

# 轉移性大腸直腸癌患者之MMR、PD-L1及TIL表現的關聯性以及存活因子研究

張景明<sup>1</sup>、吳佩儒<sup>2</sup>、許維中<sup>3</sup>

澄清綜合醫院中港分院 血液腫瘤科<sup>1</sup>、病理科<sup>2</sup>、放射腫瘤科<sup>3</sup>

## 摘要

### 目的

近年來免疫檢查哨抑制劑 (Immune Checkpoint Inhibitor, ICI) 發展迅速, 但對於大腸直腸癌, 直到近期才發現核酸錯誤配對修復 (Mismatch Repair, MMR) 缺陷的病患, 對於免疫檢查哨抑制劑的治療效果特別好; 在許多癌症研究中, 腫瘤細胞上PD-L1表現 (Tumor Cell PDL1, TC-PDL1) 的多寡可預測免疫檢查哨抑制劑的治療效果; 再者, 腫瘤浸潤淋巴球 (Tumor-Infiltrating Lymphocytes, TIL) 的多寡在許多癌症扮演重要的預後功能。因此, 本研究目的在於分析免疫學相關的生物指標 (MMR、TC-PDL1、TIL) 的關聯性, 並做上述生物指標於轉移性大腸直腸癌的預後探討。

### 方法

本研究共收集了93位轉移性大腸直腸癌的患者的臨床基本資料, 並以免疫組織化學染色法分析腫瘤組織切片的MMR (MLH-1、MSH-2、MSH-6、PMS2)、TC-PDL1、TIL等的表現, 並運用統計方法進行相關性分析, 以及對相關變數進行存活分析。

### 結果

相關性分析發現, 不論是MMR & TC-PDL1、MMR & TIL或是TIL & TC-PDL1, 兩兩間皆無相關性。存活分析方面, 以多變數分析結果發現TIL為最重要的存活預後因子。

### 結論

在免疫治療的時代中, MMR、TC-PDL1、TIL三者在大腸直腸癌各有其角色, 應常規性檢測, 而TIL<sup>+</sup>為預後較佳之因子, 建議將來需要有更

大病患人數規模, 並加入免疫檢查哨抑制劑治療的隨機對照前瞻性研究, 以深入了解免疫治療時代中, 重要的預測與預後因子。(澄清醫護管理雜誌 2020; 16 (3): 9-22)

關鍵詞: 轉移性大腸直腸癌、核酸錯誤配對修復、細胞程式死亡-配體1、腫瘤浸潤淋巴球

## 前言

### 一、轉移性大腸直腸癌的治療現況

根據我國最新之癌症登記報告 (民國 107 年底發表的資料), 每年罹患大腸直腸癌的病患已經超過一萬五千人, 為發生率第二名的癌症, 每年因大腸直腸癌死亡超過五千五百位, 為死亡率第三名的癌症 [1], 而轉移性 (第四期) 大腸直腸癌的五年存活率約只有 1 成左右, 預後很差。目前轉移性大腸直腸癌的治療以全身性化學治療 (如 5-FU, Oxaliplatin, Irinotecan...等)、標靶治療 (如血管內皮生長因子的抑制劑、表皮生長因子接受體的抑制劑、口服多標靶酪胺酸激酶抑制劑等) 為主 [2,3], 近年來整體平均存活時間已可超過 24 個月。

由於分子生物學、生物醫學技術的進步, 我們了解約有一半的轉移性大腸直腸癌患者帶有突變的 RAS 致癌基因, 而突變的 RAS 致癌基因會導致 RAS-RAF-ERK 生長路徑的持續活化, 而對表皮生長因子接受體抑制劑產生先天的抗藥性 [4]。特別是約有 5-10% 的大腸直腸癌帶有 BRAF<sup>V600E</sup> 的突

通訊作者: 許維中

通訊地址: 臺中市西屯區臺灣大道四段966號

E-mail: 6751106@yahoo.com.tw

受理日期: 2019年8月; 接受刊載: 2019年11月

變，對表皮生長因子接受體抑制劑效果特別差，預後特別不好。

## 二、免疫檢查哨抑制劑治療癌症的原理機制

2014年有東方諾貝爾獎之稱的「唐獎」，將生技醫藥獎項頒給了James P. Allison（發現Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4, CTLA-4）以及本庶佑（發現Programmed Cell Death Protein-1, PD-1），由於有兩位學者的發現，近年來癌症免疫治療，特別是免疫檢查哨抑制劑（Immune Checkpoint Inhibitors, ICI）才得以有蓬勃的發展。

T淋巴球的活化或抑制的過程，需要兩個訊號的傳入，第一個訊號是由抗原呈現細胞藉由主要組織相容性複合體（MHC）將抗原呈現給T淋巴球上的T淋巴球接受器（TCR），而第一個訊號的傳入，可以發生在淋巴結（主要是樹突細胞與T淋巴球間的作用）或是周邊組織、腫瘤（如腫瘤細胞與T淋巴球間的作用）；第二個訊號則是由抗原呈現細胞膜上許多種配體（Ligand）與T淋巴球上的接受器（Receptor）結合後產生，可以是刺激性的訊號，也可以是抑制性的訊號，其中以CTLA-4路徑以及PD-1/PD-L1路徑研究較為透徹。舉例來說，當T淋巴球上的PD-1接受器與癌細胞表面上的PD-L1配體（Programmed Death-Ligand 1）結合，便會產生抑制T淋巴球的訊號，因此，PD-1抑制劑（一種ICI）與T淋巴球上的PD-1接受器結合後，抑制的訊號便消失，因而活化了T淋巴球，而活化的T淋巴球便可毒殺癌細胞[5]。

近十年來癌症免疫治療的研究主要聚焦於ICI，目前有多項藥物已獲得多國藥品管理單位的上市許可，藥物適應症涵蓋多種癌症的治療，包含有惡性黑色素瘤、非小細胞肺癌、泌尿道上皮癌、腎臟癌、肝癌、頭頸部鱗狀細胞癌、胃癌以及何杰金氏淋巴瘤；更特別的是其中一種ICI-Pembrolizumab（為PD-1單株抗體），還具有不限定特定器官癌症的適應症，只要該腫瘤特徵為MSI-H（Microsatellite Instability-High）或是dMMR（Mismatch Repair Deficiency）[6]。

然而，ICI用於上述的癌症的後線治療時，其腫瘤反應率大約為10-20%，也就是說若是不依生物指標挑選病人，則相當大一部分的病人其

腫瘤並不會縮小，並不會因此獲得益處，因此若有可以精確預測ICI效果的生物指標（Predictive Biomarkers），不僅可以選擇到最適合使用藥物的病人，避免藥物浪費及治療副作用，對病人而言會是一大福音。

## 三、免疫檢查哨抑制劑於黑色素瘤、肺癌的臨床應用

Ipilimumab，為一CTLA-4單株抗體，率先於黑色素瘤的臨床試驗中成功證明其療效，相對於對照組（勝肽腫瘤疫苗或是化學治療），該藥物可以有效提升腫瘤反應率，以及整體存活期，也因此美國食品藥品監督管理局（Food and Drug Administration, FDA）於2011年3月份核准通過該藥於無法開刀或已經轉移的惡性黑色素瘤病患。

