

学位論文（博士）

Serum CCL7 is a Novel Prognostic Biomarker of
Metastatic Colorectal Cancer

（血清 CCL7 は転移を伴う大腸癌の新規予後バイオ
マーカーである）

氏名 千々松 日香里

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 4 年 12 月

目次

1. 要旨	3
2. 背景	3
3. 方法	4
4. 結果	6
5. 考察	6
6. 謝辞	8
7. 参考文献	9
8. 図表	15

1. 要旨

背景・目的：大腸癌（CRC）は、世界的に癌関連死亡の第2位の原因となっており、転移を伴う大腸癌（mCRC）患者の予後不良は緊急の課題である。以前、我々はSOMAscanアッセイを用いて、予後を予測する10種類のバイオマーカー候補を得ることができた。本研究の目的は、得られた候補タンパクの一つであるC-C motif chemokine ligand 7（CCL7）について、mCRC患者における治療前の血清CCL7濃度の予後予測性能を明らかにすることであった。

材料と方法：mCRC患者の血清（n=110）および手術標本（n=85）について、それぞれCCL7のタンパク濃度をELISA法および免疫組織化学法で検討した。また、Cox回帰分析、受信者動作特性曲線（ROC）分析、Kaplan-Meier法を用いて、タンパクの濃度と予後との関係を検討した。結果：血清CCL7濃度が高い患者の全生存期間（OS）は、低い患者と比較し、有意に不良であった。間質中のCCL7発現レベルが高い患者は、低い患者に比べ、有意に予後不良であった。Carcino embryonic antigen（CEA）および糖鎖抗原19-9（CA19-9）の濃度は、CCL7低値群に比べ、高CCL7群で有意に高値であった。単変量解析および多変量解析により、血清CCL7濃度はmCRCの有意な予後因子であることが明らかになった。また、血清CCL7濃度とCEA濃度の組み合わせにおいて、血清CCL7濃度、CEAの両方が高値である患者は、両方が低値である群と比較し、有意に予後不良であった。

結論：治療前の血清CCL7濃度および血清CCL7濃度とCEAとの組み合わせは、mCRCの予後を予測する有用なバイオマーカーである。

2. 背景

大腸癌（CRC）は、世界的に癌関連死亡の第2位の原因となっている(1)。CRC患者において、正確な病期分類は治療選択のために重要である(2,3)。転移を伴う大腸癌（mCRC）は米国 Surveillance, Epidemiology, and End Results Programによると、診断時に約20%の割合で認められる(4)。Stage I-IIIのCRC患者においても、再発後の治療は重要であるが(5)、同様にmCRCの予後を改善することは緊急の課題となっている。過去10年間、フッ化ピリミジン+イリノテカン（FOLFIRI）またはオキサリプラチン（FOLFOX）などのdoublet療法と抗血管内皮増殖因子（VEGFR）抗体や抗上皮増殖因子受容体（EGFR）抗体などのモノクローナル抗体の併用により、mCRC患者の予後が著しく改善した(6-10)。さらに、フルオロウラシル+ロイコボリン+オキサリプラチン+イリノテカン（FOLFOXIRI）+ベバシズマブのtriplet療法は、doublet療法と比較して、mCRC患者の予後を改善することが知られている(11)。また、免疫チェックポイント阻害剤は、癌治療において画期的な臨床成果を上げてきている(12)。しかしながら、化学療法や免疫療法に対する反応には個人差があり、mCRC患者の予後は極めて依然として不良である(13)。

FOLFOXIRI+ベバシズマブ併用療法とFOLFIRI+ベバシズマブ併用療法の比較試験（TRIBE試験）において、FOLFOXIRI+ベバシズマブはFOLFIRI+ベバシズマブと比較して無増悪生

存期間、奏効率、全生存期間、転移巣切除率が有意に良好であることが示された。しかし、Grade3 または 4 の好中球減少、下痢、口内炎、末梢神経障害といった合併症の発生率は、FOLFOXIRI+ベバシズマブ併用療法で有意に高くなっており(14)、mCRC 患者の予後バイオマーカーは治療戦略を検討する上で有用と考えられる。さらに、予後予測バイオマーカーは、組織生検のような侵襲的な方法ではなく、血液や便などの非侵襲的な方法で簡便に採取できる検体であることが望ましい。末梢血などのリキッドバイオブシーで得られた Cell-free DNA(15)、circulating tumor DNA(15, 16)、microRNA(17)、炎症性分子(18, 19)の分析により同定されたバイオマーカーは、mCRC 患者の予後判定に有用であると示されている(20)。

以前、我々は SOMAscan アッセイを用いて、mCRC 患者 24 人の血清中の 1, 129 のタンパク質濃度を網羅的に解析した結果、予後を予測する 10 種類のバイオマーカー候補を得ることができた(21)。候補となった 10 種のタンパクのうち、myeloperoxidase (22)、interleukin (IL)-8 (23)、heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (24)、VEGF121 (25)は CRC 患者の予後判定マーカーとして知られている。さらに、我々は、血清 lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1)がステージ III/IV CRC の新規予後バイオマーカーであることを明らかにした(21)。今回我々は血清中の C-C motif chemokine ligand 7 (CCL7、別名 monocyte chemotactic protein3 (MCP-3)) に注目した。CCL7 は、CRC の肝転移で高発現しており(26, 27)、癌の進行に関係することが報告されている(26, 28, 29)。しかし、CRC 患者における血清 CCL7 濃度および組織中 CCL7 発現レベルの予後判定に関する報告はない。本研究では、血清 CCL7 濃度が mCRC 患者の予後を予測する新規バイオマーカーとなり得るかを評価した。

3. 方法

【血清タンパク質の網羅的な解析】

血清タンパク質濃度の網羅的解析は SOMAscan (SomaLogic, Boulder, CO, USA) を用いて行われ、mCRC に関連する 1, 129 のタンパク質が測定された(21)。血清検体は 2009 年 2 月から 2012 年 11 月までに当院で FOLFOX を第一選択とした化学療法を施行された mCRC 患者 24 名から、化学療法施行前の入院日に採取した。3 年以上生存した予後良好群 (n=9) と 2 年未満生存した予後不良群 (n=11) に割り付けた 20 例の血清検体をその後の分析に使用し、2-3 年生存した 4 例は除いた。

【検体採取】

2007 年 2 月から 2017 年 12 月にかけて、当院の mCRC (Stage IV) 患者 110 名 (SOMAscan 解析に用いた 24 名の患者は予め除外した) から血清検体を採取し、使用するまで-80°C で保存した。これらは、入院時または初診時、手術または化学療法の直前に採取された。免疫組織化学的染色 (IHC) のために、85 の組織サンプルが収集され評価された。これらは手術を受けた mCRC の患者の手術検体から得られ、その中には複数の癌を持つ 2 人の患者も含まれて

