

博士論文

進行下部直腸癌に対する
術前化学放射線療法（CRT:chemoradiotherapy）の
治療効果に関する免疫学的検討

多田 訓子

目次

目次	1
略語一覧	3
はじめに	4

第1章 進行性直腸癌患者に対する術前化学放射線治療の効果と 末梢血中リンパ球数の関係.....	7
1. 目的	8
2. 対象および方法	9
1. 対象.....	9
2. CRT に対する効果判定.....	11
3. 血液検体とリンパ球分画の分析.....	12
4. 統計解析	14
3. 結果.....	15
1. 臨床病理学的背景.....	15
2. CRT 前後の白血球 subpopulations と病理学的効果	18
3. CRT 前後のリンパ球 subsets と病理学的効果	18
4. CRT 前後のリンパ球 subsets と腫瘍縮小率	21
5. CRT 前後のリンパ球 subsets と病理学的因子	22
6. CRT 効果の予測因子としてのリンパ球 subsets の可能性	23
4. 考察.....	28

第2章 進行性直腸癌患者に対する術前化学放射線治療の効果と 末梢血中サイトカイン濃度の関係	33
1. 目的	34
2. 対象および方法	35
1. 対象	35
2. CRT に対する効果判定	35
3. サイトカイン濃度の測定	35
4. 統計解析	37
3. 結果	38
1. 臨床病理学的背景	38
2. CRT 前後のサイトカイン濃度と病理学的効果	40
3. CRT 前後のサイトカイン濃度変化	42
4. 血小板とサイトカイン	47
4. 考察	49
第3章 まとめ・今後の展望	55
謝辞	56
参考文献	57

略語一覽

AUC: area under the curve
BSA: bovine serum albumin
CCL-5: chemokine ligand-5
CR: complete response
CRT: chemoradiotherapy
CT: computed tomography
EGFR: epithelial growth factor receptor
FACS: fluorescence-activated cell sorter
FITC: fluorescein isothiocyanate
IFN: interferon
MCP-1: monocyte-chemoattractant protein-1
MDSCs: myeloid-derived suppressor cells
MRI: magnetic resonance imaging
PBS: phosphate-buffered saline
PE: phycoerythrin
PET: positron emission tomography
QOL: quality of life
RANTES: regulated on activation normal T-cell expressed and secreted
ROC: Receiver Operating Characteristic
sCD40L: soluble CD40 ligand
Tc: cytotoxic T lymphocyte
Th: helper T lymphocyte
TIL: tumor infiltrating lymphocytes
TNF: tumor necrosis factor
TRAIL: tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand
WBC: white blood cells

はじめに

大腸癌は、欧米のみならず日本においても罹患率、死亡率の高い疾患である。大腸癌治療において、予後の改善に最も寄与するのは癌病巣の根治的切除である。直腸癌においても同様であるが、直腸癌は解剖学的な特徴から結腸癌と比較した場合、局所再発の割合が高いことが知られている。その解剖学的な特徴の1つは直腸が骨に囲まれた狭い骨盤腔に存在していることであり、大きな腫瘍が存在する場合には外科的アプローチが難しく切除断端が確保困難になり、人工肛門造設、局所再発の割合が高くなる。また直腸周囲には排尿・性機能に関する自律神経が接近して密集しており、側方廓清を行った際に機能障害が問題となる。

このように結腸癌と比較した場合に直腸癌のほうが切除による人工肛門造設、QOL低下が起こる可能性が高いため、補助療法として術前化学放射線療法（CRT：chemoradiotherapy）がおこなわれることがあり、欧米では標準治療となっている。また、術前 CRT による腫瘍の縮小効果が、根治切除率と密接に関係し、局所再発率を低下させることが報告されており[1-3]、日本でも進行下部直腸癌に対し術前 CRT が行われるようになってきている。

しかし、患者によって CRT の効果が異なることはしばしば認められることである。CRT が著効した症例の手術検体では主病巣にもリンパ節にも腫瘍細胞を認めないが、一方で CRT の効果がほとんど認められない症例もある[4-6]。

もし CRT 開始前に治療に対する反応が予測できれば、CRT に対して抵抗性を示す腫瘍や CRT 効果が期待されない患者に対しては CRT の施行を避け、CRT に関連する副作用を回避し、CRT に費やす治療費や時間を免れることができるかもしれない。

このような CRT 効果の差に対して、これまで多くの予測因子が検討され、p53、epithelial growth factor receptor (EGFR)、Ki-67、p21[7-10]などが候補として挙げられている。また、直腸癌の放射線感受性を予測し得る因子として、Ku70、Ku86、P16、テロメラーゼ逆転写酵素の telomerase reverse transcription などが報告されている[11-13]。さらに、直腸癌の遺伝子発現と病理学的腫瘍縮小の関係について DNA マイクロアレイ解析した報告もある[14]。これらの研究は、癌細胞に及ぼす放射線照射の直接傷害（DNA 傷害・アポトーシス）が、抗癌剤・放射線に対する直腸癌の感受性と密接に関連するという考えに基づいて行われている。しかし、直腸癌の腫瘍縮小効果には放射線の直接傷害のみではなく、腫瘍の微小環境や宿主の免疫応答も関係している[15, 16]。当教室からの最近の報告では、腫瘍内に浸潤しているリンパ球（TIL : tumor infiltrating lymphocytes）の割合、末梢血中のリンパ球の割合が、CRT の効果と有意に関連することを確認しており[17-19]、宿主の抗腫瘍免疫が CRT の腫瘍縮小効果に重要な役割を果たすことを示唆する結果であった。抗腫瘍免疫において、腫瘍組織内及び末梢血中のリンパ球が重要であることが知られており、CRT の抗腫瘍効果においても重要と考えられる。

これまで報告された CRT の治療効果予測因子の多くは、放射線照射に対する腫瘍

細胞の治療抵抗性を予測するためのものであり、宿主の免疫機能を評価したものは近年増えつつある。マウスモデルにおいて、T細胞の除去は放射線照射の効果減少につながることを確認されている[20]。また CD4(+)、CD8(+)TIL の割合が高いと CRT 後の病理学的効果が高く、CD8(+) TIL の割合が CRT 後の CR 達成に関連する独立した予測因子であることを当教室から報告している[19]。さらには、直腸癌患者の CRT 前の末梢血中リンパ球数が多いと病理学的治療効果が高かったことより CRT の治療効果に関与することも報告した[18]。同様に CRT 前のリンパ球の割合が高いと CRT 効果が高かったという結果が報告されているが[21]、CRT 効果に関与する抗腫瘍免疫において、最も重要となるリンパ球分画などの詳細な検討はなされていない。

また、腫瘍免疫機構はサイトカインやケモカイン（以下、サイトカイン）により調節されることはこれまでも十分に知られている。抗腫瘍作用を有する免疫担当細胞を活性化、誘導するサイトカインが産生される一方、この機構に対して抑制的に作用するサイトカインも産生され、腫瘍の成長を助長する場合もある[22, 23]。放射線照射が腫瘍組織で引き起こす炎症反応に伴い、様々なサイトカインが産生され、炎症細胞が集積することも知られているが[24, 25]、そのメカニズムについては完全に解明されておらず、CRT に伴って産生されるサイトカインの詳細についても報告は存在しない。

そこで今回、我々は、末梢血中の免疫細胞が直腸癌の CRT 効果予測因子になり得るかについて前向きに検討し、さらには CRT 効果と関連する血中サイトカインの変化について検討を行った。

第 1 章

進行性直腸癌患者に対する

術前化学放射線治療の効果と末梢血中リンパ球数の関係

目的

直腸癌に対する CRT 効果と末梢血免疫細胞の関係についての報告[17-19, 21]はいくつか存在するが、免疫細胞分画の詳細に関する報告はない。今回、末梢血免疫細胞のうち、特にリンパ球 subsets に注目し、CRT 前後におけるリンパ球 subsets の変化、また、CRT 効果との関係について詳細に分析・解析を行った。そして、リンパ球 subsets の CRT の効果予測因子として可能性について評価することを目的とした。

対象および方法

1. 対象

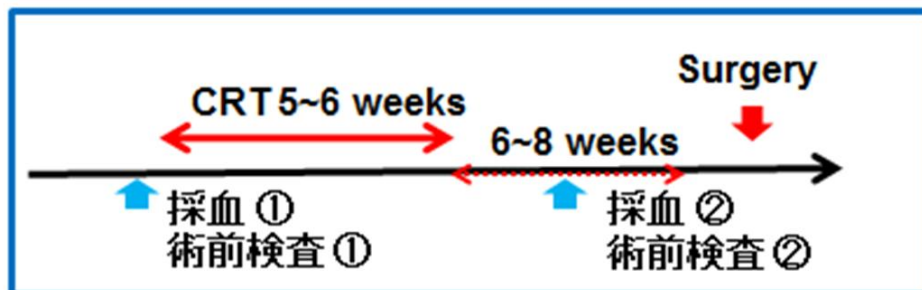
2010 年 1 月から 2012 年 6 月に、東京大学医学部附属病院大腸肛門外科にて術前検査を施行し原発性進行下部直腸癌と診断され、術前化学放射線療法 (Chemo-radiotherapy CRT) の後に手術を施行した 45 症例を対象とした。なお、CRT の適応となった臨床病期が T3-4, N0-2, M0 の原発性進行下部直腸癌症例に対し CRT を施行し、その 6-8 週間経過の後、手術的摘出を行った。

本研究を遂行するに当たり、東京大学医学部研究倫理委員会の承認を得た後に、研究に関する十分なインフォームドコンセントを行い、全例より同意書を得ている。

術前 CRT は、総量 50.4Gy/25-28 回の放射線照射および Tegafur-uracil (300-500 mg/day) & leucovorin (75 mg/day) ± CPT-11 (50-80 mg/kg/2weeks) の化学療法を投与し、CRT を施行した 6-8 週間後に標準的な根治手術を行った。

CRT 前後には採血・下部内視鏡検査・CT 検査・注腸検査を行い、注腸検査にて腫瘍縮小率も算出して術前評価を行った。(図 1) また、他臓器転移が疑わしい場合には、MRI・PET を行った。

治療プロトコールと検体採取



術前検査

採血

下部内視鏡検査

CT 検査

注腸検査

(他臓器転移が疑わしい場合には、MRI・PET を追加)

注腸検査⇒ 腫瘍縮小率*を測定

$$\text{腫瘍縮小率}^*(\%) = (A-B)/A \times 100$$

A: CRT 前腫瘍最大径(mm)

B: CRT 後腫瘍最大径(mm)

図 1 術前検査方法と注腸を用いた腫瘍縮小率の算出方法

採血・下部内視鏡検査・CT 検査・注腸検査を CRT 前後に合計 2 回行った。

他臓器転移が疑わしい場合には、状況に応じて MRI・PET を行った。

また、注腸検査では腫瘍縮小率も算出した。

1 回目は CRT 前、2 回目は CRT を完了した 4-6 週間後に術前検査を施行した。

2. CRT に対する効果判定

根治手術で摘出した標本は(当院病理部医師により)病理学的に解析し、TMN 分類に基づき評価した。CRT に対する効果判定は大腸癌取り扱い規約の組織学的効果判定基準に基づき、残存する腫瘍細胞の程度に応じて以下のように分類した。

Low histological regression (Low-R): Grade 0, 1a, 1b

2/3 未満の癌細胞に変性・壊死・消失が認められる。

High histological regression (High-R): Grade 2, 3

2/3 またはそれ以上の癌細胞に変性・壊死・消失が認められる。

(「大腸癌取り扱い規約:金原出版」より引用)

