

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 今井 雄一

横浜市立大学大学院医学研究科 生殖生育病態医学

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 横浜市立大学附属病院 病理診断科 准教授 山中 正二

Expression of multiple immune checkpoint molecules on T cells in malignant ascites from epithelial ovarian carcinoma

(上皮性卵巣癌腹水中の T 細胞における免疫チェックポイント分子の発現)

まずは、申請者より以下のような学位研究の要旨についての説明が行われた。

免疫チェックポイント分子は、さまざまな癌種において宿主の T 細胞に発現することが知られている。宿主の T 細胞に免疫チェックポイント分子が発現すると、最終的に腫瘍細胞が宿主免疫からの逃避機構を獲得し、腫瘍に対する治療抵抗性の原因となることも知られている。今日の免疫チェックポイント分子阻害薬は、このような腫瘍細胞による免疫逃避機構を選択的に解除することで抗腫瘍効果を発揮する薬剤として、さまざまな癌種に対する抗腫瘍効果が示されつつあり、悪性腫瘍治療に対する免疫療法の分野においては新たな治療選択肢として期待されている。卵巣癌は、本邦において年間 10,000 人以上が罹患し、そのおよそ半数が死亡する予後不良の婦人科悪性腫瘍である。手術療法および全身化学療法による集学的治療が実際に施行されているが、罹患数、死亡数ともにいまだ増加傾向にある。治療成績の向上を目的とした免疫チェックポイント分子阻害薬の併用も試みられているが、現時点での治療効果はあくまで限定的である。免疫チェックポイント分子阻害薬の抗腫瘍効果を推測するためのバイオマーカーとして、卵巣癌を除くいくつかの癌種では、宿主の T 細胞に発現した免疫チェックポイント分子と治療効果、あるいは予後との相関が報告されている。一方、卵巣癌では免疫チェックポイント分子の発現と予後との関連性については一定の見解が示されていない。また、卵巣癌では癌性腹膜炎を併発しやすいが、その際に貯留した腹水を用いて腫瘍微小免疫環境を評価した報告はこれまでにない。本研究では、免疫細胞、腫瘍細胞をともに含有し、卵巣癌の病勢を反映するとされる癌性腹水を解析することにより、上皮性卵巣癌の腫瘍微小免疫環境を評価すること、臨床的バイオマーカーや予後との相関を評価することを目的とした。

そこで、埼玉医科大学国際医療センター臨床倫理委員会承認を受け（承認番号 13-092）、上皮性卵巣癌 54 例の癌性腹水を用いて、腫瘍微小免疫環境を評価した。まず、腹水中の CD4 陽性 T 細胞または CD8 陽性 T 細胞における免疫チェックポイント分子の発現状況を解析した。免疫チェックポイント分子として、PD-1 (programmed cell death protein-1)、LAG-3 (lymphocyte-activation gene-3)、TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3)、BTLA (B and T lymphocyte attenuator) の 4 種類を選択し、マルチカラーフローサイトメトリーによりその発現状況を評価した。次いで、腹水中の腫瘍細胞に発現している、PD-1 のリガンドである PD-L1 (programmed cell death ligand-1) および PD-L2 (programmed cell death ligand-2)、TIM-3 のリガンドであるガレクチン-9 の発現状況につい

でも、それぞれ評価した。さらに、腹水中のサイトカインおよびケモカインについても解析を追加した。そして、これらの結果と、進行期、組織型、予後等の臨床的バイオマーカーとを対比した。

上皮性卵巣癌腹水中の CD4 陽性 T 細胞では、PD-1 が 65.8%，LAG-3 が 10.6%，TIM-3 が 4.3%，BTLA が 37.6% に発現していた。また、CD8 陽性 T 細胞では、PD-1 が 57.7%，LAG-3 が 5.0%，TIM-3 が 4.9%，BTLA が 15.7% に発現していた。PD-1，LAG-3，BTLA は、CD8 陽性 T 細胞と比較して CD4 陽性 T 細胞で有意に高発現していた。また、39 例（72.2%）の CD4 陽性 T 細胞、37 例（68.5%）の CD8 陽性 T 細胞で、それぞれ複数の免疫チェックポイント分子が高発現していた。CD4 陽性 T 細胞における PD-1 発現と腫瘍細胞における PD-L1 発現、CD8 陽性 T 細胞における TIM-3 発現とガレクチン-9 濃度とは、それぞれ相関関係が示された。複数の免疫チェックポイント分子が CD8 陽性 T 細胞で高発現している症例では、サイトカインである TNF- α および IL-6 が有意に低下していた。一方で、免疫チェックポイント分子の発現と臨床的バイオマーカーとの相関関係に明らかなものではなく、複数の免疫チェックポイント分子の発現は、進行期や組織型に関わらず認められた。

