

学位論文（博士）

IL-6 levels correlate with prognosis and
immunosuppressive stromal cells in patients
with colorectal cancer

（切除可能結腸直腸癌患者における IL-6 発現と
予後、腫瘍間質免疫抑制性細胞の関係）

氏名 山本 常則

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5年6月

目次

1. 要旨	2
2. 研究の背景	2
3. 目的	3
4. 方法	3
(1) 対象	3
(2) 方法	4
(3) 解析	5
5. 結果	5
6. 考察	7
7. 結語	9
8. 謝辞	9
9. 参考文献	9
10. 図表	13

1. 要旨

【背景】結腸直腸癌 (colorectal cancer: CRC) の予後については、腫瘍の特性だけでなく、宿主の免疫反応も重要な因子となる。我々は宿主の免疫反応として全身および腫瘍微小環境 (tumor microenvironment: TME) の炎症性サイトカイン発現に注目し、これらを評価することにより、免疫抑制状態と患者の予後との関係を検討した。

【方法】切除可能 CRC 患者 209 名において、術前に採取した血清サンプルを用いてサイトカイン濃度 (IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α) を電気化学発光法により測定し、予後との関連を検討した。また切除切片における腫瘍組織でのサイトカイン発現を腫瘍細胞、間質細胞に分けて免疫組織化学的に評価した。さらに、切除した CRC 患者 10 例において、新鮮な切除切片から抽出した腫瘍浸潤細胞を用いたマスマイトメトリーによるシングルセル解析を行った。

【結果】無再発生存期間において、血清 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 濃度の高低では有意な関係を認めなかったが、血清 IL-6 高値群で有意に予後不良であった。また血中 IL-6 濃度上昇は腫瘍組織中の間質細胞における IL-6 高発現と関連していた。シングルセル解析の結果、腫瘍浸潤免疫細胞のうち IL-6+細胞は主に骨髄球系細胞で構成され、リンパ球系細胞では IL-6 発現をほとんど認めなかった。また IL-6 高発現群では、CD33+HLADR-骨髄由来抑制細胞 (myeloid-derived suppressor cell: MDSC) および CD4+FOXP3^{high}CD45RA-エフェクター型抑制性 T 細胞 (effector regulatory T cell: eTreg) の割合が IL-6 低発現群に比べ有意に高かった。さらに、MDSC における IL-10+細胞の割合、eTreg における IL-10+細胞または CTLA-4+細胞の割合は、IL-6 高発現群で有意に高かった。

【結論】血清 IL-6 濃度の上昇は間質細胞の IL-6 発現と関連し、予後不良であった。腫瘍浸潤免疫細胞における IL-6 高発現は、TME における MDSC や eTreg 等の免疫抑制性細胞の蓄積と関連し、その機能性マーカーの上昇も認めた。これら IL-6 を介した抑制性免疫機構が CRC 患者の予後不良の一因となっている可能性がある。

2. 研究の背景

結腸直腸癌 (colorectal cancer: CRC) は、世界で 3 番目に罹患率の高い癌であり、その高い有病率と死亡率から世界的に重要な健康問題である (1)。通常は CRC 患者の予後推定に国際対がん連合 (Union for International Cancer Control: UICC) による TNM 分類が使用されるが、疾患の進行は腫瘍の特性だけでなく、宿主の免疫反応も考慮することが重要である。CRC を含む様々な癌種の予後には、局所のおよび全身的な炎症反応が重要な役割を果たすことが先行研究により示唆されており、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α などの全身性炎症性サイトカインは、CRC の病態と関連が報告されている (2-5)。これらのサイトカインは、腫瘍細胞だけでなく間質細胞からも分泌され (6)、腫瘍の浸潤や転移を促進することが報告されている (7)。

IL-6 は代表的な炎症性サイトカインであり、CRC 患者は健常人と比較して血清 IL-6 濃度

が高く (8)、CRC 間質では T 細胞、マクロファージ、線維芽細胞などの様々な炎症性浸潤細胞が IL-6 を分泌している (9-12)。IL-6 が受容体と結合すると、シグナル伝達兼転写活性化因子 3 (STAT3) が活性化し、癌細胞の増殖、血管新生、腫瘍の進行を促進し (11-13)、肝転移や予後不良につながる (8, 14)。IL-1 β は、炎症性サイトカインの複雑なネットワークを誘導し、様々な経路を活性化することで炎症反応を開始、制御する (15, 16)。CRC の腫瘍微小環境 (tumor microenvironment: TME) において、IL-1 β は IL-6 の分泌を制御することが報告されている (17)。IL-8 は、Akt およびマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) 経路を活性化し、細胞増殖に関わる遺伝子の発現を促進する (18)。TNF- α も IL-6 と同様に、その受容体への結合が CRC における腫瘍の増殖を促進する (19, 20)。本研究では、これらのサイトカインの免疫抑制能に着目し、腫瘍局所と全身のサイトカイン発現量の関係を検討した。

また腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) は、局所免疫応答の一部として CRC 患者の予後に好影響を与えることが報告されている (21)。CRC 患者の予後予測スコアリングシステムである Immunoscore は、腫瘍内の CD3⁺ および CD8⁺T 細胞の密度が CRC 患者の無再発生存 (RFS) 及び全生存の独立した予後因子であることを示しており (22, 23)、我々もこれまでに CD4 およびフォークヘッドボックス P3 (FOXP3) 陽性細胞の腫瘍浸潤が CRC 患者の良好な予後と関連することを報告している (24)。一方で、担癌患者において全身的な IL-6 上昇は、T 細胞応答の障害に関与し、抗腫瘍免疫に有害な影響を及ぼすと報告されている (25)。このように CRC における全身性の炎症と局所的な免疫抑制は研究されているが、その関係については不明な点が多い。

3. 目的

本研究では、宿主の免疫反応として全身および TME における炎症性サイトカイン発現に注目し、これらと患者の予後、TIL を含む腫瘍浸潤免疫細胞との関係の解明を目的とした。

4. 方法

(1) 対象

山口大学大学院医学系研究科消化器・腫瘍外科学講座において、1993 年から 2012 年の間に CRC の根治切除を受けた患者 209 名から検体を収集した。腹膜翻転部以下に腫瘍がある下部直腸癌患者は研究対象から除外した。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。患者背景を表 1 に示す。本研究は山口大学の倫理審査委員会によって承認され (H17-83 および H23-135)、ヘルシンキ宣言に従って実施された。

(2) 方法

【血清サイトカイン濃度の測定】

V-PLEX Human Proinflammatory Panel II (k15053D; MSD, Rockville, MD, USA) を用い

た高感度電気化学発光法により、4種類の血清サイトカイン (IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α) 濃度を測定した。術前に採取した血液サンプル (n = 209) を、2,000 \times g で10分間遠心分離し、分析まで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。サイトカイン濃度は、製造元のプロトコールに従って測定した。原液を各プレコートウェルに添加し、室温で2時間インキュベートした。プレートを洗浄した後、検出液を加えて2時間インキュベートし、リードバッファー (R92TC ; MSD) を加え、SECTOR Imager 2400 (MSD) でシグナルを読み取った。IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α の検出下限は、それぞれ0.04 pg/mL, 0.06 pg/mL, 0.04 pg/mL, 0.04 pg/mLであった。

【免疫組織化学染色】

CRCのホルマリン固定パラフィン包埋手術標本(n = 209)を4 μ mに薄切し、免疫組織化学的に評価した。抗原賦活化は、pH6.0のTris-EDTA緩衝液中で、マイクロ波を用いて95 $^{\circ}$ Cにて60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ペルオキシダーゼブロッキング液 (S2023 ; DAKO, Santa Clara, CA, USA) でブロックし、非特異的タンパク質結合を、Protein Block Serum-Free (Dako) を用いて10分間処理することでブロックした。切片をウサギ抗ヒトIL-6抗体 (ab6672; Abcam plc., Cambridge, UK; 500倍希釈) と共に4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。洗浄後、切片を対応する二次抗体を添加した。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、大阪、日本) を用いて撮影した。