3. 血液検体とリンパ球分画の解析

末梢血検体は、術前に合計 2 回、すなわち CRT 前に 1 回目、CRT 施行 4-6 週間後に 2 回目の検体を採取した。エチレンジアミン酢酸を含む採取試験管で検体を採取し、検体の血球数は自動血液分析器 (XE-5000, Sysmex, Japan) を用い、リンパ球分画 (subsets) は、モノクローナル抗体で標識した後、FACS Lysing Solution (Becton Dickinson) で処理し、フローサイトメリーにて分析した。フローサイトメリーの方法を下記に示す。

① 全血 100 μ l に標識抗体 (Becton-Dickinson 社、表 1) を各々 10 μ l 添加し、暗所・室温 (20~25 $^{\circ}$ C) で 20 分間反応させる。

② 10 倍に希釈した FACS Lysing Solution を加え、暗所・室温で 10 分間反応させる。

FACS Lysing Solution で処理することにより、全血中の赤血球を溶血し、白血球を 1%ホルムアルデヒドで固定させる。

③ 500 \times g で 5 分間遠心分離し、上清を除く。

④ 洗浄緩衝液 (0.5% ウシ血清アルブミン; BSA + 0.1% NaN₃ を含む phosphate-buffered saline; PBS) を 2-3ml 加えて、500 \times g で 5 分間遠心分離する。

⑤ 1% パラホルムアルデヒド PBS 溶液を 0.5ml 加えてよく混合し、フローサイトメーターで測定する。10,000 個のリンパ球を測定し、各リンパ球 subsets に特異的な抗体を組み合わせた two-color で解析した。(表 1)

測定には FACS Calibur Flow-cytometer (Becton-Dickinson 社) を用い、データの解析には CellQuest software を使用した。

表 1. 直接免疫蛍光染色によるリンパ球 subsets 検出

FITC/PE	リンパ球 subsets
CD3(+)/CD19(-)	T リンパ球
CD3(-)/CD19(+)	B リンパ球
CD3(+)/CD4(+)	Helper T(Th) リンパ球
CD3(+)/CD8(+)	Cytotoxic T (Tc) リンパ球
CD3(-)/CD56(+)	Natural killer cells

略語 : FITC: fluorescein isothiocyanate; PE: phycoerythrin

4. 統計解析

統計学的有意差の検定には Wilcoxon 検定を用いた。リンパ球数と腫瘍縮小率の相関関係は、Pearson の積率相関係数を求めて検討した。CRT の効果予測因子としての感度、特異度を解析するために、ROC 曲線 (Receiver Operating Characteristic curve) を用いた。データは平均値±標準偏差で表記し、 $P<0.05$ を統計学的に有意と判定した。

結果

1. 臨床病理学的背景

対象患者 45 症例の臨床病理学的背景を表 2-1 に要約した。平均年齢は 64 歳 (43-81 歳)、男性 29 例、女性 16 例であった。45 症例を病理学的効果に応じて 2 群に分類すると Low histological regression (Low-R) 群 28 症例 (62.2%)、High histological regression (High-R) 群 17 症例 (37.8%) であった。

また、治療効果別に評価した Low-R 群と High-R 群の臨床病理学的背景を表 2-2 に、病理学的効果判定の組織型が No residual cancer であった 8 症例の臨床病理学的背景を表 2-3 に要約した。

表 2-1. 本研究の患者の臨床病理学的背景

臨床病理学的因子	分類	症例数	割合(%)
性別	男性	29	64.4
	女性	16	35.6
年齢(歳)		64(43-81)*	
腫瘍縮小率(%)		43.7±20.4**	
組織学的効果判定	Low histological regression (Low-R)	28	62
	High histological regression (High-R)	17	38
深達度	pT0-pT2***	23	51.1
	pT3-pT4***	22	48.9
リンパ節転移	陰性	32	71.1
	陽性	13	28.9
リンパ管浸潤	陰性	38	84.4
	陽性	7	15.6
静脈浸潤	陰性	19	42.2
	陽性	26	57.8
組織型	tub1	21	46.7
	tub2	15	33.3
	Muc	1	2.2
	No residual cancer	8	17.8

単位は症例数であるが、例外として年齢(歳)*、腫瘍縮小率(%)**がある。

pT0 - pT4***: CRT 施行後に手術により摘出した標本検体に対する病理学的評価

表 2-2. 組織学的効果判定別の患者の臨床病理学的背景

臨床病理学的因子	分類	組織学的効果判定		P 値
		Low-R	High-R	
性別	男性	17	11	0.78
	女性	11	6	
年齢(歳)		65 (44-81)*	59 (43-73)*	0.09 “
腫瘍縮小率(%)		32.6±15.1**	62.0±13.9**	<0.01 “
深達度	pT0-pT2***	11	11	0.09
	pT3-pT4***	17	6	
リンパ節転移	陰性	19	13	0.53
	陽性	9	4	
リンパ管浸潤	陰性	23	14	0.98
	陽性	5	3	
静脈浸潤	陰性	8	10	0.04
	陽性	20	7	
組織型	tub1	15	7	
	tub2	12	2	
	Muc	1	0	
	No residual cancer	0	8	

P 値 : カイ 2 乗検定、Wilcoxon 順位和検定(“)で統計学的に検討した。

表 2-3. 病理組織学的判定が No residual cancer の 8 症例の臨床病理学的背景

臨床病理学的因子	分類	症例数
性別	男性 / 女性	4 / 4
年齢(歳)		60(43-73)*
腫瘍縮小率(%)		66.9±8.7**
深達度	pT0-pT2***/ pT3-pT4***	7 / 1
リンパ節転移	陰性 / 陽性	5 / 3
リンパ管浸潤	陰性 / 陽性	8 / 0
静脈浸潤	陰性 / 陽性	6 / 2

2. CRT 前後の白血球分画と病理学的効果

CRT 前後の白血球数、リンパ球 subsets の割合・数と病理学的効果との関係を表 3 に示す。High-R 群では CRT 前の末梢血中のリンパ球数が Low-R 群と比較すると有意に多かった。(CRT 前のリンパ球数; Low-R 群は 1612.4 ± 498.0 cells/ μ l、High-R 群は 1997.1 ± 610.9 cells/ μ l; $P=0.042$)

リンパ球以外の白血球分画 に関しては、CRT 前の割合・数に、High-R 群と Low-R 群間で有意差を認めなかった。また、CRT 後のこれらの白血球数、subsets の割合・数を分析したが、いずれも High-R 群と Low-R 群間で明らかな差を認めなかった。

3. CRT 前後のリンパ球 subsets と病理学的効果

次にリンパ球 subsets と病理学的効果の関係について検討を行った。(図 2)

High-R 群は Low-R 群に比べ、CRT 前の T(CD3+)リンパ球数と Th(CD4+)リンパ球数が有意に多かった(T(CD3+)リンパ球: $P=0.002$ 、Thリンパ球(CD4+): $P=0.003$)。また、有意差には至らなかったが、CRT 前の Tc(CD8+)リンパ球数は、Low-R 群に比較し、High-R 群で多い傾向が認められた。(Tc(CD8+)リンパ球: $P=0.089$)

その他のリンパ球 subsets (B cell、NK cell) の CRT 前値に関しては、High-R 群、Low-R 群間で有意差を認めず、また、CRT 後値に関しても、何れのリンパ球 subsets でも両群間に明らかな差を認めなかった。

表 3. CRT 前後の末梢白血球数と病理組織学的効果 (Wilcoxon 順位和検定)

(A) CRT 前

	Low-R	High-R	P value
WBC (cells/ μ l)	6066.7 \pm 1824.6	6737.5 \pm 1569.2	0.211
Neutrophil (%)	64.8 \pm 6.3	60.5 \pm 8.3	0.089
Neutrophil (cells/ μ l)	3982.8 \pm 1378.3	4103.3 \pm 1159.1	0.761
Lymphocyte (%)	27.5 \pm 6.2	30.3 \pm 8.2	0.252
<u>Lymphocyte (cells/μl)</u>	<u>1612.4 \pm 498.0</u>	<u>1997.1 \pm 610.9</u>	<u>0.042</u>
Monocyte (%)	5.8 \pm 1.8	5.7 \pm 1.4	0.84
Monocyte (cells/ μ l)	350.2 \pm 148.1	395.8 \pm 174.1	0.388
Eosinophil (%)	2.0 \pm 1.3	3.0 \pm 2.0	0.08
Eosinophil (cells/ μ l)	124.2 \pm 100.4	211.3 \pm 167.3	0.072
Basophil (%)	0.4 \pm 0.3	0.4 \pm 0.3	0.569
Basophil (cells/ μ l)	24.6 \pm 24.8	29.8 \pm 26.1	0.518
NLR	2.5 \pm 0.8	2.2 \pm 1.0	0.382

(B) CRT 後

	Low-R	High-R	P value
WBC (cells/ μ l)	4676.7 \pm 1506.6	4681.2 \pm 1696.4	0.869
Neutrophil (%)	70.8 \pm 7.8	68.4 \pm 8.0	0.351
Neutrophil (cells/ μ l)	3442.7 \pm 1316.7	3179.2 \pm 1154.7	0.497
Lymphocyte (%)	18.8 \pm 6.8	19.6 \pm 7.1	0.724
Lymphocyte (cells/ μ l)	829.9 \pm 260.8	961.6 \pm 618.2	0.428
Monocyte (%)	7.1 \pm 1.9	7.6 \pm 2.6	0.607
Monocyte (cells/ μ l)	337.3 \pm 143.5	348.1 \pm 159.8	0.825
Eosinophil (%)	2.5 \pm 2.4	3.5 \pm 2.5	0.206
Eosinophil (cells/ μ l)	126.4 \pm 132.4	159.3 \pm 125.7	0.422
Basophil (%)	0.4 \pm 0.4	0.3 \pm 0.3	0.301
Basophil (cells/ μ l)	19.1 \pm 19.0	14.9 \pm 18.0	0.484
NLR	4.3 \pm 1.7	4.4 \pm 2.2	0.603

