

## 最終試験の結果の要旨

報 告 番 号	総 研 第	571 号	学位申請者	南 幸次
審 査 委 員	主 査	井戸 章雄	学 位	博士 (医学)
	副 査	原 博満	副 査	古川 龍彦
	副 査	橋口 照人	副 査	武田 泰生

主査および副査の5名は、令和2年6月29日、学位申請者 南 幸次君に面接し、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) CD68はM1マクロファージ、汎マクロファージ、どちらのマーカーとして検討しているか。CD68とCD163で陽性細胞数に差はなかったか。CD68の方が多いということはないか。

(回答) M1マクロファージのマーカーとして使用した。CD68陽性の方が多いということもなかった。

質問2) 他のHCCとTAMの研究ではM2が多いとの報告があるが、本研究結果との差異をどう考えるか。

(回答) 肝臓の背景炎症の違い(ウイルス性肝炎、自己免疫性肝炎など)やゲノム変異の違いなどが関係するのではないかと考えている。

質問3) TAMをターゲットにした(癌免疫)治療法は現在どのような状況か。

(回答) c-fms/FLT3 チロシンキナーゼ阻害剤などはTAMへの作用を示し治療薬の可能性のある薬剤として報告されている。また、mTORC-FOXK1-CCL12経路の阻害による創薬の可能性の報告がある。

質問4) CD68、CD163 発現がないHCCは存在したか。

(回答) 本研究の検討では発現の程度に差はあるが、全てのケースでCD68、CD163の発現は認めた。

質問5) M2マクロファージは、慢性炎症、発癌とどの様に関連しているか。

(回答) M2マクロファージは一般的に抗炎症や組織修復作用を示す。慢性炎症でも組織修復に働くような状態では抗炎症作用を示すM2マクロファージが増加する。発癌に対しては組織修復や血管新生作用を示すことで発癌(癌の進展)を促進する働きを示す。

質問6) 肝炎ウイルス感染の有無でTAMの違いはあったか。また、腫瘍部と腫瘍辺縁部での違いは認めたか。

(回答) 肝炎ウイルスの有無では検討していない。腫瘍部と辺縁部でのTAMの発現に違いは認めなかった。

質問7) 今回HCCの遺伝子変異の背景としてはどうか。RASの変異が多いのか。

(回答) 今回遺伝子発現までの検討は行っていない。HCCの1.3%にRAS変異が認められたとの報告がある。

質問8) 葉酸レセプター(以下FRβ)に関して、CD163との染色パターンと違いはみられたか。

(回答) FRβは染色度合いが低く、また染色を認めない症例もあり陽性の頻度に差があると思われる。

質問9) CD163/68比(cut off=1)の検討で1未満群の症例数は何例だったか。

(回答) カットオフ1未満の症例数は16例であった。

質問10) TAMではM1、M2スイッチングの話題もあるが、今回TAMマーカーとしてのFRβでは相関が無い。癌のステージ進行に伴うマクロファージ分化の変化などはあるか。

(回答) 近年の知見ではM1-TAMやM2-TAMという概念や、癌種によってはM2発現と悪性度の逆相関の報告もあるなど、マクロファージやTAMの多様性が存在すると考えられ、進行による変化の可能性はある。

## 最終試験の結果の要旨

質問 1 1) CD163/68 比を用いた予後比較の意義は何か。

(回答) 発現タンパクだけでなく比を取ることで、その発現パターンの違い (CD68 優位か、CD163 優位か) で何が悪性度や予後に関連するのか、どのような群が予後不良か、という知見が得られ、今後それらを標的にした治療開発への道筋が得られると考える。

質問 1 2) CD163/68 比の検討で RFS は差がなく OS で差があるが、それはなぜか。

(回答) 同一ケースでも初発・再発で悪性度や分化度の変化をきたす可能性が考えられる。今回は初発切除組織検体を用いた評価であるので、再発例で検討した場合、発現比の変化などがある可能性があり、今後の研究課題の一つと思われる。

質問 1 3) 今回、非特異的 IgG 抗体を用いる等の陰性コントロールをおいたか。また CD68、CD163、FR $\beta$  の 2 つあるいは 3 つ共発現しているかの確認はしたか。

(回答) 今回、陰性コントロールは用いていない。2 重染色などでの共発現の確認は実施していない。

質問 1 4) CD68 染色の観察で Kupffer 細胞を含んでいる可能性はあるか。

(回答) 一般的に HCC 内では Kupffer 細胞は減少を示すことが多いが無存在ではなく、また Kupffer 細胞は CD68 陽性を示すので CD68 陽性細胞の中に Kupffer 細胞を含む可能性は考えられる。

質問 1 5) monocytes が癌組織に集まるときの初期の主な mediator は何か。

(回答) M-CSF などが分化を促進し、IL-4 や IL-13 などが M2 への分化を促進する。

質問 1 6) TAMs が M1、M2 に限らず、多様性のある heterogenous なものであり環境因子にドライブされる可能性を述べているがどのような因子が考えられるか。

(回答) 具体的な環境因子の断定は困難であるが、IL-4 や STAT6、また酸化ストレスなどの関与で M1、M2 の相互の形質転換が起こることが報告されている。

質問 1 7) 背景肝 (肝硬変、慢性肝炎、炎症の存在しないもの) で、発現細胞数に差は出るか。

(回答) 今回の背景肝は肝炎ウイルス存在のものが多く、背景肝の分類による検討は実施していない。

質問 1 8) M2 マクロファージは増殖因子や血管新生因子を分泌すると思うが、その結果として細胞増殖 (Ki-67) や新生血管のカウントはしていないか。

(回答) 今回、その検討は実施していない。

質問 1 9) 被膜があるところはマクロファージの浸潤が多い傾向にあるか。M1、M2 マーカーの比は炎症性発癌と非炎症性発癌で差があるか。

(回答) 明確な差は認めなかった。これまでの報告では炎症性癌・非炎症性癌での差は認めていない。

質問 2 0) iNOS など他の M1、M2 のマーカーを、凍結切片を用いて RT-PCR などで検討していないか。

(回答) 行っていない。

質問 2 1) 背景肝での CD68、CD163 の発現検討は行っているか。

(回答) 大まかな検討での有意差は認めなかった。詳細な項目の検討に関しては今後の研究課題である。

質問 2 2) 腫瘍径の 3.5 cm の根拠は何か。

(回答) 本研究に使用した症例データの腫瘍径の中央値である。

質問 2 3) 背景肝との関係で炎症の強さや線維化の程度など、生化学データとの解析は実施していないか。

(回答) 今回は、腫瘍因子との比較をしており実施してない。今後の検討課題である。

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。