

表 題 胃癌患者の腹腔内細胞の解析と腹膜播種治療におけるバイオマーカーとしての意義の解明

論文の区分 博士課程

著 者 名 高橋 和也

担当指導教員氏名 佐田 尚宏 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
専攻 地域医療学
専攻分野 消化器疾患学
専攻科 消化器外科学

2023年1月10日申請の学位論文

胃癌患者の腹腔内細胞の解析と腹膜播種治療におけるバイオマーカーとしての意義の解明

高橋 和也



注：冊子にした時に下 5 センチ必ず空けてください。

目次

略語一覧	3
1. はじめに	5
2. 実験材料と方法	8
2-1. 胃癌患者の腹腔内洗浄液または腹水原液の回収	
2-2. 検体の免疫細胞染色と解析	
2-3. 腹腔内細胞の解析	
2-3-1. 遊離癌細胞の解析方法	
2-3-2. リンパ球の解析方法	
2-3-3. ミエロイド系細胞の解析方法	
2-4. 統計学的解析	
3. 結果	16
3-1. 胃癌患者の腹水中の癌細胞の割合	
3-2. 播種の有無や進行度と TLR の関連性について	
3-3. 癌細胞中の Ki-67 陽性率	
3-4. 根治切除症例における TLR の比較	
3-5. 根治切除後症例の TLR による予後予測	
3-6. 腹腔内リンパ球と播種の関係	

3-7.	リンパ球の割合と TLR の相関関係	
3-8.	播種の有無とミエロイド系細胞の関係性	
3-9.	腹腔内マクロファージ上の CD16 の発現について	
3-10.	フローサイトメーターを用いた CD16 陽性マクロファージと陰性マクロファージの比較	
3-11.	CD16 陽性マクロファージおよび陰性マクロファージ上の CD163 の発現	
3-12.	播種症例における CD16 陽性マクロファージの割合と各リンパ球サブセットの割合との相関	
3-13.	S-1／オキサリプラチン＋パクリタキセル腹腔内投与併用療法前後の腹腔内好酸球比率の変化	
3-14.	S-1／オキサリプラチン＋パクリタキセル腹腔内投与併用療法の効果と腹腔内好酸球比率の関係	
4.	考察	33
5.	おわりに	38
6.	謝辞	39
7.	参考文献	40

略語一覧

略語	名称
APC	Allophycocyanin
BV	Brilliant Violet
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	Forward Scatter
FVS	Fixable Viability Stain
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
FITC	Fluorescein isothiocyanate
MFI	Mean Fluorescence Intensity
LPM	Large Peritoneal Macrophage
PBS	Phosphate buffered saline
PCI	Peritoneal Carcinomatosis Index
PE	Phycoerythrin
PBS	Phosphate buffered saline
PTX	Paclitaxel
SPM	Small Peritoneal Macrophage

SSC	Side Scatter
TAM	Tumor-Associated Macrophage
TLR	Tumor Leukocyte Ratio

第1章 はじめに

胃癌は好発地域に大きな偏りがみられ、東アジア地域で特に発症率が高い。しかし、世界全体で見ても癌による死亡原因として、肺癌・大腸癌・肝癌に続き第4位と上位に位置する(1)。近年、ピロリ菌除菌による発症予防、内視鏡による早期発見・早期切除が普及したこと、本邦における臨床試験により術後補助化学療法、再発・切除不能症例に対する標準化学療法が確立されたことに伴い、胃癌に対する治療成績は向上したものの(2-4)、死亡率の十分な改善は得られていない(3)。

胃癌の主たる転移形式の一つである腹膜播種は(5-8)、胃の原発巣から腹腔内に遊離した腫瘍細胞が腹腔内臓器の漿膜面に生着することによって引き起こされ(9-10)、進行すれば腸閉塞、水腎症、腹水の貯留などの合併症を伴いやすく、患者の生活の質を著しく損なう病態である(11,12)。治療として全身化学療法・免疫療法・腹腔内化学療法・腹腔内温熱化学療法などが行われているが、その効果は限定的である(13-16)。

播種の確定診断はヘマトキシリン/エオジン染色、またはパパニコロウ染色を使用した洗浄細胞診・腹水細胞診陽性、腹腔内観察による肉眼的播種の確認、播種結節の組織診による癌の存在診断のいずれかによって行われる。細胞診は顕微鏡観察により癌細胞の有無を目視にて確認する方法であり、その重要性や

必要性は疑う余地もないが、形態的な診断方法であるために主観が入り込む余地を排除できず、施設や病理医によって診断結果が異なる問題が指摘されている(17)。また、細胞診は定性的な診断方法であり、腹腔内の遊離癌細胞の量に関する情報は得られない。また、播種の程度を評価する PCI (Peritoneal Cancer Index) score が存在するものの(18)、肉眼的な観察に基づいており客観性の高い定量性に優れた評価方法とは言い難い。一方で、胃癌の手術時に肉眼的な播種を認めず、CY0 の診断にて根治的切除を受ける患者の中に一定の割合で腹膜播種再発をきたす患者が存在する。これらのケースでは、手術時に腹腔内にごく少量の癌細胞が既に存在していたが、通常の細胞診では検出されず、これらの残存癌細胞が術後に腹膜上に着床、増殖し、再発をきたしたものと考えられる。したがって、腹腔内の癌細胞をより正確に把握できる診断法が確立できれば、播種患者の予後向上に繋がると思われる。

新たな播種の診断方法としては、上皮細胞に特異的に発現する CD326 (19-21) をマーカーとして使用して、腹腔内の遊離癌細胞をフローサイトメーターで定量化する方法が報告され(22-25)、その臨床応用が期待されている。今回は、これらの研究を基に CD45 陽性細胞に対する CD326 陽性細胞の割合(tumor leukocyte ratio :TLR)を求め、腹腔内の細胞に占めるがん細胞の相対的な割合を

算出することにより、播種の進行度や評価や患者背景、予後との相関を検討した。

また、ヒトの腹腔内には様々な免疫細胞が存在し、マクロファージと T 細胞がその大部分を占める (26)。マウスの腹腔内においても同様に様々な免疫細胞が存在し (27,28)、腹腔内マクロファージは主要な構成細胞となっている。近年の研究において、マウスの腹腔内マクロファージは骨髄由来の Small peritoneal macrophage (SPM)、組織常在型の Large peritoneal macrophage (LPM) に分かれ (29-31)、感染の制御など腹腔内の恒常性の維持に働いていること、組織常在型マクロファージの中に Tim-4 陽性の表現型を示すサブタイプが存在し、播種の進展を促進することが報告された (32)。一方、ヒトの腹腔内マクロファージは、CD14 および CD16 表面抗原をマーカーとして CD14⁺CD16⁻、CD14⁺⁺CD16⁺、CD14⁺⁺CD16⁺⁺ の 3 つのサブタイプに分類されること (33)、播種症例の腹腔内マクロファージは M2 型に分化し播種を促進する可能性 (34,35) が報告されている。しかし、腹膜播種患者において、これらマクロファージのサブタイプ、および T 細胞を含めた他の免疫細胞の割合がどのように変化し、播種の病態とどう関連するのかについては全く解っていない。

本研究では、フローサイトメーターを利用して、腹腔内の遊離癌細胞、免疫細胞を同定、フェノタイプ分類を行い、その結果と播種の程度や患者予後との

関連性を検討することで、播種治療における新たなバイオマーカーを見出すことを目標とした。

第2章 実験材料と方法

本研究で用いた抗体は、表1のとおりである。

表1 使用抗体

N/A: Not Applicable

商品名	clone	販売元
FVS780	N/A	BD Horizon
Fc-block reagent	N/A	Miltenyi
DAPI	N/A	DOJINDO
Anti-human CD90 (FITC)	5E10	BioLegend
Anti-human CD66b (FITC)	80H3	Bio-RAD
Anti-human CD4 (FITC)	RPA-T4	BioLegend
Anti-human CD45 (FITC)	HI30	BioLegend
Anti-human Ki-67 (PE)	Ki-67	BioLegend
Anti-human CD16 (PE)	B73.1	BioLegend
Anti-human CD56 (PE)	5.1H11	BioLegend
Mouse IgG1 isotype control (PE)	MOPC-21	BioLegend
Anti-human CD326 (APC)	HEA125	Miltenyi
Anti-human CD14 (APC)	M5E2	BioLegend
Anti-human CD8 (APC)	RPA-T8	BioLegend
Anti-human CD45 (BV605)	HI30	BioLegend
Anti-human CD3 (BV605)	UCHT1	BioLegend
Anti-human CD11b (BV605)	ICRF44	BioLegend
Anti-human CD19 (BV711)	HIB19	BioLegend
Anti-human CD163 (BV711)	GHI/61	BioLegend

2-1. 胃癌患者の腹腔内洗浄液または腹水原液の回収

研究内容に関する説明を行った上で同意の得られた胃癌患者より、手術開始時に生理食塩水 250ml を用いて腹腔内を洗浄して得られた洗浄腹水 200 ml、または腹水穿刺により得られた腹水原液 20ml を研究に用いた（自治医科大学倫理委員会 承認番号 臨 A22-変 007）。腹膜播種を認めた症例は審査腹腔鏡時に PCI スコア（18）の測定を行った。S-1/オキサリプラチン+パクリタキセル腹腔内投与併用療法を施行中の症例は PTX 腹腔内投与前に注入用のポートから 20ml の腹水を回収し、これを研究に用いた。

2-2. 検体の免疫細胞染色と解析

腹水または腹腔内洗浄液を 1200rpm にて 7 分間遠心分離した後、沈殿した細胞を PBS（Sigma-Aldrich）に懸濁し、再度同様の遠心分離・懸濁を 2 回繰り返した（この操作を以後“細胞洗浄”と記載する）。細胞数が 1×10^6 cells/ml となるよう分取したのち、遠心分離した細胞を PBS 100 μ L に懸濁した。FVS780（1000 倍希釈、1 μ L/ 1×10^6 cells）を添加し、常温にて 15 分間インキュベートすることにより死細胞の染色を行った。細胞洗浄後に Fc-blocker にて 10 分間のブロッキングを行い、後述の 4 パネルに分けそれぞれの抗体を添加後、冷暗所に 40 分間静置することにより多重染色を行った。PBS で細胞洗浄後、1 パネ