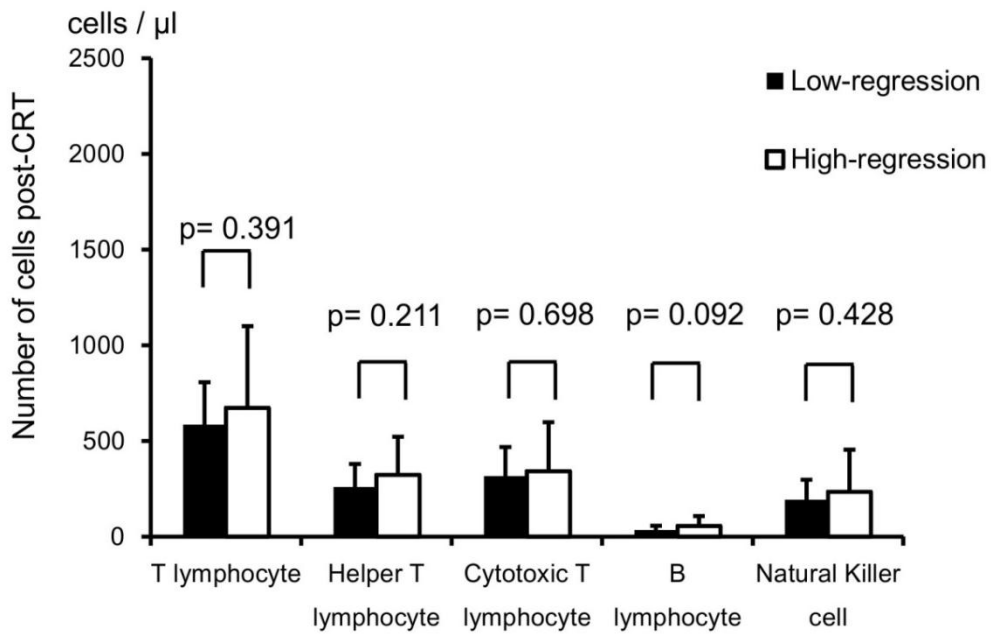
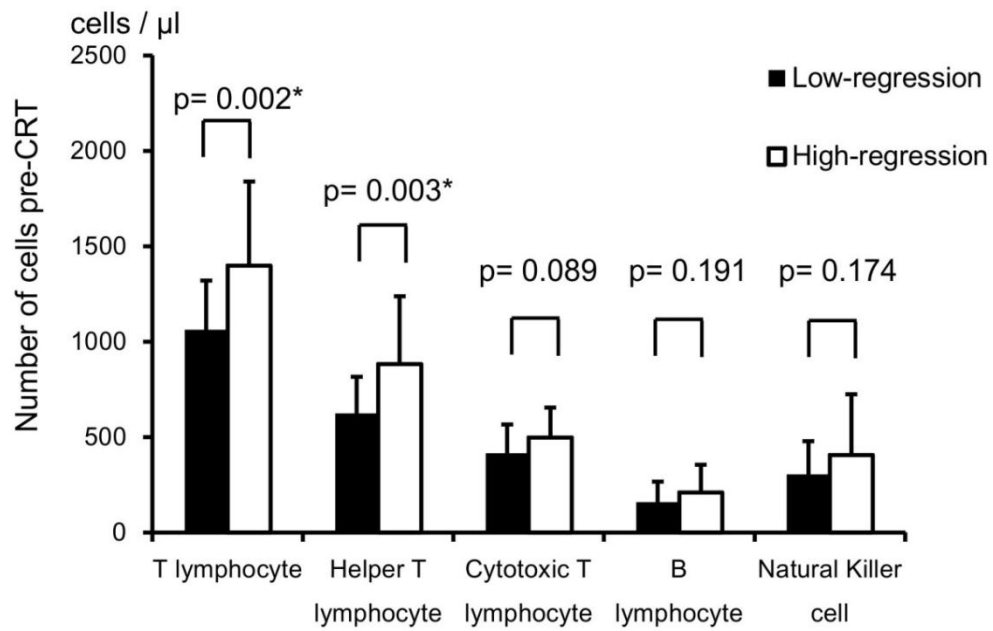


図 2 CRT 前後のリンパ球 subsets と病理学的効果

上段: CRT 前、下段: CRT 後で、黒棒が Low-R 群、白棒が High-R 群のリンパ球数を表している。Wilcoxon 順位和検定で統計学的に検討した。

4. CRT 前後のリンパ球 subsets と腫瘍縮小率

CRT 前のそれぞれのリンパ球 subsets の数と注腸検査より算出した腫瘍縮小率の相関関係について検討した。(図 3)

CRT 前の T(CD3+)リンパ球数と Th(CD4+)リンパ球数は腫瘍縮小率と正の相関関係を認めた。(T(CD3+)リンパ球: $r=0.295$, $P=0.049$, Th(CD4+)リンパ球: $r=0.305$, $P=0.042$ 、Pearson の積率相関係数) 図 3 に関して CRT 前の T(CD3+)リンパ球 2000cells/ μ l の 2 例を除外し評価したところ相関関係は $r=0.26$, $p=0.09$ となり、CRT 前の Th(CD4+)リンパ球 1500 cells/ μ l の 1 例を除外して評価すると相関関係は $r=0.303$, $p=0.05$ となった。したがって、共に相関関係が弱くなり、T(CD3+)リンパ球では有意差が失われるが、Th(CD4+)リンパ球に関しては有意差を認めた。

CRT 後のリンパ球 subsets に関しては、腫瘍縮小率との間に明らかな相関関係は認めなかった。また、治療効果別に腫瘍縮小率を評価すると High-R 群で縮小率は有意に高かった。(表 2-2:腫瘍縮小率 P 値 <0.01)

以上より、CRT 前の T(CD3+)リンパ球数、Th(CD4+)リンパ球数が多いほど腫瘍縮小効果は高く、腫瘍縮小効果が高いと CRT 効果が高いことが分かった。

これは CRT 前の T(CD3+)リンパ球数、Th(CD4+)リンパ球数が多いほど、CRT に対する病理学的効果が良好ということ进行するものであると考えられる。

5. CRT 前後のリンパ球 subsets と病理学的因子

CRT 前後のリンパ球 subsets と CRT 後に手術で摘出した検体から得られた病理学的因子の関係について表 4 に示した。CRT 前のリンパ球 subsets と深達度、リンパ節転移の有無、リンパ管浸潤の有無、静脈浸潤の有無の間に明らかな関係は認められなかった。

CRT 後のリンパ球 subsets に関しては、手術検体の病理所見で深達度が深い(T3-T4)症例で T(CD3+)リンパ球数(P=0.039)、Tc(CD8+)リンパ球数(P=0.038)が多いという結果であった。つまり今回の対象とした深達度 T3-4 の症例(CRT 前評価)が CRT 後に深達度 T0-2 に改善している場合(High-R 群)、改善していない(T3-T4)症例(Low-R 群)に比し、CRT 後の T リンパ球数、Tc リンパ球数が少ないという結果であった。一方、リンパ節転移の有無、リンパ管浸潤の有無、および静脈浸潤の有無に関しては、CRT 後のリンパ球 subsets との間に明らかな相関を認めなかった。

6. リンパ球 subsets の CRT 効果予測因子としての可能性

CRT 前の T(CD3+)、Th(CD4+)、Tc(CD8+)リンパ球数が、病理組織学的 CRT 効果の予測因子になり得るかについて評価するため、ROC 曲線を用いて評価した。図 4 に示すように、CRT 前の T(CD3+)、Th(CD4+)、Tc(CD8+)リンパ球数の AUC はそれぞれ 0.733、0.718、0.671 であった。T リンパ球の最適な cut-off 値は 1,196/ μ l であり、特異度は 68%、感度は 76% であった。Th リンパ球の cut-off 値は 683/ μ l、特異度 73%、感度 76%、Tc リンパ球の cut-off 値は 367/ μ l、特異度 54%、感度 88% であった。

次に CRT 前の T(CD3+) リンパ球・Th(CD4+) リンパ球と CRT 効果予測因子としての可能性に関してさらに検討した。CRT 効果が High-R 群の症例では、CRT 前の T(CD3+) リンパ球・Th(CD4+) リンパ球・血小板数が有意に多く、年齢・腫瘍径は有意差は認めないが傾向を認めた。(年齢 $p=0.09$ 、腫瘍径 $p=0.07$)

さらに各々の cut off 値を求めて多変量ロジスティック回帰分析のモデルにおいて、CRT 前の Th (CD4+) リンパ球数が 683cells/ μ l 以上をカテゴリーとした場合、オッズ比は 5.60 (95%信頼区間：2.24-39.72) で CRT の治療効果と優位な関連が認められた。

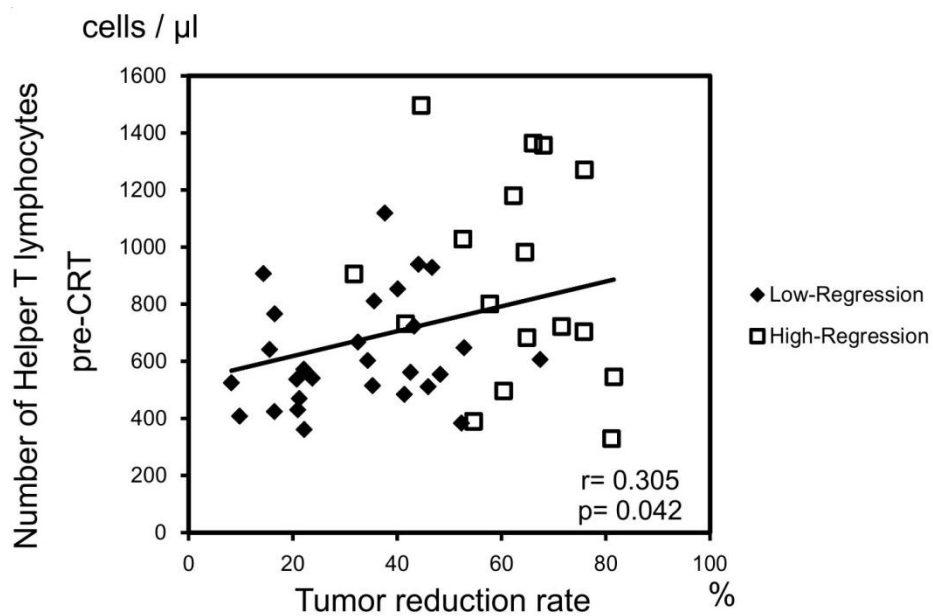
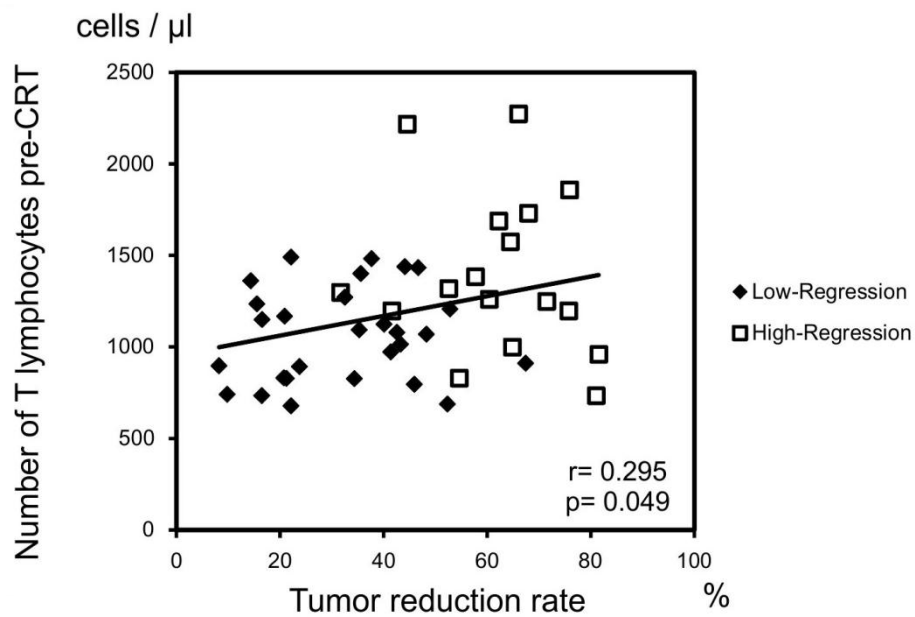


図 3. CRT 前のリンパ球数と腫瘍縮小率

CRT 前の T リンパ球数・Th リンパ球数と腫瘍縮小率に正の相関関係を認める。

Pearson の積率相関係数を用いて検討した。

表 4. CRT 前後のリンパ球 subsets と病理学的因子

深達度						
pre-CRT				post-CRT		
	ypT0-2	ypT3/4	<i>p</i>	ypT0-2	ypT3/4	<i>p</i>
T Lymphocyte	1230.9 ± 391.4	1145.5 ± 355.4	0.448	525.3 ± 173.2	727.0 ± 403.2	0.039
Th lymphocyte	752.4 ± 318.8	689.0 ± 263.5	0.472	249.0 ± 130.6	324.1 ± 176.9	0.127
Tc lymphocyte	456.2 ± 163.3	436.0 ± 151.0	0.670	266.9 ± 94.0	393.8 ± 257.9	0.038
B lymphocyte	187.1 ± 131.3	169.5 ± 117.7	0.640	41.3 ± 33.7	42.7 ± 43.2	0.910
NK cells	321.9 ± 226.6	363.9 ± 259.3	0.566	173.9 ± 97.7	248.8 ± 202.3	0.131