いた。本研究は、山口大学医学部附属病院の倫理委員会（承認番号：H17-83 および H23-135）によって承認され、すべてのサンプルは、患者の書面によるインフォームドコンセントのもとに入手された。

【血清 CCL7 濃度の測定】

血清 CCL7 濃度は、the Human CCL7 ELISA Kit (ab193769; Abcam, Cambridge, UK) を用いて測定した。サンプルは遠心分離によって集められ、分注され、分析まで -80°C に保存された。製造元の説明書に従ってアッセイした。EnVision Multilabel Plate Readers (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) を用いて 450nm の吸光度を直ちに測定した。標準曲線はキット付属の標準品を用いて作成した。アッセイの感度は 10.3 pg/ml であった。

【大腸癌組織 CCL7 の IHC 染色】

血清 CCL7 濃度が測定された 110 例のうち、原発巣切除が行われた 85 例について IHC が行われた。IHC は $4\mu\text{m}$ 厚の FFPE 切片を用いて行った。抗原賦活には 10mM Tris-EDTA buffer (pH=9.0) で 95°C , 40 分間マイクロ波での加熱を用いた。3% H_2O_2 メタノールで内因性ペルオキシダーゼ活性を 10 分間ブロックした後、切片を無血清プロテインブロック (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) で 10 分間、さらに抗 CCL7 抗体 (AV07048 ; Merck KGaA, Darmstadt, Germany ; 希釈、1 : 1500) を 4°C にて一晩インキュベートした。反応は 3,3'-diaminobenzidinechromogen (DAB; Agilent Technologies) で可視化し、Mayer のヘマトキシリン溶液で対比染色した。画像は、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X710 (KEYENCE, 大阪, 日本) を用いて撮影した。患者の臨床情報を得ていない経験豊富で独立した病理医がスライドを評価し、腫瘍細胞質および間質細胞における CCL7 レベルを評価した。腫瘍の細胞質における染色強度を順に強、中、弱に分け（その強度で染色された腫瘍細胞が 10% 以上であることを条件として）、強または中の強度を高 CCL7 発現群、弱の染色強度または陰性を低 CCL7 発現群と定義した。間質では、400 倍の倍率で最も多い 5 視野の CCL7 陽性細胞数を数えた。

【統計解析】

バイオマーカーの最適カットオフ値は、時間依存受信者動作特性 (ROC) 曲線とそのグラフにおける左上に最も近い座標から指標を決定した。2 群間の差は Welch の t 検定または Mann-Whitney の U 検定を用いて推定した。カテゴリー変数はフィッシャーの正確検定を用いて比較した。全生存期間 (OS) の生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて推定し、log-rank 検定を用いて解析した。単変量解析および多変量解析は Cox 回帰モデルを用いて行った。統計解析は R ソフトウェア (バージョン 3.6.1; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を用いて行った。 $p < 0.05$ を統計的有意性を示すとした。

4. 結果

血清 CCL7 濃度と mCRC 患者の予後および臨床病理学的特徴との関係

時間依存 ROC 曲線解析に基づく血清 CCL7 濃度のカットオフ値 44.25 pg/ml を用いると、CCL7 濃度が高い mCRC 患者は、CCL7 濃度が低い患者よりも OS において有意に予後不良であった ($n=110$, $p=0.038$, 図 1)。また、Carcino embryonic antigen (CEA) および carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) の濃度は、高 CCL7 群の方が低 CCL7 群より有意に高かったが、年齢、性別、腫瘍部位、リンパ節転移、遠隔転移などにおける臨床病理学的因子においてこれら 2 群間に有意差は認められなかった (表 I)。

mCRC の組織における CCL7 の発現と予後の関係

手術で得られた検体 85 例において、CCL7 タンパクの発現レベルを評価した。IHC 解析の結果、CCL7 は腫瘍細胞の細胞質および腫瘍細胞周囲の間質細胞に発現していた (図 2)。腫瘍細胞質における低 CCL7 群と高 CCL7 群の間で OS に有意差は見られなかった ($p=0.41$, 図 3A)。CCL7 陽性の間質細胞については、ROC 曲線解析に基づき、カットオフ値を 40.8 個/field とした。興味深いことに、間質中の CCL7 レベルが高い群は、低い群に比べ有意に予後不良であった ($p=0.043$, 図 3B)。さらに、間質中の CCL7 発現レベルは、遠隔転移臓器の数と有意に相関していた ($p=0.012$, 表 I)。しかし、血清中 CCL7 濃度と間質中の CCL7 発現レベルとの間には、統計的に有意な相関は観察されなかった。

mCRC 患者の OS に関する単変量および多変量解析

治療前に得られた因子を用いた単変量解析 (表 II) により、血清 CCL7 濃度は mCRC 患者の OS と有意に関連していた [ハザード比 (HR) = 1.61, $p=0.04$]。術後に得られた因子については、リンパ節、遠隔転移、間質性 CCL7 濃度が OS と有意に関連していた (それぞれ $p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.047$)。

多変量解析により、治療前に得られた血清 CCL7 濃度 (HR=1.61, $p=0.040$) は、mCRC 予後の独立したリスク因子であった (表 III)。

mCRC 患者の OS に対する CCL7 および CEA 濃度の予測性能

時間依存 ROC 解析では、血清 CCL7 と CEA 濃度の組み合わせが、癌診断後 3 年目を除き、ROC 曲線下面積 (AUC) がそれぞれ単独を指標とした時と比較して最も高かった (図 4A)。血清 CCL7 と CEA 濃度の組み合わせ (両方低い、どちらか高い、両方高い) は、癌診断後 5 年の mCRC 患者の OS について、0.71 の AUC が得られた (図 4B)。生存分析では、CCL7 と CEA の複合指標は OS に有意差を認め ($p=0.006$, 図 4C)、CCL7 と CEA の両方が高濃度の患者群は、両方が低濃度の患者群に比べ、有意に OS が不良であった ($p=0.001$, 図 4C)。

5. 考察

本研究の目的は、mCRC 患者に対する新規予後バイオマーカー候補の性能を明らかにすることである。本研究は、我々の調べた限り、mCRC 患者における血清 CCL7 濃度の臨床的意義について初めて報告したものである。血清 CCL7 濃度が高い患者は、低い患者に比べ、有意に予後不良であった (図 1)。また、血清 CCL7 濃度は CEA および CA19-9 濃度と相関していた (表 I)。さらに、mCRC の予後予測は、CCL7 濃度と CEA 濃度の組み合わせで最も高かった (図 4)。新規バイオマーカーを用いて予後不良と予測された患者には、FOLFOXIRI などのトリプレットによる化学療法を割り当てて治療効果を最大限に高め、予後良好な患者にはカペシタビン+ベバシズマブなどの副作用の少ない治療法で腫瘍の長期コントロールを行うことができる可能性がある (30)。

