



Title	直腸癌の術前治療による術後合併症への影響と腫瘍局所の微小環境の変化に関する研究
Author(s)	今泉, 健
Description	配架番号 : 2504
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14034号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14034
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77839
Type	doctoral thesis
File Information	Ken_Imaizumi.pdf



学 位 論 文

直腸癌の術前治療による術後合併症への影響と腫瘍局所の微小環境の変化
に関する研究

(Study on postoperative complications and tumor microenvironment
related to neoadjuvant therapies for rectal cancer)

2020年3月

北 海 道 大 学

今 泉 健

Ken IMAIZUMI

学 位 論 文

直腸癌の術前治療による術後合併症への影響と腫瘍局所の微小環境の変化
に関する研究

(Study on postoperative complications and tumor microenvironment
related to neoadjuvant therapies for rectal cancer)

2020年3月

北 海 道 大 学

今 泉 健

Ken IMAIZUMI

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	3 頁
略語表	6 頁
緒言	7 頁
研究 I. 直腸癌の術前治療による術後合併症に与える影響	
緒言	9 頁
研究方法	9 頁
結果	10 頁
考察	16 頁
研究 II. 直腸癌の術前治療による腫瘍局所の微小環境に与える変化	
緒言	17 頁
研究方法	19 頁
結果	26 頁
考察	49 頁

総括および結論	54 頁
謝辞	56 頁
利益相反	56 頁
引用文献	57 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Ken Imaizumi, Yuichiro Tsukada, Yoshinobu Komai, Shogo Nomura, Koji Ikeda, Yuji Nishizawa, Takeshi Sasaki, Akinobu Taketomi, and Masaaki Ito. Prediction of urinary retention after surgery for rectal cancer using voiding efficiency in the 24 h following Foley catheter removal. *Int J Colorectal Dis.* 2019;34(8):1431-43.

2. Ken Imaizumi, Toshihiro Suzuki, Motohiro Kojima, Manami Shimomura, Naoki Sakuyama, Yuichiro Tsukada, Takeshi Sasaki, Yuji Nishizawa, Akinobu Taketomi, Masaaki Ito, and Testuya Nakatsura. Ki67 expression and localization of T-cells after neoadjuvant therapies as reliable prediction markers in rectal cancer. *Cancer Sci.* 2019. Doi: 10.1111/cas.14223.

本研究の一部は以下の学会で発表した。

1. 今泉健、塚田祐一郎、駒井好信、佐々木剛志、西澤祐吏、酒井康之、伊藤雅昭：「直腸癌術後排尿機能障害の発生頻度とリスク因子の同定」第72回日本消化器外科学会総会 2017年7月20日金沢

2. Ken Imaizumi, Toshihiro Suzuki, Manami Shimomura, Yuichiro Tsukada, Takeshi Sasaki, Yuji Nishizawa, Motohiro Kojima, Masaaki Ito, and Testuya Nakatsura. Immunological features of resected tumor after neoadjuvant chemotherapy (NAC) and chemoradiotherapy (CRT) become the superior prediction markers for recurrence in rectal cancer. *European Society for Medical Oncology 2017 Congress, September 8-12, 2017, Madrid, Spain.*

3. 今泉健、鈴木利宙、下村真奈美、塚田祐一郎、佐々木剛志、西澤祐吏、小嶋基寛、伊藤雅昭、中面哲也：「術前化学療法もしくは化学放射線療法後の直腸切除検体における腫瘍微小環境の評価は術後再発を予測する因子になりうる」第37回日本分子腫瘍マーカー研究会 2017年9月27日横浜

4. 今泉健、塚田祐一郎、駒井好信、佐々木剛志、西澤祐吏、伊藤雅昭：「直

腸癌術後排尿障害における早期治療介入を可能にするリスク因子の同定と排尿障害予測因子としての排尿効率の有用性」第 118 回日本外科学会定期学術集会 2018 年 4 月 6 日東京

5. Ken Imaizumi, Yuichiro Tsukada, Yoshinobu Komai, Takeshi Sasaki, Yuji Nishizawa, and Masaaki Ito. Prediction of urinary retention after surgery for rectal cancer by using a novel scaling system in the 24-hour voiding status following Foley catheter removal. American Society of Colon and Rectal Surgeons 2018 Annual scientific meeting, May 19-23, 2018, Nashville, Tennessee, U.S.A.

6. 今泉健、塚田祐一郎、佐々木剛志、西澤祐吏、伊藤雅昭：「直腸癌術後排尿機能障害の長期経過」第 73 回日本消化器外科学会総会 2018 年 7 月 11 日鹿児島

7. Ken Imaizumi, Toshihiro Suzuki, Manami Shimomura, Naoki Sakuyama, Yuichiro Tsukada, Takeshi Sasaki, Yuji Nishizawa, Motohiro Kojima, Akinobu Taketomi, Masaaki Ito, and Testuya Nakatsura. Alteration of the immunosuppressive population after neoadjuvant therapies for locally advanced rectal cancer. The 38th Sapporo International Cancer Symposium, July 11-13, 2019, Sapporo, Hokkaido, Japan.

要旨

【背景と目的】

本邦における切除可能局所進行直腸癌に対する標準的な術前治療は、化学放射線療法である。しかし、近年、術前化学療法も良好な結果を示している。術前化学放射線療法は、腫瘍の局所制御に寄与するが、術後合併症の増加や生存期間を延長させないなどのデメリットも報告されている。治療後に病理学的完全奏効を達成できた症例の予後は良好であるが、残存腫瘍を認める症例の長期予後を予測できる有用なマーカーが乏しいことも現在の課題である。腫瘍微小環境の評価やその予後との関連は、これまでも検討がされているが、術前化学療法の腫瘍環境への効果は明らかにされていない。そこで、本研究では、まず、術前化学放射線療法および術前化学療法の術後合併症に与える影響を評価した（研究 I）。結果、術前治療によって腫瘍縮小を得ることで合併症のリスクとなる拡大手術を回避できることが示唆された。そこで、術前治療による腫瘍縮小のメカニズムおよび免疫細胞を中心とした微小環境の変化の解明を目的として、術前治療後の直腸癌切除検体を用いて多重蛍光免疫染色法にて評価を行なった（研究 II）。

【対象と方法】

研究 I. 術前治療の術後合併症との関連に関する評価は、2つのコホートを用いた。評価項目は、会陰創部感染と排尿障害とした。コホート 1；会陰創部感染評価コホートで 135 例の直腸および肛門管腫瘍症例、コホート 2；排尿障害評価コホートで 503 例の直腸癌症例について、それぞれの合併症の発生頻度と、リスク因子の解析を行った。

研究 II. 腫瘍微小環境の評価としては、200 例の局所進行直腸癌を対象とし、その内訳は、48 例の術前化学放射線療法（Neoadjuvant chemoradiotherapy: CRT）施行症例、51 例の術前化学療法（Neoadjuvant chemotherapy: NAC）施行症例、101 例の手術単独症例（Control 群）であった。術前治療による腫瘍縮小効果の評価として、組織学的治療効果判定：TRG（Tumor regression grade）を用いた。各症例から、4-point tissue micro arrays を作成し、それらを用いて、多重蛍光免疫組織化学染色法により、残存腫瘍および浸潤免疫細胞の評価を行った。

【結果】

研究 I. 術後の会陰創部感染の発症頻度は 56%、術後の排尿障害は 19%に発症していた。会陰創部感染における独立したリスク因子は、男性、他臓器合併切除であった。排尿障害の独立したリスク因子は、男性、開腹手術、骨盤神経の非温存、出血量であった。CRT および NAC 施行に関しては、いずれの評価項目においても独立した有意なリスク因子とはならなかった。本研究の結果から、術前治療によって腫瘍の縮小が得られた症例では、他臓器合併切除および骨盤神経の非温存手術といった拡大手術を回避できるため、合併症の発症を最小限に抑えることが可能になると考えられた。

研究 II. 術前治療による腫瘍縮小の微小環境の変化を評価した。残存腫瘍を

評価したところ、CRT は、TRG および残存腫瘍面積いずれにおいても NAC よりも縮小効果が高く、さらに Ki67 を指標とした残存腫瘍の増殖能についても、CRT で強く増殖抑制を認めた。浸潤免疫細胞を評価したところ、CD4 T細胞および CD8 T細胞、さらにそれぞれの活性化分画 (Ki67 高発現) は、Control 群と比較して、NAC 施行症例では高値であり、CRT 施行症例では低値であった。腫瘍組織を癌巣部と間質部に分けて、T細胞の癌巣部への浸潤を癌間質比として評価を行った。その結果、特に腫瘍縮小効果の高い TRG1 症例では、CRT、NAC、いずれの施行症例においても、Control 群と比較し、T細胞の癌間質比は有意に上昇しており、Ki67 高発現分画については、その傾向がより顕著であった。免疫抑制性分画の術前治療による変化としては、間質部での CD4 陽性細胞の制御性 T細胞割合が、CRT、NAC、いずれの施行症例においても低値であり、腫瘍縮小に伴って段階的な減少を認めた。マクロファージは、両術前治療群で高値であったが、特に M1 分画において有意に高値であった。次に、これら腫瘍局所の浸潤免疫細胞と術後無再発生存(Relapse-free survival: RFS)の関連を評価した。CRT 施行症例では、Ki67 を高発現した活性化 CD4 T細胞の癌巣内密度が、NAC 施行症例では、間質部の Ki67 高発現 CD8 T細胞密度が、有意な再発予測マーカーであった。また、CRT 施行症例では CD8 T細胞分画が再発抑制に寄与する傾向を認めたが、NAC 施行症例での CD4 T細胞分画は再発抑制への関与は認められなかった。

【考察】

術後合併症との関連について、各術前治療は単変量解析ではリスク因子としての可能性が示唆されたが、多変量解析では独立したリスク因子とはならなかった。術前治療によりがん縮小が認められ、手術での臓器温存が可能になれば、会陰創部感染および排尿障害の発生頻度を抑えることができると考えられる。

多重蛍光免疫組織化学染色法による評価によって、CRT 施行症例では有意に残存腫瘍面積およびその増殖能の低下が認められたことから、局所の腫瘍退縮ならびに長期の増殖制御は CRT が有利である可能性が示唆された。また、NAC では術前治療から手術までのインターバルにおいて、残存腫瘍が再増殖する可能性が考えられた。腫瘍浸潤 T細胞の解析からは、NAC 後で、特に CD4 T細胞の浸潤増加が顕著であることが明らかとなった。これは、化学療法により惹起された炎症応答に伴うケモカイン依存的な浸潤と考えられる。一方、CRT 後では、浸潤 T細胞の低下が認められた。これまでに、CRT により T細胞浸潤が増加することが報告されており、CRT における照射線量などのスケジュールや手術までのインターバルによって、浸潤 T細胞の減少およびその後の回復が異なってくる可能性が考えられた。しかし、両治療群ともに腫瘍縮小効果の高い症例では、T細胞の癌巣浸潤が顕著であり、制御性 T細胞の減少を認めていた。これらは、今後、より効果的な免疫療法との併用療法を開発する上で重要な知見である。興味深いことに、RFS の延長に関連する浸潤 T細胞の分画やその腫瘍内局在は、各術前治療

で異なっていた。NAC 後で顕著に高値であった CD4 T 細胞は RFS の延長に寄与せず、一方、CRT 後では CD4 T 細胞の癌巣内の高値が必要であることがわかった。また、NAC 後では、がん免疫に抑制的に作用する CD4 陽性制御性 T 細胞の増加も認められた。NAC 後では必ずしも、ヘルパー CD4 T 細胞が抗腫瘍免疫応答に有用に作用していない可能性がある。CD8 T 細胞はいずれの術前治療でも有用に機能していることが示されているため、腫瘍排除に働くエフェクター CD8 T 細胞の活性化や増殖において、ヘルパー CD4 T 細胞の必要性が各術前治療で異なる可能性が示唆されるが、その機序の評価にはより詳細な実験が必要である。

【結論】

術後の合併症・機能障害について、術前治療によって腫瘍縮小を達成できれば、手術での臓器温存を可能にし、合併症の発生頻度を最小限に抑えることが可能になると考えられる。術前治療により、微小環境における残存腫瘍および免疫細胞の特徴は異なることが明らかとなった。一方、腫瘍縮小効果の高い症例では、共通した微小環境の変化が生じていた。これは今後の術前治療の発展に重要な結果である。術前治療後に腫瘍局所に浸潤した T 細胞の Ki67 発現を指標とした活性化とその腫瘍内局在を評価することで、局所進行直腸癌の再発を予測できる可能性が示唆された。

略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下の通りである.

CT	Center tumor
CRT	Neoadjuvant chemoradiotherapy
dMMR	Mismatch repair protein deficient
Foxp3	Forkheak boxprotein P3
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HE	Hematoxilin-eosine
IM	Invasive margin
MHC	Major histocompatibility complex
MMR	Mismatch repair
NAC	Neoadjuvant chemotherapy
pCR	Pathological complete response
PD-1	Programmed cell death 1
RFS	Relapse-free survival
TIL	Tumor-infiltrating lymphocytes
TMA	Tissue micro array
TRG	Tumor regression grade
UICC	Union for International Cancer Control
4p-TMAs	4-point tissue micro arrays
5-FU	5-fluorouracil

緒言

《大腸癌》

本邦における大腸癌の死亡数は増加しており、国立研究開発法人国立がん研究センターがん対策情報センターより発表された「最新がん統計」によると、本邦における 2018 年の大腸癌の部位別予測がん死亡数は、男性では肺癌、胃癌に次いで 3 位 (28,700 人)、女性では 1 位 (24,800 人) であった。直腸癌はそのうちの約 30%を占めており、直腸癌の治療成績の向上は重要な課題となっている (がんの統計'18 公益財団法人 がん研究振興財団)。

直腸癌は、結腸癌より予後が悪いことが報告されている。直腸癌は、全体で結腸癌より 5 年生存率が 1.5%低く、Stage II では 2.3%、Stage IIIa では 7.4%、Stage IIIb では 10.3%の低下が認められる。なかでも、局所進行の直腸癌はより予後が悪い傾向が認められる (大腸癌治療ガイドライン 医師用 2019 年版 大腸癌研究会/編 金原出版)。

《局所進行直腸癌の治療》

切除可能局所進行直腸癌 (cT3-4NanyM0) に対する標準治療として、世界的に術前に 5-FU ベースの化学療法と放射線治療を併用した化学放射線療法 (Neoadjuvant chemoradiotherapy: CRT) を行なった後に、手術治療として直腸間膜全切除が行われている。直腸間膜全切除としては、長年、腹会陰式直腸切断術 (マイルズ手術) が標準術式であったが、手術技術や CRT の発展に伴い、低位前方切除術および括約筋間直腸切除術などの肛門温存手術が普及している。一方、複数の臨床試験において CRT は腫瘍の局所制御に寄与するが予後を改善するエビデンスは示されておらず (Kapiteijn et al., 2001; Gérard et al., 2006)、術後合併症の増加や骨盤機能の低下といったデメリットも報告されている (Bullard et al., 2005; Ito et al., 2009; Nishizawa et al., 2011)。そこで、近年、骨盤神経および骨盤筋群への影響を軽減できる術前化学療法 (Neoadjuvant chemoradiotherapy: NAC) の有用性が報告されている (Schrug et al., 2014; Deng et al., 2016)。今後は、症例によって CRT および NAC を組み合わせる治療戦略や症例によって使い分けを行うテーラーメイド治療が重要になると見込まれている (Rouanet et al., 2017)。

《直腸癌の術後合併症》

一般的に、直腸癌手術は高難度手術であり、術後の合併症も多い。代表的

な合併症としては、直腸切除吻合後の縫合不全やマイルズ手術後の骨盤死腔炎が広く知られている。また、直腸をはじめとする骨盤内手術は、肛門機能のみならず排尿および性機能に影響を与えることが報告されている(Akasu et al., 2009)。術前の放射線照射は、組織の線維化による手術操作を困難にし、創傷治癒機転の障害から術後合併症のリスクになることが報告されている (Bullard et al., 2005; Musters et al., 2014; West et al., 2010)。一方、術前化学療法に関しては、施行されている施設が限られているため報告が少ない。

《術前治療後の術後長期成績》

CRT は腫瘍の局所制御に寄与するが予後の延長には寄与しないことが報告されている (Kapiteijn et al., 2001; Gérard et al., 2006)。さらに、残存腫瘍を認める症例においては、長期予後を予測するマーカーとして有用性が確立されたものは報告されていない。一方、切除検体に残存腫瘍を認めない病理学的完全奏功 (Pathological complete response; pCR) を達成した症例は有意に予後が良好なことが報告されており (Maas et al. 2010)、腫瘍局所の微小環境を解明することで予後予測因子の同定につながる可能性がある。大腸癌以外にも様々な癌腫で、腫瘍環境における免疫細胞が予後予測マーカーとなりうることが報告されている (Cho et al., 2003; Zhang et al., 2003; Hiraoka et al., 2006; Loi et al., 2013)。

《本研究の目的》

本研究では、術前治療として放射線化学療法および化学療法が施行された直腸癌症例を対象として、術前治療の術後合併症に与える影響の評価を行う。さらに、術前治療後の残存腫瘍および免疫細胞の変化を解明し長期経過との関連性を検討する。

研究 I. 直腸癌の術前治療による術後合併症に与える影響

緒言

《術前治療後の直腸癌術後合併症》

直腸癌の術後合併症としては、直腸切除吻合後の縫合不全やマイルズ手術後の骨盤死腔炎が広く知られている。骨盤死腔炎をはじめとした会陰創部関連合併症の発症頻度は、60%程度と非常に高率であることが報告されている (de Bruin et al., 2008; Kuhrt et al., 2012)。また、直腸をはじめとする骨盤内手術は、肛門機能のみならず排尿および性機能に影響を与えることが報告されている (Akasu et al., 2009)。排尿障害の発生頻度は、4-29%と報告されている (Sterk et al., 2005; Akasu et al., 2009; Kin et al., 2013; Lee et al., 2014; Yoo et al., 2015; Kwaan et al., 2015)。CRT では、放射線治療の影響により術後の創傷治癒機転が障害され、縫合不全や骨盤死腔炎はその発生頻度が高まるとされている (Bullard et al., 2005; Musters et al., 2014; West et al., 2010)。一方、放射線療法は、術中の骨盤神経への物理的なダメージが原因となる術後の排尿障害のリスクにはならないとされる報告がみられる (Hung et al., 2016)。術前化学療法に関しては、施行されている施設が限られているため報告が少ない、

《本研究の目的》

術前治療による術後合併症への影響を明らかにし、各々の合併症発症に関するリスク因子の同定を行う。

研究方法

1) 評価項目

合併症の評価項目は、マイルズ手術および骨盤内臓全摘術後の会陰創部に関連した感染と、直腸癌手術後の排尿障害とする。

2) 対象

術後合併症の評価に関しては以下の 2 つのコホートを用いて行う。
コホート 1 (会陰創部関連感染): 2008 年 4 月から 2016 年 6 月の期間に国立がん研究センター東病院大腸外科で、直腸および肛門管の腫瘍でマイルズ手

術もしくは骨盤内臓全摘術を受けた 135 症例

コホート 2 (排尿障害): 2012 年 4 月から 2016 年 5 月の期間に国立がん研究センター東病院大腸外科で、直腸癌にて直腸切除術が施行された 503 症例

本研究は、ヘルシンキ宣言を遵守しており、国立がん研究センターの倫理審査委員会で承認を受け、実施した (研究計画書番号: 2016-386、2017-089)。

3) 評価項目の定義

会陰創部関連感染は、表層部感染 (Superficial) と深部感染 (Deep) に分類した。表層部感染は、蜂窩織炎・表層部創離開とし、深部感染は、創深部まで到達する創離開・会陰の膿瘍形成・仙骨全面での膿瘍形成と定義した。

排尿機能障害は、膀胱留置バルーン抜去後の自排尿後に残尿量を 100ml 以上認めるもしくは尿閉で、膀胱留置バルーンの再挿入もしくは導入となり、退院時にバルーン留置もしくは自己導尿などのカテーテル治療が必要な状態と定義した。

4) 統計学的解析

術後合併症のリスクに関わる因子の同定を、単変量解析はフィッシャーの正確検定を用いて、多変量解析はロジスティック回帰分析を用いて行った。単変量解析にて、P 値が 0.1 未満を共変量として多変量解析の対象とした。P 値が 0.05 未満を統計学的有意差ありとみなした。すべての統計検定は、EZR version 1.41 (自治医科大学埼玉メディカルセンター) を使用して行った (Kanda et al., 2013)。

結果

1) 患者背景

コホート 1 およびコホート 2 の患者背景を示す (表 1、2)。コホート 1 では、術前化学療法症例が 35 例および術前化学放射線療法症例が 21 例、コホート 2 では、術前化学療法症例が 90 例、術前化学放射線療法症例が 9 例含まれていた。

