

令和元年5月21日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10532

研究課題名(和文) 直腸癌術前化学放射線療法による癌間質変化と治療抵抗性・再発機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation for recurrent mechanism in rectal cancer patients after CRT.

研究代表者

三枝 晋 (Saigusa, Susumu)

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：10632383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：直腸癌腫瘍組織中のPD-L1発現と臨床病理学的因子との関連では直腸癌組織におけるPD-L1高発現群は、有意に脈管浸潤と相関を認め、さらに術後再発が有意に高率であった。また予後解析では、直腸癌組織中のPD-L1高発現群は、有意にrelapse free survival、ならびにoverall survivalが不良であった。さらに直腸癌周囲の間質に存在するCD8陽性リンパ球数とFoxp3陽性リンパ球数は有意に正の相関を示し、間質浸潤のCD8陽性リンパ球数は腫瘍中のPD-L1高発現群で有意に低値を示した一方、間質浸潤のFoxp3陽性リンパ球数は腫瘍中のPD-L1発現との間に相関を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果を用いることで、直腸癌化学放射線療法におけるあらたな予後マーカーとなるほか、免疫チェックポイント阻害剤併用の可能性が考慮された。

研究成果の概要(英文)：Immunohistochemical analysis showed that elevated PD-L1 expression in rectal cancer tissues was significantly correlated with presence of lymphovascular invasion and recurrence after curative surgery. Survival curve analysis demonstrated that elevated PD-L1 expression was significantly correlated with poor overall and disease-free survival in rectal cancer patients receiving chemoradiotherapy. Furthermore, number of CD8+ tumor infiltrative lymphocytes (TILs) was positively correlated with FOXP3+ TILs, and CD8+ TILs was significantly increased in patients with high PD-L1 expression.

研究分野：消化器外科学

キーワード：直腸癌 間質 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

局所進行直腸癌に対する術前化学放射線療法(chemoradiotherapy: CRT)及び直腸間膜全切除(total mesorectal excision: TME)は、局所制御の観点からは十分な成績が得られているものの、全生存率(遠隔再発を含む)の改善においては未だ許容に足る成績は認められていない。当科における直腸癌の治療成績は2001年~2014年までの術前 CRT+手術後の局所再発率は7%と良好であるものの、遠隔再発率は20%に認められ、局所進行直腸癌の遠隔再発の制御無くして、更なる予後の改善は期待できない。

近年、癌の増殖・進展・転移に癌間質(局所抗腫瘍免疫も含む)が深く関わっていることが報告されており、'seed and soil'概念は、癌細胞のみならず、癌微小環境の制御が、癌制御において非常に重要な役割を担っていることを示している。線維芽細胞、免疫担当細胞、血管及びリンパ管内皮細胞、細胞外基質等により構築される癌間質が、腫瘍の増殖・進展に重要な役割を担っており、そこには癌-間質の相互作用が存在し、そのメカニズムの解明は、更なる治療成績の向上に繋がることは必然である。大腸癌治療成績は大きく改善されたが、癌増殖、転移に癌微小環境が大きく影響しており、CRT 後癌間質変化の特徴を評価し、癌-癌間質の相互作用を更に解明することは、更なる治療効果が期待できると考えられる。近年、癌免疫療法の発展も著しく、術前 CRT と癌免疫療法の併用療法へのエビデンス確立にも貢献する可能性がある。更に、癌間質の CRT による形態学的変化、蛋白、遺伝子発現の変化を検討することにより、CRT 抵抗性機序を解明できる可能性があり、牽いては、直腸癌治療のオーダーメイド化にも貢献する重要なデータを蓄積できると考えられる。