CCL7 は炎症性サイトカインであり、単球、好酸球、好塩基球の浸潤を誘発する強力な走化性タンパクである (31)。全身的な炎症反応は、全身的な腫瘍の免疫力を抑制し (32)、化学療法に対する抵抗性を高め、予後不良につながる (33)。IL-6 や IL-8 などの炎症性サイトカインは、大腸癌を含む様々な癌の予後不良と関連することが報告されている (19, 34)。我々は、同様に CCL7 が mCRC 患者の予後不良の潜在的なマーカーであることを明らかにした。

CCL7 の腫瘍形成促進作用は、CRC 細胞において既に確認されている (28, 35)。CCL7 の過剰発現により、CRC 細胞の増殖、遊走、浸潤が *in vitro* (36) および *in vivo* (22) で増加する。CCL7 を安定的に過剰発現した CRC 細胞は、C-C モチーフ・ケモカイン受容体 3 の発現を増強する (35)。我々は、腫瘍細胞質中の CCL7 発現の頻度は予後と有意に関連しないが (図 3A)、線維芽細胞やマクロファージが多く存在する間質中の CCL7 発現の頻度が高い患者は、低い患者よりも有意に予後不良であることを示した (図 3B)。興味深いことに、マクロファージにおける癌関連菌 *Fusobacterium nucleatum* の細胞内生存は、CCL7 発現のアップレギュレーションによって促進されることが報告されている (37)。間質 CCL7 発現レベルは遠隔転移臓器数およびリンパ節数と有意に相関しており (表 I)、間質細胞における CCL7 高発現が遠隔転移を促進する可能性が示唆された。

CRC に加えて (36)、CCL7 は腎細胞癌 (38) や口腔扁平上皮癌 (39) とも関連があることが報告されている。ヒト口腔扁平上皮癌では、癌細胞から放出される IL-1 α が癌関連線維芽細胞の増殖を刺激し、CCL7 の発現を増加させることが知られている (39)。マウスでは、CT26 大腸がん細胞と間葉系幹細胞を共培養すると、CT26 単培養に比べ、CCL7 の発現が増加した。CCL7 は免疫グロブリンおよび B 細胞依存性の転移促進作用を有し、CCL7 を過剰発現した細胞は対照群と比較し高い割合で肺転移を引き起こす (36)。最近の研究では、CCL7 存在下でマクロファージ細胞と共培養すると、上皮間葉転換を介して CT26 細胞の移動が促進されることが報告されている (37)。このように、CCL7 は、転移の初期段階として、癌細胞の局所的な移動と浸潤を促進する可能性がある (40)。Ren らは、単球性骨髄由来抑制細胞 (MDSC) が分泌する CCL7 が、転移性潜在性 CRC 細胞の伸展を開始するのに重要な役割を果たすことを報告し (41)、また、血清 CCL7 濃度が高値であれば、CRC 患者の転移および短期再発と有意な相関があることを報告した (41)。単球性 MDSCs が分泌する CCL7 は、腫瘍細胞の CCR2 と

結合し、Janus kinase (JNK)/signal transducer and activator of transcription 3 経路を刺激して、休眠状態の CRC 細胞の増殖を促進させる (41)。また、JNK 経路の下流にある CCL7 は、CRC の骨転移における初期破骨細胞前駆体の重要な制御因子であることが報告されている (42)。CCL7 を発現する間質細胞も同様に、CRC 細胞の活動に影響を与え、mCRC 患者の予後を左右する可能性がある。興味深いことに、ウェブベースの生存分析ツールである Kaplan Meier plotter (43) を用いると、いくつかの腫瘍型において CCL7 の mRNA 発現と OS の有意な関連性が示された (表 IV)。消化器癌に関しては、間質に富む膵管腺癌では CCL7-high 群が CCL7-low 群に比べ有意に OS が悪く、逆に間質に乏しい肝細胞癌では CCL7-high 群が有意に予後良好であった。さらに、CCL7 阻害剤の予防投与は、CRC 細胞の増殖・転移を有意に抑制し、腫瘍の再発を抑制する可能性がある (41)。以上のことから、CCL7 の阻害は、このタンパク質の濃度が高い患者の疾患進行を防ぐための潜在的な治療ターゲットとなる可能性がある。

しかしながら、腫瘍内の CCL7 の発現と血清中の CCL7 の発現との間には相関がなかった。したがって、間質性 CCL7 の発現は、血清 CCL7 濃度に直接反映されない。これは、CCL7 が様々な細胞から分泌される炎症性サイトカインであるためと思われる (35)。CCL7 は様々な細胞から分泌される炎症性サイトカインであり、血清 CCL7 濃度には癌による慢性炎症に伴う分泌が含まれている可能性がある。本研究には以下に示すいくつかの限界があった。本研究は、Stage IV の mCRC 患者を対象としたためサンプル数が少なく、また、レトロスペクティブで単一施設での研究であること、詳細な分子メカニズムは明らかにされていないため、CCL7 がどのようなメカニズムで mCRC の予後を反映するのか、さらなる検討が必要であることである。

結論として、血清 CCL7 と CEA 濃度からなる複合指標は、mCRC 患者の予後バイオマーカーとして有用である。これらは治療前に得ることができ、診断時に mCRC の治療の積極性や軽重に関して計画を立てる際に有用であると考えられる。癌組織において、腫瘍細胞よりも間質においての CCL7 の役割が、より重要である可能性がある。

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恒富亮一先生、裕彰一先生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宏子氏、小林俊彦氏に深謝いたします。本研究は、癌治療薬開発研究事業 (P-DIRECT;11039020) および日本医療研究開発機構 (AMED;15cm0106085h0005) の研究プロジェクトとして実施されました。本研究の一部は、日本医療研究開発機構の医療イノベーション先導事業 (LEAP;16am0001006h003) の助成を受けました。

