



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1984号
学位記番号	第1395号
氏名	加納 慎二
授与年月日	令和5年9月25日
学位論文の題名	Differences in the immune microenvironment between improved and non-improved cases of vitiligo after halo nevus excision (サットン母斑切除後の白斑改善例と非改善例の免疫微小環境の違い)  J Dermatol Sci. 2023 Mar;109(3):136-142.
論文審査担当者	主査： 山崎 小百合 副査： 稲垣 宏, 飯田 真介

## 論文内容の要旨

背景：ハロー母斑はサットン母斑とも呼ばれ、母斑抗原に対する T 細胞を介した免疫反応によって生じる白斑に囲まれた母斑細胞母斑である。全身性の尋常性白斑を伴うことがあり、尋常性白斑への進行を防ぐために母斑切除術が行われることがあるが、切除後に免疫反応が停止して白斑が改善する場合と、切除後も免疫反応が続いて白斑が悪化する場合の違いは不明である。悪性黒色腫などの周囲に白斑が生じる場合は、サットン現象と呼ばれ悪性黒色腫に関連する良い兆候と考えられている。白斑は、免疫チェックポイント阻害剤治療が奏功した患者さんにおいて、免疫関連有害事象 (irAE) として認められることもあり、良好な治療効果を示すことが多い。その改善メカニズムが注目されている。

目的：免疫療法による腫瘍免疫活性化機構を明らかにするためにサットン母斑の免疫反応を解析する

方法：54名のサットン母斑患者（男性20名、女性34名、平均年齢20.7歳）を収集した。そのうち45例の母斑を切除し、追跡可能な29例を免疫組織化学的に解析した。解析は免疫蛍光法 PhenoCycler®アッセイを用いた免疫細胞表現型解析および空間的単一細胞解析も含めて行った。

結果：ハザード解析の結果、周囲の白斑の改善率は、尋常性白斑を伴わないサットン母斑において尋常性白斑を伴う症例よりも有意に高かった ( $P = 0.0249$ , ログランク検定)。周囲の白斑はすべて1年以内に改善を認めており、約半数が3ヶ月以内に改善した。

免疫組織化学染色を、その後の臨床結果が追跡可能な母斑切除症例29例を対象に実施した。サットン母斑周囲に浸潤する CD8 陽性細胞の数と PD-1 陽性細胞の数を定量化した。また、CD4 陽性および Foxp3 陽性細胞を制御性 T (Treg) 細胞と定義した。サットン母斑に発現する PD-L1 陽性細胞も定量化した。改善例と非改善例の間で、浸潤する CD8 陽性細胞、PD-1 陽性細胞、Treg 細胞の数に有意差は見られなかった。PD-L1 発現量は、改善例では非改善例に比べて低かった ( $p = 0.0024$ , スチューデント T テスト)PD-L1 発現量の差は、尋常性白斑の症例のみで比較するとさらに大きかった( $p = 0.0002$ , スチューデント T テスト)。PD-L1 発現量は、尋常性白斑の有無における差は検出されなかった。

PhenoCycler®アッセイを用いた免疫細胞表現型解析および空間的単一細胞解析を行った。周囲の白斑の改善例では、CD20 陽性細胞、CD21 陽性細胞、CD3,4 陽性細胞が PD-L1 陽性細胞の周りに密集し、3次リンパ系構造 (TLS) を形成していた。非改善例では、CD8 陽性、CD3,4 陽性、CD20 陽性の細胞が帯状に密集し浸潤していた。改善例では、CD21 陽性細胞を中心とした活発な細胞間相互作用が観察されたのに対して、非改善例では細胞間相互作用はまばらで、代わりに CD8 陽性細胞と CD3、CD4 陽性細胞の密な浸潤が観察された。

考察：PD-L1 の発現強度は、周囲の白斑の非改善例では、細胞が免疫系の攻撃にさらされる時間が長いために上昇しているように考えられた。周囲の白斑の改善例では、自然免疫反応、抗原提示、免疫活性化が局在していたため、母斑細胞を除去すると免疫反応が停止した一方、非改善例で原因を除去しても免疫応答が止まらないのは、全身的な免疫反応が起こっているためと考えた。免疫チェックポイント阻害剤による治療が有効であるためには、非改善型サットン母斑のように、悪性腫瘍の周囲に免疫応答が生じることが期待される。また重度の irAE が発生した場合、臓器