### 2. 研究の目的

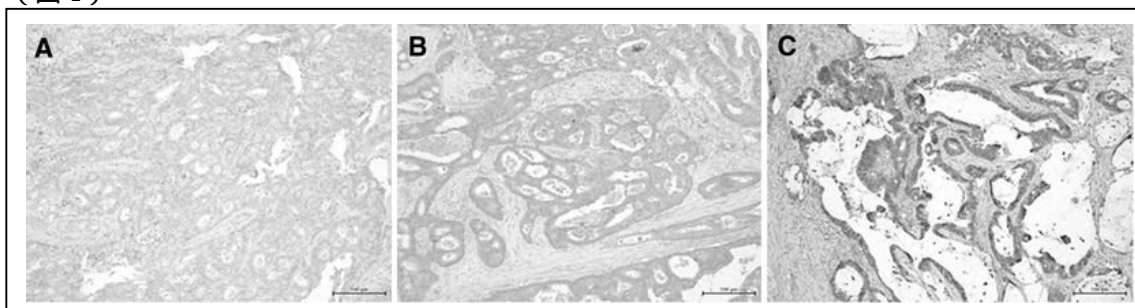
近年、癌増殖・進展・転移に癌間質の重要性が注目されつつあるが、術前化学放射線療法後の癌間質の評価に関する報告は未だ少ない。癌-癌間質の相互作用の解明は、更なる治療効果の向上及び予後の改善に繋がるとともに、直腸癌治療のオーダーメイド化、免疫治療との併用の妥当性を導き出せる可能性がある。そのために、本研究では癌間質に重点を置き、化学放射線療法後の癌増殖・進展・転移に関わる癌間質の形態学的変化、蛋白・遺伝子発現を検討する。また、癌間質の治療抵抗性因子について検証する。

### 3. 研究の方法

- 対象患者：
  - ✓ 術前化学放射線療法を施行した進行直腸癌 90 例を対象とした。
- 放射線化学療法のレジメン
  - ✓ Short course (20 Gy in 4 fractions) +radiosensitizer として 5FU 製剤
  - ✓ Long course (45 Gy in 25 fractions)+ radiosensitizer として 5FU 製剤
- データ収集
  - ✓ 上記 90 症例の臨床病理学的データならびに放射線化学療法の腫瘍効果判定データを集積した。
- 免疫染色による腫瘍における PD-L1 発現ならびに間質における腫瘍浸潤性リンパ球の数の評価
  - ✓ 切除標本における H-E 染色ならびに免疫組織学的染色 (PD-L1, CD8, Foxp3) を施行し、腫瘍周囲間質中に浸潤しているリンパ球 (TIL) と腫瘍組織の PD-L1 発現の定量
  - ✓ PD-L1 の定量方法: 染色強度 0 = negative, 1 = weak, 2 = moderate, and 3= strong (図 1A-C)
  - ✓ 染色強度が 0,1 を PD-L1 低発現群とし、2,3 を PD-L1 高発現群とした。
- 解析
  - ✓ 術前放射線化学療法を施行し、根治手術を施行した直腸癌患者の臨床病理学的因子ならびに予後と上記定量結果との関連を検証した。

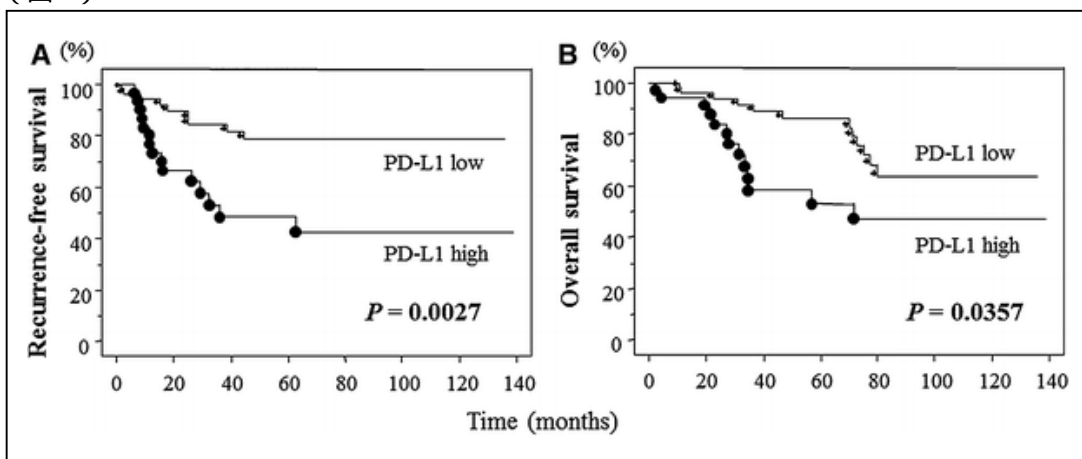
### 4. 研究成果

- 直腸癌腫瘍組織中の PD-L1 発現形式
  - ✓ PD-L1 の免疫染色にて直腸癌腫瘍細胞の細胞質ならびに細胞核に発現することが示された(図 1)。
  - ✓ 90 人中 36 人(40%)が PD-L1 の免疫染色にて high PD-L1 expression 群であった。(図 1)



