

学位論文（博士）

Siglec-7 is a predictive biomarker
for the efficacy of cancer vaccination
against metastatic colorectal cancer

(Siglec-7 は転移性結腸直腸癌に対する
ワクチン療法の効果予測バイオマーカーである)

氏名 山田 健介

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 消化器・腫瘍外科学講座

令和2年11月

目次

1. 要旨	3
2. 背景	3
3. 方法	4
4. 結果	7
5. 考察	9
6. 謝辞	11
7. 参考文献	11
8. 図表	17

1. 要旨

背景：ワクチン療法を含むがん免疫療法は、科学的・医学的に大きなブレイクスルーと考えられている。しかし、がん免疫療法では、結腸直腸癌（CRC）に対して持続的、客観的な反応は得られていない。そこで本研究では、免疫療法の効果を高めるために、免疫療法に良好な反応が期待できる患者を選択するためのいくつかのバイオマーカーを検討した。

方法：まず、5種類のヒト白血球抗原（HLA）-A*24:02 拘束性ペプチドを投与した第II相試験登録患者の腫瘍組織抽出物を用いて、タンパク網羅的解析を行った。シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン（Siglec）-7が効果予測バイオマーカー候補として選択され、さらにウエスタンブロット法および免疫蛍光染色を用いて検証された。免疫蛍光染色で検出されたSiglec-7の発現量を定量化し、ペプチドワクチンを投与された患者の全生存期間（OS）との関連を検討した。さらに、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）がCRCの予後に重要な役割を果たすことを考慮し、CRC組織におけるCD3+、CD4+、CD8+およびフォークヘッドボックスP3（FOXP3）+T細胞の密度を調べ、Siglec-7の発現量と比較した。

結果：タンパク網羅的解析およびウエスタンブロット法では、OSが2年以下の予後不良群でSiglec-7の平均発現量が有意に高かった（各々 $P=0.016$ 、 0.025 ）。免疫蛍光染色の結果、Siglec-7は腫瘍内マクロファージに発現していることが明らかになった。また、HLA-A*24:02適合群では、Siglec-7が高発現している患者のOSは、Siglec-7が低発現している患者に比べて有意に短かった（ $P=0.017$ ）。しかし、HLA非適合群ではこの差は認められなかった。また、TIL数によるOSの有意差は認められず、TIL数とSiglec-7発現との間にも有意な相関は認められなかった。

結論：腫瘍組織中のマクロファージにおけるSiglec-7発現は、転移性CRCに対する免疫療法の有効性を予測する新たなバイオマーカーとなる可能性がある。

2. 背景

CRCは、男女ともに第3位の癌関連死亡の原因である(1)。過去10年間で、化学療法や分子標的治療により転移性CRC患者のOSは約30カ月にまで改善している(2)。しかし、これらの薬剤には薬剤耐性や副作用などの限界があるため、転移拡大を防ぎ、生存率を向上させるための新たな治療法の開発が必要とされている(3)。

がん免疫療法は、科学的・医学的に大きなブレイクスルーと考えられており(4)、いくつかの免疫チェックポイント阻害剤は、様々ながん患者のOSを向上させ、食品医薬品局によって承認されている(5,6)。例えば、PD-1阻害剤であるニボルマブやペムブロリズマブは、世界的に見てもミスマッチ修復機能欠損（dMMR）や高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）を有するCRCに使用されている(7,8)。

しかし、ミスマッチ修復機能が保たれた（pMMR）CRCに対する免疫チェックポイント阻害剤を含む免疫療法は、CRCに対し持続的、客観的な反応が得られていない(9,10)。免疫療法の有効性を向上させるためには、2つのアプローチが必要である。一つは、T細胞の浸

潤がないことを特徴とする「cold tumor」を、炎症性サイトカインの蓄積と T 細胞の浸潤を特徴とする「hot tumor」に変化させるための併用療法である(5,11)。もう一つは、免疫療法への良好な反応が期待できる患者を選択するためのバイオマーカーの同定である。

本研究の著者らは以前、進行 CRC 患者に 5 種類のエピトープペプチドを投与した第 I 相および第 II 相試験を報告している(12,13)。これらの研究では、好中球/リンパ球比が低く、血漿中インターロイキン (IL) -6 レベルが低いことが、ワクチン療法を受けた患者の生存期間を改善する潜在的なマーカーとなっていた(14,15)。さらに、いくつかの miRNA や血漿中のセルフフリー DNA のインテグリティが、エピトープペプチドを用いた能動免疫療法の予測バイオマーカーとなることも示されている(15-18)。

本研究では、免疫療法の有効性を高めるために、免疫療法に反応性の高い患者を選択するための新規予測バイオマーカーを同定することを目的とした。この目的のために、腫瘍組織中のタンパク網羅的解析を行い、Siglec-7 を免疫療法の効果予測バイオマーカー候補として選択した。

Siglec は、自然免疫細胞と獲得免疫細胞の両方に存在する膜貫通型受容体のファミリーであり、細胞表面のシアル酸を認識することで自己細胞と非自己細胞の区別に関与している(19,20)。Siglec ファミリーの 7 番目のメンバーである Siglec-7 は、主にナチュラルキラー (NK) 細胞、単球、マクロファージ、および CD8+ T 細胞のごく一部のサブセットで発現し(21,22)、抑制性受容体として作用する。Siglec-7 の細胞質部分には、免疫受容体抑制性チロシンモチーフ (ITIM) が含まれており、これは SH2 ドメイン含有チロシンホスファターゼ (SHP) -1 および SHP2 をリクルートすることにより阻害シグナルを伝達する(22)。SHP1 と SHP2 は、NKG2D 経路などの NK 細胞活性化経路を阻害し、腫瘍細胞に対する NK 細胞の細胞毒性を抑制する(23)。しかし、これまでがん免疫療法との関連は評価されていない。本研究では、Siglec-7 が能動免疫療法の新規バイオマーカーとなり得るかを評価した。

3. 方法

【第 II 相試験の概要】

がんワクチン療法の臨床的有用性を評価するために、KOC1(24)、TOMM34(25)、RNF43(26)、VEGFR1 および 2(27,28) を含む 5 つのヒト白血球抗原 (HLA) -A*24:02 拘束性ペプチドを用いた第 II 相試験を実施した。この第 II 相試験は、HLA-A の状態を二重盲検とした非無作為化試験であった。この第 II 相試験の詳細なプロトコールは以前に記載されている(13)。要約すると、治療はオキサリプラチンを含む化学療法に加えて、5 種類のエピトープペプチドカクテルで構成された。5 種類のペプチドをそれぞれ 3mg ずつ含むカクテルを、不完全フロイントアジュバント 1.5ml と混合し、13 週間、毎週大腿部または腋窩に皮下投与し、その後は 2 週間に 1 回投与した。対象は、組織学的に CRC と確認された、20 歳以上の進行再発 CRC 患者で、化学療法の既往がなく、主要臓器機能が保たれており、予後

が3ヶ月以上見込まれる症例とした。2009年2月から2012年11月までの間に、96人の患者が登録された。

【患者と組織サンプル】

第II相試験に登録された96人の患者（HLA-A*24:02 適合群 50例、非適合群 46例）から、63のCRC原発巣組織のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織標本が得られた（HLA-A*24:02 適合群 32例、非適合群 31例）（図1）。HLA-A*24:02 適合群 32例のうち14例では、新鮮組織も液体窒素で急速凍結し-80°Cで保存した。CRC 原発巣組織は、山口大学医学部附属病院および関連病院でのワクチン治療前に、手術により採取された。すべてのサンプルは、書面によるインフォームドコンセントを得た。本研究は山口大学の倫理審査委員会によって承認され（承認番号：H20-102、臨床試験登録番号：UMIN000001791）、ヘルシンキ宣言に従って実施された。

【腫瘍組織のタンパク網羅的解析】

腫瘍組織抽出液のタンパク網羅的解析は、SOMAscan (SomaLogic, Inc.) を用いて行なわれ、1129の生物学的に関連するタンパクを定量化した(29)。凍結CRC組織サンプルは、OSが3年以上または2年未満の患者から入手可能であった(図1)。製造元のプロトコールに従って、凍結CRC組織サンプルの全タンパクを、Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を加えた溶解バッファータ-T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific) 中で、Qiagen TissueLyser (Qiagen, Valencia, CA) を用いて抽出した。抽出液をSomaLogicに送り、SOMAscanアッセイを用いて分析した。このアッセイでは、タンパクシグナルを化学的に修飾されたヌクレオチドを用いてヌクレオチドシグナルに変換し、マイクロアレイ上の相対蛍光シグナルを用いて定量することができるようにした。このため、SOMAscan測定値は相対蛍光単位(RFU)として提示された。

