

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 風間 慶祐

横浜市立大学大学院医学研究科 医科学専攻 外科治療学

審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科	免疫学 教授 田村 智彦
副査	横浜市立大学大学院医学研究科	血液・免疫・感染症内科学 教授 中島 秀明
副査	横浜市立大学大学院医学研究科	消化器・腫瘍外科学 准教授 松山 隆生

博士の学位論文審査結果の要旨

Distribution of Regulatory T-Cells and Other Phenotypes of T-Cells in Tumors and Regional Lymph Nodes of Colorectal Cancer Patients

(大腸癌組織と周囲リンパ節における T リンパ球サブセットの解析)

【背景と目的】大腸癌は癌罹患・死因のともに上位を占め、今後更なる治療開発が望まれる。近年、悪性腫瘍進展における抗腫瘍免疫抑制環境の存在が明らかにされ、同機構における制御性 T 細胞の役割が報告されている。また大腸癌を始め多癌腫で、抗腫瘍免疫を治療ターゲットとした免疫チェックポイント阻害薬の有効性が報告されている。既報では、腫瘍局所の免疫抑制環境を構成する T 細胞集団の解析を主とした研究が殆どであり、周囲リンパ節を含めた包括的な解析は大腸癌に関して未だ報告がない。リンパ節転移は大腸癌の重要な癌進展経路であり、同部の抗腫瘍免疫抑制環境の解析は、今後の治療開発に繋がる可能性がある。そこで今回我々は、大腸癌手術検体を用いて、腫瘍と周囲リンパ節における T 細胞のサブセットを解析した。

【対象と方法】2016年から2018年に、神奈川県立がんセンターにおいて、初回治療としてリンパ節郭清を伴う原発巣切除術を施行した大腸癌症例 50 例とした。検体摘出後速やかに腫瘍組織、近接正常粘膜組織、各所属リンパ節(1群・2群・3群)、非所属リンパ節(腫瘍から10cm以上離れた傍腸管リンパ節)を採取し、フローサイトメトリーを用いて各組織中に存在する制御性 T 細胞、各免疫チェックポイント分子を発現する T 細胞、インターフェロン γ 産生 T 細胞の頻度を測定した。

【結果】腫瘍は正常粘膜組織と比し、制御性 T 細胞比率が高く、免疫活性を有するインターフェロン γ 産生 CD4 陽性 T 細胞が低率であった。また、各所属リンパ節において、1群リンパ節における制御性 T 細胞の比率は2群、3群、非所属リンパ節中よりも高値である一方で、インターフェロン γ 産生 CD4 または CD8 陽性 T 細胞は、1群リンパ節において、中枢リンパ節や非所属リンパ節と比し、有意に低比率であった。さらに、Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, CD278, CD134 分子を発現する T 細胞比率に関して、正常組織に比し腫瘍において、また、中枢リンパ節や非所属リンパ節に比し1群リンパ節における T 細胞において高比率であった。

【考察】大腸癌において、腫瘍局所と同様に所属リンパ節において抗腫瘍免疫抑制機構の存在が示され、免疫抑制強度に順列が存在する可能性が示唆された。同環境において、制御性 T 細胞や CTLA-4 による免疫抑制作用が、共刺激分子による免疫賦活を上回り作用している機序が考察された。

本学位審査会は2021年2月5日に、田村 智彦教授（主査）、中島 秀明教授（副査）、松山 隆生准教授（副査）により行われた。
上記論文の概要説明の後、各審査員から以下の質疑応答が行われた。

副査の松山 隆生准教授の質疑に対し、以下の回答がなされた。

1. 摘出したリンパ節への転移の有無により、T細胞比率の差は存在したか
今回論文に記載はしていないが、転移リンパ節と非転移リンパ節における制御性T細胞やインターフェロン γ 産生T細胞の頻度の相違を検討した。結果、転移リンパ節と非転移リンパ節間で、上記T細胞集団の頻度に差は認められなかった。転移リンパ節の数自体が非常に少なかったため、有意差に至らなかった可能性はある。
2. 1群リンパ節転移陽性例は、2群3群リンパ節の制御性T細胞頻度が高い傾向や、病期の進行によるT細胞分布の特徴などはあるのか
患者背景として、性別、腫瘍局在（左右）、臨床病期に関して、因子の違いによるT細胞分布の相違を検討した。結果、性別や局在による分布の相違は認められなかったが、病期が進行している症例では、より腫瘍から離れたリンパ節まで、制御性T細胞頻度が上昇している傾向が認められた。
3. 今回の研究内容から見える、リンパ組織への大腸癌進展機序のイメージはどのようなものか
大腸癌は、原発巣からの距離に依存する何らかの因子により、周囲リンパ組織の免疫抑制環境を構築・整備しながら、同部への進展を来すという考察をしている。