另外，Nivolumab（為PD-1單株抗體），因其阻斷PD-1/PD-L1路徑而阻斷T淋巴球的抑制性訊號，故促使T淋巴球活化，在數個黑色素瘤的臨床試驗中也證明可以明顯增加腫瘤反應率、延長疾病無進展存活期及整體存活期。另一個臨床試驗中，Nivolumab與Ipilimumab合併使用，結果顯示無進展存活期、整體存活期比單一藥物使用要來得更好[7]。

以往轉移性非小細胞肺癌的治療，主要是白金類化學治療，或是酪胺酸激酶抑制劑（如病患的腫瘤細胞具有敏感性突變）作為第一線治療，當疾病進展時，第二線的治療則為另外一類化學治療或是下一線可以對抗突變的酪胺酸激酶抑制劑，而越後線的藥物治療，其控制腫瘤的時間通常會越短。

CheckMate 057（第三期的隨機分配對照試驗），試驗族群為嚴重型的非鱗狀細胞非小細胞肺癌接受過第一線的化學治療後而疾病進展的病人（n=582），隨機分配為實驗組（接受Nivolumab單一治療）及對照組（接受歐洲紫杉醇-Docetaxel-標準第二線化學治療）。該研究發現相較於Docetaxel，Nivolumab可以延長整體存活期（12.2個月 vs. 9.4個月，HR 0.73, 95% CI: 0.59-0.89, p=0.0015），而整體腫瘤反應率也比較高（19% vs. 12%），腫瘤反應時間也較長（17個月 vs. 5.6個月）；另外發現腫瘤細胞表現PD-L1較高者（不論切點是1%, 5%, 10%），與PD-L1表現較低者相比，其整體存活期、無進展存活期、腫瘤反應時間皆比較長[8]。

而另一種 PD-1 單株抗體 Pembrolizumab，於 KEYNOTE-010 臨床試驗中 [9]，1034 位接受過第一線藥物治療失敗後，腫瘤特徵為腫瘤細胞 PD-L1 表現 >1% 的非小細胞肺癌病人，隨機分配為 3 組，1 組為 Docetaxel，其他 2 組為不同劑量的 Pembrolizumab (2mg/kg/dose、10mg/kg/dose)，並分析 PD-L1 表現 ≥ 50% 的次族群病人。該研究結果若以全部病人來分析，整體存活期最長的是 Pembrolizumab 高劑量 10mg/kg 組 (12.7 個月)，次之為 Pembrolizumab 低劑量 2mg/kg 組 (10.4 個月)，最差的是 Docetaxel 組 (8.5 個月)，Pembrolizumab 與 Docetaxel 相比可顯著延長整體存活期。而次族群分析 (PD-L1 表現 ≥ 50%)，整體存活期最長的仍是 Pembrolizumab 高劑量組 (更是延長至 17.3 個月)，最差的是 Docetaxel 組 (8.2 個月)，Pembrolizumab 與 Docetaxel 相比可顯著延長整體存活期。由這個研究中顯示，腫瘤細胞表現 PD-L1 的多寡有預測 Pembrolizumab 治療效果的可能性。

#### 四、應用於免疫檢查哨抑制劑的生物指標

直至今日，醫界仍試著尋找可以準確預測 ICI 臨床效果的最佳生物指標 (Predictive Biomarkers)，然而目前並沒有單一指標或是複合式指標可以正確預測 ICI 的治療效果。目前，科學界研究較多的生物指標，可以分成 5 大類來了解，包括臨床指標、血液指標、糞便指標、組織指標以及影像指標，然而許多研究屬於回溯性研究，或是研究人數較少，研究的癌症類別不同，且研究主題亦不盡相同，有些針對 CTLA-4 單株抗體，有些針對 PD-1 單株抗體或是 PD-L1 單株抗體，而研究目的，有些是預測藥物治療效果，有些是研究指標的預後功能，此為評讀這些研究必須注意的地方。

- (一) 臨床指標: 如轉移處、免疫相關副作用...等，與預後的相關性。
- (二) 血液指標: 血中嗜中性白血球、淋巴球數量或比例，單核球或是調節性 T 淋巴球 (Treg)，甚至是細胞激素，與預後及治療反應率之間的相關性。
- (三) 糞便指標: 不同的腸道菌叢具有不同的免疫刺激的作用，因而對免疫檢查哨抑制劑可能會有不同的治療反應。

(四) 組織指標: 是目前研究最多的部分。

1. 腫瘤細胞上 PD-L1 表現 (Tumor Cell PDL1, TC-PDL1): 在上述 Pembrolizumab 應用於非小細胞肺癌的研究中，可觀察到腫瘤細胞上 PD-L1 表現越強，使用 Pembrolizumab 的治療效果越好。但是 Nivolumab 在黑色素瘤的臨床試驗中 [10]，則無法觀察到 PD-L1 表現高低與治療效果間的關係，而且部份 PD-L1 陰性的病患甚至有不錯的治療反應。因此，無法單以腫瘤 PD-L1 的表現來預測治療的效果。
2. 腫瘤浸潤淋巴球 (Tumor-Infiltrating Lymphocytes, TIL): 許多研究認為 TIL 與預後的相關性相當複雜，包括 TIL 的 Density、Phenotype、Diversity、Location 可能都與整體的預後，與免疫治療的治療效果有關。
3. 腫瘤突變負荷 (Tumor Mutation Burden, TMB): 腫瘤突變負荷的定義為，每一百萬鹼基中，非同義體突變 (Non-Synonymous Somatic Mutations) 的總數量，這些體突變會造成蛋白質的構型改變，因而產生新的抗原 (Neo-Antigens)，對於免疫系統就有如外來物，而 ICI 可以進一步喚醒、刺激免疫系統，使免疫系統可以偵測到這些外來物，並進一步攻擊、摧毀腫瘤。Rizvi [11] 研究發現，Pembrolizumab 使用於非小細胞肺癌，越高的腫瘤突變負荷，治療效果越好。然而，目前 TMB 技術門檻較高且昂貴，不適合一般臨床使用需求。
- (五) 影像指標: 許多研究利用正子攝影掃描來預測 ICI 的治療效果，包括使用 <sup>18</sup>F-Fluoro-Deoxy-Glucose-Positron Emission Tomography (FDG-PET)、<sup>18</sup>F-Fluorothymidine-Positron Emission Tomography (FLT-PET)。

#### 五、核酸錯誤配對修復 Mismatch Repair 在大腸直腸癌的應用

核酸錯誤配對修復 (Mismatch Repair, MMR) 是眾多 DNA 修復機制的一種，可以辨識並修復 insertion、deletion 等基因損傷。其中，四種基因變異包括 MLH-1、MSH-2、MSH-6、PMS-2 所造成的任何一種蛋白質缺乏或是功能不全，會造成 MMR deficiency (dMMR)。因此，若 MMR Deficiency 時，會造成突變的累積，dMMR 腫瘤的突變預期會比較多。由 Le 的研究可以發

