

切除可能結腸直腸癌に対する  
強力な予後予測マーカーとしての  
腫瘍内浸潤 CD4 および FOXP3  
陽性 T 細胞

氏名 桑原 太一

所属 山口大学大学院医学系研究科  
医学博士課程 医学専攻

令和 2 年 1 月

## 目次

1. 要旨	3
2. 背景	3
3. 方法	4
4. 結果	5
5. 考察	6
6. 謝辞	8
7. 参考文献	9
8. 図表	13

## 1. 要旨

背景： CD3 および CD8 陽性 T 細胞の腫瘍浸潤は、結腸直腸癌(CRC)患者の良好な予後予測マーカーとして報告されてきた。この度、CRC における CD4 および FOXP3 陽性 T 細胞の腫瘍内浸潤の予後に与える意義を明らかにする。

方法： 治癒切除を受けた 342 人の CRC 患者の組織標本から、CD3、CD8、CD4 および FOXP3 陽性 T 細胞を免疫染色(IHC)し、1mm<sup>2</sup> あたりの腫瘍内浸潤細胞数を定量化した。マイクロサテライト不安定性(MSI)も 322 検体で評価し、臨床病理学的因子および生存率を解析した。

結果： CD3、CD4 および FOXP3 陽性 T 細胞の高浸潤群は、無再発生存率(RFS)の改善と関連した。CD8、CD4 および FOXP3 陽性 T 細胞の高浸潤群は、疾患特異的生存率(DSS)の改善と関連した。CD4 および FOXP3 陽性 T 細胞を共に低浸潤として認める症例は、非常に予後不良だった。深達度、脈管浸潤、および CD4 陽性 T 細胞密度は、DSS の独立した予後因子だった。CD4 および FOXP3 陽性 T 細胞浸潤は、CD3 および CD8 陽性 T 細胞浸潤とは対照的に、高頻度マイクロサテライト不安定群と関連を認めなかった。

結論：腫瘍内 CD4 陽性 T 細胞浸潤と CD4 および FOXP3 陽性 T 細胞浸潤の組み合わせは、他の臨床病理学的因子と比較して強力な予後因子だった。これらの結果は、CRC の新しい予後マーカーとして治療戦略の確立の一助となる可能性がある。

## 2. 背景

CRC は、世界で 3 番目に多い癌種である。癌関連死亡の原因としては 4 番目となる主要な原因であり、年間 500,000 人以上が死亡する(1,2)。近年の外科的治療や化学療法の発展にもかかわらず、患者の 20~25%に致命的となる再発を来し、治療の有効性は依然として不十分である(3)。

TNM 分類(UICC)は、患者の予後を予測する上で役立つことが示されてきた(4,5)。しかし、臨床転帰は同じ Stage の患者間で著しく異なる可能性があり、このアプローチだけでは、予後予測因子として十分ではない(6)。補助化学療法は、1990 年代初頭から Stage III 患者の標準治療として広く推奨されている(7)。それに加えて現在では、High-risk Stage II 患者に対しても施行されるようになっている(8)。フルオロピリミジン単独もしくはオキサリプラチンとの併用など、多くのレジメンが存在し、その治療強度は病期によって異なっている(9)。したがって、補助化学療法の最大の恩恵を受ける患者を分類するために、新規バイオマーカーの特定が必要である(9-11)。

再発リスクを予測する上で、突然変異や腫瘍遺伝子の発現に基づく分類は、有用性を認める症例に限られている(12-14)。近年、腫瘍への免疫細胞浸潤が、良好な予後と関係するとされる多くの報告を認める(15-17)。腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、特に CD3 および CD8 陽性 T 細胞は、腫瘍に対する宿主免疫応答の指標となる可能性があり、再発および全生存期間において強力な予測因子となりうる(17,18)。さらに、腫瘍内の CD3 および CD8 陽性 T

細胞密度とその浸潤マージンにより規定される Immunoscore と呼ばれるスコアリングシステムは、CRC 患者の臨床転帰の予測に役立つことが示されている(19,20)。

対照的に、CD4 陽性 T 細胞は CRC の予後マーカーとしてまだ十分に定義されておらず、CD4 陽性 T 細胞浸潤と生存率の間に有意な関係を報告した研究はほとんどない(21,22)。さらに、現在フォークヘッドボックス P3(FOXP3)陽性細胞は、一部を除き多くの癌種で免疫抑制性に働くと考えられている(23-26)。

この研究では、根治的切除を受けた原発性大腸癌患者の切除標本から CD3、CD8 だけでなく CD4 および FOXP3 陽性 T 細胞も予後予測因子としての有用性を明らかにすべく調査した。この度、我々の知る限り腫瘍内 CD4 および FOXP3 陽性細胞浸潤が CRC 患者の最も有力な予測因子であることを初めて示した。

### 3.方法

#### 【患者と組織サンプル】

1993 年から 2012 年にかけて山口大学大学院消化器腫瘍外科で CRC の根治切除を受けた 342 症例の組織標本を用いた。下部直腸癌症例は、術前治療として術前化学(放射線)療法を施行することがあり、その他の CRC とは異なるために研究から除外した(27)。5 年間の DSS および RFS を解析する上で、切除後 5 年以内の他病死や予後不明症例は除外した。患者背景を表 1 に示した。術後補助化学療法は、主に StageIII および High-risk StageII 患者に対して実施した。補助療法を受けた患者の割合は、StageI、II、III 患者でそれぞれ 11%、64%、87%だった(表 S1)。倫理的、法的、社会的影響は、山口大学病院倫理委員会(H17-83, H23-135)によって承認された。全てのサンプルは、患者のインフォームドコンセントによって取得された。

#### 【IHC と TIL の分析】

免疫組織化学(IHC)は以前の報告に準じて行った(17,28)。簡潔に述べると、手術標本のヘマトキシリンとエオシンで染色されたスライドを病理学的に評価した後、ホルマリン固定、パラフィン包埋標本から 4 $\mu$ m の切片を作成した。IHC 染色は、Ventana Discovery XT 染色システム(Ventana, Tucson, AZ, USA)を使用して実行した。TIL を識別するために、次の 4 つの抗体を使用した：anti-CD3 (rabbit monoclonal, 518110079 (CD3); Ventana)、anti-CD8 (mouse monoclonal, 1:50, IR623; Dako, Foster City, CA, USA)、anti-CD4 (mouse monoclonal, 518108816 (CD4); Ventana)、anti-FOXP3 (mouse monoclonal, 1:100, ab20034; Abcam, Cambridge, MA, USA)。コントロールとして、anti-mouse IgG1 antibody(1:100, ab91353; Abcam)も使用した。

