

令和 6 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K16294

研究課題名（和文）転移性大腸癌における原発巣切除による免疫状態変化と予後に関する検討

研究課題名（英文）Immune status changes and prognosis after primary tumor resection in metastatic colorectal cancer

研究代表者

市川 伸樹（Ichikawa, Nobuki）

北海道大学・大学病院・特任助教

研究者番号：50779890

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：切除不能転移性大腸癌の姑息的原発巣切除前後の末梢血リンパ球単球比（LMR）の変化を検討し、原発性腫瘍切除64例のうち39例はLMRが増加し増加率は平均1.57倍であった（LMR増加群）、一方残り25例ではLMRが減少し、平均0.68倍減少した（LMR減少群）。背景因子に大きな差を認めなかったが、原発巣切除後のOSをLMR増加群とLMR減少群と比較すると、全生存期間中央値は、それぞれ27.3ヵ月および20.8ヵ月で（ $P = 0.02$ ）、Cox回帰でもLMR低下は独立した予後不良因子であった。原発巣摘出検体の免疫染色ではCD8+とCD163+の浸潤細胞比率は、LMR増加例で有意に低い結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

切除不能転移性大腸癌において原発巣切除を行った症例の間でも、切除によりLMRの術後増加する症例は減少する症例よりは生命予後が良い可能性がある。今回、結果としてLMRが増加した症例と、減少した症例で予後及び組織学的特徴の差異を見出したが、どのような症例でLMRが増加、あるいは減少するかを術前に予見することで、原発巣切除が生命予後改善に寄与する症例を選別できる可能性がある。より症例数の多いコホートでバリデーションするとともに、本研究から得られた、組織でのCD8+：CD163+の比率を含め、より確固たる術前後LMR変化の予測因子を見出す事が今後の課題である。

研究成果の概要（英文）：The study examined the changes in peripheral blood lymphocyte monocyte ratio (LMR) before and after parietal colorectal resection of unresectable metastatic colorectal cancer.

Of 64 patients who underwent resection of primary tumor, 39 patients had increased LMR with an average 1.57-fold increase (increased LMR group), while the remaining 25 patients had decreased LMR with an average 0.68-fold decrease (decreased LMR group). Although there were no significant differences in background factors, the median overall survival after resection in the increased LMR and decreased LMR groups was 27.3 and 20.8 months, respectively ($P = 0.02$). Cox regression also showed that decreased LMR was an independent poor prognostic factor. Immunostaining of specimens from primary tumor resection showed that the ratio of CD8+ to CD163+ infiltrating cells was significantly lower in cases with increased LMR.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 切除不能転移性大腸癌 姑息的切除 リンパ球単球比

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

切除不能転移性大腸癌の中には、原発巣切除により予後が延長する症例がある可能性がある。一方、大腸がん患者において、末梢血中リンパ球/単球比 (LMR) は生命予後と関連する可能性があり、切除不能転移性大腸癌において原発巣切除を行った症例の間でも、切除により LMR の術後増加する症例は減少する症例よりは生命予後が良い可能性がある。これらの事より、切除不能転移性大腸癌における原発巣切除の予後延長効果には、原発巣切除による免疫反応の変化が関与するのではないかと考えた。原発巣切除後の LMR 変化と予後および、それに関わる生体内での免疫学的変化を示した報告に乏しいため、本研究において検討する。

2. 研究の目的

切除不能転移性大腸癌において、姑息的原発巣切除後の免疫状態の変化および予後に与える影響を究明する事を目的とする。

3. 研究の方法

切除不能転移性大腸癌の原発巣切除後に LMR の術後増加する症例と減少する症例で、摘出検体中の免疫状態の差異を評価し予後との相関を検討した。

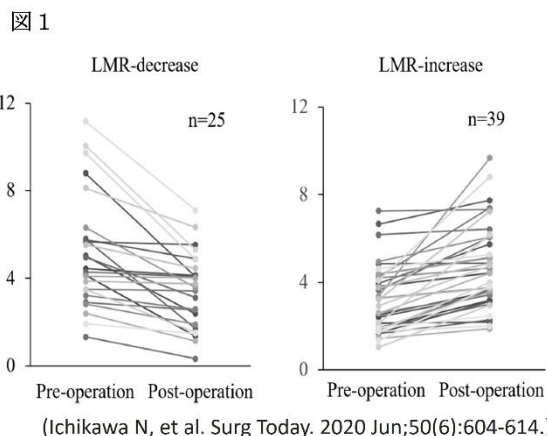
2010 年から 2015 年に化学療法を行った切除不能転移性大腸癌に 123 例を対象とした。このうち、原発巣切除を行い LMR が術後増加した 39 例と減少した 25 例の臨床病理学的背景と生命予後を比較し、予後に影響を与えうる因子を抽出した。生存曲線の比較においては、原発巣切除を行わなかった 59 例の生存曲線と対比した。