現 dMMR 的病患中，體突變數平均高達 1782 個，而 pMMR 的體突變數僅有 73 個 [6]。

MMR 修復的位置常常位在 DNA 重複序列處，這個位置又稱為 Microsatellites (微小衛星)，當 MMR deficiency 時會造成這些 Microsatellites 長度變異，稱為 Microsatellites Instability (MSI)。也就是當 dMMR 時，會產生 MSI 的狀況，特別是 Microsatellites 長度變異較大的狀況，即 MSI-High (MSI-H) [12]。目前有 3 種方法可用來檢驗 dMMR 或 MSI，包括免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry, IHC)、聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)、次世代定序 (Next Generation Sequencing, NGS)。研究指出，三種方式的結果一致性很高。以 IHC 檢測 MMR Status 是簡單又快速的方法，但是有以下缺點：腫瘤組織固定的變異性 (包括固定液、浸泡福馬林液的時間)，判讀的困難性 (染色強度、片狀分布)，這是在判讀 MMR IHC 之前須要留意的問題。

#### (一) MSI 變異大腸直腸癌的臨床特徵

具 MSI 變異大腸直腸癌，其腫瘤位置大多在近端大腸，其預後較非 MSI (Non-MSI) 大腸直腸癌好，發現時通常較為早期，較少為轉移性疾病 [13]。根據研究，具 MSI 變異大腸直腸癌的預後較好，可能與較多的腫瘤浸潤淋巴細胞有關，而腫瘤浸潤淋巴細胞較多，推論乃由於 MSI 變異會造成較高的腫瘤突變量 (Mutational Burden)，進而產生較多的新抗原 (Neo-Antigens) [14]。

#### (二) dMMR/MSI 的預後價值 (Prognostic Value)

Venderbosch 的研究指出，dMMR 的轉移性大腸直腸癌相較於 pMMR，其存活期較差，而具 BRAF 突變的病人，相較於 BRAF 沒有突變，預後較差。進一步分析，發現 dMMR 的病人中較多 BRAF 突變 (34.6%)，而 pMMR 的病人 BRAF 突變較少 (6.8%)。研究指出 dMMR 病人預後較差的主要原因為來自於 dMMR 病人具有較多的 BRAF 突變 [15]。

#### (三) dMMR/MSI 的預測價值 (Predictive Value)

儘管以 dMMR/MSI 來預測化學治療的治療效果並不準確，但其預測 ICI 的治療效果卻是很好，第二期臨床試驗 -KEYNOTE 016 [6]，

以 Pembrolizumab 應用於 dMMR 腫瘤，41 位病人中有 11 位是 dMMR 大腸直腸癌，21 位是 pMMR 大腸直腸癌，9 位是 dMMR 的非大腸直腸癌，結果，dMMR 大腸直腸癌病人的腫瘤反應率達 40%，pMMR 大腸直腸癌病人的腫瘤反應率為 0%，dMMR 非大腸直腸癌的腫瘤反應率則高達 71%；經全外顯子組定序發現，dMMR 的病患，體突變數平均高達 1782 個，而 pMMR 的體突變數僅有 73 個，兩組的體突變數具統計上之明顯差異 ( $p=0.007$ )；也發現體突變數越高時，則疾病的存活期越長 ( $p=0.02$ )。由上可知，MMR 的狀態可以預測腫瘤的突變量，而以兩者 (MMR、腫瘤突變負荷) 來預測接受 ICI 的反應率是有效的生物指標。然而，腫瘤突變負荷昂貴是其缺點。此外，未來需要更多努力將腫瘤突變負荷做較明確的定義，如 Cutoffs 的定義、統一等等，以做為指引。

### 六、免疫檢查哨抑制劑於轉移性大腸直腸癌的臨床應用

ICI 用於轉移性大腸直腸癌的治療效果並不好，直到 MMR 的應用才露出一線曙光。約 15% 的大腸直腸癌屬於 dMMR，但是腫瘤期別越高則 dMMR 比例越少，據統計，第二期 dMMR 比例約有 20%，第三期約有 11%，第四期只約有 3.5%，這是大腸直腸癌應用 MMR 的限制之一。

Le 在後續的臨床研究中 [16]，40 位大腸直腸癌與 46 位非大腸直腸癌病人 (主要包括有子宮內膜癌、胰臟癌、胃食道癌、小腸癌、膽道癌...等等)，共 86 位病人，皆為 dMMR 狀態，接受單一藥物 Pembrolizumab 治療，在大腸直腸癌組，腫瘤反應率為 52%，非大腸直腸癌組，腫瘤反應率為 54%；有 64% 的病人於治療一年後疾病穩定沒有進展，53% 於治療兩年後疾病穩定沒有進展，顯示藥物的療效有足夠的續航力。因此，目前美國 FDA 批准 Pembrolizumab 使用於具 dMMR 或 MSI-H 的所有固態腫瘤 (Solid Tumors)，接受過標準治療後，而疾病仍持續進展者，其中也包括大腸直腸癌；這是美國 FDA 核准免疫檢查哨抑制劑使用條件，首度限定於腫瘤的特徵，而不限制腫瘤類別。

## 研究材料與方法

### 一、病例收案

病例收錄自澄清醫院中港分院癌症登錄資料

庫，為第四期轉移性大腸直腸癌有確定病理組織切片報告的病人，收案時間範圍為 2008 年 1 月 1 日至 2012 年 12 月 31 日，共有 108 位病例。所有病例的福馬林固定石臘包埋的蠟塊，切成 4  $\mu$ m 厚度的組織玻片，施做 IHC，包括腫瘤細胞的 MMR Panel (MLH-1, MSH-2, MSH-6, PMS-2)、PD-L1，並觀察 TIL。扣除剩餘蠟塊檢體不足、或蠟塊切片無腫瘤細胞共 15 位外，最後有 93 位納入本研究。收集各病例的相關臨床基本資料，包括年齡、性別、原發腫瘤部位、原發腫瘤大小、淋巴結轉移數目、腫瘤組織分級、K-RAS Status (Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog, 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物)、遠端轉移器官、起始化學治療以及整體存活時間。本研究經澄清醫院中港分院人體試驗委員會審核通過 (HP180007)。

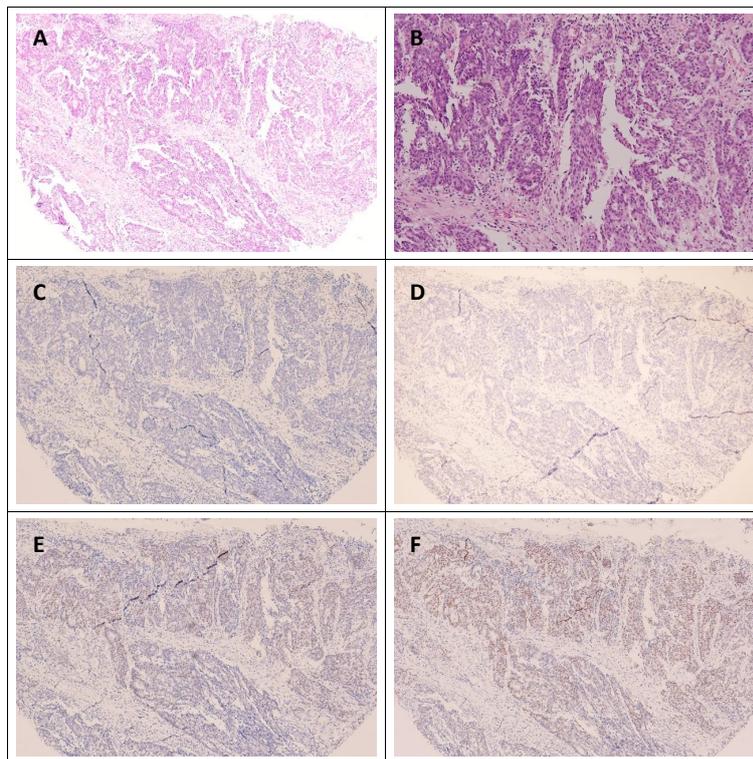
## 二、組織微陣列 (Tissue Microarrays)