高解像度デジタルスライドスキャナー(NanoZoomer-XR C12000; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)によりスライドをスキャンし、画像解析システム(Tissue Studio; Definiens, Munich, Germany)によって全ての腫瘍病変を自動的に解析した。腫瘍組織 1 mm<sup>2</sup> あたりの陽性細胞数を測定し、記録した(図 1a)。CRC 組織には、いくつかのリンパ

組織、壊死組織、肥厚した線維組織が含まれる場合がある。この研究では、腫瘍周囲リンパ球浸潤および腫瘍外リンパ様構造を含まない癌病変のみを選択した(図 1b)。検査したセクションの中央値は、ほとんど全ての症例で1つだった。最大4つの病変を検査した。

#### 【MSI の分析】

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit(Qiagen、Hilden、Germany)を用いて、切除標本からDNAを抽出した。MSIは、5つのモノヌクレオチドマーカークの Promega panel(BAT25、BAT26、NR-21、NR-24、MONO-27)を用いて分析した。メーカーの指示に従って、MSI Analysis System(Promega、Madison、WI、USA)を使用して行った。5つのマーカークのうち2つ以上が不安定であった場合、MSI-high(MSI-H)群、0または1つのマーカークが不安定を示した場合、マイクロサテライト安定(MSS)群とし、CRC患者を2つの群に分類した。

#### 【統計解析】

各実験は、カイ2乗検定またはフィッシャーの正確検定を用いて解析した。DSSおよびRFSは、手術日から原病死、および癌再発の診断日までとして定義した。ログランク検定を使用して、生存時間の分布を比較した。DSSとRFSはKaplan-Meier曲線を用いて標記した。Cox比例ハザードモデルを使用して、単変量および多変量解析を実行した。統計解析にはJMP 14(SAS Institute Inc.、Cary、NC、USA)を用いた。P値<0.05を統計的に有意差ありとした。

## 4.結果

#### 【IHC と TIL の解析】

それぞれの細胞数の中央値に応じて高浸潤または低浸潤の2群に分類した。代表的な画像としてCD3陽性細胞の高浸潤群(図1c)および低浸潤群(図1d)を示し、それぞれのTILの1mm<sup>2</sup>あたりの平均細胞数を図2に示した。

年代の古い標本の免疫染色の安定性を明らかにするために、研究期間の前半と後半の平均陽性細胞数の違いを調べた。2001年以前と2002年以降のCD3、CD8、およびCD4陽性細胞の平均数の間に有意差は認めなかった。2002年以降と比較して2001年以前にFOXP3陽性細胞の減少傾向を認めたが、これらの違いは本研究の結果に影響を与えないと判断した(図S1)。

腫瘍内不均一性を分析するために、15症例で1mm<sup>2</sup>中のCD3陽性細胞数を評価した。この分析では、CD3陽性細胞が低浸潤、中等度浸潤、高浸潤の症例からそれぞれ5症例ずつを選択した。1mm<sup>2</sup>あたりCD3陽性細胞数は、低浸潤、中等度浸潤、高浸潤の場合でそれぞれ0-205、0-1479、0-5070(細胞/mm<sup>2</sup>)だった(図S2)。

#### 【各 TIL における予後】

次に、それぞれのTILと予後との関係を解析した。原病死者数は37人、再発は75人だった。Kaplan-Meier生存曲線をそれぞれ図3a-hに示す。ログランク分析により、CD8高浸潤群(P = 0.0234)、CD4高浸潤群(P < 0.0001)およびFOXP3高浸潤群(P = 0.0003)が

DSS の改善に関連した。同様に、CD3 高浸潤群( $P = 0.0215$ )、CD4 高浸潤群( $P = 0.0015$ ) および FOXP3 高浸潤群( $P = 0.0003$ )は RFS の改善に関連した(図 3)。

驚くべきことに、CD4 高浸潤 と FOXP3 高浸潤の組み合わせが最も正確に予後を予測した(図 3i, j)。CD4 低浸潤と FOXP3 低浸潤の組み合わせを有する症例は、CD4 高浸潤群 および FOXP3 低浸潤群、CD4 低浸潤群および FOXP3 高浸潤群、または CD4 高浸潤群 および FOXP3 高浸潤群の患者と比較した場合、RFS( $P < 0.0001$ )および DSS( $P < 0.0001$ )と 著明に予後不良であった。

#### 【DSS の単変量および多変量解析】

DSS の単変量および多変量解析は、既知の臨床病理学的因子や MSI ステータスなどの予 後因子、および TIL を用いて行った(表 2)。単変量解析は、深達度、組織型、脈管浸潤、 CD8、CD4 および FOXP3 細胞密度がより高い DSS と関連することを明らかにした。MSI ステータスは予後因子であることが示されなかった。多変量解析において、独立した予後 因子は、深達度、脈管浸潤、および CD4 細胞密度だった(表 3)。さらに、CD4 高浸潤群が 予後良好を示す最も強い因子だった( $P = 0.0004$ )。

#### 【MSI ステータスと T 細胞浸潤】

MSI ステータスは 322 症例で測定可能であった。MSI-H 群と MSS 群間の TIL を比較 し、表 3 に示す。MSI-H 群は、MSS 群と比較した場合、CD3 および CD8 陽性細胞の密度 が高かった(それぞれ  $P = 0.0212$  および  $P = 0.0153$ )。興味深いことに、MSI-H 群と MSS 群間で CD4 および FOXP3 陽性細胞の密度の分布に差はなかった(それぞれ  $P = 0.8287$  および  $P = 0.8287$ )。

## 5. 考察

CRC 患者では、細胞傷害性免疫反応のマーカーである CD3 および CD8 の存在が良好な 予後と関連することが報告されている(15-20,26)。以前の報告と同様に、本研究でも予後 因子として CD3 および CD8 陽性 T 細胞密度の有用性を確認した(図 3a-d)。