ル当たり 200 μ L の Cytofix-Cytoperm (Becton-Dickinson, San Jose, CA) に細胞を懸濁し、冷暗所に 40 分間静置し、固定・透過処理を行った。細胞洗浄後に核染色剤として DAPI(100ng/1x10⁶ cells)を 4 本いずれにも添加ののち、癌細胞パネルに PE 標識抗 Ki-67 抗体、コントロールパネルに PE 標識 IgG(isotype control)を添加した。40 分間冷所に静置し細胞内染色を行った後、細胞洗浄し 350 μ L の PBS に懸濁した。FortessaTMX-20 (Becton-Dickinson, San Jose, CA) により処理した検体の測定を行った。Flow JoTMsoftware を用いた解析により、細胞集団の特定、および細胞集団の割合や比率の算出を行った。

- 癌細胞パネル: (細胞表面) FITC-CD90, APC-CD326 (EpCAM), BV605-CD45, (細胞内) PE-Ki-67
- 癌細胞コントロールパネル: (細胞表面) FITC-CD90, APC-CD326 (EpCAM), BV605-CD45, (細胞内) PE-IgG1
- リンパ球パネル: (細胞表面) FITC-CD4, PE-CD56, APC-CD8, BV605-CD3, BV711-CD19,
- ミエロイド系細胞パネル : (細胞表面) FITC-CD66b, PE-CD16, APC-CD14, BV605-CD11b, BV711-CD163

2-3-1. 遊離癌細胞の解析方法 (図 1)

DAPI 陰性となる分画を debris としてゲーティングにより除去し、DAPI 陽性の分画を腹腔内細胞とし、その中で FVS780 が弱陽性の分画を生細胞とした。CD45-CD326 で展開して、CD45 陰性の集団をゲートし、その中で CD90 が陰性の集団を癌細胞と判断した。癌細胞が 50 個以上存在する症例を解析に用い、癌細胞における Ki-67 の陽性率を調査した。(癌細胞数) / (白血球数) × 100 を TLR(tumor leukocyte ratio) (%)として算出し、白血球細胞全体に対する癌細胞の比率を定量化した。

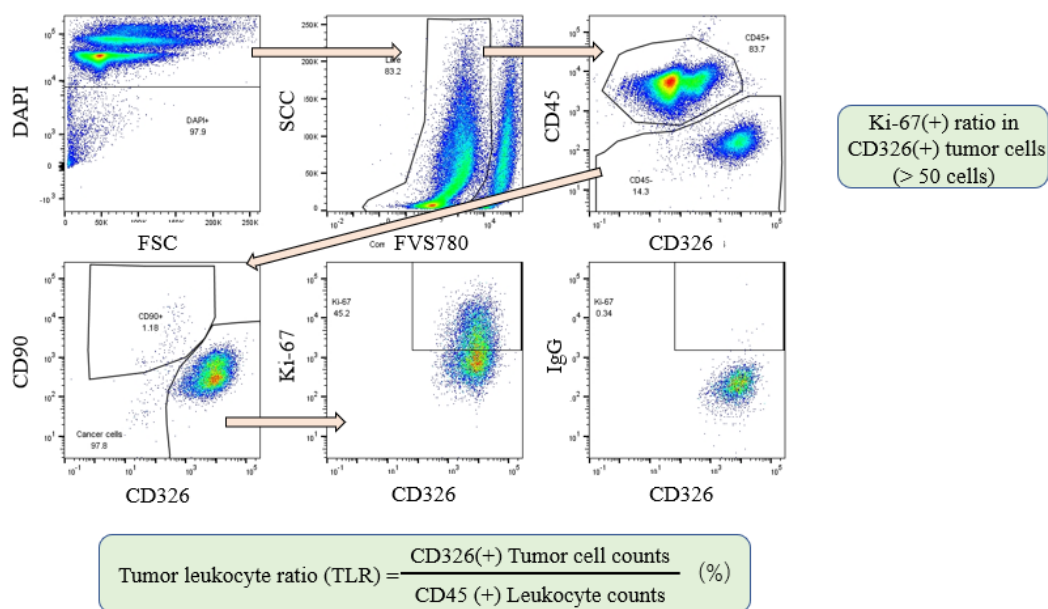


図 1

2-3-2. リンパ球の解析方法 (図 2)

腹腔内細胞のうち、生細胞の特定は 2-3-1 と同様に行った。CD19-CD3 で展開し、CD19 陰性 CD3 陽性のフェノタイプを示す細胞を T リンパ球とし、さらに CD4 陽性、あるいは CD8 陽性のフェノタイプを示す細胞に分類した。CD19 陽性 CD3 陰性細胞を B 細胞とした。また、CD56-CD3 で展開し、CD3 陰性 CD56 陽性細胞を NK 細胞、CD3 陽性 CD56 陽性細胞を NKT 細胞とした。それぞれの細胞集団の白血球全体に占める割合を算出した。

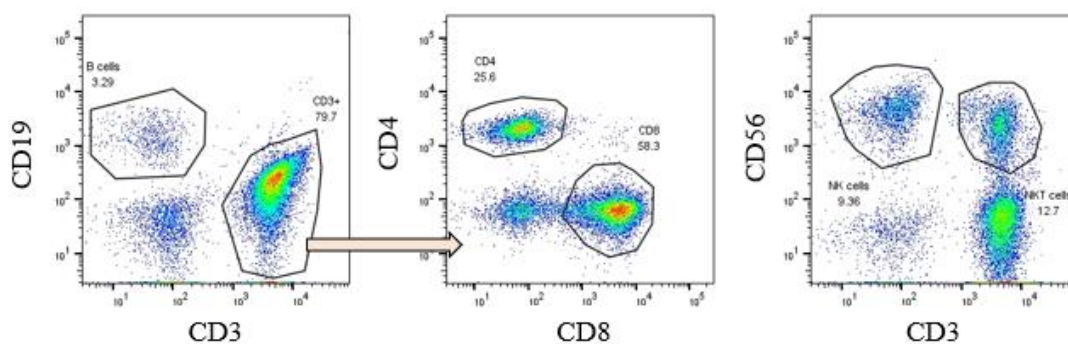


図 2

2-3-3. ミエロイド系細胞の解析方法 (図3)

生細胞の特定は 2-3-1 と同様に行った。CD11b 陽性細胞をミエロイド系細胞としてゲートし、その集団を CD66b-CD14 で展開した。CD14 陰性 CD66b 陽性細胞を顆粒球とし、さらに顆粒球の中で CD16 陽性細胞を好中球、陰性細胞を好酸球とした。CD66b 陰性 CD14 陰性細胞を樹状細胞とし、CD66b 陰性 CD14 陽性細胞をマクロファージとした。リンパ球同様それぞれの細胞集団の白血球全体に占める割合を算出した。マクロファージは CD16 の発現の有無により CD16 陽性マクロファージおよび陰性マクロファージに分類し、それぞれの CD163 の発現率を測定した。

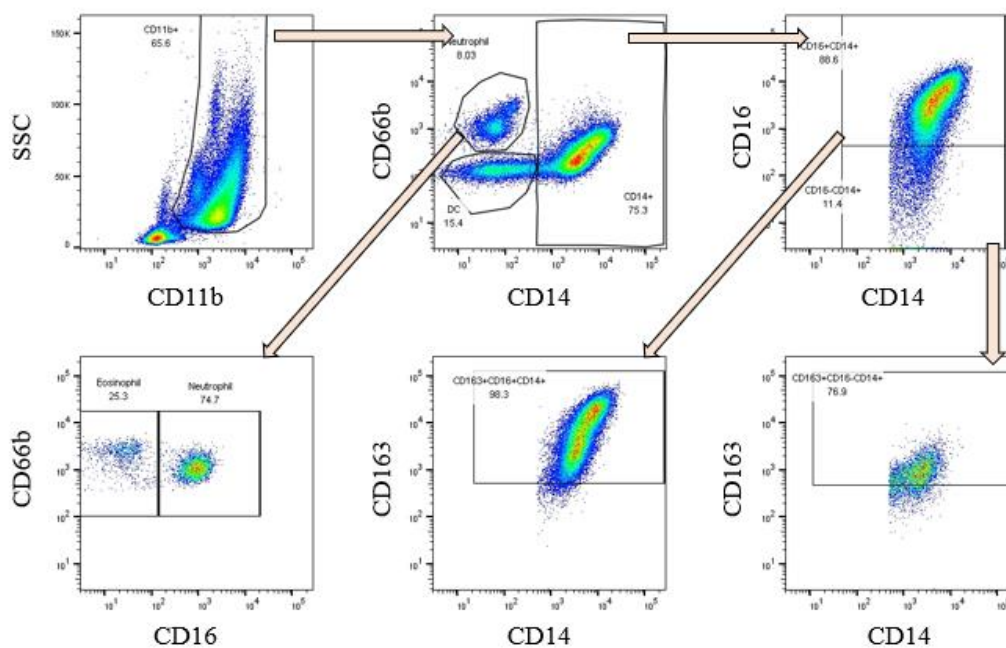


図3

2-4 統計学的検討

統計解析は、Graph Pad Prism 8 を使用して行った。対応のない群間比較は Mann-Whitney U 検定、対応のある群間比較は Wilcoxon の符号順位検定により評価を行った。相関関係は Spearman の順位相関係数を使用して検定を行った。生存率は Kaplan-Meier 法を用いて計算し、群間差は log-rank 検定により評価を行った。すべての検定において、p 値が $p < 0.05$ を示す場合に有意差ありと判定した。

第3章 結果

3-1. 胃癌患者の腹水中の癌細胞の割合

胃癌の診断で手術を受けた、もしくは腹水穿刺を行った症例 205 例（播種症例 83 例、非播種症例 122 例）の腹腔内洗浄液あるいは腹水原液中に存在する CD326 陽性癌細胞、CD45 陽性白血球を、フローサイトメーターを用いて同定し、TLR を算出した。その代表的な 4 例を図 4 に示す。CD45(+)白血球の集団と、CD326(+)癌細胞の集団は明確に区別することができ、P0CY0 の播種のない症例と比較すると播種症例において CD326(+)癌細胞の集団はより明瞭に検出された。TLR は症例によって 0%から 790%まで非常に幅広い範囲で値の変動を示した。