リンパ節転移						
pre-CRT				post-CRT		
	absent	present	<i>p</i>	absent	present	<i>p</i>
T Lymphocyte	1227.4 ± 407.6	1095.0 ± 257.0	0.285	602.7 ± 329.6	662.6 ± 281.5	0.596
Th lymphocyte	754.9 ± 324.5	639.0 ± 170.6	0.231	278.8 ± 167.1	297.5 ± 129.0	0.740
Tc lymphocyte	449.4 ± 27.9	438.6 ± 43.7	0.836	313.8 ± 203.9	358.2 ± 180.2	0.529
B lymphocyte	194.8 ± 21.6	138.4 ± 33.9	0.168	44.0 ± 41.1	36.4 ± 28.3	0.574
NK cells	301.8 ± 176.1	442.4 ± 343.7	0.076	209.3 ± 164.6	206.6 ± 144.3	0.962

リンパ管浸潤						
pre-CRT				post-CRT		
	absent	present	<i>p</i>	absent	present	<i>p</i>
T Lymphocyte	1202.2 ± 340.5	1118.3 ± 543.5	0.285	594.1 ± 320.1	738.7 ± 279.8	0.274
Th lymphocyte	725.1 ± 275.1	701.9 ± 394.9	0.849	274.2 ± 162.9	330.3 ± 118.8	0.395
Tc lymphocyte	454.4 ± 153.5	402.3 ± 174.3	0.423	310.4 ± 195.6	399.9 ± 199.1	0.279
B lymphocyte	190.1 ± 129.4	115.6 ± 59.1	0.145	43.5 ± 40.6	34.4 ± 21.3	0.571
NK cells	313.3 ± 217.4	500.8 ± 317.4	0.058	198.0 ± 154.2	260.1 ± 176.6	0.349

静脈浸潤						
pre-CRT				post-CRT		
	absent	present	<i>p</i>	absent	present	<i>p</i>
T Lymphocyte	1187.8 ± 420.9	1190.2 ± 341.5	0.984	548.2 ± 240.5	674.0 ± 358.6	0.209
Th lymphocyte	756.3 ± 319.2	696.0 ± 273.1	0.499	276.0 ± 153.1	289.9 ± 162.1	0.781
Tc lymphocyte	412.9 ± 150.7	470.7 ± 158.1	0.223	264.0 ± 114.6	374.0 ± 233.7	0.075
B lymphocyte	179.3 ± 85.1	178.0 ± 147.4	0.973	47.3 ± 46.1	37.7 ± 30.5	0.428
NK cells	247.5 ± 126.9	411.8 ± 281.1	0.022	172.3 ± 182.6	237.0 ± 132.3	0.196

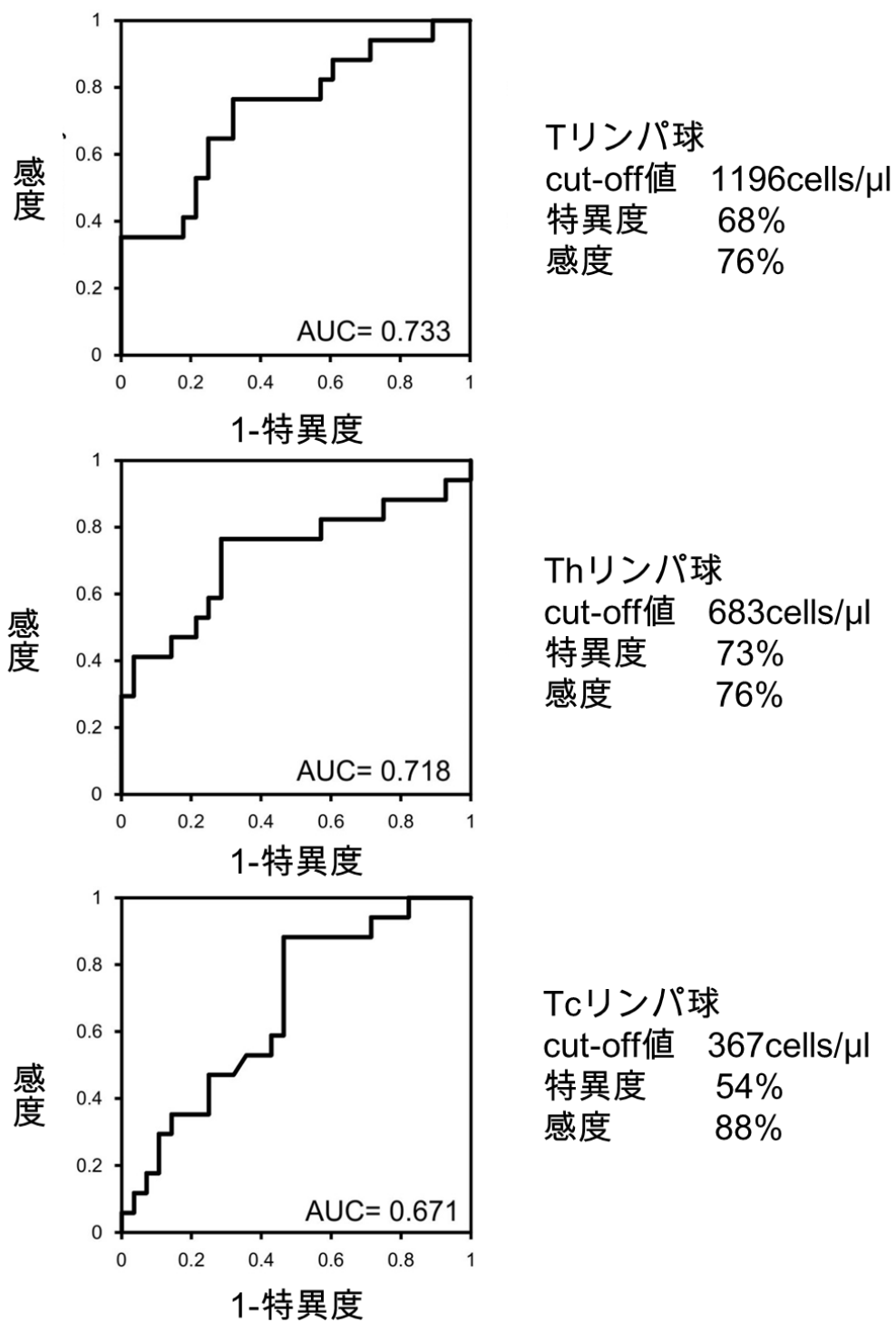


図 4. CRT 前 T, Th, Tc リンパ球数の ROC (receiver operating characteristic) 曲線

CRT の治療効果を評価する際の有用性を検討するために ROC 曲線を作成した。

表 5. CRT 前の T リンパ球・Th リンパ球と CRT 効果予測因子としての可能性

単変量解析

CRT 前	Low-R	High-R	P value
男性 / 女性 (人)	17 / 11	11 / 6	0.78*
年齢 (歳)	65 ± 9	60 ± 10	0.09
T リンパ球 (cells/μl)	1062 ± 257	1397 ± 442	< 0.01
Th リンパ球 (cells/μl)	624 ± 191	881 ± 357	< 0.01
腫瘍径 (mm)	41.5 ± 9.4	49.2 ± 14.6	0.07
Hb (g/dl)	12.7 ± 1.6	12.7 ± 1.8	0.99
血小板(10000/μl)	22.8 ± 6.1	28.7 ± 8.3	<0.02
CEA (ng/ml)	9.1 ± 9.8	11.1 ± 8.8	0.49
CA19-9 (U/ml)	42.8 ± 116	30.8 ± 38.8	0.62

Wilcoxon 検定、カイ 2 乗 *

多変量解析

CRT 前	オッズ比	95 %信頼区間	P 値
Th リンパ数	5.60	2.24-39.72	<0.01
血小板数	0.52	0.38-8.01	0.49
年齢	1.92	0.42-9.83	0.38
腫瘍径	1.86	0.46-8.27	0.38

ロジスティック回帰

考察

これまで、種々の癌患者において末梢血リンパ球数が予後と関係することが報告されている[18, 21, 26, 27]。今回の研究では末梢血リンパ球の subset についてより詳細に検討し、下部進行直腸癌患者の術前 CRT 効果の予測因子になり得るかについて検討した結果、CRT 前のリンパ球数、特に T(CD3+)リンパ球数、Th(CD4+)リンパ球数が多い症例においてより高い CRT 効果を示すことを見出した。

最初に末梢血リンパ球数と病理学的治療効果の関係について検討したところ、CRT 前の末梢血リンパ球数が多い症例において治療効果が高いことを確認し、次に治療効果と特に関係するリンパ球分画(subset)の解析を行った。血液分析器で測定するリンパ球集団にはいくつかの subset が含まれるため、それぞれの subset に特異的に発現するマーカーに対するモノクローナル抗体で標識し、フローサイトメリーにて解析を行った。その結果、CRT 前の T(CD3+)リンパ球と Th(CD4+)リンパ球は CRT の病理学的効果および腫瘍縮小率の間に相関関係を示した。すなわち、CRT 前に末梢血 T(CD3+)リンパ球数、中でも Th(CD4+)リンパ球数が多い症例では、CRT による高い腫瘍縮小効果が得られるか可能性があることを示唆する結果であった。

何れの症例においても、CRT 後の T(CD3+)リンパ球および B(CD19+)リンパ球は明らかに減少していたが、CRT 後のリンパ球 subset と CRT 効果の間には相関を認めなかった。既存の研究報告では、免疫細胞、特に Tリンパ球が放射線照射の抗腫瘍効果に関与していることが示されており[18, 19, 21]、我々の結果もそれと一致するものであった。CRT 前 T

(CD3+)、Th(CD4+)リンパ球数の AUC はそれぞれ 0.733、0.718 であった。多変量ロジスティック回帰分析の結果 Th(CD4+)リンパ球のオッズ比は 5.60 (95%信頼区間：2.24-39.72) で CRT の治療効果と優位な関連が認め、CRT 前の Th(CD4+)リンパ球数が 683cells/ μ l より少ない症例は CRT に抵抗性を持つ可能性を示し、CRT 開始前に効果予測するためのスクリーニング因子になり得ると考えられた。

これまでの報告の多くは、CRT 後に得られた切除標本の解析により CRT 効果の予測因子を探索しようとするものであるため、CRT 前に効果を予測するためには適していない。また、これらの報告で検討された因子の予測因子としての有用性を評価するためには、事前の生検などによる腫瘍組織の採取が必要であり、次のような問題を伴う。一つ目は、CRT 後の切除検体は CRT の影響を受けており、得られた結果は、治療前の腫瘍の状態を必ずしも反映しない。二つ目に、腫瘍組織の不均一性 (heterogeneity) により、生検で得られたサンプルは必ずしも腫瘍組織全体を反映しないということである。それに対して、末梢血は、全身の状態を反映し、CRT 前に容易に採取可能であるため、これまで報告されてきた腫瘍組織由来の因子よりも予測因子として応用性が期待できる。

一方、末梢血リンパ球 (Peripheral blood lymphocytes, PBL) と腫瘍内に浸潤しているリンパ球 (Tumor infiltrating lymphocytes, TIL) の関係については未だ十分に解明されていない現状がある。Milne らは卵巣癌患者の CD8(+) または CD20(+) の TIL と末梢血リンパ球 (PBL) の間には相関がなく、PBL と TIL はそれぞれ予後と有意に相関する独立した因子であると報告している[28, 49]。また、抗腫瘍免疫における PBL の重要性については、子宮頸癌、乳癌、