腫瘍細胞および間質細胞におけるサイトカイン発現は、患者の転帰について盲検化された病理専門医によって評価された。腫瘍細胞に焦点を当て、サイトカイン発現の半定量的な評価は、先行文献に記載された composite expression score (CES) を用いて行われた (26)。CESは、染色強度と腫瘍細胞の頻度から算出された。強度スコアは、0 (染色なし)、1 (弱陽性)、2 (中陽性)、3 (強陽性) の4グレードに分類し、頻度スコアは、1 (5~24%)、2 (25~49%)、3 (50~74%)、4 (75~100%) の4つのグレードに分類された。CESは、以下の式により算出した: $CES = 4 \times (\text{強度スコア} - 1) + \text{頻度スコア}$ 。全例 (n = 209) をCESの中央値をカットオフとして高低2群に分けた。間質細胞におけるサイトカイン発現の解析は、各スライドのうち、陽性細胞の多い5箇所を400倍視野で撮影し、陽性間質細胞の数をカウントした。全例を陽性細胞数の中央値をカットオフとして2群に分けた。TILのIHCについては、209例のCRC切除標本に対して既報の如く染色を行い、CD3+、CD4+、CD8+、FOXP3+細胞について評価を行った (21, 24, 27)。簡単に説明すると、切片を以下の抗体でインキュベートした: 抗CD3 (マウスモノクローナル、518110079; Ventana, Tucson, AZ, USA)、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, Foster City, CA, USA; 50倍希釈) および抗FOXP3 (マウスモノクローナル、ab20034; Abcam; 100倍希釈)。スライドをスキャンし、コンピュータ画像解析システム (Tissue Studio; Definiens, Germany) を用いて腫瘍部の陽性細胞数を自動計測した。

【マスサイトメトリー解析】

当科で2020年から2021年にかけて切除されたCRC患者10人のサンプルに対してマスサ

イトメトリー解析 (Cytometry by time-of-flight: CyTOF、Fluidigm Corp., South San Francisco, CA, USA) を実施した。腫瘍浸潤免疫細胞は、切除標本から抽出され、38 種類の抗体を用いて分析し (補足表 1)。簡単に説明すると、腫瘍切片を氷上で 1mm^3 の断片に切断し、次に Tumor and Tissue Dissociation Reagent (BD) を含む DMEM 中でインキュベートした。その後、 $40\ \mu\text{m}$ のセルストレーナーを用いてサンプルを濾過した。単離したばかりの細胞を洗浄し、 $5\ \mu\text{M}$ Cell-IDTM cisplatin (201064, Fluidigm) を含む PBS で染色した。Maxpar Cell Staining Buffer (CSB、201068、Fluidigm) を加えてクエンチした。細胞を細胞表面抗体カクテルで室温で 30 分間標識した。CSB で洗浄した後、Maxpar Nuclear Antigen Staining Buffer (201063、Fluidigm) を用いて細胞をプールした。次に、Maxpar Nuclear Antigen Staining Perm (201063、Fluidigm) で 2 回洗浄し、細胞内抗体カクテルで室温で 30 分間標識した。細胞を洗浄し、Cell-IDTM Intercalator-Ir (201192, Fluidigm) に再懸濁し、 4°C で一晩インキュベートした。データ取得は、Helios Mass Cytometer (Fluidigm) を用いて実施した。その後、サイトメトリー解析ソフトウェア Cytobank (Beckman Coulter) で生細胞をゲーティングし (28)、さらに CD45+ 細胞をゲーティングした後にランダムに選択した 10,000 個の細胞を、t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) 教師なし分類アルゴリズムにより 2 次元空間に投影した (29)。

(3) 解析

カテゴリー変数は χ 二乗検定を用いて比較した。2 群間の差は、Mann-Whitney U test を用いて推定した。多群間の差は、Kruskal-Wallis 検定、次いで Steel-Dwass 検定を用いて推定した。RFS は、手術日から癌再発診断日までの間隔と定義した。血清サイトカインのカットオフ値は、Youden index を用いた時間依存受信者動作特性曲線 (receiver operating characteristic curve: ROC) 解析により決定した。生存曲線は Kaplan-Meier 法で推定し、log-rank 検定を用いて検定した。統計解析は、JMP ソフトウェアバージョン 15 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて実施した。統計的有意性は、 $p < 0.05$ とした。

5. 結果

【血清サイトカイン値と予後】

血清サイトカイン (IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α) 濃度と患者の予後との関係を検討した。RFS に関しては、本研究中に 29 名の再発を認めた。血清 IL-6 高値群の RFS は、血清 IL-6 低値群と比べ有意に不良であった ($p=0.031$ 、図 1a)。一方で IL-1 β 、IL-8、TNF- α の高低で RFS に有意差は認めなかった (図 1a)。IL-6 は CRC の予後に重要なサイトカインであることを考慮し、IL-6 に注目してさらなる解析を行った。

【血清 IL-6 濃度と腫瘍の病理学的因子】

血清 IL-6 濃度と腫瘍の病理学的因子との関係を検討した (図 1b)。血清 IL-6 濃度は、T2 よりも T3 または T4 で有意に高かった ($p=0.008$ および $p=0.024$)。一方で血清 IL-6 濃度と

N 因子との間には有意な関係は見られなかった。

【血清 IL-6 濃度と CRC 組織における IL-6 発現の関係】

腫瘍細胞と間質細胞の両方における IL-6 発現を評価し、IHC 染色の代表画像を図 2a に示す。間質 IL-6 高発現群は、IL-6 低発現群と比較して RFS が悪化する傾向を認めたが、その差は統計的に有意ではなかった ($p=0.071$ 、図 2b)。血清と腫瘍細胞の IL-6 レベルには有意な関係は認められなかったが、間質 IL-6 高発現群では血清 IL-6 濃度が有意に高かった ($p<0.001$ 、図 2c)。これらの結果から、間質細胞から分泌される IL-6 が、CRC 患者の循環 IL-6 濃度や予後と関連している可能性が示唆された。

【IL-6 濃度と TILs の関係】

TIL (CD3、CD4、CD8、FOXP3) の密度と患者の予後との関係を検討した。各 TIL の中央値で全症例を高低 2 群に分けた。FOXP3 低値群の RFS は FOXP3 高値群に比べ有意に不良であった ($p=0.022$ 、図 2d)。CD3 および CD4 についても同様の傾向が認められた ($p=0.062$ および $p=0.061$)。続いて、TILs と IL-6 発現の関係を調べた (表 2)。CD8⁺細胞と FOXP3⁺細胞の密度は、血清 IL-6 高値群で有意に低かった ($p=0.032$ および $p=0.005$)。CD3⁺、CD4⁺、FOXP3⁺細胞の密度は、間質 IL-6 高発現群で低くなる傾向を認めた (それぞれ $p=0.061$ 、 $p=0.061$ 、 $p=0.083$)。

免疫学的な予後予測値を評価するため、血清 IL-6 濃度と免疫関連分子 (CD3、CD4、CD8、FOXP3) を用いた RFS の多変量解析を行ったところ、IL-6 は独立した予後因子であった (補足表 2)。しかし、IL-6 と年齢、性別、T 因子、N 因子、組織学的グレード、術後補助療法の有無などの臨床病理学的変数を用いた多変量解析を行ったところ、T 因子が RFS の強い予後因子であり、IL-6 は独立した予後因子とならなかった (補足表 3)。

