

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 723 号		学位申請者	濱田由紀
審査委員	主査	橋口 照人	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	上野 真一	副査	井上 博雅
	副査	榎田 英樹	副査	上田 和弘
<p>主査および副査の5名は、令和5年12月12日、学位申請者 濱田 由紀 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。</p> <p>質問 1) 対象患者において、年齢・腫瘍部位などが3群間で偏りがあったが理由はどのように考察しているか。 (回答) 対象患者は深達度 T3 以上の進行大腸癌であるが、PS や合併症の問題で化学療法が行えなかった患者が LFFRONT 群には含まれるため、年齢が他2群より高くなったと考える。また、当科の方針として直腸癌に対して積極的に術前化学療法を行ってきた背景があり、腫瘍部位の偏りもそれを反映していると考え。</p> <p>質問 2) 対象期間である 2011 年から 2020 年の間に化学療法導入などの治療方針に変更はなかったのか。 (回答) 右側結腸と左側結腸で抗 EGFR 抗体薬の奏効性が異なることが明らかになった 2017 年を基準に B-MAB 群の症例を確認すると、2017 年以前の 13 名中 1 名、2018 年以降の 13 名中 4 名が右側結腸癌であり、薬剤選択方針に変更があり、それを反映している可能性がある。</p> <p>質問 3) 術前化学療法はプロトコルで推奨のコース数が設定されているが、実施コース数に幅がある理由は何か。 (回答) 殆どの症例が 6 コース実施されているが、有害事象により脱落した症例や合併症や患者理由により手術までの待機期間が長くなり、治療を延長した症例が含まれることが理由として考えられる。</p> <p>質問 4) 腫瘍縮小率はどのように算出したのか。 (回答) 化学療法開始前後で行った CT・MRI から最大径を測定して算出した。</p> <p>質問 5) Bevacizumab の ADCC 活性の有無についてはどのように報告されているか。 (回答) ベバシズマブ (日医工) の薬品添付文書に ADCC 活性はないと記述されていた。</p> <p>質問 6) 薬剤の効果を評価しているとするならば、治療前の各群の免疫状態は同等との仮説なのか。 (回答) 患者特性にも示した通り、免疫状態に影響を及ぼすと思われる年齢や腫瘍の所在・進行度に偏りがあるため、同等とは評価できない。結果は偏りの影響を受けているが、治療の影響が最も大きいと考えている。</p> <p>質問 7) 真に治療の影響を評価するのであれば、治療前の標本についても評価を行うべきではないのか。 (回答) 正確な評価を行うには、同一患者内で継続的に生検を行い、評価を行うのが望ましいと考える。また免疫細胞の偏在の可能性を考慮し生検の方法・個数から条件を揃えて行う必要があると考える。</p> <p>質問 8) 腫瘍内の免疫細胞の分布の均一性についてはどのように評価しているか。 (回答) CD8 以外の免疫細胞は分布に偏在があった。その状態でも比較評価を行うために、観察を行う切片を深達度の最も深い部分に設定することで条件を揃え、全視野を確認して Hot spot 法で計測を行って評価した。</p> <p>質問 9) VEGF は血管新生・リンパ管新生の作用を有しているが、それについての評価は行わなかったのか。 (回答) VEGF による血管・リンパ管新生の評価のためには、VEGF の染色が必要と考える。参考にした AVAGAST 試験 (胃癌における Bevacizumab 治療の臨床試験) の論文において、固定前の組織の状態などで VEGF の免疫染色の状態が変わるとの記述があり、今回集めた標本では染色結果の評価が難しいと考え VEGF の免疫染色は行わなかった。</p> <p>質問 10) 各免疫細胞の VEGF 受容体の発現について Human cell atlas などでは分かると思うがどうか。 (回答) Human cell atlas 内の Analysis Portal を利用し、殺細胞性 T 細胞、制御性 T 細胞、macrophage の VEGF 受容体の遺伝子 (VEGFR-1 : Flt-1, VEGFR-2 : KDR, VEGFR-3 : Flt-4) の発現を確認した。殺細胞性 T 細胞・制御性 T 細胞は Flt-1, KDR, Flt-4、(臓器によっては Flt-1 と Flt-4 のみ)、macrophage (大腸) は Flt-1 と KDR の発現を認めた。</p> <p>質問 11) Bevacizumab が免疫細胞の浸透に影響しているという点では、リンパ組織内での PD-1 陽性リンパ球や制御性 T 細胞の分布についても評価してもよいと思うがどうか。 (回答) リンパ組織まで評価を行えば、治療期間での比較の他に、同一群内でのリンパ節転移症例と非転移症例、同一症例内での転移リンパ節と非転移リンパ節など、色々評価・検討ができたと思う。今後の課題としたい。</p>				

最終試験の結果の要旨

質問 12) 制御性 T 細胞は他免疫細胞よりターンオーバーは早いとあるがどれくらいの期間か。

(回答) 具体的な期間の報告はなかったが、制御性 T 細胞は併加時間が 8 日と他の T 細胞より (memory T 細胞: 24 日, naive T 細胞: 199 日) 若明に短くアポトーシスしやすいと報告されていた(J Clin Invest. 2006;116(9):2423-2433.)。

