

抄読会 2021/10/18

A template to quantify the location and density of CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in colon cancer by digital pathology on whole slides for objective, standardized immune score assessment

Dordi Lea, Marin Watson, Ivar Skaland, Hanne R. Hagland, Melinda Lillsand, Einar Gudlaugsson, Kjetil Sereide

Cancer Immunology, Immunotherapy 70; 2049-2057; 2021.

【要旨】

【背景】大腸癌においては、tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) の浸潤部位と密度により患者予後が low および high-risk に分類される。これらを評価するプログラムも市販されているが、高価かつ権利の点から汎用されていない。本研究の目的は大腸癌における TIL の定量化の方法を確立することである。【方法】大腸癌患者を無作為に抽出し、自動デジタル解析 (automated digital pathology) により免疫組織化学的に評価を行なった。代表的切片の浸潤先進部 (invasive margin) および腫瘍中心 (tumor center) における CD3, CD8 について自動計測を行い、image analysis software (Visiopharm) を用いて解析を行なった。切片全体について、1mm² 当たりの細胞数を計測し、分布量から immune score を算出した。Immune score と臨床病理学的特徴との関係について確認した。【結果】Digital image analysis による定量的な TIL 数に基づき、low (n=83, 69.7%), intermediate (n=14, 11.8%) および high (n=22, 18.5%) の immune score group に分類された。High immune score は stage I-II の腫瘍 (p=0.017)、高 MSI 型 (p=0.030) と有意な関連がみられた。MSI 型腫瘍では、MSS 型腫瘍と比較して、浸潤先進部における CD3+TIL が高値であり、加えて浸潤先進部および腫瘍中心部における CD8+ TIL が高値であった。【結論】Immune score の定量的 digital template は大腸癌における臨床病理学的所見と MSI 型腫瘍との関連を簡便に評価することが可能であった。

Take Home message

1. CD3+/CD8+ TIL の定量的評価により、immune score は3つのグループに分類することが可能であった。
2. 大腸癌における TIL は腫瘍中心部と比較して、浸潤先進部で多く認められる。
3. 大腸癌では、MSS 型癌と比較して MSI 型癌で TIL が多く認められ、TIL の評価は免疫チェックポイント阻害薬の効果予測に用いることが可能である。

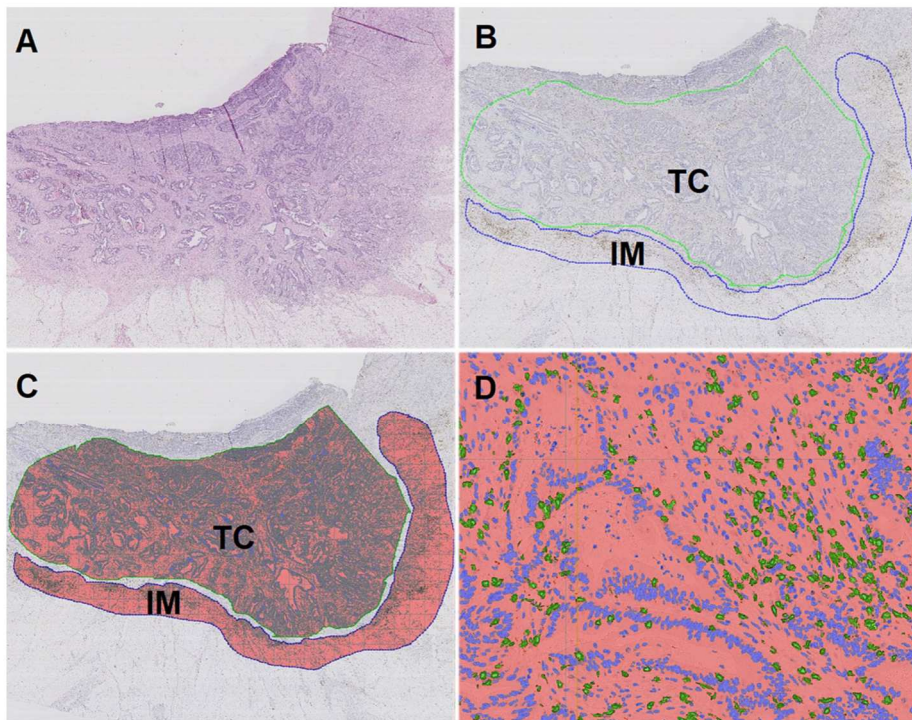


Fig. 1 **a** Hematoxylin-eosin staining of tumor. **b** Immunohistochemical staining of CD3 (brown) in the same tumor with marking of tumor center/TC (blue) and invasive margin/IM (green). **c** Digital image analysis measured the CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in TC and IM. The number of positive TILs was calculated pr.