本研究の主な新規性は以下の通りである。CD4 陽性細胞密度は、多変量解析における独 立した予後因子だった。FOXP3 陽性細胞浸潤は、切除可能 CRC の陽性予測マーカーであ ることを確認した。低 CD4 と低 FOXP3 陽性細胞浸潤の組み合わせは、CRC 患者の著明 な予後不良因子だった。そして、MSI ステータスは、CD3 および CD8 陽性細胞浸潤と関 連を認めたが、CD4 または FOXP3 陽性細胞浸潤とは関連を認めなかった。

最初に、CD4 陽性 T 細胞の高浸潤群が、CRC の独立した予後因子であることを示した。 深達度もしくはリンパ節転移よりも予後因子として優れていた(表 2)。我々の知る限り、 これは切除可能な CRC における陽性予後因子として、腫瘍内 CD4 陽性 T 細胞浸潤の有用 性を明確に示した最初の報告である。本研究は、デジタル化された高解像度画像と特殊な ソフトウェアを使用して、免疫細胞の腫瘍浸潤を客観的かつ定量的評価を可能とした (20,28)。このことは、研究者によって選択された腫瘍の一部のみを分析した他の研究とは

異なった。全腫瘍部の分析は、観察者のバイアスを回避し、検査技術の簡素化に役立つ可能性がある。さらに、我々は腫瘍周囲のリンパ球浸潤もしくは腫瘍外リンパ構造を含まない腫瘍病変部のみを選択した(図 1b)。したがって、リンパ球の腫瘍内浸潤の正確な分析が可能であった。

CD4 陽性 T 細胞密度は、他の癌種、例えば肺癌、腎癌、前立腺癌、乳癌では、予後不良因子と報告されている(28-31)。この結果の不一致の理由は明らかではないが、癌微小環境内の CD4 陽性 T 細胞の機能、つまり免疫応答を活性または抑制するかは、癌種により異なる可能性がある。我々の結果と一致し、CD4 陽性細胞による調節が機能しない場合は、特定の CD8 陽性 T 細胞が不活化し、エフェクター T 細胞に変換されないことが報告されている(32,33)。つまりこのことは、CD4 陽性 T 細胞が腫瘍免疫の調節において中心的な役割を果たしていることを意味している。癌微小環境下で、ナイーブ T 細胞は、サイトカイン産生および調節転写因子に基づいて、Th1、Th2、Th17、および制御性 T 細胞(Treg)という 4 つの主要な細胞へ分化が可能である(34,35)。以前の研究により、Th1 は CD8 陽性 T 細胞を介して適応免疫を促進すること(36)、Th1 および細胞障害性 T 細胞は良好な予後と関連すること(17)、Th17 発現の高い CRC 患者は予後不良であることが示されている。我々はこれらの複雑なメカニズムが、癌微小環境において免疫応答を増強し、CRC の予後に寄与すると考えた。

次に、FOXP3 陽性細胞浸潤が陽性予後因子であることを確認した(図 3g, h)。FOXP3 転写因子を発現する CD4 陽性 T 細胞は Treg として機能し、癌細胞に対する免疫応答に抑制的に作用する(37,38)。様々な癌種でみられる予後不良を示す臨床結果は、豊富な FOXP3 陽性細胞の腫瘍組織への浸潤と関連している(24)。しかし、CRC においては FOXP3 陽性細胞に関する矛盾した結果が報告されており、いくつかの研究では FOXP3 陽性 T 細胞の高浸潤を認める症例が、予後良好であることが報告されている(25,26,39)。さらに、FOXP3 陽性の CD4 陽性 T 細胞は、FOXP3 および CD45RA の発現レベルに基づいて、FOXP3<sup>low</sup> / CD45RA 陽性の細胞はナイーブ Treg、FOXP3<sup>high</sup> / CD45RA 陰性の細胞はエフェクター Treg、および FOXP3<sup>low</sup> / CD45RA 陰性の細胞は、免疫抑制機能を有さず、炎症性サイトカインの分泌能を有する非制御性 T 細胞といった 3 つの細胞に分画され、それぞれ機能的に異なるという報告もある(38,40,41)。CRC を取り巻く腸内細菌を豊富に含む癌微小環境下において、腫瘍への特定の腸内細菌の浸潤量が非制御性 T 細胞と関連し、特に、フゾバクテリウム・ヌクレアタムの腫瘍浸潤と高い関連性を示していた(42)。したがって、FOXP3<sup>low</sup> T 細胞浸潤が豊富な症例は、FOXP3<sup>high</sup> T 細胞浸潤が高い症例より予後良好であることが示された(42)。我々の結果では、FOXP3 陽性細胞の高浸潤が予後の改善と関連を認めた。本研究の限界の 1 つは、FOXP3 陽性細胞の数のみが免疫染色によって定量化され、非制御性 T 細胞の割合は不明のままであった。もう 1 つの制限として、FOXP3 陽性細胞数が 2002 年以後と比較して 2001 年以前に減少する傾向があり、研究期間の後半における FOXP3 陽性 T 細胞数の中央値が、前半におけるトップ 25%の細胞数と

同等であった(図 S1)。したがって、低浸潤群の生存率の低さは、一部の研究前半の予後不良な症例に起因する可能性がある。

また、我々は、CD4 陽性細胞と FOXP3 陽性細胞の組み合わせが、予後に対して最も有用であることを示した(図 3i, j)。この結果は、癌の再発しづらい癌微小環境には、1 種類の免疫細胞、すなわち CD4 陽性細胞または FOXP3 陽性細胞のどちらかの浸潤があれば十分であることを示した。これらの結果の背後にある科学的メカニズムの解明にはさらなる研究が必要だが、我々の知見は、CRC に関する腫瘍免疫の新しいアイデアと見識へのきっかけになるかもしれない。

