



Title	進行直腸癌の術前化学放射線療法における治療効果および長期予後に関連する病理学的予測因子の研究
Author(s)	佐野, 修平
Description	配架番号 : 2902
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16410号
Issue Date	2025-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16410
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95941
Type	doctoral thesis
File Information	SANO_Shuhe_i.pdf



学 位 論 文

進行直腸癌の術前化学放射線療法における
治療効果および長期予後に関連する
病理学的予測因子の研究

(A Study on Pathological Predictive Factors Related to the
Therapeutic Effects and Long-term Prognosis of Preoperative
Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer)

2025 年 3 月

北海道大学

佐野 修平

Shuhei Sano

学位論文

進行直腸癌の術前化学放射線療法における
治療効果および長期予後に関連する
病理学的予測因子の研究

(A Study on Pathological Predictive Factors Related to the
Therapeutic Effects and Long-term Prognosis of Preoperative
Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer)

2025 年 3 月

北海道大学

佐野 修平

Shuhei Sano

目 次

発表論文目録および学会発表目録・	1 頁
要旨・	2 頁
略語集・	6 頁
全体の緒言・	7 頁
第一章	
緒言・	11 頁
方法・	13 頁
結果・	17 頁
考察・	27 頁
第二章	
緒言・	30 頁
方法・	31 頁
結果・	36 頁
考察・	49 頁
全体の結論・	52 頁
謝辞・	54 頁
利益相反・	55 頁
引用文献・	56 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. Shuhei Sano, Takashi Akiyoshi, Noriko Yamamoto, Yukiharu Hiyoshi, Toshiki Mukai, Tomohiro Yamaguchi, Toshiya Nagasaki, Akinobu Taketomi, Yousuke Fukunaga, Hiroshi Kawachi
Intratumoral Budding and CD8-positive T-cell Density in Pre-treatment Biopsies as a Predictor of Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Advanced Rectal Cancer
Clin Colorectal Cancer. 2023 Dec 22(4):411-420.e1.
Doi: 10.1016/j.clcc.2023.07.004 PMID: 37516615
2. Shuhei Sano, Takashi Akiyoshi, Noriko Yamamoto, Tatsuki Noguchi, Takashi Sakamoto, Shimpei Matsui, Toshiki Mukai, Tomohiro Yamaguchi, Akinobu Taketomi, Yousuke Fukunaga, Naoki Miyazaki, Hiroshi Kawachi
Prognostic Significance of Desmoplastic Reaction After Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Advanced Rectal Cancer
Disease of Colon and rectum, accepted

本研究の一部は以下の学会に発表した。

佐野 修平, 日吉 幸晴, 向井 俊貴, 山口 智弘, 長寄 寿矢, 秋吉 高志,
福長 洋介, 河内 洋
進行直腸癌における術前化学放射線療法効果予測因子としての治療前生検検体
における Intratumoral budding の有用性
第 78 回消化器外科学会総会、2023 年 7 月 12 日-14 日、函館

要 旨

【背景と目的】

直腸癌は大腸癌の約 30%を占め、特に先進国で発生率が増加している疾患である。日本においても直腸癌の罹患数および死亡数は年々増加傾向にあり、結腸癌に比べて再発率が高く、予後不良であることが課題とされている。直腸癌患者の予後改善には局所再発の抑制が重要であり、術前および術後の化学放射線療法（Chemoradiotherapy; CRT）や適切な手術技術の導入が再発抑制に有用であるとされる。しかし、CRT の効果や予後を予測する明確な因子は未だ確立されておらず、CRT に対する反応や長期予後の予測が困難な状況である。本研究では、個別化された治療戦略を確立するために、実臨床で応用可能な効果予測因子および長期予後予測因子を明らかにすることを目的とした。

最近の研究で、直腸癌患者の治療前生検標本における腫瘍微小環境の指標とされる CD8+腫瘍浸潤リンパ球（CD8+ TIL）密度の高さが CRT への良好な反応と関連し、腫瘍内簇出（Intratumoral Budding; ITB）の存在が不良な反応と関連することが示唆されている。しかし、TIL の定量方法は標準化されておらず、ITB や CD8+ TIL の密度と CRT 反応との関係についての研究は限られている。

第一章では、Hematoxylin and Eosin (HE) 染色で確認可能な治療前生検検体における ITB が CRT の効果や生存率に与える影響を評価し、さらに CD8+ TIL との関連についても検討することを目的とした。

第二章では、Desmoplastic Reaction (DR) に着目した。DR は腫瘍細胞を取り巻く線維性組織の反応であり、大腸癌を含む多くのがんにおいて予後因子として注目されている。DR は腫瘍微小環境の重要な構成要素であり、腫瘍周囲の線維性組織の特徴により分類される。一般的に、DR も ITB 同様に HE 染色で確認可能であり、特別な免疫染色を必要としないため、臨床応用において簡便で低コストな評価法とされている。第二章では、切除検体における DR を評価し、予後予測因子としての有用性を検討することを目的とした。

▽第一章

【対象と方法】

術前 CRT を施行し、根治切除を行った進行直腸癌の患者 266 例の生検検体において、ITB および CD8+ TIL が CRT 効果および生存率に与える影響を評価した。また、174 例の RNA シーケンシングデータを使用して、ITB と上皮間葉転換（Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT）マーカーの発現との関連を評価した。

【結果】

62 例 (23.3%) の患者で高 ITB (ITB-High)、204 例 (76.7%) で低 ITB (ITB-Low) が観察されたが、ITB と CD8+ TIL との関連は認められなかった。多変量ロジスティック回帰分析では、CD8+ TIL 密度が高いこと ($p = 0.002$) が CRT に対する良好な反応と関連しており、一方で ITB-High ($p = 0.014$) は不良な反応と関連していた。生存率に関する多変量 Cox 回帰分析では、CD8+ TIL 密度が高いことが無再発生存率 ($p = 0.002$) および全生存率 ($p = 0.005$) の改善と関連していたが、ITB の有意性は低かった (無再発生存率 $p = 0.104$ 、全生存率 $p = 0.163$)。また、EMT 関連遺伝子の発現には、ITB-High および ITB-Low の間で有意差は認められなかった。

【考察】

進行直腸癌患者の生検検体において、ITB および CD8+ TIL はそれぞれ術前 CRT の効果と独立して相関していたが、ITB と EMT 関連遺伝子の発現には関連が認められなかった。本研究の特徴は、腫瘍内および間質領域での CD8+ TIL 密度を区別して測定し、これを長期予後と関連付けて多変量解析を行った点であり、初めての報告である。生検標本での CD8+ TIL 密度の測定・定量化については免疫染色が必須であり、現在のところ標準化された方法が存在しない。一方、ITB は簡便に HE 染色で評価可能であり、実臨床において CRT の反応や生存率を予測するバイオマーカーとして広く応用できる可能性がある。さらに、本研究は標準的な CRT を受けた進行直腸癌患者に対して、十分な長期追跡期間をもって評価を行った最大規模のコホート研究であり、これにより ITB の臨床的有用性についても信頼性の高いデータが得られた。また、ITB と CD8+ TIL の両方を評価することで、CRT への反応をより正確に予測できる可能性が示されたことも本研究の重要な知見である。

▽第二章

【対象と方法】

第一章と同様のコホートから、切除検体が評価不能であった症例を除いた、CRT 後に全直腸間膜切除術を施行した進行直腸癌患者 255 名を対象とした。切除検体における DR は HE 染色による組織学的所見に基づき、*mature*、*intermediate*、*immature* に分類し、DR が無再発生存率および全生存率に与える影響を評価した。

【結果】

DR は mature (69.0%)、intermediate (5.5%)、immature (25.5%) に分類された。mature 群は CRT に良好な反応を示す患者の割合が高く (34.1%)、intermediate (0%) および immature (4.6%) 群と比較して有意に高かった ($p < 0.0001$)。mature 群は、5 年無再発生存率 (85.4%) および全生存率 (93.0%) が intermediate (それぞれ 45.1% および 76.2%) および immature (それぞれ 65.8% および 88.8%) 群と比較して良好な予後と関連していた。多変量解析では、intermediate/immature の DR が無再発生存率の低下と有意に関連していた ($p = 0.03$)。CRT 反応不良者の中でも、intermediate/immature の DR は無再発生存率の低下と関連していた ($p = 0.03$)。mature 群においては、補助化学療法による 5 年無再発生存率の有意な改善は見られず (補助化学療法あり vs. なし: 86.4% vs. 84.8%; $p = 0.64$)、intermediate/immature 群ではむしろ悪化傾向が見られた (55.9% vs. 69.4%; $p = 0.27$)。

【考察】

CRT を施行した進行直腸癌の切除検体において、無再発生存率と DR 分類の間に有意な相関がみられた。特に、CRT 反応不良患者において、DR 分類は腫瘍縮小率 (Tumor regression grade; TRG) よりも強く予後に相関していた。本研究は現代における標準的な CRT 後の進行直腸手術において、DR の有用性を明確に示したものである。また、CRT に対する不良反応を示す症例において、DR が TRG よりも長期予後と密接に関連することを報告した点も新たな知見である。これらの成果は、直腸癌治療における DR の臨床的有用性を明確に示した初めての報告であり、個別化治療に向けた予後因子としての DR の価値を示唆している。これにより、腫瘍微小環境が直腸癌の進行および治療成績に与える影響に対する理解が深まり、特に CRT への不良反応者に対する新たな治療戦略の発展に寄与するものである。

【全体の結論】

本研究は、進行直腸癌に対する CRT の効果と長期予後を予測する因子として、治療前生検検体における ITB および治療後切除検体における DR 分類の有用性を明らかにした。ITB は CRT の反応予測因子として、術前に治療効果を見極めるために活用が期待される。また、DR 分類は特に CRT 不良反応例における予後予測に役立ち、術後の補助療法やフォローアップの個別化を可能にする。

ITB および DR 分類はいずれも標準的な HE 染色で評価可能であり、簡便かつ低コストで実臨床への応用が容易である。これにより、進行直腸癌患者の予後改善と個別化治療の実現が期待される。また、本研究により腫瘍微小環境の理解が

深まり、新たな治療戦略の開発やさらに精度の高い個別化医療への貢献が期待される。

略 語 表

cCR	Clinical Complete Response
CEA	Carcinoembryonic Antigen
CRM	Circumferential Resection Margin
CMS	Consensus Molecular Subtype
CRT	Chemoradiotherapy
DR	Desmoplastic Reaction
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
HE	Hematoxylin and Eosin
HR	Hazard Ratio
IQR	Interquartile Range
ITB	Intratumoral Budding
ITBCC	International Tumor Budding Consensus Conference
NOM	Nonoperative Management
OR	Odds Ratio
OS	Overall Survival
pCR	Pathological Complete Response
PN	Perineural Invasion
QOL	Quality of Life
RFS	Recurrence-Free Survival
ssGSEA	Single-Sample Gene Set Enrichment Analysis
TME	Total Mesorectal Excision
TPM	Transcripts Per Kilobase Million
TRG	Tumor Regression Grade
TNT	Total Neoadjuvant Chemoradiotherapy
TIL	Tumor-Infiltrating Lymphocytes

全体の緒言

1.直腸癌の疫学

直腸癌は、大腸癌の約30パーセントを占める疾患である (Brenner et al, 2012)。世界的に見ても直腸癌の発生率は増加傾向にあり、特に先進国において顕著である。

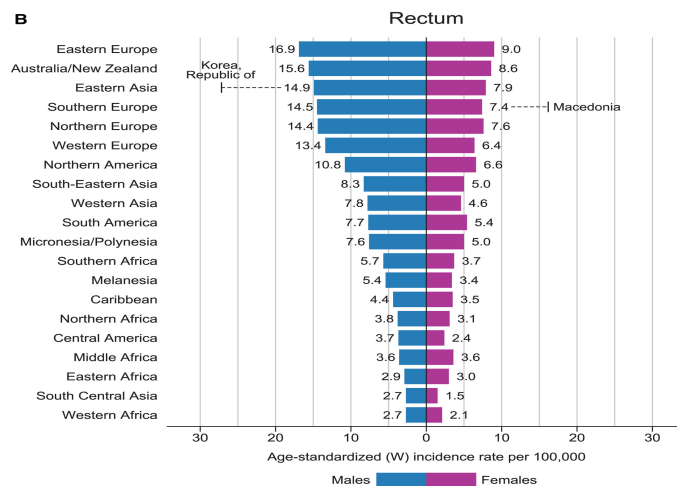


図 1. 世界における直腸癌の地域別年齢標準化罹患率の男女別棒グラフ
罹患率は、男性の世界年齢標準化罹患率が高い順に表示され、男性および女性における各国の最高罹患率を示している。(Bray et al, 2018)より引用。

日本においては 2019 年の直腸癌罹患数は男性 32997 人、女性 19290 人、死亡数は男性 9753 人、女性 5831 人であり、罹患数、死亡数ともに増加傾向である。

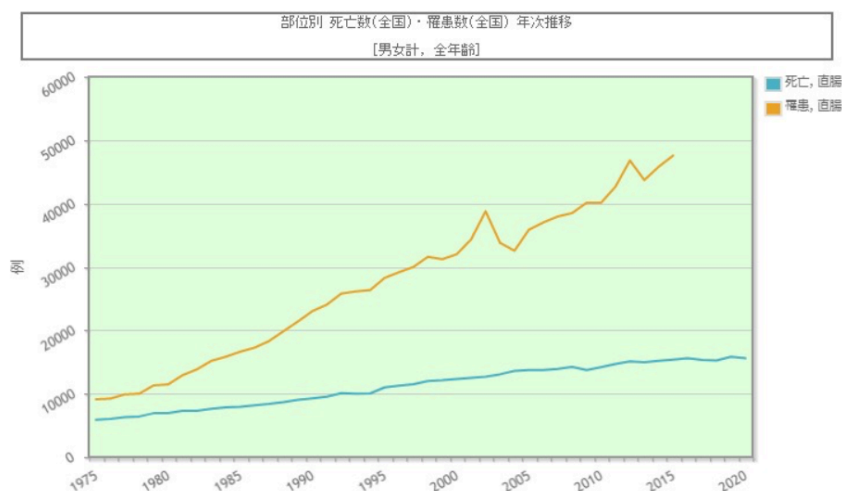


図 2. 日本における直腸癌罹患数、死亡数の年次推移

(Cancer statics in Japan – 2024, https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/data/dl/index.html.)
より引用

また、直腸癌は結腸癌と比較して特に予後が悪く、その再発率の高さが原因であると考えられている (Shida et al, 2020)。直腸癌の再発形式は結腸癌と比較して肺が多いとされているが、局所再発が多いことも特徴的である。

再発部位	結腸 (3,135 例)	直腸 (1,968 例)	p 値
肝	7.2% (227)	7.0% (137)	NS
肺	3.9% (121)	8.1% (160)	p<0.0001
腹膜	2.5% (79)	1.1% (21)	p=0.0001
局所	0.7% (22)	4.1% (80)	p<0.0001
吻合部	1.0% (30)	1.3% (25)	NS
その他	4.0% (124)	6.1% (119)	p=0.0007
全体	16.0% (502)	22.9% (451)	p<0.0001

(大腸癌研究会・全国登録 2007 年症例)
* RS は直腸癌として集計

図 3. 結腸癌・直腸癌における初発再発部位別再発率の比較

(大腸癌研究会編 大腸癌治療ガイドライン 2022 年版) より引用

年々増加傾向にある直腸癌に対して、予後の改善は重要な課題であり、その鍵の一つは局所再発率を低下させることである。直腸癌において局所再発は患者の生活の質や生存率に直接的に影響を与えるため、再発予防のための効果的な治療戦略が求められている。特に、術前・術後の化学放射線療法や、適切な外科的手技の選択が局所再発率の低下に寄与することが明らかになっており、これらのアプローチを組み合わせ、包括的な治療を行うことが、直腸癌の予後を大幅に改善するための鍵となると考えられる。

2. 手術治療

直腸癌における最大の局所治療は手術治療である。世界で初めての直腸癌手術は 1826 年にフランスの婦人科医によって報告された直腸切断術であり (Breen and Garnjobst, 1983)、その後 1908 年に Miles による副会陰式直腸切断術 (Miles, 1971)、1939 年に Dixon らによる初めての肛門温存手術である直腸低位前方切除が報告された (Dixon, 1948)。そして 1982 年、Heald らによって、現在でも直腸癌手術における最も重要な概念である TME (Total Mesorectal Excision) が予後を改善することが報告された (Heald et al, 1982)。直腸および直腸間膜 (mesorectum) は、臓側骨盤内筋膜 (visceral pelvic fascia) に包まれた一つの package を構成しており、TME は、この package を傷つけずに直腸および直腸間膜を一括して切除する手術技術である (Ono et al, 2002)。また、周囲剥離断端 (CRM, Circumferential Resection Margin) が局所再発や長期予後に影響を与えると報告され、1mm 以上の CRM を確保することが重要であることも報告された (Park et al, 2014)。腹腔鏡手術、ロボット手術とより狭い空間での拡大視野による手術が可能になったことでより高精度な手術が実現されているが、現代においても直腸癌手術では TME+CRM 確保は局所再発させないための最も重要な要素である。