從癌組織福馬林固定石臘包埋的蠟塊中，取出直徑 1.5mm 大小的組織核心，再用細鋼針將這些組織核心排列於一個新的石臘塊中，形成一個新的組織微陣列。先做一個 4  $\mu$ m 厚度的蘇木素 - 伊紅染色 (H&E Stain) 切片，由病理科醫師仔細搜尋

腫瘤細胞所在，來確認其代表性，同時亦觀察判讀腫瘤浸潤淋巴細胞的有無。

## 三、MMR免疫組織化學染色及分析

IHC 使用的抗體分別如下: MLH1 抗體 (Clone GM011, 1:50; Genemed)、MSH2 抗體 (Clone G219-1129, 1:100; ZETA)、MSH6 抗體 (Clone GM024, 1:100; Genemed)、PMS2 抗體 (Clone A16-4, 1:100; BD)。組織切片厚度為 4  $\mu$ m，使用 Bond-Max 自動染色機，分別以 MLH1、MSH2、MSH6、PMS2 抗體來做染色。組織微陣列標本置於 Tris 緩衝液和聚山梨醇酯 20，再經由一系列的酒精稀釋液再水化，以磷酸鹽食鹽水緩衝液洗滌，並根據供應商建議的流程來執行;之後組織切片在全自動的 Bond-Max 系統中以前述的抗體做染色，使用裝載著熱誘導抗原修復以及 Leica Refine 聚合物檢測系統;所有的免疫染色的染色原都是使用二氨基聯苯胺，組織切片以封片膠封片以便鏡檢。接著由病理科醫師以 Olympus BX51 顯微鏡觀察染色玻片，當任一顆腫瘤細胞的細胞核呈現染色，則判讀為陽性染色 (圖一)，若所有腫瘤細胞的細胞核都沒有呈現染色，則判讀為陰性 (圖一)。



圖一 某位病例的MMR免疫組織化學染色表現

當 MLH1、MSH2、MSH6、PMS2 中任何一種蛋白完全沒有表現，代表相對的基因有突變而失去功能，則定義為 MMR deficiency (dMMR)；若四種蛋白皆有表現，則定義為 MMR proficiency (pMMR)。

(A) H&E Stain，放大倍率 100 倍；(B) H&E Stain，放大倍率 200 倍；(C) MLH1 染色，幾乎沒有任何腫瘤細胞染上色，故判讀為陰性染色；(D) PMS2 染色，幾乎沒有任何腫瘤細胞染上色，故判讀為陰性染色；(E) MSH2 染色，有相當多的腫瘤細胞染上色，故判讀為陽性染色；(F) MSH6 染色，有相當多的腫瘤細胞染上色，故判讀為陽性染色。

#### 四、PD-L1 免疫組織化學染色

PD-L1 使用的抗體為 (Clone Y19-I, 1:100; DB Biotech)，組織切片厚度為  $4\ \mu\text{m}$ ，先使用一級抗體來做染色，再用 HRP 鍵結的二級抗體染色，去觀測 PD-L1 Rabbit 單株抗體 (DB041)，表現的程度則使用 Talink Mouse/Rabbit 聚合物檢測系統，免疫組織化學染色則使用 Cemark 300 全自動染色機。這些組織切片以封片膠封片以便鏡檢，最後由病理科醫師以 Olympus BX51 顯微鏡來觀察染色玻片。

觀察評估腫瘤細胞細胞膜表面是否呈現染色，若有呈現染色的腫瘤細胞比例  $\geq 50\%$ ，則判讀為陽性染色 (TC-PDL1<sup>+</sup>) (圖二)，而呈現染色的腫瘤細胞比例  $< 50\%$ ，則判讀為陰性染色 (TC-PDL1<sup>-</sup>) (圖二)。

(A) 一位病例的 H&E Stain，放大倍率 200 倍；(B) 圖例 A 病例的 PDL1 染色，有相當多的腫瘤細胞染上色，故判讀為陽性染色；(C) 另一位病例的 H&E Stain，放大倍率 100 倍；(D) 圖例 C 病例的 PDL1 染色，幾乎沒有任何腫瘤細胞染上色，故判讀為陰性染色。

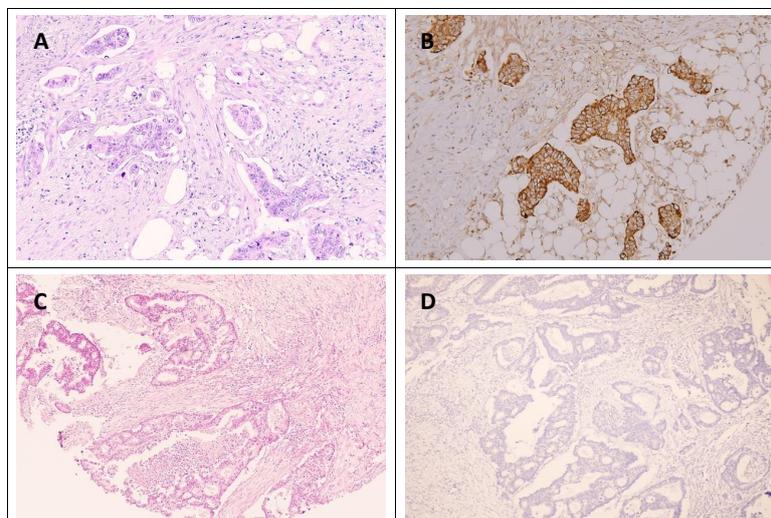
#### 五、統計分析方法

本研究以 SPSS 第 19 版套裝軟體為資料分析工具，樣本之基本資料以個數及百分比表示，類別變項 (性別、原發腫瘤位置、遠端轉移、Grade、K-RAS、MMR、TC-PDL1、TIL) 使用 Pearson 卡方檢定或 Fisher's exact 檢定分析，連續變項 (年齡、原發腫瘤大小、淋巴結侵犯) 使用 Student's t 檢定分析；存活曲線則以 Kaplan-Meier 方法以及 Log-Rank 檢定進行分析，影響存活之顯著因子利用 Cox Proportional Hazards Model 統計檢定。p 值  $< 0.05$  視為具統計學顯著差異。

### 研究結果

#### 一、收案研究病例的基本臨床病理特性

表一顯示，收案病例共 93 位，病例年齡最小為 28 歲，最大為 91 歲，年齡中位數為 63 歲，男性共 56 位 (60.2%)，原發部位位於左側大腸有 64 位 (68.8%)，具肝臟或肺臟單一器官轉移者共 55 位 (59.1%)。腫瘤分化級為 grade 2 有 75 位 (80.6%)，有 65 位病例 K-RAS 狀態未