最後に、MSS 群よりも MSI-H 群の方が CD3 および CD8 陽性細胞浸潤が多いが、CD4 および FOXP3 陽性細胞浸潤は腫瘍の MSI 状態に影響を受けないことがわかった(表 3)。ミスマッチ修復遺伝子の欠如または変化によって引き起こされる MSI-H 症例は、CRC 症例の約 6-16%に存在し、良好な転帰および転移の可能性の低下と関連する(43,44)。CD3 および CD8 陽性細胞の結果は、これまでの報告の結果と一致していたが、CD4 および FOXP3 陽性細胞の結果は一致しなかった。MSI-H 腫瘍は、ネオアンチゲンを認識することができる CD3 および CD8 陽性 T 細胞の豊富な腫瘍組織への浸潤と関連している(45,46)。CD4 陽性細胞と MSI の関係についての報告はこれまでに無く、FOXP3 陽性細胞と MSI の関係に関する以前の報告とは結果は一致しなかった。本研究と同様に、Salama らは、FOXP3 陽性細胞と MSI の間に有意な関係は無かったと報告し(25)、Le Gouvello らは、MSI-H 腫瘍組織における FOXP3 の mRNA 発現レベルが低いことを示している(47)。CRC においては、CD4 および FOXP3 陽性細胞の浸潤は、ネオアンチゲンではなく腸内細菌叢の影響を受けている可能性が考えられる。そのため、今後の研究では、CD4 陽性 T 細胞と腸内細菌叢を含む癌微小環境の関係を詳細に調べる必要がある。

#### 【結語】

CRC 患者において、CD4 および FOXP3 陽性 T 細胞浸潤の組み合わせによる予後的意義について報告したのは、本研究が初めてである。StageII および StageIII の CRC 症例には、術後補助化学療法が推奨され、フルオロピリミジン単独またはオキサリプラチンとの併用が推奨される。したがって、これらの新しい予後マーカーの発見は、治癒切除された CRC 患者の適切な術後管理にとって重要である。CD4 および FOXP3 陽性 T 細胞を評価することにより、今後 CRC の新しい予後因子および治療戦略が確立される可能性がある。

## 6.謝辞

本研究にあたり、ご指導戴いた永野浩昭教授に深甚なる謝意を表します。また、直接ご指導を賜りました碓 彰一教授に心より拝謝申し上げます。また技術的支援をしていただいた竹之内寛子さんに深謝いたします。



## 7.参考文献

1. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. & Forman, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 61, 69–90 (2011).
2. Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. & Parkin, D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* 127, 2893–2917 (2010).
3. Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H. J., Lynch, H. T., Minsky, B., Nordlinger, B. et al. Colorectal cancer. *Lancet* 375, 1030–1047 (2010).
4. Wittekind, C., Compton, C. C., Greene, F. L. & Sobin, L. H. TNM residual tumor classification revisited. *Cancer* 94, 2511–2516 (2002).
5. Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Hohler, T., Galle, P. R. & Buchler, M. W. Colorectal cancer. *Lancet* 365, 153–165 (2005).
6. Nagtegaal, I. D., Quirke, P. & Schmoll, H. J. Has the new TNM classification for colorectal cancer improved care? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 9, 119–123 (2011).
7. Quasar Collaborative, G., Gray, R., Barnwell, J., McConkey, C., Hills, R. K., Williams, N. S. et al. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet* 370, 2020–2029 (2007).
8. Schmoll, H. J., Van Cutsem, E., Stein, A., Valentini, V., Glimelius, B., Haustermans, K. et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Ann. Oncol.* 23, 2479–2516 (2012).
9. Dienstmann, R., Salazar, R. & Tabernero, J. Personalizing colon cancer adjuvant therapy: selecting optimal treatments for individual patients. *J. Clin. Oncol.* 33, 1787–1796 (2015).
10. Hazama, S., Tamada, K., Yamaguchi, Y., Kawakami, Y. & Nagano, H. Current status of immunotherapy against gastrointestinal cancers and its biomarkers: Perspective for precision immunotherapy. *Ann. Gastroenterol. Surg.* 2, 289–303 (2018).
11. Kono, K. Advances in cancer immunotherapy for gastroenterological malignancy. *Ann. Gastroenterol. Surg.* 2, 244–245 (2018).
12. Ribic, C. M., Sargent, D. J., Moore, M. J., Thibodeau, S. N., French, A. J., Goldberg, R. M. et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N. Engl. J. Med.* 349, 247–257 (2003).
13. Gavin, P. G., Colangelo, L. H., Fumagalli, D., Tanaka, N., Remillard, M. Y., Yothers, G. et al. Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: an assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value. *Clin. Cancer Res.* 18, 6531–6541 (2012).
14. Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reynies, A., Schlicker, A., Song, C. et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* 21, 1350–1356 (2015).
15. Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H. K., Maby, P., Angelova, M., Tougeron, D. et al.

Integrative analyses of colorectal cancer show immunoscore is a stronger predictor of patient survival than microsatellite instability. *Immunity* 44, 698–711 (2016).

16. Fridman, W. H., Pages, F., Sautes-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 12, 298–306 (2012).

17. Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C. et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960–1964 (2006).

18. Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Berger, A., Bindea, G., Meatchi, T. et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J. Clin. Oncol.* 29, 610–618 (2011).

19. Galon, J., Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H. K., Berger, A., Lagorce, C. et al. Towards the introduction of the ‘Immunoscore’ in the classification of malignant tumours. *J. Pathol.* 232, 199–209 (2014).

20. Pages, F., Mlecnik, B., Marliot, F., Bindea, G., Ou, F. S., Bifulco, C. et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet* 391, 2128–2139 (2018).

21. Canna, K., McArdle, P. A., McMillan, D. C., McNicol, A. M., Smith, G. W., McKee, R. F. et al. The relationship between tumour T-lymphocyte infiltration, the systemic inflammatory response and survival in patients undergoing curative resection for colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 92, 651–654 (2005).

22. Zlobec, I., Karamitopoulou, E., Terracciano, L., Piscuoglio, S., Iezzi, G., Muraro, M. G. et al. TIA-1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein improves the prognostic performance of CD8 in mismatch repair-proficient colorectal cancer. *PLoS ONE* 5, e14282 (2010).

23. Zhang, Y., Huang, Y. & Qin, M. Tumour-infiltrating FoxP3+ and IL-17-producing T cells affect the progression and prognosis of gallbladder carcinoma after surgery. *Scand. J. Immunol.* 78, 516–522 (2013).