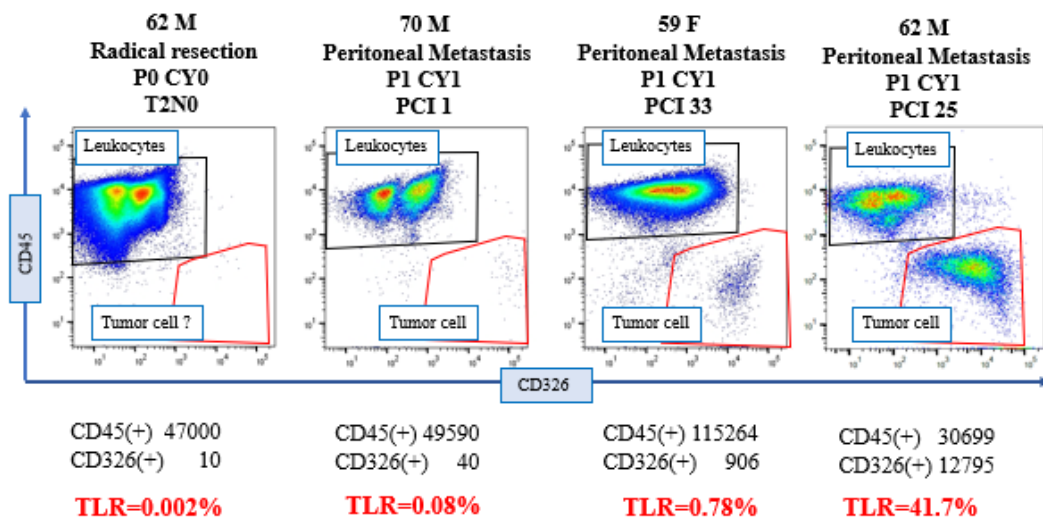


図 4. CD326(+)癌細胞と CD45(+)白血球の同定 代表例 4 例

3-2. 播種の有無や進行度と TLR の関連性について

播種の有無で TLR を比較したところ (図 5A)、播種のある症例で TLR は中央値 0.139% (最小値 0.002%- 最大値 790%)、播種のない症例では中央値 0.008% (最小値 0%- 最大値 0.377%) と、TLR は播種症例で有意に高値を示した ($p<0.0001$)。播種症例を細胞診陽性患者と陰性患者に分けて TLR を比較すると (図 5B)、TLR は陽性患者で有意に高値を示した (中央値 CY1: 0.593% vs CY0: 0.016%, $p<0.0001$)。TLR の対数値と PCI スコアの相関関係を調べたところ (図 5C)、両者の間に正の相関を認めた ($r=0.2907$, $p=0.0114$)。TLR という定量化された値を用いて、播種の進行度を客観的に評価できる可能性が示唆された。

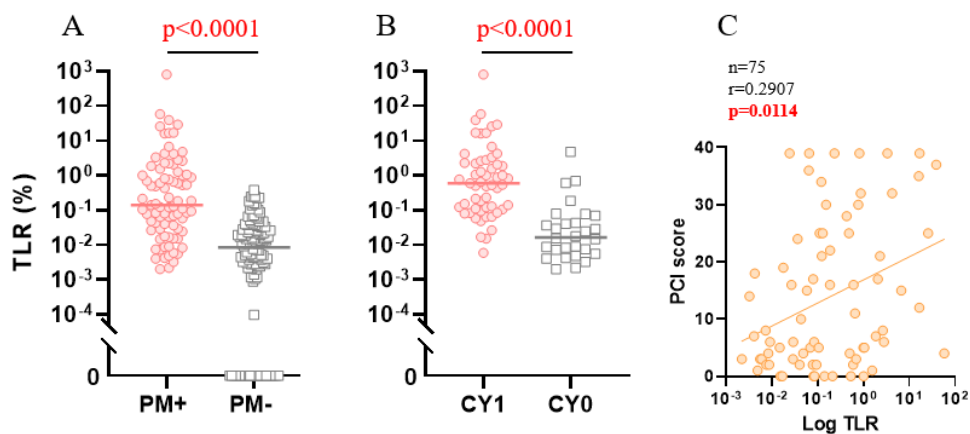


図 5A. 播種症例と非播種症例における TLR の比較

図 5B. 播種症例のうち、細胞診陽性症例と陰性症例における TLR の比較

図 5C. TLR の対数値と PCI スコアの散布図

3-3. 癌細胞中の Ki-67 陽性率

CD326(+)癌細胞が 50 個以上存在する播種症例に対して、癌細胞における Ki-67 の陽性率を測定した。陽性率は約 2%から 70%まで症例により様々な値を示した。組織型で比較する (図 6A) と Diffuse type では中央値 28.7% (最小値 2.13%- 最大値 71.4%) で、Intestinal type (中央値 8.05%、最小値 3.11%- 最大値 30.9%)と比べて高値を示した ($p=0.061$)。一方、細胞診陽性症例と陰性症例の間に差を認めず (図 6B)、播種の進行度を示す TLR や PCI スコアと Ki-67 陽性率との間に有意な相関は認めなかった (図 6C, D)。

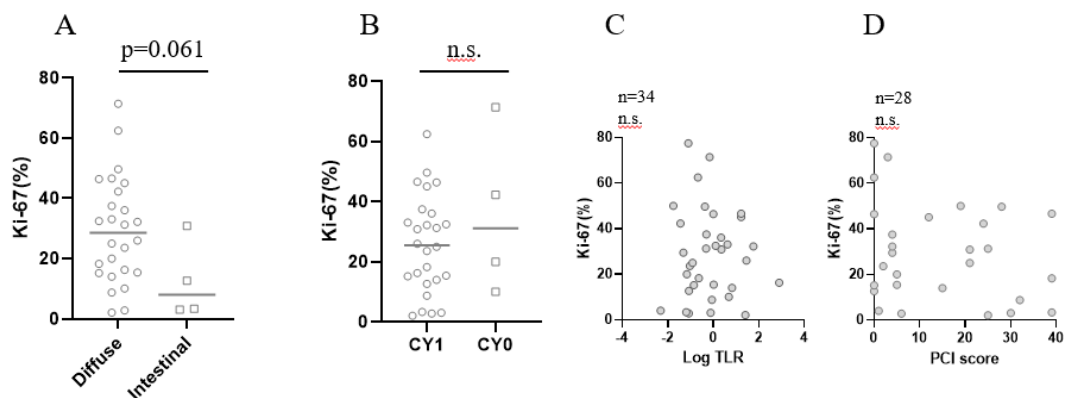


図 6A. Diffuse type と Intestinal type における癌細胞中の Ki-67 陽性率の比較

図 6B. 細胞診陽性症例と陰性症例における癌細胞中の Ki-67 陽性率の比較

図 6C. TLR 対数値と癌細胞中の Ki-67 陽性率の散布図

図 6D. PCI スコアと癌細胞中の Ki-67 陽性率の散布図

(図 6A-6D はすべて播種症例においての検討である)

3-4. 根治切除症例における TLR の比較

根治切除を行った症例において TLR の測定を行った。組織型の間で TLR に有意な差は認めなかった (図 7A)。T4 症例は T3-1 症例よりも TLR が有意に) 高値であり (図 7B, 中央値 T4: 0.019% vs T3-1: 0.005%, $p=0.0002$)、リンパ節転移のある症例はない症例よりも有意に TLR が高値を示した (図 7C, 中央値 N1-3: 0.017% vs N0: 0.004%, $p=0.0041$)。播種症例と比較すると全体的に低値ではあるものの、深達度・リンパ節転移の程度が進んだ根治切除例の中に TLR が高値を示す症例が存在し、細胞診が陰性であっても腹腔内に遊離癌細胞が存在する可能性が示唆された。

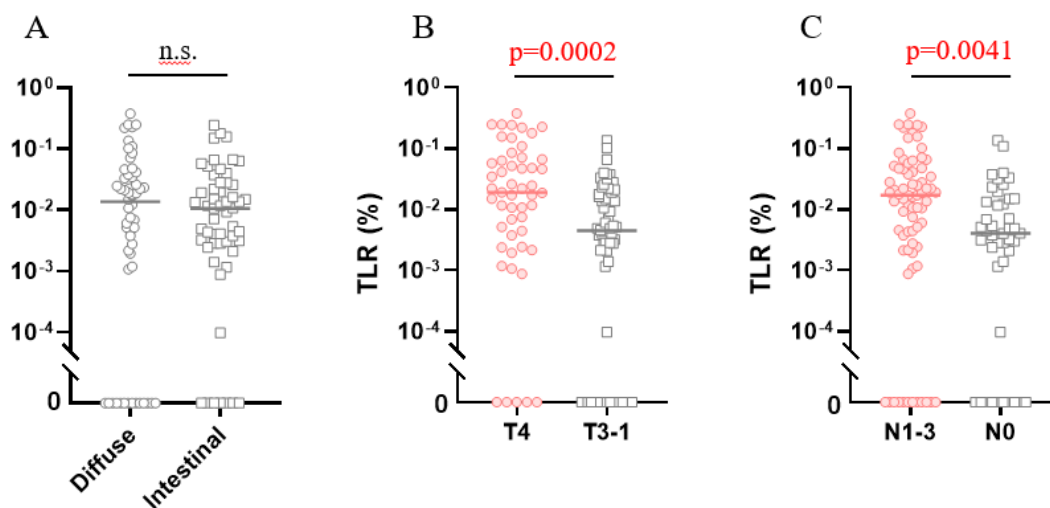


図 7A. Diffuse type と Intestinal type による TLR の比較

図 7B. T4 症例と T3-1 症例による TLR の比較

図 7C. リンパ節転移の有無による TLR の比較

3-5. 根治切除後症例の TLR による予後予測

根治手術後に播種再発を来した症例と、播種再発を認めない症例の間で TLR を比較した。根治手術を行った症例は 117 例であり、そのうち播種再発は 22 例 (18.8%) に認めた。T4 症例 (51 例) に限ると再発率は 29.1% (16 例) であった。T4 症例の中で播種再発した症例は播種再発を認めない症例に比べて手術時の TLR が有意に高値であった (図 8A, 中央値: 再発あり 0.019% vs 再発なし: 0.005%, $p=0.0003$)。TLR が 0.02% 以上の症例と未満の症例に分けて、両群間で全生存期間、および播種に関する無再発生存期間を比較したところ、いずれも TLR が高い群で有意に生存期間が短い結果であった (図 8B, 8C, $p=0.0016$, $p=0.0014$)。以上より、TLR は予後および播種再発を予測する良いマーカーとなる可能性が示唆された。

