

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 641 号	氏 名	野田 美和
審 査 委 員 会 委 員		主査氏名	杉尾 賢二 
		副査氏名	浅山 良樹 
		副査氏名	廣中 秀一 
<p>論文題目                  Circulating <i>PD-1</i> mRNA in Peripheral Blood is a Potential Biomarker for Predicting Survival of Breast Cancer Patients                  (乳癌患者における末梢血中 <i>PD-1</i> mRNA 発現の予後予測バイオマーカーとしての意義)</p> <p>論文掲載雑誌名                  Annals of Surgical Oncology</p> <p>論文要旨  <b>結言：</b>PD-1/PD-L1阻害剤は、様々な癌腫において重要な治療薬である。腫瘍組織におけるPD-L1発現はPD-1/PD-L1阻害薬の効果予測マーカーとして臨床的に使用されているが、PD-L1高発現でも効果が得られない症例もあり、臨床効果との相関は十分ではない。また組織検査は手術や生検など侵襲的な検査である。そこで今回、非侵襲的かつ安全、頻回な検査可能なリキッドバイオプシーとして、血中PD-1 mRNAの発現に着目し、乳癌におけるその臨床的意義と免疫状態との関連について調べた。  <b>研究対象及び方法：</b>(1) 公共データセットTCGAを使用し、乳癌組織のPD-1 mRNA発現と予後との関連を評価した。(2) 2000年から2008年までに共同研究施設で根治切除術を施行した乳癌患者(n=372)の末梢血を対象に、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応を行い、血中PD-1 mRNA発現を測定した。PD-1 mRNA発現と臨床病理学的特徴との関連、予後との関連を評価した。(3) 乳癌患者の末梢血においてPD-1が発現している細胞をフローサイトメトリー分析で特定した。(4) 当院で手術を施行した乳癌患者(n=27)の末梢血と腫瘍組織におけるPD-1 mRNA発現の相関関係、さらに免疫関連遺伝子(CD4, CD8)発現、CYTとの相関関係について調べた。  <b>結果：</b>(1) PD-1 mRNA発現は、正常組織と比較して腫瘍組織で有意に高く、腫瘍組織におけるPD-1 mRNA低発現群は有意に予後不良であった。(2) 乳癌患者の末梢血でのPD-1 mRNA発現は健常人より有意に高く、末梢血PD-1 mRNA高発現群は予後不良と有意に関連していた。(3) 末梢血ではPD-1はほとんどがT細胞、主にCD4陽性T細胞に発現していた。(4) 腫瘍組織において、PD-1 mRNA発現とCD8 mRNA発現、CYTは正の相関関係であった。末梢血PD-1 mRNA発現と腫瘍組織PD-1 mRNA発現は負の相関関係であった。  <b>考察：</b>切除可能な乳癌において、腫瘍組織PD-1 mRNA高発現症例は予後良好であるのに対し、末梢血PD-1 mRNA高発現症例は予後不良であった。末梢血と腫瘍組織におけるPD-1 mRNA発現の予後予測因子としての相反は、末梢血中PD-1は主として免疫疲弊したT細胞に発現する一方、腫瘍組織では免疫活性化したT細胞に発現していることが原因と考える。以上より末梢血PD-1 mRNA発現は乳癌患者において免疫疲弊状態を反映する予後バイオマーカーとしてだけでなく免疫治療の有効性を予測するマーカーとなることも期待される。  <b>結語：</b>乳癌において末梢血PD-1 mRNA発現は、予後を予測するバイオマーカーとして有用である可能性を示した。</p> <p>以上の発表内容を審査委員で合議し、本論文は学位論文に値すると判断した。</p>			