圖二 某兩位病例的TC-PDL1免疫組織化學染色表現

知 (69.9%)，這是因為早期的病理檢體沒有常規檢測 K-RAS 突變狀態。IHC 染色結果為 dMMR 的病例共 7 位 (7.5%)，TC-PDL1<sup>+</sup> 的共 21 位 (22.6%)，有 82 位有腫瘤浸潤淋巴細胞 (TIL<sup>+</sup>) (88.2%)。

## 二、MMR、TC-PDL1、TIL 狀態與臨床病理特性

表二顯示 dMMR 與 pMMR 兩組臨床病理特性分析，在性別、年齡、原發腫瘤部位、腫瘤大小、淋巴結侵犯、器官轉移、腫瘤分化級別、K-RAS 的突變皆無顯著差異。

表一 研究病例的基本臨床病理特性

基本特性		病例人數 (%)
年齡 (歲) (平均)	28-91 (63.0±13.2)	93
	< 60	39 (41.9)
	≥ 60	54 (58.1)
性別	男性	56 (60.2)
	女性	37 (39.8)
原發部位	右側大腸	29 (31.2)
	左側大腸	64 (68.8)
轉移部位	肝臟或肺臟單一器官轉移	55 (59.1)
	腹膜轉移或兩個器官以上轉移	38 (40.9)
分化等級	2	75 (80.6)
	3	15 (16.1)
	Unknown	3 (3.2)
K-RAS <sup>a</sup>	Wild type	14 (15.1)
	Mutation	14 (15.1)
	Unknown	65 (69.9)
MMR	Deficiency (dMMR)	7 (7.5)
	Proficiency (pMMR)	86 (92.5)
TC-PDL1	Positive	21 (22.6)
	Negative	72 (77.4)
TIL	Positive	82 (88.2)
	Negative	11 (11.8)

<sup>a</sup>K-RAS Status (Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog, 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物)

表二 依不同 MMR 狀態的臨床病理特性分析

	dMMR (n=7,%)	pMMR (n=86,%)	p
性別			0.699 <sup>a</sup>
男性	5 (71.4)	51 (59.3)	
女性	2 (28.6)	35 (40.7)	
年齡 (歲) <sup>#</sup>	60.0±17.1	63.1±12.9	0.557
原發腫瘤位置			0.673 <sup>a</sup>
右側	3 (42.9)	26 (30.2)	
左側	4 (57.1)	60 (69.8)	
原發腫瘤大小 (cm) <sup>#</sup>	6.64±1.97	5.50±2.15	0.178
淋巴結侵犯 (顆) <sup>#</sup>	4.7±4.3	4.3±4.6	0.798
遠端轉移			0.696 <sup>a</sup>
單一器官 (肝、肺)	5 (71.4)	50 (58.1)	
兩個器官以上或腹膜轉移	2 (28.6)	36 (41.9)	
分化等級 <sup>#</sup>			0.330 <sup>a</sup>
2	5 (71.4)	70 (84.3)	
3	2 (28.6)	13 (15.7)	
K-RAS <sup>g</sup>			1.000 <sup>a</sup>
Wild Type	1 (50.0)	13 (50.0)	
Mutation	1 (50.0)	13 (50.0)	

<sup>a</sup>Fisher's Exact Test

<sup>#</sup>Mean±SD

<sup>g</sup>Missing Data: Grade有3人；K-RAS有65人

表三顯示 TC-PDL1<sup>+</sup> 與 TC-PDL1<sup>-</sup> 兩組臨床病理特性分析，TC-PDL1<sup>-</sup> 組的腫瘤大小為 5.87±2.26 公分，TC-PDL1<sup>+</sup> 組為 4.68±1.46 公分，TC-PDL1<sup>-</sup> 組腫瘤較大 (p=0.026)，其餘兩組在性別、年齡、原發腫瘤部位、淋巴結侵犯、器官轉移、腫瘤分化級別、K-RAS 的突變皆無顯著差異。

表四顯示 TIL<sup>+</sup> 與 TIL<sup>-</sup> 兩組臨床病理特性分析，TIL<sup>+</sup> 組平均年齡為 61.5 歲，TIL<sup>-</sup> 組為 72.6 歲，TIL<sup>-</sup> 組病患年紀較大 (p=0.008)，其餘兩組在性別、原發腫瘤部位、腫瘤大小、淋巴結侵犯、器官轉移、腫瘤分化級別、K-RAS 的突變皆無顯著差異。

表三 依不同 TC-PDL1 狀態的臨床病理特性分析

	TC-PDL1 <sup>+</sup> (n=21,%)	TC-PDL1 <sup>-</sup> (n=72,%)	p
<b>性別</b>			0.857
男性	13 (61.9)	43 (59.7)	
女性	8 (38.1)	29 (40.3)	
<b>年齡 (歲) #</b>	62.6±10.4	62.9±13.9	0.920
<b>原發腫瘤位置</b>			0.809
右側	7 (33.4)	22 (30.6)	
左側	14 (66.7)	50 (69.4)	
<b>原發腫瘤大小 (cm) #</b>	4.68±1.46	5.87±2.26	0.026
<b>淋巴結侵犯 (顆) #</b>	4.5±3.8	4.2±4.8	0.830
<b>遠端轉移</b>			0.770
單一器官 (肝、肺)	13 (61.9)	42 (58.3)	
兩個器官以上或腹膜轉移	8 (38.1)	30 (41.7)	
<b>分化等級 #</b>			0.506 <sup>a</sup>
2	18 (90.0)	57 (81.4)	
3	2 (10.0)	13 (18.6)	
<b>K-RAS<sup>g</sup></b>			0.678 <sup>a</sup>
Wild Type	5 (23.8)	9 (12.5)	
Mutation	16 (76.2)	63 (87.5)	

<sup>a</sup>Fisher's Exact Test

<sup>#</sup>Mean±SD

<sup>g</sup>Missing Data: Grade有3人；K-RAS有65人

表四 依不同 TIL 狀態的臨床病理特性分析

	TIL <sup>+</sup> (n=82,%)	TIL <sup>-</sup> (n=11,%)	p
<b>性別</b>			1.000 <sup>a</sup>
男性	49 (59.8)	7 (63.6)	
女性	33 (40.2)	4 (36.4)	
<b>年齡 (歲) #</b>	61.5±13.0	72.6±10.1	0.008
<b>原發腫瘤位置</b>			0.493 <sup>a</sup>
右側	27 (32.9)	2 (18.2)	
左側	55 (67.1)	9 (81.8)	
<b>原發腫瘤大小 (cm) #</b>	5.57±2.18	5.72±2.07	0.832
<b>淋巴結侵犯 (顆) #</b>	4.3±4.6	3.9±4.5	0.769
<b>遠端轉移</b>			0.754 <sup>a</sup>
單一器官 (肝、肺)	49 (59.8)	6 (54.5)	
兩個器官以上或腹膜轉移	33 (40.2)	5 (45.5)	
<b>分化等級 #</b>			1.000 <sup>a</sup>
2	66 (83.5)	9 (81.8)	
3	13 (16.5)	2 (18.2)	
<b>K-RAS<sup>g</sup></b>			-
Wild Type	14 (50.0)	0	
Mutation	14 (50.0)	0	

