

# 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 関澤 健太郎

横浜市立大学大学院医学研究科医科学専攻 消化器・腫瘍外科学

## 審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科 泌尿器科学	教授	榎山 和秀
副査	横浜市立大学大学院医学研究科 免疫学	教授	田村 智彦
副査	横浜市立大学附属病院 国際臨床肝疾患センター	准教授	斉藤 聡

# Relationship between stromal regulatory T cells and response to neoadjuvant chemotherapy for locally advanced rectal cancer

## 直腸癌に対する術前化学療法後の腫瘍免疫微小環境

### 【背景・目的】

化学療法において抗癌剤の有効性は直接的な殺細胞効果に加えて、宿主の免疫機能によって影響を受ける。腫瘍浸潤リンパ球（TILs：tumor infiltrating lymphocytes）は宿主の抗腫瘍免疫を表す一つと考えられており、結腸直腸癌、胃癌、膀胱癌、卵巣癌、乳癌、肺癌などで予後との関連について報告されている。しかし直腸癌における腫瘍浸潤リンパ球と術前化学療法の関係についての報告はない。本研究の目的は、局所進行直腸癌に対する術前化学療法の腫瘍縮小率と組織学的効果が直腸の原発巣を取り巻く免疫微小環境の状態と関連しているかどうかを判断することである。

### 【対象と方法】

2012年1月から2014年12月までに術前化学療法（NACT：neoadjuvant chemotherapy）を行った後に原発巣の切除を行った局所進行直腸癌症例65例を対象とした。TILsと腫瘍縮小率および術前化学療法に対する組織学的効果との相関関係について比較検討した。術前化学療法のレジメンは、mFOLFOX6（オキサリプラチン、レボホリナート、5-フルオロウラシル）の6コースに加えて、RAS野生型の場合はパニツムマブを投与した。検討項目として腫瘍縮小率は固形腫瘍における評価基準 Response Evaluation Criteria in Solid Tumors（RECIST）1.1を用いて、hematoxylin-eosin（HE）染色での組織学的効果判定は本邦の大腸癌取り扱い規約【第8版】に基づいて行った。TILsの免疫組織染色ではCD3、CD8、FoxP3はそれぞれTリンパ球、細胞障害性Tリンパ球、制御性Tリンパ球のマーカーとして、CD86、CD206はM1マクロファージ、M2マクロファージのマーカーとして免疫染色を行った。

### 【結果】

平均腫瘍縮小率は $41.5 \pm 18.8\%$ であった。RECISTでは、47症例（72.3%）がPRとな

り、1 症例 (1.5%) が CR となった。8 症例 (12.3%) は Grade2 の組織学的効果を示し、2 症例 (3.1%) は Grade3 の組織学的効果を示した。多変量解析は、間質細胞 (ST: stromal cell) 領域における Foxp3 陽性リンパ球の浸潤が低い群で、PR または CR (オッズ比[OR] 7.69; 95%信頼区間[CI] 1.96-33.33;  $p < 0.01$ ) および組織学的効果 Grade2 または 3 (OR 11.11; 95%CI 1.37-98.04;  $p = 0.02$ ) と有意に関連していることを示した。

### 【考察】

本研究では局所進行直腸癌に対して NACT を施行した後に原発巣切除を施行した 65 人を対象として、切除標本の免疫染色により腫瘍周囲に浸潤した様々リンパ球 (CTL, Treg) やマクロファージ (M1 マクロファージ, M2 マクロファージ) の多寡と化学療法の臨床的治療効果や病理学的効果との関連を検討した。ST 領域の Treg 高浸潤群 (N=32) の臨床的奏効率 (PR/CR) は 56.3%と、低浸潤群 (N=33) の 90.9%と比較して有意に不良であった ( $p=0.01$ )。また病理学的効果判定についても Treg 高浸潤群では Grade2 または 3 が 3.1%と、低浸潤群の 27.3%と比較して有意に不良であった

( $p=0.02$ )。ST 領域の Treg 低浸潤は NACT に対する直腸癌の良好な臨床的および病理学的効果と関連していた。

Treg の浸潤が術前放射線化学療法 (NACRT : neoadjuvant chemoradiation therapy) の効果と関連しているかは不明であり、矛盾する結果が報告されている。NACT の効果と関連しているかも不明のまま、以前の研究では術前の生検検体においても、術後の切除標本においても Treg の浸潤と効果に関連はなかった。NACT により組織学的完全奏功 (pCR : pathological Complete Response) となった症例では Treg が大幅に減少していたと報告されている。本研究は以前の結果と一致して ST 領域の Treg は NACT に対する抗腫瘍効果を阻害していることが示唆された。

術前療法において治療効果のある症例では、Treg が選択的に減少して効果的な抗腫瘍免疫効果を得ている可能性と、治療前から Treg の浸潤が低い可能性がある。NACRT 前の Treg の浸潤と治療効果には関連がなく、術前治療開始前の Treg の浸潤と病理学的効果との間には関連を認めなかったと報告されている。治療後の Treg の浸潤が特に重要であるとしているが、治療前の Treg の浸潤と NACT の効果との関連には更なる研究が必要である。

本研究の結果からは、ST 領域の Treg の低浸潤が化学療法の効果に対する良好なマーカーになる可能性がある。ST 領域の Treg の浸潤を抑制あるいは減少させることで、NACT の治療効果を良好にできる可能性があり、Treg を治療標的とした新規治療の開発などが今後期待される。進行直腸癌の NACRT に関する報告はこれまでであるものの、

我々が知る限りでは、NACT後の直腸癌切除症例での治療後 Treg の低浸潤と良好な臨床的あるいは病理学的効果との関連を明らかにしたのは本研究が初めてである。

審査にあたり、以上の論文内容の説明がなされた後、以下の質疑応答が行われた。

まず、田村副査より次の質問がなされた。

- 1) 今回 NACT を行っていない手術症例に対して、CC, ST 領域の TILs を検討したのか.
- 2) 術前治療を行っていない手術症例で、Treg が予後良好因子となったのは CC 領域なのか ST 領域なのか.
- 3) Stage I の直腸癌にも NACT を行うのか.
- 4) なぜ炎症が癌に悪い可能性があるのか.