3. 術前化学放射線治療

TME を基本とした手術が主流になったにもかかわらず、直腸癌手術後の局所再発は先にも述べたように結腸癌と比較し、高率である。TME だけでは局所再発を制御することは困難であり、これに対し、欧米で術前放射線療法 (neoadjuvant chemoradio therapy, CRT) が局所再発率を低下させることが報告された (Cedermarck et al, 1997; Kapiteijn et al, 2001; van Gijn et al, 2011)。本邦においても、術前 CRT を導入する施設が年々増加傾向である。さらには、CRT 後に病理学的完全奏効 (pathological complete response; pCR) となる割合は 15-20% 程度とも報告されている。特に下部直腸癌の手術では高率に人工肛門造設が必要であり、これによる QOL 低下、縫合不全等の術後合併症が問題となる。これに対し、手術を回避し経過観察を行う Watch & Wait 療法が 2004 年に Habr-Gama らにより初めて報告された (Habr-Gama et al, 2004)。CRT 後に臨床的病理学的完全奏効 (clonical complete response; cCR) と判断された 71 例に対して経過観察を行い、全生存率 100%、無再発生存率 92% と手術と同等以上の成績であった。CRT によって手術を行わなくても癌を根治でき、手術を回避することで肛門温存が可能になる症例も存在するということである。進行直腸癌の治療に関して、局所再発率の低下、QOL の維持、Watch & Wait の概念において、CRT は本邦においても標準治療となりつつある。

4.術前放射線治療の効果・予後予測因子について

CRT は局所再発防止や QOL 向上の観点から非常に有用であるが、その効果は患者によって異なる。術前治療前に CRT に対する反応を予測できれば、個々の患者に対して個別化した治療を提供する可能性がある。近年、免疫細胞が手術前の CRT に対する反応の予測因子として注目されている (Matsushita et al, 2012)。免疫細胞は抗腫瘍反応において重要な役割を果たすだけでなく、手術前の CRT における細胞傷害性 T 細胞やヘルパー T 細胞の密度が低いことが、腫瘍退縮不良と関連していることが報告されている (Yasuda et al, 2011)。生検検体に免疫染色を施すことで臨床応用の可能性が広がるかもしれないが、その手法をルーチンの病理報告に組み込むには、手順の煩雑さやコストの面で実用化へのハードルが高いと考えられる。日常的に行われる HE 染色の中で、CRT の効果や予後を予測できる因子が発見されれば、多くの医療機関で簡便かつ低コストに個別化治療が提供できる可能性が広がると考えられる。さらに、切除標本でも同様の因子が確認されれば、術後治療の層別化が可能となり、予後改善に役立つ可能性がある。

今回我々は術前 CRT を施行した直腸癌切除症例における、生検検体、切除検体の両方における臨床実用性の高い病理学的な CRT 効果予測因子、および予後予測因子を探索することを目的とした。

第一章

進行直腸癌に対する術前化学放射線治療前生検検体での Intratumoral budding の治療効果と 長期予後の予測因子としての有用性に関する検討

緒言

欧米では、CRT とその後の TME が局所進行直腸癌の標準治療となっており、本邦においても同様の治療が標準化されつつある。術前 CRT 後、10%から 20% の患者が病理学的完全奏効を達成する一方で、50%以上の患者は CRT に対して不十分な反応を示し、予後が不良であることが報告されている (Collette et al, 2007; Das et al, 2007; Park et al, 2012)。近年では、欧米を中心に CRT の前後で手術前に全身化学療法を行う、Total Neoadjuvant chemoradiotherapy (TNT) や臨床的完全奏効を達成した患者に対する非手術療法 (Nonoperative management, NOM) など、進行直腸癌の治療戦略が多様化している (Benson et al, 2022)。術前 CRT に対する反応を予測するバイオマーカーを特定することは、より個別化された治療戦略を設計するうえで有用である。例えば、CRT に対して高い反応が期待される患者では、術前 CRT のみで優れた腫瘍学的結果や臓器温存が達成できる可能性がある。一方、CRT に対する反応が不良と予測される患者は、TNT などの強化された治療法が有益となるだろう。しかし、現時点では、臨床の場で日常的に使用できるバイオマーカーは存在していない。

近年の研究では、直腸癌患者において、治療前の生検標本における CD8+腫瘍浸潤リンパ球 (CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes ; TIL) の密度が高いことが、CRT に対する良好な反応と関連していることが示されている (Akiyoshi et al, 2019; El Sissy et al, 2020; Orhan et al, 2022)。しかし、TIL レベルは病理学的なルーチン検査においてまだ評価されておらず、TIL の定量方法も十分に標準化されていない。

予測バイオマーカーのもう一つの候補は、腫瘍内の簇出 (intra-tumoral budding; ITB) の存在であり、ITB が高いことが直腸癌における CRT に対する不良反応と関連していると示唆する報告がある (Chen et al, 2021; Farchoukh et al, 2021; Huang

et al, 2019; Rogers et al, 2014; Wen et al, 2022; Yim et al, 2022)。Budding は、孤立した一つの癌細胞または5細胞未満の細胞集団として定義され (Ueno et al, 2002b)、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) の形態学的現象とされている (Basile et al, 2022; Ueno et al, 2019a)。大腸癌における予後不良と関連する Budding は、浸潤縁における腫瘍周囲の Budding または ITB に分類される (Morodomi et al, 1989)。The International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) は、腫瘍浸潤部における Budding をステージ II 大腸癌の病理報告に含めることを強く推奨しているが (Lugli et al, 2017)、術前 CRT で治療された直腸癌における ITB のルーチン報告を支持する証拠はまだ十分ではなく、ITB の密度と CD8+ TIL の関係を調査した研究は限られている (Farchoukh et al, 2021; Huang et al, 2019; Lugli et al, 2017)。さらに ITB と EMT との関係についての報告はこれまでなされていない。

本研究は、ITB と CD8+ TIL の密度が、CRT に対する反応、無再発生存率 (Recurrence free survival, RFS)、および全生存率 (Overall survival, OS) に与える影響を評価し、ITB および CD8+ TIL 密度が治療反応を予測するバイオマーカーとして有効であるかを検討することを目的とした。また、ITB と EMT マーカーの発現との関係をトランスクリプトミクスデータを用いて評価した。

方法

1. 対象

本後ろ向き研究は、ヘルシンキ宣言に従って実施され、がん研有明病院の倫理委員会（承認番号：2016-1042）によって承認された。

本研究は、2005 年から 2014 年の間にフルオロピリミジン系薬剤を用いた長期間の CRT（総線量 45-50.4 Gy）とその後の TME を受けた進行直腸癌の 287 人の患者を対象とした。TNT を受けた患者は本研究には含まれていない。本研究のコホートは、我々の以前の生検標本の CD8 免疫染色に関する研究と同一のものである(Akiyoshi et al, 2019; Kitagawa et al, 2022; Ogura et al, 2018)。287 人の患者のうち、術前生検標本の欠落や CD8 免疫染色に必要な腫瘍量が不十分であった 12 人の患者は除外された。さらに、HE 染色標本における腫瘍細胞量が不十分であった 9 人の患者では ITB の評価が困難であった。最終的に、266 人の患者が解析対象として選定された (図 4)。本研究は、観察研究の報告ガイドラインである STROBE (von Elm et al, 2007)に従って実施された。

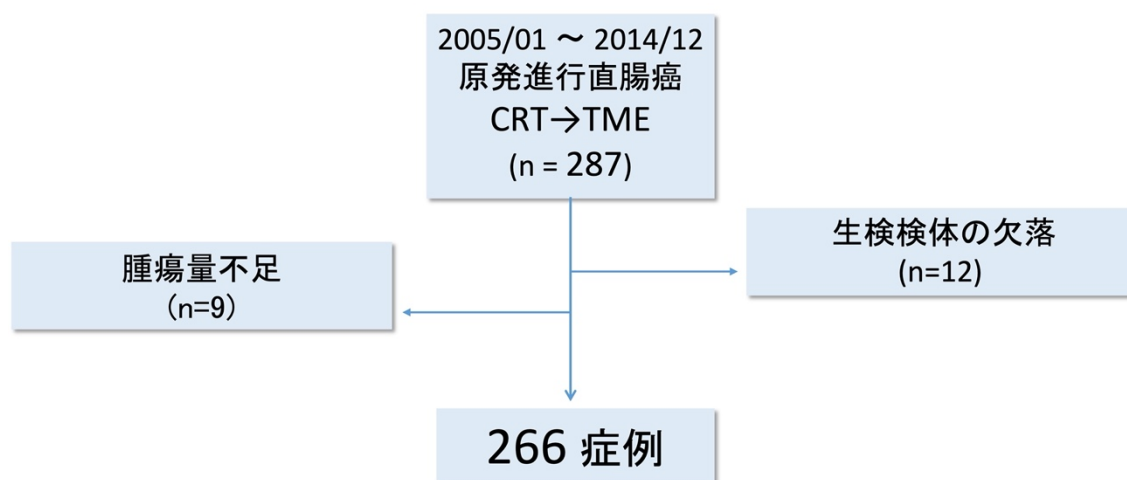


図 4. 対象患者のフローチャート

2005 年 1 月から 2014 年 12 月の期間で 266 症例を対象とした。

2. 病理学的評価

1) ITB の評価方法

術前の生検標本は、10%中性緩衝ホルマリン液で 24～72 時間固定され、パラフィン包埋された後、切片を作成し HE 染色が行われた。ITB は、生検標本における孤立した 1 つの癌細胞または 5 個未満の腫瘍細胞の集団として定義された。

HE 染色されたすべての生検標本は、ITB を評価するために後方視的に評価された。腫瘍生検標本の約 2~3 枚のスライドを低倍率で観察し、最も ITB の数が多いスライドを選択した。最も多くの Budding が観察された視野において、 0.785mm^2 の領域で Budding の数をカウントした (Chen et al, 2021; Farchoukh et al, 2021; Pavlič et al, 2022; Slik et al, 2019; Wen et al, 2022)。ITB は、2 ケ所以上の Budding が確認された場合を ITB-High、1 ケ所以下の ITB が確認された場合を ITB-Low として分類した (Farchoukh et al, 2021; Slik et al, 2019; Wen et al, 2022)。ITB の評価は、1 名の外科医および 1 名の病理医によって実施され、両者とも最終的な病理結果には盲検化された状態で評価を行った (図 5)。

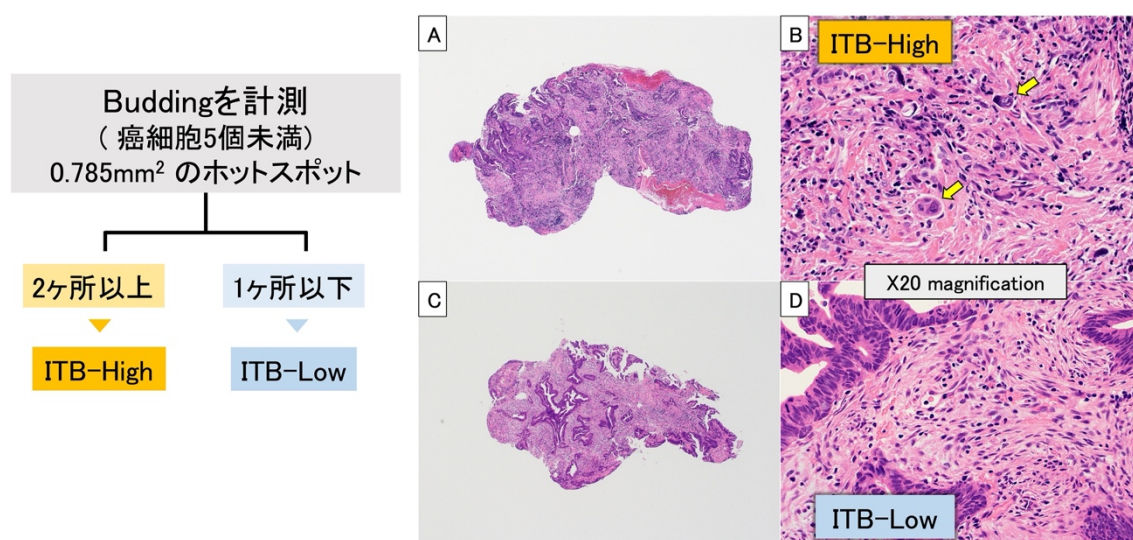


図 5. ITB の評価方法

(A, B) ITB を示す生検標本画像。4 倍の倍率で撮影された画像 (A)と 40 倍の倍率で撮影された画像 (B)。B では黄色矢印で ITB を示している。

(C, D) ITB が見られない生検標本画像。4 倍の倍率で撮影された画像 (C)と 40 倍の倍率で撮影された画像 (D)。

2) CD8 の評価方法

術前生検標本の CD8 免疫染色におけるデータ解析と定量法については、既に報告しているが、以下に示す(Akiyoshi et al, 2019; Kitagawa et al, 2022; Ogura et al, 2018)。CRT 前に取得されたホルマリン固定パラフィン包埋標本から切り出した厚さ $4\mu\text{m}$ の切片を用いた。マウスモノクローナル抗 CD8 抗体 (希釈 1:100、クローン C8/144B ; ニチレイ、東京、日本) を使用し、Leica Bond III 自動染色システム (Leica Biosystems, ニューキャッスル、英国) を用いて染色を行った。全切片は Aperio ImageScope システム (Leica Biosystems) を用いて 20 倍の倍率でス

キャンされた。視野は 0.6mm^2 の領域から 2 つ無作為に選び、CD8+TIL と間質リンパ球を別々にカウントした。腫瘍および間質領域における CD8+TIL 密度の平均値を計算した。CD8+TIL 密度については、患者を中央値 ($65.49/\text{mm}^2$) に基づいて「High 群」と「Low 群」の 2 群に分類した (図 6)。

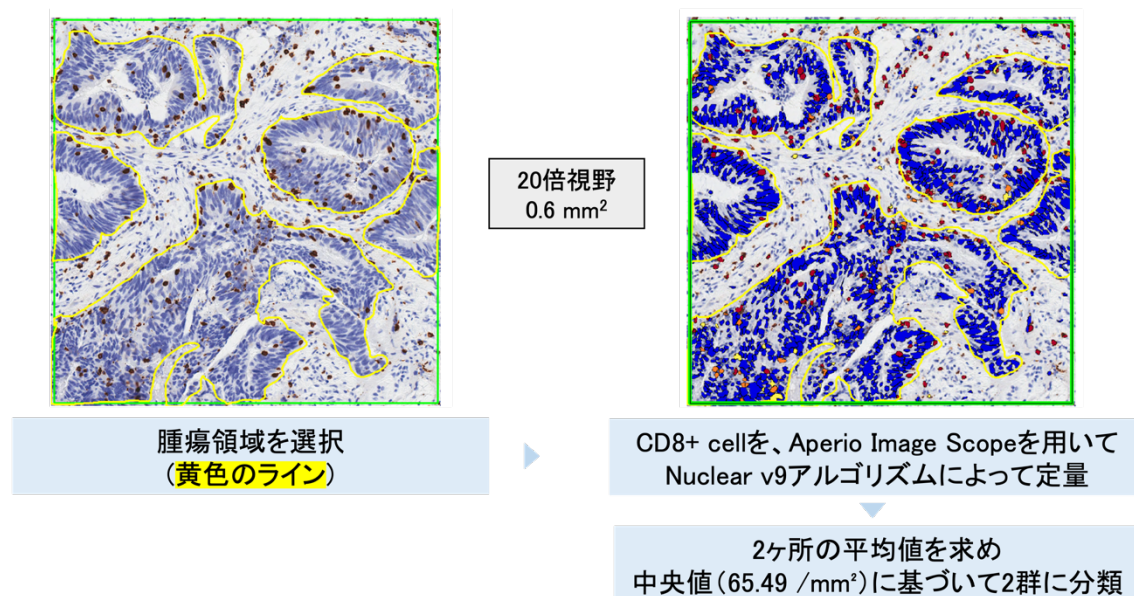


図 6. CD8 免疫染色の定量方法

Aperio ImageScope システム (Leica Biosystems) を用いて定量した。

3) Tumor regression grade

術前 CRT に対する効果は、手術で切除された標本を用いて、Dworak tumor regression grade (TRG) に従って評価した (Dworak et al, 1997) 。TRG 4 (完全な腫瘍退縮。腫瘍細胞が全く認められず、治療による完全な奏効を示している。) および TRG 3 (大部分が線維化に置き換わり、わずかな腫瘍細胞しか残っていない。) と分類された患者は「good responders」とされ、一方で TRG 2 (腫瘍細胞と線維化が同程度見られる。) および TRG 1 (腫瘍の退縮は少なく、ほとんどが腫瘍細胞で構成されている。) と分類された患者は「poor responders」と分類した。