表 1 コホート 1 の患者背景

Characteristics (n=135)		n (%)
Age (years), median (range)		63 (31-87)
Sex	Male	95 (70)
	Female	40 (30)
Body mass index (kg/m ²), median (range)		21.7 (15.8-37.2)
Smoking		81 (60)
Diabetes mellitus		15 (11)
Diagnosis	Rectal and anal canal cancer	113 (84)
	Recurrence	18 (13)
	Gastrointestinal stromal tumor (GIST)	2 (1.5)
	Melanoma	2 (1.5)
Preoperative therapy	Chemotherapy	35 (26)
	Chemoradiotherapy	21 (16)
Surgical approach	Open	57 (42)
	Laparoscopic	78 (58)
Surgical type	Abdominoperineal resection	119 (88)
	Total pelvic exenteration (TPE)	16 (12)
Adjacent organs resection (including TPE)		54 (40)
Operative time (min), median (range)		418 (190-733)
Bleeding (ml), median (range)		690 (12-10657)

表 2 コホート 2 の患者背景

Characteristics (n=503)		n (%)
Age (years), median (range)		63 (27-86)
Sex	Male	329 (65)
	Female	174 (35)
Diabetes mellitus		66 (13)
Benign prostatic hyperplasia*		20 (6)
Preoperative residual urine volume (mL)	< 50	394 (78)
	50 ≤, < 100	53 (11)
	100 ≤	21 (4)
	no data	35 (7)
Distance of the tumour from the anal verge (cm)	≤ 5	200 (40)
	5 <, ≤ 10	246 (49)
	10 <	57 (11)
Clinical T stage	T1	105 (21)
	T2	93 (19)
	T3	273 (54)
	T4	32 (6)
Preoperative therapy	Chemotherapy	90 (18)
	Chemoradiotherapy	9 (2)
Surgical approach	Open	64 (13)
	Laparoscopic	422 (84)
	Robotic-assisted	17 (3)
Surgical method	High anterior resection	27 (5)
	Low anterior resection	250 (50)
	Intersphincteric resection	189 (38)
	Abdominoperineal resection	27 (5)
	Others	10 (2)
Lateral lymph node dissection		208 (41)
No pelvic nerve preservation		98 (20)
Operative time (min), median (range)		286 (93-709)
Bleeding (mL), median (range)		65 (0-9794)
*Only male patients were included		

2) 合併症の発生頻度

会陰創部感染は、コホート 1 の 135 例中 75 例 (56%) に発生していた。そのうち、表層感染が 44 例 (33%)、深部感染が 31 例 (23%) であった。排尿障害は、コホート 2 の 503 例中 93 例 (19%) に発生していた。

3) 合併症のリスク因子

会陰創部感染のリスク因子の解析では、単変量解析で、男性、術前化学放射線療法、他臓器合併切除、手術時間がリスク因子の候補となり、多変量解析では、男性・他臓器合併切除が独立した有意なリスク因子となった。術前化学放射線療法は独立した有意なリスク因子とはならなかった。術前化学療法の施行群と未施行群間で、会陰創部感染発生率に有意な差は認められなかった (表 3)。

排尿障害のリスク因子の解析では、単変量解析で、男性、術前の残尿量、T3/4、術前治療、開腹手術、側方リンパ節郭清、骨盤神経の非温存、出血量 100ml 以上がリスク因子の候補となった。多変量解析では、男性、開腹手術、骨盤神経の非温存、出血量 100ml 以上が独立した有意なリスク因子となった。術前化学療法および化学放射線療法は、排尿障害発生の独立した有意なリスク因子にはならなかった (表 4)。

表 3 会陰創部感染のリスク因子解析

Risk factors		n	PWI, n(%)	Fisher's exact test	Multivariable logistic regression analysis	
				P	P	OR (95%CI)
Age	≥70years	47	26 (55)	1.000	-	
	<70years	88	49 (56)			
Sex	Male	95	58 (61)	0.059*	0.029**	2.38 (1.09-5.21)
	Female	40	17 (43)			
Body mass index	≥25kg/m ²	24	12 (50)	0.652	-	
	<25kg/m ²	111	63 (57)			
Smoking	Yes	81	48 (59)	0.584	-	
	No	54	27 (50)			
Diabetes mellitus	Yes	15	6 (40)	0.271	-	
	No	120	69 (58)			
Preoperative chemotherapy	Yes	35	20 (57)	0.846	-	
	No	100	55 (55)			
Preoperative chemoradiotherapy	Yes	21	16 (76)	0.055*	0.235	1.98 (0.64-6.10)
	No	114	59 (52)			
Surgical approach	Open	57	31 (54)	0.862	-	
	Laparoscopic	78	44 (56)			
Adjacent organs resection	Yes	54	37 (69)	0.014*	0.009**	2.70 (1.15-5.94)
	No	81	38 (47)			
Operative time	≥420min	67	43 (64)	0.057*	0.488	1.35 (0.62-2.92)
	<420min	68	32 (47)			
Bleeding	≥700ml	65	41 (63)	0.119	-	
	<700ml	70	34 (49)			

PWI, perineal wound infection; CI, confidence interval; OR, odds ratio

*単変量解析で、 $P < 0.1$ となった因子

**多変量解析で、 $P < 0.05$ となった因子

表 4 排尿障害のリスク因子解析

Risk factors		n	PUR, n (%)	Fisher's exact test	Multivariable logistic regression analysis	
				P	P	OR (95%CI)
Age	≥70 years	194	42 (22)	0.192		
	<70 years	309	51 (17)			
Sex	Male	329	73 (22)	0.003*	0.026**	1.96 (1.09-3.52)
	Female	174	20 (12)			Reference
Diabetes mellitus	Yes	66	17 (26)	0.124		-
	No	437	76 (17)			
Benign prostatic hyperplasia*	Yes	20	4 (20)	1.000		-
	No	309	69 (22)			
Preoperative residual urine volume	≥50 mL	74	20 (27)	0.037*	0.056	1.91 (0.98-3.69)
	<50 mL or no data	429	73 (17)			Reference
Distance of the tumour from AV	≤5 cm	200	42 (21)	0.202		-
	>5 cm	303	51 (17)			
Clinical T stage	T3 or T4	305	78 (26)	<0.001*	0.119	1.69 (0.87-3.27)
	T1 or T2	198	15 (8)			Reference
Preoperative therapy	Chemotherapy	90	32 (36)	<0.001*	0.672	1.15 (0.59-2.24)
	Chemoradiotherapy	9	2 (22)		0.781	0.79 (0.14-4.33)
	No	404	59 (15)			Reference
Surgical approach	Open	64	35 (55)	<0.001*	<0.001**	3.37 (1.73-6.54)
	Laparo or Robotic	439	58 (13)			Reference
Lateral lymph node dissection	Yes	208	63 (30)	<0.001*	0.637	0.84 (0.41-1.72)
	No	295	30 (10)			Reference
Pelvic nerve preservation	No	98	43 (44)	<0.001*	<0.001**	3.92 (2.28-6.74)
	Yes	466	50 (12)			Reference
Operative time	≥300min	242	67 (27)	<0.001*	0.592	1.23 (0.57-2.66)
	<300min	261	26 (10)			Reference
Bleeding	≥100ml	206	67 (33)	<0.001*	<0.001**	2.69 (1.51-4.80)
	<100ml	297	26 (9)			Reference

*Only male patients were included PUR, postoperative urinary retention; CI, confidence interval; OR, odds ratio

*単変量解析で、 $P < 0.1$ となった因子

**多変量解析で、 $P < 0.05$ となった因子

考察

本研究において、術前治療は、会陰創部感染および排尿障害の独立したリスク因子とはならなかった。会陰創部感染には、CRT が単変量解析でリスクとなる傾向を認めたが、多変量解析では男性、他臓器合併切除が独立したリスク因子となり、CRT は独立したリスク因子とはならなかった。マイルズ手術における拡大手術は骨盤内死腔を拡大し、感染のリスクとなることが報告されている (West et al., 2010; Yu et al., 2014; West et al., 2008; Mesquita et al., 2016)。排尿障害に関しては、術前治療が単変量解析において有意差を認めたが、多変量解析では男性、開腹手術、骨盤神経の非温存、出血量が独立したリスク因子となり、術前治療は独立したリスク因子とはならなかった。手術において、骨盤神経の温存が排尿障害に関与していることが報告されており (Akasu et al., 2009)、骨盤神経の温存を困難にする男性の狭骨盤および開腹手術が独立したリスク因子となっていると考えられる。

本研究の結果から、術前治療自体が術後合併症のリスク因子になるのではなく、他臓器合併切除および骨盤神経の非温存手術といった拡大手術を要する症例が合併症発症の高リスク群となることが示唆された。一方、術前治療によって腫瘍の縮小が得られた症例では、拡大手術を回避できるため、合併症の発症を最小限に抑えることが可能になると考えられた。この結果から、術前治療による腫瘍縮小のメカニズムを解明することが、周術期成績の向上につながると考えられた。さらに、術前治療後の残存腫瘍および免疫細胞を含めた微小環境を評価することで、長期予後を予測することを可能にし、今後の術前治療の発展にも寄与すると考え、続く実験を考案した。

研究 II. 直腸癌の術前治療による腫瘍局所の微小環境に与える変化

緒言

《術前治療による腫瘍縮小》

術前治療後の組織学的な腫瘍縮小効果の評価としては、Tumor regression grade (TRG) が広く用いられている。過去の臨床試験では、CRT の pCR 割合は 10-15%程度と報告されている (Sauer et al., 2004; Gérard et al., 2006)。その他の残存腫瘍を認める症例では、TRG の予後予測因子としての有効性が限定的であることが報告されている (Mace et al., 2015)。Sakuyama らは、CRT と NAC で残存腫瘍の面積を比較することで、両治療群には差があることを報告している (Sakuyama et al., 2018)。この術前治療による残存腫瘍の変化を追求することで腫瘍縮小のメカニズムの解明につながると考えた。

《腫瘍微小環境における免疫細胞》

腫瘍浸潤リンパ球 (Tumor-infiltrating lymphocytes: TIL) は、腫瘍監視のみならず術前治療の治療効果の指標としても報告されている (McDonnell et al., 2011; Zitvogel et al., 2013)。TIL が腫瘍免疫の構築に良好に働き、腫瘍に浸潤していく行程は、種々の癌種で良好な予後に関与していると報告されている (Cho et al., 2003; Zhang et al., 2003; Hiraoka et al., 2006; Loi et al., 2013)。直腸癌においても、CD8 T 細胞が腫瘍に高浸潤する症例は、良好な予後であることが報告されている (Anitei et al., 2014)。さらに、Shinto らは CRT の前後の腫瘍局所の評価で、CRT 後は CD8 T 細胞が増加し制御性 T 細胞が減少することを報告している (Shinto et al., 2014)。一方、NAC 後の直腸癌の微小環境について、詳細に検討した報告は少なく、さらに、術前治療による腫瘍縮小と微小環境の変化の関連について検討した報告はこれまでに認められない。術前治療後の腫瘍微小環境の変化を評価することで、治療効果および予後に関与する免疫細胞を明らかにできる可能性がある。

近年、いくつかの臨床試験において抗 PD-1 抗体をはじめとした免疫チェックポイント阻害剤が抗癌治療に有効であると報告されている (Yi et al., 2017; Rutkowski et al., 2017; Forde et al., 2016)。一方、大腸癌においては、マイクロサテライト不安定性を示す症例を除いて、免疫チェックポイント阻害剤への感受性は低いことがわかっている (Le et al., 2015)。このよう

な免疫チェックポイント阻害剤への感受性が低い癌種や患者に対し、抗腫瘍免疫応答を強化する目的で、化学療法、放射線療法、免疫療法を組み合わせた併用療法の開発が世界的に進められている (Rouanet et al., 2017; Yi et al., 2017; Rutkowski et al., 2017)。

術前治療後の腫瘍微小環境および抗腫瘍免疫応答を評価することで、進行直腸癌の CRT および NAC と免疫チェックポイント阻害剤の併用をはじめとした併用療法の Proof of Concept の確立に有用な知見を提供できる可能性がある。

《多重蛍光免疫染色》

近年、多重蛍光免疫染色は、多様な免疫細胞の分画やその形質を網羅的に解析するための重要なツールとなっている (Cross et al., 2011; Stack et al., 2014; Feng et al., 2015)。さらには、複数の研究において、TIL 分画の評価に加えて、組織内の局在、すなわち腫瘍間質もしくは腫瘍胞巣領域に位置するリンパ球をそれぞれ分けて評価することが、より正確にがんに対する免疫応答を理解するために重要であることが報告されている。それらの報告では、間質には治療後の非特異的なリンパ球浸潤を認めることが多く、腫瘍胞巣領域に局在している TIL がより予後との関連や抗腫瘍効果に重要であることを報告している (Mlecnik et al., 2016; Igari et al., 2017)。Ki67 は、細胞周期の活性化の周期に強発現し、細胞増殖のマーカーとしてよく用いられている。(Tumeh et al., 2014)。免疫においても、HIV、癌、自己免疫疾患をはじめとした慢性疾患において、T 細胞の Ki67 発現パターンを指標とした抗原反応性 T 細胞の活性化評価が行われている (Hazenbergh et al., 2000; Papagno et al., 2004)。

《本研究の目的》

多重蛍光免疫組織化学染色法を用いて、術前治療後の残存腫瘍および免疫細胞の特徴を解析し、免疫組織学的な変化を手術単独群と比べることで評価を行う。さらに、腫瘍縮小と免疫細胞の変化の関係を解析する。また、腫瘍微小環境と無再発生存との関連を評価し、術前治療後の新規予後予測マーカーの探索を行うことを目的とする。

研究方法

1) 対象

本研究は、2001年1月から2014年6月の期間に国立がん研究センター東病院大腸外科において、進行直腸癌（cT3 or T4, N0 or T any, N1-2）に対して、術前治療後に根治手術を受けた99例を対象とした。その中に、術前化学放射線療法（Neoadjuvant chemoradiotherapy: CRT）を受けた症例が48例、術前化学療法（Neoadjuvant chemotherapy: NAC）を受けた症例が51例含まれていた。術前化学放射線療法は、静注5-FUもしくは経口のCapecitabineを使用し、放射線は45Gy/25fもしくは50.4Gy/28fで施行されていた。CRTから手術までのインターバルは4から12週であった。NAC群は、3から8コースのFOLFOX療法（5-FU+Leucovorin+Oxaliplatin）が行われ、手術までのインターバルは4から8週であった。年齢、性別、腫瘍の局在、臨床病期を術前治療群とマッチングさせた手術単独症例、101例をControl群とした。本研究は、計200例の局所進行直腸癌を対象とした（図1）。本研究は、ヘルシンキ宣言を遵守しており、国立がん研究センターの倫理審査委員会で承認を受け、実施した（研究計画書番号: 2016-157）。

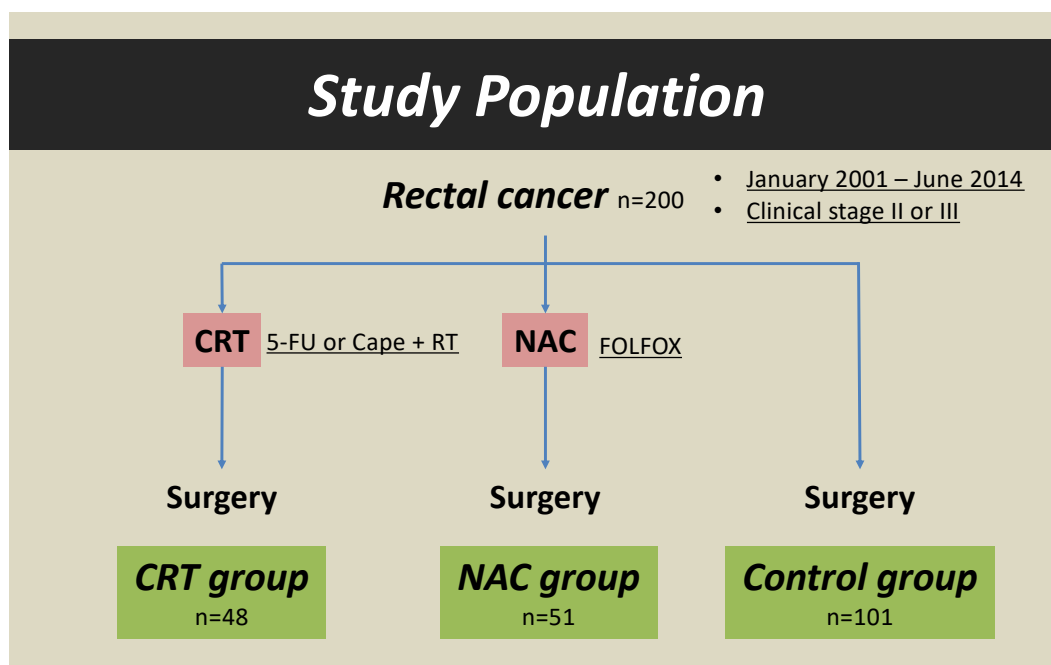


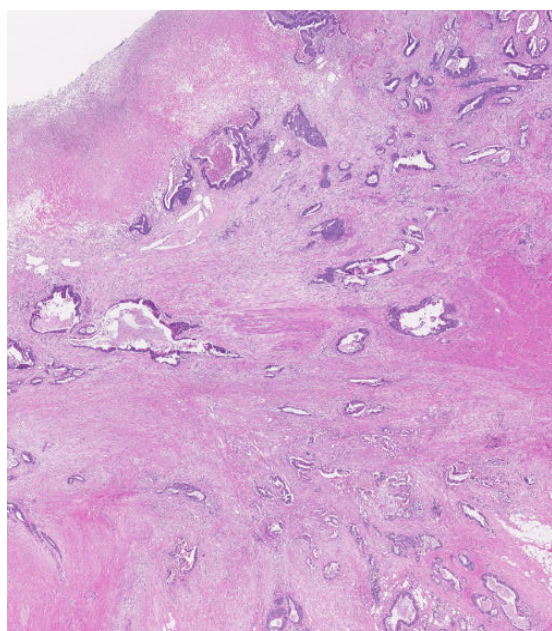
図1 対象症例のシェーマ

2) 病理組織学的評価項目

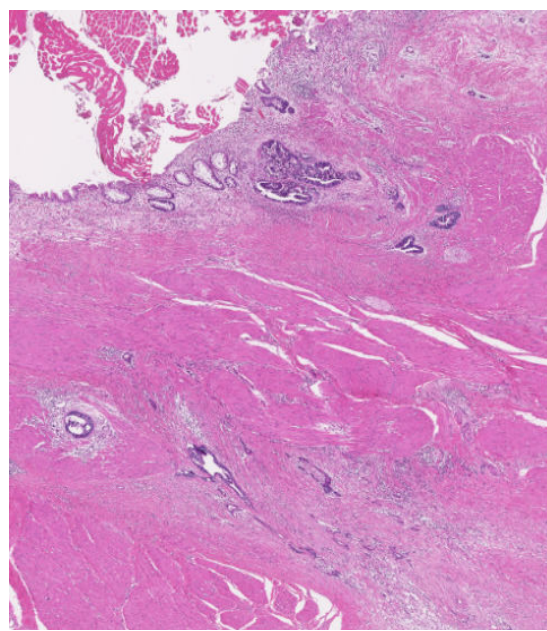
術前および病理学的な TNM ステージ分類は、UICC 第 7 版の規定に従って行った。術前治療の効果判定は、American Joint Committee on Cancer and the College of American Pathologists による TRG を用いて、腫瘍病理診断専門医によって行われた (Edge et al., 2010; Mace et al., 2015)。TRG0 は病理学的完全奏功を示しており、TRG3 は組織学的な治療の効果を認めないことを示す (表 5、図 2)。その他の評価項目として、リンパ管・静脈・神経侵襲を病理組織所見報告用紙から収集した。

表 5 AJCC による TRG 分類

TRG0 (complete response)	No viable cancer cells
TRG1 (moderate response)	Single or small groups or cancer cells
TRG2 (minimal response)	Residual tumor outgrown by fibrosis
TRG3 (poor response)	Minimal or no tumor kills, extensive residual cancer



CRT TRG 2



NAC TRG 1

図 2 各治療群の組織学的効果判定

3) 4-point tissue micro arrays (4p-TMAs) の作製

直腸癌 200 症例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックおよびそのブロックに由来した HE 染色のスライドを、施設内保管庫から収集した。病理診断専門医によって、HE 染色のスライドを精査し、TRG の判定を行った。同時に、TMA に用いる部位 (コア) の選択を行なった (図 3)。

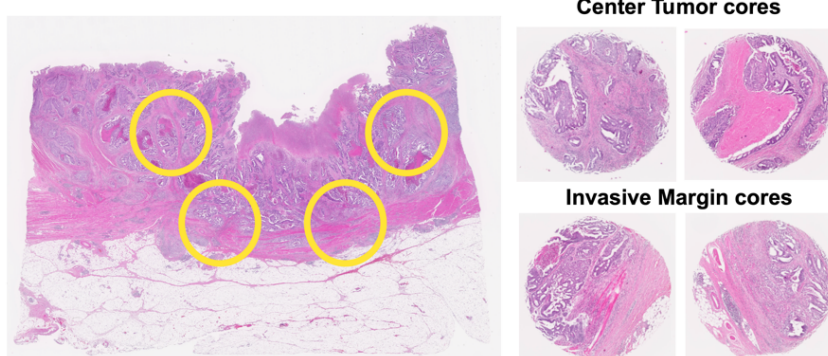


図 3 HE 染色スライド上での TMA コア採取部

TMA は、1 症例につき 4 個のコアを採取する 4p-TMAs 法で作製した (Shinto et al., 2004; Kojima et al., 2014)。TMA コアの採取する部位の均一性を保つために、腫瘍が残存する症例 (TRG1-3 および Control 群) は、腫瘍中心部 (Center Tumor) と腫瘍先進部 (Invasive Margin) からそれぞれ 2 ヶ所ずつ、腫瘍が残存していない症例 (TRG0) は、腫瘍が存在していたと考えられる線維化を認めた範囲から 4 ヶ所、直径 2mm のコアを作成した (Azuma, Tokyo, Japan) (図 4)。