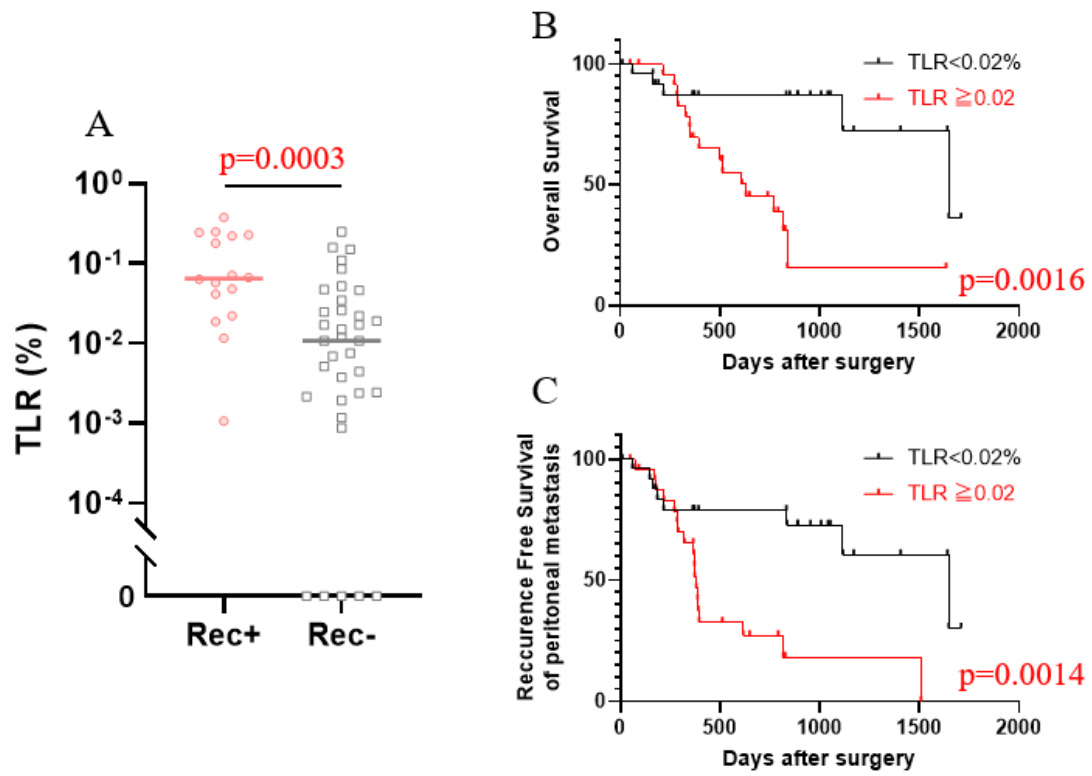


図 8A. 播種再発の有無による TLR の比較

図 8B. TLR $\geq 0.02\%$ の症例と TLR < 0.02% の症例による生存期間の比較

図 8C. TLR $\geq 0.02\%$ の症例と TLR < 0.02% の症例による無再発生存期間の比較

3-6 腹腔内リンパ球と播種の関係

播種症例と播種のない症例の間で腹水中の CD45 陽性細胞に占める各種リンパ球の割合を比較した。播種症例では CD3 陽性 T 細胞の割合が有意に減少していた (図 9A, 中央値 播種あり: 34.9% vs 播種なし: 49.1%, $p=0.0048$)。そのうち CD4 陽性 T 細胞は両群間で有意な差を認めず (図 9C)、CD8 陽性 T 細胞は播種症例で有意に減少していた (図 9B, 中央値 播種あり: 18.0% vs 播種なし: 27.4%, $p<0.0001$)。NK 細胞は両群間で有意な差を認めないが (図 9D)、NKT 細胞は播種症例で有意に減少していた (図 9E, 中央値 播種あり: 2.09% vs 播種なし: 7.18%)。一方、B 細胞は播種症例で有意に増加していた (図 9F, 中央値 播種あり: 2.45% vs 播種なし: 0.79%, $p=0.0004$)。以上より、播種の有無により腹腔内リンパ球の構成が変化することが示された。

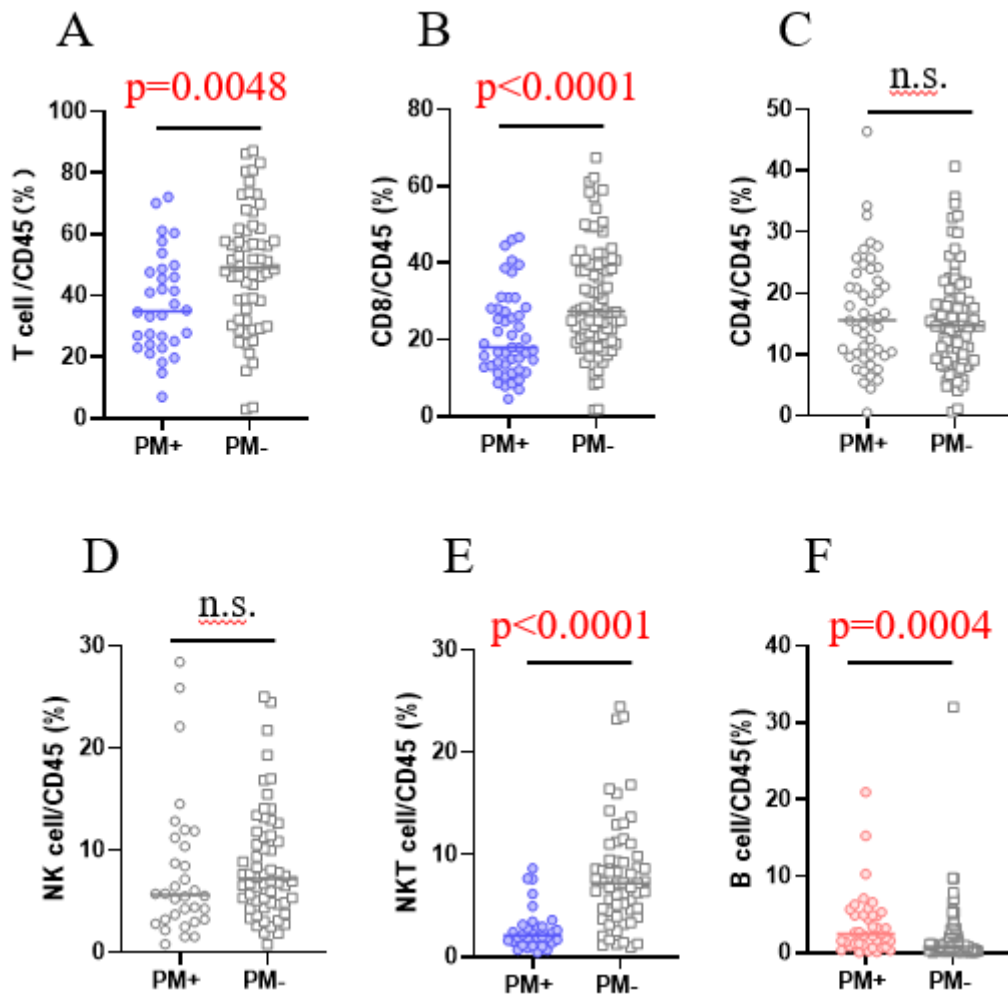


図 9A~F. 播種の有無による各種リンパ球割合の比較

3-7. リンパ球の割合と TLR の相関

3-6 において、播種の有無によりその割合に有意差を認めた腹腔内リンパ球と TLR の相関を調査した (図 10A~C)。CD8 陽性 T 細胞、NKT 細胞は TLR の対数値と負の相関を示した (CD8: $r=-0.324$, $p=0.0263$, NKT: $r=-0.493$, $p=0.0044$)。その一方で、B 細胞は TLR の対数値と正の相関を示した ($r=0.4862$, $p=0.002$)。

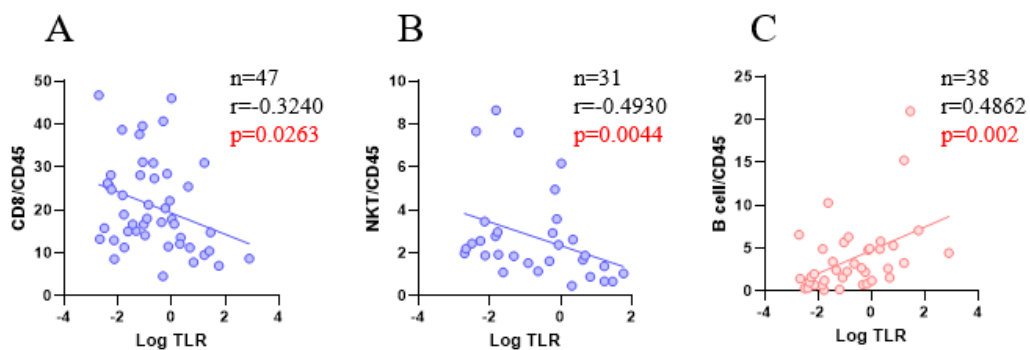


図 10A-C. TLR の対数値と各種リンパ球の散布図

3-8. 播種の有無とミエロイド系細胞の関係性

腹腔内の白血球全体に占めるミエロイド系細胞の割合を播種の有無で比較した (図 11A-E)。CD11b(+)ミエロイド系細胞全体の割合は播種症例で有意に増加していた (図 11A, 中央値 播種あり: 37.8% vs 播種なし: 33.7%, $p=0.00201$)。好中球、好酸球、樹状細胞の割合はいずれも播種の有無で有意な差を認めなかった (図 11B-E) が、マクロファージの割合が播種症例で有意に増加していた (図 11A 中央値 播種あり: 31.9% vs 播種なし: 20.3%, $p=0.0234$)。