3. トランスクリプトーム解析

我々の最近の研究で 2004 年から 2020 年にかけて CRT を受けた直腸癌患者 298 名の治療前生検標本に対して RNA シークエンシング解析を実施した (Akiyoshi et al, 2023)。この 298 名の RNA シークエンシングデータのうち、ITB は 174 名の患者について解析した。RNA の調製およびシークエンシングの詳細

な方法は、以前に報告しているが以下に示す (Akiyoshi et al, 2023)。新鮮凍結された生検標本から癌細胞を濃縮するためにレーザーキャプチャーマイクロダイセクションが行われ、Illumina HiSeq2500 (Illumina, サンディエゴ, カリフォルニア, USA) を用いて RNA シークエンシングを施行した。遺伝子発現値は、Transcripts Per Kilobase Million (TPM) として示され、無限値を回避するために擬似値 1 を加えた後、log2 に変換した。ZEB1、TWIST1、SNAI1、および CDH1 の遺伝子発現は、ITB-High 群と ITB-Low 群の間で比較した。さらに、シングルサンプル遺伝子セット濃縮解析 (Single-sample gene set enrichment analysis; ssGSEA) を実施し、Molecular Signature Database ver 7.5.1 から HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION を定量化した (Liberzon et al, 2015)。解析には、R と Bioconductor の遺伝子セット変動解析を使用した (Hänzelmann et al, 2013)。

4.統計解析

カテゴリー変数の比較には Fisher の直接確率検定または χ^2 検定を使用し、連続変数の比較には Mann-Whitney U 検定を用いた。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて可視化し、ログランク検定で比較した。全生存期間 (Overall Survival; OS) は手術からあらゆる原因による死亡までの期間として定義され、無再発生存期間 (Recurrence-free survival; RFS) は手術から再発までの期間として定義された。CRT への反応に関連する因子のオッズ比 (Odds Ratio; OR) を推定するために、単変量および多変量ロジスティック回帰モデルを使用し、RFS および OS に関連する因子のハザード比 (Hazard Ratio; HR) を推定するためには Cox 比例ハザード回帰モデルを使用した。単変量解析で p 値が <0.20 となった変数は多変量解析に含めた。両側 p 値 <0.05 は統計的に有意とみなした。解析は、R バージョン 4.1.0 (Foundation for Statistical Computing、ウィーン、オーストリア)、R のグラフィカルユーザーインターフェースである EZR (自治医科大学埼玉医療センター、埼玉、日本) (Kanda, 2013)、または GraphPad Prism バージョン 7 (GraphPad、サンディエゴ、カリフォルニア、USA) を使用して実施した。

結果

1. ITB と術前 CRT の効果との関連

本研究に含まれた 266 名の患者のうち、62 名（23.3%）が ITB-High 群に分類された。術前生検標本の ITB 分類に基づく臨床病理学的背景は、表 1 に示した。術前の CEA 値は、ITB-High 群で ITB-Low 群に比べて有意に低かった ($p=0.04$)。

表 1 CRT 前生検標本における ITB に基づく臨床的患者背景

項目	ITB-Low (n=204)	ITB-High (n=62)	P 値
性別			0.64
男性	137 (67.2%)	44 (71.0%)	
女性	67 (32.8%)	18 (29.0%)	
年齢 (年) (range)	60 (27- 78)	61 (34-77)	0.61
肛門縁から腫瘍までの距離 (mm) (range)	40 (0-100)	40 (10-80)	0.40
CRT 前 CEA (ng/mL) (range)	3.7 (0.50-152.4)	2.9 (0.80-14.60)	0.04
CRT 前 CA19-9 (ng/mL) (range)	7.80 (0-588.3)	6.35 (0-588.3)	0.23
CRT 前 腫瘍内 CD8+ TIL 密度			0.56
低	105 (51.5%)	29 (46.8%)	
高	99 (48.5%)	33 (53.2%)	
臨床的深達度分類			1.00
cT2	1 (0.5%)	0 (0%)	
cT3	185 (90.7%)	57 (91.9%)	
cT4	18 (8.8%)	5 (8.1%)	
臨床的リンパ節転移陽性	62 (30.4%)	19 (30.6%)	1.00
CRT から手術までの期間 (日)			0.28
≤56	180 (88.2%)	51 (82.3%)	
>56	24 (11.8%)	11 (17.7%)	
放射線量 (Gy)			0.10
45	117 (57.4%)	43 (69.4%)	
50.4	87 (42.6%)	19 (30.6%)	
手術			0.53
肛門温存	145 (71.1%)	41 (66.1%)	
非肛門温存	59 (28.9%)	21 (33.9%)	

病理学的背景に関して、表2に示す。術前の腫瘍内CD8+密度の値に関しては、ITB-High群とITB-Low群の間で有意差は認められなかった(53.2% vs. 48.5%)。術後の病理学的所見において、ITB-High群とITB-Low群間でypTに差がある傾向が見られた($p = 0.13$)。完全奏効率は、ITB-Low群でITB-High群よりも高かった(19.1% vs. 6.5%)。リンパ管浸潤およびypNカテゴリーに関しては、両群間で有意差は認められなかった。TRGにおいては、good responderの割合がITB-Low群でITB-High群よりも有意に高かった(29.4% vs 11.3%, $p = 0.004$)。

表2 CRT 前生検標本におけるITBに基づく病理学的背景

項目	ITB-Low (n=204)	ITB-High (n=62)	P 値
病理学的深達度分類			0.13
ypT0	39 (19.1%)	4 (6.5%)	
ypT1	11 (5.4%)	4 (6.5%)	
ypT2	64 (31.4%)	21 (33.9%)	
ypT3	84 (41.2%)	32 (51.6%)	
ypT4	6 (2.9%)	1 (1.6%)	
病理学的リンパ節転移分類			0.71
ypN0	142 (69.6%)	43 (69.4%)	
ypN1	45 (22.1%)	12 (19.4%)	
ypN2	17 (8.3%)	7 (11.3%)	
組織型			0.08
高分化もしくは中分化腺癌	197 (96.6%)	56 (90.3%)	
その他	7 (3.4%)	6 (9.7%)	
脈管侵襲			0.11
陽性	98 (48.0%)	37 (59.7%)	
陰性	106 (52.0%)	25 (40.3%)	
Tumor regression grade (腫瘍縮小グレード)			0.004
TRG1/2	144 (70.6%)	55 (88.7%)	
TRG3/4	60 (29.4%)	7 (11.3%)	
術後補助化学療法			0.74
あり	87 (42.6%)	29 (46.8%)	
なし	116 (56.9%)	33 (53.2%)	
不明	1 (0.5%)	0 (0.0%)	

単変量および多変量解析を実施し、本コホートにおいて術前の臨床的および病理学的因子が CRT に対する反応を予測できるかを解析した (表 3)。多変量解析では、cT4 カテゴリー (OR 0.20; 95%CI 0.04-0.93; $p=0.040$)、cN 陽性 (OR 0.40; 95%CI 0.22-0.73; $p=0.003$)、および高 ITB (OR 0.33; 95%CI 0.14-0.80; $p=0.014$) が CRT の poor responder と有意に関連していることが示された。対照的に、術前の腫瘍内 CD8+TIL 密度が高い患者 (OR 2.69; 95%CI 1.45-4.98; $p=0.002$) は、多変量解析において良好な反応と関連していることが示された。

表 3 CRT に対する効果に関連する CRT 前因子の単変量および多変量解析

項目	単変量解析		多変量解析	
		オッズ比 (95% CI)		
	N		P 値	P 値
年齢 (年)			0.481	
≤60	134	1		
>60	132	1.24 (0.69, 2.26)		
性別			0.292	
男性	181	1		
女性	85	1.38 (0.73, 2.55)		
肛門縁から腫瘍までの距離 (mm)			0.671	
≤40	143	1		
>40	123	0.85 (0.47, 1.54)		
CRT から手術までの期間 (日)			0.677	
≤56	231	1		
>56	35	1.22 (0.49, 2.82)		
臨床的深達度分類			0.076	0.040
T2/3	243	1	1	
T4	23	0.26 (0.03, 1.12)	0.20 (0.04, 0.93)	
臨床的リンパ節転移			0.006	0.003
陰性	104	1	1	
陽性	162	0.49 (0.24, 0.82)	0.40 (0.22-0.73)	
CEA (ng/ml)			0.942	

≤5	176	1		
>5	90	0.94 (0.49, 1.75)		
放射線量 (Gy)			0.043	0.059
45	160		1	
50.4	106	1.81 (0.99, 3.30)	1.11 (1.00, 1.24)	
組織型			1.000	
高分化もしくは中分化腺癌	253	1		
その他	13	0.89 (0.15, 3.58)		
腫瘍内 CD8+ TIL 密度			0.005	0.002
低	134	1	1	
高	132	2.31 (1.26, 4.33)	2.69 (1.45, 4.98)	
Intratumoral budding			0.004	0.014
Low	204	1	1	
High	62	0.31 (0.11, 0.73)	0.33 (0.14, 0.80)	

2. ITB と長期予後との関連

図 2 は、ITB-High 群と ITB-Low 群における無再発生存率 (RFS) および全生存率 (OS) の曲線を示している。生存者の中央値追跡期間は 73 ヶ月 (IQR、64–84) であった。5 年間の RFS は、ITB-High 群の患者で ITB-Low 群よりも有意に悪かった (67.4% vs. 81.4%、 $p=0.03$)。また、5 年間の OS も ITB-High 群で ITB-Low 群よりも有意に悪かった (83.5% vs. 92.4%、 $p=0.04$)。

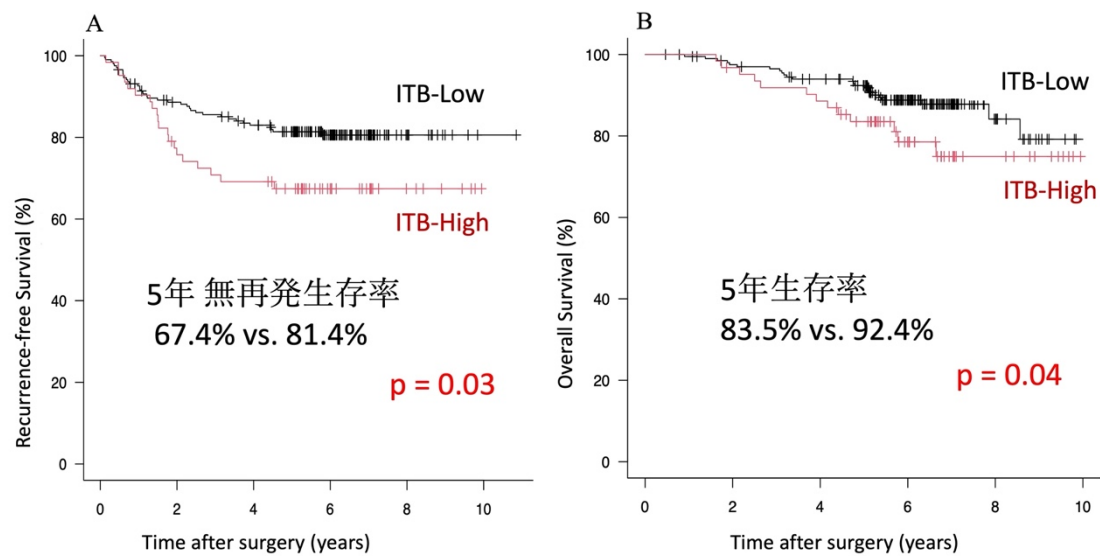


図 7. ITB-High 群と ITB-Low 群に基づく無再発生存率 (A) および全生存率 (B) の Kaplan-Meier 生存曲線解析

3. ITB と長期予後との関連

表 4 に RFS に関連する術前および治療関連の臨床因子を使用した単変量および多変量解析を示した。RFS に関して、多変量解析では cN 陽性が RFS の悪化と関連していた (HR 2.57、95% CI 1.37-4.81、 $p=0.003$)。一方で、術前の腫瘍内 CD8+ TIL 密度が高いことは RFS の改善と関連していた (HR 0.41、95% CI 0.24-0.72、 $p=0.002$)。ITB-High は RFS の悪化とわずかに関連していたが、 p 値は有意ではなかった ($p=0.104$)。

表 4 RFS に関連する CRT 前因子の単変量および多変量解析

項目	N	単変量解析		多変量解析	
		ハザード比 (95% CI)	P 値	ハザード比 (95% CI)	P 値
年齢 (年)			0.561		
≤60	134	1			
>60	132	1.17 (0.70, 1.95)			
性別			0.623		
男性	181	1			
女性	85	0.87 (0.49, 1.53)			
肛門縁から腫瘍までの距離(mm)			0.388		
≤40	143	1			
>40	123	0.79 (0.47, 1.34)			
CRT から手術までの期間 (日)			0.056		0.163
≤56	231	1		1	
>56	35	1.86 (0.99, 3.51)		1.59 (0.83, 3.04)	
臨床的深達度分類			0.047		0.115
T2/3	243	1		1	
T4	23	2.06 (1.01, 4.20)		1.81 (0.87, 3.80)	
臨床的リンパ節転移			0.003		0.003
陰性	104	1		1	
陽性	162	2.52 (1.36, 4.67)		2.57 (1.37, 4.81)	
CEA (ng/ml)			0.150		0.359
≤5	176	1		1	

>5	90	1.47 (0.87, 2.48)	1.29 (0.75, 2.23)	
放射線量 (Gy)			0.236	
45	160	1		
50.4	106	1.37 (0.82, 2.29)		
組織型			0.425	
高分化もしくは中分化腺癌	253	1		
その他	13	1.51 (0.55, 4.18)		
腫瘍内 CD8+ TIL 密度			0.003	0.002
低	134	1	1	
高	132	0.43(0.25, 0.75)	0.41(0.24, 0.72)	
Intratumoral budding			0.027	0.104
Low	204	1	1	
High	62	1.84 (1.07, 3.16)	1.58 (0.91, 2.76)	

表 5 に OS に関連する術前および治療関連の臨床因子を使用した単変量および多変量解析を示す。多変量解析では術前の腫瘍内 CD8+ TIL 密度が高いことのみが OS の改善と関連していた (HR 0.36、95% CI 0.17–0.74、 $p = 0.005$)。ITB-High は OS の悪化とわずかに関連していたが、 p 値は有意ではなかった ($p = 0.163$)。

表 5 OS に関連する CRT 前因子の単変量および多変量解析

項目	N	単変量解析 ハザード比 (95% CI)	P 値	多変量解析 ハザード比 (95% CI)	P 値
年齢 (年)			0.026		0.089
≤60	134	1		1	
>60	132	2.18 (1.10, 4.35)		1.83 (0.91, 3.68)	
性別			0.582		
男性	181	1			
女性	85	0.83 (0.42, 1.62)			
肛門縁から腫瘍までの距離(mm)			0.951		
≤40	143	1			
>40	123	0.98 (0.52, 1.84)			
CRT から手術までの期間 (日)			0.583		
≤56	231	1			
>56	35	1.27 (0.54, 2.98)			
臨床的深達度分類			0.635		
T2/3	243	1			
T4	23	1.27 (0.48, 3.34)			
臨床的リンパ節転移			0.051		0.055
陰性	104	1		1	
陽性	162	2.05 (0.99, 4.22)		2.05 (0.98, 4.29)	
CEA (ng/ml)			0.279		
≤5	176	1			
>5	90	1.43 (0.75, 2.70)			
放射線量 (Gy)			0.781		
45	160	1			

50.4	106	0.98 (0.87, 1.11)		
組織型			0.061	0.061
高分化もしくは中分化腺癌	253	1	1	
その他	13	2.70 (0.95, 7.62)	2.80 (0.95, 8.22)	
腫瘍内 CD8+ TIL 密度			0.013	0.005
低	134	1	1	
高	132	0.41 (0.20, 0.83)	0.36 (0.17, 0.74)	
Intratumoral budding			0.048	0.163
Low	204	1	1	
High	62	1.95 (1.00, 3.77)	1.61 (0.82, 3.16)	

4. ITB と EMT 関連遺伝子の発現との関連

図 8A は、上皮間葉転換 (EMT) マーカーである ZEB1、TWIST1、SNAIL、および CDH1 の発現を ITB-High 群と ITB-Low 群で比較したものである。ZEB1、TWIST1、SNAIL、CDH1 の発現には、ITB-High 群と ITB-Low 群の間で有意な差は認められなかった。ssGSEA を用いた遺伝子セット解析でも、両群間で EMT の代表的な遺伝子セットの発現に有意な差は見られなかった (図 8B)。