7. 参考文献

- 1 Siegel RL, Miller KD and Jemal A: Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 70(1): 7–30, 2020. PMID: 31912902. DOI: 10.3322/caac.21590
- 2 De Falco V, Napolitano S, Rosello S, Huerta M, Cervantes A, Ciardiello F and Troiani T: How we treat metastatic colorectal cancer. *ESMO Open* 4(Suppl 2): e000813, 2020. PMID: 32817137. DOI: 10.1136/esmoopen-2020-000813
- 3 Marin JJ, Sanchez de Medina F, Castaño B, Bujanda L, Romero MR, Martinez-Augustin O, Moral-Avila RD and Briz O: Chemoprevention, chemotherapy, and chemoresistance in colorectal cancer. *Drug Metab Rev* 44(2): 148–172, 2012. PMID: 22497631. DOI: 10.3109/03602532.2011.638303
- 4 National Institutes of Health: National Cancer Institute Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. Cancer stat facts—colorectal cancer) Available at: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html> [Last accessed on September 10, 2022]
- 5 Sawayama H, Miyamoto Y, Hiyoshi Y, Ogawa K, Kato R, Akiyama T, Kiyozumi Y, Yoshida N and Baba H: Overall survival after recurrence in stage i-iii colorectal cancer patients in accordance with the recurrence organ site and pattern. *Ann Gastroenterol Surg* 5(6): 813–822, 2021. PMID: 34755013. DOI: 10.1002/ags3.12483
- 6 Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M, Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C and de Gramont A: FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: A randomized gercor study. *J Clin Oncol* 22(2): 229–237, 2004. PMID: 14657227. DOI: 10.1200/JCO.2004.05.113
- 7 Cassidy J, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, Couture F, Sirzén F and Saltz L: Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26(12): 2006–2012, 2008. PMID: 18421053. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.9898
- 8 Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, Couture F, Sirzén F and Cassidy J: Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: A randomized phase III study. *J Clin Oncol* 26(12): 2013–2019, 2008. PMID: 18421054. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.9930
- 9 Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens

- G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J and Rougier P: Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* *360(14)*: 1408–1417, 2009. PMID: 19339720. DOI: 10.1056/NEJMoa0805019
- 10 Suzuki N, Hazama S, Nagasaka T, Tanioka H, Iwamoto Y, Negoro Y, Yamauchi M, Kobayashi M, Okuda H, Fujishima N, Nishimura T, Yamanaka N, Toyota K, Mori Y, Nakagami Y, Shimokawa M, Nagano H and Okajima M: Multicenter phase II study of biweekly CAPIRI plus bevacizumab as second-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer (JSWOG-C3 study). *Int J Clin Oncol* *24(10)*: 1223–1230, 2019. PMID: 31144145. DOI: 10.1007/s10147-019-01473-3
- 11 Cremolini C, Antoniotti C, Rossini D, Lonardi S, Loupakis F, Pietrantonio F, Bordonaro R, Latiano TP, Tamburini E, Santini D, Passardi A, Marmorino F, Grande R, Aprile G, Zaniboni A, Murgioni S, Granetto C, Buonadonna A, Moretto R, Corallo S, Cordio S, Antonuzzo L, Tomasello G, Masi G, Ronzoni M, Di Donato S, Carlomagno C, Clavarezza M, Ritorto G, Mambrini A, Roselli M, Cupini S, Mammoliti S, Fenocchio E, Corgna E, Zagonel V, Fontanini G, Ugolini C, Boni L, Falcone A and Investigators GF: Upfront FOLFOXIRI plus bevacizumab and reintroduction after progression versus mFOLFOX6 plus bevacizumab followed by FOLFIRI plus bevacizumab in the treatment of patients with metastatic colorectal cancer (TRIBE2): A multicentre, open-label, phase 3, randomised, controlled trial. *Lancet Oncol* *21(4)*: 497–507, 2020. PMID: 32164906 DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30862-9
- 12 Kono K: Advances in cancer immunotherapy for gastroenterological malignancy. *Ann Gastroenterol Surg* *2(4)*: 244–245, 2018. PMID: 30003186. DOI: 10.1002/ags3.12184
- 13 Rebersek M: Consensus molecular subtypes (CMS) in metastatic colorectal cancer – personalized medicine decision. *Radiol Oncol* *54(3)*: 272–277, 2020. PMID: 32463385. DOI: 10.2478/raon-2020-0031
- 14 Loupakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L, Cortesi E, Tomasello G, Ronzoni M, Spadi R, Zaniboni A, Tonini G, Buonadonna A, Amoroso D, Chiara S, Carlomagno C, Boni C, Allegrini G, Boni L and Falcone A: Initial therapy with FOLFIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* *371(17)*: 1609–1618, 2014. PMID: 25337750. DOI: 10.1056/NEJMoa1403108
- 15 Kitahara M, Hazama S, Tsunedomi R, Takenouchi H, Kanekiyo S, Inoue Y, Nakajima M, Tomochika S, Tokuhisa Y, Iida M, Sakamoto K, Suzuki N, Takeda S,

- Ueno T, Yamamoto S, Yoshino S and Nagano H: Prediction of the efficacy of immunotherapy by measuring the integrity of cell-free DNA in plasma in colorectal cancer. *Cancer Sci* *107(12)*: 1825–1829, 2016. PMID: 27663862. DOI: 10.1111/cas.13085
- 16 Oki E, Ando K, Taniguchi H, Yoshino T and Mori M: Sustainable clinical development of adjuvant chemotherapy for colon cancer. *Ann Gastroenterol Surg* *6(1)*: 37–45, 2022. PMID: 35106413. DOI: 10.1002/ags3.12503
- 17 Kijima T, Hazama S, Tsunedomi R, Tanaka H, Takenouchi H, Kanekiyo S, Inoue Y, Nakashima M, Iida M, Sakamoto K, Suzuki N, Takeda S, Ueno T, Yamamoto S, Yoshino S, Okuno K and Nagano H: 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(1)*: 23–30, 2017. PMID: 27878288. DOI: 10.3892/or.2016.5267
- 18 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(4)*: 289–303, 2018. PMID: 30003192. DOI: 10.1002/ags3.12180
- 19 Mei Z, Liu Y, Liu C, Cui A, Liang Z, Wang G, Peng H, Cui L and Li C: Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: Systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer* *110(6)*: 1595–1605, 2014. PMID: 24504370. DOI: 10.1038/bjc.2014.46
- 20 Yamamoto T, Kawada K and Obama K: Inflammation-related biomarkers for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients. *Int J Mol Sci* *22(15)*: 8002, 2021. PMID: 34360768. DOI: 10.3390/ijms22158002
- 21 Nakashima-Nakasuga C, Hazama S, Suzuki N, Nakagami Y, Xu M, Yoshida S, Tomochika S, Fujiwara N, Matsukuma S, Matsui H, Tokumitsu Y, Kanekiyo S, Shindo Y, Maeda N, Tsunedomi R, Iida M, Takeda S, Yoshino S, Ueno T, Hamamoto Y, Ogihara H, Hoshii Y and Nagano H: Serum LOX-1 is a novel prognostic biomarker of colorectal cancer. *Int J Clin Oncol* *25(7)*: 1308–1317, 2020. PMID: 32277394. DOI: 10.1007/s10147-020-01673-2
- 22 Droeser RA, Hirt C, Eppenberger-Castori S, Zlobec I, Viehl CT, Frey DM, Nebiker CA, Rosso R, Zuber M, Amicarella F, Iezzi G, Sconocchia G, Heberer M, Lugli A, Tornillo L, Oertli D, Terracciano L and Spagnoli GC: High myeloperoxidase positive cell infiltration in colorectal cancer is an independent favorable prognostic factor. *PLoS One* *8(5)*: e64814, 2013. PMID: 23734221. DOI: 10.1371/journal.pone.0064814