【ウエスタンブロット法】

ウエスタンブロット法は、SOMAscanによるタンパク網羅的解析と同じ抽出物を使用して、以前に記載されたように実施した(30)。要約すると、タンパクサンプル(10 μ g)を10% SDS-PAGEで分離し、PVDF膜(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)に転写した。PVDF膜は、3%スキムミルクと共に30分間室温でブレインキュベートすることによりブロックされ、その後、抗Siglec-7抗体(Proteintech, Chicago, IL)と共に4°Cで一晩インキュベートされた。Tween 20含有トリス緩衝生理食塩水(TBST)で3回洗浄した後、膜を対応する二次抗体と共に室温で1時間インキュベートした。免疫反応は、増強化学発光(ECL)ウエスタンブロッティング検出システムとAmersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK)を使用して検出した。密度分析は、ImageJソフトウェア(National Institutes of Health) (31)を用いて行った。ハウスキーピングタンパクの一つであるVCPのタンパクレベルは、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)やアクチンなどの他のハウスキーピングタンパクと比較して安定しているため、VCPをロ

ーディングコントロールとして選択した (30,32,33)。

【免疫組織化学染色】

免疫組織化学染色は、4 μ m 厚の FFPE 切片を用いて行った。Siglec-7 を染色するために、切片をキシレンおよび段階的に濃度を増したアルコールを通して脱パラフィン化した。抗原賦活化は、pH9.0 の 10mM Tris-EDTA 緩衝液 (Dako、Carpinteria、CA) 中で、マイクロ波を用いて 95°C に 20 分間加熱して行った。切片中の内因性ペルオキシダーゼ活性を 3% 水素ペルオキシダーゼで 20 分間ブロックし、非特異的タンパク質結合を Protein Block Serum-Free (Dako) で 10 分間ブロックした。染色手順は、製造業者のプロトコールに従って Dako Autostainer (Dako) で行った。切片を、抗 Siglec-7 抗体 (ウサギポリクローナル、13939-1-AP、Proteintech ; 800 倍希釈) と共に室温で 1 時間インキュベートした。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗浄した後、切片を対応する二次抗体と共に 30 分間インキュベートした。反応は、3,3'-ジアミノベンジジンクロモゲン (DAB、Dako) で可視化し、メイヤーのヘマトキシリンで対比染色した。画像は、蛍光顕微鏡 BZ-X710 (KEYENCE、東京、日本) を用いて撮影した。

TIL が CRC の予後に重要な役割を果たしていることを考慮し、CRC 組織における CD3+、CD4+、CD8+、FOXP3+ T 細胞の密度も計測した。TIL の免疫組織化学染色は、以前に記載されているように実施した(34,35)。簡潔に述べると、Ventana Discovery XT 染色システム (Ventana、Tucson、AZ、USA) を用いて、切片を抗 CD3 抗体 (マウスモノクローナル、518110079、Ventana)、抗 CD4 (マウスモノクローナル、518108816、Ventana)、抗 CD8 (マウスモノクローナル、IR623、Dako; 50 倍希釈)、および抗 FOXP 抗体 (マウスモノクローナル、ab20034、Abcam ; 100 倍希釈) と共にインキュベートした。顕微鏡画像は、高解像度デジタルスライドスキャナ NanoZoomer-XR C12000 (浜松ホトニクス、浜松、日本) を用いて撮影した。

【免疫蛍光染色】

4 μ m 厚の FFPE 切片を用いて、免疫組織化学染色と同様に免疫蛍光染色を行った。切片を脱パラフィン化し、pH9.0 の 10mM Tris-EDTA 緩衝液 (Dako) 中で、マイクロ波を用いて 95°C に 20 分間加熱し、抗原賦活化を行った。非特異的タンパク質結合を Protein Block Serum-Free (Dako) で 10 分間ブロックした。切片を、抗体混合液 (800 倍希釈抗 Siglec-7 抗体、および 400 倍希釈抗 CD68 抗体 ; マウスモノクローナル、Ab783、Abcam) と共に 4°C で一晩インキュベートした。翌日、PBS で 3 回洗浄した後、切片を二次抗体混合液 (1000 倍希釈抗マウス Alexa Fluor 568 および 1000 倍希釈抗ウサギ Alexa Fluor 488; Thermo Fisher Scientific) と共に室温で 60 分間インキュベートした。スライドは、核を可視化するために DAPI ブルーで対比染色した。すべての染色手順を手動で行い、染色された切片を蛍光顕微鏡 BZ-X710 (KEYENCE ; 200 倍) を用いて可視化し、撮影した。各切片から、腫瘍の中心付近で Siglec-7 陽性細胞および CD68 陽性細胞の密度が最も高い 10 個のフィールドを、観察者が手動で選択した。画像は、Siglec-7 および CD68 の発現量を定量化するために、ImageJ

(NIH) を用いた陽性画素数アルゴリズムで解析した。しきい値強度は、Siglec-7 および CD68 染色ともに 40 に設定した。結果は、観察視野の面積に対する総陽性面積の割合として示された。

【TIL の分析】

TIL の免疫組織化学染色に基づいて、以前に記載されたように TIL 数を測定した(34,35)。簡潔に述べると、腫瘍内浸潤 CD3+、CD4+、CD8+、および FOXP3+細胞を TIL と定義し、それらの数を測定した。腫瘍周囲の間質および腫瘍外リンパ構造に見られる細胞は、この分析から除外した。コンピュータ化された画像解析システム Tissue Studio (Definiens、ミュンヘン、ドイツ) を使用して、すべての腫瘍病変をスコア化した。TIL 数は、腫瘍組織 1 平方ミリメートル当たりの陽性細胞の平均数として記録された。

【統計解析】

包括的タンパク質解析において、タンパク質発現量の差異を、Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation、Redmond、WA、USA) を用いた log2 比および Fisher 比を用いて検出した (36)。タンパク質 k についての log2 比は、次の式に従って計算した：log₂比

$= \log_2 \left(\frac{\bar{x}_k(\text{予後良好群})}{\bar{x}_k(\text{予後不良群})} \right)$ 、ここで、 $\bar{x}_k(\cdot)$ は、予後良好群または予後不良群のサンプル平均の k 番目のタンパク質である。タンパク質 k に対する Fisher 比 F は、以下の式を用いて

算出した。 $F(k) = \frac{[\bar{x}_k(\text{予後良好群}) - \bar{x}_k(\text{予後不良群})]^2}{\frac{1}{2}[s_k^2(\text{予後良好群}) + s_k^2(\text{予後不良群})]}$ 、ここで $s_k^2(\cdot)$ は予後良好群または予

後不良群の標本分散の k 番目のタンパク質である。

2 群間の差は、Welch の t 検定を用いて推定された。これは、最近の統計学的勧告やシミュレーション研究では、分散の等しさに関わらずこの検定を用いることが示唆されているため、この研究のために選択された(37)。カテゴリー変数は、 χ^2 検定またはフィッシャーの正確検定を用いて比較された。2 群間の相関の強さは、Spearman の順位相関係数によって評価した。Siglec-7、CD3、CD4、CD8 および FOXP3 の発現レベルの最適カットオフ値は、中央値または Kaplan-Meier (KM) 推定法および Youden 指数 (感度 + 特異度 - 1) を用いた時間依存受信者動作特性曲線 (ROC) 分析のいずれかを用いて決定した (38)。生存曲線は KM 法を用いて推定し、ログランク検定を用いて検定した。すべての統計解析は、64-bit Windows R 言語 (バージョン 3.6.1、R Development Core Team) を用いて行った。P<0.05 は、統計的有意差を示すと考えられた。

4. 結果

【効果予測バイオマーカーとなり得る候補タンパクの選択】

HLA-A*24:02 適合群 13 例の凍結 CRC 組織サンプルにおける 1129 のタンパクの発現量を網羅的に解析した。OS が 3 年以上の予後良好群 7 例と OS が 2 年以下の予後不良群 6 例

に分けた。両群のタンパク発現量を比較すると、log2 比の絶対値 ≥ 1 、Fisher 比 ≥ 1 を満たすタンパク質は 23 個あり、そのうち Fisher 比が最も高い 10 個のタンパク質を表 I に示した。予後良好群の sonic hedgehog (SHH) の発現量は予後不良群に比べて有意に高かった ($P=0.022$)。一方、Siglec-7 および fibronectin の発現量は、予後不良群の方が予後良好群よりも有意に高かった (各々 $P=0.016$ 、 0.025)。その中で P 値が最も低かい Siglec-7 が候補タンパク質として選択された。

【ウエスタンブロット法による候補タンパク発現の確認】

SOMAscan による網羅的解析で得られた結果を検証するために、SOMAscan で用いたものと同じ 13 サンプルを用いてウエスタンブロット法を行った (図 2A)。図 2A に示すように、レーン # 9 のタンパク質バンドは、他のものに比べて低い位置に認められた。Siglec-7 は 3 つのアイソフォームを有しており、短い方のアイソフォームが他の患者に比較し患者 # 9 の腫瘍組織で高度に発現していた可能性がある。Siglec-7 の発現量は、SOMAscan とウエスタンブロット法との間に正の相関を示した ($r_s=0.758$ 、 $P=0.00268$; 図 2B)。また、SOMAscan とウエスタンブロット法のいずれも、Siglec-7 の平均発現量は予後不良群で有意に高かった (各々 $P=0.016$ 、 0.025 ; 図 2C および D)。これらの結果から、HLA-A*24:02 適合群では、CRC 組織中の Siglec-7 発現量が予後不良群で有意に高いことが示唆された。