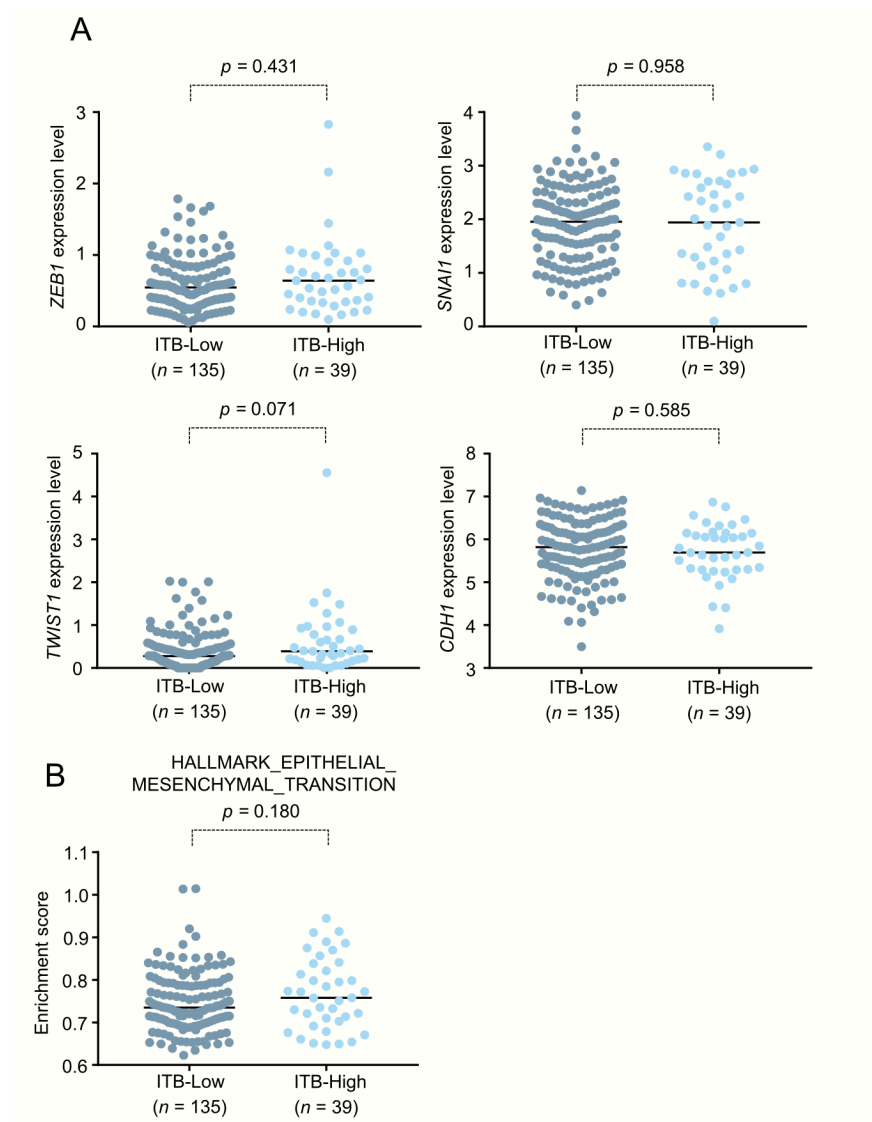


図 8. ITB に基づく EMT に関連する遺伝子発現

(A) ZEB1、TWIST1、SNAIL、および CDH1 の発現を ITB に基づいて示した散布図。中央値は横線で表されている。P 値は Mann-Whitney U 検定で算出した。

(B) EMT セットの ssGSEA スコアを ITB に基づいて示した散布図。中央値は横線で表しており、P 値は Mann-Whitney U 検定で算出した。

考察

最近の研究では、術前の腫瘍免疫微小環境の状態が、直腸癌患者における CRT への反応を予測するバイオマーカーとなる可能性が示唆されている。免疫成分に関して、我々や他の研究者は、CD8+ TIL の密度が高いことが、CRT に対する良好な反応と関連していることを、生検標本における免疫組織化学染色により報告している(Akiyoshi et al, 2019; El Sissy et al, 2020; Orhan et al, 2022)。一方、腫瘍成分に関しては、生検標本における ITB の存在が、HE 染色(Chen et al, 2021; Farchoukh et al, 2021; Huang et al, 2019; Rogers et al, 2014; Yim et al, 2022)、または免疫組織化学染色(Wen et al, 2022)によって評価され、CRT の不良な反応と関連していることが示されている。これまでのところ、CD8+ TIL と ITB の関係を調査した研究はほとんどない。本研究では、腫瘍内 CD8+ TIL 密度と ITB の間に明確な相関関係は見られなかったが、両者が独立して CRT への反応と関連していることを示した。これらの結果は、生検標本において腫瘍成分と免疫成分の両方を評価することで、直腸癌患者における CRT への反応をより正確に予測できる可能性があることを示唆している。また、単変量解析において、高 ITB が長期的な腫瘍学的予後不良と関連していることを示したが、CD8+ TIL 密度を含む多変量解析では有意な関連は見られなかった。さらに、生検標本における ITB の存在が、転写解析による EMT 経路遺伝子の増加と関連していないことも示された。我々の知る限り、進行直腸癌において、CD8+ TIL 密度と組み合わせて、CRT に対する反応を予測する上での ITB の重要性を検討した研究としては、これが最大規模のものである。

腫瘍浸潤部周囲における Budding は、特にステージ II 結腸癌における確立された予後不良因子であることが知られている(Rogers et al, 2016)。しかしながら、切除標本における周囲腫瘍の Budding とは異なり、生検標本における腫瘍内 Budding, ITB の重要性を支持する十分なエビデンスはまだ得られていない。最近の 13 件の研究を対象としたメタアナリシスでは、ITB が高いことは高度な病理学的深達度、リンパ節転移の増加、無病生存率の低下と有意に関連していることが示された(Kang et al, 2022)。しかし、このメタアナリシスには、ITB が切除標本で評価された研究が含まれており、また術前 CRT を受けた直腸癌に限定されたものではなかった。いくつかの先行研究では、術前 CRT を受けた直腸癌患者の術前生検標本における ITB の関連性を調査しており、ITB が高いとされる基準にはさまざまなものがある(Chen et al, 2021; Farchoukh et al, 2021; Huang et al, 2019; Rogers et al, 2014; Wen et al, 2022; Yim et al, 2022)。Rogers らは、100 倍の倍率で観察される Budding がある場合を「高 ITB」と定義し、89 名の患者のうち 20%に高 ITB が観察されたと報告している(Rogers et al, 2014)。また、彼らは高

ITB が CRT への不良な反応とわずかに関連していること ($p=0.061$) を示し、高 ITB の患者には病理学的完全奏効が認められなかった(Rogers et al, 2014)。Lino-Silva らは、 0.785mm^2 あたり 5 つ以上の ITB がある場合を「高 ITB」と定義し、50.4%の患者で高 ITB が確認されたと報告している(Lino-Silva et al, 2018)。本研究では、 0.785mm^2 あたり 2 つ以上の ITB を「高 ITB」と定義したが、その理由は、 0.785mm^2 あたり 5 つ以上の ITB を持つ患者の数が限られていたためである($n=12$ 、4.5%)。さらに、ITBCC は ITB の評価に 0.785mm^2 の視野を使用することを推奨している(Lugli et al, 2017)。我々の結果は、同じ基準を用いた Farchoukh らの研究とほぼ一致している。117 名の患者を評価したところ、高 ITB の割合は 22%であり、多変量解析において高 ITB は CRT への不良反応と有意に関連していた(Farchoukh et al, 2021)。生検標本における ITB の評価は一般化されておらず、標準化するためには、さらなる研究が必要である。

高密度の TIL は、大腸癌において良好な予後と関連していることが報告されており(Pagès et al, 2018)、Budding と腫瘍浸潤周囲における適応免疫応答の相互作用が示唆されている(Fujiyoshi et al, 2020; González et al, 2021; Lang-Schwarz et al, 2018; Zlobec et al, 2011)。Fujiyoshi らは、大腸癌患者において、上皮内の CD8+ TIL 密度と浸潤部周囲での Budding の程度に逆相関があることを明らかにした(Fujiyoshi et al, 2020)。他の研究では、TIL 密度が腫瘍浸潤部周囲の Budding とは独立した予後因子であることが示されている(Fujiyoshi et al, 2020; Lee et al, 2020)。浸潤部における Budding とは異なり、生検標本における ITB と TIL との関係は十分に調査されていない。本研究では、ITB と CD8+ TIL 密度との間に相関関係は認められず、両方の変数が独立して CRT に対する反応と関連していた。実際に、生検標本内では、CD8+ TIL と ITB に関連するホットスポットが異なっており、この違いが ITB と CD8+ TIL の相関の欠如に関連している可能性がある。しかしながら、我々の結果は、生検標本において ITB と TIL を同時に評価することで、直腸癌における CRT への反応予測を改善できる可能性を示唆している。Farchoukh らによる唯一の先行研究では、生検標本で自動デジタル画像解析を用いて ITB と CD8+ TIL 密度の関係を調査しており、彼らの研究でも ITB と CD8+ TIL 密度との相関は認められなかったが、ITB と CD8+ TIL 密度が CRT に対する反応の独立した予測因子であることを示していた(Farchoukh et al, 2021)。

ITB の予後予測に関して、本研究の結果では、ITB ではなく CD8+ TIL 密度が RFS および全生存率 OS と有意に関連していることが多変量解析で示された。この結果は、単に高 ITB の患者数やイベントが少なかったことに起因している可能性がある。Rogers らは、高 ITB が無病生存率の低下と癌特異的死亡率の増加と関連していることを示した(Rogers et al, 2014)。しかし、彼らは CD8+ TIL の密度を分析しておらず、他の術前腫瘍特性を含む多変量解析も行っていなかった。

Farchoukh らの研究では、多変量解析において CD8+ TIL ではなく高 ITB のみが無病生存率と関連していることが示された(Farchoukh et al, 2021)。しかし、CD8+ TIL の予後的意義は単変量解析でわずかであったため ($p = 0.1$)、彼らの研究では多変量解析に CD8+ TIL は含まれなかった。さらに、著者らは腫瘍内領域と間質領域を区別しておらず、我々は腫瘍内の CD8+ TIL のみを測定した点が異なる。生検標本における CD8+ TIL 密度の定量化に関しては標準化された方法が存在しないため、ITB は CRT の反応や生存率のバイオマーカーとして臨床実践においてより使いやすい可能性がある。

最後に、ITB と EMT 関連遺伝子発現との関連も評価した。EMT は ZEB1、TWIST、SNAIL などの複数の転写因子によって誘導される。ZEB1 および SNAIL は CDH1 プロモーターに直接結合して E-カドヘリンの発現を抑制し、一方で TWIST は CDH1 プロモーターに直接結合せずに EMT を引き起こす(De Craene and Berx, 2013)。以前の研究では、間葉系の CMS4 (Consensus Molecular Subtype 4) では上皮系の CMS2/3 に比べて腫瘍の Budding の割合が有意に高いことが示されている(Trinh et al, 2018)。本研究では、ITB と EMT 関連遺伝子発現の関連や、高 ITB 腫瘍における EMT 遺伝子セットの増加は確認できなかった。この結果は、RNA シークエンシングが腫瘍全体の生検標本を用いて行われ、Budding 細胞のマイクロダイセクションが実施されなかったことによる可能性がある(De Smedt et al, 2017)。我々は以前、CMS4 と CMS2/3 の間で CRT に対する良好な反応率に有意差がないことを報告している (38% vs. 24%) (Akiyoshi et al, 2023)。また、これまでの研究では、EMT 関連タンパク質が大腸癌の Budding 領域で発現していないことが示されており、Budding 細胞が必ずしも EMT を反映していない可能性がある(Yamada et al, 2017)。ITB の分子メカニズムを理解するためには、さらなる研究が必要である。

本研究の強みは、標準的な長期間の CRT を受けた患者数が比較的多く、十分な長期追跡が行われた点である。一方で、本研究の最大の制約は、後ろ向きの単施設研究である点である。サンプルサイズは比較的大きかったものの、good responder やイベント（死亡および再発）の数が比較的少なかったため、内部妥当性を確保する上で課題があった。さらに、本研究には、TNT や NOM を受けた患者は含まれていない。直腸癌において、生検標本での ITB の有用性を CRT 反応の予測バイオマーカーとして確認するためには、より多くの患者を対象としたさらなる後ろ向きおよび前向き研究が必要である。

第二章

術前化学放射線療法後の進行直腸癌における

Desmoplastic Reaction の長期予後的意義の検討

緒言

第一章では、進行直腸癌における術前 CRT 前の生検検体内での腫瘍微小環境に注目し、HE 染色で確認できる ITB の効果予測としての有用性および長期予後との関連を検討した。しかし、CRT に対する反応は患者間で大きく異なり、一部の患者では完全奏効を示す一方で、約 40% の患者は術前 CRT に対する反応が不良であり、最終的には遠隔再発を発症するケースが存在する(Fokas et al, 2014)。CD8+ TIL をはじめとする術前の CRT に関する腫瘍微小環境に関する報告は散見される一方で、術後の腫瘍微小環境についての特徴については、十分に調査されていない(Chen et al, 2020; Hong et al, 2022; Song et al, 2019)。術前および術後の腫瘍微小環境を理解し、それに伴う再発率を把握することは、直腸癌の管理において患者をより適切に層別化し、術後の化学療法やフォローアップ方法を最適化し、さらなる長期予後の改善につながる可能性があると考えられる。

腫瘍微小環境の特徴の中でも、腫瘍細胞を取り巻く線維性組織の変化、Desmoplastic Reaction (DR) は、大腸癌における重要な予後因子として注目されている(Ueno et al, 2021a; Ueno et al, 2019b)。DR はコラーゲン沈着や細胞外マトリックスの程度によって特徴づけられ、成熟した組織化から未熟な粘液状の間質まで様々である(Ueno et al, 2002a; Ueno et al, 2004; Ueno et al, 2015b)。DR は ITB と同様に標準的な HE 染色で評価でき、追加の免疫染色を必要としないため、実臨床でも応用可能な患者を層別化するための有望なツールと考えられる。DR のこのような利点にもかかわらず、術前 CRT 後の直腸癌における DR の分類の予後的価値は十分に調査されていない。第二章では、術前 CRT およびその後の外科的切除を受けた患者における DR 分類と、無再発生存率 (RFS) および全生存率 (OS) などの臨床転帰との関係を調査することを目的とした。

方法

1.対象

本研究は後ろ向きコホート研究として、ヘルシンキ宣言に基づく倫理原則を遵守し、がん研有明病院の倫理審査委員会から承認を得て実施された（承認番号：2016-1042）。本コホートは、第一章の研究と一致しており、同様の患者集団を対象としている。本研究では、2005年から2014年の間にフルオロピリミジン系薬剤を用いた術前 CRT を受け、総放射線量 45-50.4 Gy の後に TME を施行された進行直腸癌患者 287 名を対象とした（生検検体が欠如していた症例は除いた。）統一されたコホートを維持し、従来の CRT レジメンが DR のパターンに与える影響を評価するため、TNT 療法を受けた患者は除外した。さらに切除標本が入手できなかった 20 名の患者を除外し、最終的に 255 名の患者が解析対象として適格であった（図 9）。選定および解析は、観察研究報告の強化を目指すガイドラインである STROBE 声明に従って実施された。