最終試験  
の結果の要旨  
~~学力の確認~~

審査区分 ①・論	第641号	氏名	野田 美和
審査委員会委員	主査氏名	杉尾 賢二 	
	副査氏名	浅山 良樹 	
	副査氏名	廣中 秀一 	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、結果、考察について以下のような質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 本研究の解析対象は407例であるが、Electronic supplementary file 1の組織内訳（IDC 343例、DCIS 32例、others 23例、NA 9例）と論文上（IDC 372例、DCIS32例）の数字が合わない。理由を述べよ。</li> <li>2. 生体試料は、乳癌患者で27例と記載されているが、flow cytometric analysisの項には、28例となっている。その違いの理由を述べよ。</li> <li>3. 保存されていたcDNAの信頼性の検定はどのようにおこなったのか。</li> <li>4. Healthy volunteers 23人の選択基準を説明せよ。</li> <li>5. TCGA dataの解析を具体的に説明せよ。</li> <li>6. TCGA dataの正常乳腺組織はどの部位から採取したものか。</li> <li>7. RNA extraction, separation, RT-PCR および IHC は誰が施行したのか。</li> <li>8. IHC と mRNA のデータに相関関係はあるのかを説明せよ。</li> <li>9. 末梢血でのPD-1発現の局在で、健常者、乳癌患者それぞれ5人を選択した基準は何か</li> <li>10. univariate analysis で有意な因子は5項目挙がっているが、multivariate analysis ではそのうち3項目で解析が行われている。相互に相関が認められない項目のみを解析した、となっているが、その方法論を説明せよ。</li> <li>11. リキッドバイオプシーでのバイオマーカー研究にあたっては、PD-1 mRNA 以外にも PD-L1 mRNA や PD-1 発現 CTC などもある。PD-1 mRNA を選択した理由を述べよ。</li> <li>12. PB での PD-1 mRNA のカットオフ値は minimum p value approach で決定しているが、高値から低値でカットした場合に結果に傾向は見られたか。</li> <li>13. 単変量解析で腫瘍径が有意なマーカーであったが、多変量解析の際に検討しなかったは、何の因子と交絡したからかを説明せよ。</li> <li>14. 腫瘍局所の PD-1 mRNA が高値の場合、免疫寛容になると思われるが、予後が良好な理由を考察せよ。</li> <li>15. 今回の PD-1 mRNA は minimum P value approach を用いた Developing cohort での検討に過ぎないため、Validation cohort での再現性の検討が必要と考えるが、どう思うか。</li> <li>16. 乳癌の種々の Subtype が混在した対象では治療法が異なるため、分けて検討する必要があるのではないか。</li> <li>17. 組織と血液の paired sample の組織では、PD-1 と CD4 とに相関は認められない。そして、paired sample での血液と組織では PD-1 expression が逆相関しているとしているが、このような CD4 と相関しないような sample で検定することの意義は、また、どのように解釈するのかを述べよ。</li> <li>18. 乳癌患者の末梢血では疲弊化 T 細胞といえる根拠があるのか。癌患者と非癌健常人では末梢血の T 細胞に差があるのか、考え方を述べよ。</li> <li>19. 組織では T 細胞は活性化する一方で末梢血では疲弊すると考察されているが、T 細胞が変化する解剖学的部位はどこか。</li> <li>20. 末梢血中の PD-1 発現が regulatory T cell の活性化を示している、という論法になっているが、regulatory T cell の活性化の根拠は？ FOXP3 などの発現を検討したのか。</li> </ol> <p>これらの質問に対し、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 野田 美和

## 論 文 題 目

Circulating *PD-1* mRNA in Peripheral Blood is a Potential Biomarker for Predicting Survival of Breast Cancer Patients

(乳癌患者における末梢血中 *PD-1* mRNA 発現の予後予測バイオマーカーとしての意義)

## 要 旨

ア. 緒言 Programmed cell death 1 (PD-1) / Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) 阻害剤は、様々な癌腫において重要な治療薬である。腫瘍組織における PD-L1 発現は腫瘍局所の免疫環境を反映し、PD-1/PD-L1 阻害薬の効果予測マーカーとして臨床的に使用されている。しかし、PD-L1 高発現でも効果が得られない症例もあり、臨床効果との相関は十分とは言えない。また組織検査は手術や生検など侵襲的な検査を要し、頻回に行うことは不可能である。そこで今回、非侵襲的かつ安全、頻回な検査可能なリキッドバイオプシーとして、血中 *PD-1* mRNA の発現に着目し、乳癌におけるその臨床的意義と免疫状態との関連について調べた。

イ. 研究対象及び方法 (1) 公共データセット TCGA を使用し、乳癌組織の *PD-1* mRNA 発現と予後との関連を評価した。(2) 2000 年から 2008 年までに共同研究施設で根治切除

術を施行した乳癌患者 (n=372) の末梢血を対象に、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応を行い、血中 *PD-1* mRNA 発現を測定した。*PD-1* mRNA 発現と臨床病理学的特徴との関連、予後との関連を評価した。(3) 乳癌患者の末梢血において *PD-1* が発現している細胞をフローサイトメトリー分析で特定した。(4) 当院で手術を施行した乳癌患者 (n=27) の末梢血と腫瘍組織における *PD-1* mRNA 発現の相関関係、さらに免疫関連遺伝子 (*CD4*, *CD8*) 発現、*CYT* (*GZMA* と *PRF1* の幾何平均で算出する局所免疫の指標) との相関関係について調べた。

ウ. 結果 (1) *PD-1* mRNA 発現は、正常組織と比較して腫瘍組織で有意に高く、腫瘍組織における *PD-1* mRNA 低発現群は有意に予後不良であった。(2) 乳癌患者の末梢血での *PD-1* mRNA 発現は健常人より有意に高く、末梢血 *PD-1* mRNA 高発現群は予後不良と有意に関連していた。(3) 末梢血では *PD-1* はほとんどが T 細胞、主に *CD4* 陽性 T 細胞に発現していた。(4) 腫瘍組織において、*PD-1* mRNA 発現と *CD8* mRNA 発現、*CYT* は正の相関関係であった。末梢血 *PD-1* mRNA 発現と腫瘍組織 *PD-1* mRNA 発現は負の相関関係であった。

エ. 考察 切除可能な乳癌において、腫瘍組織 *PD-1* mRNA 高発現症例は予後良好であるのに対し、末梢血 *PD-1* mRNA 高発現症例は予後不良であった。末梢血と腫瘍組織における *PD-1* mRNA 発現の予後予測因子としての相反は、末梢血中 *PD-1* は主として免疫疲弊した T 細胞に発現する一方、腫瘍組織では免疫活性化した T 細胞に発現していることが原因と考える。以上より末梢血 *PD-1* mRNA 発現は乳癌患者において免疫疲弊状態を反映する予後バイオマーカーとしてだけでなく免疫治療の有効性を予測するマーカーとなることも期待される。

オ. 結語 乳癌において末梢血 *PD-1* mRNA 発現は、予後を予測するバイオマーカーとして有用である可能性を示した。