24. Huang, Y., Liao, H., Zhang, Y., Yuan, R., Wang, F., Gao, Y. et al. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ T cells in gastrointestinal cancers: a meta analysis. *PLoS ONE* 9, e94376 (2014).

25. Salama, P., Phillips, M., Grieu, F., Morris, M., Zeps, N., Joseph, D. et al. Tumorinfiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 27, 186–192 (2009).

26. Sinicrope, F. A., Rego, R. L., Ansell, S. M., Knutson, K. L., Foster, N. R. & Sargent, D. J. Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma. *Gastroenterology* 137, 1270–1279 (2009).

27. Yamashita, K., Matsuda, T., Hasegawa, H., Mukohyama, J., Arimoto, A., Tanaka, T. et al. Recent advances of neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer: Future treatment perspectives. *Ann. Gastroenterol. Surg.* 3, 24–33 (2019).
28. Kinoshita, T., Muramatsu, R., Fujita, T., Nagumo, H., Sakurai, T., Noji, S. et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes differs depending on histological type and smoking habit in completely resected non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 27, 2117–2123 (2016).
29. McArdle, P. A., Canna, K., McMillan, D. C., McNicol, A. M., Campbell, R. & Underwood, M. A. The relationship between T-lymphocyte subset infiltration and survival in patients with prostate cancer. *Br. J. Cancer* 91, 541–543 (2004).
30. Bromwich, E. J., McArdle, P. A., Canna, K., McMillan, D. C., McNicol, A. M., Brown, M. et al. The relationship between T-lymphocyte infiltration, stage, tumour grade and survival in patients undergoing curative surgery for renal cell cancer. *Br. J. Cancer* 89, 1906–1908 (2003).
31. Droeser, R., Zlobec, I., Kilic, E., Guth, U., Heberer, M., Spagnoli, G. et al. Differential pattern and prognostic significance of CD4+, FOXP3+ and IL-17+ tumor infiltrating lymphocytes in ductal and lobular breast cancers. *BMC Cancer* 12, 134 (2012).
32. Bourgeois, C., Veiga-Fernandes, H., Joret, A. M., Rocha, B. & Tanchot, C. CD8 lethargy in the absence of CD4 help. *Eur. J. Immunol.* 32, 2199–2207 (2002).
33. Kurts, C., Carbone, F. R., Barnden, M., Blanas, E., Allison, J., Heath, W. R. et al. CD4 + T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self antigens and favors autoimmunity. *J. Exp. Med.* 186, 2057–2062 (1997).
34. Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev. Immunol.* 28, 445–489 (2010).
35. Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G. et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 71, 1263–1271 (2011).
36. Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Peng, S. L. & Glimcher, L. H. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev. Immunol.* 21, 713–758 (2003).
37. Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 6, 345–352 (2005).
38. Nishikawa, H. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* 27, 1–7 (2014).
39. Noshu, K., Baba, Y., Tanaka, N., Shima, K., Hayashi, M., Meyerhardt, J. A. et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J. Pathol.* 222, 350–366 (2010).
40. Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A. et al. Functional

delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup>T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30, 899–911 (2009).

41. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M. & Hafler, D. A. FOXP3<sup>+</sup>regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 490–500 (2010).

42. Saito, T., Nishikawa, H., Wada, H., Nagano, Y., Sugiyama, D., Atarashi, K. et al. Two FOXP3(+)CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat. Med.* 22, 679–684 (2016).

43. Peltomaki, P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J. Clin. Oncol.* 21, 1174–1179 (2003).

44. Roth, A. D., Delorenzi, M., Tejpar, S., Yan, P., Klingbiel, D., Fiocca, R. et al. Integrated analysis of molecular and clinical prognostic factors in stage II/III colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 104, 1635–1646 (2012).

45. Ishikawa, T., Fujita, T., Suzuki, Y., Okabe, S., Yuasa, Y., Iwai, T. et al. Tumor-specific immunological recognition of frameshift-mutated peptides in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res.* 63, 5564–5572 (2003).

46. Alexander, J., Watanabe, T., Wu, T. T., Rashid, A., Li, S. & Hamilton, S. R. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am. J. Pathol.* 158, 527–535 (2001).

47. Le Gouvello, S., Bastuji-Garin, S., Aloulou, N., Mansour, H., Chaumette, M. T., Berrehar, F. et al. High prevalence of Foxp3 and IL17 in MMR-proficient colorectal carcinomas. *Gut* 57, 772–779 (2008).

48. Kuwahara T, Hazama S, Suzuki N, Yoshida S, Tomochika S, Nakagami Y, Matsui H, Shindo Y, Kanekiyo S, Tokumitsu Y, Iida M, Tsunedomi R, Takeda S, Yoshino S, Okayama N, Suehiro Y, Yamasaki T, Fujita T, Kawakami Y, Ueno T, Nagano H. et al. Intratumoural-infiltrating CD4 + and FOXP3 + T cells as strong positive predictive markers for the prognosis of resectable colorectal cancer. *Br J Cancer.* 121(11):983-984. (2019).

## 8. 图表

表 1 患者背景

<b>Table 1. Demographics and baseline characteristics (n = 342)</b>	
<b>Characteristic</b>	<b>No. (%)</b>
<i>Age, years (range)</i>	
Median	69
Range	27–95
< 65	124 (36)
<i>Sex</i>	
Male	179 (52)
Female	163 (48)
<i>Primary tumour location</i>	
Ascending colon	94 (27)
Transverse colon	36 (11)
Descending and sigmoid colon	135 (39)
Upper rectum*	77 (23)
<i>Disease stage at diagnosis</i>	
I	88 (26)
II	142 (41)
III	112 (33)
<i>T stage</i>	
T1	54 (16)
T2	48 (14)
T3	211 (62)
T4	29 (8)
<i>N stage</i>	
N0	230 (67)
N+	112 (33)
<i>Histologic grade</i>	
Well differentiated	92 (27)
Moderately differentiated	223 (65)
Poorly differentiated	16 (5)
Mucinous/undifferentiated	11 (3)
<i>Vascular emboli and lymphatic invasion</i>	
Present	172 (51)
Absent	170 (49)
<i>Perforation</i>	
Present**	8 (2)
Absent	334 (98)