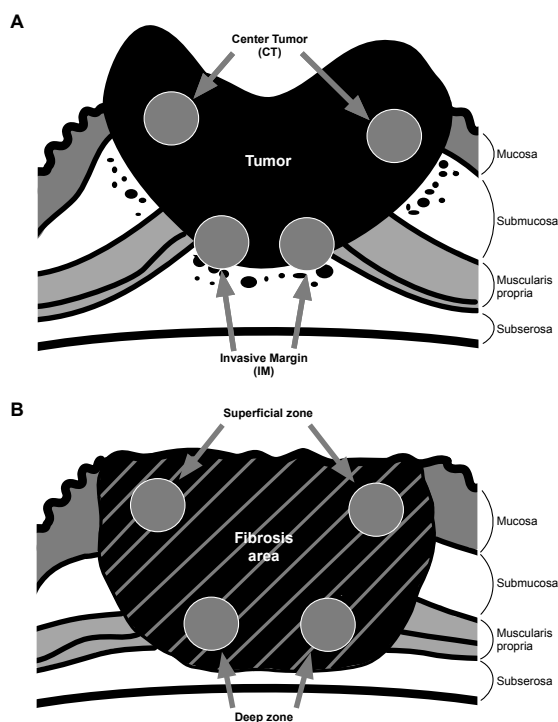


図 4 TMA コア採取部のシエーマ (A). 残存腫瘍症例 (B). TRG0 症例

免疫染色のむらなど的人為的、技術的な影響を可能な限り排除する目的で、同一の症例から採取した 4 つのコアは、うち 2 つを一つの TMA ブロックに対角になるように配置し、2 つの TMA ブロックに分散させ配置した。一つの TMA のブロックには 48 個のコアが含まれており、本研究のために 960 個のコアで、合計 20 個の TMA ブロックを作成した。この TMA ブロックから、4 μ m の薄切を行い、以後の免疫組織化学染色および多重蛍光免疫組織化学染色に用いた。

4) ミスマッチ修復蛋白 (Mismatch repair; MMR) の免疫組織化学染色

各症例における MMR ステータスを評価するために、MLH1 (1:500; BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ)、MSH2 (1:50; Calbiochem, Burlington, MA)、MSH6 (1:1000; BD Pharmingen)及び PMS2 (1:50; Dako, Santa Clara, CA) に対する抗体を用いて、免疫組織化学染色法により各タンパク質の発現を検討した。免疫組織化学染色は、TMA のブロックから薄切された $4\mu\text{m}$ のスライドを用いて行なった。いずれかの抗体が、腫瘍胞巣で染色されなかった症例をミスマッチ修復蛋白欠損 (Mismatch repair protein deficient; dMMR) とした。

5) 多重蛍光免疫組織化学染色

まず、腫瘍組織全体を薄切したスライド (Whole) を用いて、染色条件のバリデーションを行った後、TMA のブロックから薄切された $4\mu\text{m}$ のスライドを用いて、多重蛍光免疫組織化学染色を行なった。多重蛍光免疫組織化学染色では、PerkinElmer Opal Kit (PerkinElmer, Waltham, MA) を使用した (図 5)。抗体および染色条件の詳細を、表 6 に示す。

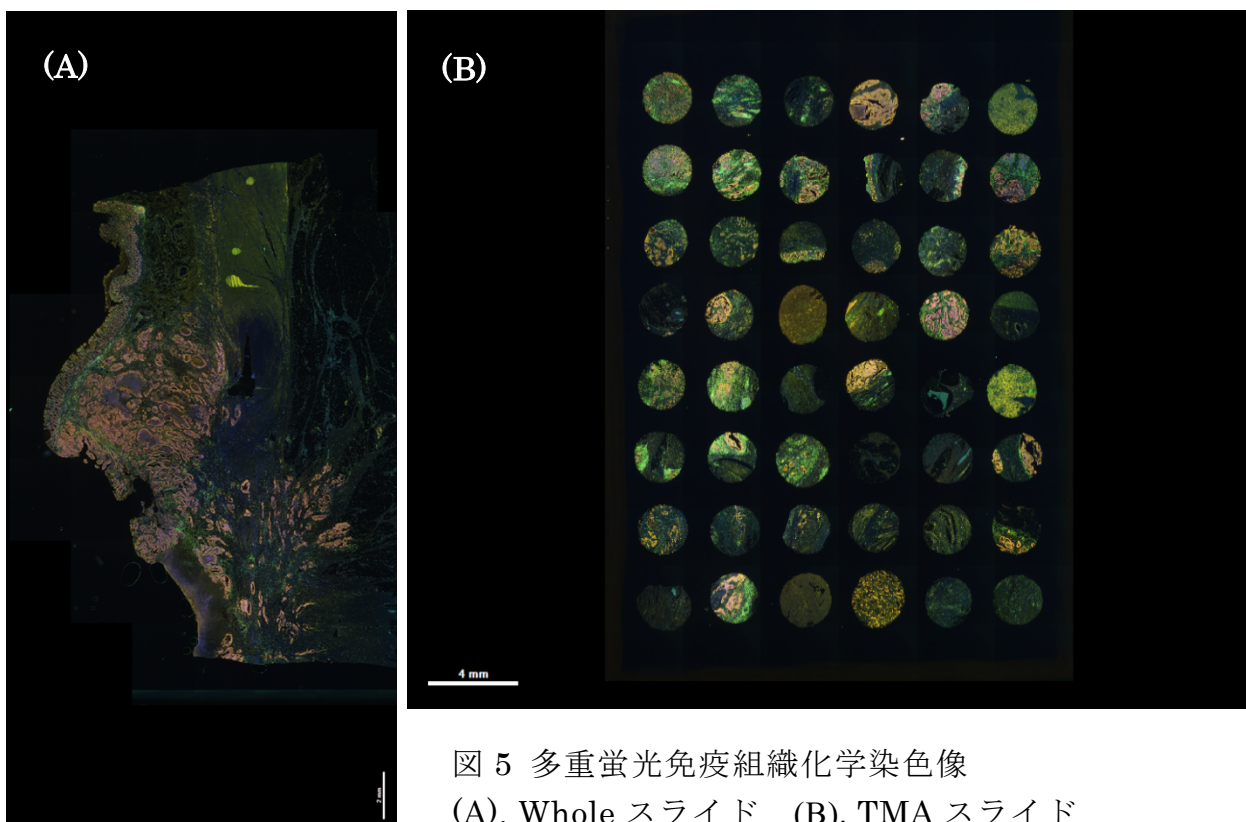


図 5 多重蛍光免疫組織化学染色像
(A). Whole スライド (B). TMA スライド

表 6 蛍光免疫組織化学染色の抗体および染色条件

Antibody	Clone	Isotype	Company	Antigen activaion	Dilution
CD3	SP7	Rabbit IgG	Abcam	TRS9 (Dako) / 95 °C, 15 min.	1 / 200
CD4	4B12	Mouse IgG1	Novocastra	TRS9 (Dako) / 95 °C, 15 min.	1 / 200
CD8	4B11	Mouse IgG2a	Novocastra	ARpH6 (PerkinElmer) / 95 °C, 15 min.	1 / 160
CD68	PG-M1	Mouse IgG1	Dako	TRS9 (Dako) / 95 °C, 15 min.	1 / 12000
CD204	SRA-E5	Mouse IgG1	Transgenic Inc cat.	ARpH6 (PerkinElmer) / 95 °C, 15 min.	1 / 200
Cytokeratin	AE1+AE3	Mouse IgG1	Dako	TRS9 (Dako) / 95 °C, 15 min.	1 / 100
Foxp3	D6O8R	Rabbit IgG	CST	TRS9 (Dako) / 95 °C, 15 min.	1 / 400
Ki67	Mib-1	Mouse IgG1	Dako	ARpH6 (PerkinElmer) / 95 °C, 15 min.	1 / 100

6) 画像解析

多重蛍光免疫組織化学染色を行なったスライドから、自動イメージングシステム (Vectra ver. 3.0; PerkinElmer) によって画像データを取得した。画像データの解析は、画像解析ソフトウェア (Inform; PerkinElmer) によって行なった。Whole スライドは腫瘍浅層および腫瘍深層からそれぞれ 10 カ所の領域を選択し、解析対象とした。TMA のスライドでは、各コア全体を解析対象とした (図 6)。

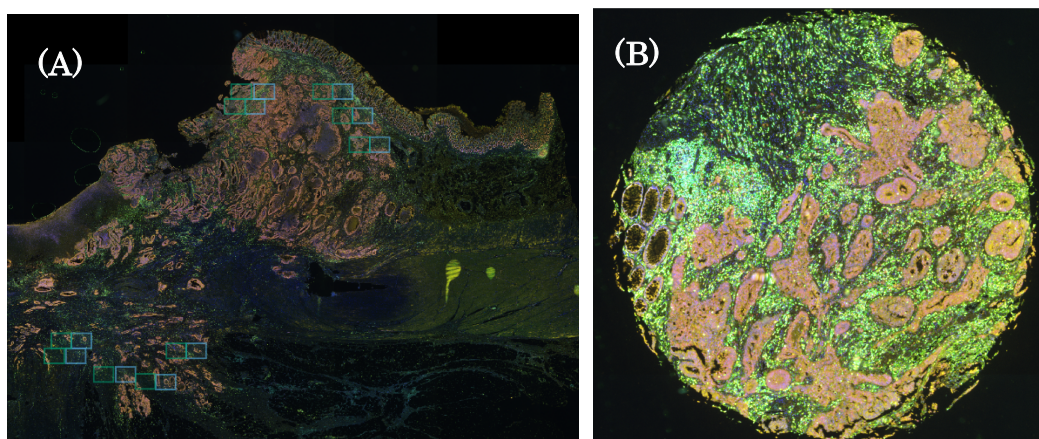
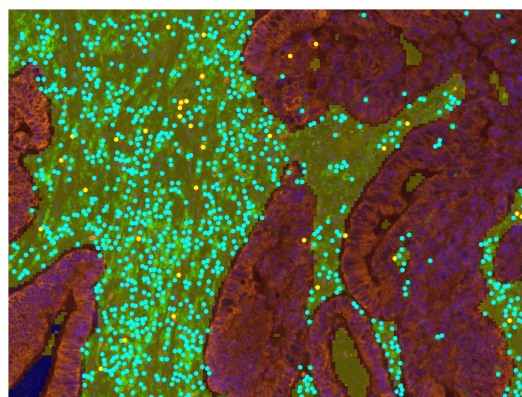
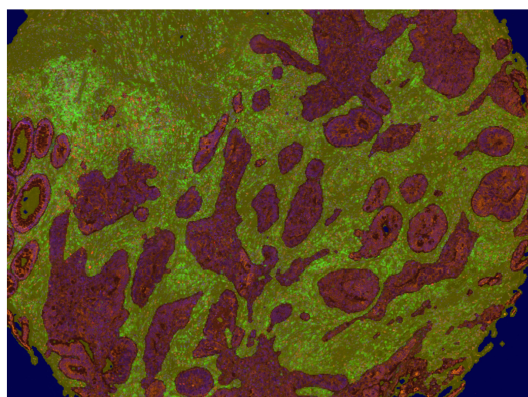


図 6 解析対象

- (A). Whole スライドでは計 20 カ所の選択領域 (青枠) を解析対象
 (B). TMA スライドではコア全体を解析対象

(A) Tissue segmentation

(B) Phenotypes



■ Carcinoma

■ Stroma

● CD4

● CD8

図 7 画像解析

(A). 腫瘍領域の区別 (Tissue segmentation)

(B). 浸潤免疫細胞の認識 (Phenotypes)

Inform では、まず、腫瘍組織を癌領域 (carcinoma area) と間質領域 (stromal area) に区別し (図 7A)、DAPI の染色から核を検出し、細胞数を算出した。さらに、染色した各分子の蛍光強度や細胞形態から、CD4 陽性細胞や CD8 陽性細胞といった特定のフェノタイプを持つ免疫細胞を定義し、自動学習アルゴリズムによりその認識と抽出を行なった (図 7B)。その後、浸潤免疫細胞の分布を解析した。領域の区別と免疫細胞の認識は、アルゴリズムの識別精度が 90%に到達するまで繰り返し行なった (Igari et al., 2017; Takahashi et al., 2018)。フェノタイプによって CD4 もしくは CD8 陽性に認識された細胞のうち、CD3 抗体の平均蛍光強度の高い集団を CD3 陽性集団とし、CD3CD4 もしくは CD3CD8 陽性細胞をそれぞれ、CD4 T 細胞、CD8 T 細胞と定義した。同様の方法で、サイトケラチン陽性細胞、CD4 T 細胞および CD8 T 細胞のうち、Ki67 が高発現する分画を Ki67 強発現分画として区別した (図 8)。また、CD4 T 細胞のうち、Foxp3 が核において高発現する分画を制御性 T 細胞として、CD68 陽性細胞のうち、CD204 高発現および低発現分画を、それぞれ M2 マクロファージおよび M1 マクロファージとして区別した。これらの各細胞サブセットの解析は、ソフトフェア (Spotfire ver. 7.8; TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA) を用いて行なった。Whole スライドではすべての選択領域の細胞数の平均値を用いて評価

した。TMA スライドでは、それぞれの腫瘍領域の面積を算出し、免疫細胞が位置している領域における密度を算出し、すべてのコアの平均値を用いて評価した。癌巣領域に位置している T 細胞は癌 T 細胞 (Carcinoma T-cell)、間質領域に位置している T 細胞は間質 T 細胞 (Stromal T-cell) と定義した。この癌 T 細胞と間質 T 細胞の比を癌間質比として算出し、T 細胞の癌巣内への浸潤を評価した。

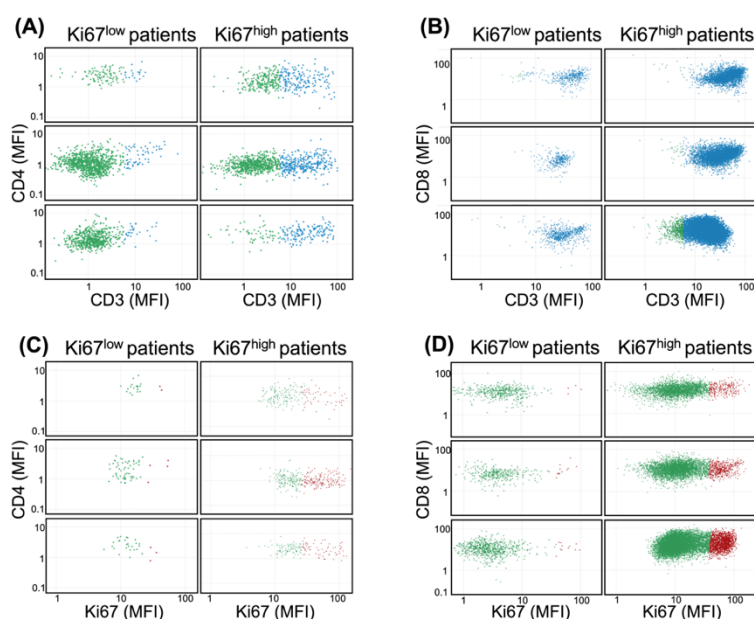


図 8 平均蛍光強度による細胞分画の区別
 (A).(B). CD3CD4 および CD3CD8 陽性細胞 (青)
 (C).(D). Ki67 高発現分画 (赤)

7) 統計学的解析

免疫細胞の密度は、中央値と四分位とともに箱ひげ図で示した。箱ひげ図の上下のひげは、10%および 90%タイルを示す。それぞれの分画の割合および CD4CD8 比と癌間質比は、平均値とともに棒グラフで示した。エラーバーは標準偏差を示す。統計検定は、パラメトリックな検定として、Dunnett 検定および Tukey 検定を、ノンパラメトリックな検定として、Steel 検定および Steel-Dwass 検定を用いた。カテゴリー変数の検定には、カイ二乗検定およびフィッシャーの正確検定を用いた。無再発期間の生存曲線は Kaplan-Meier 法で表し、群間の検定にはログランク検定を用いた。無再発生存期間に寄与する因子の同定は、コックスの比例ハザードモデルを用いて単変量解析および多変量解析を行った。単変量解析で P 値が 0.05 未満になった因子を多変量解析に組み込んだ。P 値は 0.05 未満のものを統計学的有意差ありとみなした。

すべての統計検定およびグラフ化は、EZR version 1.41 (自治医科大学埼玉メディカルセンター) を使用して行った (Kanda et al., 2013)。グラフ中に統計検定の結果を示している。

結果

1) 患者背景と術前治療後の無再発生存

本研究に登録した全症例の患者背景と臨床病理学的な特徴を、表 7 に示した。

表 7 患者背景と臨床病理学的な特徴

Characteristics	CRT (n=48)	NAC (n=51)	Control (n=101)	<i>P</i> value CRT vs NAC	<i>P</i> value CRT vs Cont.	<i>P</i> value NAC vsCont.
Age (year), median (range)	56.5 (27-77)	57 (27-73)	61 (33-80)	0.819	0.256	0.051
Sex, n (%)				1.000	1.000	1.000
Male	35 (72.9)	36 (70.6)	66 (65.3)			
Female	13 (27.1)	15 (29.4)	35 (34.7)			
Distance from anal verge (cm), median (range)	3.0 (0-6)	3.5 (0-6)	4.0 (0-6)	0.524	0.279	0.968
Clinical TNM stage, n (%)				0.850	1.000	0.260
II	24 (50)	19 (37.3)	54 (53.5)			
III	24 (50)	32 (62.7)	47 (46.5)			
Pathological TNM stage, n (%)				1.000	0.009	0.060
0	7 (14.6)	5 (9.8)	0 (0)			
I	10 (20.8)	13 (25.5)	22 (21.8)			
II	14 (29.2)	12 (23.5)	35 (34.7)			
III	15 (31.2)	18 (35.3)	36 (35.6)			
IV	2 (4.2)	3 (5.9)	8 (7.9)			
Lymphatic invasion, n (%)	10 (20.8)	22 (43.1)	53 (52.5)	0.093	0.002	1.000
Vascular invasion, n (%)	24 (50)	21 (41.2)	82 (81.2)	1.000	<0.001	<0.001
Perineural invasion, n (%)	14 (29.2)	12 (23.5)	43 (42.6)	1.000	0.490	0.100
Tumour regression grade, n (%)				<0.001	-	-
0 (pCR)	7 (14.6)	5 (9.8)	-			
1	17 (35.4)	13 (25.5)	-			
2	24 (50)	20 (39.2)	-			
3	0 (0)	13 (25.5)	-			

CRT, chemoradiotherapy; NAC, neoadjuvant chemotherapy; pCR, pathological complete response

年齢、腫瘍の局在、臨床病期、病理学的病期、そして神経侵襲に関しては 3 群間で、有意な差は認められなかった。リンパ管浸潤は Control 群と比較

し、CRT 群で頻度が少なく、静脈浸潤は Control 群と比較し、CRT 群および NAC 群で頻度が少なかった。TRG に関しては、NAC 群より CRT 群で腫瘍縮小が良好であった。CRT 群、NAC 群および Control 群の 3 群間の無再発生存期間 (Relapse-free survival: RFS) に有意差は認めなかった (図 9)。続く解析では、残存腫瘍の評価および腫瘍に浸潤する免疫細胞を評価していくため、残存腫瘍を認めない TRG0 の症例 12 例を除外し、TRG1 から 3 および無治療の 188 例を解析対象とした。

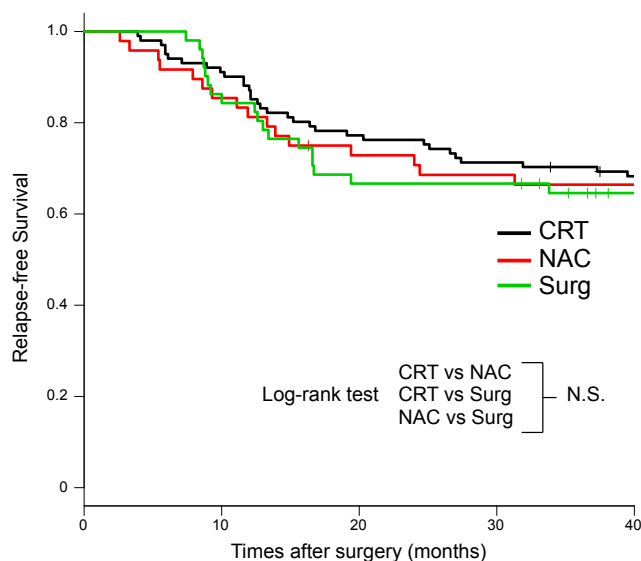


図 9 各治療群の無再発生存期間

2) Whole スライドでの多重蛍光免疫組織化学染色の解析

まず、Whole スライドによる抗体染色条件およびその組み合わせのバリデーションを行った。決定した各抗体の染色条件ならびに組み合わせは、表 2 に示した。それらを用いて、腫瘍浸潤 T 細胞の解析を行った。CRT 群、NAC 群および Control 群からそれぞれ 3 症例を選択し計 9 例の解析を行った。各治療群の CD4 陽性細胞は、Control 群と比較して有意差は認めなかったが、CRT 群で低い傾向にあり、NAC 群で高い傾向にあった (図 10)。この結果は、後述の TMA スライドでの CD4 T 細胞の結果と同様の傾向であり、以降の残存腫瘍および浸潤免疫細胞の評価は、TMA の解析データを用いている。