頭頸部癌を含む様々な癌腫において指摘されており、末梢血中のリンパ球数が多いことが予後と相関するという報告が多く存在する[26, 27]。このような知見に基づいて、我々は今回の前向き試験を計画し、PBL についてより詳細に検討することとし、次の結果を得た。まず PBL が多い症例でより高い CRT 効果が確認されたことから、CRT 効果は、腫瘍細胞に対する直接的な作用に加え、全身の免疫の活性化を介した機序が関与している可能性が考えられる。また、リンパ球分画の中で、T (CD3+)リンパ球、特に Th (CD4+)リンパ球の数が多い症例でより高い効果が確認されたことから、自然免疫応答 (innate immune response) および獲得免疫応答 (adaptive immune responses) の誘導に重要な役割を果たし、抗腫瘍免疫の誘導にも不可欠な調節細胞である Th (CD4+)リンパ球が多く存在することが CRT 効果の増強につながると考えられた。

一方、上記の病理学的な腫瘍縮小効果についての解析結果とは異なり、CRT 前の PBL (末梢血リンパ球) subset は臨床病理学的因子と相関性を示さなかった。興味深いことに、深達度が浅い(病理学的に T0-2; つまり腫瘍縮小効果が得られた)症例では、CRT 後の顕著なリンパ球数の減少を認め、リンパ球 subset では、T (CD3+)リンパ球数、特に Tc (CD8+)リンパ球数が特に減少していた。以前、我々の教室より、in vitro の系で放射線照射により誘導される PBL (末梢血リンパ球)のアポトーシスの割合が術前 CRT の病理学的縮小効果と有意に相関することを報告した[29]。今回の実験で示した CRT による臨床的奏功(深達度の改善)と PBL (リンパ球) 数減少の相関は、前述の報告結果を強く裏付けるものであった。

しかしながら、今回の我々の研究成果に関して、今後の検討が必要ないくつかの点が残さ

れている。一つは、CRT によって惹起される抗腫瘍免疫機構について、二つ目に短い患者の観察期間である。

放射線または化学療法の直接傷害効果によって腫瘍細胞はアポトーシスを誘導し、その結果産生された腫瘍特異抗原がマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞に貪食され、腫瘍特異的な Th(CD4+)リンパ球や Tc(CD8+)リンパ球が誘導される[30, 31]。さらに放射線照射した組織からは様々な化学誘因物質(CCL11 や CXCL16 など)が放出され[32, 33]、癌組織内へのリンパ球などの炎症・免疫細胞の浸潤を誘導する。この一連の機序の中で、腫瘍組織へ浸潤するリンパ球 subset の種類によって CRT 効果に差異が生じていると考えられる。この腫瘍組織内に浸潤するリンパ球(TIL)の種類を末梢血リンパ球(PBL)の解析にて評価できるかが今後の重要な課題であると考ええる。

また、今回の研究は前向き研究として実施したため、対象の観察期間が比較的短期間であり、術後再発症例は4例と少なかった。しかし、術後再発症例の4症例はすべて病理学的効果 Low-R 群であり、この結果は CRT の効果が悪いと無病率・予後が悪いというこれまでの報告[17-19]と一致した結果であった。

今後、これらの患者を長期間観察し、予後との相関を検討していく必要がある。また、症例数を増やすことで、より正確な解析が可能となると考える。今回の研究結果により、全身免疫の解析によって、術前 CRT 効果を効率的に予測できる可能性を示した。末梢血 T(CD3+)リンパ球数と Th(CD4+)リンパ球数を事前に評価することにより、CRT 効果を予測できれば、効果が期待できない症例に対して CRT 実施に伴う副作用や時間的・経済的な負担を排除

し、より効果的な治療法の選択に役立てられること期待する。

第 2 章

進行性直腸癌患者に対する術前化学放射線治療の効果と

末梢血中サイトカイン濃度の関係

目的

第1章で直腸癌に対する CRT 効果の予測因子として CRT 前のリンパ球数、特に T リンパ球数の有用性を示した。CRT の抗腫瘍効果には、癌細胞に対する直接的な障害作用に加え、宿主の免疫機構を介した機序もあると考えられている。宿主で誘導される腫瘍免疫機構には、免疫細胞や腫瘍細胞が産生する様々なサイトカインやケモカインが重要な役割を果たしていること[22-25]は知られているが、CRT 効果との関係は十分に解明されていない。そこで、第2章では、CRT 前後の血中サイトカインの変動および CRT 効果とサイトカインの関係について検討を加えた。それによって、宿主免疫細胞と腫瘍細胞の相互作用におけるサイトカインの役割、また、CRT 効果に影響を及ぼすサイトカインを明らかにし、新たな CRT 効果予測因子を探索することを目的とした。

対象および方法

1. 対象

2. CRT に対する効果判定

1.2 に関しては第 1 章に記載した内容と同様であり、CRT 前後に採血を行った。

3. サイトカイン濃度の測定

サイトカイン測定に必要な検体を血清用採血管で採取し(第一章同様、CRT 前後の合計 2 回)、室温約 10 分間 3,000rpm で遠心・分離し、測定するまで-40℃で保存した。

第 1 章でリンパ球、特に T リンパ球、Th リンパ球が CRT の効果に影響を及ぼす可能性が示唆されたことから、白血球から産生されるケモカインのうち、Th1、Th2 サイトカイン（インターロイキン-2, IL-4, IL-6, IL-10, インターフェロン- γ など）をはじめ、CRT に伴って変化することが報告されている炎症性サイトカイン（IL-1, IL-6, TNF- α , sCD40L など）、またそれに加え、免疫細胞の誘導に関与するケモカイン（monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, C-C chemokine receptor type 5 (CCR-5) (RANTES)など）の測定も行うこととした。これらのサイトカインを組み合わせた Luminex 法のキットを用いたが、コスト面より今回は下記の 10 種類のサイトカインに限定した。

末梢血サイトカイン: インターロイキン (Interleukin (IL))-2, IL-4, IL-6, IL-10, インターフェロン (Interferon (IFN))- γ , Tumor necrosis factor (TNF)- α , monocyte chemoattractant protein

(MCP)-1, C-C chemokine receptor type 5 (CCR-5) (RANTES), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), および soluble (s)CD40-Ligand (L) の合計 10 種類の検量線用抗原溶液を含む Procarta polystyrene beads-based multiplex immunoassay (Affymetric Inc, Santa Clara, CA) を付属のプロトコールに準じて Luminex 法にて測定し、Luminex IS2.2/2.3 software を用いてデータ进行分析した。

低温 (-40℃) で保存したサンプルを 20-25℃ で 20-30 分間静置して解凍し、1,000×g、20-25℃ で 10 分間遠心し上清を回収しサンプルを調整した。

Antibody Beads を付加した付属の ELISA 用 96 穴プレートに、サンプルと検量線用抗原溶液を 25μl 毎加えて室温、500rpm で 60 分間振盪インキュベーションし付属の Wash Buffer で洗浄した。次に Detection Antibody を 25μl ずつ加え 500rpm で 30 分間振盪インキュベーションし Wash Buffer で洗浄した。さらに Streptavidin-PE を 50μl 毎加え 500rpm で 30 分間振盪インキュベーションし Wash Buffer で洗浄した。最後に Reading Buffer を 120μl 毎加え 500rpm で 5 分間振盪インキュベーションし、Luminex/Bio-Plex で測定した。標準血清を段階希釈して得られた容量依存曲線より、サンプルの各サイトカイン濃度を算出した。

4. 統計解析

統計学的有意差の検定には Wilcoxon 検定を用い、また CRT 前後のサイトカイン濃度の変化は Paired t 検定を用いて評価した。サイトカイン濃度と血小板数の相関関係は、Pearson の積率相関係数を求めて検討した。データは平均値±標準偏差で表記し、 $P<0.05$ を統計学的に有意と判定した。

結果

1. 臨床病理学的背景

対象患者はサイトカイン測定検体を CRT 前後に採取できた 35 症例とした。臨床病理学的背景を表 6 に要約した。平均年齢は 62 歳 (43-85 歳)、男性 23 例、女性 12 例であった。35 症例を病理学的効果に応じて 2 群に分類すると Low histological regression (Low response, Low-R) 群 18 症例(51.4%)、High response (High-R) 群 17 症例(48.6%)であった。

表 6. 本研究の患者の臨床病理学的背景

臨床病理学的因子		症例数	割合(%)
性別	男性	23	65.7
	女性	12	34.3
年齢(歳)		62(43-85)*	
組織学的効果判定			
	Low histological regression (Low-R)	18	51.4
	High histological regression (High-R)	17	48.6
深達度	pT0-pT2	17	48.6
	pT3-pT4	18	51.4
リンパ節転移	陰性	24	68.6
	陽性	11	31.4
リンパ管侵襲	陰性	31	88.6
	陽性	4	11.5
静脈侵襲	陰性	14	40.0
	陽性	21	60.0
組織型	Well-differentiated adenocarcinoma	13	37.1
	Moderately-differentiated adenocarcinoma	15	42.9
	Mucinous adenocarcinoma	1	2.9
	No residual cancer	6	17.1

2. CRT 前後のサイトカイン濃度と病理学的効果

CRT 前後のサイトカイン濃度と病理学的効果との関係を表 7 に示す。CRT 後の IL-6、および TNF- α 濃度は、High-R 群に比較し Low-R 群で有意に高値であった。一方、その他の CRT 後サイトカイン濃度および CRT 前サイトカイン濃度に関しては、Low-R 群および High-R 群で有意な差は認められなかった。

表 7. CRT 前後のサイトカイン濃度と病理組織学的効果 (Wilcoxon 順位和検定)

(A) CRT 前

	Low-R	High-R	P value
IFN- γ (pg/ml)	0.51 \pm 0.82	0.33 \pm 0.59	0.946
IL-10(pg/ml)	1.31 \pm 1.76	0.85 \pm 1.08	0.732
IL-2(pg/ml)	3.36 \pm 5.27	1.51 \pm 2.64	0.540
IL-4(pg/ml)	8.39 \pm 12.24	7.03 \pm 9.23	0.573
IL-6(pg/ml)	11.14 \pm 11.59	8.49 \pm 7.28	0.804
MCP-1(pg/ml)	8.68 \pm 3.35	9.78 \pm 4.29	0.467
CCL-5(ng/ml)	37.82 \pm 24.50	35.41 \pm 18.61	0.863
sCD40L(ng/ml)	1.53 \pm 1.18	1.62 \pm 1.05	0.759
TNF- α (pg/ml)	4.31 \pm 4.99	2.08 \pm 2.91	0.205
TRAIL(pg/ml)	52.01 \pm 55.50	39.47 \pm 19.21	0.815

(B) CRT 後

	Low-R	High-R	P value
IFN- γ (pg/ml)	0.37 \pm 0.48	0.18 \pm 0.33	0.062
IL-10(pg/ml)	1.18 \pm 1.41	0.97 \pm 1.33	0.587
IL-2(pg/ml)	2.48 \pm 3.94	1.37 \pm 2.83	0.552
IL-4(pg/ml)	8.20 \pm 11.13	5.4 \pm 5.63	0.866
<u>IL-6(pg/ml)</u>	<u>50.12\pm82.94</u>	<u>11.42\pm17.57</u>	<u>0.028*</u>
MCP-1(pg/ml)	7.65 \pm 4.49	6.80 \pm 3.98	0.457
CCL-5(ng/ml)	37.81 \pm 26.01	34.94 \pm 35.49	0.293
sCD40L(ng/ml)	1.43 \pm 0.95	1.26 \pm 0.86	0.586
<u>TNF-α(pg/ml)</u>	<u>9.11\pm13.28</u>	<u>1.65\pm2.19</u>	<u>0.005*</u>
TRAIL(pg/ml)	56.85 \pm 71.76	31.20 \pm 15.79	0.07

