

令和 6 年 5 月 1 6 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16480

研究課題名（和文）大腸癌の腫瘍・間質形態に基づいた革新的免疫複合療法の開発

研究課題名（英文）Development of Innovative Immune Combination Therapy Based on Tumor and Stromal Morphology of Colorectal Cancer

研究代表者

白石 卓也（Shiraishi, Takuya）

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90881277

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：進行大腸癌を対象に癌関連線維芽細胞の機能を反映するdesmoplastic reaction (DR)と癌先進部の脱分化所見としての低分化胞巣(PDC)から病理組織標本上で形態学的に分類し、上皮間葉転換(EMT)の誘導を評価した。EMT誘導を認める大腸癌は予後不良であった。また、腫瘍内の線維化成分を評価し、線維化成分の多い症例は予後不良で、このような症例ではCD3+細胞やCD8+細胞の有意な低下と関連していた。さらに腫瘍局所の免疫状態を評価し、腫瘍免疫抑制を認めた症例の予後は不良であった。EMT誘導に関連する未熟なDRや腫瘍内の高度線維化は免疫細胞浸潤の減少に関連し、予後悪化と関連していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果からEMT誘導の引き起こされている腫瘍先進部のDRが未熟な症例や腫瘍内の線維化が強い症例は腫瘍免疫抑制と関連し、予後の悪化を引き起こしていることが明らかとなった。大腸癌の形態学的特徴や腫瘍免疫に関連する各種指標から予後不良症例を抽出し集学的治療を行うことで進行大腸癌の予後を向上させうる可能性や、EMT誘導を引き起こしている症例に対して免疫療法の感受性を高めることで予後を改善させうる新たな治療開発につながる基礎データを得ることができた点で学術的・社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We classified advanced colorectal cancer morphologically on histopathological specimens based on desmoplastic reaction (DR), which reflects the cancer function of related fibroblasts, and poorly differentiated clusters (PDCs), which are signs of dedifferentiation in advanced cancer areas. Moreover, we evaluated epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) based on this classification, and colorectal cancer with EMT had a poor prognosis. In addition, we evaluated the fibrotic components within the tumor, and found that cases with many fibrotic components had a poor prognosis, and such cases were associated with a significant decrease in CD3+ and CD8+ cells. Furthermore, the local immune status of the tumor was evaluated, and the prognosis of cases in which tumor immunosuppression was observed was poor. We revealed that immature DR, associated with EMT, and severe intratumoral fibrosis were associated with decreased immune cell infiltration and worsened prognosis.

研究分野：消化器外科学関連

キーワード：上皮間葉転換 癌関連線維芽細胞 腫瘍免疫関連因子 desmoplastic reaction 低分化胞巣 大腸癌

## 1. 研究開始当初の背景

癌の浸潤や転移の過程に重要である上皮間葉転換(EMT)の誘導は、癌関連線維芽細胞の機能を反映する desmoplastic reaction (DR)と癌先進部の脱分化所見としての低分化癌巢(PDC)から病理組織標本上で形態学的に分類でき、実際に大腸癌の予後と相関していることが報告された(Ueno H, et al. *JMA J.* 2020)。以前から DR や PDC は癌の病期に関係なく転移や予後との相関していることが報告されており(Shivji S, et al. *Histopathology.* 2020)、DR や PDC は EMT の誘導の結果を示した腫瘍間質の形態学的特徴であると考えられている。しかし、大腸癌における DR や PDC といった形態学的特徴と相関する EMT 関連因子や、誘導された EMT において腫瘍免疫に関連する因子は未だわかっていない。