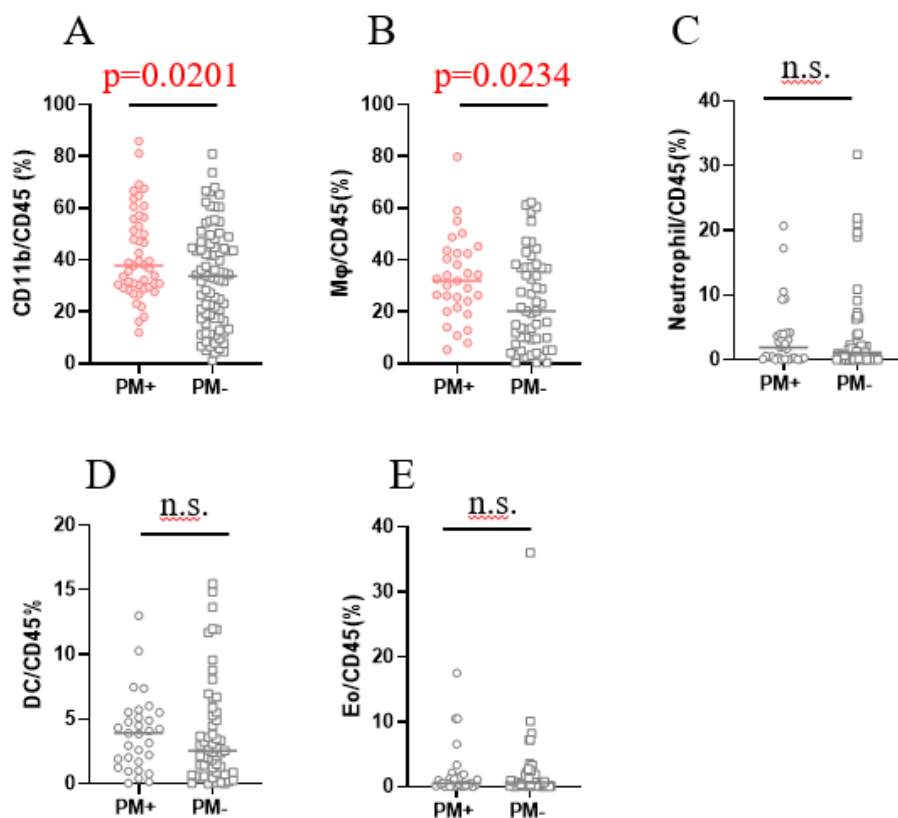


図 11A-F. 播種の有無による各種リンパ球割合の比較

3-9. 腹腔内マクロファージ上の CD16 の発現について

CD11b 陽性 CD66b 陰性 CD14 陽性の細胞集団であるマクロファージにおける CD16 の発現を調査した。播種を認めない症例では、腹腔内マクロファージの大部分は CD16 陰性の表現型を示すのに対し、腹膜播種を有する症例では CD16 陽性の表現型を示すマクロファージの割合が有意に増加していた (図 12A) (中央値: 播種あり: 17.5% vs 播種なし: 0.81%, $p < 0.0001$)。腹腔内マクロファージから CD16 陽性マクロファージ、CD16 陰性マクロファージをそれぞれソーティングしたのち、位相差顕微鏡による観察を行った。CD16 陽性マクロファージは、大型で細胞内顆粒を多く有するのに対し、CD16 陰性マクロファージは小型で細胞内顆粒が少なく、両者は形態的に識別が可能であった (図 12B, C)。

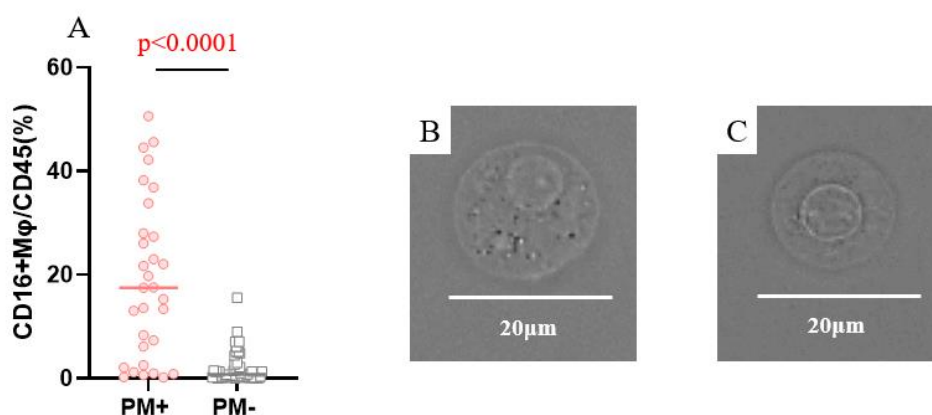


図 12A. 播種の有無による CD16 陽性マクロファージの割合の比較

図 12B, C. CD16 陽性 (B)・陰性 (C) マクロファージの顕微鏡像

3-10. フローサイトメーターを用いた CD16 陽性マクロファージと陰性マクロファージの比較

フローサイトメーターを用いて CD16 陽性マクロファージと陰性マクロファージの形態的特徴および CD14 の発現強度の違いを比較した。CD16 陽性マクロファージは陰性マクロファージよりも FSC、SSC とともに有意にシグナル強度が高く (FSC(図 13A): 中央値: CD16-M ϕ : 44737 vs CD16+M ϕ : 54599, $p < 0.0001$, SSC (図 13B) : 中央値: CD16-M ϕ : 33395 vs CD16+M ϕ : 54599, $p < 0.0001$), 大型で細胞内が複雑であり、両者の間に形態的な差異があることが客観性をもって示された。また、CD14 の MFI も CD16 陽性マクロファージの方が有意に高値であった (図 13C 中央値: CD16-M ϕ : 33395 vs CD16+M ϕ : 54599, $p < 0.0001$)。

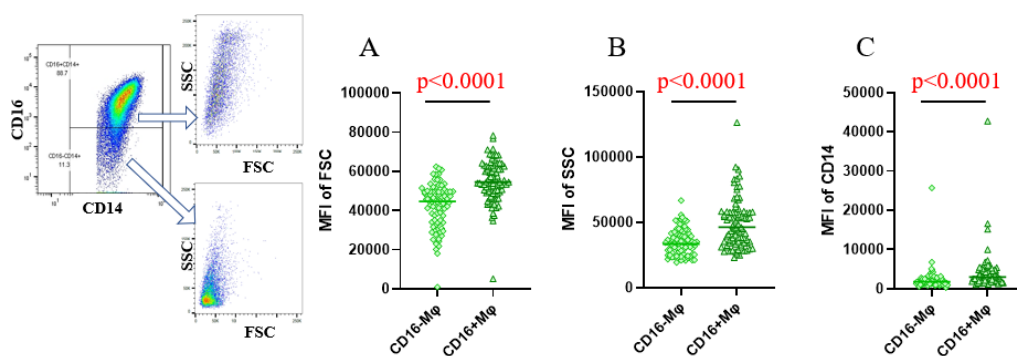


図 13A. CD16 陽性・陰性マクロファージによる FSC の比較

図 13B. 同 SSC の比較

図 13C. 同 CD14 発現強度の比較

3-11. CD16 陽性マクロファージおよび陰性マクロファージ上の CD163 の発現

M2 型のマクロファージのマーカである CD163 の発現を CD16 陽性マクロファージと陰性マクロファージの間で比較した (図 14)。CD16 陽性マクロファージの大部分が CD163 を発現しており、CD163 陽性率は CD16 陰性マクロファージよりも有意に高かった (中央値: CD16-M ϕ : 39.6% vs CD16+M ϕ : 91.4%, $p < 0.0001$)。

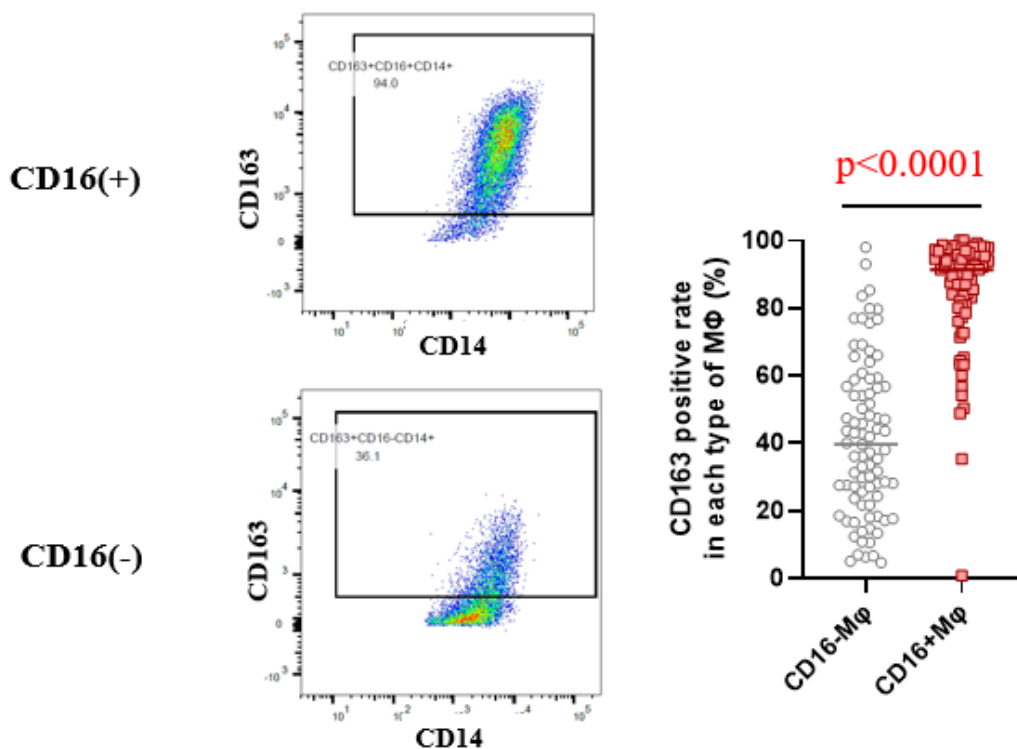


図 14. CD16 陽性・陰性マクロファージによる CD163 発現率の比較

3-12. 播種症例における CD16 陽性マクロファージの割合と各リンパ球サブセットの割合との相関

CD16 陽性マクロファージの割合と各リンパ球サブセットの割合との相関を調査したところ、CD16 陽性マクロファージは CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞といった抗腫瘍免疫に関与する細胞と負の相関を認めた (図 15A-C, CD8: $r=-0.3994$, $p=0.0002$, NK: $r=-0.3749$, $p=0.0006$, NKT: $r=-0.3943$, $p=0.0003$)。一方、B 細胞との間に明らかな相関は認めなかった (図 15D, $r=0.1580$, $p=0.1589$)。以上より、CD16 陽性マクロファージは免疫抑制に関与する可能性が示唆された。