\*Above the peritoneal reflection, \*\*Four patients out of eight cases with perforation experienced relapses within 3 years

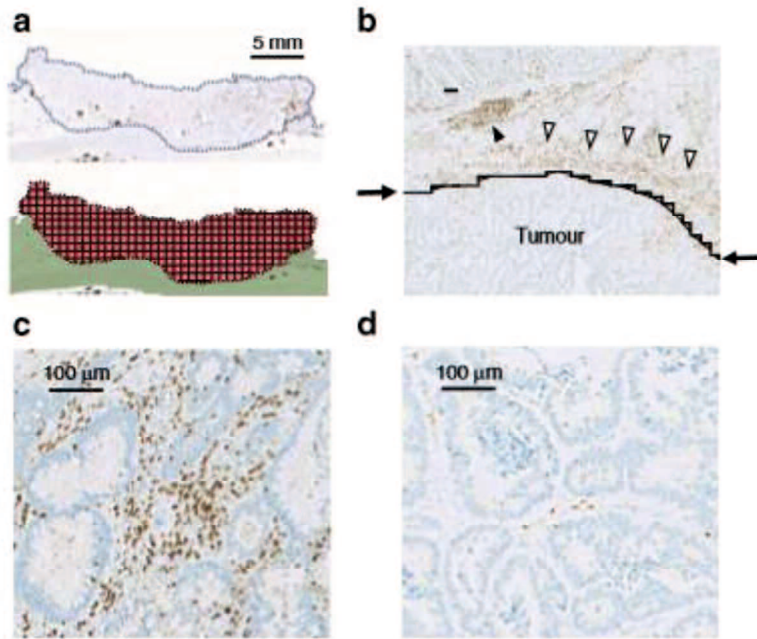


図1 結腸直腸癌(CRC)における CD3 陽性腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の免疫染色(IHC)。

- a 結腸組織を 1 mm<sup>2</sup> のタイルに分割し、腫瘍組織を赤で強調し、表示した。
- b 腫瘍領域は、腫瘍周囲リンパ球浸潤(白三角)および腫瘍外リンパ様構造(黒三角)を除く曲線下の領域(矢印)として選択した。
- c 高い CD3 陽性細胞浸潤を示す代表的な IHC。
- d 低い CD3 陽性細胞浸潤を示す代表的な IHC

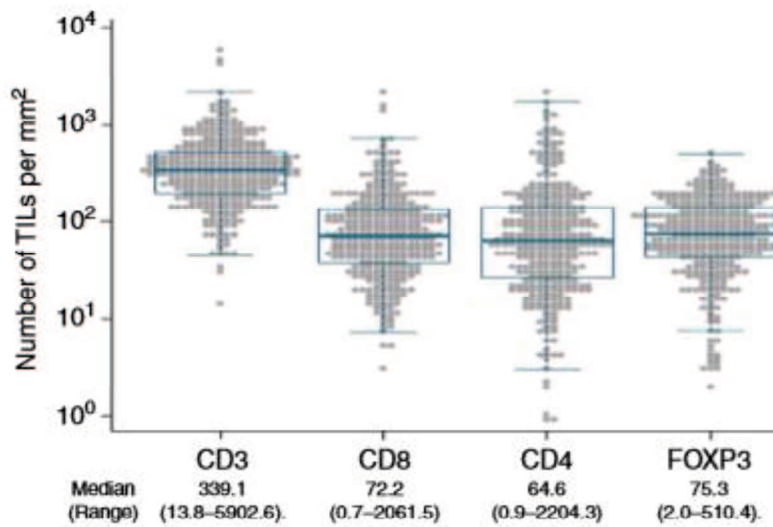
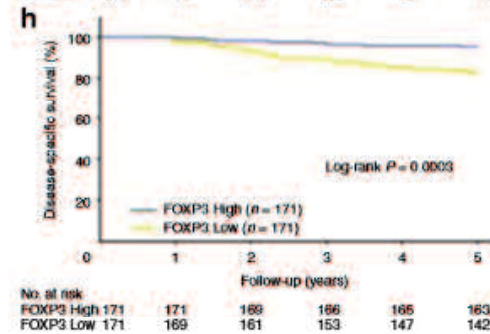
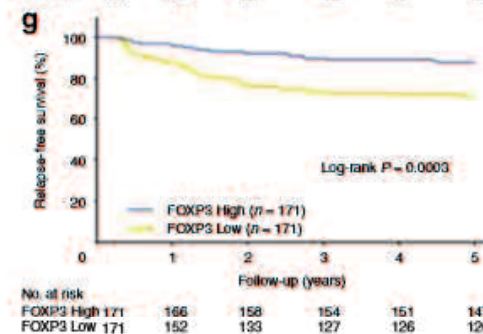
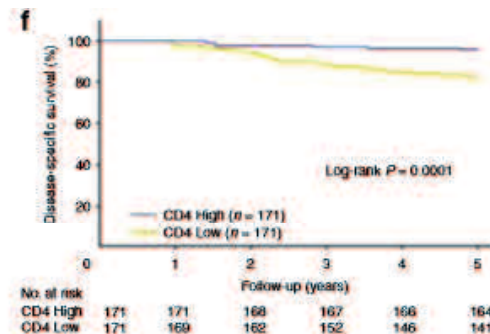
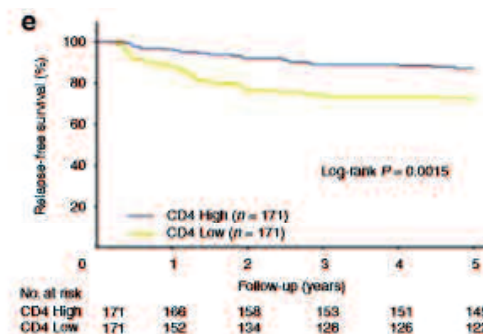
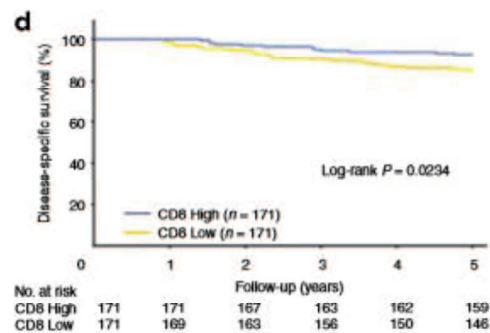
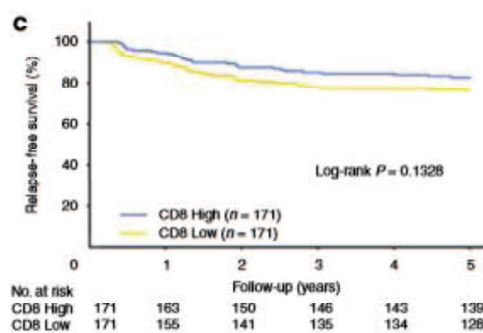
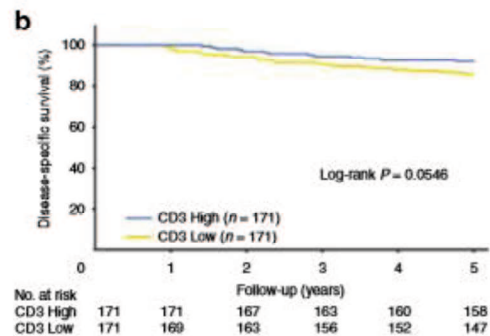
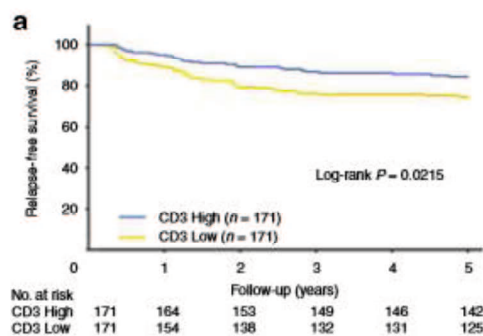