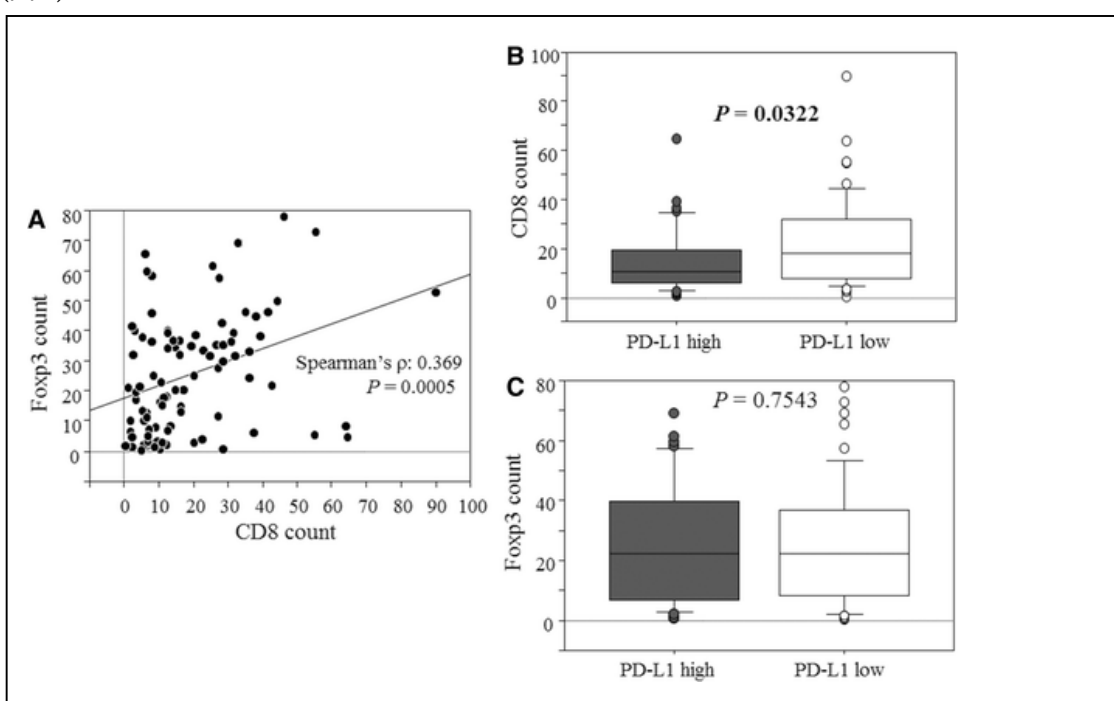
- 直腸癌腫瘍組織中の PD-L1 発現と臨床病理学的因子との関連
  - ✓ 直腸癌組織における PD-L1 高発現群は、有意に脈管浸潤と相関を認め( $p=0.0225$ )、さらに術後再発が有意に高率であった( $p=0.0051$ )。
- 直腸癌腫瘍組織中の PD-L1 発現と予後との関連
  - ✓ 生存曲線解析では、直腸癌組織中の PD-L1 高発現群は 有意に relapse free survival、ならびに overall survival が不良であった(図 2A,B)。

(図 2)