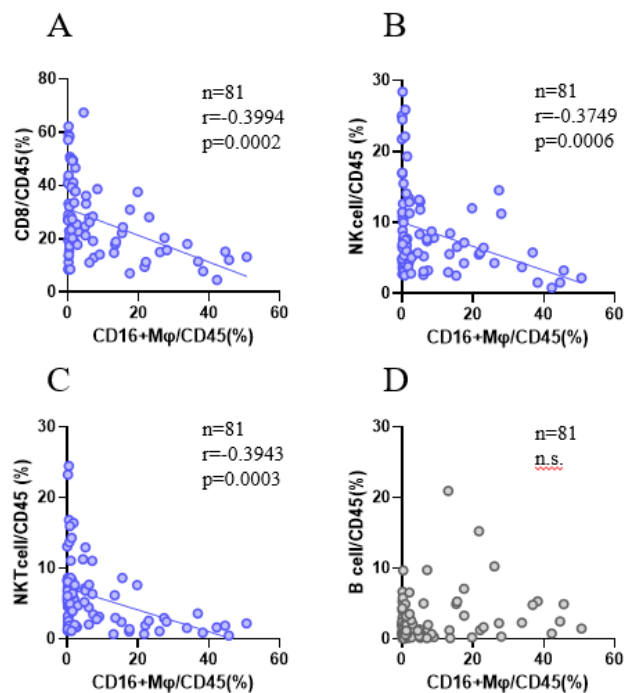
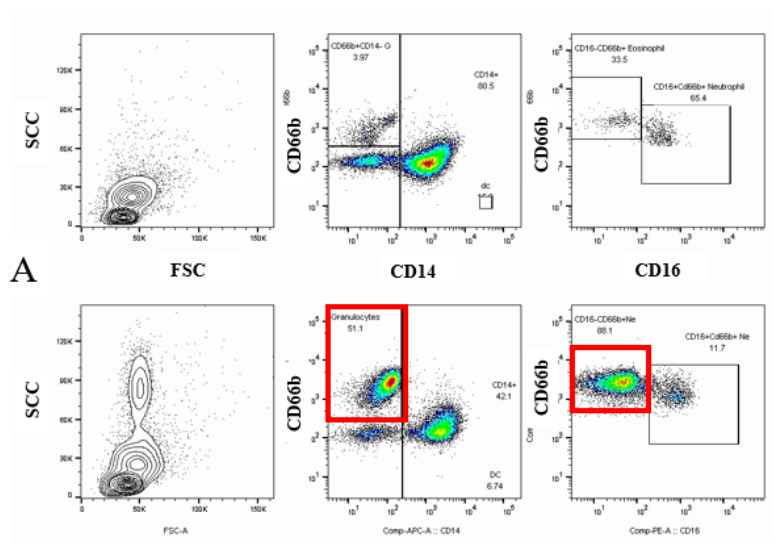


図 15A-D. CD16 陽性マクロファージと各種リンパ球割合の散布図

3-13. S-1/オキサリプラチン+パクリタキセル腹腔内投与併用療法前後の腹腔内好酸球比率の変化

当院において臨床試験として行っている S-1/オキサリプラチン+パクリタキセル腹腔内投与併用療法を受けた、腹膜播種を伴う胃癌患者 15 例の治療開始前と 1 コース施行後の腹腔内免疫細胞の割合の変化を調査したところ、治療開始後 CD14 陰性 CD66b 陽性 CD16 陰性のフェノタイプを示す好酸球の割合が増加していた (図 16B: 中央値 開始前 : 0.50% vs 開始後 : 9.29%, $p=0.0006$)。

Before IP chemotherapy



After IP chemotherapy

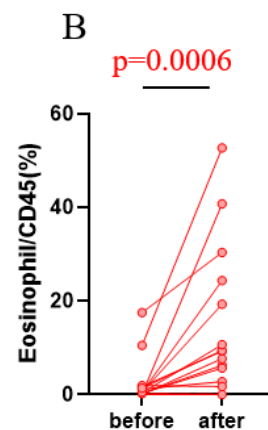


図 16A. 腹腔内化学療法前後の免疫細胞分布 代表例

図 16B. 腹腔内化学療法前後の好酸球割合の変化

3-14. S-1／オキサリプラチン+パクリタキセル腹腔内投与併用療法の効果と腹腔内好酸球比率の関係

治療開始後に細胞診が陰転化しなかった4症例と、細胞診が治療開始前から陰性あるいは治療後陰転化した症例11例において治療開始前後の腹腔内好酸球の割合を比較すると、陰転化しなかった症例では好酸球の割合の有意な増加は認めなかったのに対し（図17A）、治療開始前から陰性あるいは開始後に陰転化した症例では有意な好酸球の割合の増加を認めた（図17B、中央値 陰転化なし：0.5% vs 陰転化あり：10.7%, $p=0.001$ ）。腹腔内の好酸球の割合の増加がS-1／オキサリプラチン+パクリタキセル腹腔内投与併用療法の治療効果に関連する可能性が示唆された。

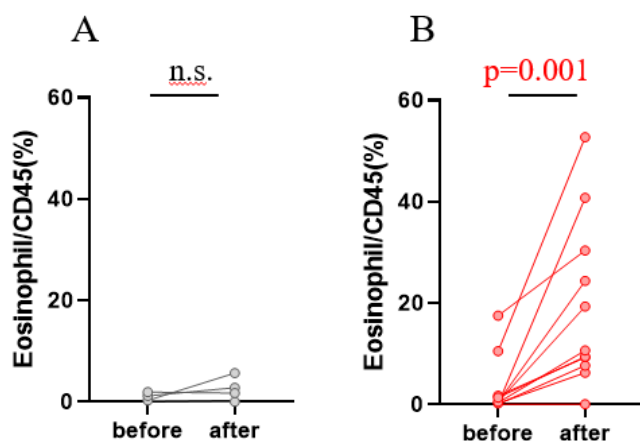


図17A. 細胞診が陰転化しなかった症例における治療開始前後の好酸球の割合の変化

図17B. 細胞診が陰転化した症例における治療開始前後の好酸球の割合の変化

第4章 考察

①腹腔内液中の TLR の臨床的意義について

細胞診による腹水中の腫瘍細胞の検出は、胃癌患者における腹膜播種再発の最も重要な予後因子である (36,37)。本研究において腹水細胞診陰性の T4 胃癌患者に播種再発する患者が約 30%存在したが、その原因として、手術時に腹腔内に存在するごく少量の癌細胞を細胞診では捉えきれていない可能性が考えられる。また、細胞診は形態学的診断であり主観的な判断を排除できないために、病理医間で診断が異なるという問題が指摘されており (17)、より客観的で高感度な予後予測方法の開発が求められている。本研究では、近年報告された方法 (22-25)を応用し、CD45 陽性細胞に対する CD326 陽性細胞の割合 (TLR) を算出することにより腹腔内遊離癌細胞を定量化することを試みた。

TLR は、腹膜播種陽性群、特に細胞診陽性 (CY1) 群で有意に高値を示し、PCI スコアとも正の相関を示した。このことは、審査腹腔鏡という侵襲的な検査を行わなくても、腹水ないし腹腔洗浄液の検体を用いて TLR を測定することで播種の進行度を客観的に推定できる可能性を示唆する。ただし、PCI score が低値であるにも関わらず TLR が高値を示す症例も存在し、TLR の持つ臨床的意義については今後さらなる検討が必要である。

胃切除術を受けた患者において、TLR が高い症例では播種再発をきたしやす

く、全生存期間、腹膜播種に関する無再発生存期間がいずれも有意に短くなること
が示された。これは TLR が播種の程度をスコア化するだけでなく、根治切除
後の播種再発のマーカーになりうることを示唆している。T4 症例 51 例中、再
発症例数は 16 例で 29.1%（16 例）であったが、T4 症例のうち TLR が 0.02%
以上の患者では、13 人（81%）が腹膜再発をきたした。CY0 と診断され根治切
除が施行されても高い TLR を示す症例は、腹腔内に腫瘍細胞が存在し腹膜播種
再発をきたすリスクが極めて高いことを明確に示唆している。

また、胃癌原発組織中の Ki-67 陽性率高値が予後不良因子として報告されて
いること（38）に着目し、腹腔内液中の CD326 陽性細胞の Ki-67 の陽性率が持
つ予後予測マーカーとしての意義を調査した。CD326 陽性癌細胞の Ki-67 陽性
率は、組織型が Diffuse type の症例において Intestinal type の症例よりも高い傾
向を示すものの、TLR や PCI スコアとの相関は認めず、予後予測因子としての
臨床的意義を見出すことはできなかった。原発腫瘍内の腫瘍細胞と腹水中で浮
遊状態の腫瘍細胞とで増殖状態が異なる可能性があると考えられる。

