

最終試験の結果の要旨

報告番号	総論第 10 号		学位申請者	吉満 誠
審査委員	主査	河野 嘉文	学位	博士 (医学)
	副査	出雲 周二	副査	馬場 昌範
	副査	古川 龍彦	副査	岡本 康裕

主査および副査の5名は、平成25年6月24日、学位申請者 吉満 誠君に面接し、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) ウイルスの慢性持続感染と急性感染症の違いをもたらす分子として、PD-1 以外に関連があるとされている因子等はないか。

(回答) マウス LCMV ウイルスの慢性持続感染症と急性感染症においてウイルス特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) を集めてマイクロアレイで検討した報告で、まず PD-1 が候補遺伝子として知られるに至ったという経緯がある。他にも多数の関連遺伝子が知られており、他の抑制性 T 細胞受容体も疾患によっては候補となっている。

質問2) HTLV-1 で CTL の頻度と機能が低下しているとあるが、頻度が低下するのはなぜか。

(回答) HTLV-1 特異的 CTL への慢性的な抗原刺激に対して CTL は活性化され増殖するが、経過中に activation-induced cell death を繰り返し、感染後期に頻度が低下、それが ATLL 発症の一因ではないかと考察している。

質問3) PD-1 の CTL での発現はキャリア、ATLL 患者でばらつきがある。CTL の頻度と PD-1 の発現の程度を同一個体で時間軸で検討した場合はどうということが予想されるか。

(回答) PD-1 の発現は年齢とともに増加することも示されており、グループ間での年齢補正を慎重に行う必要があった。同一個体で CTL 上の PD-1 発現を観察した場合、発現が増加することが予想される。長期間にわたる慢性持続感染後に発症する ATLL の発症原因として CTL 頻度の低下と PD-1 の発現増加が関与する可能性がある。

質問4) HIV での CTL における PD-1 の発現はウイルス量と相関しているが、ATLL 患者において、末梢血のほとんどを ATLL 細胞で占められている場合にも HTLV-1 CTL での PD-1 の発現が増加しないのはなぜか。

(回答) ATLL 細胞はその増殖過程においてゲノムに組み込まれた HTLV-1 プロウイルスが欠損することや、プロモーター領域である LTR 部位の methylation のために HTLV-1 関連抗原を発現しないことがあり、それが CTL からの免疫逃避機構に関与している可能性がある。そのため PD-1 の発現と相関しないことがあると考える。

質問5) EBV と CMV のテトラマー発現を検討しているが、どちらも感染者であることを確認しているか。

(回答) 血清学的に IgG クラス抗体の上昇を確認している。

質問6) in vivo では ATLL 細胞で 40% は Tax を発現していないと考察で記載しているが、発現に関与する因子はなにか。

(回答) ATLL 細胞はサザンブロット法で検討した場合にプロウイルスの HTLV-1 一部欠損を示すものがある。HBZ などと異なり、pX 領域にある Tax は欠損することがあるため、そのような例では ATLL 細胞で Tax を発現していない。また遺伝子欠損はなくても、DNA methylation により Tax を発現していない例も存在する。一方、非発現例でも ex vivo で培養すると Tax の発現が誘導されることがある。In vivo での Tax 発現の抑制のメカニズムは十分には分かっていない。

最終試験の結果の要旨

質問 7) PD-L1 の発現制御、特にプロモーター領域にはどのような制御領域があるか。

(回答) IRF-1 に対する反応領域があり、1 型インターフェロンにより発現が誘導されるという報告がある。

質問 8) PD-L1 の抗体を治療ターゲットとした場合、PD-L1 は細胞内ドメインが短いということであれば、可溶性フォームが多くなり、抗体療法を妨げることにならないか。

(回答) 可溶性フォームの存在は報告されている。臨床試験では、そのことを踏まえ抗 PD-1 抗体を用いている。本研究ではブロック試験に PD-L1 抗体を用いたのは、Barber らが報告した論文中で抗 PD-1 抗体より、抗 PD-L1 抗体を用いた方が有意な差がでやすかったことを参考にした。

質問 9) 可溶性フォームがある場合のリガンドへの抗体療法は抗体が可溶性フォームにとられてしまい効果を発揮できない可能性があるため、レセプターを標的とした方がいいと考えられる。そこで PD-1 に対する阻害剤の検討は報告されているか。

(回答) 抗体以外での阻害剤は報告されていない。

質問 10) HAM における CTL の PD-1 の発現はどうだったか。

(回答) キャリアと比較して、HAM では CTL における PD-1 の発現は低下していた。これは HAM における CTL は activate されているというこれまでの報告に一致したものである。

質問 11) PD-L1 を発現している ATLL 細胞、特に 20% 程度の発現の患者ではどのように ATLL 細胞を同定したか。正常の制御性 T 細胞の PD-L1 発現をみている可能性はないか。

(回答) ATLL 細胞の同定は目視による分類をもとに判断した。CD4/CD25 陽性細胞には制御性 T 細胞も含まれているため、それらの検体においては T 細胞受容体のレパートリー解析を行い、モノクローナルな増殖であることを確認している。モノクローナリティの確認としては HTLV-1 のプロウイルスサザンブロットで 1 本のバンドであったことから感染 T 細胞の増加ではなく ATLL 細胞の増殖と判断した。

質問 12) 診断時には PD-L1 を発現している ATLL 細胞はなかったが、その後に発現している例がある。どのような病態変化があったのか。

(回答) くすぶり型 ATLL 細胞に対して長期間経過をみられていた中で、急性転化後化学療法、同種移植などを行った。一旦寛解した後に再燃時の細胞において PD-L1 が発現していた。

質問 13) PD-L1 の発現の誘導に関与する分子が知られているか。

(回答) ATLL では明らかにされていない。血液腫瘍である多発性骨髄腫においては MyD88 が PD-L1 の誘導因子として知られている。神経膠芽細胞腫においては PTEN の発現低下が関与していると報告されている。いずれも ATLL において検討したが関与を認めなかった。

質問 14) PD-1 の発現においてキャリアと ATLL 患者での差はあったか。

(回答) キャリアでは長期に渡る HTLV-1 抗原刺激のため HTLV-1 特異的 CTL の PD-1 の発現が上昇していた。ATLL 患者でも同程度に上昇しており、いずれも長期に渡る HTLV-1 抗原刺激の結果と考える。しかしながら、EBV と CMV 特異的 CTL の PD-1 発現は ATLL 患者においてキャリアより有意に亢進しているという差があった。

質問 15) 腫瘍化した細胞は CD4 陽性細胞であるが、CD8 陽性細胞 ATLL もあるか。また CD4 が多いのはどういう理由か。

(回答) CD8 陽性 ATLL は少数ながら経験する。HTLV-1 はその多くが CD4 陽性細胞に感染しているが、ごくわずかに CD8 に感染することが知られている。CD8 陽性 ATLL がわずかであること理由は感染細胞の少なさによるのではないかと考えている。

質問 16) 腫瘍量と PD-1 発現に有意の相関がみられなかったが、そもそも ATLL の腫瘍量が多すぎる患者では免疫が完全に破綻しており、PD-L1 の発現を必要としていないのかもしれない。むしろ ATLL 腫瘍量の少ない群で腫瘍量と PD-1 発現を検討すると相関している可能性はないか。

(回答) 本検討では PD-L1 発現群が少ないため検討できなかったが、今後 ATLL 細胞の少ない患者群を詳細に検討したい。

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同等あるいはそれ以上の学力・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。