- ✓ 単変量解析による relapse free survival 不良を規定する因子の解析では、漿膜浸潤、リンパ節転移陽性、脈管浸潤陽性、PD-L1 高発現が有意な因子で、多変量解析ではリンパ節転移陽性 ( $p=0.0051$ ) ならびに PD-L1 高発現 ( $p=0.0249$ ) が独立した relapse free survival 不良を規定する因子であった。
- ✓ 同様に、単変量解析による overall survival 不良を規定する因子の解析では、リンパ節転移陽性、PD-L1 高発現が有意な因子で、多変量解析ではリンパ節転移陽性 ( $p=0.005$ ) ならびに PD-L1 高発現 ( $p=0.0279$ ) が独立した relapse free survival 不良を規定する因子であった。
- 直腸癌腫瘍組織中の PD-L1 発現と予後との関連
  - ✓ 直腸癌周囲の間質に存在する CD8 陽性リンパ球数と Foxp3 陽性リンパ球数は有意に正の相関を示した(図 3A)。
  - ✓ 間質浸潤の CD8 陽性リンパ球数は腫瘍中の PD-L1 高発現群で有意に低値を示した(図 3B)。一方で、間質浸潤の Foxp3 陽性リンパ球数は腫瘍中の PD-L1 発現との間に相関を認めなかった(図 3C)。

(図 3)



- 成果のまとめ
  - ✓ 直腸癌組織中の PD-L1 高発現は有意に早期再発、予後不良と関連を認めた。
  - ✓ 術前化学放射線療法を施行した直腸癌患者において、PD-L1 阻害により予後を改善できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Implication of programmed cell death ligand 1 expression in tumor recurrence and prognosis in rectal cancer with neoadjuvant chemoradiotherapy. **Saigusa S, Toiyama Y, Tanaka K**, Inoue Y, Mori K, Ide S, Imaoka H, Kawamura M, Mohri Y, **Kusunoki M**. Int J Clin Oncol. 2016 Oct;21(5):946-952. 査読有
2. Prognostic relevance of stromal CD26 expression in rectal cancer after chemoradiotherapy. **Saigusa S, Toiyama Y, Tanaka K**, Inoue Y, Mori K, Ide S, Imaoka H, Kawamura M, Mohri Y, **Kusunoki M**. Int J Clin Oncol. 2016 Apr;21(2):350-358. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 術前化学放射線療法後大腸癌における低分化胞巣の臨床病理学的意義 北嶋貴仁、**問山裕二**、奥川喜永、大村悠介、井出正造、藤川裕之、廣純一郎、小林美奈子、荒木俊光、**楠正人** 第 118 回日本外科学会定期学術集会 2017
2. 直腸癌術前化学放射線療法後癌間質変化と臨床病理学因子との関連 **三枝晋**、井上 靖浩、**問山裕二**、**田中光司**、廣 純一郎、藤川 裕之、荒木 俊光、毛利 靖彦、**楠正人** 第 117 回日本外科学会定期学術集会 2016
3. 直腸癌化学放射線療法後 Tumor infiltrating lymphocytes(TILs)と再発期間との関連 **三枝晋**、井上 靖浩、**問山裕二**、**田中光司**、森 浩一郎、今岡 裕基、藤川 裕之、廣 純一郎、毛利 靖彦、**楠正人** 第 71 回日本消化器外科学会総会 2016
4. 病理組織学的効果からみた直腸癌術前化学放射線療法の最適化について 井上 靖浩、今岡 裕基、沖上 正人、廣 純一郎、**三枝晋**、**問山裕二**、小林 美奈子、**田中光司**、毛利 靖彦、**楠正人** 第 71 回日本消化器外科学会総会 2016
5. 進行下部直腸癌に対する集学的治療の進歩 直腸癌術前化学放射線療法における予後予測因子としての病理組織学的効果について 井上 靖浩、今岡 裕基、藤川 裕之、奥川 喜永、廣 純一郎、**三枝晋**、**問山裕二**、小林 美奈子、荒木 俊光、**田中光司**、毛利 靖彦、**楠正人** 第 116 回日本外科学会定期学術集会 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：問山 裕二

ローマ字氏名(TOIIYAMA, YUJI)

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号(8桁): 00422824

研究分担者氏名：田中 光司

ローマ字氏名:(TANAKA, KOJI)

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学系研究科

職名：客員准教授

研究者番号(8桁): 10345986

研究分担者氏名：楠 正人

ローマ字氏名:(KUSUNOKI, MASATO)

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 50192026

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。