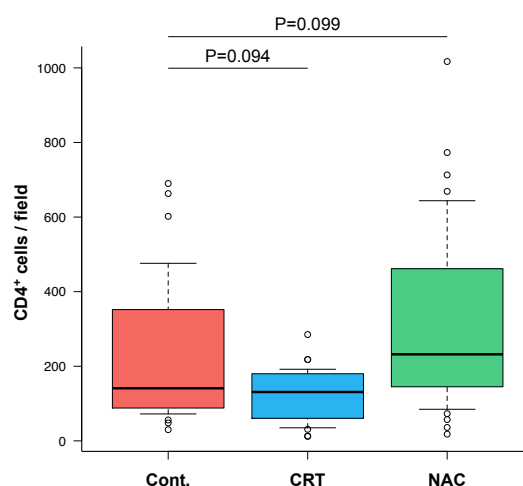


図 10 Whole スライドでの各治療群の CD4 陽性細胞

3) 術前治療後のミスマッチ修復蛋白の免疫組織化学染色

ミスマッチ修復蛋白の代表的な染色像を図 11 に示す。全体のうち 11 症例 (5.9%) で dMMR を認め、各群での内訳は、CRT 群で 3 症例 (7.3%)、NAC 群で 2 症例 (4.3%)、Control 群で 6 症例 (5.9%) であった。

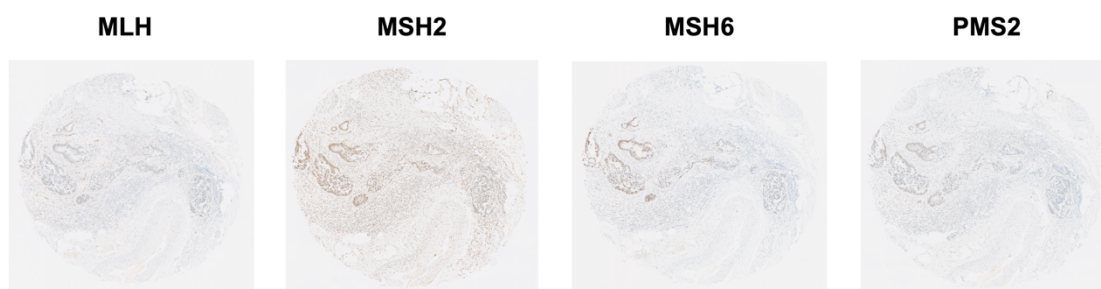


図 11 ミスマッチ修復蛋白の免疫組織化学染色像

4) 術前治療後の残存腫瘍の形態学的な変化および腫瘍増殖能の変化

まず、微小環境における腫瘍の評価を行った。多重蛍光免疫組織化学染色法にて、DAPI (核)、サイトケラチン、Ki67 染色を用いて、残存腫瘍の腫瘍面積および腫瘍増殖能について評価を行った。代表的な染色像を図 12 に示す。

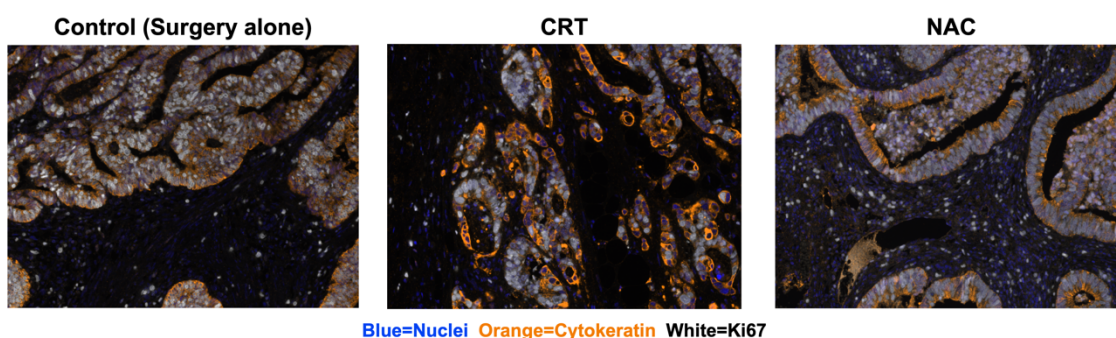


図 12 各治療群の残存腫瘍の染色像

腫瘍中心部および腫瘍先進部を含む合計 4 コアの総腫瘍面積の平均値 (Total carcinoma area) は、Control 群と比較して、CRT 群および NAC 群いずれも有意に低値であった。さらに、NAC 群と比較して CRT 群が有意に低値であった。各領域では、腫瘍中心部 (Center tumor) では、各群間に有意差を認めたが、腫瘍先進部 (Invasive margin) では、CRT 群と NAC 群間に有意差は認めなかった (図 13)。

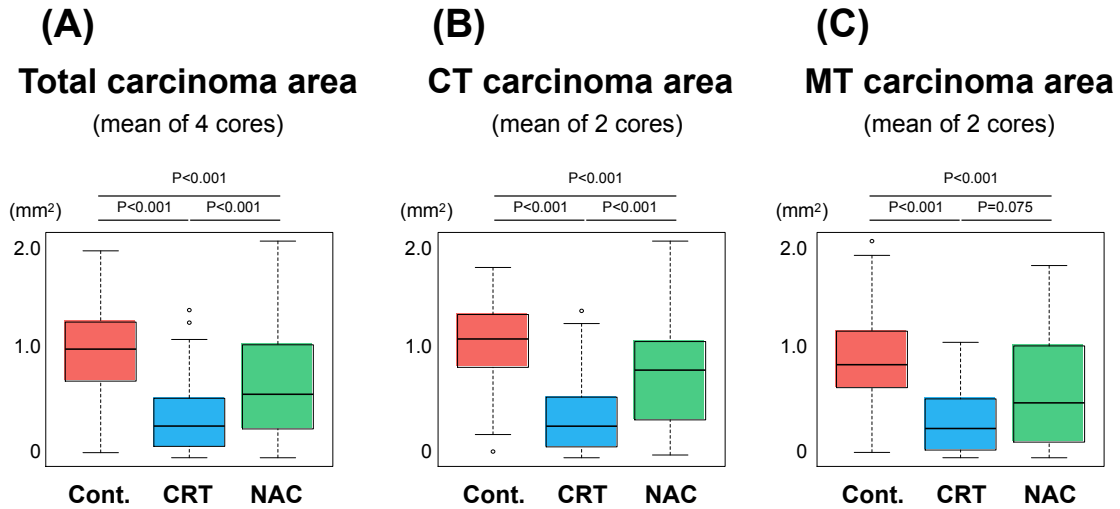


図 13 残存腫瘍面積

(A). 総腫瘍面積 (B). 腫瘍中心部面積 (C). 腫瘍先進部面積

次に、各治療群のそれぞれの TRG 毎に残存総腫瘍面積の比較を行った。その結果、TRG による組織学的な治療効果判定と相関することを確認した (図 14)。この結果から、4p-TMAs による腫瘍面積の評価は、腫瘍全体の結果を近似した結果であることが示唆された。同じ TRG の各治療群間での総残存腫瘍面積には、差が認められなかった。

染色像の顕微鏡観察所見で、CRT 群の残存腫瘍胞巣は、NAC 群と比較して小さい傾向にあったことから、各治療群の同じ TRG 間で、残存腫瘍胞巣の大きさの分布を比較した。総腫瘍面積を腫瘍胞巣数で割った

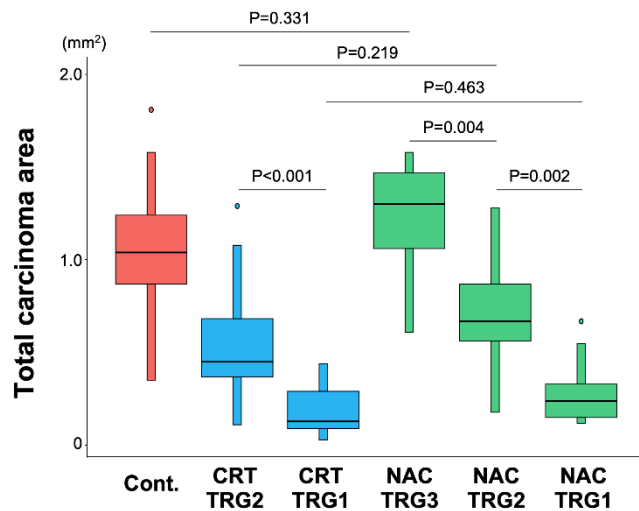


図 14 残存腫瘍面積と組織学的治療効果との関連

各症例の腫瘍胞巣あたりの平均腫瘍面積を、小胞巣 (0.01mm² 未満)、中胞巣 (0.01mm² 以上、0.02mm² 未満)、大胞巣 (0.02mm² 以上) に分類し、そのパーセンテージを比較した。その結果、CRT 群は、小胞巣症例の割合が、NAC 群の同じ TRG 群よりも有意に多く、腫瘍胞巣が崩壊していることが示唆された (図 15)。

Mean carcinoma region size

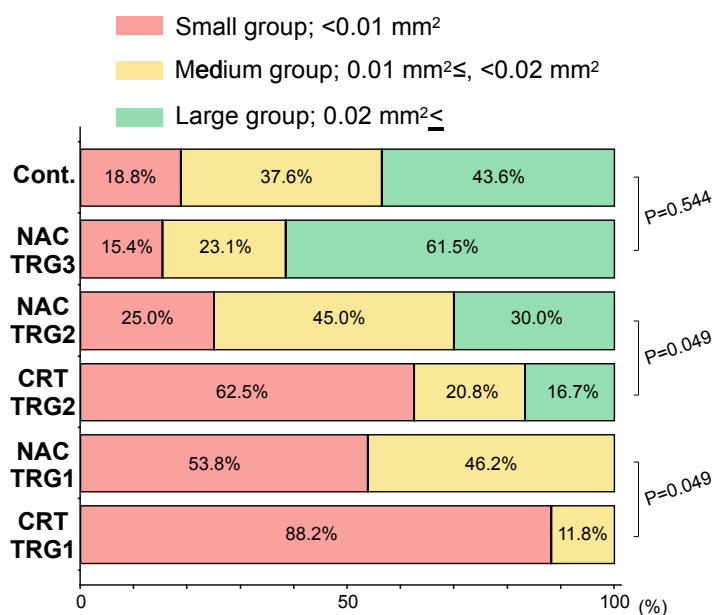


図 15 平均残存腫瘍胞巣の大きさ

次に残存腫瘍の増殖能を評価するために、サイトケラチン陽性細胞のうち Ki67 を高発現する細胞の割合を評価した。その結果、CRT 群では、サイトケラチン陽性細胞の Ki67 高発現細胞の割合が Control 群と比較して有意に低下していることがわかった。一方、NAC 群では低下は認めなかった。それぞれの TRG 毎に評価を行った場合、CRT・NAC 群ともに TRG 間での差異は認めなかった (図 16)。

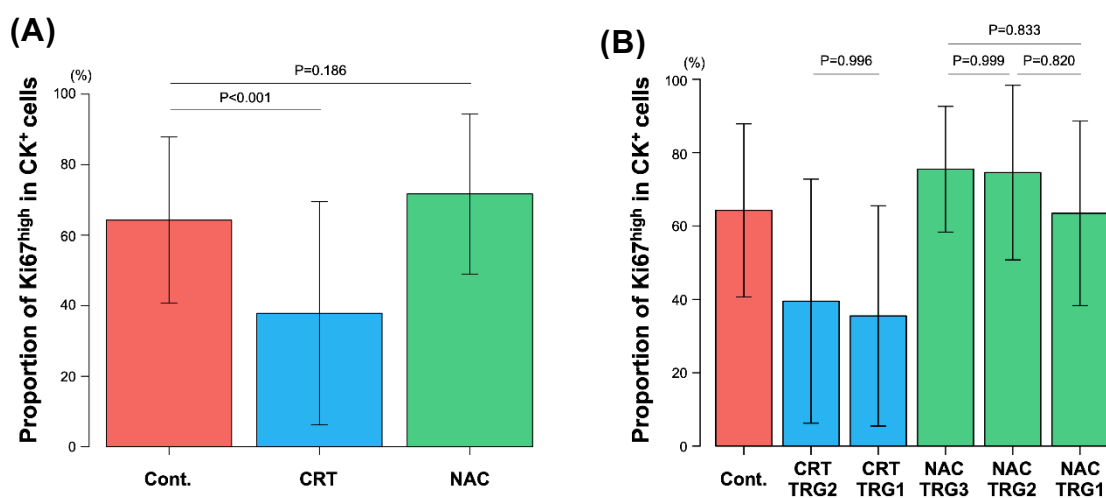


図 16 腫瘍細胞における Ki67 高発現細胞の割合 (A). 各治療群 (B). 組織学的治療効果

3) 術前治療後の T 細胞の変化

まず、微小環境に関する浸潤免疫細胞として T 細胞数の評価を行った。多重蛍光免疫組織化学染色法にて、CD3、CD4、CD8 を染色し、術前治療後の CD4 T 細胞および CD8 T 細胞について評価を行った。CD3CD4 および CD3CD8 の二重陽性細胞の代表的な染色像を図 17 に示す。

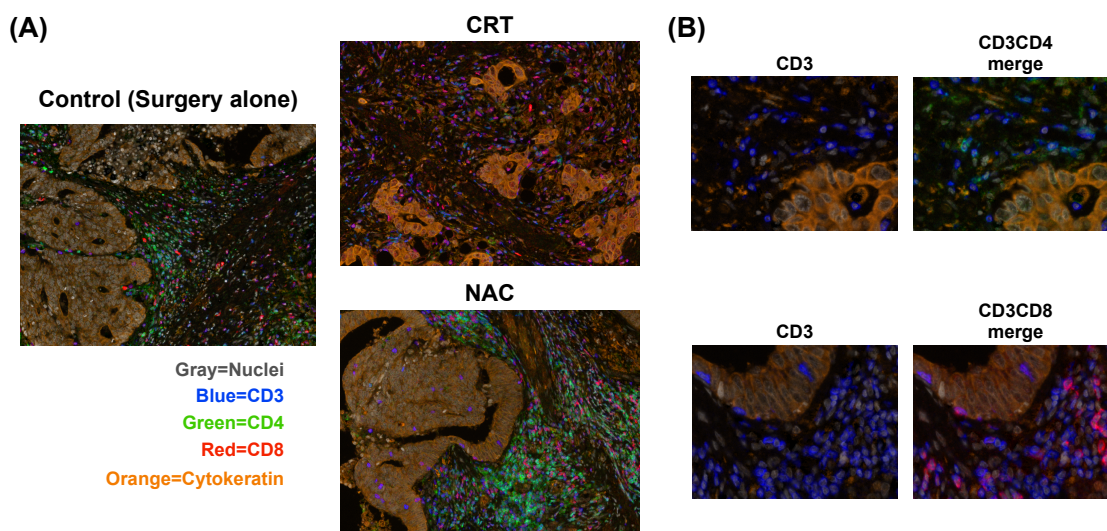


図 17 各治療群の T 細胞の染色像

(A). 弱拡大 (B). CD3CD4 陽性 (上)、CD3CD8 陽性 (下) 細胞

CD4 T 細胞および CD8 T 細胞の密度は、Control 群と比較して、NAC 群では高値であり、CRT 群では低値であった (図 18)。

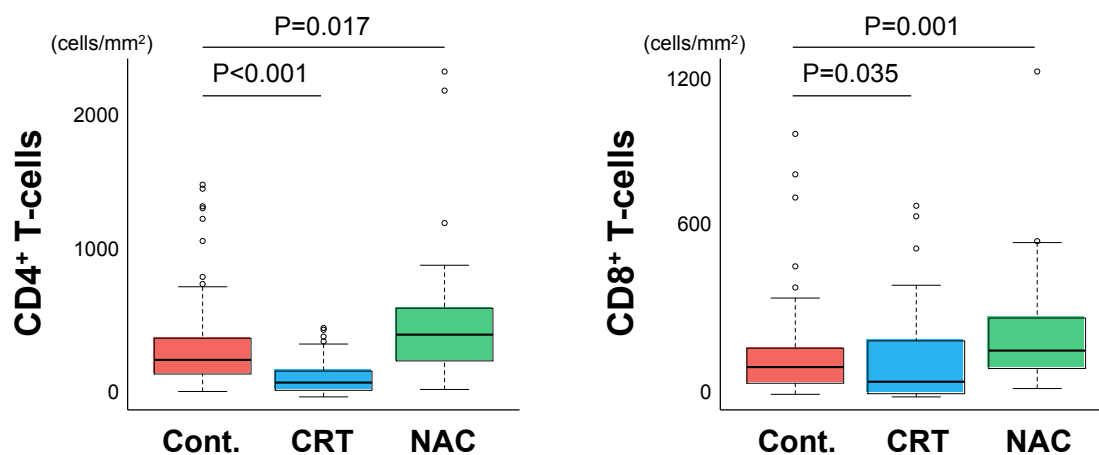


図 18 CD4 T 細胞および CD8 T 細胞の密度の解析

癌部と間質部で領域ごとに評価を行った結果、NAC 群では Control 群に比較して、癌 CD4 T 細胞、癌 CD8 T 細胞および間質 CD8 T 細胞の密度が有意に高値であった。一方、CRT 群では、間質 CD4 T 細胞および CD8 T 細胞は有意に低値であった (図 19)。

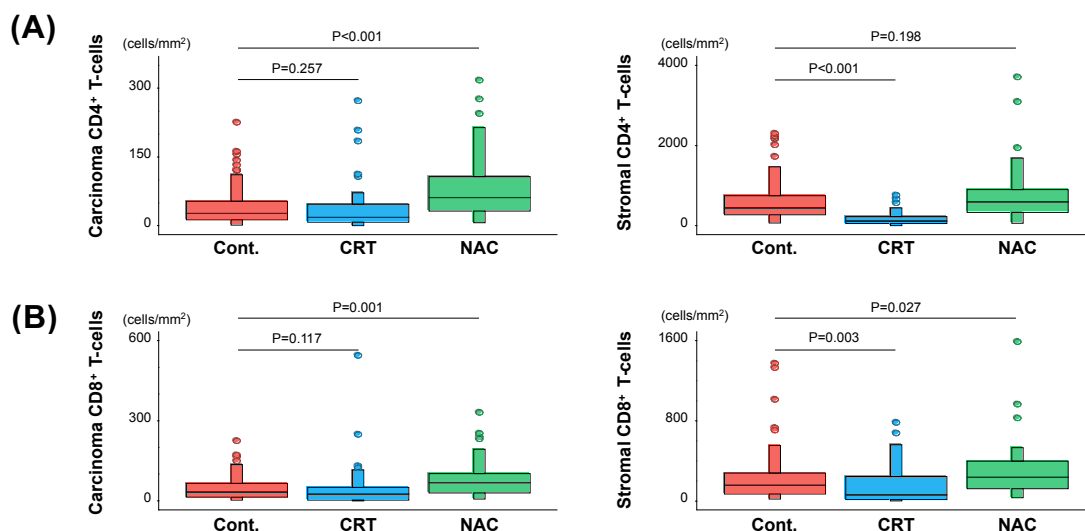


図 19 領域別 T 細胞の解析

(A). 癌および間質 CD4 T 細胞密度 (B). 癌および間質 CD8 T 細胞密度

CD4CD8 比に関しては、癌部では CRT 群で CD4CD8 比が有意に高値であった。間質では NAC 群で CD4CD8 比が低い傾向にあった (図 20 (A))。癌間質比に関しては、CRT 後の CD4 T 細胞および CD8 T 細胞の癌間質比は Control 群と比較して有意に高値であり、NAC 群では CD8 T 細胞の癌間質比のみが高い傾向にあった (図 20 (B))。

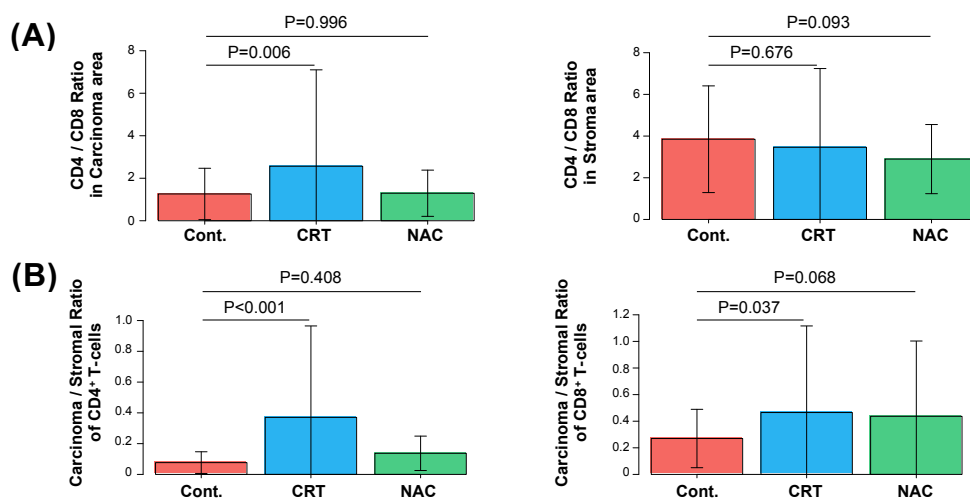


図 20 (A). 癌部および間質部における CD4CD8 比
(B). CD4 および CD8 T 細胞の癌間質比

4) 術前治療後の T 細胞 Ki67 高発現分画の変化

次に、T 細胞の活性化を評価するために、T 細胞の Ki67 高発現分画について解析を行った。CD4 T 細胞および CD8 T 細胞における Ki67 染色の代表的な染色像を図 21 に示す。