<sup>a</sup>Fisher's Exact Test

<sup>#</sup>Mean±SD

<sup>g</sup>Missing Data: Grade有3人；K-RAS有65人

### 三、MMR、TC-PDL1、TIL間的關聯性

接著我們分析 MMR、TC-PDL1、TIL 三者間的關聯性，各分組的次族群人數如表五所示，進行相關性分析後發現，不論是 MMR&TC-

PDL1、MMR&TIL 或是 TIL&TC-PDL1 三組間，兩兩皆無相關性，p 值分別為 0.344、1.000、0.446。

### 四、預後因子的探討

表六顯示各個因子（包括性別、年齡、原發腫

表五 MMR、TC-PDL1、TIL 間的相關性分析

變項	病例數目				p
	(+, +)	(+, -)	(-, +)	(-, -)	
MMR#& TC-PDL1	0	7	21	65	0.344 <sup>a</sup>
MMR#& TIL	6	1	76	10	1.000 <sup>a</sup>
TIL & TC-PDL1	20	62	1	10	0.446 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>MMR (+) : 表示dMMR ; MMR (-) : 表示pMMR

<sup>a</sup>Fisher's Exact Test

表六 預後因子分析

變項	單變數分析		多變數分析	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
<b>性別</b>		0.237		0.799
男	1		1	
女	1.306 (0.839-2.034)		1.064 (0.658-1.721)	
<b>年齡</b>		0.007		0.051
< 60 歲	1		1	
≥ 60 歲	1.849 (1.180-2.896)		1.633 (0.998-2.673)	
<b>原發腫瘤部位</b>		0.504		
右側	1			
左側	0.854 (0.537-1.358)			
<b>原發腫瘤大小</b>		0.676		
≤ 5cm	1			
> 5cm	0.911 (0.587-1.413)			
<b>淋巴結侵犯</b>		0.030		0.168
< 4 顆	1		1	
≥ 4 顆	1.646 (1.050-2.580)		1.404 (0.867-2.276)	
<b>遠端轉移</b>		0.160		
單一器官 (肝、肺)	1			
兩個器官以上或腹膜轉移	1.367 (0.884-2.115)			
<b>分化等級</b>		0.026		0.183
2	1		1	
3	1.942 (1.081-3.488)		1.525 (0.820-2.837)	
<b>K-RAS</b>		0.724		
Wild Type	1			
Mutation	0.863 (0.380-1.957)			
<b>MMR</b>		0.340		
dMMR	1			
pMMR	1.554 (0.629-3.841)			
<b>TC-PDL1</b>		0.895		
TC-PDL1 <sup>-</sup>	1			
TC-PDL1 <sup>+</sup>	1.034 (0.626-1.711)			
<b>TIL</b>		0.001		0.038
TIL <sup>+</sup>	1		1	
TIL <sup>-</sup>	2.969 (1.529-5.766)		2.132 (1.044-4.352)	
<b>Initial Treatment</b>		0.247		
Oxaliplatin-based	1			
Irinotecan-based	1.393 (0.794-2.444)			
<b>TIL/MMR</b>		0.010		
TIL <sup>+</sup> /dMMR	1			
TIL <sup>+</sup> /pMMR	1.810 (0.660-4.965)	0.249		
TIL <sup>-</sup> /dMMR <sup>a</sup>	-	-		
TIL <sup>-</sup> /pMMR	4.738 (1.456-15.419)	0.010		

<sup>a</sup>Only 1 Case

瘤部位、原發腫瘤大小、淋巴結侵犯、遠端轉移狀態、腫瘤分化級別、K-RAS、MMR、TC-PDL1、TIL 以及起始化學治療)對於整體存活的分析。平均追蹤時間為 116.1 周 (116.1±14.3 周), 追蹤時間至 2018 年 12 月 15 日為止, 93 位病例中, 有 86 位病例已死亡。

單變數存活分析中, 年齡較大、淋巴結侵犯較多、腫瘤分化級別 Grade 3、TIL<sup>-</sup> 四者, 為統計顯著較差的預後因子。其中, 年齡 ≥ 60 歲組相較於 < 60 歲組, 整體存活較差 (HR 1.849; 95% CI: 1.180-2.896; p=0.007); 淋巴結侵犯 ≥ 4 顆組相較於 < 4 顆組, 整體存活較差 (HR 1.646; 95% CI: 1.050-2.580; p=0.030); 腫瘤分化級別 Grade 3 組相較於腫瘤分化級別 grade 2 組, 整體存活較差 (HR 1.942; 95% CI: 1.081-3.488; p=0.026); TIL<sup>-</sup> 組相較於 TIL<sup>+</sup> 組, 整體存活較差 (HR 2.969; 95% CI: 1.529-5.766; p=0.001)。Kaplan-Meier 存活曲線如圖三所示。

多變數分析則進一步確認, 唯有 TIL<sup>-</sup> 為顯著預後因子 (HR 2.132; 95% CI: 1.044-4.352; p=0.038)。年齡 ≥ 60 歲達統計邊緣性差異 (HR 1.633; 95% CI: 0.998-2.673; p=0.051); 而淋巴結侵犯 ≥ 4 顆、腫瘤分化級別 Grade 3 未達統計顯著差異。

其他因子, 如性別、原發腫瘤部位、原發腫瘤大小、遠端轉移狀態、K-RAS 突變狀態、MMR

Status、TC-PDL1 Status、起始化學治療等, 則非顯著之預後因子。

## 討論

### 一、免疫相關生物指標 (MMR, TC-PDL1, TIL) 的相關性探討

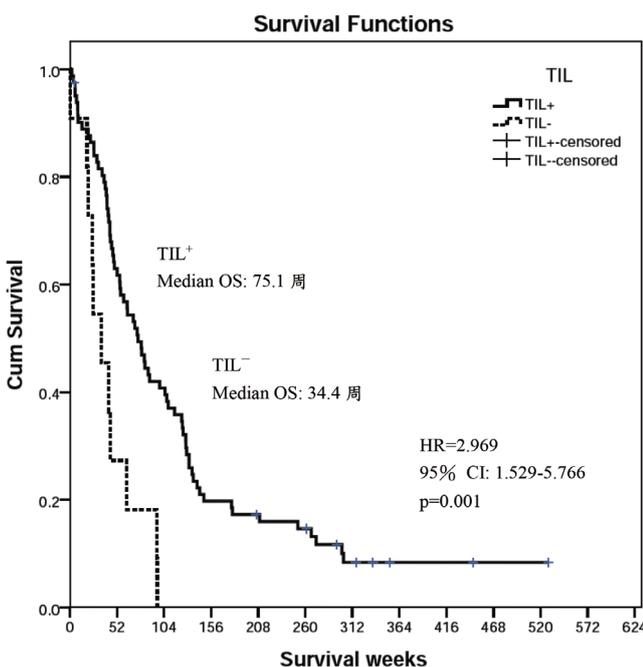
儘管我們知道免疫檢查哨抑制劑對於 dMMR 的轉移性大腸直腸癌病患的治療效果特別好, 也知道在許多癌症研究中, 腫瘤細胞 PD-L1 (TC-PDL1) 的表現量的多寡可預測免疫檢查哨抑制劑的治療效果, 再者腫瘤浸潤淋巴球 (TIL) 的多寡也證明在許多癌症中, 扮演著重要的預後角色。但是本研究針對轉移性大腸直腸癌病患所做的新興免疫相關生物指標 (MMR, TC-PDL1, TIL) 的相關性研究中, MMR&TC-PDL1、MMR&TIL、TIL&TC-PDL1, 三組之間並無相關性。