【腫瘍組織における Siglec-7 の局在】

CRC 組織における Siglec-7 の局在を同定するために、免疫組織化学染色および免疫蛍光染色を行った。免疫組織化学染色は、Siglec-7 が腫瘍細胞間またはその周辺の間質細胞に発現することを示した (図 3A)。免疫蛍光染色では、Siglec-7 は CD68 を同時に発現している間質細胞に発現することが示された (図 3B)。これらの結果から、Siglec-7 は腫瘍内マクロファージで発現することが示唆された。

【効果予測バイオマーカーとしての Siglec-7 の検証】

HLA-A*24:02 適合群 32 例および非適合群 31 例からの 63 の CRC 組織サンプルにおける Siglec-7 発現レベルを、免疫蛍光染色を用いて測定した (図 1; 表 II)。Siglec-7 の発現量は、HLA-A*24:02 適合群では 0.00001% から 7.81% (中央値、0.0279%)、HLA-A*24:02 非適合群では 0.0400% から 0.457% (中央値、0.120%) の範囲であった。本研究におけるタンパク網羅的解析は、ステージ IV 症例の生存率に基づいて行われた。ステージ IV の CRC 患者の全生存期間中央値は約 3 年であるため、最適なカットオフ値は 36 ヶ月の ROC 曲線解析を用いて決定した。この解析は、HLA-A*24:02 適合群を対象としたが、これは HLA 拘束性ペプチドワクチンが HLA 適合群で理論的に有効であるためである。カットオフ値は、観察視野面積に対する Siglec-7 の総陽性面積の割合として示された。Siglec-7 発現のカットオフ値として 0.213% が選択された。HLA-A*24:02 適合群では、Siglec-7 が高発現している患者の OS は、Siglec-7 が低発現の患者の OS よりも有意に短かった ($P=0.017$; 図 3C)。一方、HLA-A*24:02 非適合群では、Siglec-7 発現の高低で OS に差はなかった ($P=0.910$; 図 3D)。Siglec-7 が低発現の患者では、HLA-A*24:02 適合群と非適合群で OS に有意差を認め

た一方で (P=0.041; 図 S1A)、Siglec-7 が高発現の患者では差を認めなかった (P=0.179; 図 S1B)。腫瘍組織における Siglec-7 の発現量は、CD68 の発現量と相関していた ($r_s=0.786$, $P<0.001$; 図 S2A)。しかし、HLA-A*24:02 適合群では、CD68 発現量の高低で OS に有意差を認めなかった (P=0.528; 図 S2B)。これらの結果から、腫瘍微小環境における Siglec-7 発現は、ワクチン療法の効果予測バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

【TIL 浸潤および予後と Siglec-7 発現との関連】

TIL は CRC のバイオマーカーとして報告されているため、Siglec-7 解析に用いたものと同様の HLA-A*24:02 適合群 32 例の CRC 組織サンプルを用いて免疫組織化学染色を行い解析した (図 S3)。36 ヶ月の ROC 曲線解析を用いて、CD3+、CD4+、CD8+、FOXP3+ 細胞密度の最適カットオフ値をそれぞれ 440.1、133.8、52.6、17.8 と決定した。CD4+、CD8+、FOXP3+T 細胞を含む TIL 数の高低で OS に有意差はなかった (P=0.319、0.605、0.242; 図 4) 一方で、CD3+T 細胞浸潤が多い患者ほど OS が良好な傾向を認めた (P=0.065)。次に、CRC 組織における Siglec-7 発現と TIL との相関を調査した。免疫蛍光染色で検出された Siglec-7 の発現量と、免疫組織化学染色での CD3+、CD4+、CD8+、FOXP3+T 細胞数との間には、有意な関連は認められなかった (各 P=0.565、0.154、0.982、0.676; 図 5)。これらの所見は、リンパ球とマクロファージ浸潤が独立している可能性を示唆している。

5. 考察

本研究の目的は、免疫療法の有効性を治療前に予測するための新規バイオマーカーとなるタンパクを探索することであった。第一に、転移性 CRC に対するペプチドワクチン療法を受けた患者において、腫瘍組織における Siglec-7 の高発現は、短い OS と関連していることが示された。第二に、Siglec-7 は CRC 組織内のマクロファージに発現していることが示された。さらに、Siglec-7 の発現量と CRC 組織内の TIL 数との間には有意な相関は認められなかった。これらの結果から、腫瘍内マクロファージにおける Siglec-7 の高発現は、転移性 CRC に対するワクチン療法効果の負のバイオマーカーとなりうることが示唆された。我々の知る限りでは、Siglec-7 と CRC の予後との関係を示した初めての報告である。

タンパク網羅的解析では、予後良好群と予後不良群では、Siglec-7、SHH、fibronectin の発現量に有意差が認められた。SHH は hedgehog シグナル伝達経路のリガンドであり、胚発生や発癌に重要である (39)。SHH の発現亢進は、CRC を含む様々な悪性腫瘍患者の予後不良と関連しているが (40,41)、本研究ではこの点で反対の結果が得られた。さらに、fibronectin はインテグリン受容体ファミリーの多くのメンバーのリガンドであり、細胞接着、遊走、増殖、分化に関与している (42)。Fibronectin と CRC との関係は既に報告されているため (43,44)、CRC に対するワクチン療法におけるバイオマーカーとして新たな役割を見出すことは困難であった。これらの理由から、SHH と fibronectin は効果予測バイオマーカーの候補として除外された。

腫瘍組織における Siglec-7 の低発現は、HLA-A*24:02 適合群では予後改善と関連してい

たが、非適合群では関連していなかった。HLA 拘束性エピトープペプチドは、理論的には HLA 適合症例でのみ抗腫瘍効果を示す。また、本研究では HLA-A*24:02 適合群のみがワクチン治療群と見なされた。したがって、Siglec-7 発現の高低による OS の差は HLA-A*24:02 適合群のみで認められ、Siglec-7 は CRC の予後マーカーではなく、ワクチン療法の予測バイオマーカーであることが示された。

CD33 関連 Siglec-7 の 1 つである Siglec-7 は、主に NK 細胞および単球/マクロファージで発現している(22)。Siglec-7+細胞の分布は、末梢血と結腸粘膜固有層で異なることが報告されている(45)。末梢血では Siglec-7+細胞の 75%が NK 細胞、8%が単球であった。一方で、結腸粘膜固有層では Siglec-7+細胞の 76%が単球/マクロファージ系であり、4%が NK 細胞であった。本研究では、Siglec-7 は CRC 組織の CD68+細胞に多く認められたことから、腫瘍内マクロファージが Siglec-7 を発現していることが示唆された。マクロファージにおける Siglec-7 の役割については、これまであまり検討されてこなかったが、Siglec-7 と 84%の配列相同性を持つもう一つの CD33 関連 Siglec である Siglec-9 は、マクロファージにおいて抑制的な役割を果たしていることが報告されている(46)。具体的には、Siglec-9 は炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF) α の産生を抑制し、ITIM を介して抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生を強力に増加させることが報告されている(47)。したがって、Siglec-7 を発現するマクロファージが、抗炎症性サイトカイン TNF- α の分泌減少と抗炎症性サイトカイン IL-10 の分泌増加を媒介し、結果として腫瘍微小環境の免疫抑制をもたらすのではないかという仮説が立てられた。腫瘍微小環境に関連するもう一つの因子である MSI も本研究で解析したところ、MSI-H を有する CRC は 1 例のみであった(データは示されていない)。MSI-H を有する CRC では Siglec-7 発現量は低かったが、CRC 組織における Siglec-7 発現量と MSI との関係は統計学的に不適切であったため解析しなかった。

がんワクチン療法は、腫瘍抗原特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) を誘導することで抗腫瘍効果を示す。がん免疫サイクルで示されるように(48)、注入された HLA 拘束性エピトープペプチドは、HLA 分子を介して樹状細胞によって捕捉され、T 細胞に提示される。その後、活性化された腫瘍抗原特異的 CTL が腫瘍に浸潤し、標的癌細胞を認識して傷害する。しかし、CTL は腫瘍微小環境において PD-L1 や IL-10 やトランスフォーミング増殖因子 (TGF) β などの免疫抑制性メディエーターによってその機能が阻害されている可能性がある(49,50)。Siglec-7 は、TNF- α や IL-10 の分泌を介した腫瘍微小環境の免疫抑制を媒介することで CTL の障害となり、転移性 CRC に対するワクチン療法の効果が抑制される可能性がある。これらのメカニズムは、HLA-A*24:02 適合症例の腫瘍内マクロファージにおける Siglec-7 の高発現と予後不良との関連を説明する可能性がある。

