氏　　名	宮崎　翼
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	博甲第　９５７１　号
学位授与年月	令和２年３月２５日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科
学 位 論 文 題 目	初発・再発膠芽腫組織を使用した腫瘍微小環境の変化の解析とテモゾロミド耐性 TS 細胞に対する抗 PD-L1 抗体+M2 マクロファージ阻害剤併用療法の検討
主　　査	筑波大学教授　　博士（医学）　西山　博之
副　　査	筑波大学准教授　　博士（医学）　鈴木　英雄
副　　査	筑波大学准教授　　博士（医学）　小原　直
副　　査	筑波大学講師　　博士（医学）　加野　准子

論文の内容の要旨

宮崎翼氏の博士学位論文は、膠芽腫再発時の免疫抑制状態について初発時と比較した免疫組織化学解析と、人工グリオーマ幹細胞マウスモデルにおける抗 PD-L1 抗体+M2 マクロファージ阻害剤併用療法の効果を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

（目的）著者は先行研究を概観し、膠芽腫の腫瘍微小環境における PD-1/PD-L1 発現による免疫抑制状態と予後の関係は議論の途上であること、また、膠芽腫においては PD-1/PD-L1 を標的とした免疫チェックポイント阻害剤による治療効果を増強するため、免疫抑制性の M2 マクロファージに対する阻害剤の併用療法を検討する必要があることを述べている。そこでまず膠芽腫再発の機序に抑制性の免疫チェックポイント分子である PD-1/PD-L1 発現状態の変化が関与しているかどうかを明らかにするために、初発および再発膠芽腫組織を用いて免疫組織化学的解析を行っている。この実験では、解析対象に免疫療法施行症例を含めることで、免疫療法後の再発組織における腫瘍微小免疫環境の変化についても同時に検討している。次に標準治療後に腫瘍幹細胞が残存した状況を再現するため、人工のグリオーマ幹細胞である TS 細胞をテモゾロミド（TMZ）で長期処理することで TMZ 耐性 TS 細胞を樹立している。本論文では、この TMZ 耐性 TS 細胞を用いてマウス皮下腫瘍モデルを作製し、膠芽腫における免疫チェックポイント阻害剤の治療抵抗性の打開策として、PD-1/PD-L1 経路の阻害剤と M2 マクロファージの阻害剤として PI3Kγ阻害剤の IPI-549 を併用した際の治療効果の有無を明らかにすることを目的としている。

（材料と方法）膠芽腫組織を用いた免疫組織化学の実験では、膠芽腫と診断されて初回手術後に標準治療を受け、その後 24 か月以内の早期に再発して再手術を受け、初発および再発手術検体が入手可能な 14-65 歳までの患者を選択し、合計 16 名の初発・再発検体を使用した。このうち 4 例は標準療法に加え自家腫瘍ワクチン療法を受けていた。著者はこの検体を用いて、腫瘍細胞のマーカーとして Ki-67、TP53、MGMT、IDH-1R132H 、ATRX、PD-L1、MHC class I、MHC class II、浸潤リンパ球マーカーとして CD3、CD8、CD20、CD45RO、PD-1、Granzyme B の一次抗体を用いて染色を行い、初発

時から再発時への変化をスコア化して評価している。次に、標準治療後の再発を想定して、人工グリオーマ幹細胞である TS 細胞を、TMZ 濃度を 50μM から 500μM に漸増させながら長期間処理することで TMZ 耐性 TS 細胞株を樹立し、細胞の増殖能および抗腫瘍免疫抑制関連分子の発現状態を解析している。さらに、TMZ 耐性 TS 細胞株を用いてマウス皮下モデルを作製、腫瘍成長時の M2 マクロファージ浸潤の変化を確認し、抗 PD-L1 抗体、IPI-549（M2 マクロファージ阻害剤）単独もしくは併用時の腫瘍成長の変化を調べている。

（結果）初発・再発検体を使用した免疫組織化学による解析において、CD3 および CD8 陽性のキラー T 細胞が初発時に比べ再発時に有意に増加する一方で、PD-1 陽性細胞も再発時には有意に増加していた。また再発時の PD-1 発現スコア中央値で 2 群に分けて初発時からのスコアの変化を調べ、PD-1 高値群では全例が初発時に比べて再発時のスコアが有意に増加していることを明らかにしている。腫瘍細胞のマーカー分子発現に大きな変化はなかったことが述べられている。培養細胞を用いた実験において TMZ 耐性 TS 細胞は未治療の TS 細胞に比べ細胞増殖速度が 0.58 倍と遅く、TMZ による DNA 修飾を除去する酵素の遺伝子である MGMT の発現が 1.3 倍に増加することが TMZ 耐性獲得の一因となっていることを明らかにしている。また著者は、細胞の遺伝子発現に大きな影響を与えると考えられる TMZ 処理後にもかかわらず、TMZ 耐性 TS 細胞がマクロファージ遊走や M2 マクロファージ分化に関わるサイトカイン発現能を保持していることを明らかにしている。著者の作製した皮下腫瘍マウスモデルを用いた実験では、コントロールに比べ抗 PD-L1 抗体で治療することによって腫瘍成長が抑制されたが、M2 マクロファージの浸潤が初回治療後 2 日目の時点から増加しており、抗 PD-L1 抗体単剤での治療後期の増悪の要因になっている可能性が述べられている。著者はこの M2 マクロファージの浸潤による腫瘍増悪を改善するため、抗 PD-L1 抗体と M2 マクロファージ阻害剤を併用することで、抗腫瘍効果が有意に増強することを明らかにしている。

（考察）免疫組織化学による再発時に PD-1 陽性細胞の増加が認められた現象から、著者は腫瘍浸潤リンパ球の PD-1 発現や M2 マクロファージの浸潤による免疫抑制性の腫瘍微小環境が再発時には形成されている可能性について言及しており、この変化が実臨床での免疫療法の治療抵抗性獲得の一因となっている可能性が述べている。著者は M2 マクロファージ阻害剤の併用療法は、免疫療法を含む集学的治療後の治療抵抗性を克服する有望な治療選択肢になる可能性があることを述べている。

審査の結果の要旨

（批評）

本研究では、膠芽腫に関する免疫組織化学解析から再発機序に免疫抑制性の腫瘍微小環境が関与している可能性を明らかにし、その再発機序に立脚した抗 PD-L1 抗体+M2 マクロファージ阻害剤併用療法の有用性を動物モデルで検討している。本研究成果は、膠芽腫という難治性疾患に対する新規治療法の開発につながるものと臨床上高く評価される。

令和 2 年 1 月 8 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。