Liu 探討 243 位大腸直腸癌患者, 其中 dMMR、pMMR 各占一半, 該研究指出, 相較於 pMMR, dMMR 病患有較高的比例為 TIL<sup>+</sup>/TC-PDL1<sup>+</sup> [17]。而本研究 dMMR 病患主要為 TIL<sup>+</sup>/TC-PDL1<sup>-</sup> (如表五), 這可能與本研究所定 TC-PDL1 的閾值較高 (≥ 50%), 而 Liu 所定 TC-PDL1 (≥ 5%) 較低閾值有關; 若將本研究的 TC-PDL1 的閾值調降為 ≥ 5%, 則有 3 位 TC-PDL1 轉為陽性 (3/7)。Liu 的研究與本研究皆可觀察到, dMMR 病患主要皆為 TIL<sup>+</sup> (6/7), 這是由於 dMMR 會產生較多的 Mutation, 因而產生較多的 Neoantigens, 而造成 TIL 的增加 [14], 而 TIL<sup>+</sup> 與較好的存活相關, 在本研究與 Ogino 的研究中是一獨立的預後指標 [18]。

### 二、轉移性大腸直腸癌存活危險因子的探討

本研究的存活因子研究, 以單變數分析而言, 包括年齡較大 (≥ 60 歲)、淋巴結侵犯 (≥ 4 顆)、腫瘤分化級別較高 (Grade 3)、腫瘤周邊沒有淋巴細胞浸潤 (TIL<sup>-</sup>) 為達統計顯著差異之危險因子。以多變數分析, 只有 TIL<sup>-</sup> 達統計顯著差異之危險因子 (HR 2.132; 95% CI: 1.044-4.352; p=0.038)。

近年來有相當多的研究發現, 包括黑色素瘤、肺癌、乳癌、卵巢癌、胃癌等, 有 TIL 的浸潤可以預測較佳的預後。而針對大腸直腸癌, 過去也有不少的研究文獻指出 [19], 若有較多的 TIL, 則其預



圖三 TIL<sup>+</sup>與TIL<sup>-</sup>的Kaplan-Meier存活曲線

後較佳。然而，大多文獻是針對第二、三期大腸直腸癌所做的研究，較少單獨針對轉移性病患。Xie 的研究 [20]，轉移性大腸直腸癌病患，有高度 TIL 浸潤 (High TIL) 的病患預後較低度 TIL 浸潤 (Low TIL) 的病患預後較佳 (HR=0.62, 95% CI: 0.44-0.89, p=0.008)，本研究顯示 TIL<sup>+</sup>組存活時間較 TIL<sup>-</sup>組長，與 Xie 的研究結一致。根據 Hamada 研究 [21]，TIL 較多的腫瘤有較高比例的 MSI-H、較高量的 Neoantigens，因此我們可以合理預期 TIL 可能會是預測 ICI 對於轉移性大腸直腸癌治療效果的一項重要生物指標。

根據目前文獻研究，發現相較於 pMMR，dMMR 病患年齡較輕，原發部位以右側大腸為主，原發腫瘤較大、腫瘤分化較差 (Mucinous、Signet-ring Phenotype)，預後較佳 [22]。Koopman 的研究特別針對轉移性大腸直腸癌病患 [23]，發現相對於 pMMR，dMMR 病患其原發腫瘤多位於右側大腸，分化較差，對於治療的疾病控制率較差，而整體存活率雖較差，但未達統計差異。本研究 dMMR、pMMR 兩組間的臨床病理特性，不論是性別、年齡、原發腫瘤位置、原發腫瘤大小、淋巴結侵犯、遠端轉移器官、腫瘤分化級別、K-RAS，都沒有統計顯著差異；推測可能與本研究人數偏少，dMMR 組只有 7 人有關。儘管有些研究認為 dMMR 在轉移性大腸直腸癌代表預後較差 [15,23]，而主要原因來自於 dMMR 的病患 BRAF 突變較多 [24]，但是因為本研究沒有檢測 BRAF 突變狀態，故無法做此推論。

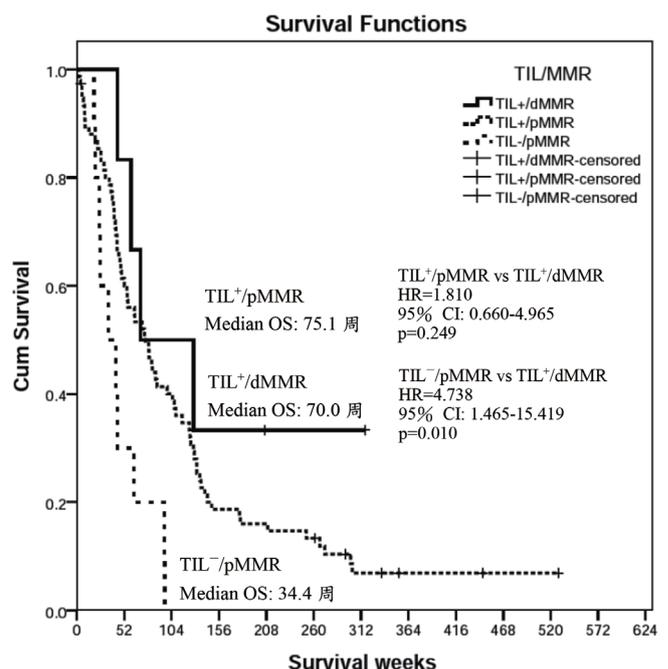
本研究 TC-PDL1<sup>+</sup>、TC-PDL1<sup>-</sup>兩組間的臨床病理特性，TC-PDL1<sup>-</sup>組腫瘤大小較 TC-PDL1<sup>+</sup>組大，達統計顯著差異 (p=0.026)，其餘因子在兩者間都沒有達統計顯著差異。TC-PDL1 的預後價值，不如其預測 ICI 的臨床效果。有些研究認為 TC-PDL1<sup>+</sup> 預後較好 [25]，也有些研究持相反意見，認為 TC-PDL1<sup>+</sup> 預後較差 [26]；有兩個大型的統合分析發現對於所有的實體腫瘤，TC-PDL1<sup>+</sup> 預後較差，然而若是針對大腸直腸癌次族群分析，TC-PDL1<sup>+</sup> 與預後並沒有相關性 [27,28]。本研究雖然發現 TC-PDL1<sup>+</sup> 腫瘤較小，但並沒有發現其與預後有相關性 (p=0.895)。

由以上討論可知，與存活率最相關的因

子 TIL，最佳預測 ICI 效果 dMMR，故本研究根據兩者狀態行交叉比較分析後發現，TIL<sup>+</sup>/dMMR、TIL<sup>+</sup>/pMMR 預後較佳，而 TIL<sup>-</sup>/pMMR 預後較差，達統計顯著差異 (p<0.001) (表六)。雖然 TIL<sup>+</sup>/dMMR 組人數較少，只有 6 個病患，本研究可觀察出 TIL<sup>+</sup>/dMMR 組存活曲線最佳，TIL<sup>+</sup>/pMMR 組次之，TIL<sup>-</sup>/pMMR 組最差 (圖四)。

