

令和元年5月30日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15006

研究課題名(和文) T細胞, B細胞受容体レパトア解析新技術を用いた乳癌治療効果予測モデルの開発

研究課題名(英文) Prediction for treatment in breast cancer using T cell and B cell repertoire analysis.

研究代表者

宮下 穰 (Miyashita, Minoru)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：60710788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：トリプルネガティブ乳癌(TNBC)を対象に、治療前後の乳癌組織を用いて、免疫バイオマーカーの測定を組織上分布も併せて行った。CD8陽性T細胞とPD-L1の発現パターンによって、4つのタイプに分類し、Inflamed/PD-L1negであった症例はInflamed/PD-L1posと比較し予後良好であった(P=0.0365)。ExcludedはImmune desertと比較し同等に予後不良であった(P=0.371)。また、TNBCとHER2陽性乳癌を対象にT細胞レパトア解析を行い、特に術前化学療法施行症例では治療前の多様性や化学療法1コース後の多様性の変化でpCR予測の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の乳癌薬物療法において最も問題となっているのは、追加治療の必要な患者群と追加治療が不要もしくは現治療が過剰である患者群の層別化が不十分であることである。本研究では、術前治療による遺残腫瘍症例における免疫バイオマーカーを検討し今後免疫チェックポイント阻害剤での追加治療が必要な症例を抽出することに成功した。これにより高価な分子標的治療の適応となる症例群が明確となった。また、T細胞レパトア解析では乳癌症例では過去に無いデータを創出した。今後これらのデータがもととなり、腫瘍抗原に反応する特異的なTCRであったり、必要な多様性の程度が明らかになるとと思われる。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the expression pattern of CD8 and PD-L1 for triple negative breast cancer using the tissue material before and after chemotherapy. Breast tumor was categorized into 4 subtypes according to the expression pattern. Patients with Inflamed/PD-L1neg tumor had better prognosis compared with patients with Inflamed/PD-L1pos tumor (P=0.0365). There was no survival difference in patients with between Excluded and Immune desert (P=0.371). We performed comprehensive analyses of T cell receptor (TCR) by using TCR DNA sequencing. Diversity index was also calculated for HER2 positive or triple negative breast cancer at the blood sample which was obtained before and after anthracycline based chemotherapy. As a result, the diversity index could be predictive for the efficacy of chemotherapy in HER2 positive or triple negative breast cancer. The some unique clones might be also predictive for the efficacy of chemotherapy.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 腫瘍免疫 T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トリプルネガティブ乳癌 (triple negative breast cancer, TNBC) の予後改善のために現在最も期待されているのが腫瘍免疫学的アプローチである。腫瘍免疫機構が正常に働くためには主に、腫瘍組織から腫瘍抗原 (Neo-antigen) が放出されること、T 細胞、B 細胞が TCR、BCR を介して腫瘍抗原を認識すること、腫瘍免疫にブレーキをかけている免疫チェックポイントの過剰発現を制御すること、が重要である (*Immunity 2013*)。に関しては近年、免疫チェックポイント阻害剤が多くの癌腫で臨床応用され成果を挙げている。しかし、乳癌では TNBC に対して臨床応用が進められているが、単剤治療の奏効率は 10-20% 程度と低い (*J Clin Oncol 2016*)。この理由として放出された腫瘍抗原を TCR、BCR を介して認識する過程が機能していないため、制御性免疫チェックポイントの阻害が効果的ではないことが挙げられる。

現在汎用されているフローサイトメトリーや免疫組織化学染色では、その検出感度・正確性・定量性の低さから、乳癌腫瘍免疫に重要な特異的 TCR、BCR クローンや TCR、BCR 多様性の程度を解明することは困難である。TCR、BCR の網羅的かつ高感度な解析が可能となれば、腫瘍抗原と TCR、BCR クローンとの 1 対 1、1 対複数、複数対複数の関連性が明らかとなり、癌治療における大きなブレークスルーとなる。それによって腫瘍免疫動態の多寡を生じている原因を正確に予測することが可能となり、正しい薬剤選択に繋がる。

また、化学療法で治療を行い遺残した腫瘍においては治療前と異なった免疫環境になっていることが推察され、そこにおける免疫バイオマーカーを検討することで、今後の適切な追加治療の標的となり得る。