副査の中島 秀明教授の質疑に対し、以下の回答がなされた。

1. 腫瘍と各領域のリンパ節間におけるT細胞集団頻度のトレンドは存在したか
全てのT細胞について検討を行っている訳ではないが、腫瘍と各群リンパ節における制御性T細胞の比率の相関の有無について、spearmanの順位相関係数を測定して検討している。その結果、腫瘍組織と各群リンパ節における制御性T細胞の頻度に、いずれも相関は認められなかった。このことから、リンパ組織における免疫抑制機構は、腫瘍におけるそれとは別の機序により形成される可能性が考察される。
2. 個々の症例において、各組織のT細胞分布で何か特徴的なトレンドを有する症例、もしくは外れた挙動を示す症例はあったか
今回は50例の結果全てをまとめて解析しており、個々の症例毎のトレンドの確認はできていない。
3. 今回の研究は、リンパ節の抗腫瘍免疫抑制の強度は腫瘍からの距離に依存するという考察がなされているが、恐らく考察通りではない挙動を示す症例があると思われる。今後はこのような点について、臨床病理学的因子と絡めた検討を

行くと、興味深い知見が得られるのではないか

今回の論文では、臨床病理学的因子と絡めた解析は記載していない。ご指摘頂いた部分に関して、今後追加検討として各組織の T 細胞分布を個別に確認し、今後新たな知見が得られればと考えている。

4. 論文査読者からは、どのような質問を受け、どのように回答したか

「今回の考察は制御性 T 細胞などによる免疫抑制により、インターフェロン γ 産生 T 細胞頻度が低下するというものであるが、なぜ腫瘍のインターフェロン γ 産生 CD8T 細胞では、正常粘膜と頻度差が見られなかったのか」との質問があった。腸内正常細菌叢の中に、粘膜における CD8T 細胞のインターフェロン γ 産生を促す種の存在が報告されている。したがってリンパ節における結果とは異なり、腫瘍と正常粘膜組織間においてインターフェロン γ 産生 CD8T 細胞の比に差が認められなかったと考える、と回答した。

5. 抗腫瘍効果を有するサイトカインとしてインターフェロン γ を測定しているが、他にも測定・検討に値する因子はあるか

ご指摘の通り、インターフェロン γ は強力な炎症作用を有する一方で特異性は低いとされる。インターロイキン-1、-6、Tumour Necrosis factor (TNF) - α は抗腫瘍作用を助長する炎症性サイトカインであり、測定・検討に値すると考えている。また抗炎症サイトカインである IL-10 についても、抗腫瘍免疫抑制作用が報告されており、測定・検討に値すると考えている。

6. 今回の検討において、制御性 T 細胞の頻度差は腫瘍と正常粘膜組織間で約 5% 程度と少なく感じるが、それが予後に影響する程の差であるのか

既報においてどの程度の頻度差が予後に影響するか、正確な数字に関しては確認調査出来ていない。しかしながら正常組織中の制御性 T 細胞頻度 5% 程度と報告されるため、増加率としては大きいものと考えられる。

最後に主査の田村 智彦教授の質疑に対し、以下の回答がなされた。

1. 大腸癌患者において、制御性 T 細胞は、どこで発生し個体内でどのような移動をすると考えるのか

胸腺で生まれ、分化する内在性制御性 T 細胞と、胸腺の新生 T 細胞が末梢組織に移動し、同部で抗原刺激により分化する末梢性制御性 T 細胞に分かれる。末梢性制御性 T 細胞が生まれるのは、末梢のリンパ節である。

2. 今回の検討では、それにあたる組織は何と考えるか。またその後に生体内においてどのような挙動をするのか

腸管に最も近い末梢リンパ節、すなわち 1 群リンパ節と考える。その後、2 群・3 群リンパ節に移動、もしくは何らかの因子により 2 群・3 群リンパ節における制御性リンパ節の分化を促進させると考えている。

3. 制御性 T 細胞の分化を促す因子として、既報ではどのようなものがあるのか

間質における Transforming Growth Factor (TGF)- β や、Cyclin depending

Kinase (CDK)8 阻害因子が報告されている。

4. 教科書的には、所属リンパ節において分化した制御性 T 細胞が、リンパ流を介し血流に乗り、最終的に腫瘍局所に戻るとされる。ある意味、今回の研究において、1 群・2 群・3 群リンパ節の順に免疫抑制機能を有する細胞群が減少するのは、ごく自然な現象を観察した結果ともいえるが、大腸癌患者における生体内での免疫抑制細胞のダイナミクスを実際に観察している研究はあまり例がないとすれば、一層価値のある研究内容と考える。上記3のように、その事象をもたらす因子は何か、という部分まで focus した研究デザインを行えば、さらに新しい知見にたどり着いた可能性がある。また生体の免疫応答の相違をもたらす腫瘍の性質 (RAS・BRAF 変異の有無、MSI status など) の検討も興味深い。観察された事象に対する理由を、常に考える姿勢が重要である
今回主査副査の先生方に頂いた助言をもとに、今後 1 例 1 例の所見を再度確認し、臨床病理学的因子などと絡めた検討や考察を行い、本研究の結果に対する造詣を更に深めていきたいと考える。

上記発表、質疑応答の結果、審査委員一致の結論として、申請者は、横浜市立大学医学博士号（甲号）の授与に十分値する研究成果を示したものと判断された。