

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 508 号	学位申請者	下之菌 将貴
審査委員	主査	古川 龍彦	学位
	副査	池田 正徳	副査
	副査	郡山 千早	副査
			佐藤 雅美

主査および副査の5名は、平成31年1月24日、学位申請者 下之菌 将貴 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) mRNA の発現解析で末梢血単核球成分を用いているが、血中の HHLA2 の発現は何を観察しているのか。

回答) 血中 HHLA2 の発現は、末梢血の抗原提示細胞やリンパ球における HHLA2 の発現を観察していると考えられる。

質問2) 血中免疫組織と胃癌組織、異なる組織において、HHLA2 の発現が相関関係を示すのはなぜか。

回答) 血中 HHLA2 の発現レベルは全身的な免疫状態を反映していると考えられる。一方、正常胃粘膜でも高い HHLA2 の発現を有していることは、正常の胃粘膜上皮は抗原に対する免疫応答機構を保持していることを示唆している。原発胃癌組織での HHLA2 の発現が血中 HHLA2 の発現レベルと比例することは、進行胃癌において、胃癌組織と免疫細胞における HHLA2 の発現をどちらも抑制するメカニズムが働いているのではないかと推察する。

質問3) 正常消化管での免疫制御は抑制的に働いていることが多いが、HHLA2 は免疫促進的な作用が強いのか。抑制的な作用が強いのではないのか。

回答) HHLA2 の受容体のうち、免疫促進的な受容体である TMIGD2 はナイーブ T 細胞上に主に発現し、抗原提示を受けた T 細胞では TMIGD2 の発現は失われ、免疫抑制的な未知の受容体が主となる。胃粘膜組織は外来抗原に反応して免疫を活性化する一方で、末梢組織に浸潤するリンパ球は活性化 T 細胞が主であることを考えると、過剰な免疫応答を抑制するための作用も同時に強く働いていると考えられる。

質問4) HHLA2 の発現低下に伴って、その他の免疫抑制分子 (PD-L1 など) の発現が上がってくるということは考えられるのか。

回答) 今回、PD-L1 の発現レベルの解析は行っていないが、PD-L1 分子の血液検体における高発現は予後不良と関連することが以前の研究で示されており、HHLA2 と PD-L1 の発現が逆相関を示す可能性は高いと考えられる。

質問5) 健常者群の年齢分布はどのようであったか。加齢に伴って HHLA2 の発現が低下することは考えられるか。

回答) 健常者群の年齢分布は 20-40 歳代で比較的若年層であった。加齢に伴う免疫力の低下が HHLA2 の発現レベルに関連する可能性は考えられる。

質問6) HHLA2 の血中 mRNA 発現レベルと血清 CEA 値、血清 CA19-9 値の実際の測定値に相関関係はあったか。

回答) 解析の結果、両者に相関関係は認められなかった。

質問7) 癌細胞株での mRNA の発現で、発現の高い細胞株が見られることについてどのように解釈するか。

回答) 全単核球成分のうち HHLA2 を発現しているのは単球、マクロファージが主である。一方で、本研究の結果からは胃癌細胞株における HHLA2 の発現は低いことが予想される。癌細胞株は一様な発現を有しているため、癌細胞株での発現が低いものであっても、mRNA 発現レベルは血液検体に比べて高くなると考えられる。HHLA2 mRNA の発現レベルが他の細胞株よりも高かった細胞株について、その発現レベルを評価するには、正常胃粘膜や胃癌組織から抽出した RNA における発現レベルとの比較を行う必要がある。

質問8) 多変量解析の解析因子を選ぶ際に、因子同士の共線性を検討したか。

回答) 多変量解析では、単変量解析で予後因子となった因子全てを用いて多変量解析を行ったため、共線性の評価は行っていない。

質問9) 治療後の患者では、HHLA2 の発現はどうか。

回答) 今回、治療前後での HHLA2 発現の推移は観察できていない。血中バイオマーカーとして利用できる利点は、検査の簡便性や反復が容易であることが挙げられる。HHLA2 の発現が、治療効果に応じて変化するかどうか、治療効果の予測因子として利用可能かどうかは今後検討が必要である。

質問10) HHLA2 の発現の分布はどのようになっているか。正常組織での生理的な役割は何か。

回答) 正常組織においては、胎盤の絨毛細胞、腸管、腎臓、胆嚢、乳腺、膵管の上皮細胞で高い発現が認められたと報告がある。HHLA2 が T 細胞上

の2つの受容体、TMIGD2および未定義の受容体との結合により、それぞれ免疫を活性化または抑制するメカニズムを誘導しており、外来抗原に対する免疫機構を担っていると考えられる。