上皮性卵巣癌腹水中の T 細胞にはさまざまな免疫チェックポイント分子が発現しており、さらにおよそ 70% の症例では複数の免疫チェックポイント分子が高発現していた。このように複数の免疫チェックポイント分子が発現している症例では、有意に炎症性サイトカインが抑制されていた。一方で、免疫チェックポイント分子の発現と、進行期や組織型等の臨床的バイオマーカーとの相関ははっきりしなかった。これは、複数の免疫チェックポイント分子阻害薬を用いた多剤併用免疫療法により、卵巣癌の病勢を制御できる可能性を示唆する結果であった。また、免疫チェックポイント分子阻害薬が、進行期や組織型に関わらず、上皮性卵巣癌全般に対して抗腫瘍効果を発揮する可能性を示唆する結果でもあった。この結果は、引き続きバイオマーカーの検索が必要であることを示しており、臨床応用に向けての新たな課題が明らかとなった。

続いて質疑応答が行われた。

副査である山中正二准教授との質疑応答は以下のものであった。

質疑

1. 免疫チェックポイント分子の定義とは何か。
2. CD4 陽性 T 細胞に免疫チェックポイント分子が発現しているということにどのような意味があるか。
3. 腹水中で腫瘍細胞周囲に炎症細胞が集積しているとのことであったが、これはセルブロック処理した結果であって生体内でも同様の環境になっているのか。
4. 本研究の発案の経緯は何か。

回答

1. 免疫チェックポイント分子は、生体内での免疫恒常性を保つために過剰な免疫反応を抑制

する分子で、本来は T 細胞の過剰な活性化や自己免疫反応を抑制するために存在している。ナイーブ T 細胞には発現しておらず、抗原提示を受け T 細胞が活性化することで発現が誘導される。悪性腫瘍においては、抗原提示細胞の MHC に提示されたがん抗原を T 細胞受容体が認識し、T 細胞が活性化されることによって初めて発現するものである。本研究で解析した PD-1, LAG-3, TIM-3, BTLA はいずれも抑制性の免疫チェックポイント分子であり、これらの発現とリガンドの結合によって、抗腫瘍免疫応答が抑制されることが知られている。

2. CD4 陽性 T 細胞は、T 細胞受容体がん抗原を認識することで活性化し、NK 細胞、マクロファージ、CD8 陽性 T 細胞等による細胞性免疫の促進を誘導する。CD4 陽性 T 細胞に免疫チェックポイント分子が発現しているということは、MHC クラス II を通じて樹状細胞等による悪性腫瘍の抗原提示を受け免疫メカニズムが作動している、かつ抗腫瘍免疫応答が抑制された環境に陥っている可能性が推察される。
3. 開腹手術時に腹水を全量採取して検体として使用している。細胞密度は濃縮されているが、免疫細胞と腫瘍細胞との比率、T 細胞における免疫チェックポイント分子の発現率等に関しては生体内の環境と同等である。
4. 卵巣癌に対する現行の化学療法には限界があり、今後は免疫チェックポイント分子阻害薬が併用される可能性が高い。一方で、免疫チェックポイント分子阻害薬を用いた治験や臨床試験の場合、多額の研究費用の問題、薬剤による重篤な有害事象等の可能性があり、現時点では実現可能性が低い。そこで、腹水を用いたバイオマーカー研究として本研究を考案した。腹水を選択した理由としては、腫瘍が産生し、かつ腹腔内で直接接触しているという点で、免疫環境が類似している可能性が高いこと、液状検体のため腫瘍では難しい定量的評価が可能であること、特に手術時であれば採取が容易であること等を考慮した。

副査である中島秀明教授との質疑応答は以下のものであった。

質疑

1. T 細胞に発現している免疫チェックポイント分子はどのようなメカニズムで制御されているのか。
2. 末梢血における免疫チェックポイント分子の発現はあるのか。
3. この研究の将来的な展望はどのようなものか。
4. 免疫チェックポイント分子の発現が確認された症例に免疫チェックポイント阻害薬を使用して効果を見るのが最も簡単な方法のように思える。それは可能か。

また以下のようなコメントがあった。

- 腹水は、末梢血よりも腫瘍組織に近く、侵襲が少なく採取できるという特徴がある。本研究の最大の強みはその腹水を用いているということで将来性も感じる。目的が明確に表現できるとさらに良かった。

