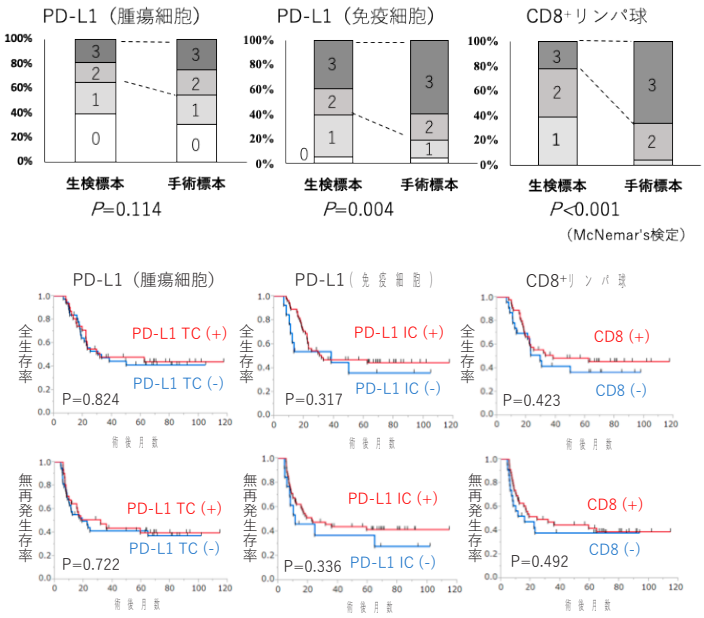
58　腫瘍低酸素下免疫応答解明と免疫制御による集学的治療	掛地　吉弘

【目的】消化器癌の治療成績の向上のためには、手術による完全切除と術後再発の抑制が重要である。このため、術前補助療法が重要な役割を果たす。進行食道癌では、5-FU＋CDDP (FP) 療法を標準治療して術前化学療法 (neoadjuvant chemotherapy：NAC) (FP-NAC)、進行直腸癌では、術前化学放射線療法 (neoadjuvant chemoradiotherapy：NACRT) が広く行われている。この術前療法での低酸素下での腫瘍や免疫細胞の微小環境に及ぼす変化を明確にし、メカニズムを把握することで、免疫チェックポイント阻害剤の併用治療への可能性と効果的な治療選択の手法を明らかにし、治療成績の向上を目指す研究である。

【方法】進行食道癌 FP-NAC 症例や局所進行直腸癌 NACRT 症例に対して、腫瘍免疫微小環境の評価を行った。評価項目は PD-L1 発現 (腫瘍細胞および免疫細胞)、CD8 などで、治療前生検標本および手術標本で免疫染色を行い、スコア化して比較した。さらに、術後標本により予後との関連を評価した。さらに、マウス大腸癌放射線照射モデルで、腫瘍内 $CD8^+$T 細胞を中心に解析し、その動態を検討した。

【結果】食道癌 FP-NAC 後手術症例では、$PD\text{-}L1^+$免疫細胞と $CD8^+$リンパ球の陽性率は有意に上昇していた。FP-NAC は食道癌腫瘍免疫微小環境において、$PD\text{-}L1^+$免疫細胞および $CD8^+$リンパ球を誘導する可能性が示唆された。予後については、いずれの因子においても発現は、生存率との相関を認めなかった。一方、直腸癌 NACRT 後手術症例を検討した。$PD\text{-}L1^+$免疫細胞および $CD8^+$で術後に有意に増加を示した。NACRT 群手術標本の各因子の免疫染色スコアと予後では、全生存率においては、いずれも有意な差を認めなかったものの、無再発生存率においては、$PD\text{-}L1^+$免疫細胞陽性群、$CD8^+$陽性群が有意に良好であった。多変量解析では $CD8^+$の低浸潤が無再発生存の独立した予後不良因子であった。次に、腫瘍内 $CD8^+$T 細胞の動態の解析を目的として、CT26 大腸癌細胞株を皮下接種したマウスで放射線照射モデルを作製した。放射治療後の腫瘍内 $CD8^+$T 細胞は、放射線照射後 11 日に著明に増加した。表現型 $PD\text{-}1^+$ $Tim\text{-}3^+$であり、腫瘍反応性 T 細胞が著明に増加していると考えられた。術前治療により食道癌、直腸癌では、腫瘍内 $CD8^+$T 細胞が増加することが示された。マウス放射線治療モデルでは、腫瘍反応性 $CD8^+$T 細胞が増加することが示された。この変化と低酸素応答のメカニズムの検討を進め、術前治療を行う手術成績の向上の一助としたい。