摘出は最終手段である。改善されたサットン母斑で観察される TLS の存在は、切除の有効性を予測するバイオマーカーとなる可能性がある。サットン母斑の研究により、腫瘍免疫のメカニズムが解明されることが期待される。

(注) 和文で 2, 0 0 0 字以内でまとめる

## 論文審査の結果の要旨

### 【背景と目的】

ハロー母斑（サットン母斑とも呼ばれる）は、母斑抗原に対する T 細胞を介した免疫反応によって引き起こされると考えられている白斑に囲まれた母斑細胞母斑である。しかし、母斑を除去しても白斑が改善しないことが多く、免疫微小環境は謎に包まれている。本研究は母斑切除術を受けたハロー母斑患者の臨床経過と免疫微小環境の解析を行ったものである。

### 【方法】

54 名のハロー母斑患者を収集し、多変量解析と免疫組織化学的解析を行った。解析には PhenoCycler®アッセイを用いた多重免疫細胞表現型解析と空間的単一細胞解析が含まれる。

### 【結果】

多変量解析の結果、診察時の尋常性白斑の有無のみが、切除後の周囲の白斑の改善と関連していた。母斑細胞における programmed death-ligand 1 の発現は、改善例と比較して非改善例で有意に高かった。PhenoCycler®アッセイにより、CD107a 陽性細胞および CD21 陽性細胞は、非改善例よりも改善例に多く認められた。改善例では、CD21 陽性細胞を中心とした活発な細胞間相互作用が観察されたが、非改善例では細胞間相互作用はまばらであった。その代わりに、非改善例では CD8 陽性細胞、CD3 陽性細胞、CD4 陽性細胞の濃密な浸潤が観察された。

### 【結論】

ハロー母斑の免疫微小環境の解明は、黒色腫関連白斑にも関連し、腫瘍免疫の理解に寄与するであろう。

### 【審査の内容】

第一副査の稲垣先生から、ハロー母斑の疫学、好発部位とその理由、ハロー母斑になりやすい母斑細胞母斑の組織型について、PDL 1 の発現細胞等、12 項目の質問があった。また多変量解析における最低限必要な症例数についての指摘があった。PhenoCycler での解析が改善例、非改善例ともに 1 例ずつしか行われていない点について、他の症例での追加解析の必要性についてのアドバイスがあった。第二副査の飯田先生から、ハロー母斑や尋常性白斑の白斑形成のメカニズムについて、及び、そのメカニズムが自己免疫反応とする場合は抗原はメラニンでよいのか、母斑の clonality、PhenoCycler 解析の方法と得られた結果の解析方法について等、9 項目の質問があった。また、今回の結果をどのように臨床に生かすべきかについて、意見が求められた。主査の山崎より、細胞数のカウント方法、PDL1 発現の定量方法、組織内の heterogeneity、母斑細胞における MHC class 1 発現などについて 9 項目の質問を行った。また、稲垣先生と同様に、PhenoCycler 解析が各グループで 1 例ずつしか行われていない点について、HE 標本における並行した解析や追加免疫染色での解析などの PhenoCycler で得られた結果のバックアップが必要である旨の指摘を行った。今後の展望として、今回の結果を悪性黒色腫における irAE のマネジメントに生かすのであれば、irAE 患者の血液におけるナチュラルキラー細胞量の測定などのアドバイスを行った。これらの質問に対して回答に詰まる場面も見られたが、おおむね満足すべき回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると判断した。

本研究は、これまで解析されてこなかったハロー母斑の免疫環境について、初めて詳細な解析を行ったものであり意義のある研究といえる。また、irAE 患者におけるサットン現象との関連についても興味深い内容であり、今後の研究の発展が期待される。従って本論文の筆者は博士（医学）の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 山崎小百合 副査 稲垣宏 飯田真介