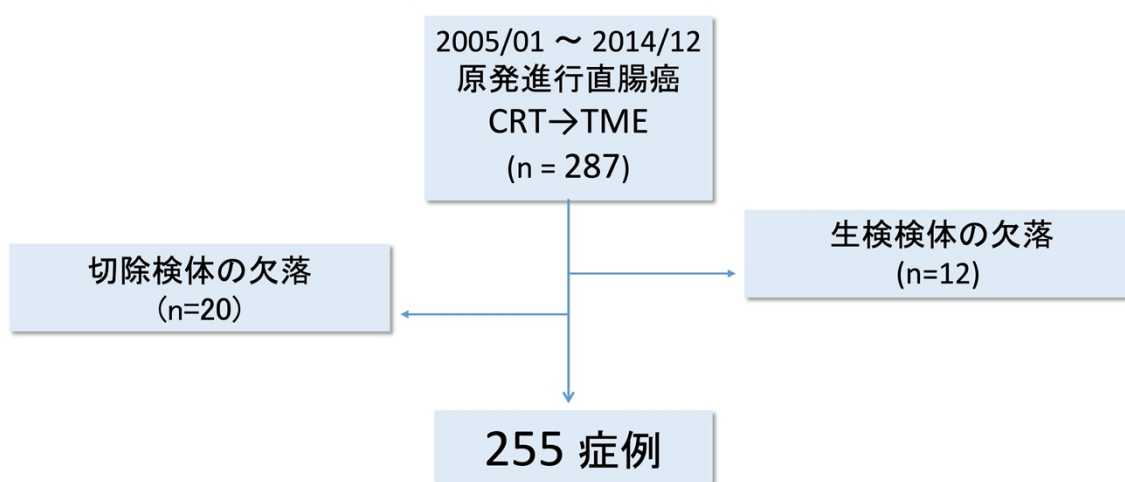


図 9. 対象患者のフローチャート

2005 年 1 月から 2014 年 12 月の期間で 255 症例を対象とした。

2. 病理学的評価

1)DR の評価方法

DR の分類は、Ueno らの方法論に基づいており(Ueno et al, 2021b; Ueno et al, 2019b; Ueno et al, 2017; Ueno et al, 2018)、標本を特定の組織学的特徴に基づいて、**mature**、**intermediate**、**immature** に分類した。線維性間質がケロイド様コラーゲンや十分な量の粘液様間質を示さず、細かい成熟したコラーゲン線維が複数の層にわたってすべての反応性線維領域にわたって分布している場合、**mature** と分類された。**intermediate** は、ケロイド様コラーゲンが成熟した間質内に散在し、通常は成熟コラーゲン線維に平行に配列されている場合に分類された。最後に、**Immature** は、線維性間質内に粘液様変化が見られ、粘液様間質の量は 40 倍対物レンズで観察された顕微鏡視野を使用して判断され (図 10) 、最終判定については図 11 のフローチャートに従って行った。DR の評価は、1 名の外科医、1 名の病理医によって、HE 染色スライドを用いて行なった。評価者は臨床データおよび切除標本の最終病理結果を盲検化された状態で評価を行った。

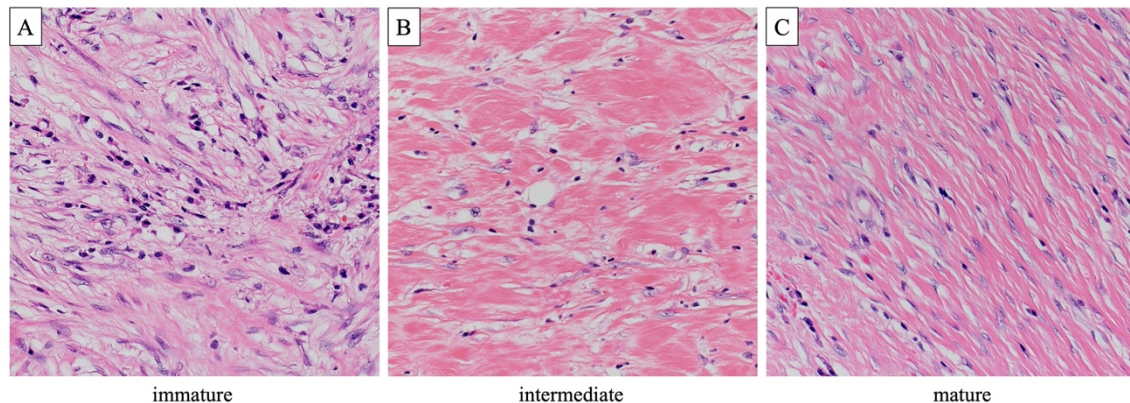


図 10. 直腸癌切除標本における DR 分類

(A) **Immature** : 線維性間質は、組織化されたコラーゲン線維がほとんどなく、主に粘液様間質が優勢である。間質は通常、緩くゼラチン状の外観を呈し、コラーゲンの沈着がまばらで、不規則に配置されている。

(B) **Intermediate** : 線維性間質には、成熟した間質のマトリックス内にケロイド様コラーゲンのコラーゲンが散在している。ケロイド様コラーゲンは、太く硝子化したコラーゲン線維として現れ、成熟コラーゲン線維に沿って平行に配置されることが多い。

(C) **Mature** : 線維性間質は、細かく成熟したコラーゲン線維で構成されており、すべての反応性線維領域にわたって複数の層に分かれている。ケロイド様コラーゲンや粘液様間質は存在しない。

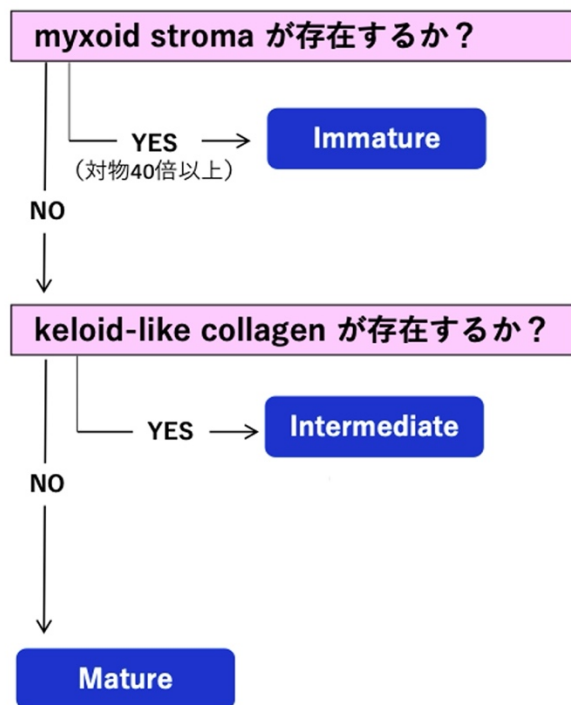


図.11 DR 分類フローチャート

(大腸癌研究会, 大腸癌における Desmoplastic reaction (DR) 分類 -病理アトラス-)
より引用

2) 壁内神経周囲浸潤の評価方法

壁内神経周囲 (Intramural perineural invasion ; PN) は、主に癌がアウエルバッハ神経叢の領域に沿って広がる場合と定義し、一方で壁外神経周囲浸潤は、筋層外に位置する神経束に沿って腫瘍細胞が浸潤または延長している場合と定義した (Ueno et al, 2013)。

3) CD8+ TIL の評価方法

生検検体における CD8+ TIL の測定方法は第一章と同様である。CRT 後の切除標本では、間質組織のみの領域内でリンパ球が最も豊富な 2~4 つの視野が評価され、1.0 平方ミリメートルの範囲で CD8+ TIL を評価した。(図 12)。これは、CRT 後に腫瘍性領域の境界を正確に識別することが難しいためである。病理学的完全奏効が得られた場合、残存腫瘍または線維化領域に隣接する間質組織の領域が腫瘍間質を表すと判断した。この評価に基づき、CD8+ TIL の平均密度 (細胞/mm²) を計算した。CD8+ TIL は中央値で高密度群と低密度群に分類した。

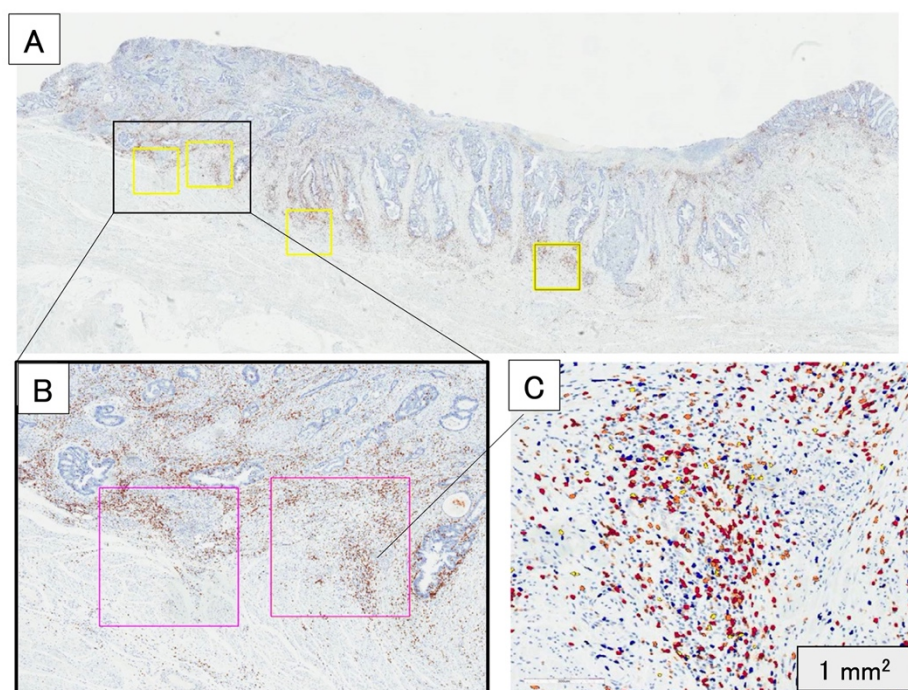


図 12. 切除検体における CD8+ TIL 密度の評価方法

腫瘍浸潤縁において CD8+ TIL が最も豊富な領域を選択し分析が行われた(A)。
囲まれた領域の拡大図 (B, C)。

4)TRG の評価方法

TRG の評価は第一章と同様である。切除検体を用いて Dvorak tumor regression grade に従って評価した(Dworak et al, 1997) 。TRG 4(完全な腫瘍退縮。腫瘍細胞が全く認められず、治療による完全な奏効を示している。) および TRG 3(大部分が線維化に置き換わり、わずかな腫瘍細胞しか残っていない。) と分類された患者は「good responders」とされ、一方で TRG 2(腫瘍細胞と線維化が同程度見られる。) および TRG 1(腫瘍の退縮は少なく、ほとんどが腫瘍細胞で構成されている。) と分類された患者は「poor responders」と分類した。

3.統計解析

カテゴリ変数の解析にはカイ二乗 (χ^2) 検定を使用し、連続変数の評価には Kruskal-Wallis 検定を用いた。定量データは中央値および四分位範囲 (IQR) として表した。生存曲線の作成には Kaplan-Meier 法を用い、比較にはログランク検定を適用した。全生存期間 (OS) は手術日からあらゆる原因による死亡までの期間、無再発生存期間 (RFS) は手術日から再発の検出までの期間として定義した。RFS および OS との関連性を検討するため、Cox 比例ハザード回帰モデルを使用し、単変量解析で p 値が 0.20 未満を示した変数を多変量解析に含めた。統計的有意性の判定には、両側 p 値 0.05 未満の閾値を採用した。統計解析は、R ソフトウェアバージョン 4.1.0 (Foundation for Statistical Computing, ウィーン、オーストリア) および R のグラフィカルインターフェースである EZR (自治医科大学埼玉医療センター、埼玉、日本) を使用して行った(Kanda, 2013)。

結果

1.DR 分類に基づく臨床病理学的特徴

DR は、255 名の患者の術前 CRT 後の切除標本に基づいて、mature (69.0%)、intermediate (5.5%)、immature (25.5%) に分類された。DR 分類に基づく詳細な臨床的患者背景は表 6 に示す。CEA の値は、グループ間で有意に異なり、mature DR で他のグループよりも顕著に低かった ($p = 0.001$)。

表 6 切除標本における DR に基づく臨床的患者背景

項目	mature (n=176)	intermediate (n=14)	immature (n=65)	P 値
性別				0.48
男性	116 (65.9%)	10 (71.4%)	48 (73.8%)	
女性	60 (34.1%)	4 (28.6%)	17 (26.2%)	
年齢 (年) (IQR)	61 (53- 67)	58.5 (51-61)	61 (54-66)	0.49
肛門縁から腫瘍までの距離(mm)	40 (30-50)	45 (25-57.5)	40 (30-60)	1.00
CRT 前 CEA (ng/mL) (IQR)	3.2 (1.9-5.6)	5.6 (4.2-10.7)	4.9 (2.7-12.8)	0.001
CRT 前 CA19-9 (ng/mL) (IQR)	7.0 (3.8-17.0)	12.7 (3.8-78.8)	10.0 (4.1-19.8)	0.33
CRT 前 腫瘍内 CD8+ TIL 密度 (/mm ²) (IQR)	75.7 (34.5-169.5)	80.0 (54.0-115.5)	62.8 (30.1-119.0)	0.19
臨床的深達度				0.11
cT3	165 (93.8%)	11 (78.6%)	59 (90.8%)	
cT4	11 (6.2%)	3 (21.4%)	6 (9.2%)	
臨床的リンパ節転移陽性	104 (59.1%)	12 (85.7%)	42 (64.6%)	0.13
CRT から手術までの期間 (日)				0.17
≤56	154 (87.5%)	12 (85.7%)	52 (80.0%)	
>56	22 (12.5%)	2 (14.3%)	13 (20.0%)	
放射線量 (Gy)				0.54
45	111 (63.1%)	9 (64.3%)	36 (55.4%)	
50.4	65 (36.9%)	5 (35.7%)	29 (44.6%)	
手術				0.25
肛門温存	130 (73.9%)	8 (57.1%)	43 (66.2%)	
肛門非温存	46 (26.1%)	6 (42.9%)	22 (33.8%)	

切除標本における DR に基づく術後の病理学的所見を表 7 に示す。ypT ($p < 0.0001$)、ypN ($p = 0.0009$)、およびリンパ管浸潤の有無 ($p < 0.0001$) において、DR 分類間で有意な差が認められた。具体的には、mature 群の患者の 22.7% が ypT0 を示したのに対し、intermediate 群では該当者がなく、immature 群では 1.5% にとどまった。また、ypN0 の割合も mature 群 (73.9%) が intermediate 群 (21.4%) や immature 群 (63.1%) よりも有意に高かった。リンパ管浸潤の割合も mature 群 (40.3%) で他の 2 つのグループ

(intermediate 85.7%、immature 80.0%) より有意に低かった。同様に、PN の割合も mature 群 (25.6%) で他の 2 つのグループ (intermediate 85.7%、immature 50.0%) より有意に低かった。切除標本における CD8+ TIL 密度に関しては、DR カテゴリー間で有意差がなく ($p = 0.75$)、CD8+ TIL は DR の状態と相関していないことが示された。対照的に、TRG は DR の状態と有意に相関しており、mature 群では good responder の割合が有意に高く (34.1%)、intermediate (0%) および immature (4.6%) グループと比べて高かった ($p < 0.0001$)。術後化学療法を受けた患者の割合もグループ間で有意に異なり、mature 群で最も低く (38.6%)、intermediate 群で最も高かった (85.7%、 $p = 0.0007$)。

表 7 切除標本における DR に基づく病理学的患者背景

項目	mature (n=176)	intermediate (n=14)	immature (n=65)	P 値
病理学的深達度分類				<0.001
ypT0	40 (22.7%)	0 (0.0%)	1 (1.5%)	
ypT1	13 (7.4%)	0 (0.0%)	2 (3.1%)	
ypT2	63 (35.8%)	0 (0.0%)	14 (21.5%)	
ypT3	59 (33.5%)	12 (85.7%)	44 (67.7%)	
ypT4	1 (0.6%)	2 (14.3%)	4 (6.2%)	
病理学的リンパ節転移分類				<0.001
ypN0	130 (73.9%)	3 (21.4%)	41 (63.1%)	
ypN1	32 (18.2%)	9 (64.3%)	17 (26.2%)	
ypN2	14 (8.0%)	2 (14.3%)	7 (10.8%)	
組織型				0.12
高分化もしくは中分化	169 (96.0%)	12 (85.7%)	59 (90.8%)	
その他	7 (4.0%)	2 (14.3%)	6 (9.2%)	
脈管侵襲				<0.001

陽性	71 (40.3%)	12 (85.7%)	52 (80.0%)	
陰性	105 (59.7%)	2 (14.3%)	13 (20.0%)	
神経周囲浸潤				<0.001
壁内神経浸潤陽性	9 (5.1%)	8 (57.1%)	24 (36.9%)	
壁外神経浸潤陽性	36 (20.5%)	4 (28.6%)	15 (23.1%)	
陰性	127 (72.2%)	2 (14.3%)	24 (36.9%)	
不明	4 (2.3%)	0 (0.0%)	2 (3.1%)	
Tumor regression grade (腫瘍縮小グレード)				<0.001
TRG1/2	116 (65.9%)	14 (100.0%)	62 (95.4%)	
TRG3/4	60 (34.1%)	0 (0.0%)	3 (4.6%)	
切除検体内 CD8+TIL 密度 (/mm ²) (range)	485.7 (28.5-1689.1)	377.6 (163.8-1554.1)	478.7 (55.3-2378.7)	0.75
術後補助化学療法				<0.001
あり	68 (38.6%)	12 (85.7%)	30 (46.2%)	
なし	108 (61.4%)	1 (7.1%)	35 (53.8%)	
不明	0 (0.0%)	1 (7.1%)	0 (0.0%)	

2. DR 分類に基づく長期生存率

図 2 は、DR 分類ごとに層別化された RFS および OS 曲線を示している。生存者コホートの中央値追跡期間は 72 ヶ月 (IQR 62-84 ヶ月) であった。mature DR 群は、5 年間の RFS 率が 85.4%と優れていた。これに対し、intermediate 群は 45.1%、immature 群は 65.8%であった。mature DR 群は 5 年間の OS 率が最も高く 93.0%であり、intermediate 群と immature 群はそれぞれ 76.2%と 88.8%でやや低かった。