質問 11) 発現レベルに人種差の報告はあるか。 回答) 人種間での発現の差異は過去に検討がない。

質問 12) HHLA2 の発現レベルと末梢血のリンパ球数などとの関連、また胃癌組織における浸潤リンパ球などとの関連は見られたか。

回答) HHLA2 血中発現レベルと末梢血リンパ球数および好中球リンパ球比は相関を示した。組織浸潤リンパ球数は癌の予後との関連が報告されているが、今回は検討できていない。組織浸潤リンパ球数を含め、免疫染色で CD8 陽性細胞や FOXP3 など制御性 T 細胞の分画が HHLA2 の発現レベルとどのように関連するか今後検討したい。

質問 13) 胃癌組織における PD-L1 の発現は免疫染色で検討したか。 回答) PDL-1 の免疫染色は行っていない。

質問 14) HHLA2 を強発現させる実験系は行われたか。

回答) 今回、強発現系の実験は行っていない。In vitro での実験は免疫環境の再現が難しいが、臨床検体を用いた癌細胞組織と免疫細胞の共培養は一つの手段と考えられる。また、HHLA2 の発現レベルは遠隔転移や深達度と有意に関連したため、HHLA2 自体が腫瘍の浸潤能や遊走能に関連するかどうかも検討する必要があると考える。In vivo での実験については、HHLA2 は Mouse、Rat では発現がみられない分子であるため、Xenograft を用いた抗腫瘍効果の検討などは難しいかと考える。

質問 15) 臓器特異的な作用があるとすれば、Splicing variant は重要な意味を持つと考えられるが、Splicing Variant の報告はあるか。

回答) Splicing variant は 5 つの報告があるが、今回は Total HHLA2 の発現解析のみで、Variant についての発現解析は行っていない。

質問 16) 免疫治療のターゲットとなり得るか。

回答) HHLA2 および TMIGD2、未知の免疫抑制的受容体を含めた免疫制御機構は治療のターゲットとなる可能性を持っていると考える。免疫抑制的な受容体に関しては、抗体療法の良いターゲットとなり得る。また、免疫促進的な受容体に関しては、キメラ抗原受容体(CAR)などの技術も注目されてきており、同じく免疫促進的な作用をもつ CD28 は CAR のターゲットとして臨床試験も行われ、T 細胞の抗腫瘍免疫を増強したとの報告もある。未定義の受容体の同定が期待されると同時に、HHLA2 および両受容体の癌組織における発現レベルや発現意義がさらに検討される必要がある。

質問 17) Table 1 で、HHLA2 の発現と T 因子との関連についての p 値が論文と発表スライドで異なる。

回答) 発表スライドが間違っており、論文が正しいデータである。

質問 18) 単球の分画について解析が行われたか。 回答) 単球分画についての解析は行っていない。

質問 19) 胃癌組織での HHLA2 免疫染色の結果と臨床病理学的因子や予後との相関を評価したか。

回答) 今回の対象症例となった 73 例は早期癌を多く含んでおり、死亡例が少なく、予後の解析はできなかった。また、臨床病理学的因子との関連については、いずれの項目についても有意な相関は認められなかった。これについては症例数が少ないことや症例の偏りが原因となっている可能性がある。

質問 20) HHLA2 は細胞膜上で作用する分子と考えられるが、免疫染色で細胞質でも強発現していることについてどう考えるか。

回答) HHLA2 の発現が細胞膜上および細胞質に見られることについては、過去の他の臓器での免疫染色における発現分布と一致しており、細胞質と細胞膜上で移行性があるものと考えられる。

質問 21) 末梢組織における単球やリンパ球での HHLA2 の発現については解析したか。

回答) 今回は胃癌細胞における HHLA2 の発現のみで評価を行っており、免疫細胞での発現レベルについては評価していない。

質問 22) 他の臓器との間で HHLA2 の発現レベルと予後の関係に差があることは HHLA2 の 2 面的な機能性によって説明できるのか。

回答) 臓器によって HHLA2 の発現と予後の関連が異なることは、癌免疫においてそれぞれの受容体との親和性が異なる可能性も考えられるが、本研究の結果では、胃癌の HHLA2 発現自体が進行癌で低下していたため、癌細胞における HHLA2 の発現が臓器によって異なるのではないかと考える。また、手技的な問題としては、それぞれの報告で抗体が異なり、評価方法が染色強度による評価が多いため、基準が一定でない可能性がある。

質問 23) HHLA2 mRNA の発現について Database を用いた *in silico* 解析は行ったか。

回答) TCGA Database を用いて予後解析を行ったが、HHLA2 の発現レベルと予後との相関は認められなかった。

質問 24) HHLA2 の発現制御はどのようになされているか。

回答) HHLA2 のマクロファージや樹状細胞における発現は、LPS や PolyIC、IFN γ によって誘導されることが報告されており、免疫反応に伴ってその発現が刺激されていると考えられるが、詳細な分子機序は明らかでない。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。