## 2. 研究の目的

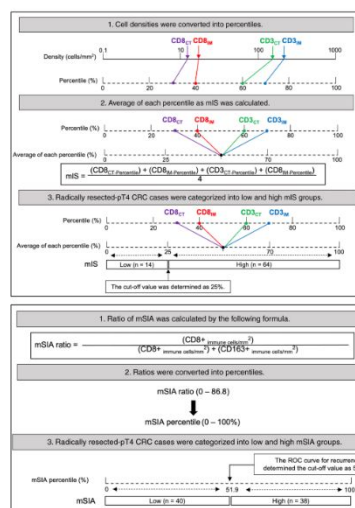
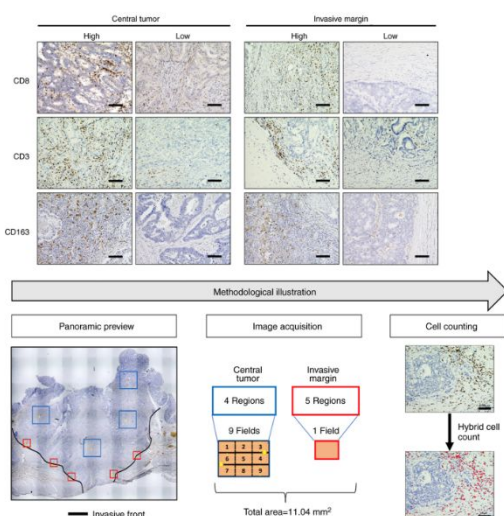
本研究の目的は、DR や PDC といった形態学的特徴や免疫療法の感受性と相関する EMT 関連因子や腫瘍免疫関連因子を明らかにすることで、大腸癌に対する免疫療法の感受性に関連する分子マーカーを同定することである。

## 3. 研究の方法

当院で術前治療を行わず大腸癌を切除した pT4 症例の切除標本(95 例)を用いて、免疫組織化学染色で EMT 関連因子や、腫瘍免疫関連因子、MMR 遺伝子関連蛋白の発現を評価する。臨床データと統合し、EMT 関連因子などの発現量によって DR や PDC といった形態学的特徴や予後の差異を解析し、DR/PDC/EMT 誘導、腫瘍局所の免疫細胞浸潤レベル、MSI-status に関連する標的分子に関連する蛋白を選別する。

## 4. 研究成果

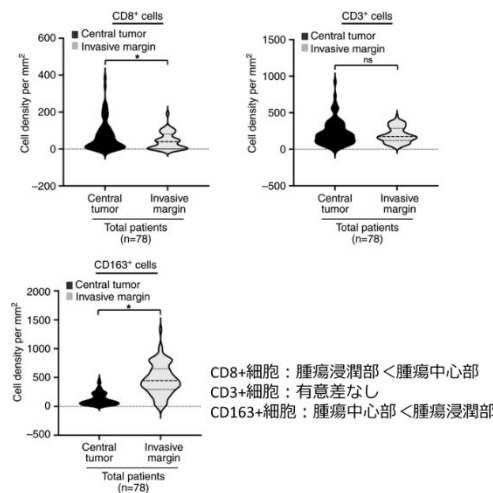
腫瘍辺縁および腫瘍内部の CD3+細胞、CD8+細胞、CD163+細胞浸潤レベルから腫瘍免疫状態を評価した。評価結果から、CD3+細胞と CD8+細胞から計算される modified-Immunoscore (mIS)と CD8+細胞と CD163+細胞から計算される modified-Signature of immune activation (mSIA)を求め、DR や PDC といった EMT と関連する形態学的な特徴と予後との関連について検討した。その結果、mIS と予後との間に有意な関連性を認めなかったが、mSIA と予後との検討において High mSIA 群は low mSIA 群と比べて全生存割合、癌特異的生存割合、無再発生存割合は有意に良好であるといった結果が得られた。特に術後補助化学療法を実施していない症例において low mSIA は有意に予後不良であった。また、無再発生存割合に関連する因子の検討において、多変量解析で low mSIA は独立した予後不良因子であることが明らかになった。以上のことから、腫瘍に浸潤した免疫細胞を評価することで、局所進行大腸癌症例における再発や生存といった予後予測マーカーとなりえる可能性が示唆された。さらに、術後補助化学療法を受けなかった局所進行大腸癌症例では mSIA が低いと生存割合は低く再発と関連していたことから、根治切除後に補助化学療法を必要とする大腸癌症例の抽出に mSIA の評価が有用である可能性が示唆された(Dorjkhoro G, Shiraishi T, et al. *Oncol Lett.* 2024)



mISの計算式  
(CD3+とCD8+  
から計算)

mSIAの計算式  
(CD8+とCD163+  
から計算)