TIL、特に CD3+および CD8+ T 細胞は、CRC の予後バイオマーカーである(28,51)。例えば、腫瘍内の CD3+および CD8+ T 細胞密度とその浸潤縁に基づくスコアリングシステム (Immunoscore) は、CRC 患者の強力な予後因子であることが実証されている(52,53)。本研究では、Siglec-7 の発現は CD3+、CD4+、CD8+、FOXP3+ T 細胞とは関連していな

かった。Siglec-7 は TIL とは独立したバイオマーカーであることが示唆された。Siglec-7 の解析は、腫瘍微小環境におけるリンパ球ではなくマクロファージを評価することで、このような結果につながった可能性がある。

しかし、本研究にはいくつかの限界があった。第一に、この研究に登録された患者の数が少ないことである。第二に、交絡因子を調整するための臨床病理学的因子を含む多変量解析は、患者数が少ないため統計的に不適切であったため実施されなかった。第三の制限は、メカニズムの研究の欠如である。しかし、腫瘍環境における Siglec-7 の機能を理解することは、cold tumor を hot tumor に変化させるなどの新規免疫療法戦略につながる可能性がある。例えば、Siglec は薬物送達に適したエンドサイトーシス受容体であるため、Siglec-7 特異的抗体を毒素または化学療法剤に結合させて Siglec-7 陽性マクロファージを枯渇させることが可能かもしれない (54)。最後に、Siglec-7 発現と PD-1、PD-L1 および HLA 発現を含む他の免疫学的に重要な分子との関係は評価されなかった。

結論として、腫瘍組織中のマクロファージにおける Siglec-7 発現は、転移性 CRC に対する免疫療法の新たな効果予測バイオマーカーとなる可能性がある。バイオマーカーとしての Siglec-7 の有用性を確認し、腫瘍微小環境における Siglec-7 の役割を解析するためには、さらなる研究が必要である。

6. 謝辞

本研究にあたり、ご指導頂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裕 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. Siegel RL, Miller KD and Jemal A: Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 70: 7–30, 2020.
2. Loupakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L, Cortesi E, Tomasello G, Ronzoni M, Spadi R, et al: Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 371: 1609–1618, 2014.
3. Sanchez-Castañón M, Er TK, Bujanda L and Herreros-Villanueva M: Immunotherapy in colorectal cancer: What have we learned so far? *Clin Chim Acta* 460: 78–87, 2016.
4. Myint ZW and Goel G: Role of modern immunotherapy in gastrointestinal malignancies: a review of current clinical progress. *J Hematol Oncol* 10: 86, 2017.
5. Hazama S, Tamada K, Yamaguchi Y, Kawakami Y and Nagano H: Current status of immunotherapy against gastrointestinal cancers and its biomarkers: Perspective for precision immunotherapy. *Ann Gastroenterol Surg* 2: 289–303, 2018.
6. Kono K: Advances in cancer immunotherapy for gastroenterological malignancy. *Ann Gastroenterol Surg* 2: 244–245, 2018.

7. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, Lu S, Kemberling H, Wilt C, Luber BS, et al: Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 357: 409–413, 2017.
8. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz H, Morse MA, Desai J, Hill A, Axelson M, Moss RA, et al: Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* 18: 1182–1191, 2017.
9. Nagorsen D and Thiel E: Clinical and immunologic responses to active specific cancer vaccines in human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 12: 3064–3069, 2006.
10. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Luber BS, Azad NS, Laheru D, et al: PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 372: 2509–2520, 2015.
11. Duan Q, Zhang H, Zheng J and Zhang L: Turning Cold into Hot: Firing up the Tumor Microenvironment. *Trends Cancer* 6: 605-618, 2020.
12. Hazama S, Nakamura Y, Takenouchi H, Suzuki N, Tsunedomi R, Inoue Y, Tokuhisa Y, Iizuka N, Yoshino S, Takeda K, et al: A phase I study of combination vaccine treatment of five therapeutic epitope-peptides for metastatic colorectal cancer; safety, immunological response, and clinical outcome. *J Transl Med* 12: 63, 2014.
13. Hazama S, Nakamura Y, Tanaka H, Hirakawa K, Tahara K, Shimizu R, Ozasa H, Etoh R, Sugiura F, Okuno K, et al: A phase I study of five peptides combination with oxaliplatin-based chemotherapy as a first-line therapy for advanced colorectal cancer (FXV study). *J Transl Med* 12: 108, 2014.
14. Hazama S, Takenouchi H, Tsunedomi R, Iida M, Suzuki N, Iizuka N, Inoue Y, Sakamoto K, Nakao M, Shindo Y, et al: Predictive biomarkers for the outcome of vaccination of five therapeutic epitope peptides for colorectal cancer. *Anticancer Res* 34: 4201–4206, 2014.
15. Shindo Y, Hazama S, Nakamura Y, Inoue Y, Kanekiyo S, Suzuki N, Takenouchi H, Tsunedomi R, Nakajima M, Ueno T, et al: miR-196b, miR-378a and miR-486 are predictive biomarkers for the efficacy of vaccine treatment in colorectal cancer. *Oncol Lett* 14: 1355–1362, 2017.
16. Kijima T, Hazama S, Tsunedomi R, Tanaka H, Takenouchi H, Kanekiyo S, Inoue Y, Nakashima M, Iida M, Sakamoto K, et al: MicroRNA-6826 and-6875 in plasma are valuable non-invasive biomarkers that predict the efficacy of vaccine treatment against metastatic colorectal cancer. *Oncol Rep* 37: 23–30, 2017.
17. Tanaka H, Hazama S, Iida M, Tsunedomi R, Takenouchi H, Nakajima M, Tokumitsu Y, Kanekiyo S, Shindo Y, Tomochika S, et al: miR-125b-1 and miR-378a are predictive biomarkers for the efficacy of vaccine treatment against colorectal cancer. *Cancer Sci* 108:

2229–2238, 2017.

18. Kitahara M, Hazama S, Tsunedomi R, Takenouchi H, Kanekiyo S, Inoue Y, Nakajima M, Tomochika S, Tokuhisa Y, Iida M, et al: Prediction of the efficacy of immunotherapy by measuring the integrity of cell-free DNA in plasma in colorectal cancer. *Cancer Sci* 107: 1825–1829, 2016.

19. Crocker PR, Paulson JC and Varki A: Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* 7: 255–266, 2007.

20. Frascilla I and Pillai S: Viewing Siglecs through the lens of tumor immunology. *Immunol Rev* 276: 178–191, 2017.

21. Matsumoto T, Takahashi N, Kojima T, Yoshioka Y, Ishikawa J, Furukawa K, Ono K, Sawada M, Ishiguro N and Yamamoto A: Soluble Siglec-9 suppresses arthritis in a collagen-induced arthritis mouse model and inhibits M1 activation of RAW264.7 macrophages. *Arthritis Res Ther* 18: 133, 2016.

22. Nicoll G, Ni J, Liu D, Klenerman P, Munday J, Dubock S, Matei MG and Crocker PR: Identification and characterization of a novel siglec, siglec-7, expressed by human natural killer cells and monocytes. *J Biol Chem* 274: 34089–34095, 1999.

23. Daly J, Carlsten M and O'Dwyer M: Sugar free: Novel immunotherapeutic approaches targeting siglecs and sialic acids to enhance natural killer cell cytotoxicity against cancer. *Front Immunol* 10: 1–9, 2019.

24. Suda T, Tsunoda T, Daigo Y, Nakamura Y and Tahara H: Identification of human leukocyte antigen-A24-restricted epitope peptides derived from gene products upregulated in lung and esophageal cancers as novel targets for immunotherapy. *Cancer Sci* 98: 1803–1808, 2007.

25. Shimokawa T, Matsushima S, Tsunoda T, Tahara H, Nakamura Y and Furukawa Y: Identification of TOMM34, which shows elevated expression in the majority of human colon cancers, as a novel drug target. *Int J Oncol* 29: 381–386, 2006.

26. Uchida N, Tsunoda T, Wada S, Furukawa Y, Nakamura Y and Tahara H: Ring finger protein 43 as a new target for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 10: 8577–8586, 2004.

27. Ishizaki H, Tsunoda T, Wada S, Yamauchi M, Shibuya M and Tahara H: Inhibition of Tumor Growth with Antiangiogenic Cancer Vaccine Using Epitope Peptides Derived from Human Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1. *Clin Cancer Res* 12: 5841–5849, 2006.

28. Wada S, Tsunoda T, Baba T, Primus FJ, Kuwano H, Shibuya M and Tahara H: Rationale for antiangiogenic cancer therapy with vaccination using epitope peptides derived from human vascular endothelial growth factor receptor 2. *Cancer Res* 65: 4939–4946, 2005.