食道癌 NAC-FP による腫瘍免疫微小環境の変化と予後との相関



58. 腫瘍低酸素下免疫応答解明と免疫制御による集学的治療

掛地　吉弘

神戸大学 大学院医学研究科 外科学講座 食道胃腸外科学分野

Key words：低酸素環境，食道癌，大腸癌，術前化学（放射線）療法，T 細胞

緒　言

消化器癌治療の治療成績の向上のためには、手術による完全切除と術後再発の抑制が重要である。このため、手術前後の集学的治療となる放射線治療や化学療法が根治切除の補助療法として重要な役割を果たす。腫瘍微小環境は低酸素状態に陥るが、これらの補助療法は、低酸素環境をさらに増強する。腫瘍は、低酸素環境下で血管新生の促進や代謝活性の亢進により微小環境や細胞そのものの性質を変化させ、生存を維持する。腫瘍組織は、元来、正常細胞が環境の変化に対応する転写調節機構を都合よく利用しているとも言える。同時に正常細胞である、免疫細胞も環境の変化に対応する機能を持ち、性状を変化させ対応する。この免疫細胞の低酸素環境への応答メカニズムに着目し、放射線治療や化学療法を腫瘍や免疫細胞を標的にした消化器癌の術前・術後治療の開発を模索する研究である。臨床的には、既に不可欠となった免疫チェックポイント阻害剤は、他癌腫では放射線治療や化学療法下での併用による相乗的な効果が示された。標準的に術前治療を行う食道癌、直腸癌に着目し、これらの併用が適用可能かの検討を行う。

方　法

1. 食道癌の術前化学療法における腫瘍免疫微小環境の評価および予後との相関

食道癌術前化学療法（neoadjuvant chemotherapy：NAC）の腫瘍微小環境を評価した報告は幾つかあるが、本邦の標準治療である、病期Ⅱ～Ⅲに対する 5-FU＋CDDP 療法（FP）の regimen に限定した NAC（FP-NAC）の腫瘍免疫微小環境に及ぼす変化を明確にした報告はない。このため、FP-NAC を対象に検討し、その予後との関連を評価した。2008 年 1 月から 2014 年 12 月までの神戸大学病院で、術前化学療法後に食道切除術を受けた患者のうち、1）組織学的に確認された ESCC、2）R0 / R1 切除、3）2 サイクルの FP 化学療法完遂例、4）生検と外科標本が評価可能、の 4 つの条件を満たす 71 人を選択し、病理学的完全奏効 2 例（2.8%）を除外し、最終的に 69 症例が登録された。免疫組織化学的解析を行い、NAC 前生検標本と NAC 後手術標本を、抗 PD-L1 抗体と抗 CD8 抗体を用いて染色した。この免疫染色をスコア化し、術前生検標本と手術標本を比較し、その変化を McNemar の検定を用いて比較した。また、手術標本のスコアにより陽性群と陰性群に分け、予後への関与を Kaplan-Meier 法を用いて検定した（表 1、図 1）[1]。

表 1. 各因子のスコア化

	clone	評価方法
PD-L1		
腫瘍細胞	sp142	PD-L1⁺腫瘍細胞 / 全腫瘍細胞
免疫細胞	sp142	PD-L1⁺免疫細胞 / 全腫瘍浸潤免疫細胞
CD8	sp57	CD8⁺リンパ球 / 全腫瘍浸潤免疫細胞

スコア	
<1%	: 0
1% ≦ ～ < 5%	: 1
5% ≦ ～ <10%	: 2
≧10%	: 3

PD-L1はスコア 2 以上，
CD8⁺リンパ球はスコア 3 を陽性

治療前生検標本と治療後手術標本に対し、ウサギモノクローナル抗 PD-L1 抗体（SP142）とウサギモノクローナル抗 CD8 抗体（SP57）を用いて染色した。その発現の程度により、スコア化を行った。