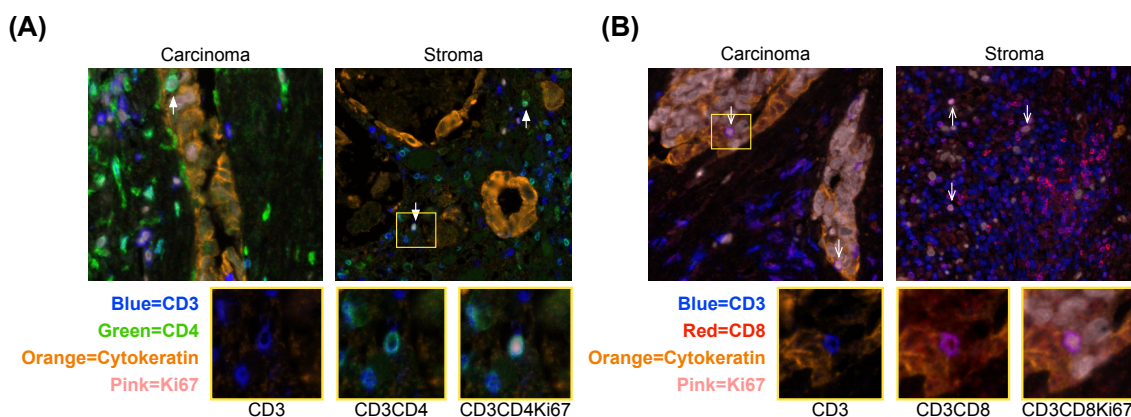


図 21 Ki67 高発現 T 細胞の染色像

(A). Ki67 高発現 CD4 T 細胞 (B). Ki67 高発現 CD8 T 細胞

T 細胞全体と同様に、NAC 群では Ki67 高発現 CD4 T 細胞、Ki67 高発現 CD8 T 細胞のいずれも高い傾向にあった。また、CRT 群ではいずれも Control 群と比較して有意に低値であった。NAC 群では、Ki67 高発現 CD4 T 細胞の分画の割合が Control 群と比較して有意に高値であった。一方、CRT 群では Ki67 高発現 T 細胞の分画の割合に有意な差は認めなかった (図 22)。

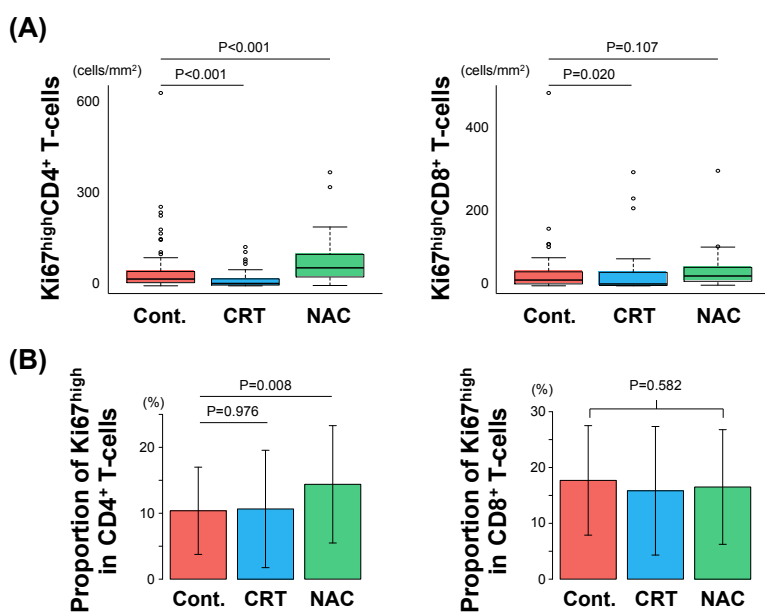


図 22 Ki67 高発現 T 細胞の解析

(A). 密度 (B). 割合

癌巣部と間質部に分けて評価した結果、NAC群ではKi67高発現癌CD4 T細胞およびKi67高発現間質CD4 T細胞が有意に高値であり、Ki67高発現癌CD8 T細胞もControl群と比較して高い傾向にあった。CRT群に関しては、Ki67高発現間質CD4 T細胞、Ki67高発現癌CD8 T細胞およびKi67高発現間質CD8 T細胞がControl群と比較して有意に低値であった(図23(A)および(B))。Ki67高発現分画の各T細胞内の割合は、両治療群共に間質部と比較し癌部において高値であった。NAC群でのKi67高発現間質CD4 T細胞の割合がControl群と比較して有意に高値であったが、その他の治療群と分画の割合に有意な差は認めなかった(図23(C)および(D))。

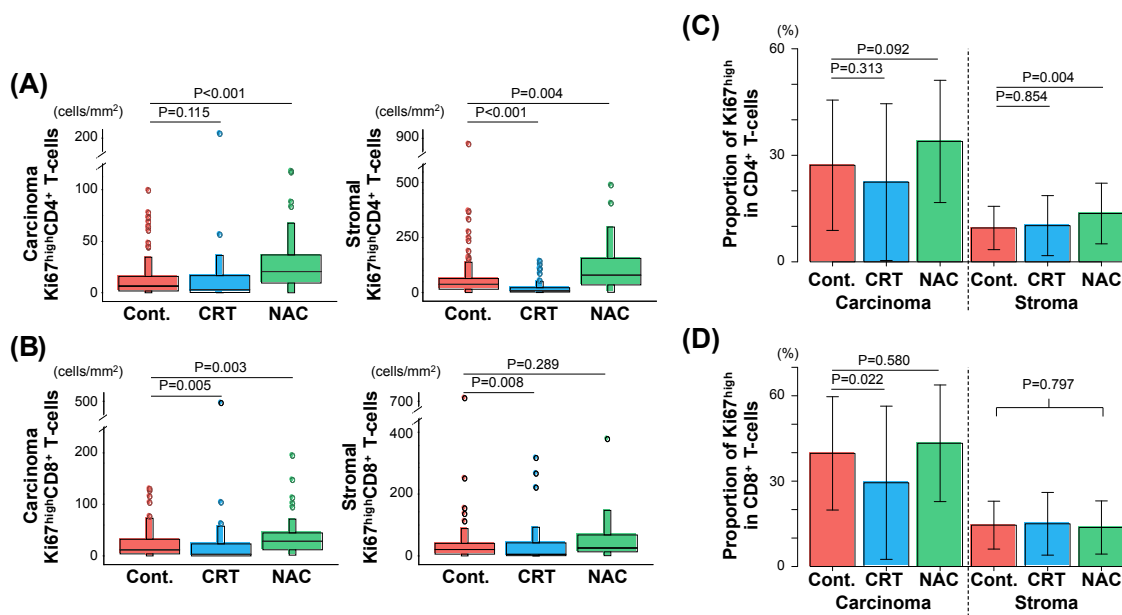


図23 領域別 Ki67 高発現 T 細胞の解析

- (A). Ki67 高発現癌および間質 CD4 T 細胞密度
- (B). Ki67 高発現癌および間質 CD8 T 細胞密度
- (C). Ki67 高発現癌および間質 CD4 T 細胞割合
- (D). Ki67 高発現癌および間質 CD8 T 細胞割合

Ki67 高発現分画の CD4CD8 比に関しては、T 細胞全体と同様に CRT 群で癌部領域の Ki67 高発現 CD4CD8 比が有意に高値であったが、その他の治療群、分画に有意差は認めなかった (図 24 (A))。T 細胞全体と Ki67 高発現分画の CD4CD8 比の比較を行なったが、術前治療群において Ki67 高発現分画の CD4CD8 比の変化は認めなかった (図 24 (B))。

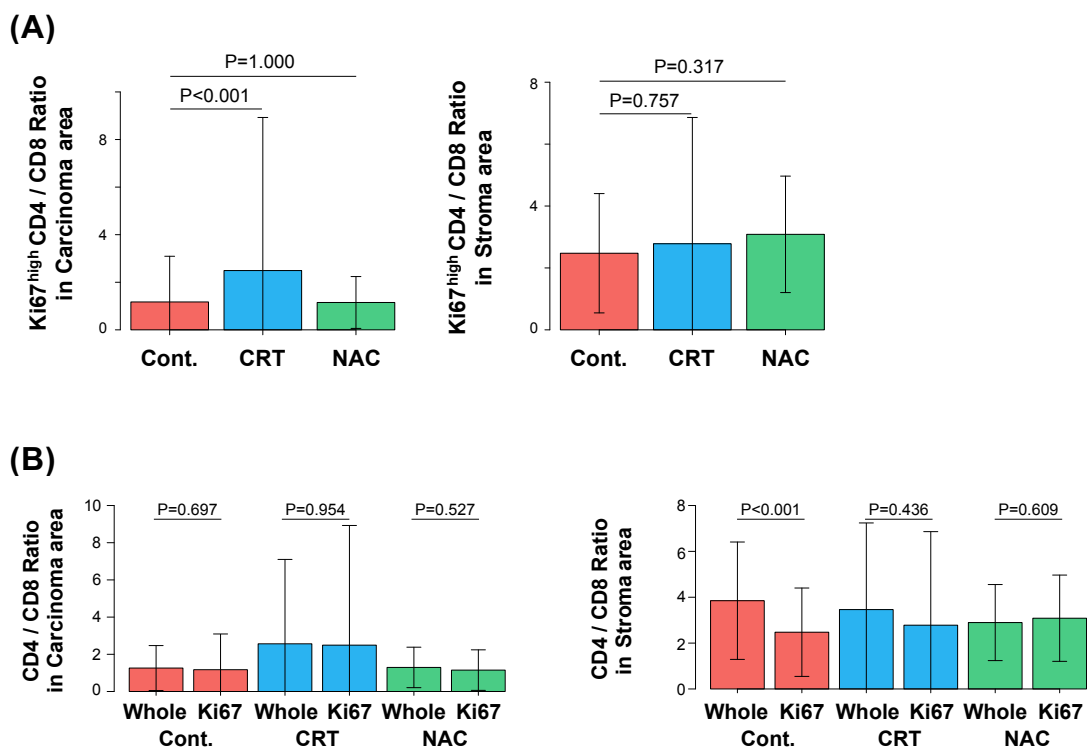


図 24 CD4CD8 比

(A). Ki67 高発現分画の CD4CD8 比

(B). T 細胞全体 CD4CD8 比と Ki67 高発現分画 CD4CD8 比の比較

一方、癌間質比に関しては、CRT 群と NAC 群で明確な違いを認めた。CRT 群では Ki67 高発現 CD4 T 細胞の癌間質比が有意に高値であったのに対して、NAC 群では Ki67 高発現 CD8 T 細胞の癌間質比が有意に高値であった (図 25 (A))。

T 細胞全体と Ki67 高発現分画の癌間質比の比較を行うと、いずれの群においても、CD4 および CD8 T 細胞ともに Ki67 高発現分画が有意に高値であった (図 25 (B))。

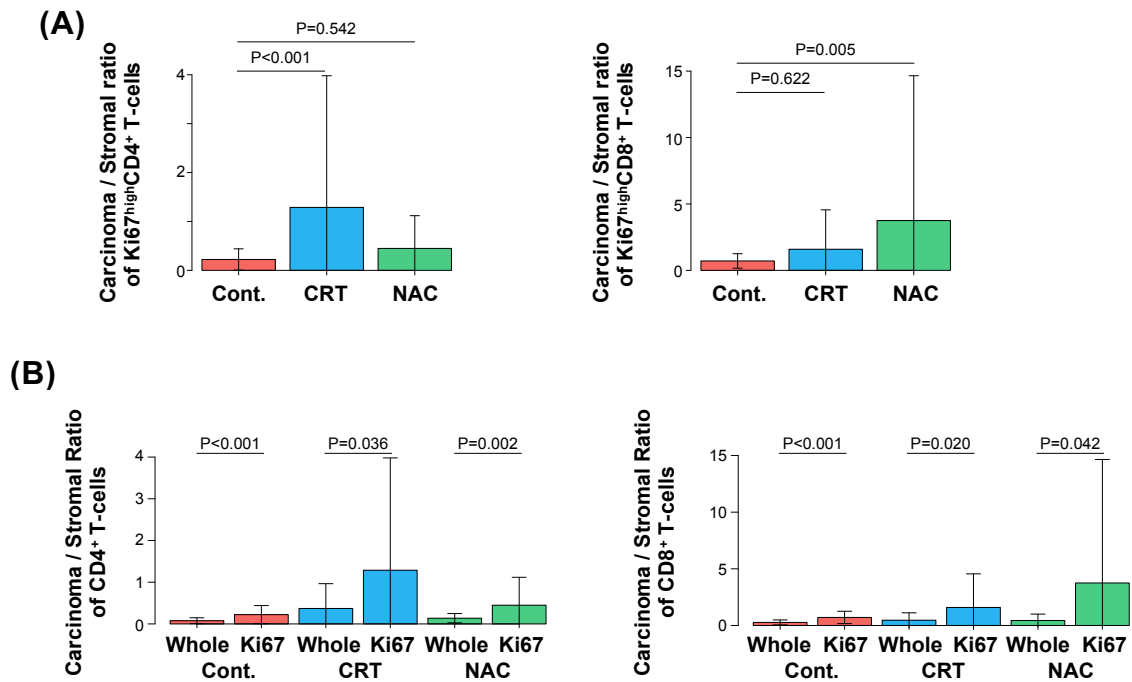


図 25 癌間質比

(A). Ki67 高発現分画の癌間質比

(B). T 細胞全体癌間質比と Ki67 高発現分画癌間質比の比較

5) 術前治療の腫瘍縮小効果と T 細胞分画の関連

続いて、術前治療による腫瘍縮小効果 (TRG) と T 細胞分画の関連について評価を行った。CRT 群では、全ての TRG において間質 T 細胞の密度は有意に低下していたのに対して、癌巣部の T 細胞密度は、TRG1 では Control 群と同程度であり、低下は認められなかった。NAC 群では、癌巣部の T 細胞は全ての TRG 群で高い傾向にあった。間質 T 細胞も高い傾向を示したが、TRG1 では上昇は確認されなかった (図 26 (A)および(B))。Ki67 高発現分画も同様に、CRT 群の癌巣部の Ki67 高発現分画の T 細胞密度は、TRG1 では Control 群と同程度に維持されており、NAC 群では、TRG1 での高発現分画の間質 T 細胞を除いて、概ね高い傾向であった (図 26 (C)および(D))。

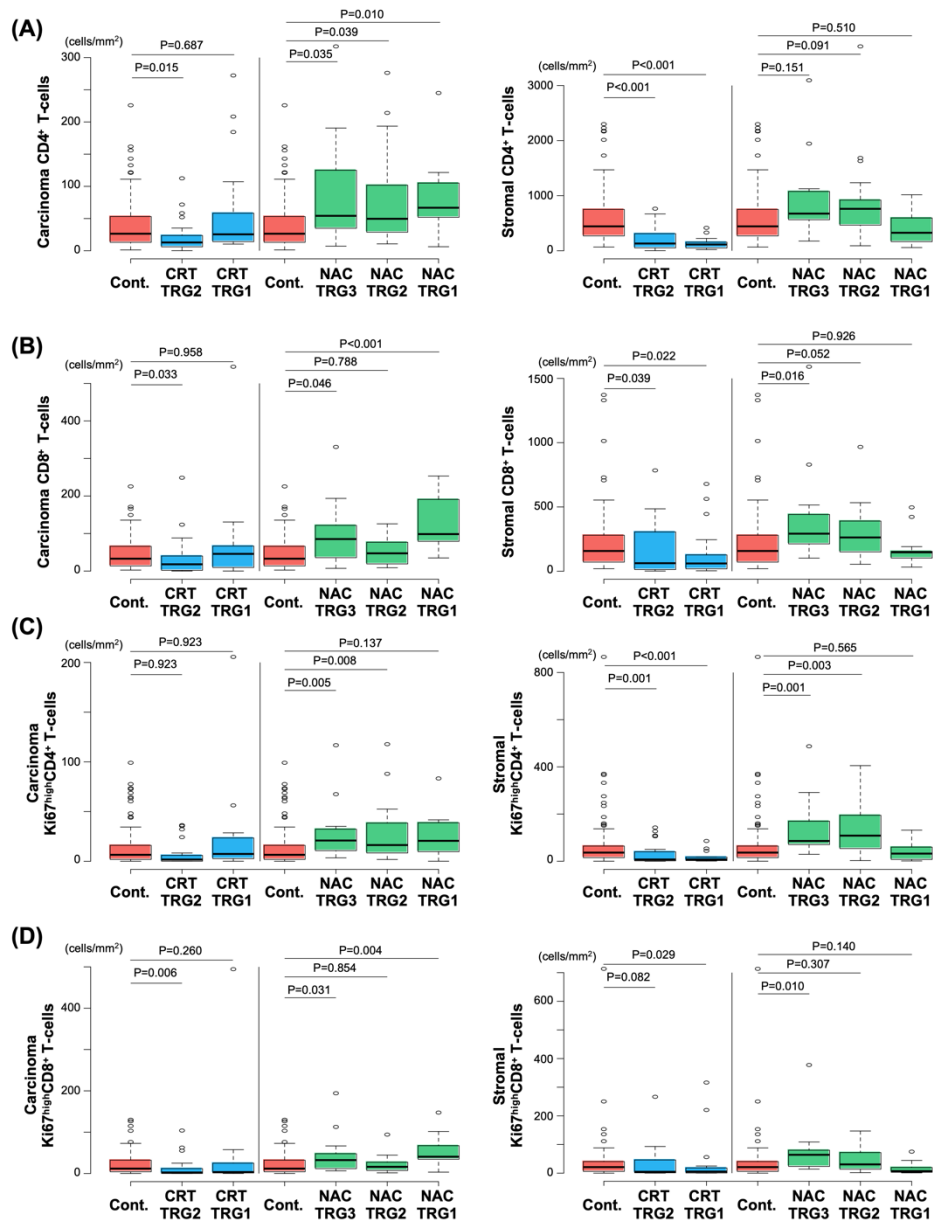


図 26 T 細胞分画の密度ならびにその腫瘍内局在と組織学的治療効果との関連

(A). CD4 T 細胞 (B). CD8 T 細胞

(C). Ki67 高発現 CD4 T 細胞 (D). Ki67 高発現 CD8 T 細胞

癌間質比の変化は、より顕著に TRG との関連が認められた。全ての T 細胞分画において癌間質比は、両術前治療後で治療効果の高かった TRG1 で、Control 群と比較して有意に高値を示した。特に、Ki67 分画の癌間質比は、T 細胞全体の癌間質比と比較しても、顕著な変化を認めた (図 27)。