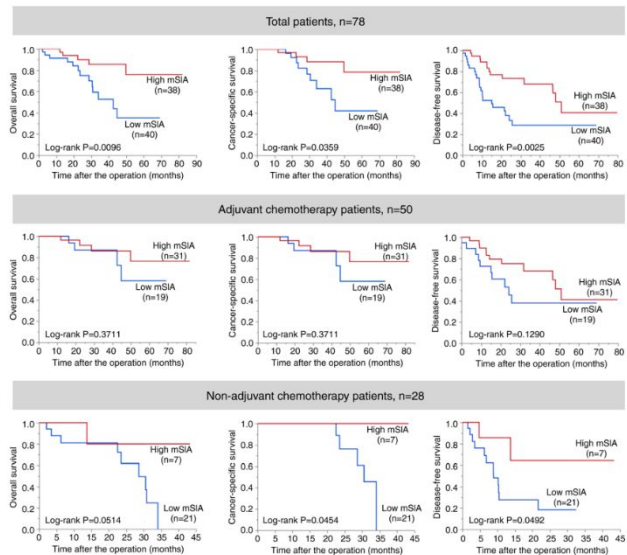
modified-Immunoscore (mIS)とmodified-Signature of immune activation (mSIA)を計算



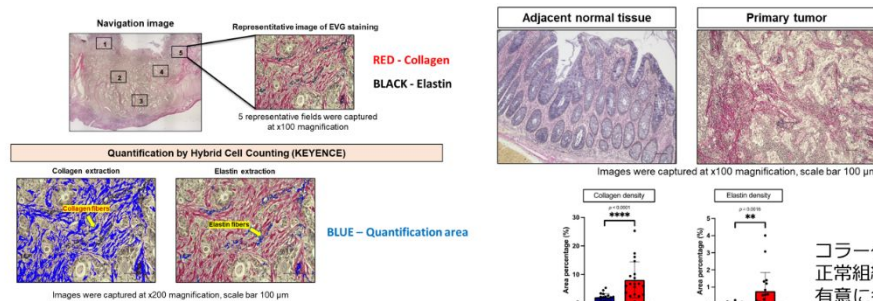
CD8+細胞：腫瘍浸潤部＜腫瘍中心部  
CD3+細胞：有意差なし  
CD163+細胞：腫瘍中心部＜腫瘍浸潤部

mISに有意差なし

High mSIA群はlow mSIA群と比べてOS、CSS、DFSは有意に良好であった  
(補助化学療法未施行群においてlow mSIAは有意に予後不良)

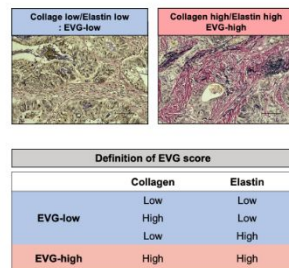
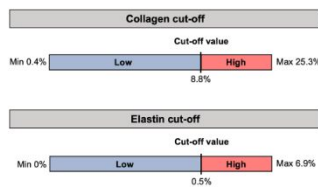


腫瘍組織内のコラーゲンとエラスチンを定量的に評価した。コラーゲンとエラスチンともに正常組織と比べて腫瘍組織内で有意に多いことが明らかとなった。コラーゲンとエラスチンの腫瘍組織内の密度からスコア化し、EVG スコアとして EVG high と EVG low の 2 群に分けて予後との関連について検討した。EVG high の症例で無再発生存割合は有意に低いといった結果が得られた。また、EVG high の症例では、CD3+細胞および CD8+細胞の腫瘍組織内浸潤の有意な低下と関連していた。さらに、無再発生存割合に関連する因子の検討において、多変量解析で EVG high は独立した予後不良因子であることが明らかになった。以上のことから、腫瘍組織内の線維化といった形態学的特徴を示すコラーゲンやエラスチンの密度が高いと、腫瘍組織内の免疫細胞は低下し再発割合が高く予後不良であったことから、EVG スコアは予後予測マーカーとなりえる可能性が示唆された。

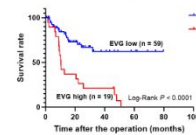


腫瘍内のコラーゲンとエラスチンを定量的に評価

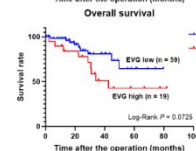
コラーゲンとエラスチンから  
EVGスコアとして症例を分類



Disease-free survival



EVG highの症例で  
DFSは有意に低い



他臓器浸潤する巨大な腫瘍でも手術で治癒切除できれば根治しうる症例がいる一方で、小さい腫瘍なのに早期再発や治療抵抗性のため予後不良な症例も存在しており、その違いは何か、その違いが新規治療法開発の糸口になるのではないかと、といった点に着目し解析を行い、局所浸潤した小さい腫瘍では組織学的に EMT を引き起こし有意に予後不良であり、その一方で大きい腫瘍の EMT 誘導は乏しく根治切除後の予後は良好で、小さい段階で局所浸潤の強い腫瘍には高悪性度を誘導する微小環境が備わっていることを報告した (Shiraishi T, et al. *Ann Gastroenterol Surg.* 2022)。今まで検討した DR や PDC といった形態学的特徴や、DR/PDC/EMT 誘導、腫瘍局所の免疫細胞浸潤レベル、MSI-status と腫瘍サイズについても検討を行ったが有