- 23 Kemik O, Sumer A, Kemik AS, Hasirci I, Purisa S, Dulger AC, Demiriz B and Tuzun S: The relationship among acute-phase response proteins, cytokines and hormones in cachectic patients with colon cancer. *World J Surg Oncol* 8: 85, 2010. PMID: 20920199. DOI: 10.1186/1477-7819-8-85
- 24 Zhou JM, Jiang H, Yuan T, Zhou GX, Li XB and Wen KM: High hnRNP AB expression is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Oncol Lett* 18(6): 6459-6468, 2019. PMID: 31819776. DOI: 10.3892/ol.2019.11034
- 25 Ishigami SI, Arii S, Furutani M, Niwano M, Harada T, Mizumoto M, Mori A, Onodera H and Imamura M: Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 78(10): 1379-1384, 1998. PMID: 9823983. DOI: 10.1038/bjc.1998.688
- 26 Cho YB, Lee WY, Choi SJ, Kim J, Hong HK, Kim SH, Choi YL, Kim HC, Yun SH, Chun HK and Lee KU: CC chemokine ligand 7 expression in liver metastasis of colorectal cancer. *Oncol Rep* 28(2): 689-694, 2012. PMID: 22614322. DOI: 10.3892/or.2012.1815
- 27 Liu J, Chen S, Wang W, Ning BF, Chen F, Shen W, Ding J, Chen W, Xie WF and Zhang X: Cancer-associated fibroblasts promote hepatocellular carcinoma metastasis through chemokine-activated hedgehog and TGF- β pathways. *Cancer Lett* 379(1): 49-59, 2016. PMID: 27216982. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.05.022
- 28 Rajaram M, Li J, Egeblad M and Powers RS: System-wide analysis reveals a complex network of tumor-fibroblast interactions involved in tumorigenicity. *PLoS Genet* 9(9): e1003789, 2013. PMID: 24068959. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003789
- 29 Bae JY, Kim EK, Yang DH, Zhang X, Park YJ, Lee DY, Che CM and Kim J: Reciprocal interaction between carcinoma-associated fibroblasts and squamous carcinoma cells through interleukin-1 α induces cancer progression. *Neoplasia* 16(11): 928-938, 2014. PMID: 25425967. DOI: 10.1016/j.neo.2014.09.003
- 30 Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, Aranda Aguilar E, Bardelli A, Benson A, Bodoky G, Ciardiello F, D'Hoore A, Diaz-Rubio E, Douillard JY, Ducreux M, Falcone A, Grothey A, Gruenberger T, Haustermans K, Heinemann V, Hoff P, Köhne CH, Labianca R, Laurent-Puig P, Ma B, Maughan T, Muro K, Normanno N, Österlund P, Oyen WJ, Papamichael D, Pentheroudakis G, Pfeiffer P, Price TJ, Punt C, Ricke J, Roth A, Salazar R, Scheithauer W, Schmoll HJ, Tabernero J, Taïeb J, Tejpar S, Wasan H, Yoshino T, Zaanani A and Arnold D: ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 27(8): 1386-1422, 2016.

- PMID: 27380959. DOI: 10.1093/annonc/mdw235
- 31 Dahinden CA, Geiser T, Brunner T, von Tschanner V, Caput D, Ferrara P, Minty A and Baggiolini M: Monocyte chemotactic protein 3 is a most effective basophil- and eosinophil-activating chemokine. *J Exp Med* 179(2): 751-756, 1994. PMID: 7507512. DOI: 10.1084/jem.179.2.751
- 32 Inácio Pinto N, Carnier J, Oyama LM, Otoch JP, Alcântara PS, Tokeshi F and Nascimento CM: Cancer as a proinflammatory environment: Metastasis and cachexia. *Mediators Inflamm* 2015: 791060, 2015. PMID: 26508818. DOI: 10.1155/2015/791060
- 33 Sharma R, Zucknick M, London R, Kacevska M, Liddle C and Clarke SJ: Systemic inflammatory response predicts prognosis in patients with advanced-stage colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 7(5): 331-337, 2008. PMID: 18794066. DOI: 10.3816/CCC.2008.n.044
- 34 Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ and Peeper DS: Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 133(6): 1019-1031, 2008. PMID: 18555778. DOI: 10.1016/j.cell.2008.03.039
- 35 Lee YS, Kim SY, Song SJ, Hong HK, Lee Y, Oh BY, Lee WY and Cho YB: Crosstalk between CCL7 and CCR3 promotes metastasis of colon cancer cells via ERK-JNK signaling pathways. *Oncotarget* 7(24): 36842-36853, 2016. PMID: 27167205. DOI: 10.18632/oncotarget.9209
- 36 Kurzejamska E, Sacharczuk M, Landazuri N, Kovtonyuk O, Lazarczyk M, Ananthaseshan S, Gaciong Z and Religa P: Effect of chemokine (C-C motif) ligand 7 (CCL7) and its receptor (CCR2) expression on colorectal cancer behaviors. *Int J Mol Sci* 20(3), 686, 2019. PMID: 30764543. DOI: 10.3390/ijms20030686
- 37 Wu Y, Guo S, Chen F, Li Y, Huang Y, Liu W, Zhang G: Fn-Dps, a novel virulence factor of fusobacterium nucleatum, disrupts erythrocytes and promotes metastasis in colorectal cancer (preprint). Available at: https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=4174458 [Last accessed on November 14, 2022]
- 38 Wyler L, Napoli CU, Ingold B, Sulser T, Heikenwalder M, Schraml P and Moch H: Brain metastasis in renal cancer patients: Metastatic pattern, tumour-associated macrophages and chemokine/chemoreceptor expression. *Br J Cancer* 110(3): 686-694, 2014. PMID: 24327013. DOI: 10.1038/bjc.2013.755
- 39 Jung DW, Che ZM, Kim J, Kim K, Kim KY, Williams D and Kim J: Tumor-stromal