質問 13) MSI-High の status が免疫チェックポイント阻害薬(以下 ICI)の効果に作用する機序はどのようなものか。

(回答) MSI は DNA のミスマッチ修復酵素の異常を反映するマーカーであり、MSI-High を有する固形癌では遺伝子変異が高頻度に認められる。腫瘍免疫の標的となる neoantigen はがん細胞の遺伝子変異に由来するものであり、MSI-High の status を有する固形癌が多種多様な neoantigen を発生することによって ICI の奏功性を高める。

質問 14) 免疫細胞の評価方法で挙げられた Hot spot 法とはどのような方法か。

(回答) 標識細胞が多い箇所から順に測定箇所を選択する方法である。

質問 15) Figure 2 の C 及び D のグラフは手術後に CD8 陽性 T 細胞が減少していたことを表しているのか。

(回答) 経軸は倍率を表しており、B-MAB 群で増加率が最も低かった結果であった。

質問 16) Figure 2 の C 及び D のグラフにおいて、UPFRONT 群の中央値が高いのはなぜか。

(回答) 化学療法による骨髄抑制を受けていないことを反映している可能性がある。

質問 17) Bevacizumab の併用によって免疫抑制性免疫細胞が低下したのはどのような機序か。

(回答) 腫瘍関連マクロファージは VEGF の作用で腫瘍促進性の M2 タイプに転化すると報告されており、VEGF 阻害薬はその作用を遮断すると考える(J Leukoc Biol. 2022 ;111(5):1269-1286.)。

質問 18) 細胞株を用いて、VEGF 阻害薬の投与前後に遺伝子発現解析をやっている論文はないのか。

(回答) VEGF 阻害薬の投与後にアポトーシスに関連した遺伝子の発現が亢進することを示した細胞株実験の研究の報告があった (J Cancer. 2013;9(18):3407-3416.)。

質問 19) VEGF 阻害薬を使用した研究で遺伝子発現を網羅的にみて機序を推測している論文はないのか。

(回答) VEGF 阻害薬併用の奏功性予測のためのバイオマーカー探求を目的として、遺伝子解析が行われている研究は複数あったが、質問内容に該当する論文は見つけることができなかった。

質問 20) 大腸癌治療で VEGF 阻害薬と ICI の併用は認可されているか。臨床試験はあるか。

(回答) 認可されていない。臨床試験としては、AtezoTRIBE 試験と Checkmate9X8 試験がある。

質問 21) B-MAB 群において、FOLFOX-B-mab の後に他のレジメンを行って手術に至ったものは含まれているのか。

(回答) FOLFOX 単剤で開始し、途中から Bevacizumab を追加した症例と最初から FOLFOX 及び Bevacizumab の併用治療を行った症例のみである。

質問 22) Figure1 の大腸癌組織は腫瘍細胞巢と間質が明確に分かれているが、大腸癌は多くがこのような組織型なのか。

(回答) 今回対象とした大腸癌症例はほぼ全例が高分化または中分化型腺癌であり、Figure1 のような形態であった。

質問 23) 細胞巢と間質が混在した状態の写真でも Image J を使用すれば一括で各領域を測定することができるのか。

(回答) 腫瘍細胞巢の評価は写真から腫瘍細胞巢以外を切り取った状態で Image J を使用した。腫瘍間質も同様である。

質問 24) CD163 の染色で、細胞内にマクロファージを認めなかったという結果だったが、一度 CD68 で染色を行い、マクロファージの組織内の分布を確認したうえで評価を行うべきではなかったか。

(回答) 今回は当初より CD163 を TAM-M2 type の標識として設定し評価を行った。より正確な評価を行うためにはご指摘の通りの方法を取るべきであった。

質問 25) VEGF の生理的作用を逆にとる形で腫瘍の進展というものがあると考えられる。VEGF と腫瘍免疫との関係を考察する前に、VEGF と炎症との関連について、まず考察を行うべきではなかったか。

(回答) ご指摘通り、腫瘍免疫にのみ注目し生理的作用に対する理解が不十分であった。今後の課題としたい。

質問 26) 今回の研究で対象とした VEGF とは腫瘍の産生した VEGF と、周囲組織や免疫細胞が産生した VEGF のいずれを想定しているのか。

(回答) 腫瘍免疫環境での VEGF 産生の主体は腫瘍細胞であり、本研究も腫瘍細胞の産生した VEGF を対象として想定している(Clin Cancer Res. 2006;12(17):5018-22.)。

質問 27) 脱顆粒していない mast cell は制御性 T 細胞を誘導すると言われているが、腫瘍・リンパ節に存在するのか。

(回答) 大腸癌においては、腫瘍組織中に存在する mast cell が IL-2、IL-5、IL-6、IL-13 などのサイトカインを放出することで制御性 T 細胞の挙動を調整しているとの報告(Cancer Immunol Res. 2015 ;3(1):85-95.)があった。

質問 28) Bevacizumab を使用し手術を行った後の再発大腸癌患者に ICI の使用を検討するときに、いつ採取した検体を評価に用いるべきと考えるか。

(回答) Bevacizumab の使用後は免疫環境に変化が起きている可能性があるため、可能であれば再発病変の生検を行うのが望ましいが、困難な場合は手術標本での評価が有用と考える。

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。