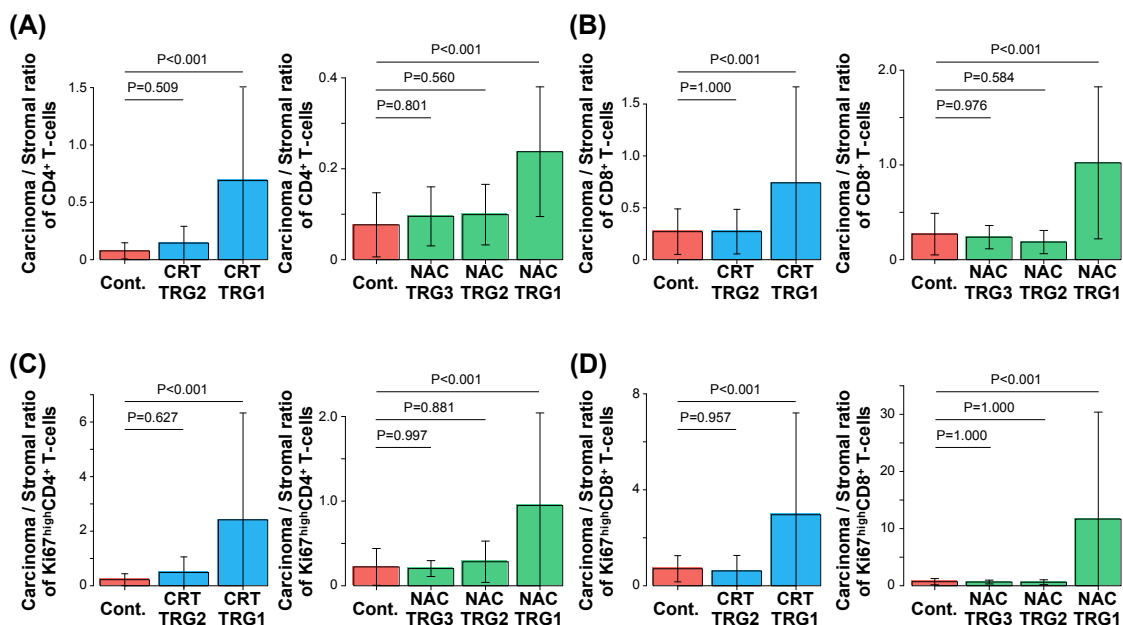


図 27 癌間質比と組織学的治療効果との関連

(A). CD4 T 細胞 (B). CD8 T 細胞

(C). Ki67 高発現 CD4 T 細胞 (D). Ki67 高発現 CD8 T 細胞

6) 術前治療後の抑制性分画の変化

抑制性分画として、制御性 T 細胞とマクロファージの評価を行った。CD4 T 細胞の中で Foxp3 高発現分画を制御性 T 細胞と定義した。

制御性 T 細胞の代表的な染色像を示す (図 28)。

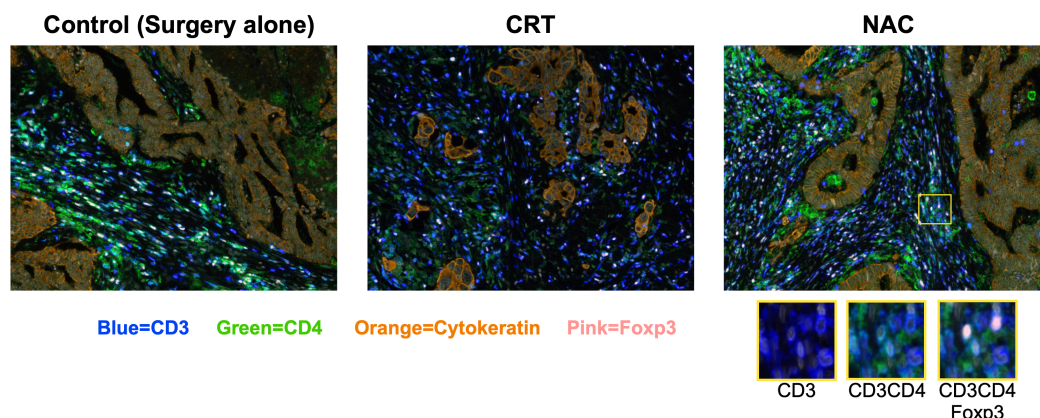


図 28 Foxp3 高発現 CD4 T 細胞 (制御性 T 細胞) の染色像

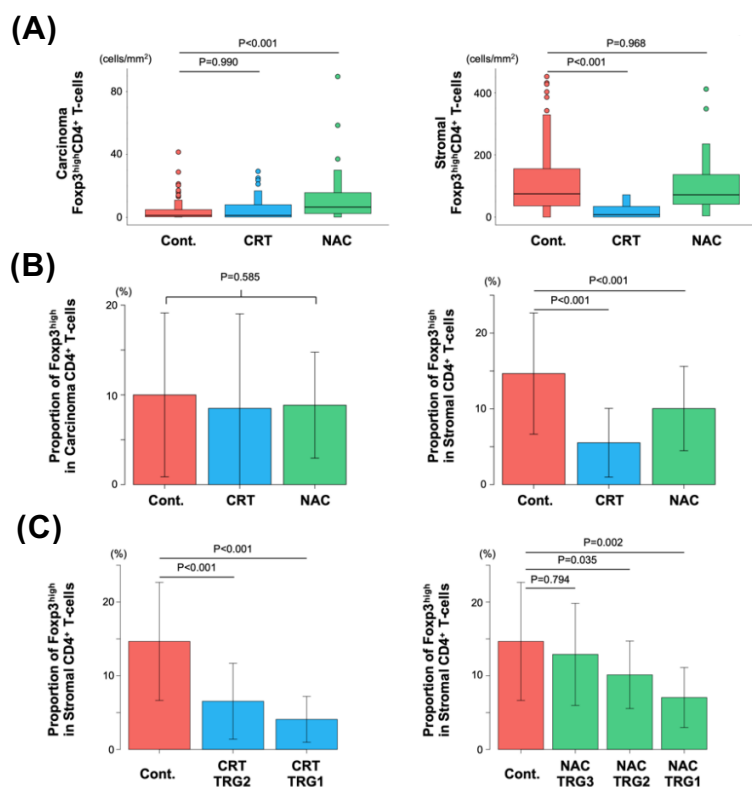


図 29 制御性 T 細胞の解析

(A). 癌部および間質部密度 (B). 癌部および間質部割合 (C). 間質部割合と組織学的治療効果との関連

癌部巣部の制御性 T 細胞は、CD4 T 細胞全体と同様に、NAC 後に細胞密度の上昇が認められた。一方、間質部については、CRT 後に顕著な低下が認められたが、NAC 後では、CD4 T 細胞全体は増加するが、制御性 T 細胞の密度の変化は認められなかった。間質の制御性 T 細胞の CD4 T 細胞に占める割合は、術前治療群により有意に低下し、腫瘍縮小効果が高くなるにつれて間質の制御性 T 細胞の割合は低下を認めた。一方、癌部の制御性 T 細胞の割合は 3 群で差を認めなかった (図 29)。

次に、CD68 陽性をマクロファージマーカーとして、そのうち CD204 陽性分画を抑制性の機能を持つ M2 マクロファージとし評価を行った。

代表的なマクロファージの染色を示した (図 30)。

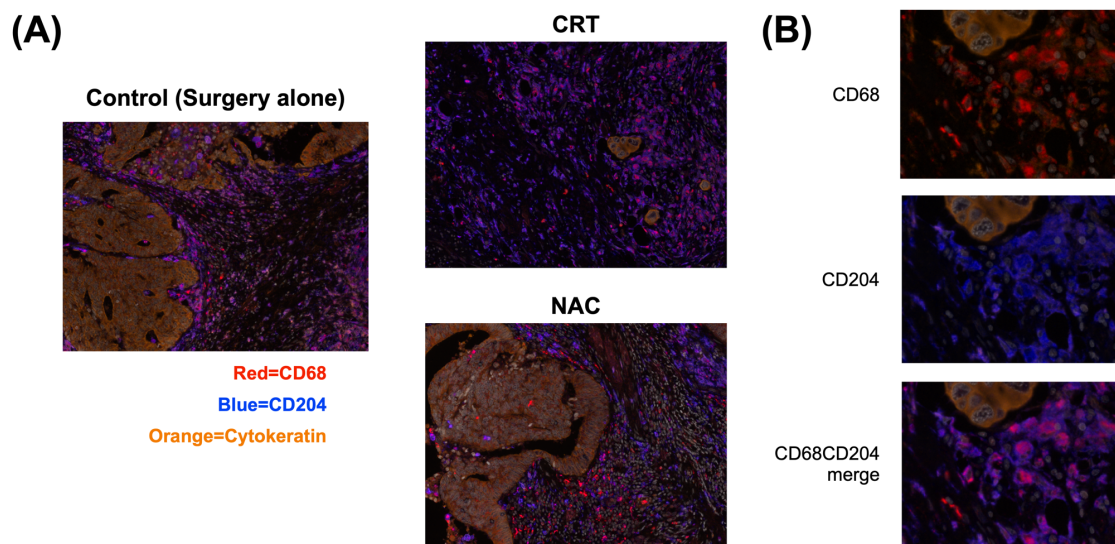


図 30 マクロファージの染色像

(A). 弱拡大

(B). CD68 陽性 (上)、CD204 陽性 (中)、CD68CD204 陽性 (下)

CD68 陽性のマクロファージは、Control 群と比較して NAC 群で有意に高値であり、CRT 群でも高値の傾向にあった。CD68 陽性マクロファージを M1 (CD204 陰性) と M2 (CD204 陽性) に分けて検討を行うと、M1 マクロファージは CRT 群、NAC 群ともに、Control 群と比較して有意に高値であった。また、NAC 群では M2 マクロファージも上昇が認められたのに対し、CRT 群では、M2 マクロファージの増加は認められなかった (図 30)。

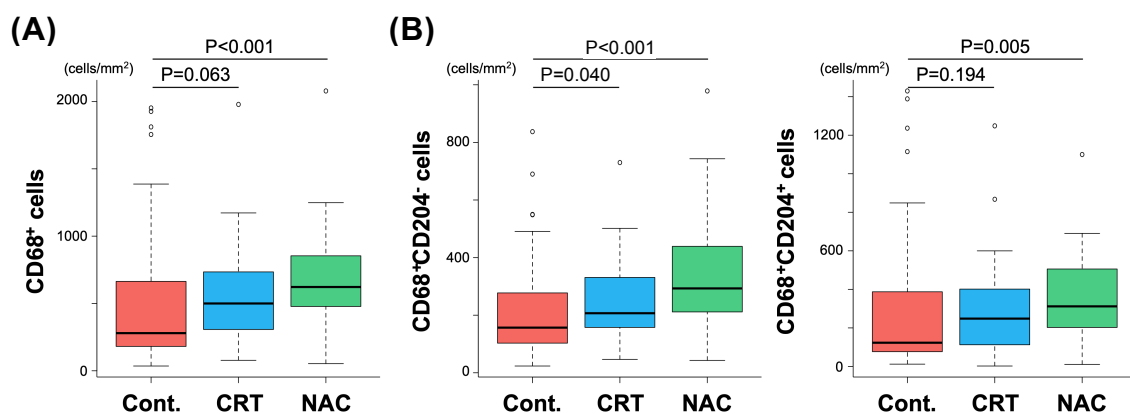


図 31 マクロファージの解析

(A). CD68 陽性細胞密度

(B). CD68 陽性 CD204 陰性細胞密度 (左)、CD68CD204 陽性細胞密度 (右)

続いて、残存腫瘍および間質部の PD-L1 の発現について評価を行なった。数例、癌部全体で PD-L1 発現が顕著に認められる症例が確認されたが(図 31 (A))、大部分の症例では、癌巣部での PD-L1 発現は認めず、間質部において PD-L1 の発現が著明であった (図 31(B))。間質部においては、主に M2 マクロファージに PD-L1 の発現を認めた。

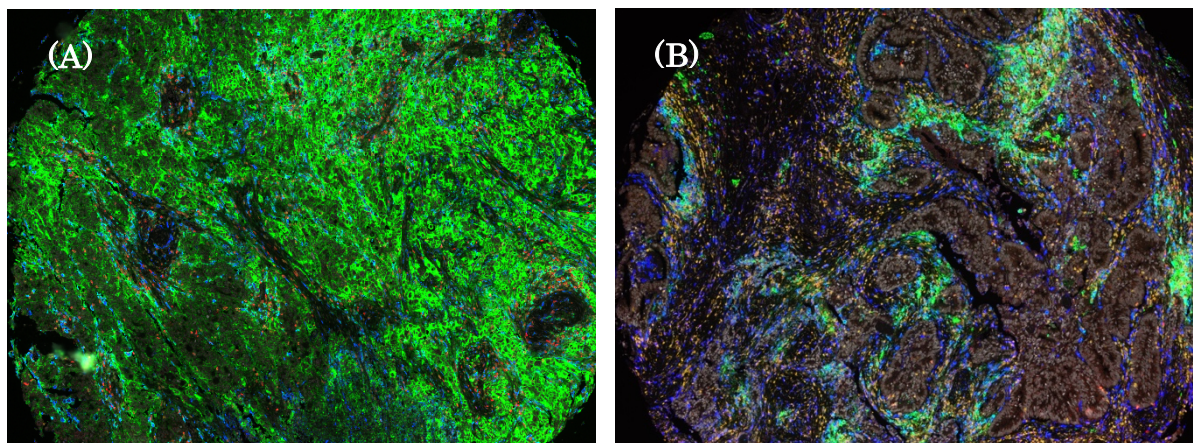


図 31 PD-L1 発現 緑:PD-L1、青:CD204、赤:CD3、黄:PD-1

(A). 癌巣部での PD-L1 発現

(B). 間質部での PD-L1 発現

PD-L1 発現を認める M2 マクロファージは、Control 群と比較し NAC 群で高値であり、CRT 群では差を認めなかった (図 32)。

PD-L1 発現 M2 マクロファージの密度が高い症例は、低い症例と比較し、Ki67 高発現 T 細胞の密度が高い傾向にあった。これは T 細胞の活性化と関連して免疫抑制性分画が増強されていることを示唆した結果であると考えられた (図 33)。

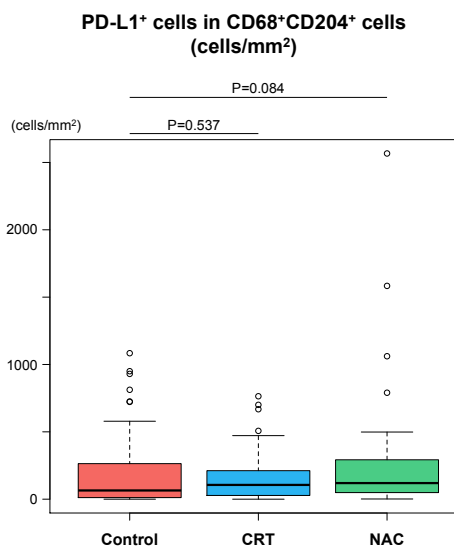


図 32 PD-L1 発現 M2 マクロファージの解析

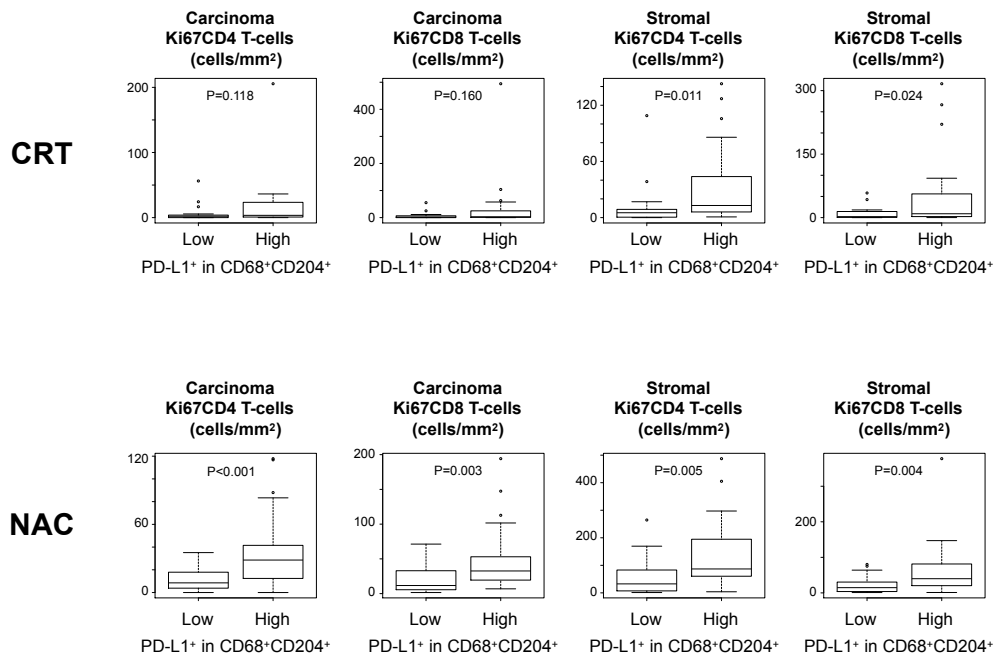


図 33 PD-L1 発現 M2 マクロファージと活性化 T 細胞浸潤の関連

7) 術前治療後の T 細胞分画の術後無再発生存への関与

残存腫瘍および浸潤免疫細胞の術後無再発生存への関与を評価するために、CRT 群および NAC 群それぞれにおいて、各評価項目の中央値で High/Low の 2 群に分類 (2 値化) し、RFS を比較した。単変量解析では、TRG の評価と同様、残存腫瘍面積と RFS の間に有意な関連は認められなかった。一方、浸潤免疫細胞に関する評価項目では、癌巣部、間質いずれの CD8 T 細胞密度も、有意でないものの、NAC および CRT 群において RFS を延長する傾向を認めた。特に、Ki67 高発現 T 細胞の評価では、有意な RFS 延長が認められ、CRT 群の癌巣部の Ki67 高発現 CD4 T 細胞ならびに NAC 群の間質部の Ki67 高発現 CD8 T 細胞の密度が有意な再発抑制因子として抽出された。一方、TRG との関連が示唆された癌間質比は、RFS との関連を示す分画は認められなかった (表 8)。

表 8 残存腫瘍および浸潤免疫細胞と無再発生存の関連

Immunological features	CRT (n=41)		NAC (n=46)	
	HR	P	HR	P
Total carcinoma area [High vs. Low]	0.928	0.875	0.721	0.482
Proportion of Ki67 in CK cells [High vs. Low]	0.761	0.564	0.626	0.314
Carcinoma CD4 T-cells [High vs. Low]	0.497	0.149	1.005	0.991
Stromal CD4 T-cells [High vs. Low]	0.914	0.849	0.945	0.901
Carcinoma CD8 T-cells [High vs. Low]	0.389	0.059	0.502	0.148
Stromal CD8 T-cells [High vs. Low]	0.510	0.164	0.484	0.128
Carcinoma / Stromal CD4 T-cells ratio [High vs. Low]	0.885	0.796	1.102	0.832
Carcinoma / Stromal CD8 T-cells ratio [High vs. Low]	0.828	0.691	1.044	0.926
Carcinoma Ki67CD4 T-cells [High vs. Low]	0.366	0.045*	0.747	0.531
Stromal Ki67CD4 T-cells[High vs. Low]	0.471	0.121	0.739	0.516
Carcinoma Ki67CD8 T-cells [High vs. Low]	0.513	0.168	0.492	0.137
Stromal Ki67CD8 T-cells [High vs. Low]	0.517	0.173	0.377	0.049*
Carcinoma / Stromal Ki67CD4 T-cells ratio [High vs. Low]	1.403	0.476	1.172	0.730
Carcinoma / Stromal Ki67CD8 T-cells ratio [High vs. Low]	1.319	0.560	1.154	0.755
Foxp3CD4 T-cells [High vs. Low]	0.366	0.045*	0.356	0.037*
Proportion of Foxp3 in CD4 T-cells [High vs. Low]	0.726	0.500	0.336	0.028*
CD68 cells [High vs. Low]	0.677	0.412	0.387	0.055
CD68CD204 cells [High vs. Low]	0.696	0.446	0.741	0.520

*単変量解析で、 $P < 0.05$ となった因子

次に、単変量解析で有意であった Ki67 高発現 T 細胞分画と病理学的因子を用いて、多変量解析により予後関連解析を行った。その結果、CRT 群ではリンパ管侵襲と癌部 Ki67 高発現 CD4 T 細胞密度が、NAC 群では間質部 Ki67 高発現 CD8 T 細胞密度のみが独立した因子として認められた (表 9)。

表 9 病理学的な因子および Ki67 高発現 T 細胞分画と無再発生存の関連

Factors		CRT (n=41)					NAC (n=46)				
		n	Univariate analysis		Multivariate analysis		n	Univariate analysis		Multivariate analysis	
			HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P		HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
Pathological TNM Stage	I	10	0.307 (0.071 - 1.339)	0.116	-		13	0.109 (0.015 - 0.817)	0.031*	0.259 (0.031 - 2.173)	0.213
	II / III	31	Reference				33	Reference		Reference	
Lymphatic invasion	Present	10	3.076 (1.176 - 8.046)	0.022*	3.401 (1.183 - 9.780)	0.023**	22	2.251 (0.886 - 5.720)	0.088	-	
	Absent	31	Reference		Reference		24	Reference			
Vascular invasion	Present	24	0.829 (0.327 - 2.100)	0.692	-		21	4.532 (1.628 - 12.62)	0.004*	2.619 (0.754 - 9.099)	0.130
	Absent	17	Reference				25	Reference		Reference	
Perineural invasion	Present	14	2.548 (1.009 - 6.435)	0.048*	1.978 (0.756 - 5.174)	0.164	12	3.646 (1.469 - 9.045)	0.005*	2.274 (0.707 - 7.317)	0.168
	Absent	27	Reference		Reference		34	Reference		Reference	
Tumor regression grade	1	17	0.597 (0.224 - 1.595)	0.304	-		13	0.809 (0.291 - 2.248)	0.685	-	
	2 / 3	24	Reference				33	Reference			
Carcinoma Ki67 ^{high} CD4 ⁺ T-cells	High	21	0.366 (0.137 - 0.979)	0.045*	0.270 (0.094 - 0.777)	0.015**	23	0.747 (0.300 - 1.860)	0.531	-	
	Low	20	Reference		Reference		23	Reference			
Stromal Ki67 ^{high} CD8 ⁺ T-cells	High	21	0.517 (0.200 - 1.335)	0.173	-		23	0.377 (0.143 - 0.994)	0.049*	0.274 (0.094 - 0.799)	0.018**
	Low	20	Reference				23	Reference		Reference	

CRT, chemoradiotherapy; NAC, neoadjuvant chemotherapy; HR, hazard ratio; CI, confidence interval