29. Nakashima-Nakasuga C, Hazama S, Suzuki N, Nakagami Y, Xu M, Yoshida S, Tomochika

S, Fujiwara N, Matsukuma S, Matsui H, et al: Serum LOX-1 is a novel prognostic biomarker of colorectal cancer. *Int J Clin Oncol*, 2020.

30. Fujiwara N, Usui T, Ohama T and Sato K: Regulation of beclin 1 protein phosphorylation and autophagy by protein phosphatase 2A (PP2A) and death-associated protein kinase 3 (DAPK3). *J Biol Chem* 291: 10858–10866, 2016.

31. Schneider CA, Rasband WS and Eliceiri KW: NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671–675, 2012.

32. Enjoji S, Yabe R, Tsuji S, Yoshimura K, Kawasaki H, Sakurai M, Sakai Y, Takenouchi H, Yoshino S, Hazama S, et al: Stemness Is Enhanced in Gastric Cancer by a SET/PP2A/E2F1 Axis. *Mol Cancer Res* 16: 554-563, 2008.

33. Yabe R, Tsuji S, Mochida S, Ikehara T, Usui T, Ohama T, and Sato K: A stable association with PME-1 may be dispensable for PP2A demethylation - implications for the detection of PP2A methylation and immunoprecipitation. *FEBS Open Bio* 8: 1486–1496, 2018.

34. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, et al: Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313: 1960–1964, 2006.

35. Kuwahara T, Hazama S, Suzuki N, Yoshida S, Tomochika S, Nakagami Y, Matsui H, Shindo Y, Kanekiyo S, Tokumitsu Y, 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: 659–665, 2019.

36. Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Nishida M, Maeda Y, Mori N, Takao T, Tamesa T, Tangoku A, Tabuchi H, et al: Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Lancet* 361: 923–929, 2003.

37. Zimmerman DW: Some properties of preliminary tests of equality of variances in the two-sample location problem. *J Gen Psychol* 123: 217-231, 1996.

38. Kamarudin AN, Cox T, Kolamunnage-Dona R: Time-dependent ROC curve analysis in medical research: current methods and applications. *BMC Med Res Methodol* 17: 53, 2017.

39. Yoshikawa K, Shimada M, Miyamoto H, Higashijima J, Miyatani T, Nishioka M, Kurita N, Iwata T and Uehara H: Sonic hedgehog relates to colorectal carcinogenesis. *J Gastroenterol* 44: 1113–1117, 2009.

40. Xu M, Li X, Liu T, Leng A and Zhang G: Prognostic value of hedgehog signaling pathway in patients with colon cancer. *Med Oncol*. 29: 1010-1016, 2012

41. Maréchal R, Bachet JB, Calomme A, Demetter P, Delpero JR, Svrcek M, Cros J, Bardier-Dupas A, Puleo F, Monges G, et al: Sonic hedgehog and Gli1 expression predict outcome in resected pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 21: 1215-1224, 2015.

42. Pankov R and Yamada KM: Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115: 3861-3863, 2002.

43. Yi W, Xiao E, Ding R, Luo P and Yang Y: High expression of fibronectin is associated with poor prognosis, cell proliferation and malignancy via the NF- κ B/p53-apoptosis signaling pathway in colorectal cancer. *Oncol Rep* 36: 3145–3153, 2016.
44. Inufusa H, Nakamura M, Adachi T, Nakatani Y, Shindo K, Yasutomi M and Matsuura H: Localization of oncofetal and normal fibronectin in colorectal cancer. Correlation with histologic grade, liver metastasis, and prognosis. *Cancer* 75: 2802-2808, 1995.
45. Miyazaki K, Sakuma K, Kawamura YI, Izawa M, Ohmori K, Mitsuki M, Yamaji T, Hashimoto Y, Suzuki A, Saito Y, et al: Colonic epithelial cells express specific ligands for mucosal macrophage immunosuppressive receptors siglec-7 and -9. *J Immunol* 188: 4690–4700, 2012.
46. Dharmadhikari G, Stolz K, Hauke M, Morgan NG, Varki A, Koning E, Kelm S and Maedler K: Siglec-7 restores β -cell function and survival and reduces inflammation in pancreatic islets from patients with diabetes. *Sci Rep* 7: 45319, 2017.
47. Ando M, Tu W, Nishijima K ichi and Iijima S: Siglec-9 enhances IL-10 production in macrophages via tyrosine-based motifs. *Biochem Biophys Res Commun* 369: 878–883, 2008.
48. Chen DS and Mellman I: Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 39: 1-10, 2013.
49. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, et al: Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8: 793-800, 2002.
50. Vermaelen K: Vaccine Strategies to Improve Anti-cancer Cellular Immune Responses. *Front Immunol* 10: 8, 2019.
51. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman W, Pagès F, 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.
52. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, Lugli A, Zlobec I, Hartmann A, Bifulco C, et al: Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 232: 199–209, 2014.
53. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou F, Bifulco C, Lugli A, Zlobec I, Rau TT, Berger MD, et al: International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet* 391: 2128–2139, 2018.
54. O'Reilly MK and Paulson JC: Siglecs as targets for therapy in immune-cell-mediated disease. *Trends Pharmacol Sci* 30: 240-248, 2009.
55. Kensuke Yamada, Shoichi Hazama, Nobuaki Suzuki, Ming Xu, Yuki Nakagami, Nobuyuki Fujiwara, Ryouichi Tsunedomi, Shin Yoshida, Shinobu Tomochika, Satoshi Matsukuma,

Hiroto Matsui, Yukio Tokumitsu, Shinsuke Kanekiyo, Yoshitaro Shindo, Yusaku Watanabe, Michihisa Iida, Shigeru Takeda, Tatsuya Ioka, Tomio Ueno, Hiroyuki Ogihara, Yoshihiko Hamamoto, Yoshinobu Hoshii, Hiroo Kawano, Tomonobu Fujita, Yutaka Kawakami, Hiroaki Nagano: Siglec-7 is a predictive biomarker for the efficacy of cancer vaccination against metastatic colorectal cancer. *Oncol Lett* (掲載予定)

8. 図表

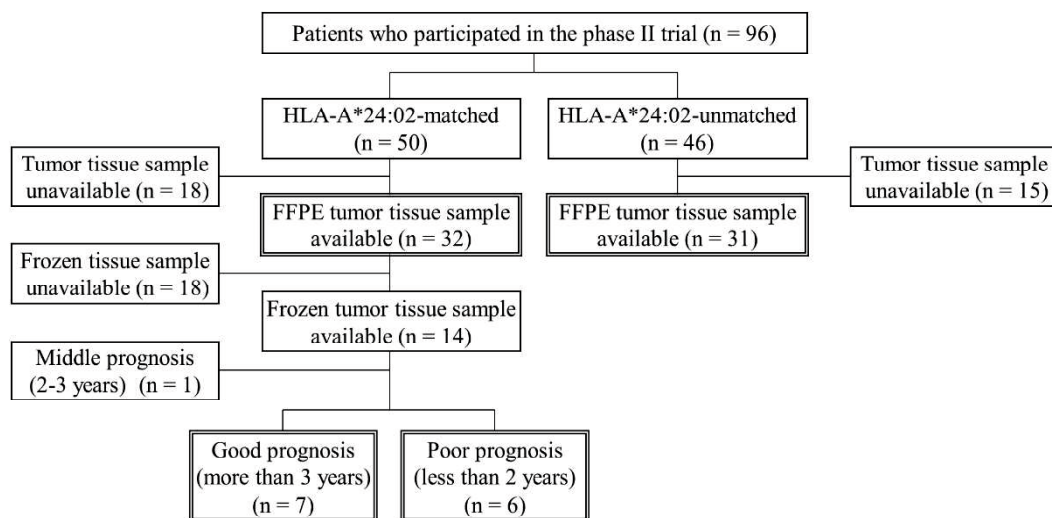


図 1. 本研究における解析の CONSORT ダイアグラム。

HLA-A*24:02 適合群からの 13 個の凍結組織サンプルを、SOMAscan を用いてタンパク網羅的解析を行った。HLA 適合群 32 個および HLA 非適合群 31 個の FFPE 腫瘍組織サンプル 63 個を、免疫蛍光染色を用いて解析した。

HLA、ヒト白血球抗原；FFPE、ホルマリン固定パラフィン包埋

表 I. 腫瘍組織のタンパク網羅的解析による予測マーカー候補

Table I. Predictive markers from comprehensive proteomic analysis of tumor tissue.

