

令和 2 年 4 月 21 日現在

機関番号：21601  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2017～2019  
課題番号：17K10540  
研究課題名(和文) 乳癌におけるT細胞を用いた免疫細胞療法の開発

研究課題名(英文) Development of immunotherapy with T cells in breast cancer

研究代表者  
三村 耕作 (Mimura, Kosaku)  
福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90568031  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究により我々は、phospho-STAT1(細胞内におけるIFN- $\gamma$ 伝達経路に存在する分子の1つ)陽性乳癌細胞ではPD-L1とHLA class Iが共発現していること、腫瘍浸潤免疫担当細胞から産生されたIFN- $\gamma$ により乳癌細胞のphospho-STAT1が活性化されていること、乳癌細胞におけるphospho-STAT1発現が抗PD-1抗体のバイオマーカーとなる可能性があること、を証明した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、進行乳癌に対する新たな治療戦略の1つとして抗PD-1抗体を用いた免疫細胞療法が施行されている。しかし、その臨床効果は限られており、更なる治療の開発やバイオマーカーの開発などが必要と考えられている。乳癌微小環境におけるPD-L1の発現機構の1つを解明した本申請研究の成果は、進行乳癌症例において、抗PD-1抗体を用いた免疫細胞療法の効果増強方法やバイオマーカーの開発に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we indicated that PD-L1 and HLA class I were co-expressed in phospho-STAT1, a molecule in the IFN- $\gamma$  signaling pathway, positive breast cancer cells, and that phospho-STAT1 in breast cancer cells was activated by IFN- $\gamma$  secreted from tumor infiltrating immune cells, and that phospho-STAT1 expression in breast cancer cells may be a potential biomarker for immunotherapy with anti-PD-1 monoclonal antibody.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：乳癌 癌微小環境 phospho-STAT1 PD-L1 HLA class I CD8陽性T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年、進行乳癌に対する新たな治療戦略の1つとして、免疫チェックポイント阻害剤を含めた免疫細胞療法が、注目されている。特に、抗 PD-1/抗 PD-L1 抗体においては、複数の癌腫に対する抗腫瘍効果が証明されているが、その単剤での奏効率は 10-40%程度と限られている。乳癌も含めた各癌腫において、抗 PD-1/抗 PD-L1 抗体の更なる効果増強方法（複合免疫療法など）やバイオマーカーの開発が急務であると考えられている。

## 2. 研究の目的

腫瘍微小環境には、免疫チェックポイントを含め、様々な免疫抑制機構が存在する。免疫チェックポイント阻害剤を含めた免疫細胞療法の効果を増強するためには、腫瘍微小環境における免疫抑制機構を解明、解除する事が必要不可欠である。

免疫抑制機構の中でも、免疫チェックポイントの PD-1 経路を介する T 細胞機能不全は、細胞免疫療法の効果を著しく損なう。そのため、本申請研究では、乳癌の腫瘍微小環境における T 細胞の免疫抑制機構（特に、乳癌細胞の IFN- $\gamma$  を介した PD-L1 発現機構の解明に重点を置く）を詳細に検討し、抗 PD-1 抗体を用いる免疫細胞療法の開発に努めた。

## 3. 研究の方法

1) The Cancer Genome Atlas (TCGA) の breast invasive carcinoma tissues dataset (n=1,100) を用いて、PD-L1 (*CD274*) の mRNA 発現レベルと IFN- $\gamma$  signature、CD8 T effector gene signature の関連について検討した。

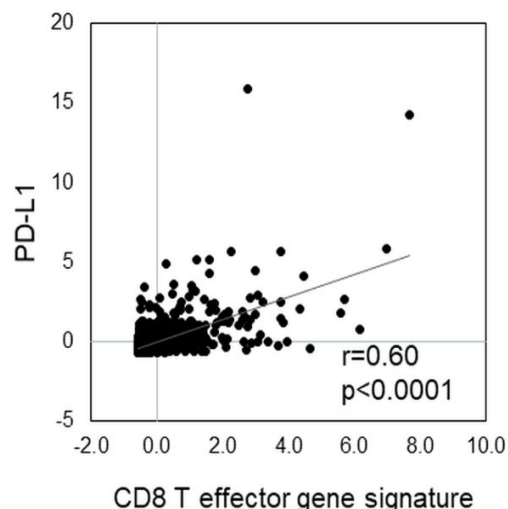
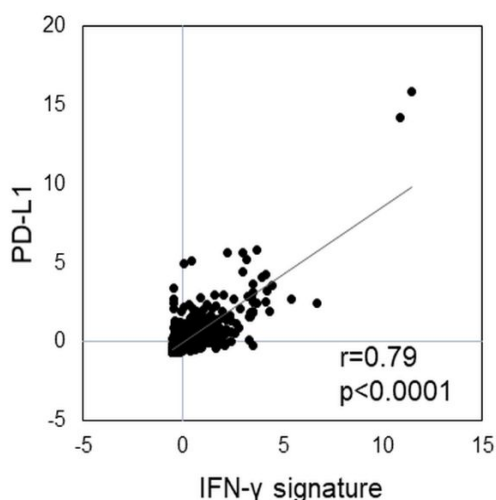
IFN- $\gamma$  signature は、*IDO1*, *CXCL10*, *CXCL9*, *HLA-DRA*, *STAT1*, *IFN-* を用い (Ayers M et al. The Journal of clinical investigation 127: 2930-2940, 2017.) CD8 T effector gene signature は、*CD8A*, *CD8B*, *EOMES*, *GZMA*, *GZMB*, *IFN-*, *PRF1* を用いた (Wallin JJ et al. Nature communications 7: 12624, 2016.)