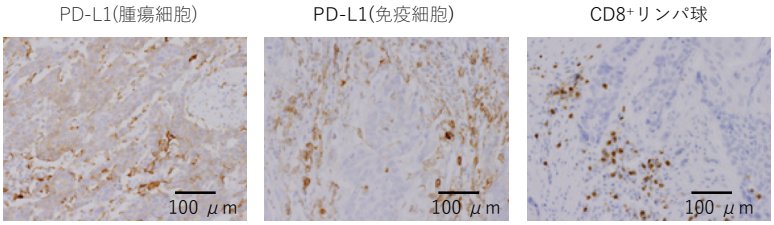


図 1. スコア 3 における各因子の免疫染色
スコア 3 における 3PD-L1（腫瘍細胞）、PD-L1（免疫細胞）、及び CD8⁺リンパ球の免疫染色図。スケールバー：100 μm。

2. 直腸癌術前化学放射線療法における腫瘍免疫微小環境の評価および予後との相関

2005 年 1 月から 2016 年 12 月までに神戸大学病院で術前化学放射線療法（neoadjuvant chemoradiotherapy：NACRT）施行後に下部直腸癌手術を受けた、1）術前に病理学的に腺癌と診断されている、2）cT3-4 または cN（＋）及び遠隔転移のない症例、3）生検標本と手術標本が評価可能、の 3 つの条件を満たす 50 例を適格とした。さらに、NACRT の腫瘍退縮の等級付けが病理学的完全奏効であった 6 例を除き、44 例が NACRT 群に登録された（NACRT 群）。また、術前治療なしで手術を受け、上記の 3 つの条件を満たす 24 例を対照群として登録した（手術単独群）。NACRT 前の生検標本と NACRT 後手術標本は、抗 PD-L1 抗体（SP142）、抗 CD8 抗体（SP57）、及び抗 CD163 抗体（10D6）を用いて染色し、解析した。絶対数を 5 箇所の平均値で算出し、生検標本と手術標本の変化を比較し、その変化を paire'd t-test により検定した。また、手術標本のスコア化により各因子がスコア 2 以上を陽性群とし、1 以下を陰性群とした。2 群間の予後への関与を Kaplan-Meier 法を用いて検定した。

3. マウス大腸癌放射線治療モデルの CD8⁺T 細胞の動態と抗腫瘍効果

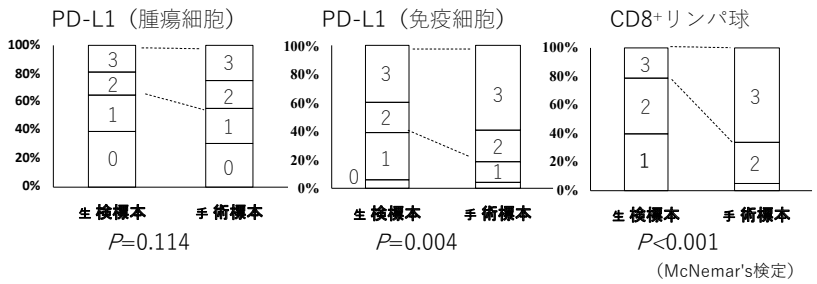
大腸癌細胞株である CT26 を 1 匹あたり 1×10^6 を BALB/c マウスに皮下接種したモデルを使用した。皮下接種後 14 日目に 10 Gy の単回照射の放射線治療を行う放射線治療群（RT 群）および未治療群（NT 群）の 2 群に設定し、腫瘍内の免疫細胞を経時的に解析した。