【腫瘍浸潤免疫細胞のマサイトメトリー解析】

TME と IL-6 発現の関係を明らかにするために、腫瘍浸潤免疫細胞のマサイトメトリー解析を行った (図 3a、3b)。IL-6 を発現している免疫細胞を解析したところ、IL-6⁺細胞は主に CD33⁺HLADR⁻細胞 (樹状細胞や単球を含む) などの骨髄球系細胞や、CD33⁺HLADR⁻ MDSC、CD68⁺マクロファージで構成されていた。CD4⁺および CD8⁺T 細胞、CD20⁺B 細胞、CD56⁺ナチュラルキラー (NK) 細胞はほとんど観察されなかった (図 3c)。

次に、全 CD45⁺細胞中の IL-6⁺細胞の割合の高低によって 10 例を 2 群に分け、IL-6 発現と腫瘍浸潤免疫細胞の関係を検討した。まず、免疫抑制因子として MDSC、マクロファージ、Treg に注目した。IL-6 高値群では CD45⁺細胞に占める CD33⁺HLADR⁻ MDSC の割合は、低値群に比べ有意に高かった (図 4a)。さらに、CD33⁺HLADR⁻ MDSC のうち IL-10⁺細胞の割合は IL-6 高値群で低値群より高くなる傾向を認めた。

CD45⁺細胞のうち CD68⁺マクロファージの割合は IL-6 高値群で低値群より高くなる傾向があった (図 4b)。CD68⁺細胞のうち、M1 マクロファージのマーカーである CD80⁺細胞や M2 マクロファージのマーカーである CD163⁺細胞の割合には、IL-6 高値群、低値群の間に有意差は見られなかった。

Treg の免疫抑制性サブポピュレーションとして知られる CD4⁺FOXP3^{high}CD45RA⁻ eTreg の割合は、IL-6 高値群では低値群に比べ有意に高かった (図 4c)。さらに IL-6 高値群では、免疫抑制性サイトカインである IL-10 や、免疫チェックポイント分子である細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 (CTLA-4) の、eTreg における発現率が高い傾向にあった (図 4c)。このことは、IL-6 が TME におけるこれらの免疫抑制細胞の誘導に関与している可能性を示している。

続いて抗腫瘍因子としての CD4⁺細胞および CD8⁺細胞の割合を解析した。CD8⁺細胞については有意差は認められなかったが、CD4⁺細胞の割合は IL-6 高値群で IL-6 低値群に比べ有意に低く (図 4d)、IHC の結果 (表 2) と一致した。

次に CD8⁺細胞および腫瘍特異的 CD39⁺CD8⁺細胞の疲弊マーカーおよび細胞傷害性マーカーを分析した。CD39⁺CD8⁺細胞における CTLA-4 の割合は、IL-6 高値群が低値群よりも高かったが、CD8⁺細胞および CD39⁺CD8⁺細胞における他の疲弊マーカーには有意差は見られなかった (補足図 1)。

最後に、患者の PBMC を用いて IL-6 (10 ng/mL) の存在下または非存在下で *in vitro* で培養し、IL-6 が免疫細胞へ与える影響を検討した。培養後にフローサイトメトリーを用いて MDSCs、Treg、腫瘍特異的 CD8⁺細胞などの免疫細胞の割合を分析した (補足図 2)。その結果、MDSC の IL-6 発現は、IL-6 を添加して培養した PBMC において、添加しない場合よりも有意に高いことが確認されたが (p=0.019)、その他は有意差を認めなかった。

6. 考察

本研究は、CRC 患者における血清サイトカイン濃度、TME におけるサイトカイン発現、腫瘍浸潤免疫細胞との関係を明らかにすることを目的とした。まず、血清 IL-6 高値が予後不良と関連し、腫瘍浸潤の深さ (T 因子) に応じて上昇することが示された (図 1a および 1b)。CRC における予後因子としての血清 IL-6 濃度の価値については議論があり、血清 IL-6 濃度が予後因子となりうることを示唆する研究 (32) もあれば、そうではないとする研究もある (8)。我々の臨床病理学的変数を考慮した多変量解析の結果では、血清 IL-6 濃度ではなく T 因子が RFS の強い独立した予後因子となったが (補足表 3)、これは血清 IL-6 が T 因子と相関することが影響していると考えられた。Richards らは、腫瘍壊死は T 因子または腫瘍の大きさと有意に関連し、その結果、全身性の炎症反応が増加することを報告し、T 因子と炎症反応の関係を説明する可能性を示した (33)。

さらに、血清 IL-6 濃度が間質細胞における IL-6 発現と相関することを証明した (図 2c)。これまでの研究では、CRC の腫瘍細胞と間質細胞の両方で、コントロールと比較して IL-6 発現の増加が観察されたことが報告されている (17)。また、木下らは、CRC のホモジナイズされた腫瘍組織における IL-6 濃度が、血清 IL-6 濃度と強い相関があることを報告している (34)。しかし、CRC 患者の血清 IL-6 濃度に腫瘍細胞と間質細胞のどちらが強い影響を及ぼすかは不明であった。我々のデータは、CRC 患者における全身性の IL-6 濃度の上昇には、

腫瘍細胞ではなく間質細胞による IL-6 産生が重要な役割を担っている可能性を示している。

次に、間質細胞における IL-6 高発現は、TME における CD4⁺および FOXP3⁺細胞の低密度と関連する傾向があることが示された (表 2)。以前の研究では、STAT3 によって制御される IL-6 は、Treg の FOXP3 発現をダウンレギュレートし、Th17 細胞の生成を誘導することが報告されている (35-37)。これらのデータは、高 IL-6 群で観察された FOXP3⁺細胞の低浸潤のメカニズムの一つの可能性を示唆している。

さらに、腫瘍浸潤免疫細胞と TME における IL-6 発現の関係を調べるため、マスサイトメトリー解析を行ったところ、IL-6⁺細胞は主に CD33⁺HLADR⁺細胞 (樹状細胞、単球等)、MDSC、マクロファージなどの骨髄系細胞からなり、T 細胞、B 細胞、NK 細胞はほとんど含まれていないことがわかった (図 3c)。また、IL-6 高値群では MDSC の割合が有意に高く、IL-10⁺ MDSC の割合も高い傾向にあった (図 4a)。MDSC は、オートクライン的に IL-6 を分泌することが報告されている (38)。また IL-6 とその下流の転写因子である STAT3 は、MDSC が免疫抑制的な表現型を獲得する過程で主要な役割を果たすと報告されている (39)。IL-6 の蓄積は、悪性黒色腫 (40)、扁平上皮癌 (41)、肝細胞癌 (42) などの異なる癌種における免疫抑制性 MDSCs の濃縮と関連している。我々のデータは、IL-6 が CRC における MDSC の集積にも関連していることを示唆している。

マスサイトメトリーデータ解析により、Treg の免疫抑制性サブポピュレーションである eTreg の割合は、IL-6 高値群で IL-6 低値群よりも有意に高いことが示された (図 4c)。さらに、eTreg のうち IL-10 や CTLA-4 の陽性細胞の割合は IL-6 高値群で高くなる傾向があり、CD8⁺CD39⁺細胞のうち CTLA-4⁺細胞の割合は IL-6 高値群で高い傾向を認めた (図 4d)。IL-10 は免疫抑制性サイトカインとして知られており (43)、CD8⁺ T 細胞や Treg に発現する CTLA-4 を介したシグナルは、免疫応答を抑制する制御因子である (44-46)。我々の結果は、腫瘍浸潤細胞における豊富な IL-6 発現が、TME における免疫細胞の抑制機能と関連し、CRC における抗腫瘍免疫の機能障害につながる可能性を示している。