2) 乳癌細胞株 (MRK-nu-1, BT-549, MCF-7, MDA-MB-231, MRK-nu-1) を ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) 阻害剤、phosphatidylinositol-3-kinase-protein kinase B (PI3K-AKT) 阻害剤、IFN- $\gamma$  で処置し、PD-L1 と HLA class I 発現の変化を flow cytometry と microarray で検討した。

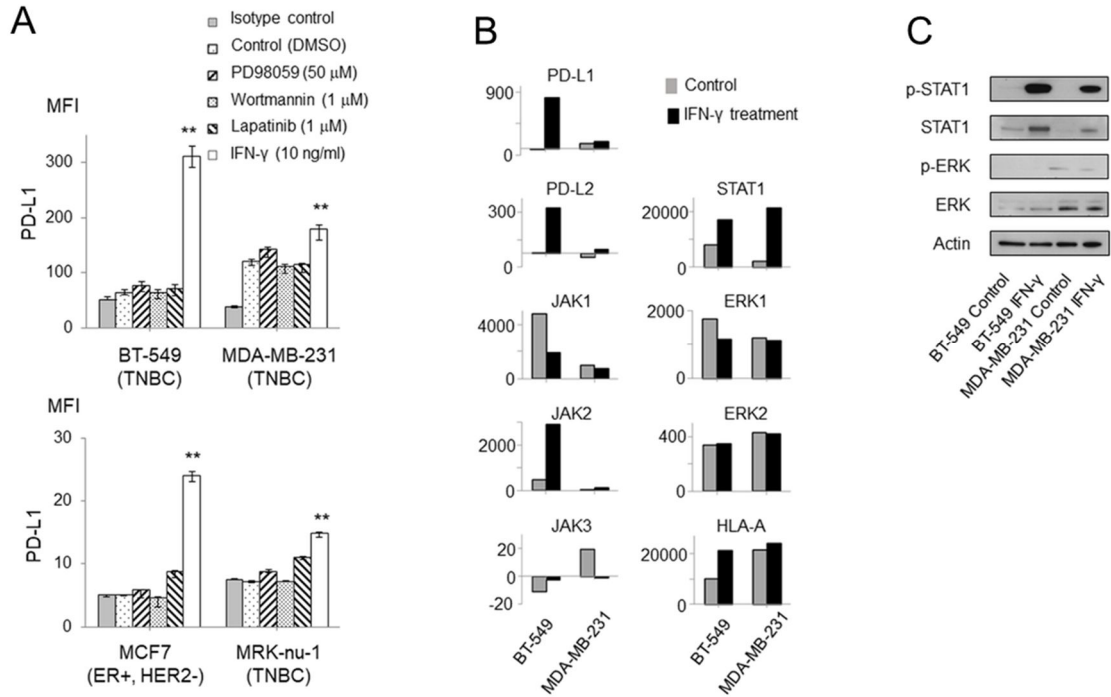
3) 術前化学療法を施行していない乳癌症例 111 例の手術切除標本を用いて、PD-L1、HLA class I、CD8 と IFN- $\gamma$  signaling pathway の1つである phospho-STAT1 (p-STAT1)、の免疫組織染色を行い、各因子間の相関関係を検討した。