結果および考察

1. 食道癌 FP-NAC は腫瘍組織の PD-L1 免疫細胞および CD8⁺T 細胞を増加させる

病期Ⅱ～Ⅲに対する 5-FU＋CDDP 術前化学療法（FP-NAC）後手術例で、登録された 69 例の患者については、年齢の中央値は 68 歳（44～82）で、87%（60/69）が男性であった。各因子の免疫染色スコアを生検標本および手術標本で比較し、McNemar の検定で検証した。免疫染色で HIF-1α が発現していることが確認した。PD-L1⁺腫瘍細胞の陽性率の有意な変化はなかった（P=0.114）が、PD-L1⁺免疫細胞（P=0.004）と CD8⁺リンパ球（P<0.001）の陽性率は有意に上昇していた（図 2a）。FP-NAC は食道癌腫瘍免疫微小環境において、PD-L1⁺免疫細胞および CD8⁺リンパ球を誘導する可能性が示唆された。また、FP-NAC 例の各因子の手術標本に関する発現と予後との相関を検討した。PD-L1⁺腫瘍細胞、PD-L1⁺免疫細胞、CD8⁺リンパ球の免疫染色スコアが高い群を陽性群、それ以外を陰性群と設定し、各 2 群間の全生存率と無再発生存率を Kaplan-Meier 法を用いて検定した。PD-L1⁺腫瘍細胞（P=0.022、0.033）、PD-L1⁺免疫細胞（P=0.317、0.336）、CD8⁺（P=0.423、0.492）と全生存率および無再発生存率との相関を認めなかった（図 2b）。さらに詳細に解析を行うと pStage Ⅰ＋Ⅱでは PD-L1⁺免疫細胞陽性群で有意に予後が良好であった（P=0.022、0.033）。pStageⅢでは各因子と予後との相関を認めなかった（P=0.482、0.502）。FP-NAC は食道癌腫瘍免疫微小環境において、PD-L1⁺免疫細胞および CD8⁺リンパ球を誘導した。これらは 5-FU、CDDP における低酸素状態や免疫反応誘導性細胞死が作用しているものと推測された。また、免疫チェックポイント阻害剤の効果が期待できるとされる PD-L1⁺免疫細胞および CD8⁺リンパ球が上昇したため、FP-NAC との併用での効果が期待された。一方で、これらの因子が予後に関与するのは、ypStage Ⅰ～Ⅱの症例に限定され、FP-NAC の down-staging ができない症例は、強力な免疫抑制機構が作用している可能性が示唆された［1］。

a)



b)

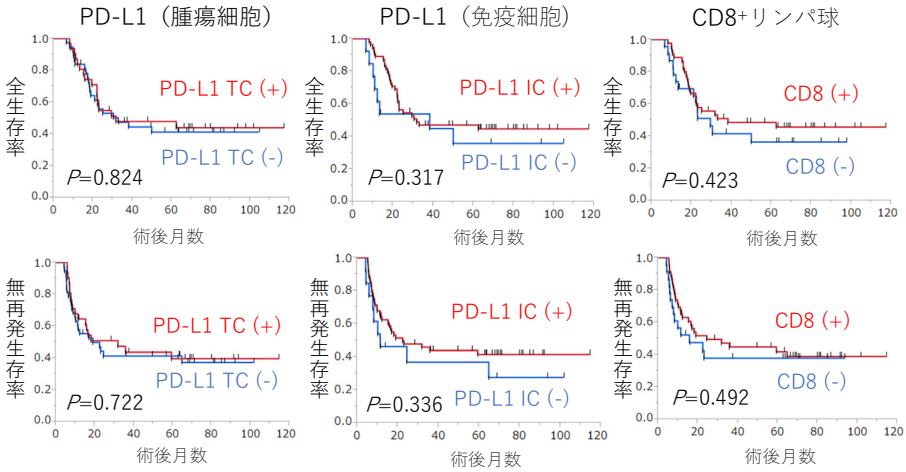


図 2. 食道癌 FP-NAC による腫瘍免疫微小環境の変化と予後

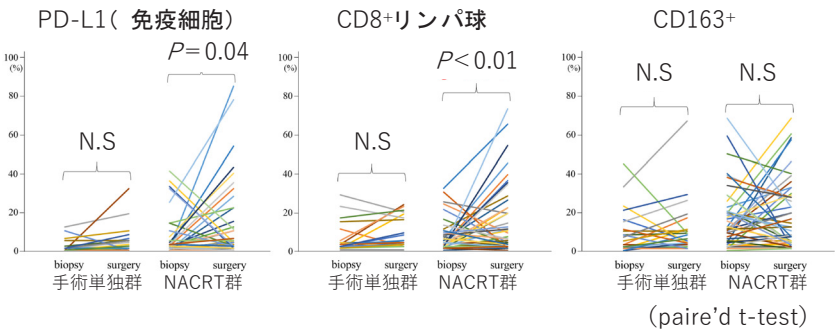
a) 食道癌 FP-NAC による腫瘍免疫微小環境の変化。生検標本と手術標本の各因子発現をスコア化して比較し、McNemar 法で検定した。