- crosstalk in invasion of oral squamous cell carcinoma: A pivotal role of CCL7. *Int J Cancer* *127*(2): 332-344, 2010. PMID: 19937793. DOI: 10.1002/ijc.25060
- 40 Han S, Wang T, Chen Y, Han Z, Guo L, Wu Z, Yan W, Wei H, Liu T, Zhao J, Zhou W, Yang X and Xiao J: High CCL7 expression is associated with migration, invasion and bone metastasis of non-small cell lung cancer cells. *Am J Transl Res* *11*(1): 442-452, 2019. PMID: 30788000
- 41 Ren X, Xiao J, Zhang W, Wang F, Yan Y, Wu X, Zeng Z, He Y, Yang W, Liao W, Ding Y and Liang L: Inhibition of CCL7 derived from Mo-MDSCs prevents metastatic progression from latency in colorectal cancer. *Cell Death Dis* *12*(5): 484, 2021. PMID: 33986252. DOI: 10.1038/s41419-021-03698-5
- 42 Yang H, Jian L, Jin Q, Xia K, Cai-Ru W, Jun S, Chen H, Wei W, Ben-Jing S, Shi-Hong L, Shi-Wei L, Juan W and Wei Z. CCL7 playing a dominant role in recruiting early OCPs to facilitate osteolysis at metastatic site of colorectal cancer. *Cell Commun Signal* *20*(1): 94, 2022. PMID: 35715847. DOI: 10.1186/s12964-022-00867-7
- 43 Lanczky A, Gyorffy B: Web-Based Survival Analysis Tool Tailored for Medical Research (KMplot): Development and Implementation, *J Med Internet Res* *23*(7): e27633, 2021. PMID: 34309564. DOI: 10.2196/27633

8. 図表

表 I. 血清 CCL7 レベル、間質 CCL7 発現と臨床病理学的特徴との関係

	Serum CCL7			Stromal CCL7		
	Low (n=55)	High (n=55)	p- Value	Low (n=26)	High (n=59)	p- Value
Age, years						
Median	66	68	0.365	67	68	0.345
(range)	(37–83)	(25–87)		(38–84)	(25–87)	
Sex						
Male	28	30	0.849	13	31	1.000
Female	27	25		13	28	
CEA (ng/ml)						
Median	15.5	48.1	0.028	19.6	39.5	0.801
(IQR)	(7–91)	(13– 348)		(12–258)	(12– 150)	
CA19-9 (U/ml)						
Median	26.6	84.4	0.010	64.4	45.5	0.296
(IQR)	(6–84)	(18– 1,938)		(16– 1,788)	(10– 248)	
Tumor location						
Right colon	23	26	0.239	10	30	0.559
Left colon	22	14		10	17	
Rectum	10	15		6	12	
Surgery						
Performed	42	43	1.000	26	59	-
Unresectable	13	12		-	-	
Depth						
pT1-3	33	24	0.127	16	27	0.240
pT4a, 4b	22	31		10	32	
Lymph node						
pN0, 1	34	29	0.441	16	31	0.486
pN2, 3	21	26		10	28	
Distant meta.						
pM1a	36	31	0.283	20	28	0.012
pM1b	16	15		2	19	

pM1c	3	9		1	8	
Serum CCL7						
Low	-	-	-	15	27	0.353
High	-	-		11	32	

p 値は Mann-Whitney U 検定または Fisher の正確検定を用いて決定した。切除不能症例については、臨床病理学的特徴を臨床画像診断により評価した。

CCL7, C-C モチーフリガンド 7; CEA, 癌胎児性抗原; CA, 糖鎖抗原; CI, 信頼区間;

IQR, 四分位範囲; meta, metastasis.

表 II. Cox 回帰モデルによる単変量解析

Factor (test vs. control, or numerical)	HR	95% CI	p-Value
<i>Before treatment</i>			
Age (years)	1.012	0.992–1.032	0.239
Sex (Male vs Female)	0.849	0.543–1.329	0.474
Serum CCL7 (High vs. Low)	1.607	1.022–2.527	0.040
CEA (ng/ml, logarithmic)	1.261	0.996–1.598	0.055
CA19-9 (U/ml, logarithmic)	1.120	0.915–1.370	0.274
Surgery (performed vs. unresectable)	0.870	0.518–1.461	0.598
<i>After surgery</i>			
Depth (pT1–4)	1.213	0.819–1.797	0.335
Lymph node (pN0–3)	1.481	1.172–1.871	<0.001
Distant metastasis (pM1a–1c)	1.721	1.254–2.362	<0.001
Tumor CCL7 (score2–3 vs. 0–1)	0.692	0.396–1.209	0.196
Stromal CCL7 (High vs. Low)	1.874	1.009–3.481	0.047

HR, ハザード比; CI, 信頼区間; CCL7, C-C モチーフリガンド 7; CEA, 癌胎児性抗原; CA, 糖鎖抗原。

表 III. Cox 回帰モデルによる多変量解析

Factor (test vs. control, or numerical)	HR	95% CI	p-Value
Age (years)			
Sex (Male vs. Female)			
Serum CCL7 (high vs. low)	1.611	1.022–2.540	0.040
CEA (ng/ml, logarithmic)	1.236	0.970–1.576	0.088

ステップワイズ多変量 Cox 回帰分析は、赤池情報量規準に基づいて行った。

HR, ハザード比; CI, 信頼区間; CCL7, C-C モチーフリガンド 7; CEA, 癌胎児性抗原; CA, 糖鎖抗原。

表 4. CCL7 mRNA 発現と OS の関連性

	Poorer OS	HR	95% CI	p-Value
Cervical squamous cell carcinoma (n=304)	High-CCL7	1.87	(1.15–3.02)	0.010
Kidney renal clear cell carcinoma (n=530)	High-CCL7	2.28	(1.68–3.10)	<0.001
Liver hepatocellular carcinoma (n=370)	Low-CCL7	0.44	(0.31–0.63)	<0.001
Lung adenocarcinoma (n= 504)	High-CCL7	1.55	(1.10–2.20)	0.012
Ovarian cancer (n=373)	Low-CCL7	0.71	(0.52–0.98)	0.034
Pancreatic ductal adenocarcinoma (n=177)	High-CCL7	1.87	(1.15–3.05)	0.010

RNA-sequencing データから得られた CCL7 mRNA 発現と 21 種類の腫瘍の OS との関連を、Web ベースの生存分析ツールである Kaplan Meier プロッターを用いて検討した。21 の腫瘍タイプのうち、ベストカットオフによる有意な関連をリストアップした。p 値は log-rank 検定を用いて決定した。