3. CRT 前後のサイトカイン濃度変化

次に CRT 前後のサイトカイン濃度の変化について検討した。(図 5) CRT 前後で比較すると、sCD40L 濃度は、CRT 前に比べ、CRT 後に明らかに減少した。また IL-6 濃度は、CRT 後に増加傾向を示したが、有意差には至らなかった。その他のサイトカイン濃度には CRT 前後で有意な濃度変化は認めなかった。

次に Low-R 群と High-R 群間で CRT 前後のサイトカイン濃度変化を比較すると(表 8)、sCD40L および CCL5 濃度は High-R 群でのみ、CRT 前に比べ CRT 後に明らかな減少を認めた。また Low-R 群では、CRT 前に比較し CRT 後の IL-6 濃度が有意に増加した。(図 6)

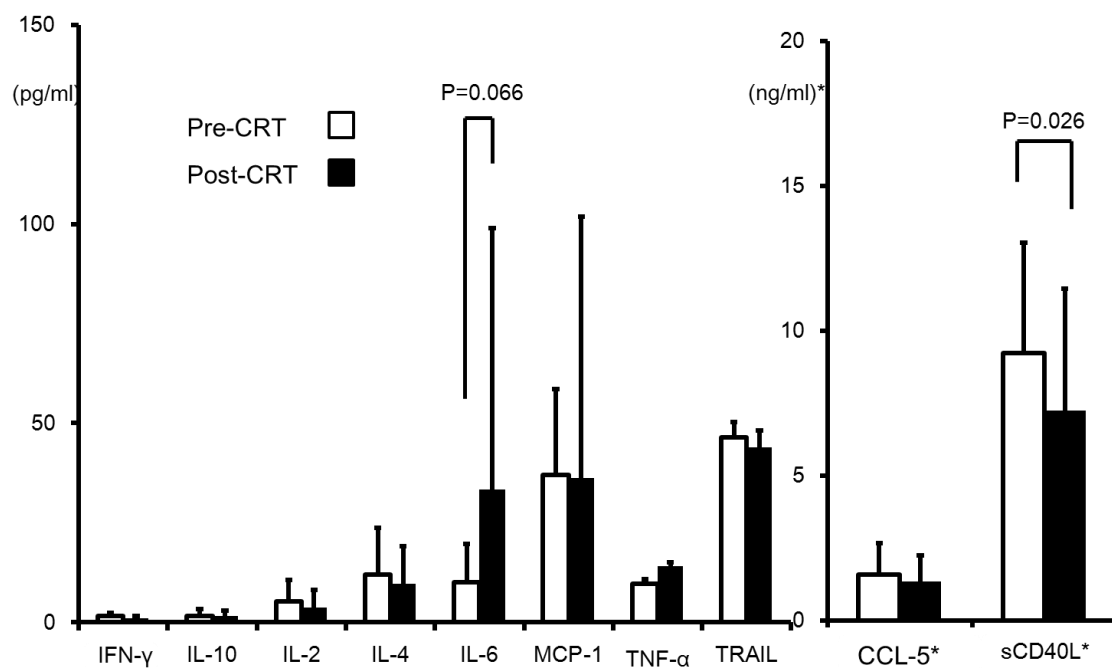


図5 サイトカイン濃度 — CRT 前後の比較(全症例)

白棒が CRT 前、黒棒が CRT 後のサイトカイン濃度を示す。

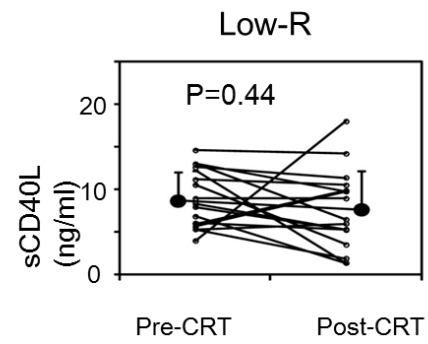
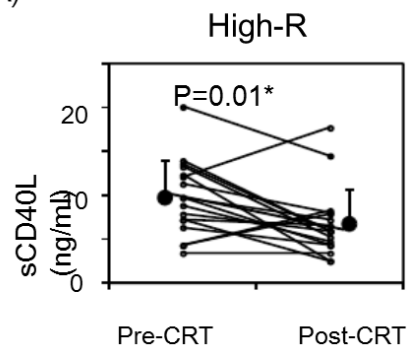
Paired t 検定にて解析した。

表 8. CRT 前後のサイトカイン濃度変化と病理組織学的効果 (Paired t検定)

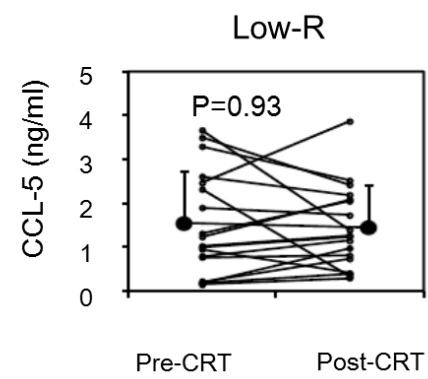
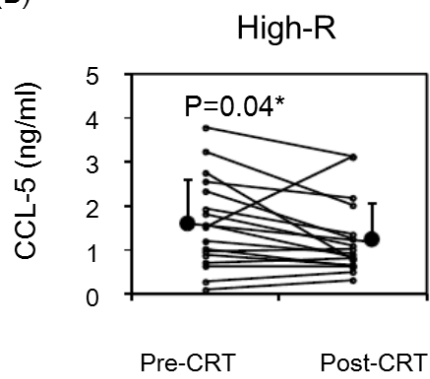
High-R 群 CRT 前後の変化			
	CRT 前	CRT 後	P value
IFN- γ (pg/ml)	0.33 \pm 0.59	0.18 \pm 0.33	0.27
IL-10(pg/ml)	0.85 \pm 1.08	0.97 \pm 1.33	0.72
IL-2(pg/ml)	1.51 \pm 2.64	1.37 \pm 2.83	0.51
IL-4(pg/ml)	7.03 \pm 9.23	5.4 \pm 5.63	0.39
IL-6(pg/ml)	8.49 \pm 7.28	11.42 \pm 17.57	0.67
MCP-1(pg/ml)	9.78 \pm 4.29	6.80 \pm 3.98	0.94
CCL-5(ng/ml)	35.41 \pm 18.61	34.94 \pm 35.49	0.04
sCD40L(ng/ml)	1.62 \pm 1.05	1.26 \pm 0.86	<u>0.01</u>
TNF- α (pg/ml)	2.08 \pm 2.91	1.65 \pm 2.19	0.49
TRAIL(pg/ml)	39.47 \pm 19.21	31.20 \pm 15.79	0.42

Low-R 群 CRT 前後の変化			
	CRT 前	CRT 後	P value
IFN- γ (pg/ml)	0.51 \pm 0.82	0.37 \pm 0.48	0.75
IL-10(pg/ml)	1.31 \pm 1.76	1.18 \pm 1.41	0.78
IL-2(pg/ml)	3.36 \pm 5.27	2.48 \pm 3.94	0.89
IL-4(pg/ml)	8.39 \pm 12.24	8.20 \pm 11.13	0.62
IL-6(pg/ml)	11.14 \pm 11.59	50.12 \pm 82.94	<u>0.05</u>
MCP-1(pg/ml)	8.68 \pm 3.35	7.65 \pm 4.49	0.82
CCL-5(ng/ml)	37.82 \pm 24.50	37.81 \pm 26.01	0.93
sCD40L(ng/ml)	1.53 \pm 1.18	1.43 \pm 0.95	0.44
TNF- α (pg/ml)	4.31 \pm 4.99	9.11 \pm 13.28	0.38
TRAIL(pg/ml)	52.01 \pm 55.50	56.85 \pm 71.76	0.99

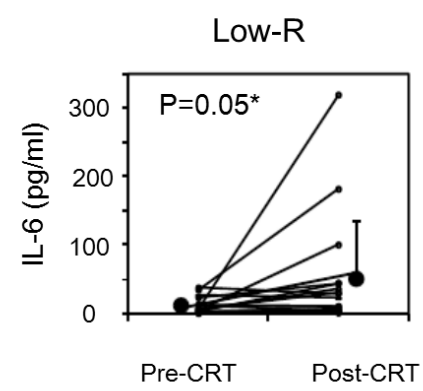
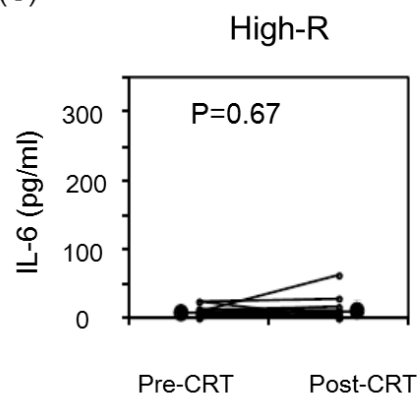
(A)



(B)



(C)



(D)

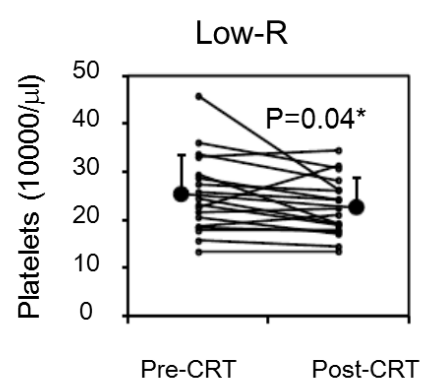
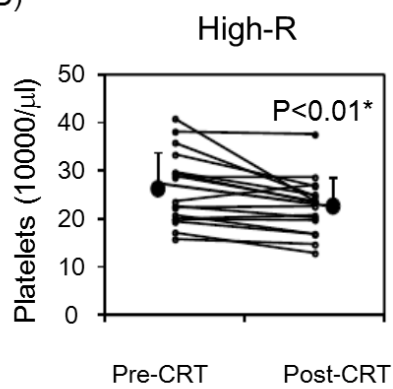


図 6 サイトカイン濃度、血小板数の変化 — High-R 群および Low-R 群の CRT 前後の比較

(A)sCD40L 濃度、(B)CCL-5 濃度、(C)IL-6 濃度、(D)血小板数の CRT 前後の変化を示し

ている。左図が High-R 群、右図が Low-R 群を各々示している。

Paired t 検定にて解析した。

4. 血小板とサイトカイン

sCD40L、およびCCL-5は主に血小板から放出されることが知られている。そこで、CRT前後の血小板数の変化、またsCD40LとCCL-5濃度の関係についてCRT効果別に評価・分析を行った。

血小板数はHigh-R群およびLow-R群共にCRT後に有意な減少を示したが、High-R群の方が顕著であった。(図6-D)また、High-R群のCRT前の血小板数は、CRT前のsCD40L濃度と明らかな正の相関関係を示した。(図7)一方でLow-R群の血小板数とsCD40L濃度には相関関係は認めず、またCRT後はHigh-R群でもLow-R群でも相関関係を認めなかった。CCL-5およびその他のサイトカインと血小板の関係についても同様の検討を行ったが、いずれも明らかな関係は認めなかった。