また、腫瘍間質における IL-6 発現は、血清 IL-6 濃度と相関することが示された (図 2c)。さらなる検討が必要であるが、血清 IL-6 を測定することにより、TME における特異的な免疫抑制状態の推測が可能となり得る。実際に、血清 IL-6 濃度は、免疫学的因子との限定的な多変量解析においては独立した予後因子であり (補足表 2)、IL-6 値の測定が何らかの免疫学的意義を持つことが示唆された。

これまでの研究で、TME における IL-6 の欠如は癌免疫療法の効果を高めることが報告されており (47)、免疫チェックポイント阻害剤 (immune checkpoint inhibitor: ICI) と IL-6 抗体遮断の併用療法は癌の進行を抑えることが報告されている (48)。また、血清 IL-6 値は癌免疫療法における予後バイオマーカーであることが報告されている (49)。これらの情報から、血清 IL-6 の測定は、ICI などの免疫調節剤の適切な投与の判断に臨床的に有用であると考えられる。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、本研究はレトロスペクティブな単一施設での

研究であったことである。第二に、マスサイトメトリー解析の結果は、限られた 10 症例に基づく preliminary なものである。したがって、追加症例のさらなる調査が必要である。第三に、IL-6 の抑制性免疫に対する作用のメカニズムは、まだ不完全に理解されていない。In vitro の PBMC の実験に加え、保存した腫瘍浸潤免疫細胞を用いた IL-6 の添加培養実験も行ったが、生細胞の数が少なすぎて解析できなかった。しかしながら本研究により、サイトカインを介した全身と局所の炎症の関係についての理解が進み、今後の新たな免疫治療戦略につながる可能性があると考えられた。

7. 結語

本研究は CRC 患者における血清 IL-6 濃度と間質細胞における IL-6 発現との間に有意な関係を示した初めての報告であると考えられる。またマスサイトメトリー解析により、IL-6 と抑制性免疫細胞の集積、その機能マーカーの発現との関係が示された。これらは予後不良の一因となっている可能性があるが、TME における IL-6 の役割を解析するためにさらなる研究が必要である。

8. 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。また技術的支援をいただいた佐野昭子さん、兼安香織さんに深謝いたします。

9. 参考文献

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J. Clin.* 2022; 72: 7-33.
2. Vakkila J, Lotze MT. Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4: 641-648.
3. Nikiteas NI, Tzanakis N, Gazouli M, et al. Serum IL-6, TNFalpha and CRP levels in Greek colorectal cancer patients: prognostic implications. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11: 1639-1643.
4. Galizia G, Orditura M, Romano C, et al. Prognostic significance of circulating IL-10 and IL-6 serum levels in colon cancer patients undergoing surgery. *Clin. Immunol.* 2002; 102: 169-178.
5. Zhang F, Qiao S. Research progress on the relationship Between inflammation and colorectal cancer. *Ann. Gastroenterol. Surg.* 2022; 6: 204-211.
6. Mager LF, Wasmer MH, Rau TT, Krebs P. Cytokine-induced modulation of colorectal cancer. *Front. Oncol.* 2016; 6: 96.
7. Tahara E. Growth factors and oncogenes in human gastrointestinal carcinomas. *J. Cancer Res.*

- Clin. Oncol. 1990; 116: 121-131.
8. Chung YC, Chang YF. Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.* 2003; 83: 222-226.
 9. Atreya R, Mudter J, Finotto S, et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat. Med.* 2000; 6: 583-588.
 10. Xu H, Lai W, Zhang Y, et al. Tumor-associated macrophage-derived IL-6 and IL-8 enhance invasive activity of LoVo cells induced by PRL-3 in a KCNN4 channel-dependent manner. *BMC Cancer* 2014; 14: 330.
 11. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2009; 15: 103-113.
 12. Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, et al. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *Br. J. Cancer* 2014; 110: 469-478.
 13. Corvinus FM, Orth C, Moriggl R, et al. Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth. *Neoplasia* 2005; 7: 545-555.
 14. Belluco C, Nitti D, Frantz M, et al. Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2000; 7: 133-138.
 15. Thomassen E, Bird TA, Renshaw BR, Kennedy MK, Sims JE. Binding of interleukin-18 to the interleukin-1 receptor homologous receptor IL-1Rrp1 leads to activation of signaling pathways similar to those used by interleukin-1. *J. Interferon Cytokine Res.* 1998; 18: 1077-1088.
 16. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87: 2095-2147.
 17. Cui G, Yuan A, Sun Z, Zheng W, Pang Z. IL-1beta/IL-6 network in the tumor microenvironment of human colorectal cancer. *Pathol. Res. Pract.* 2018; 214: 986-992.
 18. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 6735-6741.
 19. Mizoguchi E, Mizoguchi A, Takedatsu H, et al. Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* 2002; 122: 134-144.
 20. Hamilton KE, Simmons JG, Ding S, Van Landeghem L, Lund PK. Cytokine induction of tumor necrosis factor receptor 2 is mediated by STAT3 in colon cancer cells. *Mol. Cancer Res.* 2011; 9: 1718-1731.
 21. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313: 1960-1964.

22. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J. Pathol.* 2014; 232: 199-209.
23. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet* 2018; 391: 2128-2139.
24. Kuwahara T, Hazama S, Suzuki N, et al. Intratumoural-infiltrating CD4 + and FOXP3 + T cells as strong positive predictive markers for the prognosis of resectable colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 2019; 121: 659-665.
25. Tsukamoto H, Nishikata R, Senju S, Nishimura Y. Myeloid-derived suppressor cells attenuate TH1 development through IL-6 production to promote tumor progression. *Cancer Immunol. Res.* 2013; 1: 64-76.
26. Mukherjee K, Peng D, Brifkani Z, et al. Dopamine and cAMP regulated phosphoprotein MW 32 kDa is overexpressed in early stages of gastric tumorigenesis. *Surgery.* 2010; 148: 354-363.
27. Kinoshita T, Muramatsu R, Fujita T, 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.* 2016; 27: 2117-2123.
28. Kotecha N, Krutzik PO, Irish JM. Web-based analysis and publication of flow cytometry experiments. *Curr. Protoc. Cytom.* 2010; Chapter: Unit10.17.
29. Maaten L, Hinton G. Visualizing data using t-SNE. *J. Mach. Learn. Res.* 2008; 9: 2579-2605.
30. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009; 30: 899-911.
31. Saito T, Nishikawa H, Wada H, et al. Two FOXP3(+)CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat. Med.* 2016; 22: 679-684.
32. Yeh KY, Li YY, Hsieh LL, et al. Analysis of the effect of serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor levels on survival of patients with colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2010; 40: 580-587.
33. Richards CH, Roxburgh CS, Anderson JH, et al. Prognostic value of tumour necrosis and host inflammatory responses in colorectal cancer. *Br J Surg.* 2012; 99: 287-294.
34. Kinoshita T, Ito H, Miki C. Serum interleukin-6 level reflects the tumor proliferative activity in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 2526-2531.
35. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441: 235-238.
36. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24: 179-189.

37. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006; 441: 231-234.
38. Smith AD, Lu C, Payne D, et al. Autocrine IL6-Mediated Activation of the STAT3-DNMT Axis Silences the TNFalpha-RIP1 Necroptosis Pathway to Sustain Survival and Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res.* 2020; 80: 3145-3156.
39. Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol.* 2011; 32: 19-25.
40. Meyer C, Sevko A, Ramacher M, et al. Chronic inflammation promotes myeloid-derived suppressor cell activation blocking antitumor immunity in transgenic mouse melanoma model. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 2011; 108: 17111-17116.
41. Chen MF, Kuan FC, Yen TC, et al. IL-6-stimulated CD11b⁺ CD14⁺ HLA-DR⁻ myeloid-derived suppressor cells, are associated with progression and poor prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncotarget* 2014; 5: 8716-8728.
42. Lin Y, Yang X, Liu W, et al. Chemerin has a protective role in hepatocellular carcinoma by inhibiting the expression of IL-6 and GM-CSF and MDSC accumulation. *Oncogene* 2017; 36: 3599-3608.
43. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 1993; 11: 165-190.
44. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, et al. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* 2008; 322: 271-275.
45. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13: 227-242.
46. Howe JR. The impact of DNA testing on management of patients with colorectal cancer. *Ann. Gastroenterol. Surg.* 2022; 6: 17-28.44. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, et al. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* 2008; 322: 271-275.
47. Ohno Y, Toyoshima Y, Yurino H, et al. Lack of interleukin-6 in the tumor microenvironment augments type-1 immunity and increases the efficacy of cancer immunotherapy. *Cancer Sci.* 2017; 108: 1959-1966.
48. Mace TA, Shakya R, Pitarresi JR, et al. IL-6 and PD-L1 antibody blockade combination therapy reduces tumour progression in murine models of pancreatic cancer. *Gut.* 2018; 67: 320-332.
49. Hazama S, Takenouchi H, Tsunedomi R, et al. Predictive biomarkers for the outcome of vaccination of five therapeutic epitope peptides for colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2014; 34: 4201-4205.

1 0 . 图 表

表 1. 患者背景

Characteristic	n.	(%)
<i>Race</i>		
Asian	209	100
<i>Age (years)</i>		
Median	69	
Range	27–89	
<i>Sex</i>		
Male	119	57
Female	90	43
<i>Primary tumor location</i>		
Ascending colon	54	26
Transverse colon	27	13
Descending and sigmoid colon	82	39
Upper rectum	46	22
<i>Disease stage at diagnosis</i>		
I	69	33
II	84	40
III	56	27
<i>T factor</i>		
T1	43	21
T2	37	18
T3	111	53
T4	18	9
<i>N factor</i>		
N0	153	73
N+	56	27
<i>Histologic grade</i>		
Well-differentiated	59	28
Moderately differentiated	135	65
Poorly differentiated	11	5
Mucinous/undifferentiated	4	2
<i>Vascular emboli or lymphatic invasion</i>		
Present	90	43
Absent	119	57
<i>Adjuvant chemotherapy</i>		
Yes	96	46
No	113	54

表 2. 腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) 数と間質細胞 IL-6 発現量および血清 IL6 濃度の関係

		CD3			CD4			CD8			FOXP3		
		TIL density			TIL density			TIL density			TIL density		
		Low	High	<i>p</i> Value	Low	High	<i>p</i> Value	Low	High	<i>p</i> Value	Low	High	<i>p</i> Value
<i>Stromal cells</i>													
IL-6	Low	46	59	0.061	46	59	0.061	48	57	0.188	46	59	0.083
	High	59	45		59	45		57	47		58	46	
<i>Serum</i>													
IL-6	Low	46	59	0.061	57	48	0.239	45	60	0.032	42	63	0.005
	High	59	45		48	56		60	44		62	42	

IL, インターロイキン; CD, cluster of differentiation; FOXP3, フォークヘッドボックス P3

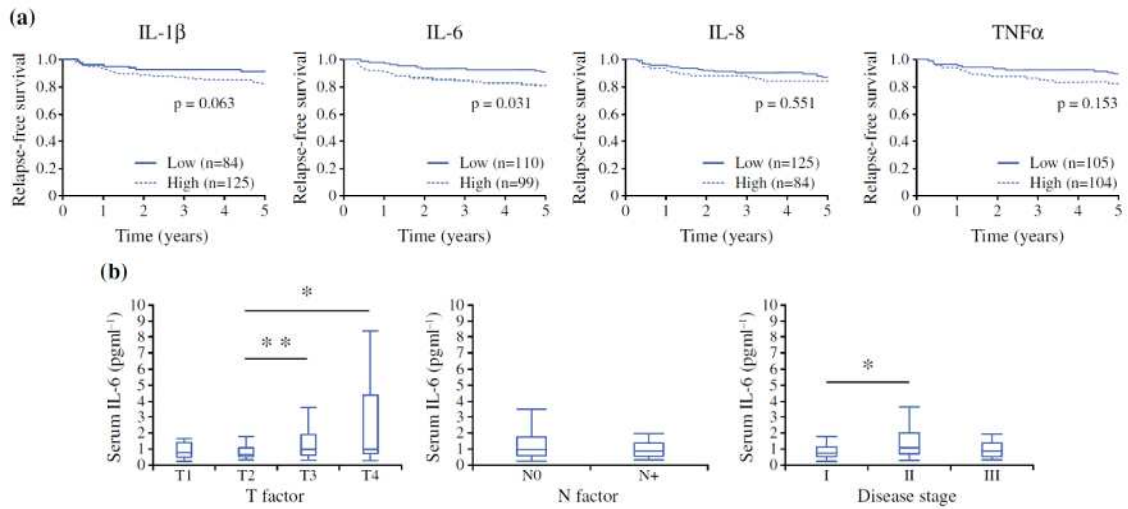


図1. 各サイトカインレベルによる長期生存期間と病理学的因子による IL-6 レベルの比較
 (a) 各サイトカイン(IL-1β、IL-6、IL-8、TNFα)濃度の高低に応じた無再発生存率の比較。高 IL-6 群は有意に悪い予後を示した (p = 0.031)。カットオフ値は Kaplan-Meier 推定法を用いた時間依存 ROC 曲線解析と Youden index によって決定された (IL-1β: 0.0693 pg/mL、IL-6: 0.9825 pg/mL、IL-8: 17.9423 pg/mL、TNFα: 2.0673 pg/mL)。
 (b) 病理学的因子に応じた血清 IL-6 値。血清 IL-6 値と病理学的要因の関係をボックスプロットで示す。血清 IL-6 値は、T 因子によって上昇する傾向を認めた。
 *p < 0.05. **p < 0.01. IL, インターロイキン; TNFα, 腫瘍壊死因子 α