## 4. 研究成果

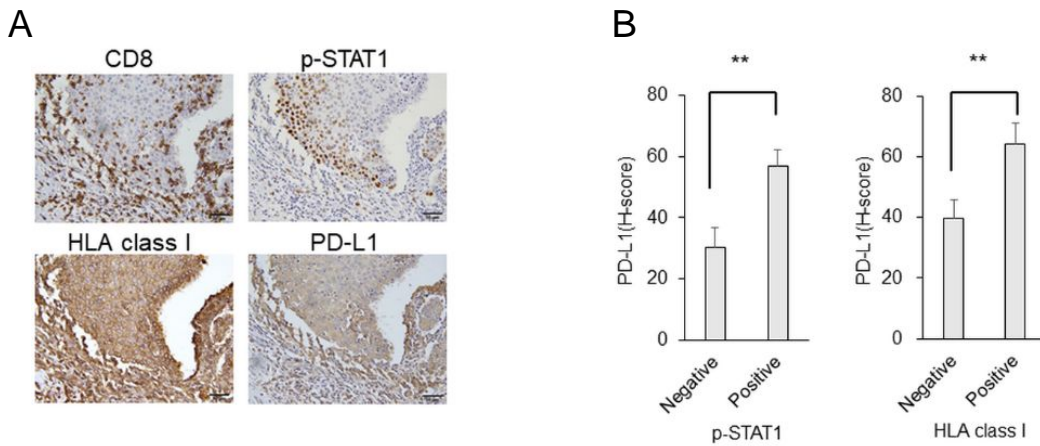
1) TCGA の解析において、PD-L1 (*CD274*) の mRNA 発現レベルと IFN- $\gamma$  signature、CD8 T effector gene signature に有意な正の相関関係を認めた。



2) 乳癌細胞株の解析では、IFN- $\gamma$  負荷時のみ PD-L1 と HLA class I の有意な発現増強を蛋白レベル (flow cytometry) (下図 A) と mRNA レベル (microarray) (下図 B) で認めた。IFN- $\gamma$  負荷時には、p-STAT1 の増強を認めた (下図 C)。



3) 免疫組織染色 (染色例: 下図 A) では、PD-L1 の発現は p-STAT1 陽性症例、HLA-class I 陽性症例においての有意に増強しており (下図 B)、p-STAT1 と HLA-class I の発現においては有意な相関関係を認めた (下図 C)。



**C**

		HLA class I		total
		Negative	Positive	
p-STAT1	Negative	20	5	25
	Positive	41	45	86
total		61	50	111

$\chi^2$  test p=0.004

これらの結果より、phospho-STAT1 (細胞内における IFN- $\gamma$  伝達経路に存在する分子の 1 つ) 陽性乳癌細胞では PD-L1 と HLA class I が共発現していること、腫瘍浸潤免疫担当細胞

から産生された IFN- $\gamma$  により乳癌細胞の phospho-STAT1 が活性化されていること、が示唆された。抗 PD-1 抗体が効果を発揮するためには、癌細胞側に HLA class I と PD-L1 が同時に発現していること、および癌細胞周囲に細胞傷害性 T 細胞が存在することが必須である。本研究結果は、乳癌細胞における phospho-STAT1 発現が、抗 PD-1 抗体のバイオマーカーとなる可能性を示唆している。

乳癌微小環境における PD-L1 の発現機構の 1 つを解明した本申請研究の成果は、進行乳癌症例において、抗 PD-1 抗体を用いた免疫細胞療法の効果増強方法やバイオマーカーの開発に寄与するものである。また、今年度、本研究結果については、国際的な主要学術誌に掲載され(Nakayama Yuko, Mimura Kosaku et al. Phospho-STAT1 expression as a potential biomarker for anti-PD-1/anti-PD-L1 immunotherapy for breast cancer. International journal of oncology. 2019;54(6):2030-2038. )、我々は国内外の主要な学術集会(ESTRO38、第 27 回日本乳癌学会学術総会、第 57 回日本癌治療学会学術集会など)で報告してきた。