b) 食道癌 FP-NAC による腫瘍免疫微小環境と予後。各因子の発現に従い、2 群に分割し、全生存率および無再発生存率を Kaplan-Meier 法を用いて検定した。

2. 直腸癌 NACRT は腫瘍組織の PD-L1 免疫細胞および $CD8^+$T 細胞を増加させる

登録された 68 例中、NACRT を行った症例が 44 例（NACRT 群）、術前治療なしで手術のみを行った症例が 24 例（手術単独群）であった。生検標本と比較して、手術標本における PD-L1$^+$免疫細胞陽性群および CD8$^+$リンパ球の割合は、NACRT 群では共に有意に増加していた（P=0.038、P=0.0027）（図 3a）。また PD-L1$^+$腫瘍細胞の発現は手術単独群では認められず、NACRT 群での発現は非常に少なく、解析不能とした。CD163$^+$については 2 群で有意な変化はなかった。手術単独群では、いずれの因子も有意な変化はなく、この評価の妥当性を示した。次に、NACRT 群の手術標本の各因子のスコアと予後との相関を検討した。PD-L1$^+$免疫細胞、CD8$^+$リンパ球、CD163$^+$の陽性群と陰性群の各 2 群間の全生存率と無再発生存率を Kaplan-Meier 法を用いて検定した。全生存率においては、PD-L1$^+$免疫細胞（P=0.26）、CD8$^+$（P=0.46）、CD163$^+$（P=0.43）といずれも有意な差を認めなかった。一方、無再発生存率においては、PD-L1$^+$免疫細胞（P=0.032）、CD8$^+$（P<0.01）と陽性群において、有意に良好であった。CD163$^+$では有意差はなかった（P=0.13）（図 3b）。解析を進め、多変量解析では CD8$^+$の低浸潤が無再発生存の独立した予後不良因子であった（P=0.041）。NACRT で PD-L1$^+$免疫細胞や CD8$^+$T 細胞が誘導される症例は、免疫チェックポイント阻害剤の併用も期待された［2］。

a)



b)

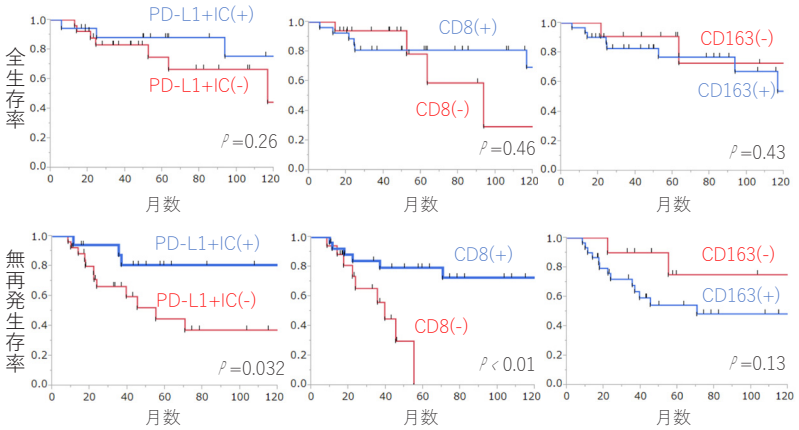


図 3. 直腸癌 NACRT による腫瘍免疫微小環境の変化と予後

a) 直腸癌 NACRT による腫瘍免疫微小環境の変化。生検標本と手術標本の各因子発現量を実数で評価し、paire'd t-test で検定した。

b) 直腸癌 NACRT による腫瘍免疫微小環境と予後。各因子の発現に従い、2 群に分割し、全生存率および無再発生存率を Kaplan-Meier 法を用いて検定した。