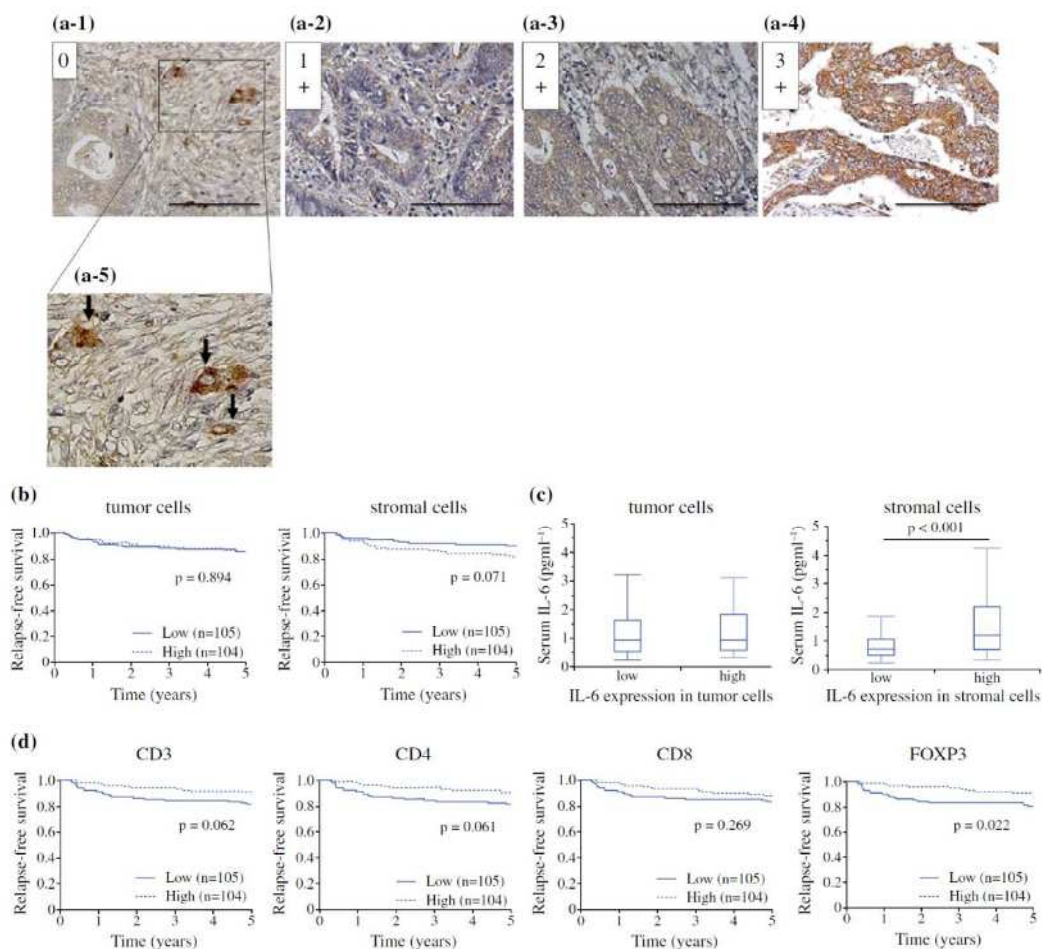


図2 免疫組織化学 (IHC) 染色の結果。

(a) IL-6 抗体による IHC 染色の代表例。腫瘍細胞は Composite Expression スコアで評価した。腫瘍細胞の染色強度は以下のように評価した。0 (染色なし, a-1) ; 1+ (弱陽性, a-2) ; 2+ (陽性, a-3) ; 3+ (強陽性, a-4)。スケールバーは $100\ \mu\text{m}$ を示す。a-5 (矢印) に IL-6⁺ 間質細胞を示す。間質は、陽性細胞の最も多い強拡大 5 視野における IL-6⁺ 細胞数の平均を評価した。

(b) 腫瘍細胞および間質細胞における IL-6 発現の高低と無再発生存率。間質細胞における IL-6 高発現群は、予後が悪い傾向を認めた ($p = 0.071$)。

(c) 腫瘍細胞および間質細胞における IL-6 発現の高低と血清 IL-6 濃度。血清 IL-6 濃度は、間質細胞の IL-6 高発現群で有意に高値であった ($p < 0.001$)。

(d) 腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) 数の高低と無再発生存率。CD3⁺、CD8⁺、CD4⁺、FOXP3⁺ 細胞の高低で無再発生存率を比較した。FOXP3 高値群は有意に予後良好であった ($p = 0.022$)。CD3⁺ および CD4⁺ 高値群はより予後良好の傾向を認めた ($p = 0.062$ および $p = 0.061$)。TIL のカットオフ値 (中央値) は CD3: $338.2\ \text{cells}/\text{mm}^2$, CD4: $68.0\ \text{cells}/\text{mm}^2$, CD8: $71.4\ \text{cells}/\text{mm}^2$, FOXP3: $89.7\ \text{cells}/\text{mm}^2$ 。IL, インターロイキン; CD, cluster of differentiation; FOXP3, フォークヘッドボックス P3

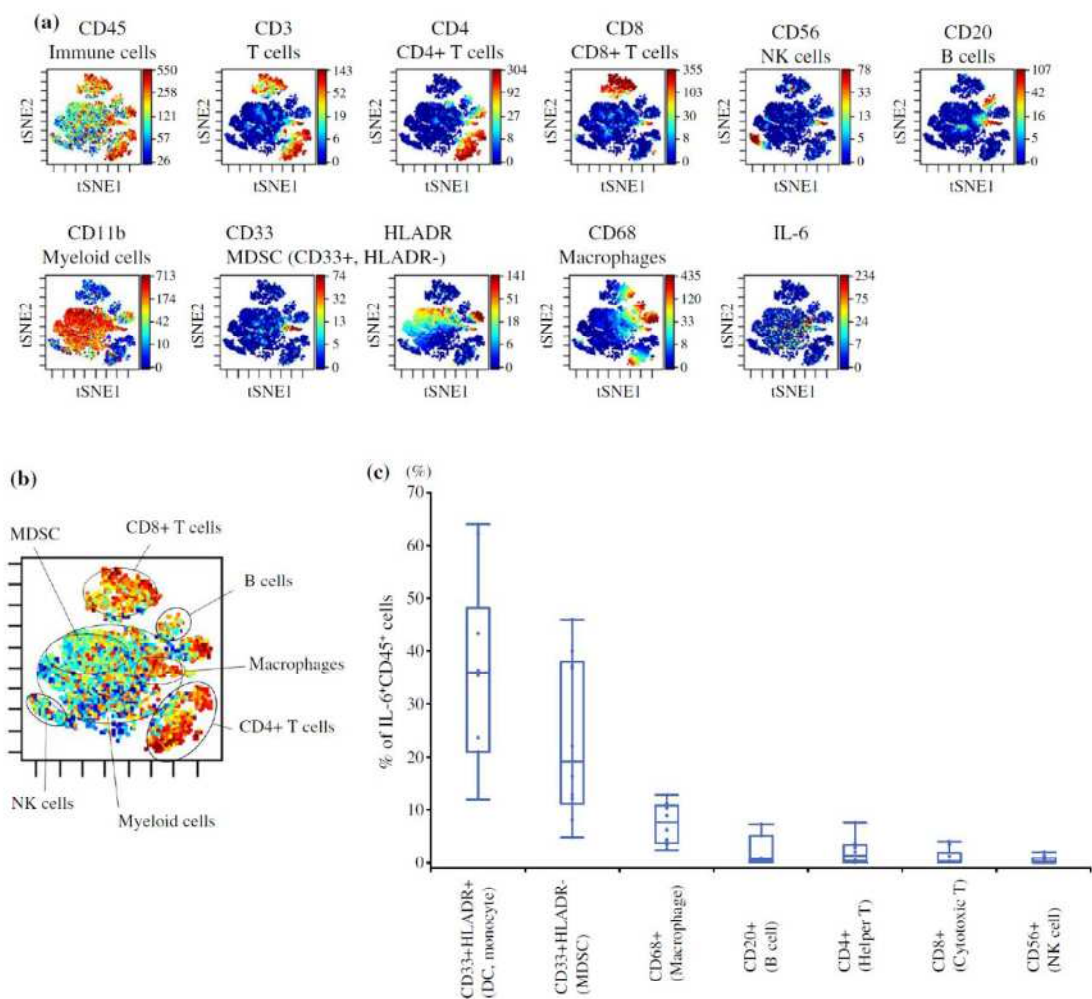


図3. 結腸直腸癌（CRC）における主な腫瘍浸潤免疫細胞と IL-6⁺細胞。

(a) 免疫細胞の代表的マーカーごとの t-SNE プロット。ゲーティングされた CD45⁺細胞が各マーカーの発現強度でクラスタリングされ、2次元空間に投影された。

(b) 主要な免疫細胞システムのクラスターを円で囲んだ t-SNE マップ。

(c) IL-6⁺細胞の免疫細胞系統の内訳を boxplot で示す。IL-6⁺細胞の大部分は骨髄系細胞で構成されており、リンパ球系細胞は少数であった。

IL, インターロイキン; t-SNE, t-distributed stochastic neighbor embedding; CD, cluster of differentiation