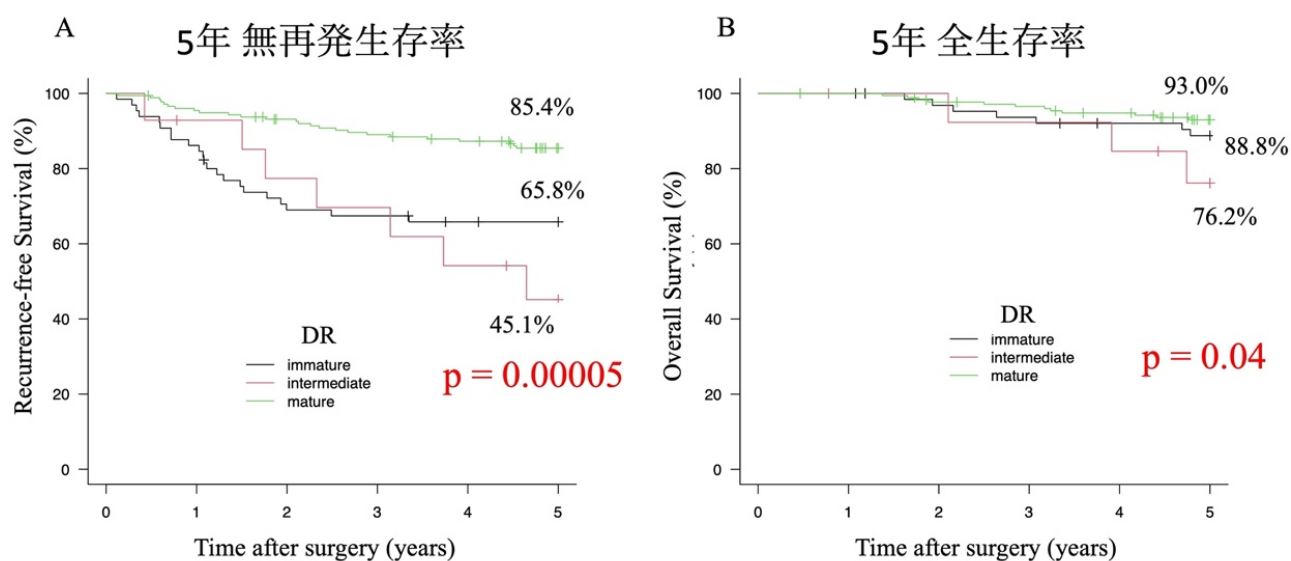


図 13. DR 分類に基づく無再発生存率 (A) および全生存率 (B) に関する Kaplan-Meier 生存曲線解析

RFS および OS の単変量および多変量解析の結果は表 8, 9 に示した。DR と TRG には強い相関が見られ、TRG 3/4 の症例の大部分が mature DR に分類された (95.2%)。この強い相関に伴う統計学的な交絡を避けるため、表 8 および表 9 の多変量解析からは TRG を除外した。

RFS に関する単変量および多変量解析の結果を表 8 に示す。解析の結果、ypT および ypN は RFS に有意に関連しており、進行した ypT および ypN は予後不良と関連していた。しかし、多変量解析においては、ypT は RFS との有意な関連を示さなかった (HR: 1.67; 95% CI: 0.77-3.65; $p = 0.19$)。一方、ypN は多変量解析において RFS と有意な関連を示し (HR: 3.66; 95% CI: 1.95-6.90; $p < 0.0001$)、さらに神経周囲浸潤も RFS に有意な関連を示していた (HR: 2.02; 95% CI: 1.01-4.05; $p = 0.047$)。リンパ管浸潤は単変量解析において RFS と有意に関連していた ($p = 0.0003$) が、多変量解析では有意な関連は認められなかった ($p = 0.62$)。また、intermediate/immature DR グループは単変量解析において RFS の悪化と関連していたが、多変量解析ではこの関連は RFS にのみ認められた (HR: 1.96; 95% CI: 1.07-3.59; $p = 0.03$)。切除標本における CD8+ TIL 密度は RFS と有意な関連を示さなかった。

表 8. 無再発生存率 (RFS) に関する単変量、多変量解析

項目	N	単変量解析 ハザード比 (95% CI)	P 値	多変量解析 ハザード比 (95% CI)	P 値
年齢 (年)			0.23		
≤60	126	1			
>60	129	1.39 (0.81-2.37)			
性別			0.62		
男性	174	1			
女性	81	0.86 (0.48-1.55)			
肛門縁から腫瘍までの距離 (mm)			0.04		0.02
>50	189	1		1	
≤50	66	2.20 (1.04-4.66)		2.55(1.16-5.58)	
CRT 前 CEA (ng/mL)			0.05		0.10
≤5	167	1		1	
>5	88	1.70 (1.00-2.88)		1.61 (0.92-2.81)	
放射線量 (Gy)			0.42		
45	156	1			

50.4	99	1.04 (0.94-1.15)		
CRT から手術までの期間(days)			0.08	0.50
≤56	218	1	1	
>56	37	1.76 (0.93-3.34)	1.28 (0.63-2.58)	
術後補助化学療法			0.31	
あり	110	1		
なし	144	0.76 (0.45-1.29)		
病理学的深達度分類			0.000001	0.19
T0/1/2	133	1	1	
T3/4	122	4.88 (2.57-9.27)	1.67 (0.77-3.65)	
病理学的リンパ節転移			0.00000001	0.00006
なし	174	1	1	
あり	81	4.99 (2.88-8.66)	3.66 (1.95-6.90)	
組織型			0.01	0.23
高分化もしくは中分化腺癌	240	1	1	
その他	15	2.78 (1.25-6.14)	1.69 (0.72-3.97)	
脈管侵襲			0.0003	0.62
なし	120	1	1	
あり	135	3.11 (1.69-5.71)	0.83 (0.39-1.74)	
神経周囲浸潤			0.0000002	0.047
なし	153	1	1	
あり	96	4.79 (2.67-8.59)	2.02 (1.01-4.05)	
切除検体内 CD8+ TIL 密度			0.24	
高	125	1		
低	128	1.38 (0.81-2.36)		
DR 分類			0.00005	0.03
mature	176	1	1	
immature/intermediate	79	2.98 (1.76-5.07)	1.96 (1.07-3.59)	

OS に関しては、単変量解析の結果、ypT および ypN が OS に有意に関連していた。しかし、多変量解析では、ypT は OS との有意な関連を示さなかった (HR: 1.53; 95% CI: 0.58-4.04; $p = 0.39$)。一方、ypN は OS と有意に関連しており (HR: 2.89; 95% CI: 1.24-6.72; $p = 0.01$)、神経周囲浸潤は OS に有意な関連を示さなかった ($p = 0.50$)。また、intermediate/immature DR は単変量解析で OS の悪化と関連していたが、多変量解析では OS との有意な関連は認められなかった (HR: 1.27; 95% CI: 0.60-2.68; $p = 0.54$)。切除標本における CD8+TIL 密度は OS とも有意な関連を示さなかった。

表 9 全再発生存率 (OS) に関する単変量、多変量解析

項目	N	単変量解析 ハザード比 (95% CI)	P 値	多変量解析 ハザード比 (95% CI)	P 値
年齢 (年)			0.05		0.24
≤60	126	1		1	
>60	129	2.03 (0.99-4.17)		1.57 (0.74-3.30)	
性別			0.67		
男性	174	1			
女性	81	1.16 (0.58-2.34)			
肛門縁から腫瘍までの距離 (mm)			0.26		
>50	189	1			
≤50	66	1.66 (0.69-4.00)			
CRT 前 CEA (ng/mL)			0.11		0.35
≤5	167	1		1	
>5	88	1.73 (0.89-3.37)		1.38 (0.70-2.75)	
放射線量 (Gy)			0.83		
45	156	1			
50.4	99	0.99 (0.87-1.12)			
CRT から手術までの期間(days)			0.80		
≤56	218	1			
>56	37	1.12 (0.46-2.73)			
術後補助化学療法			0.46		
あり	110	1			
なし	144	0.78 (0.40-1.52)			
病理学的深達度分類			0.0007		0.39
T0/1/2	133	1		1	

T3/4	122	3.92 (1.78-8.63)	1.53 (0.58-4.04)	
病理学的リンパ節転移			0.00001	0.01
なし	174	1	1	
あり	81	4.92 (2.40-10.07)	2.89 (1.24-6.72)	
組織型			0.046	0.11
高分化もしくは中分化腺癌	240	1	1	
その他	15	2.68 (1.02-7.05)	2.23 (0.84-5.91)	
脈管侵襲			0.004	0.59
なし	120	1	1	
あり	135	3.16 (1.44-6.97)	1.31 (0.49-3.50)	
神経周囲浸潤			0.001	0.50
なし	153	1	1	
あり	96	3.21 (1.59-6.45)	1.35 (0.57-3.16)	
切除検体内 CD8+ TIL 密度			0.52	
高	125	1		
低	128	1.24 (0.64-2.43)		
DR 分類			0.01	0.54
mature	176	1	1	
immature/intermediate	79	2.30 (1.18-4.49)	1.27 (0.60-2.68)	

good responder と mature DR の強い相関を考慮し、特に poor responder (TRG 1/2)に限定して、DR が予後と関連するかを検討した (表 10、11)。

RFS に関連する TRG1/2 患者の背景および手術後の因子に関する単変量および多変量解析について表 10 に示す。多変量解析の結果、intermediate/immature DR は RFS の悪化と有意に関連していることが示された (HR: 2.06, 95%CI: 1.08-3.90, $p = 0.03$)。ただし、多変量解析では TRG と RFS との有意な関連は示されなかった (HR: 0.82, 95%CI: 0.42-1.63, $p = 0.58$)。肛門縁からの腫瘍距離 (≤ 50 mm, HR: 2.40; 95%CI: 1.03-5.58; $p = 0.04$) および PN (HR: 2.37; 95%CI: 1.09-5.14; $p = 0.03$) も RFS と有意に関連していた。

表 10 RFS に関連する TRG1/2 患者の背景および手術後の因子に関する単変量および多変量解析

項目	N	単変量解析 ハザード比 (95% CI)	P 値	多変量解析 ハザード比 (95% CI)	P 値
年齢 (年)			0.24		
≤ 60	99	1			
> 60	93	1.41 (0.79-2.49)			
性別			0.27		
男性	136	1			
女性	56	0.68 (0.35-1.34)			
肛門縁から腫瘍までの距離 (mm)			0.03		0.04
> 50	140	1		1	
≤ 50	52	2.40 (1.07-5.34)		2.40 (1.03-5.58)	
CRT 前 CEA (ng/mL)			0.07		0.17
≤ 5	124	1		1	
> 5	68	1.69 (0.96-2.98)		1.54 (0.83-2.86)	
放射線量 (Gy)			0.44		
45	125	1			
50.4	67	1.04 (0.94-1.16)			
CRT から手術までの期間(days)			0.12		0.81
≤ 56	164	1		1	
> 56	28	1.73 (0.86-3.47)		1.10 (0.50-2.41)	
術後補助化学療法			0.56		
あり	97	1			
なし	94	0.85 (0.48-1.49)			

病理学的深達度分類			0.0005	0.77
T0/1/2	78	1	1	
T3/4	144	3.63 (1.76-7.50)	1.14 (0.48-2.68)	
病理学的リンパ節転移			0.000008	0.0006
なし	116	1	1	
あり	76	3.94 (2.16-7.18)	3.23 (1.65-6.29)	
組織型			0.11	0.62
高分化もしくは中分化腺癌	181	1	1	
その他	11	2.11 (0.84-5.34)	1.29 (0.47-3.54)	
脈管侵襲			0.002	0.68
なし	62	1	1	
あり	130	3.46 (1.55-7.73)	1.21 (0.49-3.00)	
神経周囲浸潤			0.00002	0.03
なし	94	1	1	
あり	94	4.67 (2.32-9.39)	2.37 (1.09-5.14)	
Tumor regression grade (腫瘍縮小グレード)			0.01	0.58
TRG1	106	1	1	
TRG2	86	0.45 (0.24-0.84)	0.82 (0.42-1.63)	
切除検体内 CD8+ TIL 密度			0.09	0.29
高	97	1	1	
低	93	1.65 (0.92-2.94)	1.41 (0.75-2.64)	
DR 分類			0.002	0.03
mature	116	1	1	
immature/intermediate	76	2.54 (1.43-4.50)	2.06 (1.08-3.90)	

OS に関連する TRG1/2 患者の背景および手術後の因子に関する単変量および多変量解析について表 11 に示す。ypN+のみが OS の悪化と関連していた (HR: 2.42, 95%CI: 1.00-5.89, p = 0.049)。

表 11 RFS に関連する TRG1/2 患者の背景および手術後の因子に関する単変量および多変量解析

項目	N	単変量解析 ハザード比 (95% CI)	P 値	多変量解析 ハザード比 (95% CI)	P 値
年齢 (年)			0.05		0.18
≤60	99	1		1	
>60	93	2.12 (0.99-4.53)		1.74 (0.78-3.89)	
性別			0.57		
男性	136	1			
女性	56	1.25 (0.58-2.67)			
肛門縁から腫瘍までの距離 (mm)			0.18		0.15
>50	140	1		1	
≤50	52	1.94 (0.74-5.07)		2.10 (0.77-5.70)	
CRT 前 CEA (ng/mL)			0.09		0.27
≤5	124	1		1	
>5	68	1.87 (0.91-3.82)		1.52 (0.72-3.18)	
放射線量 (Gy)			0.94		
45	125	1			
50.4	67	1.01 (0.87-1.16)			
CRT から手術までの期間(days)			0.61		
≤56	164	1			
>56	28	1.27 (0.51-3.99)			
術後補助化学療法			0.54		
あり	97	1			
なし	94	0.80 (0.39-1.64)			
病理学的深達度分類			0.02		0.52
T0/1/2	78	1		1	
T3/4	144	3.03 (1.24-7.42)		1.40 (0.50-3.95)	
病理学的リンパ節転移			0.001		0.049
なし	116	1		1	
あり	76	3.72 (1.70-8.16)		2.42 (1.00-5.89)	

組織型			0.048		0.25
高分化もしくは中分化腺癌	181	1		1	
その他	11	2.91 (1.01-8.36)		1.91 (0.64-5.72)	
脈管侵襲			0.06		0.71
なし	62	1		1	
あり	130	2.51 (0.96-6.57)		1.23 (0.41-3.68)	
神経周囲浸潤			0.03		0.67
なし	94	1		1	
あり	94	2.42 (1.11-5.29)		1.22 (0.50-2.98)	
Tumor regression grade (腫瘍縮小グレード)			0.40		
TRG1	106	1			
TRG2	86	0.72 (0.34-1.52)			
切除検体内 CD8+ TIL 密度			0.46		
高	97	1			
低	93	1.30 (0.64-2.64)			
DR 分類			0.06		0.25
mature	116	1		1	
immature/intermediate	76	2.00 (0.97-4.13)		1.60 (0.71-3.61)	

3. DR 分類に基づく術後補助化学療法の効果

図 14 は、DR 分類ごとに層別化した術後補助化学療法の効果を示している。mature DR 群 (N=176) では、5 年間の RFS 率は補助化学療法の有無によって影響を受けず (あり vs. なし、86.4% vs. 84.8%; $p = 0.64$)、有意差は認められなかった。対照的に、intermediate/immature DR 群 (N=79) では、補助化学療法を受けた患者は、受けなかった患者と比較して 5 年間の RFS 率が低い傾向を示した (55.9% vs. 69.4%; $p = 0.27$)。ただし、この差はサンプルサイズが小さいことが原因で有意差には至らなかった可能性がある。