Rank	Target protein	Good prognosis (n=7)		Poor prognosis (n=6)		Log ₂ ratio	Fisher ratio	Welch's t-test
		Mean	SD	Mean	SD			P-value
1	Sonic Hedgehog	492.5	226.9	230.3	82.7	1.1	3.66	0.022
2	ICOSLG	14492.5	14465.9	41296.1	34872.0	1.5	2.29	0.089
3	Lysozyme	9204.3	5769.5	19217.0	12240.3	1.1	2.20	0.079
4	Siglec-7	934.8	511.9	2272.1	1121.8	1.3	2.00	0.016
5	Siglec-9	416.4	167.9	1158.8	1044.2	1.5	1.62	0.089
6	Fibronectin	4794.1	3336.5	13751.4	8483.4	1.5	1.60	0.025
7	FCGR3B	1494.4	827.5	3934.3	3370.6	1.4	1.42	0.089
8	TIMP1	6566.0	4235.2	14537.2	11608.0	1.1	1.32	0.117
9	LBP	3525.2	2064.2	12051.2	14610.8	1.8	1.22	0.152
10	C1q	14432.5	10855.0	32501.8	22469.4	1.2	1.20	0.085

Proteins eligible for predictive biomarkers were narrowed down by the absolute log₂ ratio ≥ 1 and ranked according to the Fisher ratio between the good and poor prognosis groups. Good prognosis, with overall survival of 3 years or more; poor prognosis, with overall survival of 2 years or less; SD, standard deviation; ICOSLG, inducible T cell costimulator ligand; Siglec-7, sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 7; Siglec-9, sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 9; FCGR3B, Fc fragment of IgG receptor IIIb; TIMP1, tissue inhibitor of metalloproteinase 1; LBP, lipopolysaccharide binding protein; C1q, complement component 1, q subcomponent.

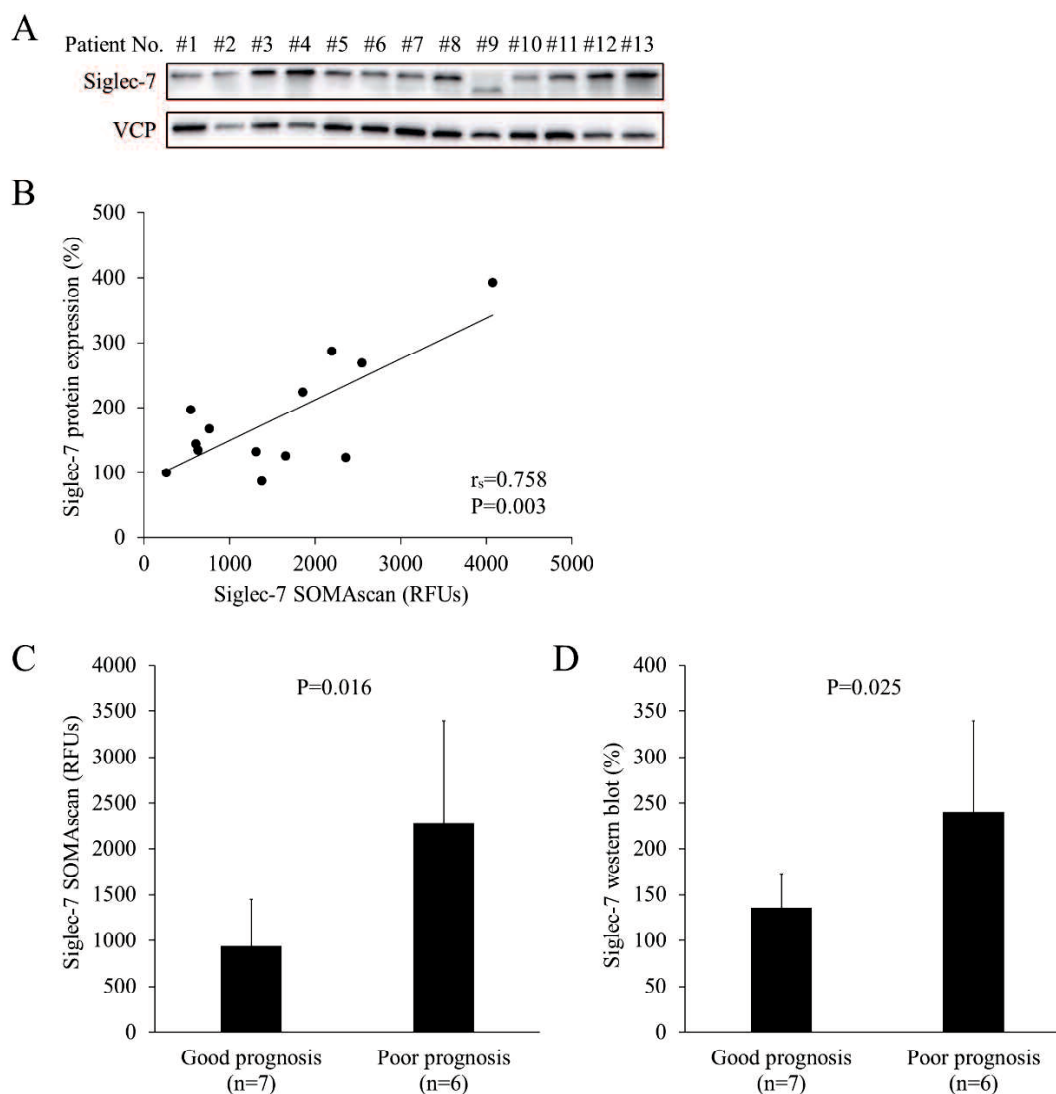


図 2. Siglec-7 発現量の確認と患者の予後との関連。

A) タンパク網羅的解析と同じサンプルをウエスタンブロット法に使用した (n=13)。

#9 の低いタンパク質バンドは、腫瘍組織において Siglec-7 の短いアイソフォームがより高発現していることを反映した可能性がある。以降の分析においては、タンパクバンドをデンストメトリーにより定量化し、結果を#1 の Siglec-7 発現レベル (=100%) に対する相対発現レベルとして示した。

B) SOMAscan およびウエスタンブロット法によって測定された Siglec-7 の発現レベルは相関していた (n=13)。

C) SOMAscan を用いて測定した Siglec-7 の発現レベルは、予後不良群で有意に高かった。

(D) ウエスタンブロット法で測定した Siglec-7 の発現レベルは、予後不良群で有意に高かった。

Siglec-7、シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン 7 ; VCP、バロシン含有タンパク質 ; RFU、相対蛍光単位 ; OS、全生存期間

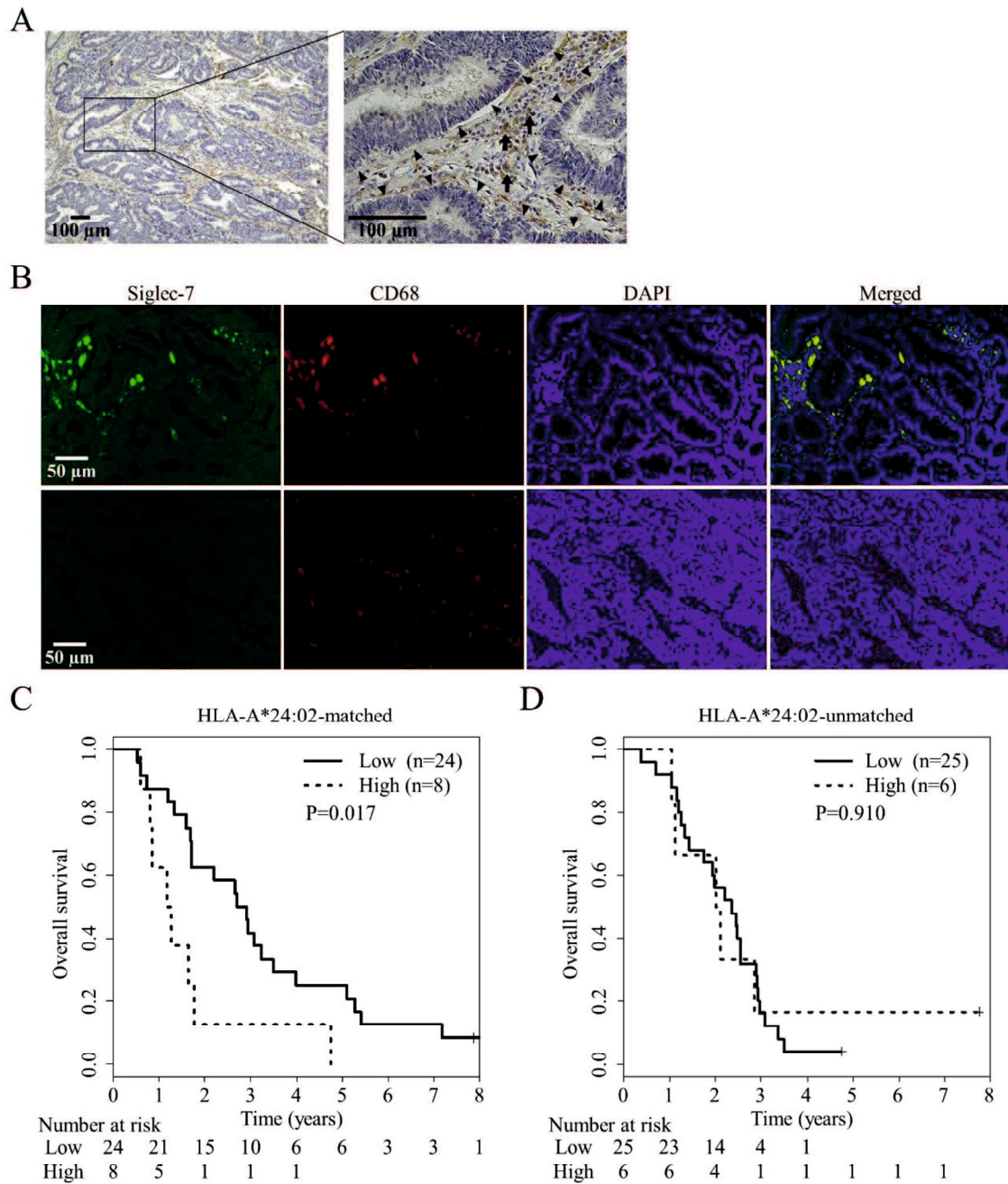


図3. 腫瘍微小環境における Siglec-7 発現および患者の予後との関連。

A) 腫瘍領域の間質細胞は Siglec-7 を発現しているのに対し (矢印)、腫瘍細胞は発現していない (矢頭)。これらの細胞は、その位置と形態学的所見に基づいて定義された。