mm². The same tumor area was analyzed for CD3 and CD8 for each patient. **d** Close-up view that shows positive TILs marked with green. Negative nuclei are marked blue and surrounding stroma is marked red

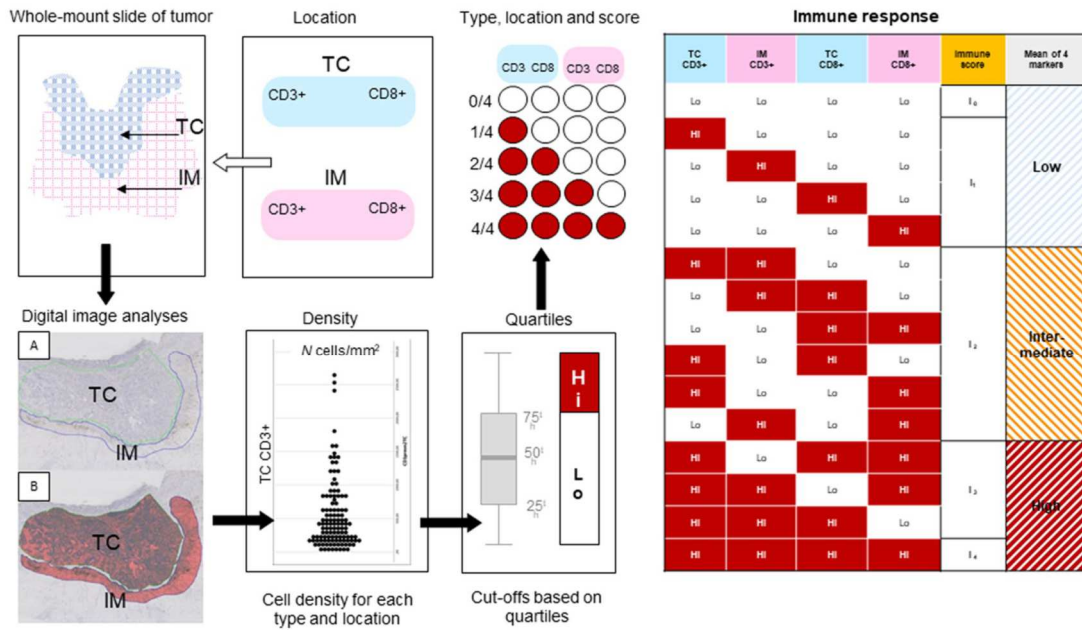


Fig. 2 Flowchart for calculating immune response based on mean densities of CD3+ and CD8+ in tumor center (TC) and invasive margin (IM)

Table 1 Density (cells/mm²) cut-off values based on highest quartiles (75th percentile)

	Tumor center		Invasive margin	
	CD3+	CD8+	CD3+	CD8+
	cells/mm ²	cells/mm ²	cells/mm ²	cells/mm ²
Median	393	220	858	513
Percentiles				
25th	187	112	452	277
50th	393	220	858	513
75th	760	466	1390	896

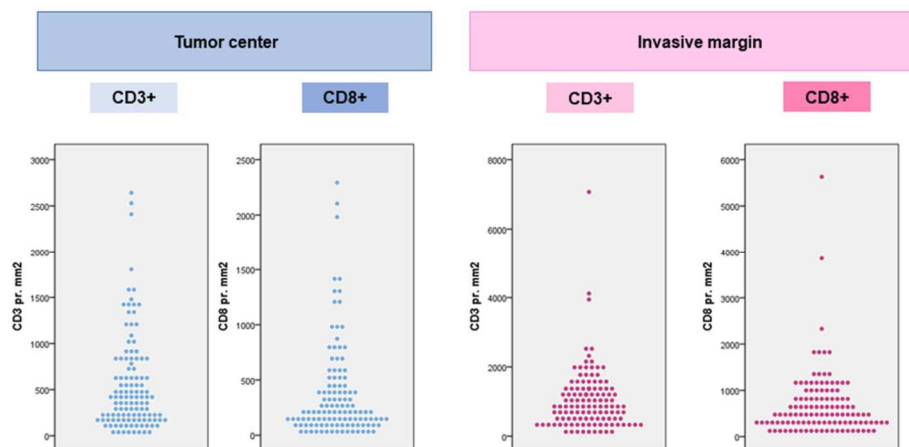


Fig. 3 Distribution of number of CD3+ and CD8+ TILs in tumor center (TC) and invasive margin (IM)