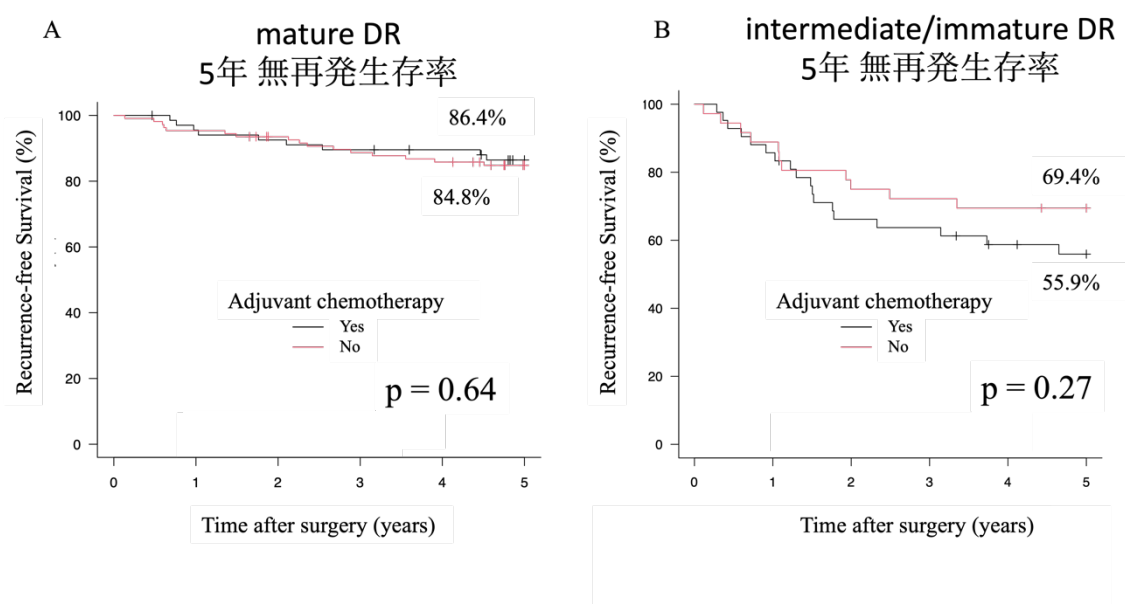


図 14. mature DR (A) および intermediate/immature DR (B) における補助化学療法に応じた無再発生存率 (RFS) の Kaplan-Meier 生存曲線解析

考察

本研究では、進行直腸癌患者の術前 CRT 後の切除標本において、RFS と DR 分類に有意な関連があることを明らかにした。この結果は、腫瘍周囲の微小環境が癌の進行や治療効果において重要な役割を果たしていることを示唆している。特に、DR によって示される線維性反応が、患者の予後において重要な指標となる可能性が示された。

Ueno らの研究(Ueno et al, 2015a)では、短期間の CRT を受けた直腸癌患者 101 名を分析し、術前 CRT 後の切除標本の 46.5%で mature DR が確認された。我々の知る限り、進行直腸癌患者における術前 CRT 後の DR の臨床的影響を調査したのは、我々の研究が 2 例目である。本研究では、69%の症例が mature DR と評価され、Ueno らの研究と比較して高い割合であった。この差異は、Ueno らの研究で用いられた 20 Gy に比べて、本研究で使用された放射線量が高いことに起因する可能性がある。また、本研究では CRT と手術の間隔がより長く (中央値 47 日 vs. 30 日)、これも寄与因子となり得る。放射線照射と手術の間隔が長いほど、pCR 率が高くなることが知られており(Petrelli et al, 2016; Wolthuis et al, 2012)、実際に本研究の ypT0 率 (16.1%) は前研究の 3.0%よりも高かった。注目すべきは、両研究において ypT0 症例の mature DR の割合が非常に高かったことであり (本研究 98%、Ueno ら 100%)、腫瘍縁での mature な線維性反応が CRT への良好な反応と関連していることを示唆している。ただし、mature DR が CRT 前に存在していたのか、それとも CRT への良好な反応の結果として形成されたのかは不明である。両研究の間で 5 年間の DFS 率は類似していたが(Ueno et al, 2015a)、前述のとおり放射線量と手術前の待機期間に違いがあったため、本研究は、現在の CRT で用いられている標準的な放射線量と待機期間下での DR の臨床的影響を検討した初めての研究であると考えられる。

mature DR は成熟した線維化であり、癌細胞の移動を制限する物理的な障壁を形成することがある(Hewitt et al, 1993)。このような現象は CRT によって引き起こされ、上皮間葉転換 (EMT) を抑制し、転移の可能性を低減する可能性がある。Ueno らによると、直腸癌における mature DR は、CRT の有無にかかわらず、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) が豊富に存在することが特徴であり、TIL が少ない場合は immature DR を示す傾向がある(Ueno et al, 2002a; Ueno et al, 2004; Ueno et al, 2015a)。しかし、本研究では、DR カテゴリーと切除標本における CD8+ TIL との関連は確認されなかった。この差異の一因として、TIL 密度および DR を評価した特定の領域の違いが考えられる。また、本研究では CRT と手術の間隔が Ueno らの研究よりも長かったことが、特に pCR を達成した患者において腫瘍抗原の喪失により CD8+ TIL 密度が減少した可能性がある。術前

CRT を受けた直腸癌患者において、DR 分類と局所免疫状態との関係を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

局所進行直腸癌患者において、術前 CRT に対する反応が不良である場合、DFS および OS の低下と関連していることが知られている(Fokas et al, 2014; Karagkounis et al, 2019; Song et al, 2018)。しかし、poor responder に限定した予後因子に関する報告は少ない。本研究では、TRG1/2 と分類された患者 (poor responder) において、DR が独立した予後因子であることが確認された。この結果は、CRT に対する反応が限定的であっても、腫瘍を取り囲む線維性環境の質が重要な予後的価値を持つことを示唆している。TRG1/2 の分類は CRT に対する限られた反応を示しているが、DR のタイプは、TRG では捉えきれない腫瘍の特異な生物学的挙動を示している可能性がある。切除標本における高い CD8+ TIL 密度は、poor responder において単変量解析で RFS の改善傾向を示した ($p = 0.09$)。これは、CRT 後の高 CD8+ TIL 密度が再発の減少と関連していることを示す先行研究と一致している(Chen et al, 2020; Hong et al, 2022)。ただし、CD8+ TIL 密度は多変量解析では統計的有意性に達しなかった。いくつかの研究で、PN (神経周囲浸潤) が CRT を受けた直腸癌の不良予後因子であると報告されており(Kim et al, 2019; Song et al, 2019)、本研究の結果もこれらの先行研究と一致している。重要なことに、本研究は、DR が PN とは別の独立した不良予後因子であることも示している。

先行研究では、進行直腸癌患者において術前 CRT 後の術後補助化学療法が DFS の改善に寄与しないことが示されている (Breugnot et al, 2015)。本研究では、intermediate/immature DR の患者において、術後補助化学療法を受けた場合の RFS 率が、補助化学療法を受けなかった患者よりも劣っており、CRT 後に intermediate/immature DR に分類される患者には補助療法が無効である可能性を示唆している。intermediate/immature DR の存在は、CRT 後の腫瘍の悪性度の高い生物学的挙動や、放射線または全身性の細胞毒性化学療法に対する耐性を示している可能性がある。本研究の結果は、補助化学療法の恩恵を受けるのは good responder のみであることを示す先行研究と一致している(Cai et al, 2024; Collette et al, 2007)。近年の総術前療法の発展に伴い、従来の CRT 後に基づいて補助化学療法を選択する必要性は減少しているが、術後 CRT 腫瘍微小環境の分子レベルでの詳細な理解は、poor responder に対する新しい治療標的の特定につながる可能性がある。

本研究は後ろ向き研究であり、手術標本からの組織学的評価に焦点を当てていることからいくつかの制約がある。DR の評価は主観的な要素を含むため、観察者間で解釈にばらつきが生じ、分類の一貫性に影響を及ぼす可能性がある。さらに、我々の知見は単一のコホートに基づいており、その一般的適用性

を確保するためには多様な患者集団での検証が必要である。3つのDR分類間で補助化学療法が割合が有意に異なることは、長期成績の結果の解釈における潜在的なバイアスとなる。また、TNTを受けた患者は評価されておらず、Buddingなどの他の術後CRT因子(Trotsky et al, 2019)も評価されていない。

全体の結論

1. 本研究から得られた新知見

➤ 第一章

- ・進行直腸癌の生検検体における ITB と CD8 陽性 TIL はそれぞれ独立して術前 CRT の効果に相関した。
- ・ITB は単変量では無再発生存率と相関したが、CD8 陽性 TIL を含む多変量解析では有意差は認めなかった。
- ・生検標本における ITB の存在は、転写解析による EMT 経路遺伝子の増加と関連しなかった。

➤ 第二章

- ・標準的な術前 CRT を施行した、進行直腸癌の切除検体において無再発生存率と DR 分類の間に有意な相関がみられた。
- ・特に、poor responder において、DR カテゴリーは TRG よりも強く予後に相関した。
- ・intermediate/immature DR の患者においては、術後補助化学療法を受けた群での無再発生存率が、補助化学療法を受けなかった群よりも低い結果となった。

2. 新知見の意義

進行直腸癌の CRT における効果予測および予後に関して、本研究の第一章では生検検体における ITB、第二章では切除検体における DR の重要性を明らかにした。これらの因子は、いずれも免疫染色を必要とせず、標準的な HE 染色で容易に確認できるため、特別な設備や高コストな手法を用いることなく、日常診療に導入しやすい点が特徴であり、進行直腸癌患者における CRT の効果予測や予後判定において、個別化治療を導く新たな指標となり得る。

3. 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されるか

本研究で得られた予後予測因子を活用することで、進行直腸癌に対する個別化治療が実現すれば、それに関連する新たな治療薬の開発研究への道が開かれる可能性がある。これにより、患者の予後をさらに改善・延長できる展望が広がると期待される。再発高リスク患者においては、血液バイオマーカーや先進的な画像診断法の改良による精密なモニタリングツールの開発が期待される。これにより、早期の再発検出と適切な治療介入が可能となり、予後改善に寄与するであろう。また、フォローアップ方法や頻度の最適化に関する検討も進展することが見込まれる。

4. 今後の課題

今回の研究で見出された ITB や DR の予後予測因子としての意義をより確実なものとするため、大規模かつ多施設での前向き研究が求められる。また、ITB や DR の標準的な評価方法や測定プロトコルの確立は、臨床現場での応用を可能にし、再現性を高めるためにも不可欠である。加えて、腫瘍微小環境における他の要素、特に腫瘍浸潤リンパ球や他の免疫細胞との相互作用に関する理解を深めることが、CRT に対する反応をより正確に予測し、個別化治療戦略を最適化するために重要であると考ええる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂き、御指導・御鞭撻を賜りました北海道大学院医学研究院外科系部門外科学分野消化器外科学教室Ⅰ教授である武富紹信先生に深謝申し上げます。また、研究全般に関して直接ご指導を賜りました公益財団法人がん研究会有明病院大腸外科部長の秋吉高志先生、同病理部部長河内洋先生に心より感謝の意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり様々な点で御協力頂きました北海道大学大学院医学研究院外科系部門外科学分野消化器外科学教室Ⅰの皆様、がん研有明病院大腸外科・病理部の皆様、直腸癌切除検体を御提供頂きました患者様、その他の多くの方々にこの場をお借りして心から厚く御礼を申し上げます。

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費助成事業（課題番号 20K09022、Y.F. および 22K08881、T.A.）、および日本医療研究開発機構（課題番号 22ck0106784h0001、T.A.）の助成を受けて実施されました。

利益相反

本研究において開示すべき利益相反はありません。

引用文献

Akiyoshi, T., N. Tanaka, K. Kiyotani, O. Gotoh, N. Yamamoto, K. Oba, Y. Fukunaga, M. Ueno and S. Mori (2019). Immunogenomic profiles associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with rectal cancer. *Br J Surg* 106, 1381-1392.

Akiyoshi, T., Z. Wang, T. Kaneyasu, O. Gotoh, N. Tanaka, S. Amino, N. Yamamoto, H. Kawachi, T. Mukai, Y. Hiyoshi, et al. (2023). Transcriptomic Analyses of Pretreatment Tumor Biopsy Samples, Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy, and Survival in Patients With Advanced Rectal Cancer. *JAMA Netw Open* 6, e2252140.

Basile, D., C. Broudin, J. F. Emile, A. Falcoz, F. Pagès, L. Mineur, J. Bennouna, C. Louvet, P. Artru, S. Fratte, et al. (2022). Tumor budding is an independent prognostic factor in stage III colon cancer patients: a post-hoc analysis of the IDEA-France phase III trial (PRODIGE-GERCOR). *Ann Oncol* 33, 628-637.

Benson, A. B., A. P. Venook, M. M. Al-Hawary, N. Azad, Y. J. Chen, K. K. Ciombor, S. Cohen, H. S. Cooper, D. Deming, I. Garrido-Laguna, et al. (2022). Rectal Cancer, Version 2.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 20, 1139-1167.

Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre and A. Jemal (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394-424.

Breen, R. E. and W. Garnjobst (1983). Surgical procedures for carcinoma of the rectum. A historical review. *Dis Colon Rectum* 26, 680-685.

Brenner, H., A. M. Bouvier, R. Foschi, M. Hackl, I. K. Larsen, V. Lemmens, L. Mangone and S. Francisci (2012). Progress in colorectal cancer survival in Europe from the late 1980s to the early 21st century: the EURO CARE study. *Int J Cancer* 131, 1649-1658.

Breugom, A. J., M. Swets, J. F. Bosset, L. Collette, A. Sainato, L. Cionini, R. Glynne-Jones, N. Counsell, E. Bastiaannet, C. B. van den Broek, et al. (2015). Adjuvant chemotherapy after preoperative (chemo)radiotherapy and surgery for patients with rectal cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 16, 200-207.

Cai, Y., M. Chen, F. Ye, Z. Liu, S. Luo, L. Huang and L. Kang (2024). The clinical relevance of adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer patients achieving near pathological complete response following neoadjuvant chemoradiotherapy: Insights from ypT stage. *Eur J Surg Oncol* 50, 108001.

Cedermark, B., M. Dahlberg, B. Glimelius, L. Pahlman, L. E. Rutqvist and N. Wilking (1997). Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 336, 980-987.

Chen, C. C., M. L. Wu, K. C. Huang, I. P. Huang and Y. L. Chung (2020). The Effects of Neoadjuvant Treatment on the Tumor Microenvironment in Rectal Cancer: Implications for Immune Activation and Therapy Response. *Clin Colorectal Cancer* 19, e164-e180.

Chen, W., L. Farchoukh, L. Seigh, D. J. Hartman and R. K. Pai (2021). Combined histopathological risk score using TP53 protein expression, CD8(+) T cell density and intratumoral budding is an independent predictor of neoadjuvant therapy response in rectal adenocarcinoma. *Histopathology* 79, 826-835.

Collette, L., J. F. Bosset, M. den Dulk, F. Nguyen, L. Mineur, P. Maingon, L. Radosevic-Jelic, M. Piérart and G. Calais (2007). Patients with curative resection of cT3-4 rectal cancer after preoperative radiotherapy or radiochemotherapy: does anybody benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy? A trial of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Radiation Oncology Group. *J Clin Oncol* 25, 4379-4386.

Das, P., J. M. Skibber, M. A. Rodriguez-Bigas, B. W. Feig, G. J. Chang, R. A. Wolff, C. Eng, S. Krishnan, N. A. Janjan and C. H. Crane (2007). Predictors of tumor response and downstaging in patients who receive preoperative chemoradiation for rectal cancer.

Cancer 109, 1750-1755.

De Craene, B. and G. Berx (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 13, 97-110.

De Smedt, L., S. Palmans, D. Andel, O. Govaere, B. Boeckx, D. Smeets, E. Galle, J. Wouters, D. Barras, M. Suffiotti, et al. (2017). Expression profiling of budding cells in colorectal cancer reveals an EMT-like phenotype and molecular subtype switching. *Br J Cancer* 116, 58-65.

Dixon, C. F. (1948). Anterior Resection for Malignant Lesions of the Upper Part of the Rectum and Lower Part of the Sigmoid. *Ann Surg* 128, 425-442.

Dworak, O., L. Keilholz and A. Hoffmann (1997). Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 12, 19-23.

El Sissy, C., A. Kirilovsky, M. Van den Eynde, A. M. Muşină, M. G. Anitei, A. Romero, F. Marliot, A. Junca, J. Doyen, B. Mlecnik, et al. (2020). A Diagnostic Biopsy-Adapted Immunoscore Predicts Response to Neoadjuvant Treatment and Selects Patients with Rectal Cancer Eligible for a Watch-and-Wait Strategy. *Clin Cancer Res* 26, 5198-5207.

Farchoukh, L., D. J. Hartman, C. Ma, J. Celebrezze, D. Medich, N. Bahary, M. Frank, L. Pantanowitz and R. K. Pai (2021). Intratumoral budding and automated CD8-positive T-cell density in pretreatment biopsies can predict response to neoadjuvant therapy in rectal adenocarcinoma. *Mod Pathol* 34, 171-183.

Fokas, E., T. Liersch, R. Fietkau, W. Hohenberger, T. Beissbarth, C. Hess, H. Becker, M. Ghadimi, K. Mrak, S. Merkel, et al. (2014). Tumor regression grading after preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal carcinoma revisited: updated results of the CAO/ARO/AIO-94 trial. *J Clin Oncol* 32, 1554-1562.