2. 研究の目的

ヒト腫瘍免疫機構において、多様ながん抗原を患者 (宿主) のリンパ球が認識する為には患者個々の T 細胞受容体 (TCR) と B 細胞受容体 (BCR) の多様性が重要とされている。しかし詳細は解明されておらず、その大きな要因に TCR、BCR の網羅的解析技術が無かったことが挙げられる。我々はこれまでに乳癌において種々の腫瘍免疫関連因子とその治療による変化が、治療効果・予後予測に有用であることを証明してきた。さらに新たな TCR、BCR 多様性解析 (レパトア解析) を可能とする基盤を整備した。これらを基に、TCR、BCR 多様性や癌特異的な TCR、BCR クローン、またそれらが治療効果に及ぼす影響を解明することを目的とする。また遺残腫瘍での免疫環境から適切な追加治療の選択を可能とする。

3. 研究の方法

(1) 術前化学療法を施行した TNBC 症例に対して遺残腫瘍における免疫バイオマーカーを免疫染色で検討する。その形態学的な分布からサブタイプに分類し、臨床病理学的因子と対比を行う。

(2) 術前化学療法としてアンスラサイクリン系レジメンを投与した TNBC 症例、HER2 陽性症例において、治療前後の血液 (PBMC) を用いて解析を行った。TCR、それぞれにおいて 196 の V、J 遺伝子を網羅的に解析し、その組み合わせや相補的決定領域 (CDR3) を明らかにする。また 4 つの多様性指数 (Shannon-Weaver index H, Inv.Simpson's index $1/\sum p_i^2$, Pielou's evenness, DE50) を算出し健常人データとの比較を行う。

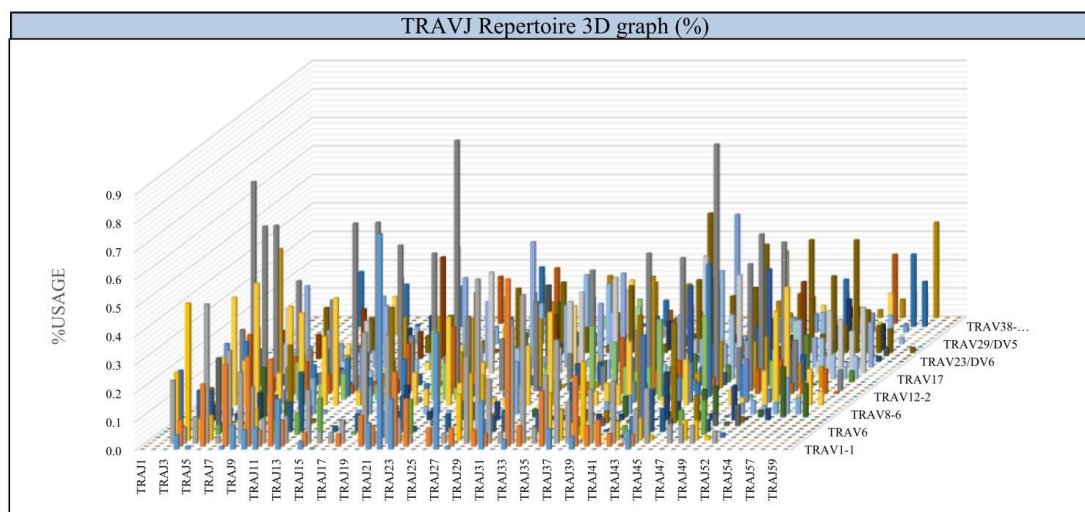
本研究での TCR、の解析は、Total RNA を用いた非バイアス遺伝子増幅をベースとし、次世代シーケンサーは Miseq、ロングリードシーケンス (300bp+300bp) に対応した

V3 試薬の使用によって得られた Fastq データをバイオインフォマティクスソフトにて解析するオールインワンシステムで施行した。

4. 研究成果

免疫染色を用いてトリプルネガティブ乳癌症例を対象に、臨床検体（治療前後の乳癌組織）を用いて、各種免疫バイオマーカーの測定を行った。また、それらの免疫バイオマーカーが実際に組織上で同様に分布しているかの形態学的解析も併せて行った。その結果、細胞障害性 T 細胞のマーカーである CD8 陽性 T 細胞と、最も重要な免疫チェックポイントのひとつである PD-L1 の発現パターンによって、4 つのタイプ（Inflamed/PD-L1pos, Inflamed/PD-L1neg, Excluded, Immune desert）に分類された。NAC 後の遺残腫瘍で Inflamed/PD-L1neg であった症例は Inflamed/PD-L1pos と比較し有意に予後良好であった（ $P=0.0365$ ）。一方で、その後の予後予測であったり、追加治療の必要性を予測できる可能性が示唆された。辺縁にリンパ球浸潤を認める Excluded は、全く認めない Immune desert と比較し同等に予後不良であった（ $P=0.371$ ）。