現在、我々は、本申請研究中で得られた新たな知見に基づき、乳癌の各組織型(特に小葉癌)における PD-L1 発現機構の解明と乳癌細胞における PD-L1 発現と EMT(epithelial to mesenchymal transition、上皮間葉転換:癌の浸潤や転移に関与している)との関連について研究を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakayama Y, Mimura K, Tamaki T, Shiraishi K, Kua LF, Koh V, Ohmori M, Kimura A, Inoue S, Okayama H, Suzuki Y, Nakazawa T, Ichikawa D, and Kono K	4. 巻 54
2. 論文標題 Phospho-STAT1 expression as a potential biomarker for anti-PD-1/anti-PD-L1 immunotherapy for breast cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 2030-2038
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2019.4779.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 中山裕子, 三村耕作, 河野浩二	4. 巻 46
2. 論文標題 IFN- の観点からみたPD-L1 発現機構と抗PD-1/抗PD-L1抗体のバイオマーカー開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 癌と化学療法	6. 最初と最後の頁 838-840
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mimura K, Yamada L, Ujiie D, Hayase S, Tada T, Hanayama H, Thar Min AK, Shibata M, Momma T, Saze Z, Ohki S, Kono K.	4. 巻 64
2. 論文標題 Immunotherapy for esophageal squamous cell carcinoma: a review.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Fukushima J Med Sci.	6. 最初と最後の頁 46-53.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5387/fms.2018-09	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 中山裕子, 三村耕作, 河野浩二	4. 巻 76/増刊8 食道癌（第2版）
2. 論文標題 免疫チェックポイント阻害薬	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 474-480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mimura Kousaku, Teh Jun Liang, Okayama Hirokazu, Shiraishi Kensuke, Kua Ley-Fang, Koh Vivien, Smoot Duane T., Ashktorab Hassan, Oike Takahiro, Suzuki Yoshiyuki, Fazreen Zul, Asuncion Bernadette R., Shabbir Asim, Yong Wei-Peng, So Jimmy, Soong Richie, Kono Koji	4. 巻 109
2. 論文標題 PD-L1 expression is mainly regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 43 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13424	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mimura Kousaku, Nakayama Yuko, Nakazawa Tadao, Kono Koji.	4. 巻 44
2. 論文標題 Adaptation of Anti-PD-1/Anti-PD-L1 Antibody from the Viewpoint of Analysis of Tumor Microenvironment	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gan To Kagaku Ryoho	6. 最初と最後の頁 981-983
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mimura Kousaku, Kono Koji.	4. 巻 44
2. 論文標題 Therapeutic Cancer Vaccine and Immune Checkpoint Inhibitor	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gan To Kagaku Ryoho	6. 最初と最後の頁 733-736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kosaku Mimura
2. 発表標題 Immunogenic tumor cell death induced by chemoradiotherapy: a clinical point of view
3. 学会等名 ESTR038 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山裕子、三村耕作、白石謙介、井上正行、中田晴夏、大森征人、木村亜矢子、高橋ひふみ、國友和善、中込博、中澤匡男、井上慎吾、市川大輔
2. 発表標題 乳癌におけるPD-L1発現機構
3. 学会等名 第27回日本乳癌学会学総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuko Nakayama, Kosaku Mimura, Kensuke Shiraishi, Masayuki Inoue, Tadao Nakazawa, Shingo Inoue, Koji Kono, Daisuke Ichikawa
2. 発表標題 Phospho-STAT1 expression as a potential biomarker for anti-PD-1/anti-PD-L1 immunotherapy for breast cancer
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山 裕子,三村 耕作,白石謙介,大森 征人,木村 亜矢子,井上 正行,井上 慎吾,中澤 匡男,河野 浩二,市川 大輔
2. 発表標題 乳癌における抗PD-1/抗PD-L1抗体適応症例の検討
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山 裕子,三村 耕作,白石謙介,井上 正行,門馬智之,佐瀬善一郎,大木進司,井上 慎吾,市川大輔,河野 浩二
2. 発表標題 The mechanism of PD-L1 expression in breast cancer
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山 裕子,三村 耕作,中澤 匡男,白石謙介,井上 正行,門馬智之,佐瀬善一郎,大木進司,井上 慎吾,市川大輔,河野 浩二
2. 発表標題 乳癌微小環境におけるPD-L1の発現機構
3. 学会等名 第31回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三村耕作、白石謙介、河野浩二
2. 発表標題 胃癌における抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体の適応について
3. 学会等名 第117回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三村耕作、中山裕子、大森征人、木村垂矢子、井上正行、河野浩二、井上慎吾
2. 発表標題 乳癌における腫瘍微小環境の解析と抗PD-1抗体/抗PD-L1抗体適応症例の検討
3. 学会等名 第25回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中山 裕子,三村 耕作,中澤 匡男,大森 征人,木村 垂矢子,井上 正行,井上 慎吾,河野 浩二,市川 大輔
2. 発表標題 乳癌微小環境におけるPD-L1発現機構
3. 学会等名 第31回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2017年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	中山 裕子 (Nakayama Yuko)  (90769001)	山梨大学・総合研究部・病院助教  (13501)	
連携研究者	井上 慎吾 (Inoue Shingo)  (30221089)	山梨大学・総合研究部・助教  (13501)	
連携研究者	大森 征人 (Omori Masato)  (70722164)	山梨大学・総合研究部・病院助教  (13501)	