図2 結腸直腸癌組織における腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の平均細胞数。

1mm<sup>2</sup> あたりの TIL の数は、すべての患者に対して CD3、CD8、CD4、および FOXP3 抗体を使用した免疫染色により測定された。中央値(cells/mm<sup>2</sup>)と範囲も示す。



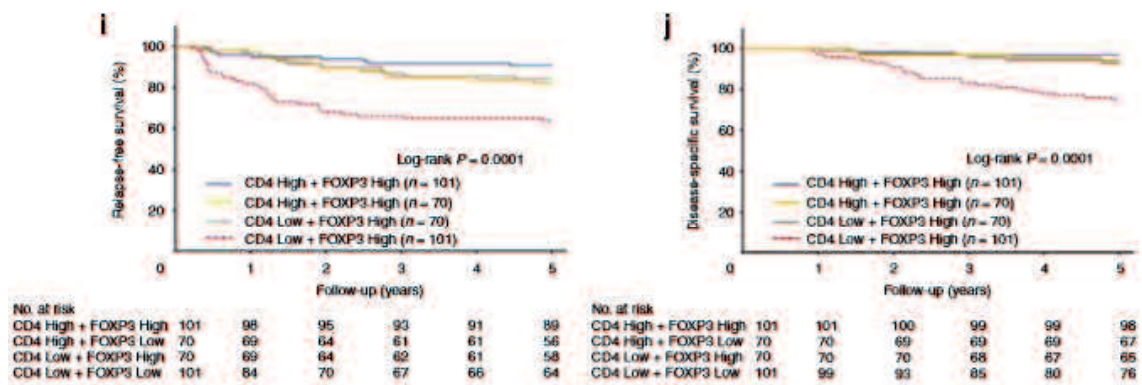


図3 腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の高浸潤群と低浸潤群による術後生存曲線。

- a CD3 陽性細胞浸潤に応じた無再発生存(RFS)。
- b CD3 陽性細胞浸潤に応じた疾患特異的生存(DSS)。
- c CD8 陽性細胞浸潤に応じた RFS。
- d CD8 陽性細胞浸潤に応じた DSS。
- e CD4 陽性細胞浸潤に応じた RFS。
- f CD4 陽性細胞浸潤に応じた DSS。
- g FOXP3 陽性細胞浸潤に応じた RFS。
- h FOXP3 陽性細胞浸潤に応じた DSS。
- i CD4 陽性および FOXP3 陽性の細胞密度に応じた RFS。
- j CD4 陽性および FOXP3 陽性の両方の細胞密度に応じた DSS。

高細胞密度と低細胞密度を区別するためのカットオフ値は、CD3、CD8、CD4、および FOXP3 でそれぞれ 339.1、72.2、64.6、および 75.3(cells/mm<sup>2</sup>)。



表2 CRC患者におけるDSSによる単変量および多変量Cox比例ハザード分析

	DSS					
	Univariate			Multivariate		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Sex	1.29	0.68–2.49	0.4363			
Age	1.05	0.54–2.12	0.8866			
Location	0.88	0.46–1.73	0.7118			
T stage	1.89	0.83–4.32	<0.0001	0.72	0.31–1.67	0.0181
N stage	1.82	0.94–3.47	0.0747			
Histologic grade	1.5	0.36–4.19	0.008			
Vascular emboli and lymphatic invasion	0.18	0.07–0.41	<0.0001	0.3	0.12–0.73	0.0029
CD3 density	0.52	0.26–1.01	0.053			
CD4 density	0.22	0.09–0.47	<0.0001	0.27	0.12–0.61	0.0004
CD8 density	0.46	0.22–0.90	0.0221			
FOXP3 density	0.26	0.11–0.54	0.0002			
MSI status	0.81	0.13–2.65	0.7587			
Adjuvant therapy	1.36	0.70–2.75	0.3674			

*DSS disease-specific survival, CRC colorectal cancer, HR hazard ratio, CI confidence interval, MSI microsatellite instability, MSI-H microsatellite instability-high, MSS microsatellite stable, FOXP3 forkhead box P3*

表3 CRC患者におけるTILとMSIの関係(n = 322)