Table 2 Distribution of patients (*n*) with high immune response (≥ 75 th percentile) in different regions

	Tumor center				Invasive margin			
	CD3 Low	CD3 High	CD8 Low	CD8 High	CD3 Low	CD3 High	CD8 Low	CD8 High
0 of 4	69	0	69	0	69	0	69	0
1 of 4	13	1	12	2	9	5	8	6
2 of 4	5	9	5	9	8	6	10	4
3 of 4	3	8	3	8	3	8	2	9
4 of 4	0	11	0	11	0	11	0	11
Total	90	29	89	30	89	30	89	30

Table 3 Immune score based on high tumor density of CD3 and CD8 in different regions

Number of regions	Patients (<i>n</i>)	Means of markers
0 of 4	69	Low
1 of 4	14	
2 of 4	14	Intermediate
3 of 4	11	High
4 of 4	11	
Total	119	

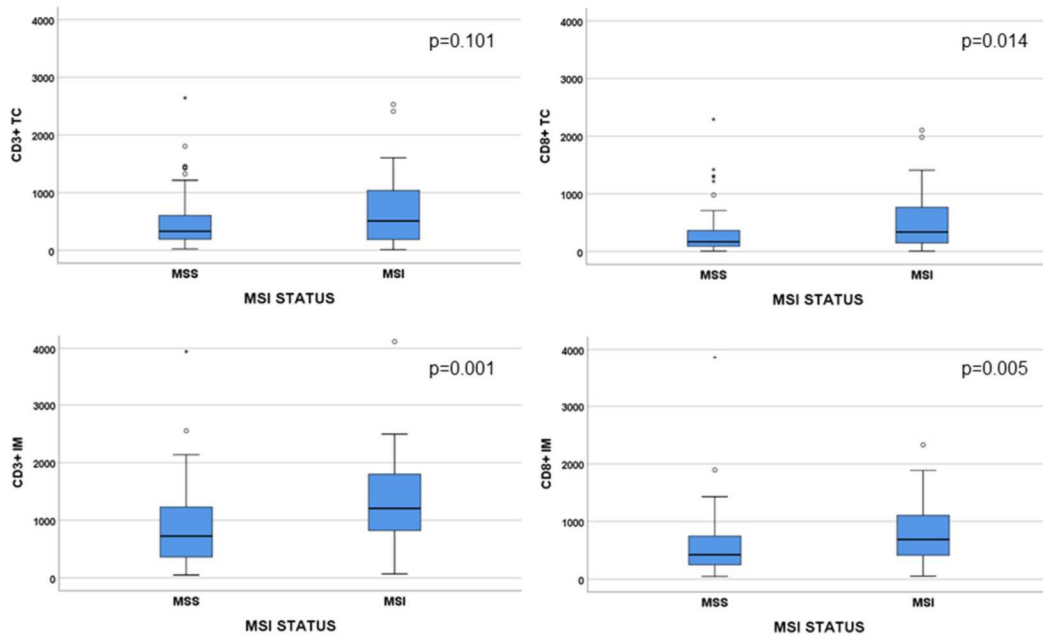


Fig. 4 Comparison of number of CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) of MSS and MSI tumors in tumor center (TC) and invasive margin (IM). Extreme values >4000 cells is not shown in figure

Supplementary Table 1: Patients characteristics

Characteristics	Variable/Cut-off	Total N, (%)
Age (years)	≤73	56 (47.1)
	>73	63 (52.9)
Sex	Male	48 (40.3)
	Female	71 (59.7)
Within Colon	Proximal	68 (57.1)
	Distal	51 (42.9)
TNM-Stage	I	37 (31.1)
	II	43 (36.1)
	III	39 (32.8)
Lymph node status	N0	80 (67.2)
	N+	39 (32.8)
Tumor size (mm)	≤45mm	61 (51.2)
	>45mm	57 (48.3)