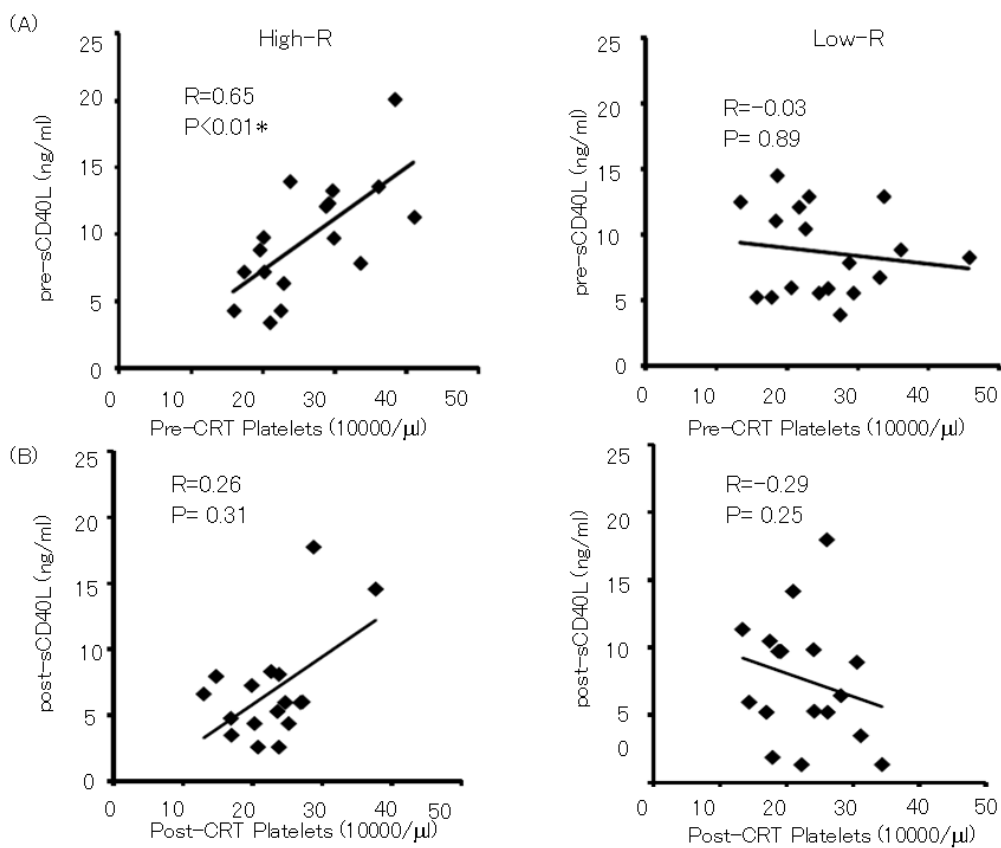


図7 CRT 前後の血小板数と sCD40L 濃度の相関

(A)CRT 前、(B)CRT 後の血小板数と sCD40L 濃度の関係を示している。

左図が High-R 群、右図が Low-R 群を各々示している。

Pearson の積率相関係数にて解析した。

考察

本検討では、CRT が血中サイトカイン濃度に及ぼす影響を検討すると同時に、CRT 効果を予測し得るサイトカインを探索することを目的とした。

第一章でも述べたとおり、CRT によって局所および全身の免疫が活性化され、抗腫瘍免疫が誘導される可能性がある。抗腫瘍免疫の誘導には様々なサイトカインが関与し、免疫細胞や炎症細胞の遊走、また細胞-細胞間の相互作用、シグナル伝達に重要な役割を果たしている[22-25]。

今回、CRT 治療効果別に、CRT 前後のサイトカイン濃度を評価したが、CRT 前は、何れのサイトカインも両群で明らかな有意差を認めず、目的としていた CRT 治療予測因子になり得るサイトカインを見出すことはできなかった。しかし CRT 後のサイトカインに関しては、High-R 群に比して、Low-R 群で IL-6 と TNF- α が有意に高く、TRAIL も高い傾向にあった。これらのサイトカインは一般的に炎症性サイトカインとして分類されており、高レベルの炎症性サイトカインへの曝露は腫瘍形成・増殖を促進することが知られている [50,51]。本研究の結果から、特に IL-6 および TNF- α は CRT に伴う組織傷害・炎症を反映している可能性が示唆され、CRT 後に高濃度の炎症性サイトカインへの暴露により腫瘍増殖が促進し、CRT 効果が減弱した可能性が考えられた。

次に CRT 前後のサイトカイン濃度変化について検討することとした。CRT によるサイトカインの変化は sCD40L が CRT 後に有意に減少し、一方で IL-6 は CRT 後に増加傾向を示した。これらのサイトカイン濃度の変化を CRT 効果別に評価すると、sCD40L の CRT 後の有意

な減少は High-R 群のみで、IL-6 の CRT 後の増加は Low-R 群のみで認められた。

近年、血小板と免疫系の相互作用が注目されており[48]、その相互作用において血小板から遊離する可溶性 soluble (s) CD40L が重要な役割を果たすとされている[34, 35]。この sCD40L のほとんどは血小板から産生されているが、リンパ球の表面にも CD40L が発現しており sCD40L の source になることも知られている[34, 35]。今回、CRT がサイトカインに及ぼす影響について解析したところ、血小板数は High-R 群および Low-R 群で、CRT 前に比較し CRT 後に有意に減少した。sCD40L は主に血小板より遊離することから、CRT 後の sCD40L の有意な減少は、単に血小板数の減少を反映しているだけかもしれない。しかし、CRT の効果別に解析すると、CRT 後の sCD40L の有意な減少は High-R 群のみで認められ、Low-R 群の sCD40L の有意な変化は認められなかった。さらに sCD40L と血小板について CRT 前後、治療効果別に検討を加えた。High-R 群の CRT 前の sCD40L と CRT 前の血小板数は正負の相関関係を示し、Low-R 群においては CRT 前の血小板数と sCD40L の間に相関は認められなかった。また CRT 後は High-R 群と Low-R 群の両群で sCD40L と血小板数に明らかな関係は認められなかった。

本研究では High-R 群の CRT 前の血小板数と sCD40L に正の相関関係を認めたことより、CRT 効果には主に血小板から産生される sCD40L が関与している可能性があると考えられ、今後 sCD40L と血小板について研究を進めることが CRT 効果を予測する因子の発見に有用であると考えている。

CD40 は、TNF 受容体ファミリーに属する I 型膜貫通型タンパクであり、様々な癌腫に広く

発現することが確認されている。しかし、癌細胞に発現する CD40 の機能については未だ不明な点が多い。大腸癌においても CD40 の発現が確認されており[36, 37]、そのリガンドである sCD40L を投与することによって大腸癌細胞株のアポトーシスが誘導され、増殖が抑制されることが報告されている[36]。卵巣癌[37]、膵癌[38]、胃癌[39]や乳癌[40]でも同様の抑制効果が確認されている。一方で、CD40 – sCD40L の相互作用により、腫瘍細胞の増殖が促進するという報告も存在する[41]。

今回の検討で確認された High-R 群でのみ見られた CRT 後の sCD40L の減少の機序として、これまでの報告を参考に以下の 2 つの機序が考えられた。1)今回、摘出した大腸癌組織における CD40L の発現は調べていないが、血中に放出された sCD40L が CD40 を発現する癌細胞に作用し、アポトーシス誘導を促した可能性が考えられる。2) sCD40L が免疫細胞に発現する CD40 に作用し、腫瘍免疫機構を活性化して、抗腫瘍効果を促した可能性も考えられる。これらの抗腫瘍効果が発揮された場合、血中の sCD40L が消費によって減少し、今回の検討で High-R 群でのみ見られた CRT 後の sCD40L の減少が確認されたに可能性がある。

また近年、骨髄系の免疫抑制性細胞であり、CD40 を強発現する myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) の増殖を sCD40L が促し、T リンパ球の増殖抑制を伴う免疫抑制を誘導することが報告されている[36, 41]。動物実験において、腫瘍組織内に浸潤している MDSCs が CCL-5 を産生し制御性 T リンパ球 (regulatory T cells, Treg) を誘導することにより、抗腫瘍免疫を抑制し、その結果、腫瘍増殖を促進することが確認されている[42]。今回の研

究では CRT 前後および病理学的効果に関わらず、sCD40L と MDSCs の間に明らかな相関は認めなかったことから (CRT 前: High-R 群 P 値=0.46、Low-R 群 P 値=0.71) (CRT 後: High-R 群 P 値=0.67、Low-R 群 P 値=0.26)、MDSC の関与は否定的であった。

また、本研究では CRT による炎症性サイトカインの変化を治療効果別に検討した。Low-R 群では CRT 後の IL-6 濃度は上昇していた。Low-R 群の 18 症例中で 3 症例において CRT 後の著しい IL-6 濃度上昇が認められたため、CRT 後の IL-6 濃度が 100pg/ml 以上の 3 症例を除外して評価すると P 値は 0.07 となった。したがって Low-R 群では CRT 後に IL-6 濃度の上昇傾向を認めたが、一方で High-R 群では、CRT に伴った IL-6 濃度の上昇は認めなかった。CRT 前後の TNF- α 、TRAIL 濃度変化は治療効果別に検討したが、有意な変化は認めなかった。

IL-6、および TNF- α の上昇が大腸癌患者の予後不良と相関することはこれまでも報告されており[43-46]、CRT 実施期間中に IL-6 が上昇することもすでに報告されているが[47]、CRT 効果との関係については報告されていない。本研究の結果、CRT の治療効果によりサイトカインの反応が異なることを見出した。

本研究で測定した 2 回目の採血は CRT 後 6-8 週間経過した時期であり、CRT 終了後も強い炎症反応が伴い持続していることが腫瘍形成を促し、また腫瘍細胞から放出されるサイトカインの抗腫瘍免疫を抑制する結果[46]、CRT 効果が減弱すると考えられた。このように CRT 後の IL-6 および TNF- α の上昇は、CRT 効果不良の指標となり得ると考えられたが、CRT 前後のサイトカイン濃度を評価する必要性があることから、CRT 効果の予測因子として

臨床応用することは困難である。

最近、CRT 前の血小板数が直腸癌の CRT 効果、局所再発、および無病率と関連することを当研究室から報告した[48]。血小板増多症(血小板数 36.5 万/ μ l 以上)を有する患者を血小板数正常(血小板数 14.0 万～36.5 万/ μ l)患者と比較すると、前者では CRT 効果が弱いことが確認された。今回の症例を、血小板数により同2群に分類して解析したところ、血小板増多症を伴う患者はわずか 2 症例であり、うち 1 例は High-R 群で、もう 1 例は Low-R 群に分類されたため、解析が不可能であった。興味深いことに血小板数は High-R 群でも Low-R 群でも CRT 後に有意に減少していたが、High-R 群でより顕著な減少が認められた。血小板数と CRT 効果の間に明らかな関係性を見出すことはできなかったが、血小板が sCD40L、CCL-5 を主に産生することを考慮すると、サイトカインと抗腫瘍免疫をつなぐ複雑な機構の中心的な役割を血小板が担っている可能性がある。これまでの報告によると sCD40L は主に抗腫瘍免疫に促進的に作用し、一方で CCL-5 は抗腫瘍免疫に抑制的に作用すると考えられているが、血小板も含め免疫状態が良好な患者は、CRT に伴って抗腫瘍免疫を効果的に誘導でき、一方で免疫状態が衰えている患者では十分な抗腫瘍免疫が誘導できないための結果であると考えられる。

今回の検討から、免疫系細胞、血小板、癌細胞の間にサイトカインを介した複雑な相互作用が存在し、CRT という刺激が加わることで、これらの細胞が独自または相互に反応し、癌に対する有利または不利な環境が作られてしまい、それによって CRT の効果が決定されることが考えられた。本研究の限界は、症例数が少なく、統計解析のために十分なパワーを有し