**Table 3. Density of TILs in CRC patients according to MSI status (n = 322)**

	MSI status				P
	Patients with MSI-H tumours		Patients with MSS tumours		
	n = 23		n = 299		
	No.	%	No.	%	
<i>CD3 density</i>					0.0212
High	18	78.3	148	49.5	
Low	5	21.7	151	50.5	
<i>CD8 density</i>					0.0153
High	17	73.9	144	48.2	
Low	6	26.1	155	51.8	
<i>CD4 density</i>					0.8287
High	12	52.2	149	49.8	
Low	11	47.8	150	50.2	
<i>FOXP3 density</i>					0.8287
High	11	47.8	150	50.2	
Low	12	52.2	149	49.8	

*TILs* tumour-infiltrating lymphocytes, *CRC* colorectal cancer, *MSI-H* microsatellite instability high, *MSS* microsatellite stable, *FOXP3* forkhead box P3

表S1 病期に応じたCRC患者の術後補助化学療法療法

**Table S1. Adjuvant therapy in CRC patients according to disease stage**

Stage	Adjuvant therapy: Fluoropyrimidines		
	Yes (n = 198)	No (n = 144)	Total (n = 342)
I	10 (11)	78 (89)	88 (100)
II	91 (64)	51 (36)	142 (100)
III	97 (87)	15 (13)	112 (100)

CRC, colorectal cancer

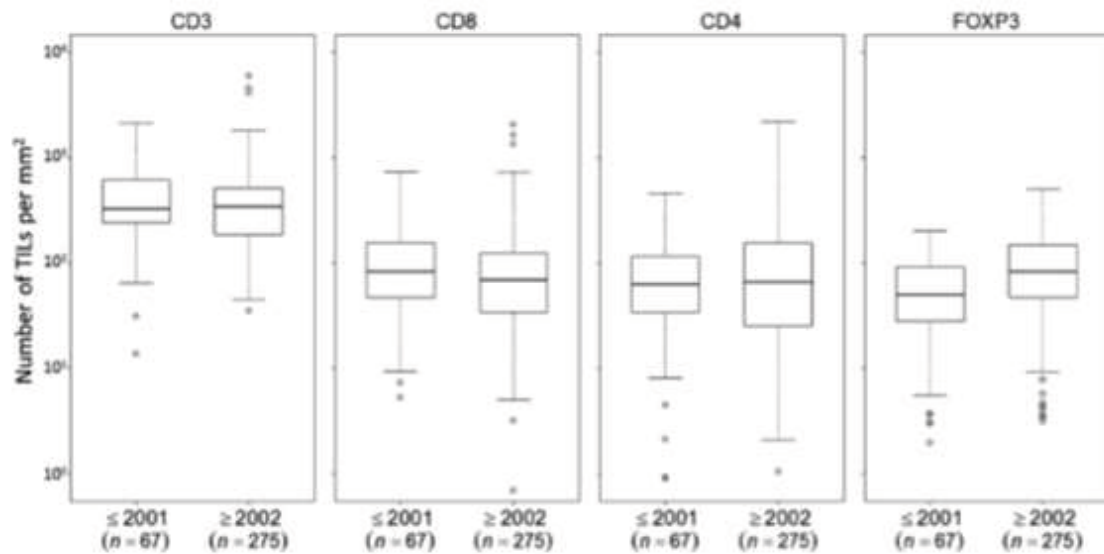


図 S1 研究期間の前半と後半の間の全てのマーカーの陽性細胞数。

2001年以前と2002年以後の1mm<sup>2</sup>の組織間では、CD3、CD8、およびCD4陽性細胞の平均数に有意差は認めなかった。2002年以後と比較して2001年以前のFOXP3陽性細胞に減少傾向を認めたが、これらの違いは本研究の結果に影響を与えないと判断した。

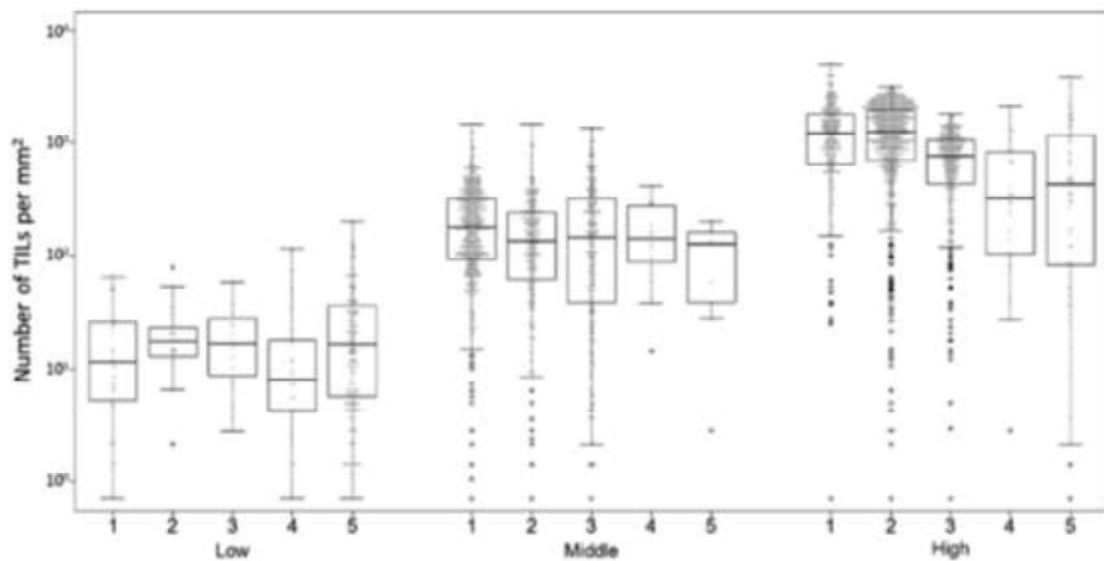


図 S2 1mm<sup>2</sup>組織間のCD3陽性細胞数の分布。

腫瘍内の不均一性を分析するために、15症例で1mm<sup>2</sup>の組織単位中のCD3陽性細胞数を評価した。この分析では、CD3陽性細胞の低浸潤、中等度浸潤、および高浸潤の症例から5症例ずつ選択した。1mm<sup>2</sup>あたりに含まれるCD3陽性細胞数は、低浸潤、中浸潤、高浸潤でそれぞれ0~205、0~1479、0~5070(cells/mm<sup>2</sup>)だった。