Fujiyoshi, K., J. P. Väyrynen, J. Borowsky, D. J. Papke, Jr., K. Arima, K. Haruki, J. Kishikawa, N. Akimoto, T. Ugai, M. C. Lau, et al. (2020). Tumour budding, poorly

differentiated clusters, and T-cell response in colorectal cancer. *EBioMedicine* 57, 102860.

González, I. A., P. S. Bauer, J. Liu and D. Chatterjee (2021). Intraepithelial tumour infiltrating lymphocytes are associated with absence of tumour budding and immature/myxoid desmoplastic reaction, and with better recurrence-free survival in stages I-III colorectal cancer. *Histopathology* 78, 252-264.

Habr-Gama, A., R. O. Perez, W. Nadalin, J. Sabbaga, U. Ribeiro, Jr., A. H. Silva e Sousa, Jr., F. G. Campos, D. R. Kiss and J. Gama-Rodrigues (2004). Operative versus nonoperative treatment for stage 0 distal rectal cancer following chemoradiation therapy: long-term results. *Ann Surg* 240, 711-717; discussion 717-718.

Hänzelmann, S., R. Castelo and J. Guinney (2013). GSEA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* 14, 7.

Heald, R. J., E. M. Husband and R. D. Ryall (1982). The mesorectum in rectal cancer surgery--the clue to pelvic recurrence? *Br J Surg* 69, 613-616.

Hewitt, R. E., D. G. Powe, G. I. Carter and D. R. Turner (1993). Desmoplasia and its relevance to colorectal tumour invasion. *Int J Cancer* 53, 62-69.

Hong, S. W., S. Lee, Y. J. Kim, S. Ahn, I. J. Park, S. M. Hong, S. W. Hwang, S. H. Park, D. H. Yang, B. D. Ye, et al. (2022). Immune profile by multiplexed immunohistochemistry associated with recurrence after chemoradiation in rectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 37, 542-550.

Huang, Y., X. Y. Lou, Y. X. Zhu, Y. C. Wang, L. Zhang, H. L. Liu, C. Wang, H. M. Zhan, Z. Q. Cheng, W. Y. Tan, et al. (2019). Local environment in biopsy better predict the pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer. *Biosci Rep* 39.

Kanda, Y. (2013). Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for

medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48, 452-458.

Kang, G., J. S. Pyo, N. Y. Kim and D. W. Kang (2022). Clinicopathological Significances and Prognostic Role of Intratumoral Budding in Colorectal Cancers. *J Clin Med* 11.

Kapiteijn, E., C. A. Marijnen, I. D. Nagtegaal, H. Putter, W. H. Steup, T. Wiggers, H. J. Rutten, L. Pahlman, B. Glimelius, J. H. van Krieken, et al. (2001). Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 345, 638-646.

Karagkounis, G., L. Thai, A. G. Mace, H. Wiland, R. K. Pai, S. R. Steele, J. M. Church and M. F. Kalady (2019). Prognostic Implications of Pathological Response to Neoadjuvant Chemoradiation in Pathologic Stage III Rectal Cancer. *Ann Surg* 269, 1117-1123.

Kim, C. H., S. S. Yeom, S. Y. Lee, H. R. Kim, Y. J. Kim, K. H. Lee and J. H. Lee (2019). Prognostic Impact of Perineural Invasion in Rectal Cancer After Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *World J Surg* 43, 260-272.

Kitagawa, Y., T. Akiyoshi, N. Yamamoto, T. Mukai, Y. Hiyoshi, T. Yamaguchi, T. Nagasaki, Y. Fukunaga, T. Hirota, T. Noda, et al. (2022). Tumor-Infiltrating PD-1+ Immune Cell Density is Associated with Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Rectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer* 21, e1-e11.

Lang-Schwarz, C., B. Melcher, F. Haumaier, K. Lang-Schwarz, T. Rupprecht, M. Vieth and W. Sterlacci (2018). Budding and tumor-infiltrating lymphocytes - combination of both parameters predicts survival in colorectal cancer and leads to new prognostic subgroups. *Hum Pathol* 79, 160-167.

Lee, H., D. Sha, N. R. Foster, Q. Shi, S. R. Alberts, T. C. Smyrk and F. A. Sinicrope (2020). Analysis of tumor microenvironmental features to refine prognosis by T, N risk group in patients with stage III colon cancer (NCCTG N0147) (Alliance). *Ann Oncol* 31, 487-494.

Liberzon, A., C. Birger, H. Thorvaldsdóttir, M. Ghandi, J. P. Mesirov and P. Tamayo (2015). The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst* 1, 417-425.

Lino-Silva, L. S., R. A. Salcedo-Hernández and A. Gamboa-Domínguez (2018). Tumour budding in rectal cancer. A comprehensive review. *Contemp Oncol (Pozn)* 22, 61-74.

Lugli, A., R. Kirsch, Y. Ajioka, F. Bosman, G. Cathomas, H. Dawson, H. El Zimaity, J. F. Fléjou, T. P. Hansen, A. Hartmann, et al. (2017). Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol* 30, 1299-1311.

Matsushita, H., M. D. Vesely, D. C. Koboldt, C. G. Rickert, R. Uppaluri, V. J. Magrini, C. D. Arthur, J. M. White, Y. S. Chen, L. K. Shea, et al. (2012). Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature* 482, 400-404.

Miles, W. E. (1971). A method of performing abdomino-perineal excision for carcinoma of the rectum and of the terminal portion of the pelvic colon (1908). *CA Cancer J Clin* 21, 361-364.

Morodomi, T., H. Isomoto, K. Shirouzu, K. Kakegawa, K. Irie and M. Morimatsu (1989). An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers. Lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer. *Cancer* 63, 539-543.

Ogura, A., T. Akiyoshi, N. Yamamoto, H. Kawachi, Y. Ishikawa, S. Mori, K. Oba, M. Nagino, Y. Fukunaga and M. Ueno (2018). Pattern of programmed cell death-ligand 1 expression and CD8-positive T-cell infiltration before and after chemoradiotherapy in rectal cancer. *Eur J Cancer* 91, 11-20.

Ono, C., K. Yoshinaga, M. Enomoto and K. Sugihara (2002). Discontinuous rectal cancer spread in the mesorectum and the optimal distal clearance margin in situ. *Dis Colon Rectum* 45, 744-749; discussion 742-743.

Orhan, A., F. Khesrawi, M. Tvilling Madsen, R. Peuliche Vogelsang, N. Dohrn, A. M. Kanstrup Fiehn and I. Gögenur (2022). Tumor-Infiltrating Lymphocytes as Biomarkers of Treatment Response and Long-Term Survival in Patients with Rectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)* 14.

Pagès, F., B. Mlecnik, F. Marliot, G. Bindea, F. S. Ou, C. Bifulco, A. Lugli, I. Zlobec, T. T. Rau, M. D. Berger, et al. (2018). International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet* 391, 2128-2139.

Park, I. J., Y. N. You, A. Agarwal, J. M. Skibber, M. A. Rodriguez-Bigas, C. Eng, B. W. Feig, P. Das, S. Krishnan, C. H. Crane, et al. (2012). Neoadjuvant treatment response as an early response indicator for patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 30, 1770-1776.

Park, J. S., J. W. Huh, Y. A. Park, Y. B. Cho, S. H. Yun, H. C. Kim, W. Y. Lee and H. K. Chun (2014). A circumferential resection margin of 1 mm is a negative prognostic factor in rectal cancer patients with and without neoadjuvant chemoradiotherapy. *Dis Colon Rectum* 57, 933-940.

Pavlič, A., E. Boštjančič, R. Kavalarič, B. Ilijevec, S. Bonin, F. Zanconati and N. Zidar (2022). Tumour budding and poorly differentiated clusters in colon cancer - different manifestations of partial epithelial-mesenchymal transition. *J Pathol* 258, 278-288.

Petrelli, F., G. Sgroi, E. Sarti and S. Barni (2016). Increasing the Interval Between Neoadjuvant Chemoradiotherapy and Surgery in Rectal Cancer: A Meta-analysis of Published Studies. *Ann Surg* 263, 458-464.

Rogers, A. C., D. Gibbons, A. M. Hanly, J. M. Hyland, P. R. O'Connell, D. C. Winter and K. Sheahan (2014). Prognostic significance of tumor budding in rectal cancer biopsies before neoadjuvant therapy. *Mod Pathol* 27, 156-162.

Rogers, A. C., D. C. Winter, A. Heeney, D. Gibbons, A. Lugli, G. Puppa and K. Sheahan (2016). Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. *Br J Cancer* 115, 831-840.

Shida, D., M. Inoue, T. Tanabe, K. Moritani, S. Tsukamoto, S. Yamauchi, K. Sugihara and Y. Kanemitsu (2020). Prognostic impact of primary tumor location in Stage III colorectal cancer-right-sided colon versus left-sided colon versus rectum: a nationwide multicenter retrospective study. *J Gastroenterol* 55, 958-968.

Slik, K., S. Blom, R. Turkki, K. Välimäki, S. Kurki, H. Mustonen, C. Haglund, O. Carpén, O. Kallioniemi, E. Korkeila, et al. (2019). Combined epithelial marker analysis of tumour budding in stage II colorectal cancer. *J Pathol Clin Res* 5, 63-78.

Song, C., J. H. Chung, S. B. Kang, D. W. Kim, H. K. Oh, H. S. Lee, J. W. Kim, K. W. Lee, J. H. Kim and J. S. Kim (2018). Impact of Tumor Regression Grade as a Major Prognostic Factor in Locally Advanced Rectal Cancer after Neoadjuvant Chemoradiotherapy: A Proposal for a Modified Staging System. *Cancers (Basel)* 10.

Song, J. H., M. Yu, K. M. Kang, J. H. Lee, S. H. Kim, T. K. Nam, J. U. Jeong, H. S. Jang, J. W. Lee and J. H. Jung (2019). Significance of perineural and lymphovascular invasion in locally advanced rectal cancer treated by preoperative chemoradiotherapy and radical surgery: Can perineural invasion be an indication of adjuvant chemotherapy? *Radiother Oncol* 133, 125-131.

Trinh, A., C. Ladrach, H. E. Dawson, S. Ten Hoorn, P. J. K. Kuppen, M. S. Reimers, M. Koopman, C. J. A. Punt, A. Lugli, L. Vermeulen, et al. (2018). Tumour budding is associated with the mesenchymal colon cancer subtype and RAS/RAF mutations: a study of 1320 colorectal cancers with Consensus Molecular Subgroup (CMS) data. *Br J Cancer* 119, 1244-1251.

Trotsyuk, I., H. Sparschuh, A. J. Müller, K. Neumann, M. Kruschewski, D. Horst and S. Elezskurtaj (2019). Tumor budding outperforms ypT and ypN classification in predicting outcome of rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy. *BMC Cancer* 19, 1033.

Ueno, H., A. Jones, J. R. Jass and I. C. Talbot (2002a). Clinicopathological significance of the 'keloid-like' collagen and myxoid stroma in advanced rectal cancer. *Histopathology* 40, 327-334.

Ueno, H., J. Murphy, J. R. Jass, H. Mochizuki and I. C. Talbot (2002b). Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology* 40, 127-132.

Ueno, H., A. M. Jones, K. H. Wilkinson, J. R. Jass and I. C. Talbot (2004). Histological categorisation of fibrotic cancer stroma in advanced rectal cancer. *Gut* 53, 581-586.

Ueno, H., K. Shirouzu, Y. Eishi, K. Yamada, T. Kusumi, R. Kushima, M. Ikegami, A. Murata, K. Okuno, T. Sato, et al. (2013). Characterization of perineural invasion as a component of colorectal cancer staging. *Am J Surg Pathol* 37, 1542-1549.

Ueno, H., E. Shinto, Y. Hashiguchi, H. Shimazaki, Y. Kajiwar, T. Sueyama, J. Yamamoto and K. Hase (2015a). In rectal cancer, the type of desmoplastic response after preoperative chemoradiotherapy is associated with prognosis. *Virchows Arch* 466, 655-663.

Ueno, H., E. Shinto, H. Shimazaki, Y. Kajiwar, T. Sueyama, J. Yamamoto and K. Hase (2015b). Histologic categorization of desmoplastic reaction: its relevance to the colorectal cancer microenvironment and prognosis. *Ann Surg Oncol* 22, 1504-1512.

Ueno, H., Y. Kanemitsu, S. Sekine, M. Ishiguro, E. Ito, Y. Hashiguchi, F. Kondo, H. Shimazaki, S. Mochizuki, Y. Kajiwar, et al. (2017). Desmoplastic Pattern at the Tumor Front Defines Poor-prognosis Subtypes of Colorectal Cancer. *Am J Surg Pathol* 41, 1506-1512.

Ueno, H., S. Sekine, T. Oshiro, Y. Kanemitsu, T. Hamaguchi, D. Shida, A. Takashima, M. Ishiguro, E. Ito, Y. Hashiguchi, et al. (2018). Disentangling the prognostic heterogeneity of stage III colorectal cancer through histologic stromal categorization. *Surgery* 163, 777-783.

Ueno, H., M. Ishiguro, E. Nakatani, T. Ishikawa, H. Uetake, C. Matsuda, Y. Nakamoto, M. Kotake, K. Kurachi, T. Egawa, et al. (2019a). Prospective Multicenter Study on the Prognostic and Predictive Impact of Tumor Budding in Stage II Colon Cancer: Results From the SACURA Trial. *J Clin Oncol* 37, 1886-1894.

Ueno, H., Y. Kanemitsu, S. Sekine, M. Ishiguro, E. Ito, Y. Hashiguchi, F. Kondo, H. Shimazaki, Y. Kajiwara, K. Okamoto, et al. (2019b). A Multicenter Study of the Prognostic Value of Desmoplastic Reaction Categorization in Stage II Colorectal Cancer. *Am J Surg Pathol* 43, 1015-1022.

Ueno, H., M. Ishiguro, E. Nakatani, T. Ishikawa, H. Uetake, K. Murotani, S. Matsui, S. Teramukai, T. Sugai, Y. Ajioka, et al. (2021a). Prognostic value of desmoplastic reaction characterisation in stage II colon cancer: prospective validation in a Phase 3 study (SACURA Trial). *Br J Cancer* 124, 1088-1097.

Ueno, H., Y. Kajiwara, Y. Ajioka, T. Sugai, S. Sekine, M. Ishiguro, A. Takashima and Y. Kanemitsu (2021b). Histopathological atlas of desmoplastic reaction characterization in colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 51, 1004-1012.

van Gijn, W., C. A. Marijnen, I. D. Nagtegaal, E. M. Kranenbarg, H. Putter, T. Wiggers, H. J. Rutten, L. Pålman, B. Glimelius and C. J. van de Velde (2011). Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *Lancet Oncol* 12, 575-582.

von Elm, E., D. G. Altman, M. Egger, S. J. Pocock, P. C. Gøtzsche and J. P. Vandenbroucke (2007). The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Ann Intern Med* 147, 573-577.

Wen, X., S. Y. Zee, K. R. Shroyer and J. Bandovic (2022). Intratumoral Budding and Tumor Microenvironment in Pretreatment Rectal Cancer Biopsies Predict the Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 30, 1-7.

Wolthuis, A. M., F. Penninckx, K. Haustermans, G. De Hertogh, S. Fieuws, E. Van Cutsem and A. D'Hoore (2012). Impact of interval between neoadjuvant chemoradiotherapy and TME for locally advanced rectal cancer on pathologic response and oncologic outcome. *Ann Surg Oncol* 19, 2833-2841.

Yamada, N., T. Sugai, M. Eizuka, K. Tsuchida, R. Sugimoto, Y. Mue, M. Suzuki, M. Osakabe, N. Uesugi, K. Ishida, et al. (2017). Tumor budding at the invasive front of colorectal cancer may not be associated with the epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol* 60, 151-159.

Yasuda, K., T. Nirei, E. Sunami, H. Nagawa and J. Kitayama (2011). 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* 6, 49.

Yim, K., W. M. Jang, U. Cho, S. Sun, Y. Chong and K. J. Seo (2022). Intratumoral Budding in Pretreatment Biopsies, among Tumor Microenvironmental Components, Can Predict Prognosis and Neoadjuvant Therapy Response in Colorectal Adenocarcinoma. *Medicina (Kaunas)* 58.

Zlobec, I., P. Minoo, L. Terracciano, K. Baker and A. Lugli (2011). Characterization of the immunological microenvironment of tumour buds and its impact on prognosis in mismatch repair-proficient and -deficient colorectal cancers. *Histopathology* 59, 482-495.

大腸癌研究会編 大腸癌治療ガイドライン 2022 年版 大腸癌研究会：東京：金原出版株式会社：2022

国立がん研究センターがん情報サービス「がん統計」
https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/data/dl/index.html. アクセス日：2024/9/20.

大腸癌研究会, 大腸癌における Desmoplastic reaction (DR) 分類 -病理アトラス-
https://www.jscrr.jp/pathology_info/pdf/pathology_03.pdf アクセス日：2024/11/05.