統計は、要約統計量を算出し、検定はカイ 2 乗および student-t 検定を用いて行った。生存曲線と追跡期間中央値は Kaplan-Meier 法を用いて推定し、log-rank 解析を用いて検定した。生存に影響を与える因子の検討では、単変量 Cox 比例ハザード回帰分析で $P < 0.1$ であった変数を共変量に用いて多変量 Cox 回帰分析を実施した。検定はすべて JMP Pro ソフトウェアプログラムバージョン 14.0 (SAS Institute, Inc.) を用いて行い、0.05 (両側) のアルファ値を用いた。

次に LMR 増加群および LMR 減少群のうち、入手可能な切除検体を用いて原発組織への免疫細胞浸潤を免疫染色で評価した。組織サンプルは 10% リン酸緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋したものを切片化し用いた。脱パラフィン化 5 μm 切片を、pH9 の抗原活性化溶液 (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) で 95、20 分間処理した。0.3% 過酸化水素トリス緩衝液で常温下に 10 分間前処理した後、切片を TBS で洗浄し、マウス抗ヒト CD4 (4B12; Leica Biosystems, Weizier, Germany) CD8 (C8/144B; Agilent, Santa Clara, CA), CD68 (M0876; Agilent), CD163 (10D6; Leica Biosystems), FOXP3 モノクローナル抗体 (236A/E7; eBiosciences, 236A/E7; eBiosciences, Waltham, MA, USA) とインキュベートした。切片を TBS で洗浄し、Histofine Simple Stain™ MAX PO (MULTI) (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) と室温で 60 分間インキュベートし、免疫標識細胞を diaminobenzidine (Agilent) で可視化した。その後、切片をヘマトキシリンで軽く対比染色した。CD4、CD8、CD68、CD163、FOXP3 陽性細胞のカウントでは、高倍率視野 (倍率 400 倍) で、CD163 染色に基づき最も炎症がひどかった 10 視野を使用した。各スライドは 1 人の病理医と 1 人と消化器内科医 1 名が盲検法によりカウントした。

4. 研究成果

原発巣切除直前と切除 1 ヶ月後の末梢血 LMR の変化を検討し、原発性腫瘍切除 64 例のうち 39 例は LMR が増加し増加率は平均 1.57 倍であった (LMR 増加群)、25 例では LMR が減少し (図 1)、平均 0.68 倍減少した (LMR 減少群)。LMR 増加群、減少群の年齢は平均 62.6 歳、63.6 歳、男女比は 19:20、12:13、右側結腸癌はそれぞれ 46.2% 対 56.0%、高文化型が 61.5% 対 64.0%、K-RAS 野生型が 48.7% 対 48.0%、術前閉塞有症状例が 79.5% 対 80%、術前 Hb11.0 対 12.0、Alb3.74 対 3.83、術前 CEA871 対 580 といずれも差を認めなかった。T 因子、N 因子に差を認めず、転移臓器の内訳は肝/肺/腹膜が 61.5%/35.9%/30.8% 対 76.0%/36.0%/28.0%、転移臓器数は 1 臓器/2 臓器/3 臓器以上が 61.5%/25.6%/12.8% 対 56.0%/25.6%/12.8% でこちらも差を認めなかった。化学療法の使用



歴にも差を認めなかった。LMR 増加群の末梢血中のリンパ球数と LMR は LMR 減少群より有意に少なかった。尚、参考群としての非切除例と切除例の比較では、非切除例で閉塞症状が有意に低く（50%対 79%）、臨床的リンパ節転移陰性例少なく（3%対 25%）、肝転移が多く（86%対 67%）、転移臓器数が多かった（3臓器 33%対 12%）。

原発巣切除後の OS を LMR 増加群と LMR 減少群で比較すると、OS 中央値は、それぞれ 27.3 か月および 20.8 か月であった（ $P = 0.02$ ）。LMR 減少群の生存曲線は、非切除症例の生存曲線と概ね重なっていた（非切除例の OS 中央値は 14.6 か月）（図 2）。原発巣切除症例での多変量回帰分析では、LMR の低下は予後不良と有意に関連していた（ $P = 0.0002$ ；HR、4.6）他、未分化腺癌および術前 LMR < 3.5 が独立因子をなっていた。

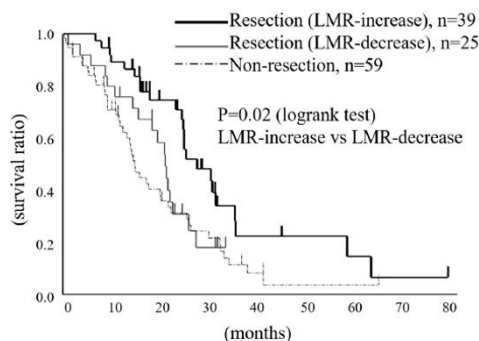
切除された原発巣における免疫学的差異を LMR 増加群と減少群で比較した。各群 5 例の切除標本について評価したところ免疫細胞のタイプは CD163+ が支配的であった。LMR が減少した患者では、LMR が増加した患者よりも腫瘍間質に浸潤している CD163+ 細胞と CD8+ 細胞が多かった（図 3）。さらに CD8+ : CD163+ の浸潤細胞比率は、LMR 増加例で有意に低かった（図 4）。これについては、サンプル数が少ないため 2016 年か 2019 年の検体をバリデーショナルコホートとして用い同様の検討を行った。検体を入力した LMR 増加例 14 例と減少例 4 例を比較すると、絶対数でのばらつきが大きいため、CD163 陽性細胞、CD8 陽性細胞それぞれの浸潤数において差は認められなくなってしまったが、CD8+ : CD163+ の浸潤細胞比率は、LMR 増加例で有意に低い結果は同様に得られた。