HR, ハザード比; CI, 信頼区間; CCL7, C-C モチーフリガンド 7; OS, 全生存期間。

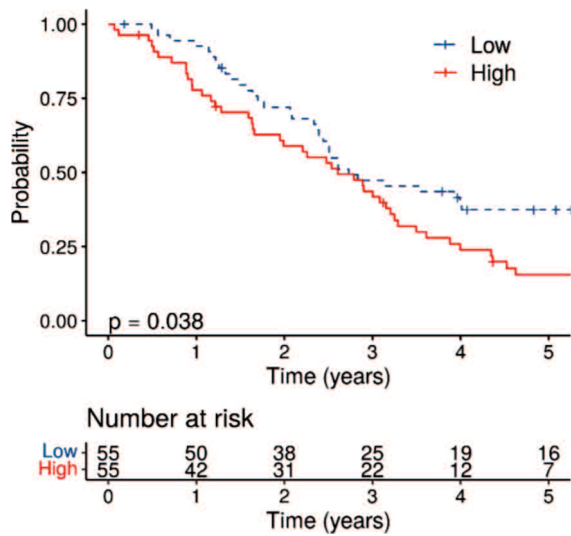


図 1. mCRC（ステージ IV）患者 110 名の血清 CCL7 濃度に基づく OS の Kaplan-Meier 曲線.

カットオフ血清 CCL7 濃度（44.25 pg/ml）は時間依存 ROC 曲線解析により決定した。血清 CCL7 濃度が高い患者は低い患者と比較し、有意に予後不良であった。

OS, 生存期間; mCRC, 転移を伴う大腸癌; CCL7, C-C モチーフリガンド 7; ROC, 時間依存受信者動作特性。

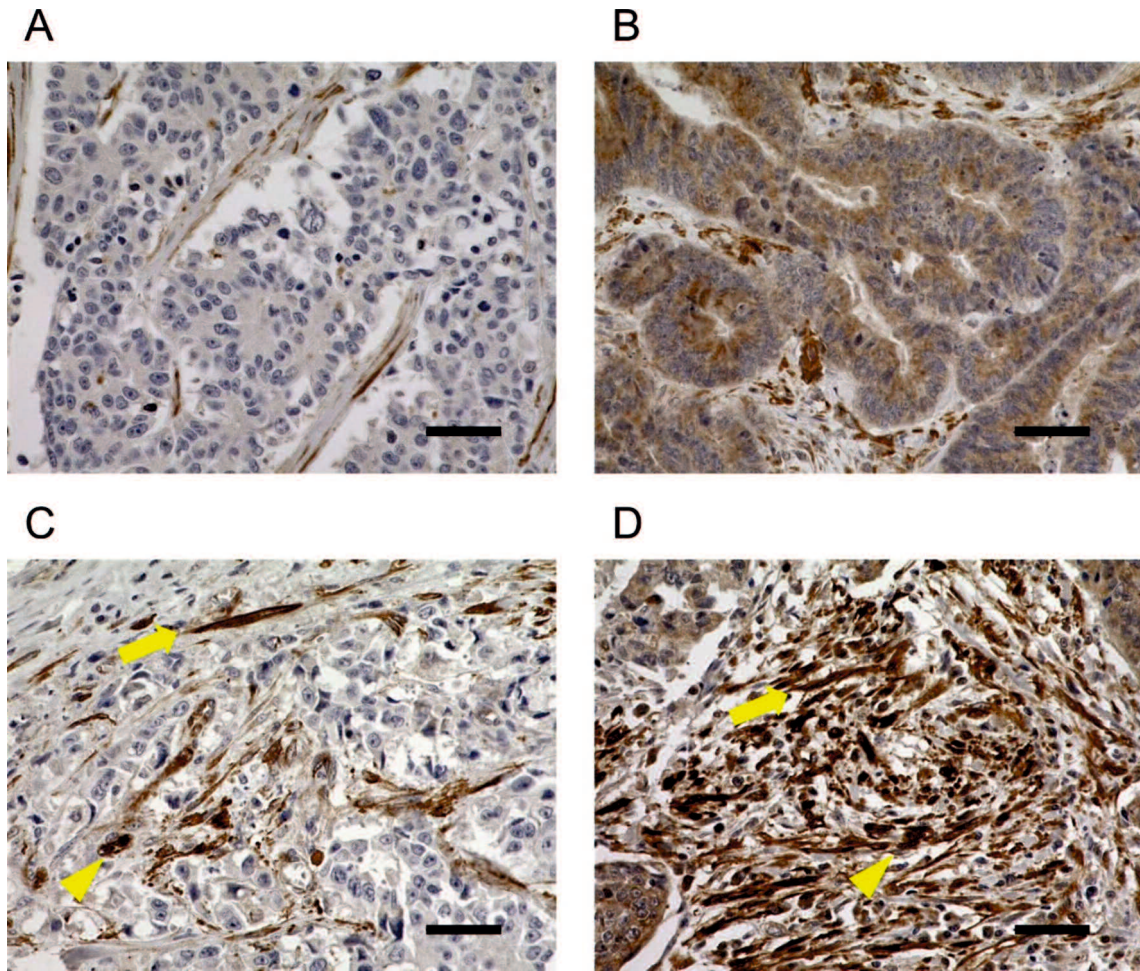


図 2. 大腸癌組織における CCL7 の免疫組織化学的解析.

(A, B) 腫瘍における CCL7 発現レベルがそれぞれ低値と高値の代表画像。(C, D) 腫瘍周囲の CCL7 陽性間質細胞がそれぞれ少数と多数の代表的画像。矢印は線維芽細胞、矢頭はマクロファージを示す。スケールバーは 50 μ m を表す。CCL7, C-C モチーフリガンド 7。