なかった可能性があること、また、前向き検討であったため、CRT 後の患者観察期間が短く、さらには、検体採取が CRT 前後の 2 点のみであったため、より詳細な検討ができなかったことである。今後、前向きの大規模研究を実施し、サイトカインを介した血小板、免疫系細胞、癌細胞の相互作用をより詳細に検討し、CRT 効果が期待できる症例の事前の選定に役立てられる因子を明らかにし、また、CRT 効果を増強するための患者免疫状態改善のための糸口を見つけることが必要であり、今回の報告が基礎データとして役立つことを期待したい。

まとめ・今後の展望

本研究では、進行下部直腸癌患者に対する術前 CRT 効果と免疫機構に関して検討し、以下の結果を見出した。

1) CRT が奏功した (High-R) 群では CRT 前の T リンパ数、Th リンパ球数が有意に多く、CRT 効果の予測因子になりうる可能性がある。

2) CRT 前の値に比して、CRT 後に sCD40L の有意な減少、および IL-6 の増加傾向を認めた。CRT 効果別に評価すると、High-R 群のみで CRT 後の sCD40L の有意な減少、および Low-R 群のみで CRT 後の IL-6 の有意な増加を認めた。これらのサイトカインの濃度変化は、CRT 前後の比較が必要のため、事前に CRT 効果予測因子としての役割は持たないものの、CRT 後の治療効果を判断する補助的な役割を果たす可能性がある。

CRT 効果に免疫機構が重要な役割を果たすとされているが、今回の検討から、血小板または血小片が主に産生するサイトカインが抗腫瘍免疫の調節に関与することが示唆され、今後更なる研究・発見の累積により機序が解き明かされ治療の予想だけでなく治療効果を補助する役割ももつようになることが期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻 腫瘍外科学
渡邊聡明教授には、研究の計画、実験方法、結果の解釈など、研究全般にわたっての
ひとかたならぬご指導・ご鞭撻を賜りました。

共同研究者である東京大学医学部附属病院輸血部 津野寛和先生、東京大学医学部
附属病院大腸肛門外科 川合一茂先生、また東京大学医学部附属病院検査部 松橋美
佳技師、名倉豊技師には、研究の進め方、検体の測定および結果の解釈など様々な点
で懇切丁寧に助言と多大なご指導をいただきました。

また、私の大学院生活には多くの先生方・友人の支えと励ましがあがり成り立ったと
ものと思われます。ここに深甚なる感謝を表します。

参考文献

1. Bosset, J.F., et al., *Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer*. N Engl J Med, 2006. **355**(11): p. 1114-1123.
2. Sauer, R., et al., *Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer*. N Engl J Med, 2004. **351**(17): p. 1731-40.
3. Ortholan, C., et al., *Role of radiotherapy with surgery for T3 and resectable T4 rectal cancer: evidence from randomized trials*. Dis Colon Rectum, 2006. **49**(3): p. 302-10.
4. Biondo, S., et al., *Response to neoadjuvant therapy for rectal cancer: influence on long-term results*. Colorectal Dis, 2005. **7**(5): p. 472-9.
5. Habr-Gama, A., et al., *Patterns of failure and survival for nonoperative treatment of stage c0 distal rectal cancer following neoadjuvant chemoradiation therapy*. J Gastrointest Surg, 2006. **10**(10): p. 1319-28.
6. Willeke, F., et al., *A phase II study of capecitabine and irinotecan in combination with concurrent pelvic radiotherapy (CapIri-RT) as neoadjuvant treatment of locally advanced rectal cancer*. Br J Cancer, 2007. **96**(6): p. 912-7.
7. Fu, C.G., et al., *Role of p53 and p21/WAF1 detection in patient selection for preoperative radiotherapy in rectal cancer patients*. Dis Colon Rectum, 1998. **41**(1): p. 68-74.
8. Kuremsky, J.G., J.E. Tepper, and H.L. McLeod, *Biomarkers for response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2009. **74**(3): p. 673-88.
9. Marquardt, F., et al., *Molecular targeted treatment and radiation therapy for rectal cancer*. Strahlenther Onkol, 2009. **185**(6): p. 371-8.
10. Kikuchi, M., et al., *High Ki67, Bax, and thymidylate synthase expression well correlates with response to chemoradiation therapy in locally advanced rectal cancers: proposal of a logistic model for prediction*. Br J Cancer, 2009. **101**(1): p. 116-23.
11. Komuro, Y., et al., *The expression pattern of Ku correlates with tumor radiosensitivity and disease free survival in patients with rectal carcinoma*. Cancer, 2002. **95**(6): p. 1199-205.
12. Komuro, Y., et al., *Evaluating the combination of molecular prognostic factors in tumor radiosensitivity in rectal cancer*. Hepatogastroenterology, 2005. **52**(63): p. 666-71.
13. Komuro, Y., et al., *Expression pattern of telomerase reverse transcriptase in rectal carcinoma predicts tumor radiosensitivity, local recurrence and disease-free survival*. Hepatogastroenterology, 2005. **52**(64): p. 985-9.
14. Watanabe, T., et al., *Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarray analysis of gene expression profiles*. Cancer Res, 2006. **66**(7): p. 3370-4.
15. Formenti, S.C. and S. Demaria, *Systemic effects of local radiotherapy*. Lancet Oncol, 2009. **10**(7): p. 718-26.

16. Demaria, S. and S.C. Formenti, *Role of T lymphocytes in tumor response to radiotherapy*. Front Oncol, 2012. **2**: p. 95.
17. Kitayama, J., et al., *Circulating lymphocyte number has a positive association with tumor response in neoadjuvant chemoradiotherapy for advanced rectal cancer*. Radiat Oncol, 2010. **5**: p. 47.
18. Kitayama, J., et al., *Circulating lymphocyte is an important determinant of the effectiveness of preoperative radiotherapy in advanced rectal cancer*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 64.
19. Yasuda, K., et al., *Density of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes in biopsy samples can be a predictor of pathological response to chemoradiotherapy (CRT) for rectal cancer*. Radiat Oncol, 2011. **6**: p. 49.
20. Stone, H.B., L.J. Peters, and L. Milas, *Effect of host immune capability on radiocurability and subsequent transplantability of a murine fibrosarcoma*. J Natl Cancer Inst, 1979. **63**(5): p. 1229-35.
21. Choi, C.H., et al., *Clinical predictive factors of pathologic tumor response after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer*. Radiat Oncol J, 2012. **30**(3): p. 99-107.
22. Dranoff, G., *Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(1): p. 11-22.
23. McDonnell, A.M., A.K. Nowak, and R.A. Lake, *Contribution of the immune system to the chemotherapeutic response*. Semin Immunopathol, 2011. **33**(4): p. 353-67.
24. Ong, Z.Y., et al., *Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis*. Radiat Oncol, 2010. **5**: p. 22.
25. Schaue, D., E.L. Kachikwu, and W.H. McBride, *Cytokines in radiobiological responses: a review*. Radiat Res, 2012. **178**(6): p. 505-23.
26. Riesco, A., *Five-year cancer cure: relation to total amount of peripheral lymphocytes and neutrophils*. Cancer, 1970. **25**(1): p. 135-40.
27. He, J.R., et al., *Pretreatment levels of peripheral neutrophils and lymphocytes as independent prognostic factors in patients with nasopharyngeal carcinoma*. Head Neck, 2012. **34**(12): p. 1769-76.
28. Milne, K., et al., *Absolute lymphocyte count is associated with survival in ovarian cancer independent of tumor-infiltrating lymphocytes*. J Transl Med, 2012. **10**: p. 33.
29. Ishihara, S., et al., *Radiation-induced apoptosis of peripheral blood lymphocytes is correlated with histological regression of rectal cancer in response to preoperative chemoradiotherapy*. Ann Surg Oncol, 2012. **19**(4): p. 1192-8.
30. Barrio, M.M., et al., *Human macrophages and dendritic cells can equally present MART-1 antigen to CD8(+) T cells after phagocytosis of gamma-irradiated melanoma cells*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40311.
31. Gupta, A., et al., *Radiotherapy promotes tumor-specific effector CD8+ T cells via dendritic*

- cell activation*. J Immunol, 2012. **189**(2): p. 558-66.
32. Huber, M.A., et al., *Cell-type-dependent induction of eotaxin and CCR3 by ionizing radiation*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **269**(2): p. 546-52.
 33. Matsumura, S., et al., *Radiation-induced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3099-107.
 34. Andre, P., et al., *Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease*. Circulation, 2002. **106**(8): p. 896-9.
 35. Aukrust, P., J.K. Damas, and N.O. Solum, *Soluble CD40 ligand and platelets: self-perpetuating pathogenic loop in thrombosis and inflammation?* J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(12): p. 2326-8.
 36. Wu, Y., et al., *Expression of CD40 and growth-inhibitory activity of CD40 ligand in colon cancer ex vivo*. Cell Immunol, 2008. **253**(1-2): p. 102-9.
 37. Melichar, B., et al., *Expression of CD40 and growth-inhibitory activity of CD40 ligand in ovarian cancer cell lines*. Gynecol Oncol, 2007. **104**(3): p. 707-13.
 38. He, S., et al., *Expression of the co-signaling molecules CD40-CD40L and their growth inhibitory effect on pancreatic cancer in vitro*. Oncol Rep, 2012. **28**(1): p. 262-8.
 39. Li, R., et al., *Influence of sCD40L on gastric cancer cell lines*. Mol Biol Rep, 2011. **38**(8): p. 5459-64.
 40. Tong, A.W., et al., *Growth-inhibitory effects of CD40 ligand (CD154) and its endogenous expression in human breast cancer*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(3): p. 691-703.
 41. Schlom, J., et al., *The role of soluble CD40L in immunosuppression*. Oncoimmunology, 2013. **2**(1): p. e22546.
 42. Huang, J., et al., *Elevated serum soluble CD40 ligand in cancer patients may play an immunosuppressive role*. Blood, 2012. **120**(15): p. 3030-8.
 43. Lin, C.C., et al., *Profiles of circulating endothelial cells and serum cytokines during adjuvant chemoradiation in rectal cancer patients*. Clin Transl Oncol, 2013.
 44. Waldner, M.J., S. Foersch, and M.F. Neurath, *Interleukin-6--a key regulator of colorectal cancer development*. Int J Biol Sci, 2012. **8**(9): p. 1248-53.
 45. Chung, Y.C. and Y.F. Chang, *Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer*. J Surg Oncol, 2003. **83**(4): p. 222-6.
 46. Becker, C., et al., *IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer*. Cell Cycle, 2005. **4**(2): p. 217-20.
 47. Debucquoy, A., et al., *Molecular responses of rectal cancer to preoperative chemoradiation*. Radiother Oncol, 2006. **80**(2): p. 172-7.
 48. Kawai, K., et al., *Thrombocytosis before pre-operative chemoradiotherapy predicts poor response and shorter local recurrence-free survival in rectal cancer*. Int J Colorectal Dis, 2013. **28**(4): p. 527-35.
 49. Masanori, M, et al., *Alterations in the signal-transducing molecules of T cells and NK cells*

- in colorectal tumor-infiltrating, gut mucosal and peripheral lymphocytes: correlation with the stage of the disease.* Int. J. Cancer, 1995; 61: p. 765-772
50. Wang, SW, et al., *The IL-6/JAK/STAT3 pathway: Potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer (Review).* Int. J. Oncol, 2014; 15: doi: 10.3892/ijo.2014.2259. [Epub ahead of print]
51. Ho, GY, et al., *Circulating soluble cytokine receptors and colorectal cancer risk.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014 Jan; 23(1): 179-88