トリプルネガティブ乳癌症例の術前化学療法開始前のレパトア解析では、計 544,208 のリードが得られ、そのうち 81.6%にあたる 443,858 リードが解析の対象となった。解析対象のうち 73.9%にあたる 327,807 リードが機能性のものと判断され、固有のリードは全体の 3.9%にあたる 12,754 リードであった。多様性の解析は 4 項目で施行した Shannon-Weaver index H, Inv.Simpson's index $1/$, Pielou's evenness, DE50)。Shannon-Weaver index H では 7.360 であり、健常人のそれ（8.929）と比較し低い結果であった。Inv.Simpson's index $1/$ は 995、Pielou's evenness は 0.779、DE50 は 0.029 といずれも健常人と比較し低値であった。続いて TCR γ -V 遺伝子の部位別発現頻度を見てみると、V13-1、V2、V19、V9-2、V26-1 の順で発現が認められた。J 遺伝子の部位別発現頻度は、J45、J22、J4、J6、J20 の順で発現が認められた。また、V-J 遺伝子の組み合わせでその頻度を 3D グラフで示す（図）。さらにこれらに CDR3 の組み合わせで特異的なクローンを見ていくと、1%以上の頻度があるものは無く、最も高くても 0.6%の頻度で V1-J2-CAVRSGSARQLTF であった。



HER2 陽性乳癌における機能的なリード数は TCR α では 113,000-297,000、TCR β では 120,000-195,000 で、固有のリード数は TCR α では全体の 3.5-5.8%、TCR β では全体の 5.0-6.4%であった。V-J-CDR3 の組み合わせで 1%以上の頻度があった特異的なクローンを

見ていくと、TCR , いずれにおいても各症例間に共通したものは認められなかった。また、使用頻度がトップ5のクローンをみても各症例間に共通したものは認められなかった。4つの多様性指数では、各症例とも健常人の多様性指数を大きく下回る結果であった。化学療法前後の比較では、トップ5のクローンが各症例でそれぞれ、20-60%の割合で治療後に入れ替わっていた。また、治療後に多様性指数が上昇・低下するものが混在しており、多様性指数が上昇した症例では著明に腫瘍縮小効果が得られていた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

「2018 年度」

1. Impact of Topoisomerase II α , PTEN, ABCC1/MRP1, and KI67 on triple-negative breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy.
Guestini F, Ono K, Miyashita M, Ishida T, Ohuchi N, Nakagawa S, Hirakawa H, Tamaki K, Ohi Y, Rai Y, Sagara Y, Sasano H, McNamara KM.
Breast Cancer Res Treat. 2018 Oct 10. doi: 10.1007/s10549-018-4985-6.
2. The interaction between carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 and HER2 is associated with therapeutic efficacy of trastuzumab in breast cancer.
Iwabuchi E, Miki Y, Kanai A, Miyashita M, Kijima G, Hirakawa H, Suzuki T, Ishida T, Sasano H.
J Pathol. 2018 Jul 29. doi: 10.1002/path.5148.

「2017 年度」

3. Effects of cytokines derived from cancer-associated fibroblasts on androgen synthetic enzymes in estrogen receptor-negative breast carcinoma.
Kikuchi K, McNamara KM, Miki Y, Moon JY, Choi MH, Omata F, Sakurai M, Onodera Y, Rai Y, Ohi Y, Sagara Y, Miyashita M, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H.
Breast Cancer Res Treat. 2017 Dec;166(3):709-723. doi:10.1007/s10549-017-4464-5.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 発表者名：宮下穰 多田寛 原田成美 濱中洋平 佐藤章子 藤井里圭 飯田雅史 谷内亜衣 石田孝宣
演題名：HER2 陽性乳癌における網羅的 TCR レパトア解析
学会名：第 27 回日本乳癌学会学術総会
日時：2019 年 7 月 11 日
2. 発表者名：宮下穰、多田寛、渡部剛、原田成美、濱中洋平、佐藤章子、内藤剛、海野倫明、亀井尚、石田孝宣
演題名：乳癌術前化学療法の現状と課題 –自験例からの検討-
学会名：第 118 回日本外科学会定期学術集
日時：2018 年 4 月 7 日
3. 発表者名：Minoru Miyashita
演題名：Biology of residual tumor after neoadjuvant chemotherapy
学会名：第 15 回日本臨床腫瘍学会学術集会
日時：2017 年 7 月 28 日

4. 発表者名：宮下穂、杉江知治、平川久、玉城研太郎、鈴木昭彦、多田寛、渡部剛、原田成美、佐藤章子、濱中洋平、石田孝宣
演題名：腫瘍免疫パターンから検討する免疫チェックポイント阻害剤の最適化
学会名：第 25 回日本乳癌学会学術総会
日時：2017 年 7 月 13 日

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。