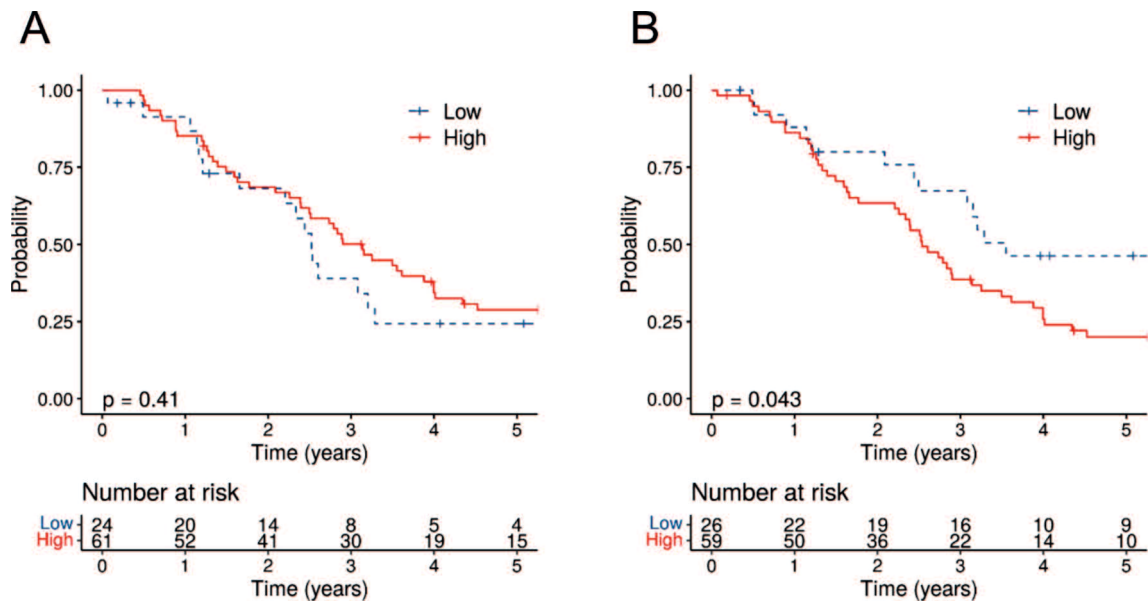


図 3. 大腸癌組織中の CCL7 発現レベルによる患者の OS の Kaplan-Meier 曲線.

転移を伴う大腸癌患者を、腫瘍細胞細胞質 (A) と間質細胞 (B) の CCL7 発現レベルに基づいて、低値群と高値群の 2 群に分けた。間質 CCL7 発現のカットオフ値である 40.8 cells/field は、時間依存 ROC 曲線解析により決定された。腫瘍細胞細胞質での発現の高低で OS に有意差を認めなかったが、間質において CCL7 発現レベル高値は有意に予後不良であった。

CCL7, C-C モチーフリガンド 7; OS, 全生存期間; ROC, 時間依存受信者動作特性。

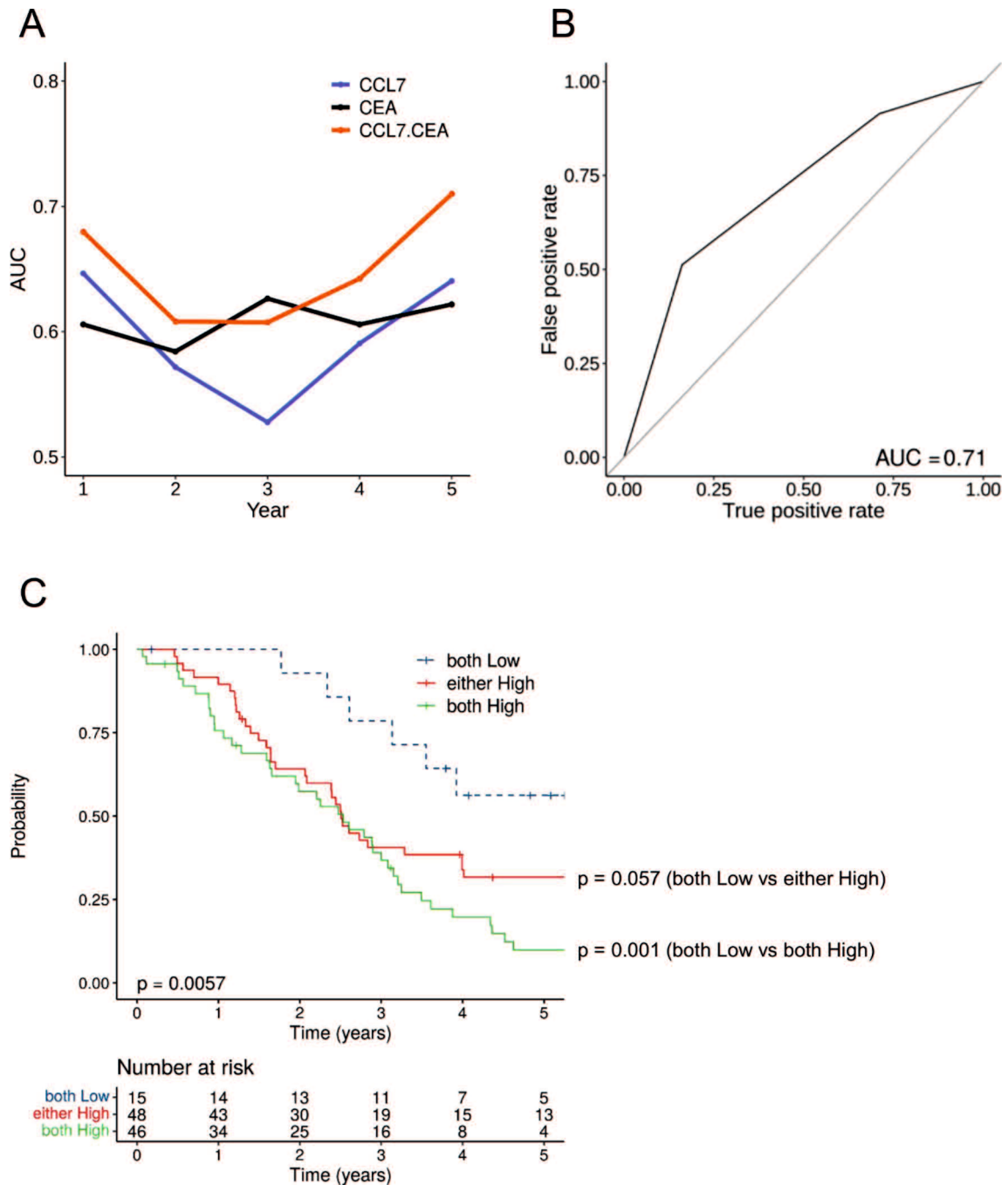


図 4. 血清 CCL7 と CEA の濃度の高低の組み合わせによる患者の OS.

(A) mCRC (ステージ IV) 患者の OS に対する時間依存性 ROC 曲線の AUC。(B) 癌診断から 5 年後の血清 CCL7 と CEA 濃度の複合指標に対する ROC 曲線。(C) 血清 CCL7 と CEA の濃度の高低の組み合わせによる患者の OS の Kaplan-Meier 曲線。CCL7 と CEA のカットオフ値は時間依存の ROC 曲線解析によりそれぞれ 44.2 5pg/ml と 8.32 ng/ml と決定した。CCL7, C-C モチーフリガンド 7; CEA, 癌胎児性抗原; ROC, 時間依存受信者動作特性; AUC, 曲線下面積; OS, 全生存期間。