3. マウス大腸癌放射線照射モデルは腫瘍反応性 CD8⁺T 細胞を増加させる

CD8⁺T細胞の動態を解析するために、マウスCT26大腸癌細胞株を皮下摂取したマウスで放射線照射モデルを作製した。RT群における腫瘍内CD8⁺T細胞は、放射線照射後11日目著明に増加していた。RT群とNT群と比較して、腫瘍内CD45⁺細胞中では、割合（42.1±7.3% vs 16.3±2.4%；P <0.01）、絶対数（$6.6\pm1.6\times10^5$ vs $2.1\pm0.3\times10^5$；P<0.001）と著明な増加を認め、統計学的にも有意であった。さらに11日目をピークに14日目でも増加したが、18日目では、その増加効果が衰退傾向にあった（図4a）。さらに、腫瘍内CD8⁺T細胞の表現型の解析では、PD-1およびTim-3の発現では、PD-1⁺Tim-3⁺の割合が劇的に増加していた（75.5±9.1% vs 38.2±5.5%；P <0.001）。これは単に疲弊の程度を示すものではなく、腫瘍反応性T細胞が著明に増加していることが示唆された。CD8⁺T細胞の多くは、低酸素環境で分化促進されるエフェクター細胞の表現型を示し、低酸素環境に対応している可能性が示唆された。さらに腫瘍内PD-L1⁺細胞中で抗原提示細胞のマーカーを検討すると、CD11c（50.1±2.0% vs 36.9±3.5%；P <0.001）およびMHC-Ⅱ（61.0±4.8% vs 39.9±2.4%；P <0.001）の発現が有意に上昇していることが示された。腫瘍内のPD-L1⁺細胞の多くは、強力な抗原提示能を持つ細胞である可能性が示唆された。放射線により増加する腫瘍内CD8⁺T細胞は腫瘍組織内あるいは近傍での抗原提示細胞（能）の増加が関連している可能性が示唆された。一方、CT26マウスモデルでの10 Gy照射は効果が一過性であることが示された。免疫チェックポイント阻害剤や腫瘍反応性CD8⁺T細胞の増強する免疫療法などがより効果を増強できる手段であると期待される［3］。