この質問に対して以下のように回答が行われた。

- 1) 今回 NACT を行っていない手術症例に対して、CC, ST 領域の TILs の検討はしていない。本邦や欧米で注目されている直腸癌の NACT 後の治療効果と TILs の関係の評価を目的とした。
- 2) 術前治療を行っていない手術症例において、既報では正常組織と腫瘍 (CC) 領域の比較で CC 領域の Treg が良好な予後因子になるといった報告はある。CC 領域と ST 領域で Treg が異なる影響を示した報告は認めない。術前治療を行っていない手術症例の ST 領域と術前治療を行った手術症例の ST 領域の Treg の影響に比較に関しては疑問が残る結果となった。
- 3) Stage I の症例は術前治療を行っていない。今回の症例においても Stage II の一部の症例から術前治療の適応となる。
- 4) 炎症が起こることにより、腫瘍における血管新生の促進と細胞増殖の活性化が起こりやすくなる可能性がある。

次に、斎藤副査より次の質問がなされた。

- 1) 今回免疫染色を行う事が出来た生検検体においても、全く有意差を認めなかったのか.
- 2) 血液検査検体から治療前に効果予測ができる可能性はあるか.
- 3) 今回の結果を踏まえて前向き研究を行う予定はあるか.
- 4) この研究においてあなたが行った領域はどこか.

この質問に対して以下のように回答が行われた。

- 1) 生検検体の免疫染色は行ったが、データとしては用いなかった。生検検体は 8mm 程

度で標本の大きさが小さく腫瘍量が少なく、CC 領域のリンパ球数は数個とわずかしら認めない。3 視野の選択に重なりが生じる。また ST 領域の評価は不可能となる。以上の点から手術検体の評価方法と違いが生じるため、比較に用いるための正確なデータにはならないと判断した。この点の解決方法として、術前治療前の人工肛門造設時や審査腹腔鏡時に腹腔内からの生検やリンパ節郭清を行う方法が考えられる。

2) 可能性はあると考える。今回は後ろ向き研究で手術検体を用いた検討になるが、前向き研究で血液検査検体や新鮮な切除検体を用いるとここでバイオマーカーとなる因子の発見につながる可能性がある。

3) 直腸癌治療の多施設共同研究が行われる予定があり、今回の研究を踏まえた免疫染色も行われる方針がある。加えて指摘のあった血液検査項目や術前治療を行わない Stage I の症例の評価も推挙したいと考える。

4) 2つの施設から全ての検体と治療データの収集し、免疫染色と解析を行った。ただし術前治療および手術と、その後の治療や予後の確認は消化器・腫瘍外科学の先生方の尽力による。

次に、榎山主査より以下の質問がなされた。

- 1) 直腸癌の標準治療が本邦と欧米で異なる歴史的背景や要因は何か。
- 2) 人工肛門状態に対する本邦と欧米の受け入れ方の違いから、欧米で術前治療が進められた背景があるか。
- 3) 本邦と欧米の治療が似てきているか。
- 4) 免疫染色後の評価は3ヶ所のリンパ球の数か。グラフの縦軸は陽性リンパ球数の平均値であるか。3ヶ所の選択に基準はあるか。
- 5) 今回の研究を通して、今後の直腸癌治療はどのように変わっていくと考えるか。
- 6) 免疫チェックポイント阻害剤と放射線や化学療法どちらが治療の中心となるか。

この質問に対して以下のように回答が行われた。

1) 局所再発率の改善を目標に、欧米では 1980 年代に術前放射線療法が導入された。本邦では日本人の体形が手術を行いやすい点から手術関連合併症が少なく、側方リンパ節郭清の導入による局所再発率の低下が進められた。

2) 人口肛門造設の受け入れが欧米における術前治療導入の主要な因子とは限らず、本邦も人工肛門の造設を避ける術式は広く行われてきた。一方で現在の局所進行下部直腸癌の

治療は、術前の一時的な人工肛門造設と根治切除後の人工肛門閉鎖術がセットとして行われており、一時的な人工肛門状態が許容されてきている。

3) 予後と局所再発率の改善, QOLの維持といった観点から, 近年は本邦と欧米の治療が非常に似てきている。

4) リンパ球を手動でカウントした数になり, 3 視野の平均値になる。グラフの縦軸は症例毎の陽性リンパ球数の平均値である。一律に陽性リンパ球の浸潤が多い部分と決めて, 3 視野を選択した。

5) 直腸癌の治療は遺伝子情報に伴って治療選択が進められているが, 選択された治療の奏効率は必ずしも高いものではない。期待される治療効果を得るためには, 腫瘍の免疫微小環境を評価して治療薬の選択や追加が行われるように変化すると考える。

6) より個別化治療が進み, 症例毎に治療の中心が変わるようになると思う。直腸癌における免疫チェックポイント阻害剤の適応は MSI-high の症例に限られている。MSI-high の症例は右側結腸の癌に比較的多いため, 直腸癌では適応症例に限られる。

以上のように各質問に対して回答を行った。審査員による協議の結果, 本研究は博士(医学)の学位論文に値するものと判定された。