B) CRC 組織における Siglec-7 (緑)、CD68 (赤)、および核 (青) の代表的な免疫蛍光画像。Siglec-7+細胞のほぼ全てが同時に CD68 を発現していたが、CD68 のみを発現している細胞も認められた。上段は Siglec-7 の発現量が多い腫瘍を、下段は少ない腫瘍を示す。

C) HLA-A*24:02 適合群において、免疫蛍光画像で検出された Siglec-7 高発現の患者の全生存期間は、Siglec-7 低発現の患者よりも有意に短かった (P=0.017)。

(D) HLA-A*24:02 非適合群において、Siglec-7 発現量が高低で、全生存期間に有意差は認められなかった。

Siglec-7、シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン 7；HLA、ヒト白血球抗原；CRC、結腸直腸癌；RFU、相対蛍光単位

表 II. 免疫蛍光染色で解析された第 II 相試験登録患者の背景

Table II. Characteristics of patients in the phase II study whose tissues were analyzed by immunofluorescence.

Characteristics	HLA-A*24:02		P-value
	Matched (n=32)	Unmatched (n=31)	
Age			
Mean	67.9	64.3	0.069
Range	47-82	47-77	
Sex			
Male	13	18	0.211
Female	19	13	
Unresectable site			
Liver	18	24	0.300
Lung	11	9	
Dissemination	3	2	
Bone	0	2	
Lymph node	3	9	
Other	3	1	
Number of metastatic organs			
One	26	19	0.068
Two	6	8	
Three	0	4	
Location of tumor			
Colon	22	24	0.572
Rectum	10	7	

HLA, human leukocyte antigen.

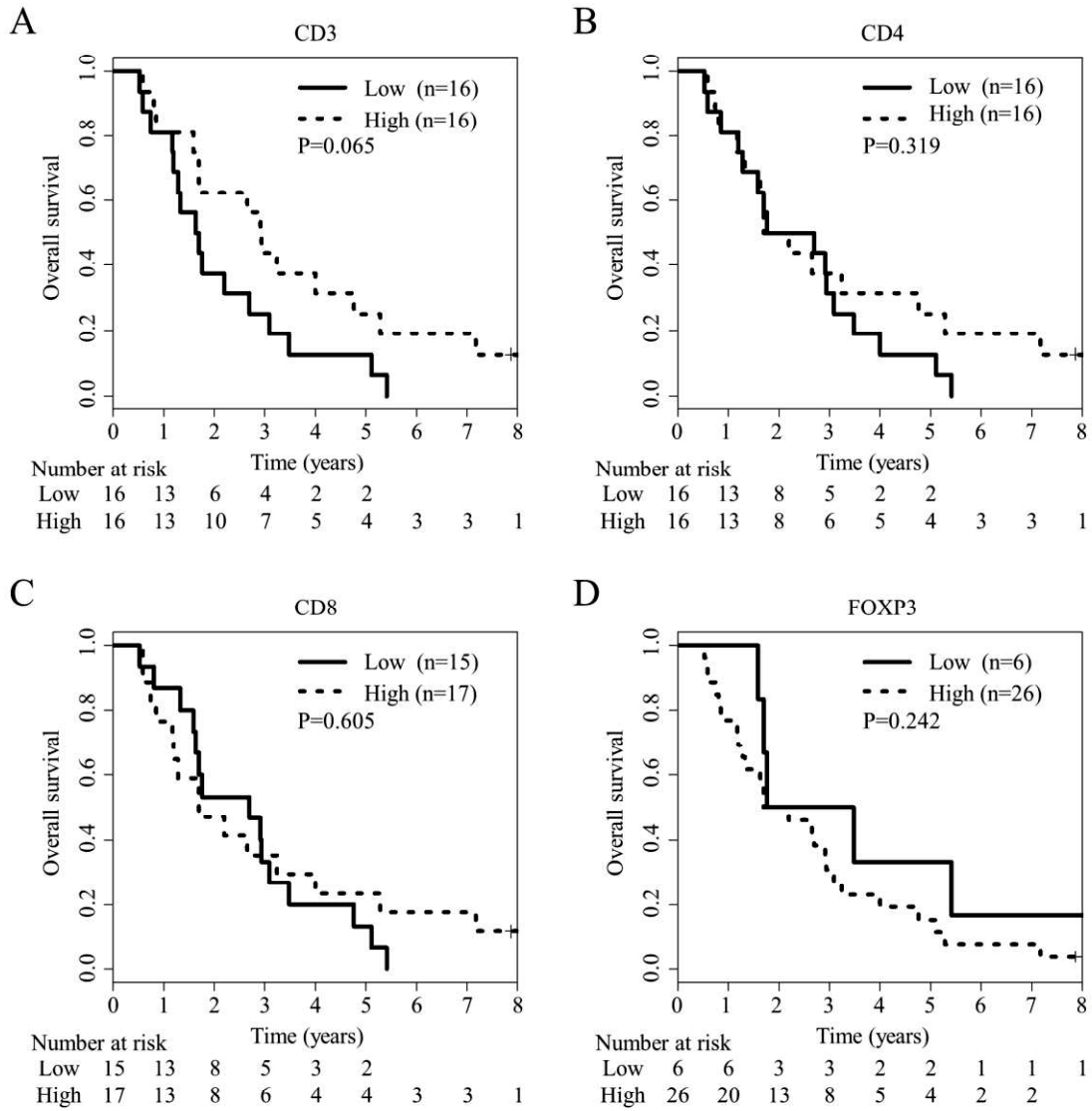


図 4. 腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) 数に応じた全生存率。

CD3、CD4、CD8、FOXP3 の数に応じた全生存率のカプランマイヤー曲線を示す。TIL 数が多い患者と少ない患者の間では、全生存期間に有意な差は認められなかった。