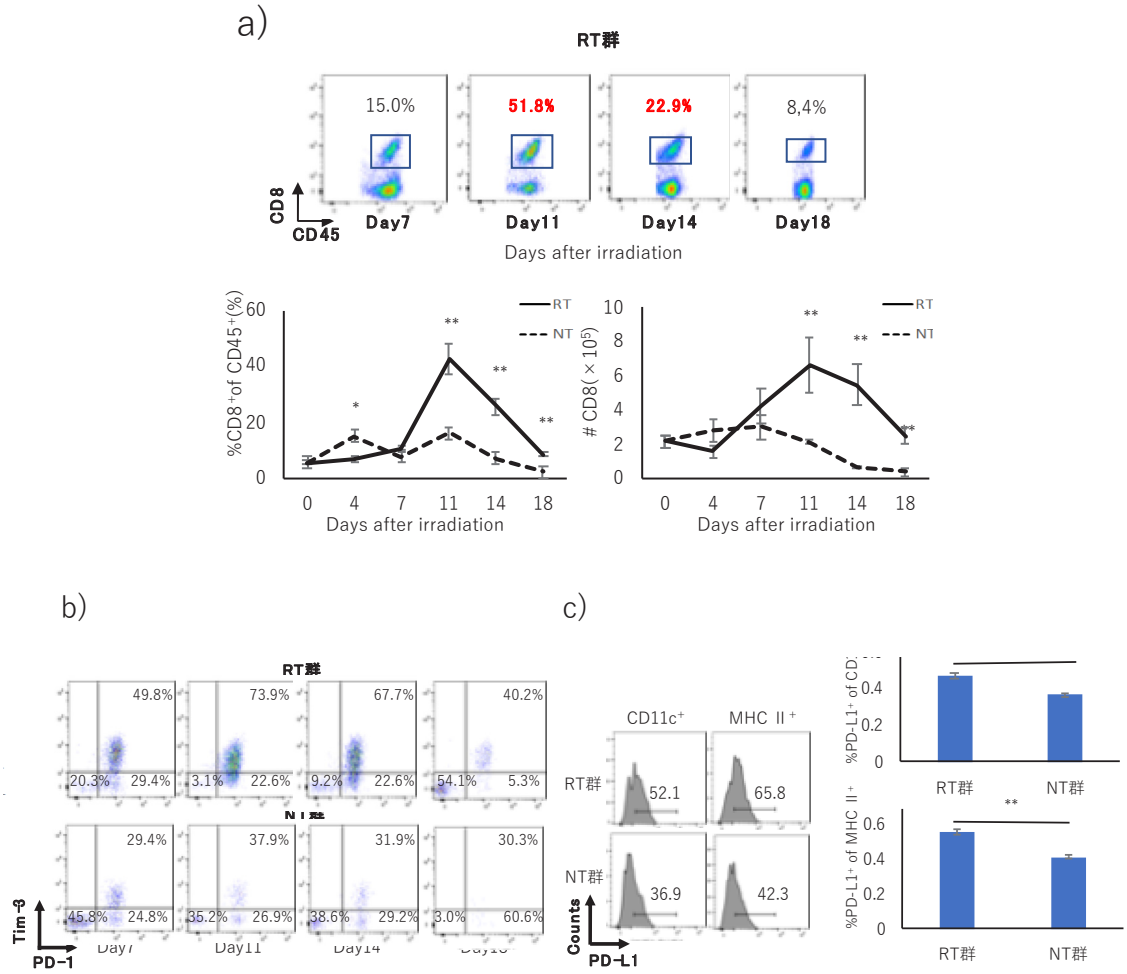


図 4. マウス大腸癌放射線照射モデルにおける CD8$^+$T 細胞の動態

a）腫瘍内 CD8$^+$T 細胞の放射線治療後の変化。t 検定で検定した（*P<0.05、**P<0.01）。

b）腫瘍内 CD8$^+$T 細胞の PD-1 および Tim-3 の発現パターンによる表現型解析。

c）PD-L1$^+$細胞の CD11c および MHC-Ⅱの発現解析。t 検定で検定した（**P<0.01）。

以上の結果より、術前治療により食道癌、直腸癌では、腫瘍内CD8$^+$T細胞、PD-L1免疫細胞が増加することが示された。これらは免疫チェックポイント阻害剤の併用による治療成績の向上を期待させる結果であった。マウス放射線治療モデルでは、腫瘍反応性CD8$^+$T細胞が増加することが示された。この変化と低酸素応答のメカニズムをさらに解析し、術前治療を行う手術成績の向上の一助としたい。

共同研究者・謝辞

ご指導いただきました神戸大学大学院医学研究科 iPS 医学研究室の青井貴之教授に深謝いたします。

文　献

1） Fukuoka E, Yamashita K, Tanaka T, Sawada R, Sugita Y, Arimoto A, Fujita M, Takiguchi G, Matsuda T, Oshikiri T, Nakamura T, Suzuki S, Kakeji Y. Neoadjuvant Chemotherapy Increases PD-L1 Expression and CD8+ Tumor-infiltrating Lymphocytes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Anticancer Res. 2019 Aug ;39(8):4539-4548. PMID: 31366557 doi: 10.21873/anticanres.13631.

2) Yamashita K, Matsuda T, Hasegawa H, Mukohyama J, Arimoto A, Tanaka T, Yamamoto M, Matsuda Y, Kanaji S, Nakamura T, Sumi Y, Suzuki S, Kakeji Y. Recent advances of neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer: Future treatment perspectives. Ann Gastroenterol Surg. 2018 Oct 24;3(1):24-33. PMID: 30697607 doi: 10.1002/ags3.12213. eCollection 2019 Jan.
3) Yamashita K, Arimoto A, Nishi M, Tanaka T, Fujita M, Fukuoka E, Sugita Y, Nakagawa A, Hasegawa H, Suzuki S, Kakeji Y. Application of iNKT Cell-targeted Active Immunotherapy in Cancer Treatment. Anticancer Res. 2018 Jul;38(7):4233-4239. PMID: 29970556 doi: 10.21873/anticanres.12719.