②腹膜播種が腹腔内免疫に与える影響について

②-1 腹腔内リンパ球について

播種が存在する症例では、播種を認めない症例と比較して腹腔内の CD8 陽性

リンパ球、NKT 細胞の割合が低下し、B 細胞の割合が増加していた。これまでも卵巣癌播種症例の腹水では、CD8+T 細胞が枯渇することが報告されており(39)、本研究もこれと矛盾のない結果であった。本研究では NKT 細胞の割合も低下しており、それぞれ TLR と負の相関を示した。CD8 陽性リンパ球および(40, 41) NKT 細胞 (42)は共にかん細胞に対する強い傷害活性を有し、抗腫瘍免疫に働く細胞であり、これらの細胞が胃癌組織内に浸潤することは予後良好の兆候と報告されている(40-42)。本研究で、腹膜播種の進行とともにこれらの抗腫瘍免疫に働くエフェクターリンパ球の増殖が腹腔内で抑制される可能性が示唆された。

一方、B 細胞の割合は、TLR と正の相関を認めた。B 細胞は腫瘍特異的な抗体を分泌することにより、抗腫瘍免疫作用を発揮するとされ(43)、一般に原発腫瘍に浸潤する B 細胞の密度が高い症例ほど、予後が良好である(44)ことが報告されている。その一方で、制御性 B 細胞(B-reg)という免疫抑制に関与する B 細胞のフェノタイプが存在することも報告されている(45, 46)。今回の研究結果から播種の存在する腹腔内では B-reg の機能を有する B 細胞が増加している可能性も考えられる。

②-2 腹腔内マクロファージについて

播種を有する患者の腹腔内の CD14(+)マクロファージの割合は、播種陰性の

患者と比較して有意に増加していた。さらに播種陽性患者では、播種陰性患者と比較してその表現型が変化し、CD14、CD16、CD163 の発現量が増加していた。一般に、血中の単球は CD16 の発現量により CD14⁺⁺CD16⁻ (Classical), CD14⁺⁺CD16⁺ (Intermediate), CD14⁺CD16⁺⁺ (Non-classical)に分類されるが(47)、腹腔内マクロファージは CD14⁺CD16⁻、CD14⁺⁺CD16⁺、CD14⁺⁺CD16⁺⁺の 3 つの表現型に分類され、発現パターンが血中の単球とは異なることが報告されている(33)。その中で、CD14⁺⁺ CD16⁺⁺のマクロファージは、GATA6 および、活性化・成熟化マーカーである CD206、HLA を高発現する。本研究においても腹腔内マクロファージの CD14 と CD16 の発現は同様のパターンを示した。

固形癌の原発巣に浸潤する腫瘍関連マクロファージ (TAM) は、その大部分が M2 型マクロファージであり、血管新生や免疫抑制のシグナルを促進することが報告されている (48)。胃癌 (34, 35, 49, 50) および卵巣癌 (51) の播種患者において、腹膜内マクロファージが M2 型に変化することが報告されており、本研究の結果と矛盾のないものであった。本研究では、腹腔内マクロファージは、播種症例において CD16 陽性マクロファージが増加しており、その大部分が M2 型のフェノタイプであることが新たに示された。

近年、体腔に滞留し Tim-4 を高発現するマクロファージは、CD8⁺細胞傷害

性 T 細胞を減少させ免疫抑制状態に維持することが報告された (52)。本研究において CD16 陽性マクロファージの割合は、CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞の割合と負の相関を示し、CD16 陽性マクロファージは免疫抑制に関与する可能性があることが示唆された。

②-3 S-1/オキサリプラチン+パクリタキセル腹腔内投与併用療法開始前後の腹腔内免疫細胞について

本治療を受けた大部分の症例において腹腔内の好酸球の割合の増加を認めた。さらに、細胞診が陰転化した症例で好酸球の増加が顕著であった。様々な癌種で腫瘍組織内に好酸球が存在することが報告されているが、好酸球の浸潤量と予後の関係は癌種によって様々である。胃癌を含めた消化管癌では好酸球の浸潤は良好な予後に関係する (53-55) ことが報告されている。一方、マウスを使用した研究において、腫瘍に浸潤した好酸球は組織内に T 細胞を動員して癌細胞を殺傷すること (56) や、播種をきたしたマウスの腹腔内にアレルギー誘発物質である IL-33 を投与すると腹腔内に好酸球が動員され、腹腔内遊離癌細胞が減少することが報告されている (57)。また、詳細な機序は不明であるが、腹腔内に PTX を投与することにより好酸球性腹水をきたした卵巣癌患者の症例が報告されている (58)。以上の事実から、パクリタキセルの腹腔内投与が腹腔内の好

酸球増加を誘導し、この好酸球が細胞診の陰転化に関与している可能性あると考えられる。S-1／オキサリプラチン＋パクリタキセル腹腔内投与併用療法の開始前後での腹腔内の好酸球の割合の変化を調査することが、治療効果の予測に利用できる可能性があることが判明した。

第5章 おわりに

今回の研究において、TLR が胃癌患者の播種の進行度を反映し、胃癌・根治切除後の患者の播種再発の予測マーカーとなることが確認できた。免疫細胞の解析から、播種の進行と共に CD8 陽性 T リンパ球と NKT 細胞が減少し、B 細胞とマクロファージが増加することが確認できた。また、腹腔内マクロファージは播種患者において CD16 陽性マクロファージの割合が増加したが、その多くは M2 型のフェノタイプを示し、免疫抑制に関与する可能性が示唆された。さらに、S-1/オキサリプラチン+パクリタキセル腹腔内投与併用療法を受けた胃癌腹膜播種患者の治療後の腹腔内において好酸球が増加しており、播種の抑制に関与する可能性が示唆された。今後、腹腔内免疫が腹膜播種の進展にどのように関わっているか、化学療法が腹腔内免疫に与える影響について理解が進むことにより、未だ十分な予後の改善の得られていない胃癌腹膜播種に対する新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導を頂いた自治医科大学大学院消化器一般移植外科 佐田尚宏教授、北山丈二教授、細谷好則教授， 宮戸秀世先生、臨床腫瘍科 山口博紀教授、大澤英之先生に深く感謝致します。

また、Flow cytometry の操作で御指導いただいた、臨床研究支援センターの早川裕子先生に深く感謝致します。

そして、研究の計画・遂行にあたり様々なご助言を頂き、日々の研究生活を支えて下さった自治医科大学消化器一般移植外科学教室の皆様、臨床研究支援センターの篠原淳子さん、畠山浩美さん、贄田育子さんに心より御礼申し上げます。

参考文献

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 71:209-249; 2021
2. 藤岡 審, 江崎 幹, 北園 孝. 【知っておきたい感染によるがん診療の知識】各種がんの現状と対策 ピロリ菌と胃がん 疫学と診断. *臨床と研究.* 95:141-145; 日本語. 2018 2018
3. Kakinuma D, Arai H, Yasuda T, Kanazawa Y, Matsuno K, Sakurazawa N, Watanabe M, Suzuki H, Yoshida H. Treatment of Gastric Cancer in Japan. *J Nippon Med Sch.* 88:156-162; 2021
4. Nashimoto A, Akazawa K, Isobe Y, Miyashiro I, Katai H, Kodera Y, Tsujitani S, Seto Y, Furukawa H, Oda I, *et al.* Gastric cancer treated in 2002 in Japan: 2009 annual report of the JGCA nationwide registry. *Gastric Cancer.* 16:1-27; 2013
5. Maehara Y, Hasuda S, Koga T, Tokunaga E, Kakeji Y, Sugimachi K. Postoperative outcome and sites of recurrence in patients following curative resection of gastric cancer. *Br J Surg.* 87:353-7; eng. 2000
6. Yoo CH, Noh SH, Shin DW, Choi SH, Min JS. Recurrence following curative resection for gastric carcinoma. *Br J Surg.* 87:236-42; eng. 2000
7. Schwarz RE, Zagala-Nevarez K. Recurrence patterns after radical gastrectomy for gastric cancer: prognostic factors and implications for postoperative adjuvant therapy. *Ann Surg Oncol.* 9:394-400; eng. 2002
8. Lee CC, Lo SS, Wu CW, Shen KH, Li AF, Hsieh MC, Lui WY. Peritoneal recurrence of gastric adenocarcinoma after curative resection. *Hepatogastroenterology.* 50:1720-2; eng. 2003
9. Sodek KL, Murphy KJ, Brown TJ, Ringuette MJ. Cell-cell and cell-matrix dynamics in intraperitoneal cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 31:397-414; 2012
10. Thibault B, Castells M, Delord JP, Couderc B. Ovarian cancer microenvironment: implications for cancer dissemination and chemoresistance acquisition. *Cancer Metastasis Rev.* 33:17-39; 2014
11. Zheng LN, Wen F, Xu P, Zhang S. Prognostic significance of malignant ascites in gastric cancer patients with peritoneal metastasis: A systemic review and meta-analysis. *World J Clin Cases.* 7:3247-3258; 2019
12. Yarema R, capital O CcEMC, Hyrya P, Kovalchuk Y, Safiyan V, Karelin I, Ferneza S, Fetsych M, Matusyak M, Oliynyk Y, *et al.* Gastric cancer with peritoneal metastases: Efficiency of standard treatment methods. *World J Gastrointest Oncol.* 12:569-581; 2020
13. Cocolini F, Cotte E, Glehen O, Lotti M, Poiasina E, Catena F, Yonemura Y, Ansaloni L. Intraperitoneal chemotherapy in advanced gastric cancer. Meta-analysis of randomized trials. *Eur J Surg Oncol.* 40:12-26; 2014