A) CD3、(B) CD4、(C) CD8、(D) FOXP3。

FOXP3、フォークヘッドボックス P3

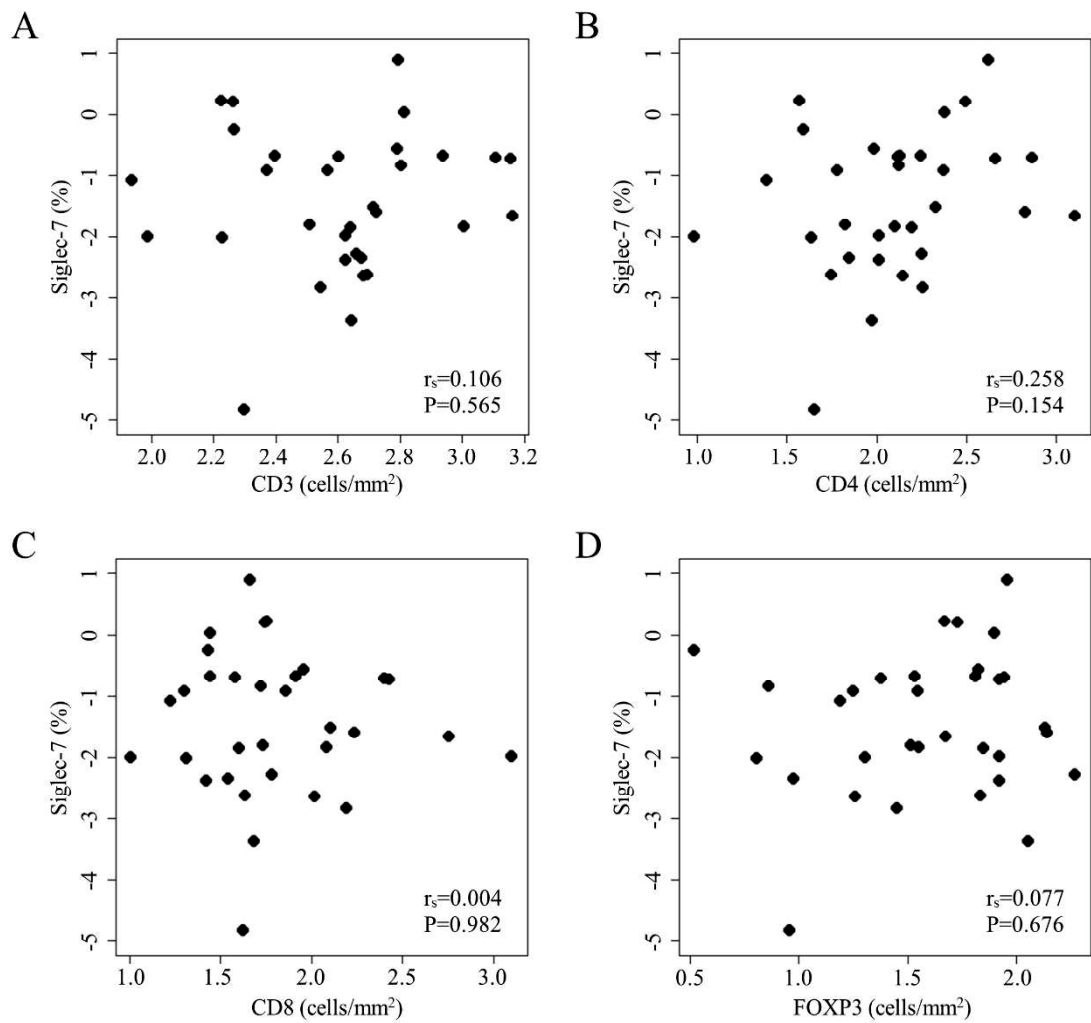


図 5. Siglec-7 発現と腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) 数との関連。
 CD3、CD4、CD8、および FOXP3 対 Siglec-7 の散布図を示す。値は \log_{10} で変換した。
 Siglec-7 発現レベルと TIL 数との間に有意な相関はなかった。
 A) CD3、(B) CD4、(C) CD8、および (D) FOXP3)。
 Siglec-7、シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン 7；FOXP3、フォークヘッドボックス P3

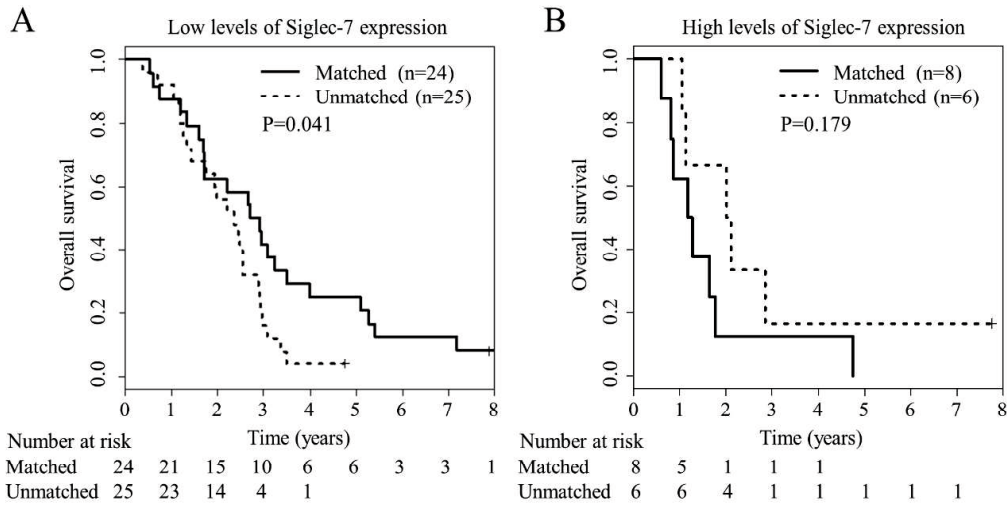


図 S1. Siglec-7 低発現および高発現患者における全生存期間。

A) 腫瘍微小環境における Siglec-7 低発現の症例において、HLA-A*24:02 適合群と非適合群との間で、全生存期間に有意差が認められた (P=0.041)。

B) Siglec-7 高発現の症例において、HLA-A*24:02 適合群と非適合群との間には、全生存期間に有意差は認められなかった。

Siglec-7、シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン 7；HLA、ヒト白血球抗原

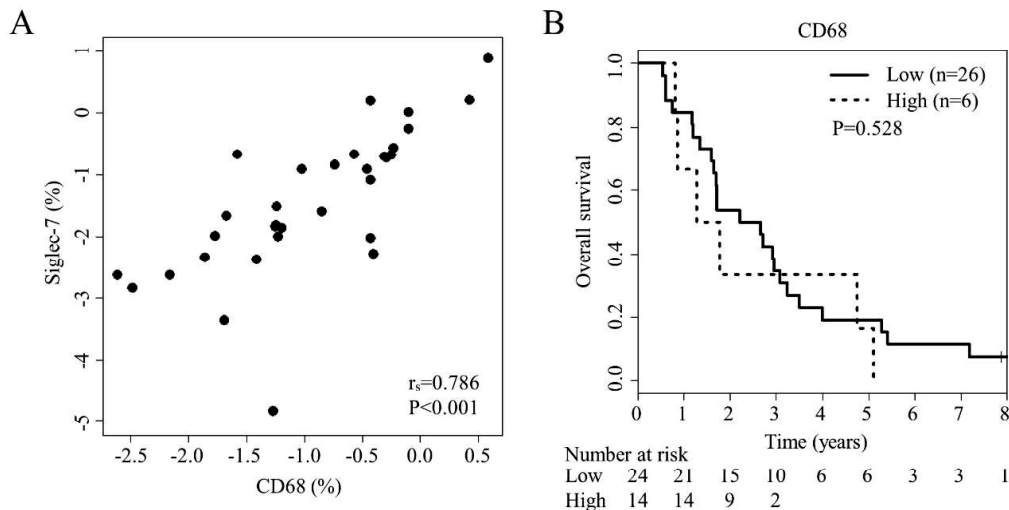


図 S2. CD68 発現と Siglec-7 発現および予後との関連。

A) CD68 と Siglec-7 の散布図を示す。値は log10 で変換した。腫瘍組織における Siglec-7 発現と CD68 発現の間には強い相関が認められた (P<0.001)。

B) CD68 発現量に応じた全生存期間のカプランマイヤー曲線を示す。最適カットオフ値は、36 ヶ月の ROC 曲線分析を用いて 0.562 と決定した。CD68 発現量の高低で、全生存期間に有意差は認められなかった (P=0.528)。

シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン 7、Siglec-7

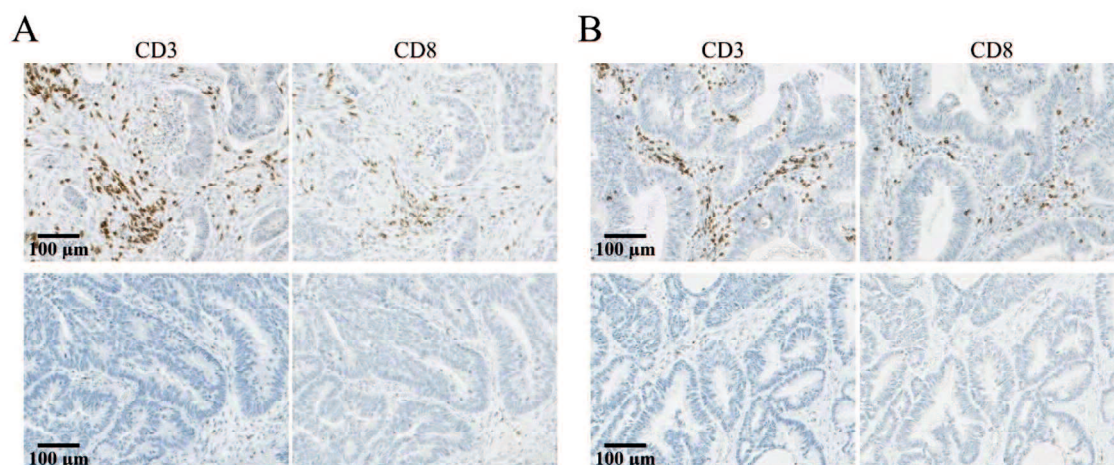


図 S3. Siglec-7 高発現または低発現の腫瘍組織における腫瘍浸潤リンパ球 (TIL)。
 Siglec-7 高発現および低発現の CRC 組織における CD3 および CD8 の代表的な IHC 画像。
 上段は高 CD3+ および高 CD8+ 細胞密度を表し、下段は低 CD3+ および低 CD8+ 細胞密度
 を表す。

A) Siglec-7 高発現の CRC 組織では、高密度および低密度の CD3+ と CD8+ 細胞が観察
 された。

B) Siglec-7 低発現の CRC 組織では、高密度および低密度の CD3+ と CD8+ 細胞が観察
 された。

Siglec-7、シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン 7；IHC、免疫組織化学染色；
 CRC、結腸直腸癌