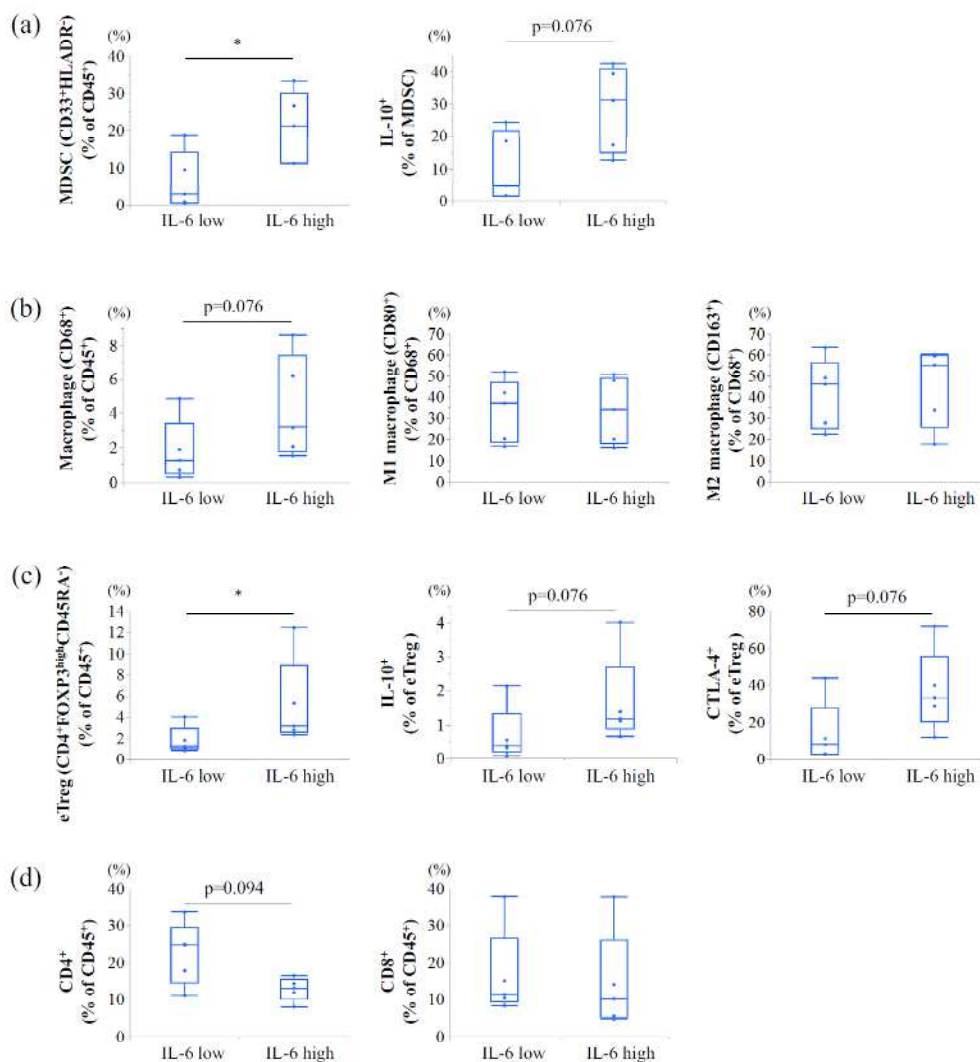


図4. IL-6 と腫瘍浸潤免疫細胞の関係。

(a) IL-6⁺細胞高値群ではCD45⁺細胞中のCD33⁺HLA-ADR⁻骨髄由来抑制細胞 (MDSC) の割合が有意に高く、MDSC中のIL-10⁺細胞の割合も高い傾向を認めた。

(b) IL-6⁺細胞高値群ではCD45⁺細胞中のCD68⁺マクロファージの割合が有意に高かった。マクロファージ中のCD80⁺M1マクロファージ、CD163⁺M2マクロファージの割合については有意差を認めなかった。

(c) IL-6⁺細胞高値群ではCD45⁺細胞中のFOXP3^{high}CD45RA⁻eTregsの割合が有意に高かった。IL-6⁺細胞高値群ではeTregs中のIL-10⁺細胞、CTLA-4⁺細胞の割合も高い傾向を認めた。

(d) IL-6⁺細胞高値群ではCD45⁺細胞中のCD4⁺細胞の割合は有意に低かった。CD8⁺細胞の割合については有意差を認めなかった。

IL, インターロイキン; CD, cluster of differentiation; HLA, ヒト白血球抗原; eTreg, エフェクター制御性T細胞; CTLA-4, 細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4; FOXP3, フォークヘッドボックスP3; *p < 0.05

補足表 1. マスサイトメトリー用抗体とアイソトープ一覧

Metal	Target	Surface / intracellular	Crone
89Y	CD45	surface	HI30
115In	IL-1b	intracellular	8516MAB201
141Pr	CD3	surface	UCHT1
142nd	IL-4	intracellular	MP4-25D2
143nd	CD45RA	surface	HI100
144Nd	CD11b (Mac-1)	surface	ICRF44
145Nd	CD163	surface	GHI/61
146Nd	CD8a	surface	RPA-T8
147Sm	CD20	surface	2H7
148Nd	CD274 (PD-L1)	surface	29E.2A3
149Sm	CD194 (CCR4)	surface	L291H4
150Nd	CD134 (OX40)	surface	ACT35
151Eu	CD278/ICOS	surface	C398.4A
152Sm	TNF α	intracellular	Mab11
153Eu	TIGIT	surface	MBSA43
154Sm	TIM-3	surface	F38-2E2
155Gd	CD279 (PD-1)	surface	EH12.2H7
156Gd	IL-6	intracellular	MO2-13AS
158Gd	CD33	surface	WM53
159Tb	FOXP3	intracellular	259D/C7
160Gd	CD39	surface	A1
161Dy	Ki-67	intracellular	B56
162Dy	CD80 (B7-1)	surface	2D10.4
163Dy	TGF β	intracellular	TW4-6H10
164Dy	arginase 1	intracellular	14D2C43
165Ho	CD223/LAG-3	surface	11C3C65
166Er	IL-10	intracellular	JES3-9D7
167Er	CD197 (CCR7)	surface	G043H7
168Er	IFN γ	intracellular	27B
169Tm	CD25 (IL-2R)	surface	2A3
170Er	CD152 (CTLA-4)	surface	14D3
171Yb	CD68	surface	Y1/82A
172Yb	IL-17A	intracellular	BL168
173Yb	HLA-DR	surface	L243
174Yb	CD4	surface	SK3
175Lu	perforin	intracellular	B-D48
176Yb	CD56 (NCAM)	surface	NCAM16.2
209Bi	CD16	surface	3G8

CD, cluster of differentiation; *IL*, interleukin; *TNF*, tumor necrosis factor; *TIGIT*, T cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domain; *TIM-3*, T cell immunoglobulin and mucin domain 3; *FOXP3*, forkhead Box P3; *TGF*, transforming growth factor; *INF*, interferon; *HLA*, human leukocyte antigen.

補足表 2. 無再発生存に対する免疫学的因子の単変量および多変量解析。

	RFS					
	Univariate			Multivariate		
	HR	95% CI	<i>p</i> -value	HR	95% CI	<i>p</i> -value
serum IL-6 density	2.32	1.08 to 4.99	0.031	2.20	1.01 to 4.83	0.048
CD3 density	0.50	0.23 to 1.08	0.076	0.38	0.26 to 1.66	0.377
CD4 density	0.50	0.23 to 1.07	0.075	0.13	0.21 to 1.21	0.128
CD8 density	0.68	0.32 to 1.41	0.297	0.40	0.59 to 3.72	0.403
FOXP3 density	0.41	0.19 to 0.90	0.027	0.08	0.21 to 1.10	0.084