*単変量解析で、 $P < 0.05$ となった因子

**多変量解析で、 $P < 0.05$ となった因子

Ki67 高発現 T 細胞分画のカプラン・マイヤー曲線を示す (図 34)。間質部 Ki67 高発現 CD8 T 細胞の密度が高い症例は、NAC 群のみならず CRT 群でも RFS の延長が見られ、いずれの術前治療においても、間質部の Ki67 高発現 CD8 T 細胞の密度が再発抑制因子となる可能性が示唆された。一方、癌部 Ki67 高発現 CD4 T 細胞は、CRT 群で再発抑制因子であることが示されたが、NAC 群の予後には、関連を認めなかった。

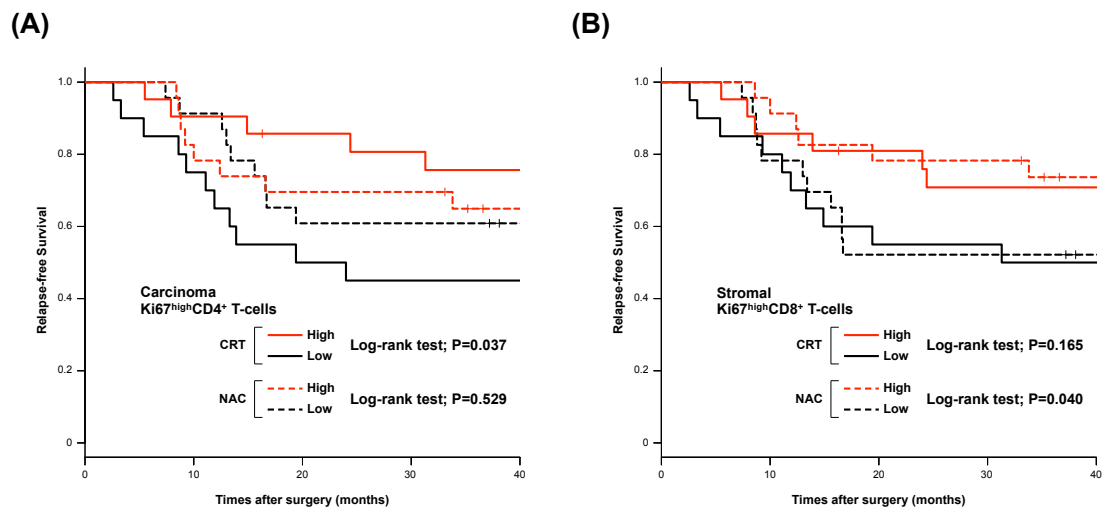


図 34 Ki67 高発現 T 細胞分画のカプラン・マイヤー曲線

(A). 癌部 Ki67 高発現 CD4 T 細胞 (B). 間質 Ki67 高発現 CD8 T 細胞

8) 術前治療後の T 細胞分画の予後予測マーカーとしての実現可能性

最後に、Ki67 高発現 T 細胞分画を二重免疫組織化学染色にて評価し、多重蛍光免疫組織化学染色で得られた結果の妥当性を評価した。二重免疫組織化学染色は、DAB および Fast-red を用いて行った。代表的な染色像を図に示す (図 35)。

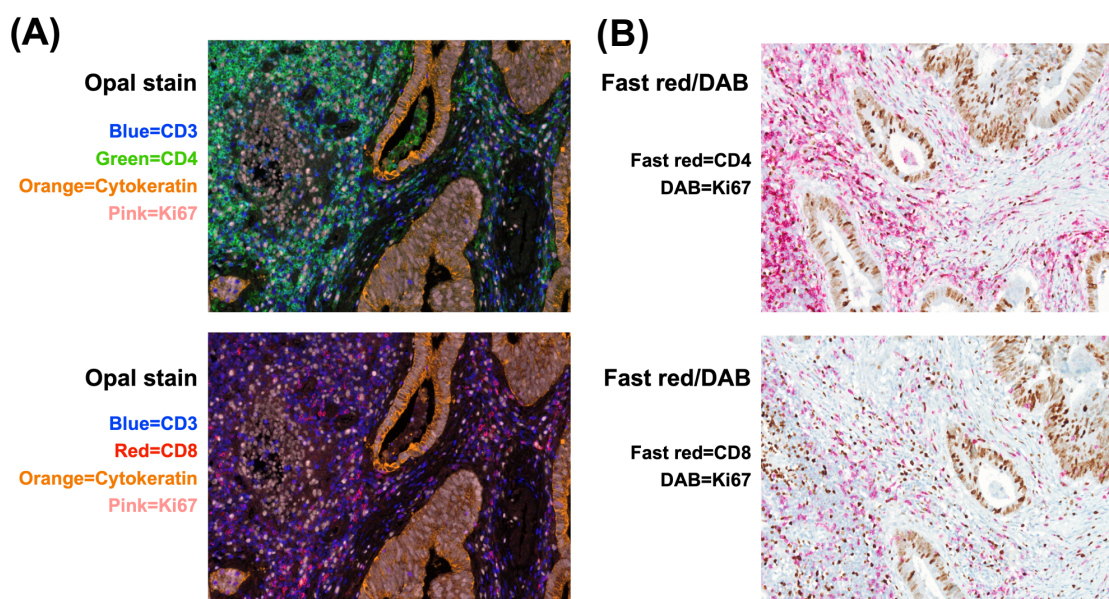


図 35 Ki67 高発現 T 細胞分画の染色像

(A). 多重蛍光免疫組織化学染色 (B). 二重免疫組織化学染色

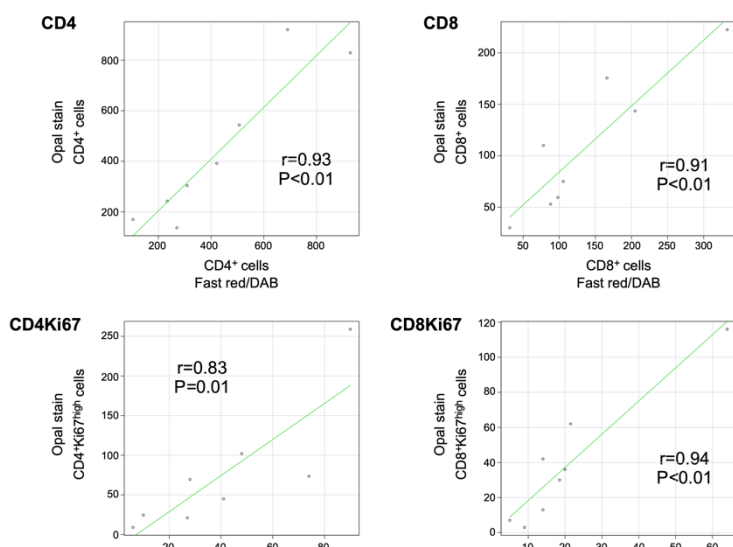


図 36 多重蛍光免疫組織化学染色法と二重免疫組織化学染色法の細胞数の相関

DAB/Fast-red 二重免疫組織化学染色の CD4 陽性細胞および CD8 陽性細胞、さらにそれぞれの Ki67 高発現分画の 1 視野における細胞数の平均値は、多重蛍光免疫組織化学染色法での CD4 T 細胞および CD8 T 細胞、それぞれの Ki67 高発現分画の細胞数と強い相関を認めた (図 36)。

考察

本研究において、進行直腸癌の腫瘍微小環境に与える、CRT および NAC による術前治療の影響を評価した。CRT および NAC は、残存腫瘍の形態的および増殖能の特徴、そして浸潤 T 細胞の密度に与える効果には違いを認めたと、両治療群ともに、術前治療による腫瘍縮小効果に関連して、癌胞巣内への顕著な T 細胞浸潤と制御性 T 細胞の減少を認めた。さらに、Ki67 が高発現している活性化 T 細胞分画は、術前治療後の予後と有意に関連を認めた。本研究の結果は、術前治療後の直腸癌切除検体における T 細胞の活性化とその局在評価に関する臨床的な有用性を示している。

術前治療後の残存腫瘍について、サイトケラチン染色と残存腫瘍面積の評価を用いて検討した。既報告では、残存腫瘍を「筋層より浅い層」と「筋層より深い層」に分類し、「筋層より浅い層」において、NAC 群と比較し CRT 群の残存腫瘍面積が小さいこと報告した (Sakuyama et al., 2018)。今回の TMA による解析でも、同様の結果を認めた。さらに、残存した癌胞巣を形態学的に観察したところ、CRT は残存腫瘍が崩壊し多くが小胞巣に至っているのに対して、NAC では、治療効果 (TRG 評価) は同じでも、癌胞巣はある程度の大きさを保ったまま全体の面積の縮小を認めた。Ki67 による残存腫瘍の増殖を評価したところ、NAC 群は CRT 群と比較して、残存腫瘍の増殖能が高いことが示された。過去の報告においても局所の腫瘍制御は、NAC よりも CRT が優れているとされており、我々の観察結果もそれを支持するものである (Peeters et al., 2007; Sakuyama et al., 2018)。

NAC における腫瘍の縮小は、抗がん剤が豊富な血流を介して周辺組織に浸透した後腫瘍に到達し、経時的な腫瘍縮小につながるという抗がん剤の一般的な作用機序に起因する。そのため、腫瘍周囲より縮小が惹起される。しかし、NAC は、最終投与から切除までのインターバルにおいて、薬剤が washout された後の長期の残存腫瘍の再増殖は制御できない。一方、放射線は直接的に癌領域のみではなく間質を含む腫瘍ではない正常組織にも影響を及ぼし、アポトーシスに誘導することで腫瘍を崩壊させ、線維化を引き起こす (Kelley et al., 2005)。さらに、分割照射によって残存腫瘍に蓄積した DNA の損傷は、腫瘍細胞の再増殖を長期にわたって制御することになる。これらの NAC および CRT のそれぞれの作用機序の違いが、術前治療ごとの残存腫瘍の胞巣の大きさや増殖能の制御の違いの原因であると考えられる。

腫瘍浸潤 T 細胞の評価から、NAC 後は、局所の腫瘍浸潤 T 細胞が増加す

ることがわかった。これまでも、Tsuchikawaらは、食道扁平上皮癌の術前化学療法後にCD4陽性およびCD8陽性細胞が増加することを報告している(Tsuchikawa et al., 2012)。抗がん剤は、ケモカインの産生上昇を伴った炎症反応を介して、腫瘍にCD4陽性細胞の蓄積を引き起こす(Denkert et al., 2010)。一方、CRT後では、本研究および過去の報告においても、T細胞密度は低下する(Sakuyama et al., 2016)。逆に、Shintoらは、CRT後の切除検体において間質のCD8陽性細胞の数が増加したことを報告している(Shinto et al., 2014)。CRTにおけるこれらの結果の違いは、放射線治療の線量と治療から手術までのインターバルに起因すると考えられる。本研究では、45-50.4GyのCRT後、4から12週で手術が行われていた。一方、Shintoらは20Gyの放射線治療後4週で手術を行っていた(Shinto et al., 2014)。腫瘍局所への長期放射線照射は、腫瘍の退縮を伴いながら腫瘍組織でのリンパ球減少を引き起こすと予想される。また、照射後、長期のインターバルを伴う場合には、血管を伴った組織構造が正常な場合には再度のリンパ球浸潤が起り、一方で、長期照射後の線維化が進んだ組織では、再度の浸潤は起こりにくいと考えられる。これら、腫瘍内T細胞の密度に対する術前治療の効果が異なっているにも関わらず、両治療において、腫瘍退縮に伴って癌巣へのT細胞浸潤が顕著に観察され、術前治療による局所腫瘍の退縮に免疫学的な機構が関与している可能性が示唆された。また、その傾向はKi67高発現の活性化T細胞でより顕著であった。これらの結果は、組織全体のT細胞密度のみならず、その局在が抗腫瘍免疫応答の評価に重要であり、局在や活性化評価など、よりがん特異的な免疫応答を正しく評価することが必要であると考えられる。以上から、直腸癌に対して免疫チェックポイント阻害剤を始めとした免疫療法と術前治療の併用療法には、NAC後のT細胞増加を利用することが良いかもしれない。一方、放射線治療との併用を考えた場合は、短期照射で長いインターバルを設けることが免疫細胞の再増加を促し腫瘍の免疫学的監視を保つことができることから、免疫治療との併用にはより利点となるであろう。

これらの局所の免疫環境と術後の無再発生存期間の関連を解析した結果、CRT後に局所において全体的なリンパ球密度の低下が見られたにもかかわらず、Ki67高発現T細胞、特にCD4T細胞は、CRT後の無再発期間の延長に寄与していた。一方で、NACでは、Ki67高発現のCD8T細胞がその延長に重要であることが示された。T細胞の癌間質比は、無再発生存との有意な相関は認めなかった。これらの結果からは、腫瘍局所の抗腫瘍応答と全身の再発を抑制する免疫監視には、異なる要因が必要であることが示唆され

る。局所において堅固な癌巣を排除する場合には、癌に対する免疫応答が惹起されることに加え、術前治療による癌巣の破壊や腫瘍の縮小が生じることで癌巣内部への T 細胞浸潤が惹起されることが最も重要であると考えられる。近年、治療前の腫瘍の大きさが免疫チェックポイント阻害剤の効果を予測する因子になりうるということが報告されていることから (Joseph et al., 2018)、術前治療により腫瘍を縮小することが、がん免疫による腫瘍排除を増強する可能性が示唆される。一方、再発時の細胞レベルもしくは微小な残存腫瘍や転移巣に対して排除が起こる場合、過去の他癌腫での術前治療の抗腫瘍免疫の効果に関する報告と同様に (Gulley et al., 2017)、術前治療における抗原拡散や炎症に伴うデンジャーシグナルによる抗腫瘍免疫応答の惹起が最も重要であると考えられる。

興味深いことに、再発抑制に関連する重要な T 細胞分画とその局在は、CRT と NAC で異なっていた。CRT 群では、Ki67 高発現 CD4 T 細胞および Ki67 高発現 CD8 T 細胞が、全身での再発抑制に寄与しており、特に、癌部 Ki67 高発現 CD4 T 細胞の増加が無再発生存の延長に有意に関係していた。一方、NAC 後では、間質部 Ki67 高発現 CD8 T 細胞は無再発生存の延長に寄与していたが、CD4 T 細胞の分画は、腫瘍での密度の増加は顕著であったが、この分画は予後の改善には寄与していなかった。これらの結果は、CD4 T 細胞のヘルパー機能が、CRT 後では重要であるが NAC 後ではその重要性が低い可能性を示唆しており、術前治療による全身での免疫監視の活性化が異なるメカニズムで起こっていることを示唆している。CRT による細胞障害性 T 細胞の活性化は、アブスコパル効果と呼ばれており、腫瘍関連マクロファージや樹状細胞に代表される腫瘍に浸潤する抗原提示細胞の活性化を介してヘルパー CD4 T 細胞の機能を必要とすることが報告されている (Kono et al., 2013; Kubo et al., 2017)。NAC 後の腫瘍局所には、炎症反応を伴う強力な T 細胞浸潤が観察されたことから、NAC 後の抗原提示細胞の活性化はこれらの非特異的な炎症により CD4 T 細胞を介さず直接、誘導されると考えられる (Denkert et al., 2010)。従って、NAC による細胞障害性 T 細胞活性の増強は、CD4 T 細胞の活性化とは独立して生じると考えられる。

次に、免疫担当細胞のうち、抑制分画の役割に関して、制御性 T 細胞とマクロファージ分画の解析を行った。制御性 T 細胞は、CD4 T 細胞のうち Foxp3 転写因子が強陽性になる分画で、非常に強い免疫抑制の機能を持つ免疫細胞である (Curiel et al., 2004; Bates et al., 2006; Mougiakakos et al., 2010; Shimizu et al., 2010)。我々の結果において、間質の制御性 T 細

胞の割合は、組織学的な腫瘍縮小に伴って有意に低値となっていた。NAC後の癌巣内の制御性 T 細胞の密度は増加していたが割合は変わっておらず、この増加は CD4 T 細胞全体の浸潤の増加に伴うものであることがわかった。腫瘍組織の制御性 T 細胞は、その大部分が間質に位置していることから、術前治療による間質の制御性 T 細胞の減少が、活性化した細胞傷害性 T 細胞の間質から癌巣内への浸潤を誘導し、局所での腫瘍排除を引き起こすと考えられる。腫瘍浸潤マクロファージの解析からも、術前治療がマクロファージ、特に M1 マクロファージの浸潤をより増強することが明らかとなった。M1 マクロファージは、MHC ClassII を高発現し局所の抗腫瘍免疫を活性化させることが報告されている (Wijesundera et al., 2014)。このように、CRT および NAC は、腫瘍浸潤マクロファージを M1 にスキューニングさせ、結果として、間質制御性 T 細胞の減少と同様に、腫瘍微小環境の免疫学的な環境を改善すると考えられる。これらの術前治療による局所の腫瘍免疫環境の改善は、無再発生存の延長には寄与しなかった。特に、制御性 T 細胞の密度は、予後を延長させる結果となっており、これは既報告と反する結果であった (McCoy et al., 2015)。しかしながら、近年、大腸癌において、制御性 T 細胞増加と予後延長の関連を示唆する報告もなされており (Kong et al., 2019)、術前治療後、特に NAC において増加した制御性 T 細胞を含む CD4 T 細胞の抗腫瘍免疫応答の役割を明らかにするためには、さらなる知見の蓄積が必要である。他の細胞分画と制御性 T 細胞の関連を調べてみると、Ki67 高発現の CD4 T 細胞および CD8 T 細胞が少ない症例は制御性 T 細胞の浸潤も低値であり、無再発生存の延長も認めていなかった。PD-L1 発現においても同様の結果が示されており、間質の PD-L1 陽性症例において、間質への活性化 T 細胞浸潤が有意に上昇していた。これらの結果からも、T 細胞活性化に伴い、複数の抑制性応答が腫瘍内で起きていることを確認することができた。これまでの報告でも提唱されているような、免疫チェックポイント阻害療法や制御性 T 細胞や抑制性マクロファージの除去が大腸癌において奏功する可能性が示される。一方、残念なことに、これまでの臨床試験において、大腸癌に対して免疫チェックポイント阻害療法はほとんど著効を示さない (Le et al., 2015)。MHC 分子の発現低下などが報告されているが、必ずしも該当しない場合も多くみられ、現在のところ原因は不明である。今回の解析では、Ki67 を指標に T 細胞活性化を評価したが、さらに正確な癌に対する特異的免疫応答を評価するマーカーの開発や T 細胞の癌巣内への浸潤を増強する治療の開発が必要であると考えられる。

本研究にはいくつかの **Limitation** がある。まず、本研究は単施設における後ろ向き研究である。今後、これらの知見を前向きに多施設で検証する必要がある。また、今回の解析では症例数が少なく、予後解析における群分けの閾値に中央値を用いた。今後、より多数の症例を用いて最適な閾値を探索する必要がある。今回の研究では、術前治療を行った症例の治療前の腫瘍微小環境のデータを検討できていないため、T細胞活性化が強く無再発期間が長かった症例が、そもそも免疫学的に有利な背景を有した症例であった可能性を否定できない。この点を検証するためにも、さらなる検討を行う必要がある。それらを踏まえても、本研究から得られた知見は、直腸癌の術前治療の発展および術前治療を受けた局所進行直腸癌の周術期合併症、手術後の再発予測に非常に重要な知見を投じる結果であり、大腸癌におけるがん免疫応答の関与を強く示唆するものであると考える。

総括及び結論

① 本研究全体から得られた新知見

- ・術後の合併症および機能障害である、マイルズ術後会陰創部感染および排尿障害のリスク因子としては、術前治療は独立したリスク因子にはならなかった。
- ・術前化学放射線療法は腫瘍制御により有効であるが、局所の T 細胞は減少した。一方、術前化学療法は、腫瘍制御の効果、特に長期の制御は化学放射線療法に比較し弱いが、T 細胞浸潤を有意に増加させた。
- ・Ki67 を高発現する T 細胞分画は術前治療による腫瘍縮小効果の高い症例において癌巣内への浸潤が強かった、一方、腫瘍間質における制御性 T 細胞は腫瘍縮小に伴って減少した。
- ・術前化学放射線療法後に癌巣内の Ki67 高発現 CD4 T 細胞が多い症例、および術前化学療法後に間質の Ki67 高発現 CD8 T 細胞が多い症例は、良好な予後を示した。

② 新知見の意義

- ・術前治療によって腫瘍縮小が得られれば拡大手術を回避することができ、術後の合併症・機能障害は最小限に抑えることが可能になる。
- ・腫瘍縮小を促すには、より T 細胞浸潤を高め制御性 T 細胞の減少を促すことが必要になる。微小環境における免疫環境の向上に関して、術前化学療法が優れており、化学放射線療法では低線量のほうが免疫環境の点では優れている可能性が考えられた。今後のテーラーメイドな術前治療や免疫療法との併用の観点からは、化学療法および低線量の放射線療法をベースとしていくべきである。
- ・術前治療後の切除腫瘍組織内の Ki67 高発現 T 細胞の評価は、予後予測マーカーになりうる。しかし、評価の方法やカットオフラインの設定などの検証が今後必要である。

③ 今後の研究展開と課題

- ・術前化学療法後に増加している制御性 T 細胞を含めた CD4 陽性細胞分画の役割を解明する必要がある。
- ・免疫チェックポイント阻害剤の標的である PD-1/PD-L1 の役割を詳細に解明する必要がある。また、同様に免疫チェックポイント阻害療法が大腸癌において奏功を示さない要因を明らかにする必要がある。