回答

1. 免疫チェックポイント分子には過剰な免疫反応を抑える役割があるが、その反応を利用した腫瘍細胞の免疫抑制機構が明らかになっている。腫瘍浸潤 CD8 陽性 T 細胞に対し、腫瘍は免疫チェックポイント分子のリガンドを発現させることで直接的な免疫抑制機構に寄与する。また、間接的には腫瘍随伴マクロファージや骨髄由来免疫抑制細胞の形成を促進し腫瘍微小環境に取り入れることで、免疫応答を回避する機構も報告されている。
2. 他癌種では、末梢血の T 細胞における免疫チェックポイント分子の発現についての報告が存在する。末梢血の T 細胞で免疫チェックポイント分子が発現している症例の予後は良好であるという報告もある。一方で、末梢血と腫瘍組織とで免疫チェックポイント分子の発現に関連性があるかどうか言及した報告はない。また、卵巣癌に限ると、末梢血の T 細胞における免疫チェックポイント分子の発現についての報告はない。
3. 本研究は、腹水における免疫チェックポイント分子の発現、その他腫瘍微小免疫環境の評価を行ったが、腫瘍組織、末梢血での免疫環境は調べられていない。今後の展望としては、腹水、腫瘍組織、末梢血における免疫環境を総合的に評価することで、腹水貯留を伴うような進行卵巣癌の免疫メカニズムの解明をはかりたい。そのためには症例数を増やす必要があり、多施設共同研究ができれば良いと考えている。
4. すでに実用化されている免疫チェックポイント分子阻害薬も複数あるが、卵巣癌にはいずれも保険適応がされていない。薬剤を投与する場合は企業にバックアップしてもらい、または高額な研究費を捻出して臨床研究を行う必要があるが、実現可能性は決して高くない。

主査である田村智彦教授との質疑応答は以下のものであった。

質疑

1. 治療奏効に差がないと記載されているが、生存曲線等が示されていない。
2. I 期症例の腹水はどのようにして採取したのか。腹膜播種があっても I 期と分類されるのか。
3. CD8 陽性 T 細胞に複数の免疫チェックポイント分子が発現している症例で TNF- α と IL-6 が抑えられていることのメカニズムをどう考察するか。

また以下のようなコメントがあった。

- 大変貴重な臨床検体を用いた意義深い解析結果である。一方で、全体を通じて現象論にとどまっている。既存の免疫学的知見を十分に理解した上で、得られたデータの背後にある分子メカニズムについての考察を深めていけばさらによかった。考察に基づく仮説を立て、それを検証する次の展開につなげていってこそ、最終的に新たな病態理解や診断・治療法開発につながるのではないかと。「何故このようなことが起きているのか」を常に考える姿勢が大切である。
- 正常組織や良性疾患をコントロールとしていないので、結果が何を示唆しているのか分かりにくい部分がある。
- 腫瘍免疫に関する知見は日進月歩なので、他癌種の情報等も取り入れながら、研究や診療に活かして欲しい。

回答

1. 治療奏効率や病勢制御率を算出し、Kaplan-Meier 法での生存曲線を描出したが、いずれも群間比較での有意差や傾向が認められず、学位研究報告書では記載を省略した。記載に関しては紛らわしい箇所を修正する。
2. 卵巣癌では I 期症例においても癌性腹水を伴うことがある。本研究では全例に開腹手術を施行しているので、少量であっても腹水採取が可能であった。含有される免疫細胞や腫瘍細胞の絶対数は少ない症例もあったが、免疫細胞や腫瘍細胞について評価可能な症例は本研究のデータとして含めた。一般的には、開腹手術を施行しない場合でも、ダグラス窩穿刺等により腹水を採取することが可能である。
3. CD8 陽性 T 細胞に複数の免疫チェックポイント分子が発現している症例では、腫瘍細胞における免疫チェックポイント分子のリガンド発現、あるいは抗原提示細胞における腫瘍組織適合性抗原複合体発現が起きやすい状況で、CD8 陽性 T 細胞による抗腫瘍免疫応答が抑制された状況であることが推測される。TNF- α および IL-6 は、T 細胞をはじめとした多数の免疫細胞により産生されるサイトカインであり、それらの低下は腫瘍細胞により構築された免疫抑制環境を反映している可能性がある。

本研究では、卵巣癌腹水中の T 細胞に発現した免疫チェックポイント分子についての解析を行い、腫瘍細胞における免疫チェックポイント分子のリガンド発現や、腹水中のサイトカインについても評価を加えていた。多くの結果はネガティブデータであったが、それを研究論文として公表できたことは評価に値した。一方、個々の事象を免疫メカニズムに当てはめた考察が十分に深まっていないことは問題点として挙げられ、結果の一部に統計学的有意差は認めつつも、全体として現象論にとどまる印象は拭えなかった。また、研究デザインにおいては、正常組織や良性腫瘍をコントロールとしていないため、悪性腫瘍ゆえに起こる特異的事象か否かの評価が不可能で、議論を深めることができなかった。

これら問題点はあるものの、卵巣癌の腹水に注目した研究テーマには十分な新規性があり、研究デザインに改善を加えることによって今後の発展が十分に期待されるテーマであった。学位論文、研究報告書等も大変よく記載されていた。審査員による協議の結果、博士（医学）の学位授与に値すると判断した。