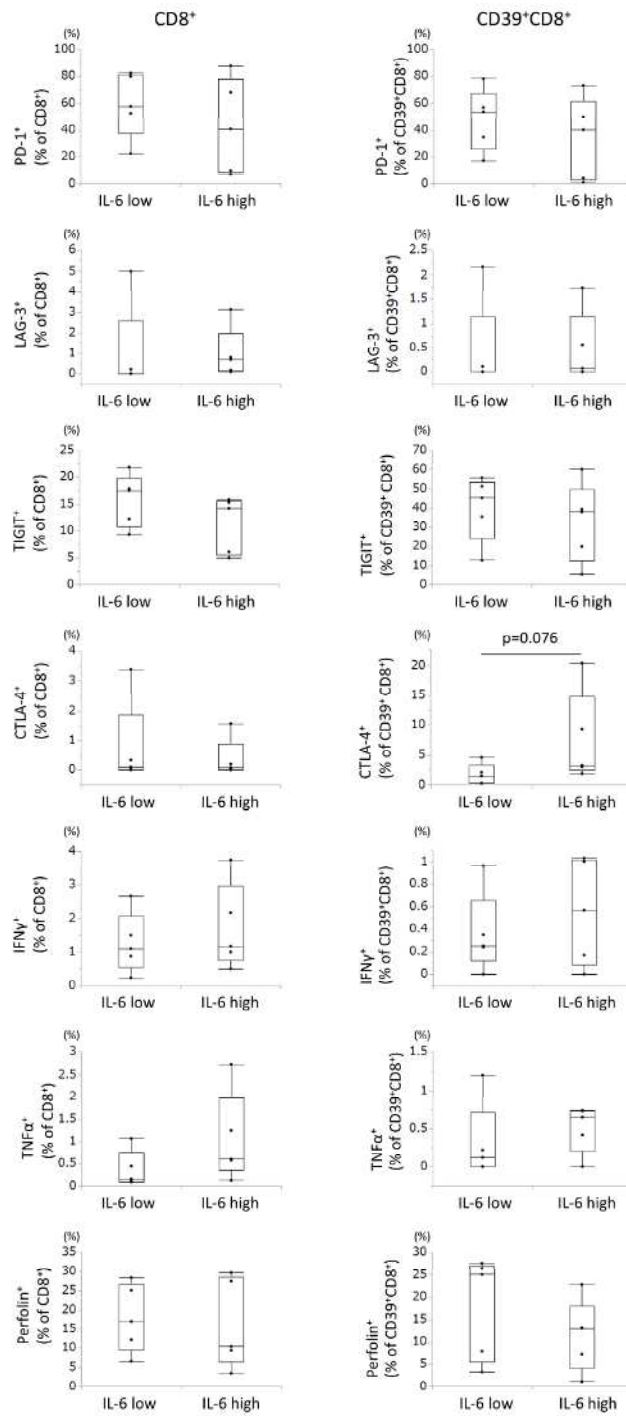
RFS, relapse-free survival; CRC, colorectal cancer; HR, hazard ratio;

CI, confidence interval; CD, cluster of differentiation; FOXP3, forkhead box P3.

補足表 3. 無再発生存に対する臨床病理学的因子の単変量および多変量解析。

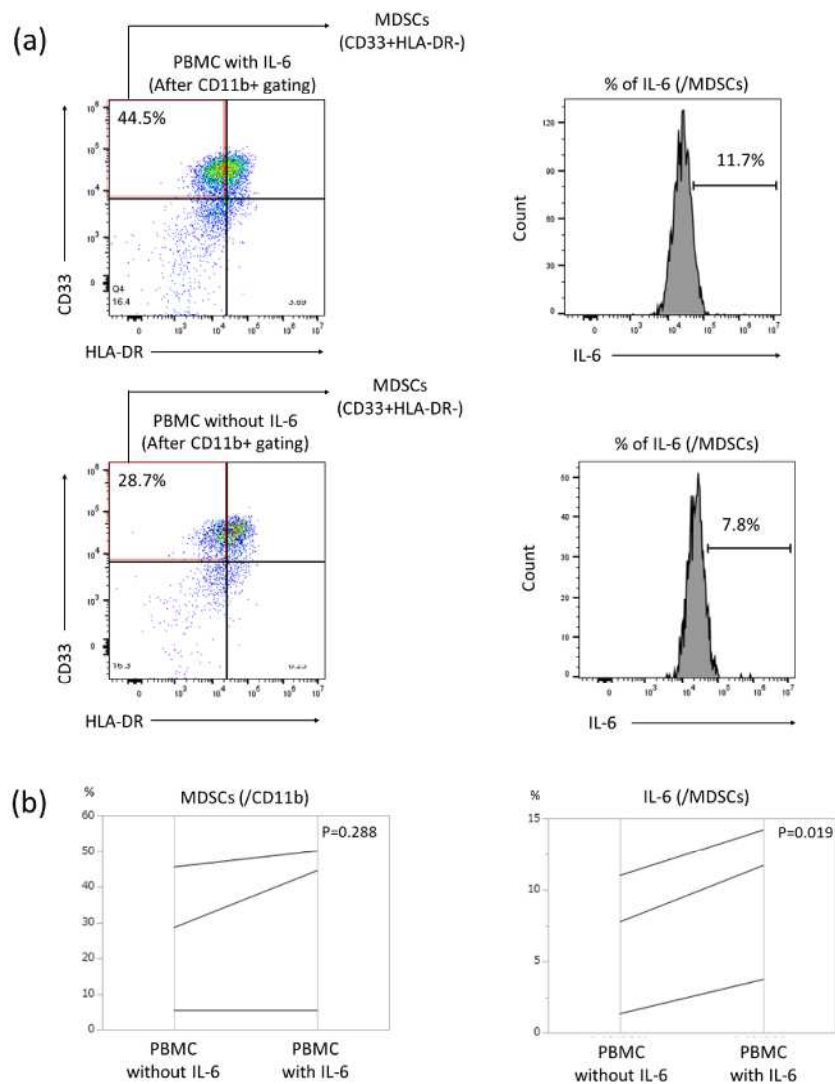
	RFS					
	Univariate			Multivariate		
	HR	95% CI	<i>p</i> -value	HR	95% CI	<i>p</i> -value
Age	2.81	1.07 to 7.35	0.036	2.64	0.99 to 7.02	0.034
Sex	1.48	0.69 to 3.18	0.316			
T stage	6.00	1.82 to 19.82	0.003	4.11	1.15 to 14.70	0.005
N stage	1.45	0.68 to 3.13	0.338			
Histologic grade	0.96	0.22 to 4.02	0.951			
serum IL-6 density	2.32	1.08 to 4.99	0.031	1.68	0.77 to 3.70	0.128
Adjuvant therapy	2.32	1.08 to 4.99	0.031	1.54	0.69 to 3.44	0.288

RFS, relapse-free survival; CRC, colorectal cancer; HR, hazard ratio; CI, confidence interval.



補足図 1. IL-6⁺細胞の高低による CD8⁺細胞および CD39⁺CD8⁺細胞の疲弊マーカーと細胞傷害マーカーの割合。IL-6 高値群では低値群に比べて、CD39⁺CD8⁺細胞中の CTLA-4⁺細胞の割合は高い傾向にあった。

IL, インターロイキン; CD, cluster of differentiation; CTLA-4, 細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4



補足図2. PBMC に対する IL-6 の MDSC 誘導効果および MDSC における IL-6 発現 (n=3)。マスサイトメトリー分析を行った 3 例の PBMC を、37°C、5%CO₂ の完全培地で IL-6 (10 ng/mL) 存在下または非存在下で 4 日間培養し、フローサイトメトリーで解析した。

(a) IL-6 存在下で培養した MDSCs (上段) と IL-6 非存在下で培養した MDSCs (下段) のフローサイトメトリー解析の結果の 1 例。

(b) IL-6 存在下または非存在下での培養結果では、CD11b 中の MDSC の割合は有意な差を認めなかったが、MDSC 中の IL-6 の陽性率は IL-6 存在下で培養した群で有意に高値であった。

IL, インターロイキン; PBMC, 末梢血単核細胞; MDSC, 骨髓由来サプレッサー細胞; CD, cluster of differentiation