意な関連を認めなかった。以上のことから、腫瘍サイズのみで悪性度を単純に分類することは難しいと考えられた。本研究成果として、腫瘍免疫状態を示す mSIA や腫瘍内の線維化を示す EVG スコアは予後予測マーカーとなり、mSIA や EVG スコア、DR といった各種指標を用いて予後不良症例を抽出することで、集学的治療による予後向上の可能性や新たな治療開発の可能性といった新しい知見が本研究結果から得られた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1 . 著者名 Dorjkhooloo Gendensuren, Erkhem-Ochir Bilguun, Shiraishi Takuya, Sohda Makoto, Okami Haruka, Yamaguchi Arisa, Shioi Ikuma, Komine Chika, Nakazawa Nobuhiro, Ozawa Naoya, Shibasaki Yuta, Okada Takuhisa, Osone Katsuya, Sano Akihiko, Sakai Makoto, Ogawa Hiroomi, Yokobori Takehiko, Shirabe Ken, Saeki Hiroshi	4 . 巻 27
2 . 論文標題 Prognostic value of a modified-immune scoring system in patients with pathological T4 colorectal cancer	5 . 発行年 2024年
3 . 雑誌名 Oncology Letters	6 . 最初と最後の頁 104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2024.14237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1 . 著者名 Shiraishi Takuya, Ogawa Hiroomi, Katayama Ayaka, Osone Katsuya, Okada Takuhisa, Enokida Yasuaki, Oyama Tetsunari, Sohda Makoto, Shirabe Ken, Saeki Hiroshi	4 . 巻 6
2 . 論文標題 Association of tumor size in pathological T4 colorectal cancer with desmoplastic reaction and prognosis	5 . 発行年 2022年
3 . 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6 . 最初と最後の頁 667 ~ 678
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ags3.12571	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 白石 卓也、小川 博臣、片山 彩香、Gendensuren Dorjkhooloo, Bilguun Erkhem-Ochir、遠藤 瑞貴、山口 亜梨紗、塩井 生馬、柴崎 雄太、小峯 知佳、中澤 信博、岡田 拓久、大曾根 勝也、佐野 彰彦、酒井 真、宗田 真、小山 徹也、横堀 武彦、調 憲、佐伯 浩司
2 . 発表標題 臨床と基礎研究から明らかにするT4大腸癌切除症例の治療戦略
3 . 学会等名 第124回日本外科学会定期学術集会
4 . 発表年 2024年

1 . 発表者名 白石 卓也、小川 博臣、Gendensuren Dorjkhooloo, Bilguun Erkhem-Ochir、岡田 拓久、大曾根 勝也、宗田 真、横堀 武彦、調 憲、佐伯 浩司
2 . 発表標題 T4大腸癌切除症例の腫瘍径と予後および腫瘍間質の検討
3 . 学会等名 2024年がん関連三学会Rising Starネットワーキング
4 . 発表年 2024年

1 . 発表者名 Gendensuren Dorjkhoro, Takuya Shiraishi, et al.
2 . 発表標題 High intratumoral fibrosis was associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in pT4 colorectal cancer
3 . 学会等名 第34回消化器癌発生学会
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 Bilguun Erkhem-Ochir, Gendensuren Dorjkhoro, Takuya Shiraishi, et al.
2 . 発表標題 High nuclear karyopherin- 2 is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in CRC patients with pT4 stage
3 . 学会等名 第34回消化器癌発生学会
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 白石卓也、小川 博臣、片山 彩香、岡田 拓久、大曽根 勝也、榎田 泰明、宗田 真、小山 徹也、調 憲、佐伯 浩司
2 . 発表標題 病理学的壁深達度T4(pT4)大腸癌根治切除症例における腫瘍径と予後および腫瘍間質の検討
3 . 学会等名 JDDW2022 (Japan Digestive Disease Week 2022)
4 . 発表年 2022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
---------	---------