結論として切除不能な転移を有する CRC 患者において、緩和的な原発巣切除を行うことは、特に原発巣切除後に LMR が上昇した場合に生命予後を改善させる可能性がある。これは、切除された原発巣における免疫細胞浸潤度が大きく影響しており、特に CD8+ : CD163+ の比率の低い腫瘍と LMR 増加がかかわっている可能性が考えられた。

今回、結果として LMR が増加した症例と、減少した症例で予後及び組織学的特徴の差異を見出したが、どのような症例で LMR が増加、あるいは減少するかがわかることで、原発巣切除の意義のある症例が選別できる可能性があり、LMR 増加例、減少症例での特徴を見出すことを目的とし、それぞれの術前液性因子の特徴を検討した。

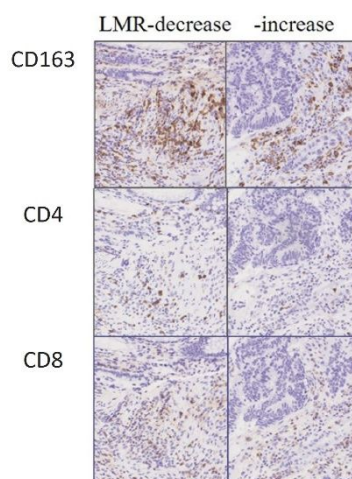
液性因子の代表として、炎症性サイトカイン、ケモカイン（TNF- α 、IL-6、MCP-1、MIP-2）骨髄由来抑制細胞のマーカー Alsinase1、をターゲットと考え、代表として IL-6 と Alsinase1 の術前血中濃度を比較したが、検体によりばらつきが大きく、有意な結果を得ることができなかった。検体が古く保存状態が影響していると考えられた為、他の液性因子の検討も実験の条件が悪いと判断し追加検討は断念した。本検討結果を、より再現性のある知見とする為、大規模コホートでのバリデーショナルおよび、RNA シークエンスによるトランスクリプトーム解析を行う後続研究を予定している。

図2



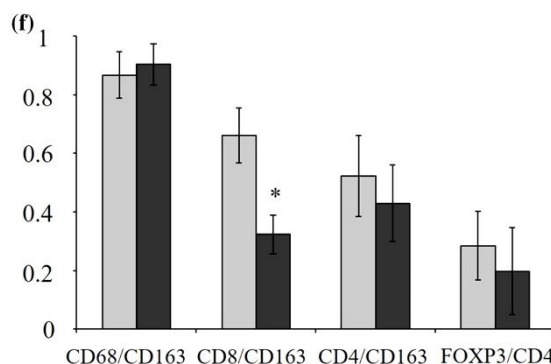
(Ichikawa N, et al. Surg Today. 2020 Jun;50(6):604-614.)

図3



(Ichikawa N, et al. Surg Today. 2020 Jun;50(6):604-614.)

図4



(Ichikawa N, et al. Surg Today. 2020 Jun;50(6):604-614.)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ichikawa N, Homma S, Yoshida T, Mitsuhashi T, Iijima H, Ogasawara K, Kazui K, Kamiizumi Y, Kawamata F, Taketomi A.	4. 巻 -
2. 論文標題 A Increase of peripheral lymphocyte-monocyte ratio after primary site resection is associated with prolonged survival in unresectable colorectal carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surg Today.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-019-01927-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Nobuki Ichikawa, Shigenori Homma, Tadashi Yoshida, Futoshi, Kawamata, Tomoko Mitsuhashi, Hiroaki Iijima, Susumu Shibasaki, Hideki Kawamura, Kazuhiro Ogasawara, Keizo Kazui, You Kamiizumi, Akinobu Taketomi
2. 発表標題 Impact of Primary Tumor Resection in Colorectal Cancer with Unresectable Metastasis.
3. 学会等名 14th Academic Surgical Congress（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nobuki Ichikawa
2. 発表標題 Increase of peripheral lymphocyte-monocyte ratio after the primary site resections related with the prolonged survival in unresectable colorectal carcinoma
3. 学会等名 Annual Congress of European Society of Coloproctology 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市川伸樹
2. 発表標題 切除不能転移性大腸癌における原発巣切除の意義の検討
3. 学会等名 日本臨床外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nobuki Ichikawa
2. 発表標題 Impact of Primary Tumor Resection in Colorectal Cancer with Unresectable Metastasis
3. 学会等名 14th Acaemic Surgical Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------