## 結論與建議

本研究結果顯示，轉移性大腸直腸癌在免疫治療時代裡 3 個重要的生物指標，MMR、TC-PDL1、TIL，彼此之間並不存在相關性；多變數分析中，TIL 是轉移性大腸直腸癌最重要的預後因子，而 MMR、TC-PDL1 與預後並無關連性。儘管已知 dMMR 是轉移性大腸直腸癌預測 ICI 治療效果的生物指標，但是 dMMR 佔轉移性大腸直腸癌比例很低，因此若要提升 ICI 於轉移性大腸直腸癌的應用，則須有更進一步的生物指標研究。本研究 dMMR 病例有比較多的 TIL<sup>+</sup>，因而推論腫瘤微環境 TIL<sup>+</sup> 會是轉移性大腸直腸癌預測 ICI 治療效果的重要生物指標。同時檢驗 MMR、TIL，相信對於 ICI 於大腸直腸癌的應用，會有更深入的認識。建議未來仍需大規模的臨床研究進一步了解腫瘤微環境，探討其他的生物指標於轉移性大腸直腸癌的應用。



圖四 TIL/MMR 合併分析之 Kaplan-Meier 存活曲線

## 參考文獻

1. 衛生福利部國民健康署：中華民國105年癌症登記報告。2018。Retrieved from <https://www.hpa.gov.tw/Pages/Detail.aspx?nodeid=269&pid=10227>
2. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al.: Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine* 2004; 350(23): 2335-2342.
3. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, et al.: Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 360(14): 1408-1417.
4. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al.: Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 2010; 11(8): 753-762.
5. Kyi C, Postow MA: Checkpoint blocking antibodies in cancer immunotherapy. *FEBS Lett* 2014; 588(2): 368-376.
6. Le DT, Uram JN, Wang H, et al.: PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 2015; 372: 2509-2520.
7. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al.: Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015; 373: 23-34.
8. Horn L, Spigel DR, Vokes EE, et al.: Nivolumab versus docetaxel in previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer: two-year outcomes from two randomized, open-label, phase III trials (CheckMate 017 and CheckMate 057). *J Clin Oncol* 2017; 35(35): 3924-3933.
9. Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al.: Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *The Lancet* 2016; 387: 1540-1550.
10. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al.: Overall survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2017; 377(14): 1345-1356.
11. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, et al.: Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015; 348: 124-128.
12. Boland CR, Goel A: Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(6): 2073-2087.
13. Malesci A, Laghi L, Bianchi P, et al.: Reduced likelihood of metastases in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13(13): 3831-3839.
14. Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, et al.: Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology* 2008; 134(4): 988-997.
15. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, et al.: Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin Cancer Res* 2014; 20(20): 5322-5330.
16. Le DT, Durham JN, Smith KN et al.: Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 2017; 357(6349): 409-413.
17. Liu S, Kong P, Wang X et al.: Tumor microenvironment classification based on T-cell infiltration and PD-L1 in patients with mismatch repair-proficient and -deficient colorectal cancer. *Oncol Lett* 2019; 17(2): 2335-2343.
18. Ogino S, Nosho K, Irahara N, et al.: Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res* 2009; 15(20): 6412-6420.
19. Huh JW, Lee JH, Kim HR: Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes for patients with colorectal cancer. *Arch Surg* 2012; 147(4): 366-372.
20. Xie QK, He WZ, Hu WM, et al.: Tumor-infiltrating lymphocyte as a prognostic biomarker in stage IV colorectal cancer should take into account the metastatic status and operation modality. *Cancer Manag Res* 2018; 10: 1365-1375.
21. Hamada T, Soong TR, Masugi Y et al.: TIME (Tumor Immunity in the MicroEnvironment) classification based on tumor CD274 (PD-L1) expression status and tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinomas. *Oncoimmunology* 2018; 7(7): e1442999.
22. Yoon YS, Yu CS, Kim TW, et al.: Mismatch repair status in sporadic colorectal cancer: immunohistochemistry and microsatellite instability analyses. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26(12): 1733-1739.
23. Koopman M, Kortman GA, Mekenkamp L, et al.: Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 100(2): 266-273.

24. Tran B, Kopetz S, Tie J, et al.: Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2011; 117(20): 4623-4632.
25. Droeser RA, Hirt C, Viehl CT, et al.: Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2013; 49(9): 2233-2242.
26. Shi SJ, Wang LJ, Wang GD, et al.: B7-H1 expression is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma and regulates the proliferation and invasion of HCT116 colorectal cancer cells. *PLoS One* 2013; 8(10): e76012.
27. Wang Q, Liu F, Liu L: Prognostic significance of PD-L1 in solid tumor: an updated meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96(18): e6369.
28. Xiang X, Yu PC, Long D, et al.: Prognostic value of PD-L1 expression in patients with primary solid tumors. *Oncotarget* 2018; 9(4): 5058-5072.

# Study on Correlation Among Manifestations and Survival Factors in Patients with Metastatic Colorectal Cancer

Ching-Ming Chang<sup>1</sup>, Pei-Ju Wu<sup>2</sup>, Wei-Chung Hsu<sup>3</sup>

Department of Hematology & Oncology<sup>1</sup>, Pathology<sup>2</sup>, Radiotherapy<sup>3</sup>,  
Chung Kang Branch, Cheng Ching General Hospital

## Abstract

### Purposes

In recent years, the development of immune checkpoint inhibitors has progressed rapidly. Immune checkpoint inhibitors therapy is particularly effective in patients with metastatic colorectal cancer with defective mismatch repair (MMR). In previous cancer studies, the expression level of tumor cell PDL1 (TC-PDL1) has helped to predict the therapeutic effect of immune checkpoint inhibitors; additionally, the number of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) has been found to play an important prognostic role in many cancers. Therefore, the present study aimed to analyze the correlation among immunology-related biomarkers (MMR, TC-PDL1, and TIL) and explore the use of the aforementioned biomarkers in predicting the prognosis of metastatic colorectal cancer.

### Methods

In this study, basic clinical information was collected from 93 patients with metastatic colorectal cancer. Immunohistochemical staining was used to analyze the expression of MMR (MLH-1, MSH-2, MSH-6, and PMS2), TC-PDL1, and TIL in tumor tissue sections. Statistical methods were used for performing correlation and survival analyses based on relevant variables.

### Results

Correlation analysis revealed that there was no correlation between MMR and TC-PDL1, MMR and TIL, or TIL and TC-PDL1, whereas multivariate analysis showed that TIL was the most important prognostic factor for survival.

### Conclusions

Routine detection of MMR, PD-L1, and TIL should be performed, since they play important role in predicting the prognosis of metastatic colorectal cancer. Among these markers, TIL<sup>+</sup> is a factor that indicates better prognosis. It is suggested that future studies should enroll a larger number of patients and randomized controlled prospective studies on immune checkpoint inhibitors should be conducted to further elucidate the important predictive and prognostic factors for metastatic colorectal cancer following immunotherapy. (Cheng Ching Medical Journal 2020; 16(3): 9-22)

**Keywords :** *Metastatic colorectal cancer, Mismatch repair, Cell programmed death-ligand 1, Tumor-infiltrating lymphocytes*