・術前治療後の **Ki67** 高発現 **T** 細胞の予後予測マーカーとしての有用性を前向きに検討する必要がある。

上記を明らかにすることで、局所進行直腸癌の術前治療の向上と免疫療法の併用を含めた新しい治療戦略の開発に発展する可能性がある。さらに、術前治療の効果を高めることで術後合併症を減らし、長期経過には術前治療後の予後予測マーカーが有用になると期待する。今後は、手術に加え、術前後の免疫療法を含めた総合的な治療戦略の開発に繋げたい。

謝辞

本博士論文は、筆者が北海道大学大学院 医学研究院 消化器外科学教室 I 博士課程在学中において、同教室、国立がん研究センター 先端医療開発センター 免疫療法開発分野および国立がん研究センター東病院 大腸外科で行った研究をまとめたものです。研究計画の立案から、基礎論文、博士論文作成の全ての過程に至るまで、御指導御鞭撻を賜りました国立がん研究センター 先端医療開発センター 免疫療法開発分野分野長 中面哲也先生、帝京大学 医学部・医療技術学部 医療共通教育研究センター 講師 鈴木利宙先生へ心より感謝申し上げます。本研究を遂行し、基礎論文を作成するにあたり、多大なる御指導を賜りました国立がん研究センター東病院 大腸外科科長 伊藤雅昭先生および大腸外科 塚田祐一郎先生、がん研究会有明病院 泌尿器科医長 駒井好信先生へ深く感謝申し上げます。また、研究遂行への御助言を賜りました北海道大学大学院 医学研究院 消化器外科学教室 I 教授 武富紹信先生へ感謝申し上げます。最後に、実験のご指導を頂き、論文作成にも多大なる御助言を頂きました国立がん研究センター 先端医療開発センター 臨床腫瘍病理分野ユニット長 小嶋基寛先生、国立がん研究センター 先端医療開発センター 免疫療法開発分野 下村真菜美先生、国立がん研究センター東病院 臨床研究支援部門 研究企画推進部生物統計室主任 野村尚吾先生、国立がん研究センター東病院 大腸外科医長 佐々木剛志先生、大腸外科 西澤祐吏先生および池田公治先生、東部地域病院外科 柵山尚紀先生に心より感謝申し上げます。

本研究の一部は、国立がん研究センター研究開発費 25-A-7 と 28-A-8 の助成を受けたものである。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Akasu, T., Sugihara, K., and Moriya, Y. (2009). Male urinary and sexual functions after mesorectal excision alone or in combination with extended lateral pelvic lymph node dissection for rectal cancer. *Ann Surg Oncol* *16*, 2779-2786.
- Anitei, M.G., Zeitoun, G., Mlecnik, B., Marliot, F., Haicheur, N., Tudosii, A.M., Kirilovsky, A., Lagorce, C., Bindea, G., et al. (2014). Prognostic and predictive values of the immunoscore in patients with rectal cancer. *Clin Cancer Res.* *20*, 1891-1899.
- Bullard, K.M., Trudel, J.L., Baxter, N.N., and Rothenberger, D.A. (2005). Primary perineal wound closure after preoperative radiotherapy and abdominoperineal resection has a high incidence of wound failure. *Dis Colon Rectum.* *48*, 438-443.
- Bates, G.J., Fox, S.B., Han, C., Leek, R.D., Garcia, J.F., Harris, A.L., and Banham, A.H. (2006). Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol.* *24*, 5373-5380.
- Cho, Y., Miyamoto, M., Kato, K., Fukunaga, A., Shichinohe, T., Kawarada, Y., Hida, Y., Oshikiri, T., Kurokawa, T., Suzuoki, M., et al. (2003). CD4+ and CD8+ T Cells Cooperate to Improve Prognosis of Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res.* *63*, 1555-1559.
- Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* *10*, 942-949.
- Cross, M. (2011). ERG oncoprotein overexpression in prostate cancer. Multiplex IHC adds to diagnostic prowess and efficiency of laboratory. *MLO Med Lab Obs.* *43*, 22-42.
- de Bruin, A.F., Gosselink, M.P., Wijffels, N.A., Coene, P.P., and van der Harst, E. (2008). Local gentamicin reduces perineal wound infection after

radiotherapy and abdominoperineal resection. *Tech Coloproctol.* *12*, 303-307.

Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Müller, B.M., Komor, M., Budczies, J., Darb-Esfahani, S., Kronenwett, R., Hanusch, C., et al. (2010). Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* *28*, 105-113.

Deng, Y., Chi, P., Lan, P., Wang, L., Chen, W., Cui, L., Chen, D., Cao, J., Wei, H., Peng, X., et al. (2016). Modified FOLFOX6 with or without radiation versus fluorouracil and leucovorin with radiation in neoadjuvant treatment of locally advanced rectal cancer: Initial results of the Chinese FOWARC multicenter, open-label, randomized three-arm phase III trial. *J Clin Oncol.* *34*, 3300-3307.

Edge, S.B., and Compton, C.C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol.* *17*, 1471-1474.

Feng, Z., Puri, S., Moudgil, T., Wood, W., Hoyt, C.C., Wang, C., Urba, W.J., Curti, B.D., Bifulco, C.B., and Fox, B.A. (2015). Multispectral imaging of formalin-fixed tissue predicts ability to generate tumor-infiltrating lymphocytes from melanoma. *J Immunother Cancer.* *3*, 47.

Forde, P.M., Smith, K.N., Chaft, J.E., Hellmann, M., Merghoub, T., Wolchok, J.D., Yang, S.C., Battafarano, R.J., Gabrielson, E., Georgiades, C.S., et al. (2016). NSCLC, early stage Neoadjuvant anti-PD1, nivolumab, in early stage resectable non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* *27*, vi552-vi587.

Gérard, J.P., Conroy, T., Bonnetain, F., Bouché, O., Chapet, O., Closon-Dejardin, M.T., Untch, M., Leduc, B., Francois, E., Maurel, J., et al. (2006). Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCD 9203. *J Clin Oncol.* *24*, 4620-4625.

Gulley, J.L., Madan, R.A., Pachynski, R., Mulders, P., Sheikh, N.A., Trager, J., and Drake, C.G. (2017). Role of antigen spread and distinctive

characteristics of immunotherapy in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst.* *109*, djw261, 1-9.

Hazenberg, M.D., Stuart, J.W., Otto, S.A., Borleffs, J.C., Boucher, C.A., de Boer, R.J., Miedema, F., and Hamann, D. (2000). T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood.* *95*, 249-255.

Hiraoka, K., Miyamoto, M., Cho, Y., Suzuoki, M., Oshikiri, T., Nakakubo, Y., Itoh, T., Ohbuchi, T., Kondo, S., and Kato, H. (2006). Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma. *Br J Cancer.* *94*, 275-280.

Huang, M., Lin, J., Yu, X., Chen, S., Kang, L., Deng, Y., Zheng, J., Luo, Y., Wang, L., Lan, P., et al. (2016). Erectile and urinary function in men with rectal cancer treated by neoadjuvant chemoradiotherapy and neoadjuvant chemotherapy alone: a randomized trial report. *Int J Colorectal Dis.* *31*, 1349-1357.

Ito, M., Saito, N., Sugito, M., Kobayashi, A., Nishizawa, Y., and Tsunoda, Y. (2009). Analysis of clinical factors associated with anal function after intersphincteric resection for very low rectal cancer. *Dis Colon Rectum.* *52*, 64-70.

Igari, F., Sato, E., Horimoto, Y., Takahashi, Y., Isomura, T., Arakawa, A., Kitano, S., and Saito, M. (2017). Diagnostic significance of intratumoral CD8+ tumor infiltrating lymphocytes in medullary carcinoma. *Hum Pathol.* *70*, 129-138.

Joseph, R.W., Elassaiss-Schaap, J., Kefford, R., Hwu, W.J., Wolchok, J.D., Joshua, A.M., Ribas, A., Hodi, F.S., Hamid, O., Robert, C., et al. (2018). Baseline tumor size is an independent prognostic factor for overall survival in patients with melanoma treated with pembrolizumab. *Clin Cancer Res.* *24*, 4960-4967.

Kapiteijn, E., Marijnen, C.A., Nagtegaal, I.D., Putter, H., Steup, W.H., Wiggers, T., Rutten, H.J., Pahlman, L., Glimelius, B., van Krieken, J.H., et al. (2001). Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal

excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med.* *345*, 638-646.

Kelley, S.T., Coppola, D., Yeatman, T., and Marcet, J. (2005). Tumor response to neoadjuvant chemoradiation therapy for rectal adenocarcinoma is mediated by p53-dependent and caspase 8-dependent apoptotic pathways. *Clin Colorectal Cancer.* *5*, 114-118.

Kuhrt, M.P., Chokshi, R.J., Arrese, D., and Martin, E.W. Jr. (2012). Retrospective review of pelvic malignancies undergoing total pelvic exenteration. *World J Surg Oncol.* *10*, 110.

Kanda, Y. (2013). Investigation of the freely available easy-to-use software “EZR” for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* *48*, 452–458.

Kin, C., Rhoads, K.F., Jalali, M., Shelton, A.A., and Welton, M.L. (2013). Predictors of postoperative urinary retention after colorectal surgery. *Dis Colon Rectum* *56*, 738-746.

Kono, K., Mimura, K., and Kiessling, R. (2013). Immunogenic tumor cell death induced by chemoradiotherapy: molecular mechanisms and a clinical translation. *Cell Death Dis.* *4*, e688.

Kojima, M., Higuchi, Y., Yokota, M., Ishii, G., Saito, N., Aoyagi, K., Sasaki, H., and Ochiai, A. (2014). Human subperitoneal fibroblast and cancer cell interaction creates microenvironment that enhances tumor progression and metastasis. *PLoS One.* *9*, e88018.

Kwaan, M.R., Lee, J.T., Rothenberger, D.A., Melton, G.B., and Madoff, R.D. (2015). Early removal of urinary catheters after rectal surgery is associated with increased urinary retention. *Dis Colon Rectum.* *58*, 401-405.

Kubo, M., Satoh, T., Ishiyama, H., Tabata, KI., Tsumura, H., Komori, S., Iwamura, M., Baba, S., Hayakawa, K., Kawamura, T., et al. (2017). Enhanced activated T cell subsets in prostate cancer patients receiving iodine-125 low-dose-rate prostate brachytherapy. *Oncol Rep.* *39*, 417-424.

Kong, J.C., Guerra, G.R., Pham, T., Mitchell, C., Lynch, A.C., Warriar, S.K., Ramsay, R.G., and Heriot, A.G. (2019). Prognostic Impact of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Primary and Metastatic Colorectal Cancer:

A Systematic Review and Meta-analysis. *Dis Colon Rectum*. *62*, 498-508.

Laghi, L., Bianchi, P., Miranda, E., Balladore, E., Pacetti, V., Grizzi, F., Allavena, P., Torri, V., Repici, A., Santoro, A., et al. (2009). CD3+ cells at the invasive margin of deeply invading (pT3-T4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: a longitudinal study. *Lancet Oncol*. *10*, 877-884.

Loi, S., Sirtaine, N., Piette, F., Salgado, R., Viale, G., Van Eenoo, F., Rouas, G., Francis, P., Crown, J.P., Hitre, E., et al. (2013). Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol*. *31*, 860-867.

Lee, S.Y., Kang, S.B., Kim, D.W., Oh, H.K., and Ihn, M.H. (2014). Risk factors and preventive measures for acute urinary retention after rectal cancer surgery. *World J Surg*. *39*, 275-282.

Le, D.T., Uram, J.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Kemberling, H., Eyring, A.D., Skora, A.D., Luber, B.S., Azad, D., Laheru, D., et al. (2015). PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med*. *372*, 2509-2520.

Maas, M., Nelemans, P.J., Valentini, V., Das, P., Rödel, C., Kuo, L.J., Calvo, F.A., García-Aguilar, J., Glynne-Jones, R., Haustermans, K., et al. (2010). Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. *11*, 835-844.

Mougiakakos, D., Johansson, C.C., Trocme, E., All-Ericsson, C., Economou, M.A., Larsson, O., Seregard, S., and Kiessling, R. (2010). Intratumoral forkhead box P3-positive regulatory T cells predict poor survival in cyclooxygenase-2-positive uveal melanoma. *Cancer*. *116*, 2224-2233.

McDonnell, A.M., Nowak, A.K., and Lake, R.A. (2011). Contribution of the immune system to the chemotherapeutic response. *Semin Immunopathol*. *33*, 353-367.

- Musters, G.D., Buskens, C.J., Bemelman, W.A., and Tanis, P.J. (2014). Perineal wound healing after abdominoperineal resection for rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. *57*, 1129-1139.
- Mace, A.G., Pai, R.K., Stocchi, L., and Kalady, M. (2015). American Joint Committee on Cancer and College of American Pathologists regression grade: a new prognostic factor in rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. *58*, 32-44.
- McCoy, M.J., Hemmings, C., Miller, T.J., Austin, S.J., Bulsara, M.K., Zeps, N., Nowak, A.K., Lake, R.A., and Platell, C.F. (2015). Low stromal Foxp3+ regulatory T-cell density is associated with complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer. *Br J Cancer*. *113*, 1677-1686.
- Mesquita, J.W. Neto., Machado, D.B., Macedo, D.J., Cordeiro, D.F., Brito, E.V., and Costa, M.L. (2016). Extended pelvic resections for the treatment of locally advanced and recurrent anal canal and colorectal cancer: technical aspects and morbimortality predictors after 24 consecutive cases. *Rev Col Bras Cir*. *43*, 93-101.
- Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H.K., Maby, P., Angelova, M., Tougeron, D., Church, S.E., Lafontaine, L., Fischer, M., Fredriksen, T., et al. (2016). Integrative analyses of colorectal cancer show immunoscore is a stronger predictor of patient survival than microsatellite instability. *Immunity*. *44*, 698-711.
- Nishizawa, Y., Fujii, S., Saito, N., Ito, M., Ochiai, A., Sugito, M., Kobayashi, A., and Nishizawa, Y. (2011). The association between anal function and neural degeneration after preoperative chemoradiotherapy followed by intersphincteric resection. *Dis Colon Rectum*. *54*, 1423-1429.
- Papagno, L., Spina, C.A., Marchant, A., Salio, M., Rufer, N., Little, S., Dong, T., Chesney, G., Waters, A., Easterbrook, P., et al. (2004). Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS Biol*. *2*, E20.
- Peeters, K.C., Marijnen, C.A., Nagtegaal, I.D., Kranenbarg, E.K., Putter, H., Wiggers, T., Rutten, H., Pahlman, L., Glimelius, B., Leer, J.W., et al.

(2007). The TME trial after a median follow-up of 6 years: Increased local control but no survival benefit in irradiated patients with resectable rectal carcinoma. *Ann Surg.* *246*, 693-701.

Rouanet, P., Rullier, E., Lelong, B., Maingon, P., Tuech, J.J., Pezet, D., Castan, F., and Nougaret, S. (2017). Tailored treatment strategy for locally advanced rectal carcinoma based on the tumor response to induction chemotherapy. *Dis Colon Rectum.* *60*, 653-663.

Rutkowski, P., and Kozak, K. (2017). News from the melanoma sessions of the European Cancer Congress 2017. *BMC Med.* *15*, 57.

Sauer, R., Becker, H., Hohenberger, W., Rödel, C., Wittekind, C., Fietkau, R., Martus, P., Tschmelitsch, J., Hager, E., Hess, C.F., et al. (2004). Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med.* *351*, 1731-1740.

Shia, J., Guillem, J.G., Moore, H.G., Tickoo, S.K., Qin, J., Ruo, L., Suriawinata, A., Paty, P.B., Minsky, B.D., Weiser, M.R., et al. (2004). Patterns of morphologic alteration in residual rectal carcinoma following preoperative chemoradiation and their association with long-term outcome. *Am J Surg Pathol.* *28*, 215-223.

Shinto, E., Tsuda, H., Ueno, H., Hashiguchi, Y., Hase, K., Tamai, S., Mochizuki, H., Inazawa, J., and Matsubara, O. (2004). Prognostic implication of laminin-5 gamma 2 chain expression in the invasive front of colorectal cancers, disclosed by area-specific four-point tissue microarrays. *Lab Invest.* *85*, 257-266.

Sterk, P., Shekarriz, B., Günter, S., Nolde, J., Keller, R., Bruch, H.P., and Shekarriz, H. (2005). Voiding and sexual dysfunction after deep rectal resection and total mesorectal excision. *Int J Color Dis* *20*, 423-427.

Shimizu, K., Nakata, M., Hiram, Y., Yukawa, T., Maeda, A., and Tanemoto, K. (2010). Tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells are correlated with cyclooxygenase-2 expression and are associated with recurrence in resected non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* *5*, 585-590.

Schrag, D., Weiser, M.R., Goodman, K.A., Gonen, M., Hollywood, E.,

Cercek, A., Reidy-Lagunes, D.L., Gollub, M.J., Shia, J., Guillem, J.G., et al. (2014). Neoadjuvant chemotherapy without routine use of radiation therapy for patients with locally advanced rectal cancer: A pilot trial. *J Clin Oncol.* *32*, 513-518.

Shinto, E., Hase, K., Hashiguchi, Y., Sekizawa, A., Ueno, H., Shikina, A., Kajiwara, Y., Kobayashi, H., Ishiguro, M., and Yamamoto, J. (2014). CD8⁺ and FOXP3⁺ tumor-infiltrating T cells before and after chemoradiotherapy for rectal cancer. *Ann Surg Oncol.* *21*, 414-421.

Stack, E.C., Wang, C., Roman, K.A., and Hoyt, C.C. (2014). Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: a review, with an assessment of Tyramide signal amplification, multispectral imaging and multiplex analysis. *Methods.* *70*, 46-58.

Sakuyama, N., Kojima, M., Kawano, S., Akimoto, T., Saito, N., Ito, M., and Ochiai, A. (2016). Histological differences between preoperative chemoradiotherapy and chemotherapy for rectal cancer: a clinicopathological study. *Pathol Int.* *66*, 273-280.

Sakuyama, N., Kojima, M., Kawano, S., Matsuda, Y., Mino-Kenudson, M., Ochiai, A., and Ito, M. (2018). Area of residual tumor is a robust prognostic marker for patients with rectal cancer undergoing preoperative therapy. *Cancer Sci.* *109*, 871-878.

Tsuchikawa, T., Yamamura, Y., Shichinohe, T., Shichinohe, T., Hirano, S., and Kondo, S. (2012). The immunological impact of neoadjuvant chemotherapy on the tumor microenvironment of esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol.* *19*, 1713-1719.

Tumeh, P.C., Harview, C.L., Yearley, J.H., Shintaku, I.P., Taylor, E.J., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V. et al. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature.* *515*, 568-571.

Takahashi, D., Kojima, M., Suzuki, T., Sugimoto, M., Kobayashi, S., Takahashi, S., Konishi, M., Gotohda, N., Ikeda, M., Nakatsura, T., et al. (2018). Profiling the tumour immune microenvironment in pancreatic neuroendocrine neoplasms with multispectral imaging indicates distinct

subpopulation characteristics concordant with WHO 2017 classification. *Sci Rep.* *8*, 13166.

West, N.P., Finan, P.J., Anderin, C., Lindholm, J., Holm, T., and Quirke, P. (2008). Evidence of the oncologic superiority of cylindrical abdominoperineal excision for low rectal cancer. *J Clin Oncol.* *26*, 3517-3522.

West, N.P., Anderin, C., Smith, K.J., Holm, T., and Quirke, P. (2010). Multicentre experience with extralevator abdominoperineal excision for low rectal cancer. *Br J Surg.* *97*, 588-599.

Wijesundera, K.K., Izawa, T., Tennakoon, A.H., Murakami, H., Golbar, H.M., Katou-Ichikawa, C., Tanaka, M., Kuwamura, M., and Yamate, J. (2014). M1- and M2-macrophage polarization in rat liver cirrhosis induced by thioacetamide (TAA), focusing on Iba1 and galectin-3. *Exp Mol Pathol.* *96*, 382-392.

Yu, H.C., Peng, H., He, X.S., and Zhao, R.S. (2014). Comparison of short- and long-term outcomes after extralevator abdominoperineal excision and standard abdominoperineal excision for rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Colorectal Dis.* *29*, 183-191.

Yoo, B.E., Kye, B.H., Kim, H.J., Kim, G., Kim, J.G., and Cho, H.M. (2015). Early removal of the urinary catheter after total or tumor-specific mesorectal excision for rectal cancer is safe. *Dis Colon Rectum* *58*, 686-691.

Yi, J.S., Ready, N., Healy, P., Dumbauld, C., Osborne, R., Berry, M., Shoemaker, D., Clarke, J., Crawford, J., Tong, B., et al. (2017). Immune activation in early stage non-small cell lung cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy plus ipilimumab. *Clin Cancer Res.* *23*, 7474-7482.

Zhang, L., Conejo-Garcia, J.R., Katsaros, D., Gimotty, P.A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M.N., et al. (2003). Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* *348*, 203-213.

Zitvogel, L., Galluzzi, L., Smyth, M.J., and Kroemer, G. (2013).

Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies:
Reinstating immunosurveillance. *Immunity*. 39, 74-88.