14. Wu X, Li Z, Li Z, Jia Y, Shan F, Ji X, Bu Z, Zhang L, Wu A, Ji J. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy plus simultaneous versus staged cytoreductive surgery for gastric cancer with occult peritoneal metastasis. *J Surg Oncol.* 111:840-7; 2015
15. Kobayashi D, Kodera Y. Intraperitoneal chemotherapy for gastric cancer with peritoneal metastasis. *Gastric Cancer.* 20:111-121; 2017
16. Kitayama J, Ishigami H, Yamaguchi H, Sakuma Y, Horie H, Hosoya Y, Lefor AK, Sata N. Treatment of patients with peritoneal metastases from gastric cancer. *Ann Gastroenterol Surg.* 2:116-123; 2018
17. Leake P-A, Cardoso R, Seevaratnam R, Lourenco L, Helyer L, Mahar A, Rowsell C, Coburn NG. A systematic review of the accuracy and utility of peritoneal cytology in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer.* 15:27-37; 2011
18. Jacquet P, Sugarbaker PH. Clinical research methodologies in diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res.* 82:359-74; eng. 1996
19. Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhof S. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol.* 35:122-8; 2004
20. Baeuerle PA, Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer.* 96:417-23; 2007
21. Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK, Mellstedt H. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. *Cancer Treat Rev.* 38:68-75; 2012
22. Davidson B, Dong HP, Holth A, Berner A, Risberg B. Flow cytometric immunophenotyping of cancer cells in effusion specimens: diagnostic and research applications. *Diagn Cytopathol.* 35:568-78; 2007
23. Krishan A, Ganjei-Azar P, Hamelik R, Sharma D, Reis I, Nadji M. Flow immunocytochemistry of marker expression in cells from body cavity fluids. *Cytometry A.* 77:132-43; 2010
24. Kitayama J, Emoto S, Yamaguchi H, Ishigami H, Kamei T, Yamashita H, Seto Y, Matsuzaki K, Watanabe T. Flow cytometric quantification of intraperitoneal free tumor cells in patients with peritoneal metastasis. *Cytometry B Clin Cytom.* 86:56-62; eng. 2014
25. Acosta M, Pereira J, Arroz M. Screening of carcinoma metastasis by flow cytometry: A study of 238 cases. *Cytometry B Clin Cytom.* 90:289-94; 2016
26. Ruiz-Alcaraz AJ, Martinez-Banaclocha H, Marin-Sanchez P, Carmona-Martinez V, Iniesta-Albadalejo MA, Tristan-Manzano M, Tapia-Abellan A, Garcia-Penarrubia P, Machado-Linde F, Pelegrin P, *et al.* Isolation of functional mature peritoneal macrophages from healthy humans. *Immunol Cell Biol.* 98:114-126; 2020
27. Liu M, Silva-Sanchez A, Randall TD, Meza-Perez S. Specialized immune responses in the peritoneal cavity and omentum. *J Leukoc Biol.* 109:717-729; 2021
28. Okabe Y. Immune Niche Within the Peritoneal Cavity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 434:123-134; eng. 2021

29. Ghosn EE, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, Bortoluci KR, Almeida SR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:2568-73; 2010
30. Bain CC, Hawley CA, Garner H, Scott CL, Schridde A, Steers NJ, Mack M, Joshi A, Williams M, Mowat AM, *et al*. Long-lived self-renewing bone marrow-derived macrophages displace embryo-derived cells to inhabit adult serous cavities. *Nat Commun*. 7:ncomms11852; 2016
31. Xia H, Li S, Li X, Wang W, Bian Y, Wei S, Grove S, Wang W, Vatan L, Liu JR, *et al*. Autophagic adaptation to oxidative stress alters peritoneal residential macrophage survival and ovarian cancer metastasis. *JCI Insight*. 5: 2020
32. Etzerodt A, Moulin M, Doktor TK, Delfini M, Mossadegh-Keller N, Bajenoff M, Sieweke MH, Moestrup SK, Auphan-Anezin N, Lawrence T. Tissue-resident macrophages in omentum promote metastatic spread of ovarian cancer. *J Exp Med*. 217: 2020.
33. Ruiz-Alcaraz AJ, Carmona-Martinez V, Tristan-Manzano M, Machado-Linde F, Sanchez-Ferrer ML, Garcia-Penarrubia P, Martinez-Esparza M. Characterization of human peritoneal monocyte/macrophage subsets in homeostasis: Phenotype, GATA6, phagocytic/oxidative activities and cytokines expression. *Sci Rep*. 8:12794; 2018
34. Ito A, Kagawa S, Sakamoto S, Kuwada K, Kajioka H, Yoshimoto M, Kikuchi S, Kuroda S, Yoshida R, Tazawa H, *et al*. Extracellular vesicles shed from gastric cancer mediate protumor macrophage differentiation. *BMC Cancer*. 21:102; 2021
35. Sakamoto S, Kagawa S, Kuwada K, Ito A, Kajioka H, Kakiuchi Y, Watanabe M, Kagawa T, Yoshida R, Kikuchi S, *et al*. Intraperitoneal cancer-immune microenvironment promotes peritoneal dissemination of gastric cancer. *Oncoimmunology*. 8:e1671760; 2019
36. Bando E, Yonemura Y, Takeshita Y, Taniguchi K, Yasui T, Yoshimitsu Y, Fushida S, Fujimura T, Nishimura G, Miwa K. Intraoperative lavage for cytological examination in 1,297 patients with gastric carcinoma. *Am J Surg*. 178:256-62; eng. 1999
37. Bonenkamp JJ, Songun I, Hermans J, van de Velde CJ. Prognostic value of positive cytology findings from abdominal washings in patients with gastric cancer. *Br J Surg*. 83:672-4; eng. 1996
38. Luo G, Hu Y, Zhang Z, Wang P, Luo Z, Lin J, Cheng C, Yang Y. Clinicopathologic significance and prognostic value of Ki-67 expression in patients with gastric cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. 8:50273-50283; eng. 2017
39. Papadopoulos N, Kotini A, Cheva A, Jivannakis T, Manavis J, Alexiadis G, Lambropoulou M, Vavetsis S, Tamiolakis D. Gains and losses of CD8, CD20 and CD56 expression in tumor stroma-infiltrating lymphocytes compared with tumor-associated lymphocytes from ascitic fluid and lymphocytes from tumor draining lymph nodes in serous papillary ovarian carcinoma patients. *Eur J Gynaecol Oncol*. 23:533-6; eng. 2002

40. Zheng X, Song X, Shao Y, Xu B, Chen L, Zhou Q, Hu W, Zhang D, Wu C, Tao M, *et al.* Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. 8:57386-57398; eng. 2017
41. Lee HE, Chae SW, Lee YJ, Kim MA, Lee HS, Lee BL, Kim WH. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *Br J Cancer*. 99:1704-11; 2008
42. Peng LS, Mao FY, Zhao YL, Wang TT, Chen N, Zhang JY, Cheng P, Li WH, Lv YP, Teng YS, *et al.* Altered phenotypic and functional characteristics of CD3+CD56+ NKT-like cells in human gastric cancer. *Oncotarget*. 7:55222-55230; eng. 2016
43. Wang SS, Liu W, Ly D, Xu H, Qu L, Zhang L. Tumor-infiltrating B cells: their role and application in anti-tumor immunity in lung cancer. *Cell Mol Immunol*. 16:6-18; 2019
44. Laumont CM, Banville AC, Gilardi M, Hollern DP, Nelson BH. Tumour-infiltrating B cells: immunological mechanisms, clinical impact and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 22:414-430; eng. 2022
45. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*. 42:607-12; 2015
46. Catalan D, Mansilla MA, Ferrier A, Soto L, Oleinika K, Aguillon JC, Aravena O. Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells. *Front Immunol*. 12:611795; 2021
47. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res*. 2:1; eng. 2014
48. Gambardella V, Castillo J, Tarazona N, Gimeno-Valiente F, Martinez-Ciarpaglini C, Cabeza-Segura M, Rosello S, Roda D, Huerta M, Cervantes A, *et al.* The role of tumor-associated macrophages in gastric cancer development and their potential as a therapeutic target. *Cancer Treat Rev*. 86:102015; 2020
49. Yamaguchi T, Fushida S, Yamamoto Y, Tsukada T, Kinoshita J, Oyama K, Miyashita T, Tajima H, Ninomiya I, Munesue S, *et al.* Tumor-associated macrophages of the M2 phenotype contribute to progression in gastric cancer with peritoneal dissemination. *Gastric Cancer*. 19:1052-1065; 2016
50. Eum HH, Kwon M, Ryu D, Jo A, Chung W, Kim N, Hong Y, Son DS, Kim ST, Lee J, *et al.* Tumor-promoting macrophages prevail in malignant ascites of advanced gastric cancer. *Exp Mol Med*. 52:1976-1988; 2020
51. Steitz AM, Steffes A, Finkernagel F, Unger A, Sommerfeld L, Jansen JM, Wagner U, Graumann J, Muller R, Reinartz S. Tumor-associated macrophages promote ovarian cancer cell migration by secreting transforming growth factor beta induced (TGFBI) and tenascin C. *Cell Death Dis*. 11:249; 2020

52. Chow A, Schad S, Green MD, Hellmann MD, Allaj V, Ceglia N, Zago G, Shah NS, Sharma SK, Mattar M, *et al.* Tim-4(+) cavity-resident macrophages impair anti-tumor CD8(+) T cell immunity. *Cancer Cell.* 39:973-988 e9; 2021
53. Sakkal S, Miller S, Apostolopoulos V, Nurgali K. Eosinophils in Cancer: Favourable or Unfavourable? *Curr Med Chem.* 23:650-66; eng. 2016
54. Varricchi G, Galdiero MR, Loffredo S, Lucarini V, Marone G, Mattei F, Marone G, Schiavoni G. Eosinophils: The unsung heroes in cancer? *Oncimmunology.* 7:e1393134; 2018
55. Simon SCS, Utikal J, Umansky V. Opposing roles of eosinophils in cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 68:823-833; 2019
56. Carretero R, Sektiglu IM, Garbi N, Salgado OC, Beckhove P, Hammerling GJ. Eosinophils orchestrate cancer rejection by normalizing tumor vessels and enhancing infiltration of CD8(+) T cells. *Nat Immunol.* 16:609-17; 2015
57. Perales-Puchalt A, Svoronos N, Villarreal DO, Zankharia U, Reuschel E, Wojtak K, Payne KK, Duperret EK, Muthumani K, Conejo-Garcia JR, *et al.* IL-33 delays metastatic peritoneal cancer progression inducing an allergic microenvironment. *Oncimmunology.* 8:e1515058; 2019
58. Kobayashi TK, Muramatsu M, Ueda M, Nishino T, Bamba M, Urabe M, Moritani S. Eosinophilic ascites: taxol-induced hypersensitivity? *Cytopathology.* 15:171-2; eng. 2004