

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16266

研究課題名(和文) 乳癌における免疫関連細胞の解明と効果予測因子の開発

研究課題名(英文) Development of predictive marker using immune related cell in breast cancer

研究代表者

新倉 直樹 (NIIKURA, Naoki)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：60459469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：予備的検討として行ったTNBCあるいはHER2陽性乳癌症例(9例)について、TILを回収し、フローサイトメトリー解析を行った。同時に末梢血液よりリンパ球を分離し、TILとの性状の差異を確認した。結果として細胞数には大きな差異があるものの、全例の腫瘍塊よりTILが回収された。CD8+ T細胞では、末梢血由来細胞ではほとんどCD39+細胞は検出されないが、TILからは様々な頻度(7-80%)にて検出された。そこで、TIL由来CD8+CD39+ T細胞に着目し、細胞表面上のPD-1および細胞内のTCF-1の発現量を調べた。その結果、TCF-1の発現は、PD-1発現量と逆相関を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去の研究では腫瘍周囲の免疫細胞を免疫染色で評価しているが、その手法には限界があり、T細胞の表面抗原を正確に同定することができない。また腫瘍免疫細胞と同様にDNA、RNAの評価が同一症例で行われた研究が少ないこと、さらに腫瘍周囲の評価と宿主(宿主)側の評価が欠損している。本研究は乳癌の腫瘍内における免疫関連細胞の発現の働き、予後因子、抗がん剤の効果予測因子となるかをヒト乳癌腫瘍サンプルを用いて検討を行い、新しい免疫関連細胞をターゲットにした新規治療薬の開発につながる研究を行っている。乳癌の腫瘍内の免疫細胞の働きを理解する上で重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：In triple negative breast cancer (TNBC) or HER2-positive breast cancer cases (9 cases) that were preliminarily examined, tumor infiltrated lymphocyte (TIL) was collected and subjected to flow cytometry analysis. At the same time, lymphocytes were from the peripheral blood, and TIL were different. Although in CD8 + T cells, almost no CD39 + cells were detected in peripheral blood-derived cells, however these cells were detected in TIL (7 to 80%). Therefore, focusing on TIL-derived CD8 + CD39 + T cells, the expression levels of PD-1 on the cell surface and intracellular TCF-1 were examined. As a result, the expression of TCF-1 showed an inverse correlation with the expression level of PD-1.

研究分野：外科学 乳腺

キーワード：乳癌 免疫 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 乳癌における免疫細胞が予後マーカー、薬剤の効果予測因子として有用であると報告されている。腫瘍のマイクロアレイ解析により immune related gene を基にしたマーカー (Immune related marker) では HER2 陽性乳癌の pCR 率の予測、予後の効果予測、トラスツズマブの効果予測が可能であるとする報告があり (Perez 2015) 我々の研究グループでも術前化学療法のデータセットを使って免疫関連遺伝子 (PD-1, 樹状細胞など) の発現が HER2 陽性乳癌の予後に関連があることを示した。(Iwamoto T, Niikura N et al 欧州臨床腫瘍学会 2013) またトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) においても予後予測が可能であることが示されている。

一方、immune infiltrate lymphocyte (TILs) についても、同様に HER2 陽性乳癌での pCR 率の効果予測、予後の効果予測、トラスツズマブの効果予測、TNBC での予後予測、プラチナ系抗がん剤の効果予測が報告されている。我々の検討で腫瘍内にリンパ球が浸潤する症例では免疫関連遺伝子の発現が上昇することを示した (Kochi M, Niikura N et al Breast Cancer Research and Treatment 2017)。さらに TIL が原発腫瘍と再発腫瘍で変化するかを検討し、再発腫瘍においては TIL が減少することを示した。(Ogiya R, Niikura N, et al Cancer Science 2016)。腫瘍局所へ浸潤している免疫細胞がどのようなものであるかについては未解明の点が多いため、免疫染色を用いた検討 (CD4, CD8, FOXP3, PD-L1, PD-L2, MHC class1) を追加検討し、TIL だけでなく CD4, CD8 陽性の T 細胞も減少していることを示した。

過去の研究では腫瘍周囲の免疫細胞を免疫染色で評価しているが、その手法には限界があり、T 細胞の表面抗原を正確に同定することができない。また腫瘍免疫細胞と同様に DNA, RNA の評価が同一症例で行われた研究が少ないこと、さらに腫瘍周囲の評価と宿主 (宿主) 側の評価が欠損している。

## 2. 研究の目的

(1) そこで今回、我々は乳癌に浸潤している腫瘍内での免疫関連細胞と血液中の末梢血単核球を用いて解析を行い、腫瘍局所環境での免疫状態を解明する。さらに免疫染色を用いた病理学的、遺伝子解析から免疫関連遺伝子との相関を検討する。

乳癌原発腫瘍の凍結検体のサスペンションを行い FACS 解析、CyTOF 解析が可能な状態で保存した凍結検体を国立がんセンター、埼玉医科大学との共同研究として FACS 解析、CyTOF 解析を行う。

また凍結検体、PBMC、腫瘍内での免疫関連細胞の3つのペアマッチサンプルが集まっている症例に対し凍結検体の RNA シーケンスを施行する

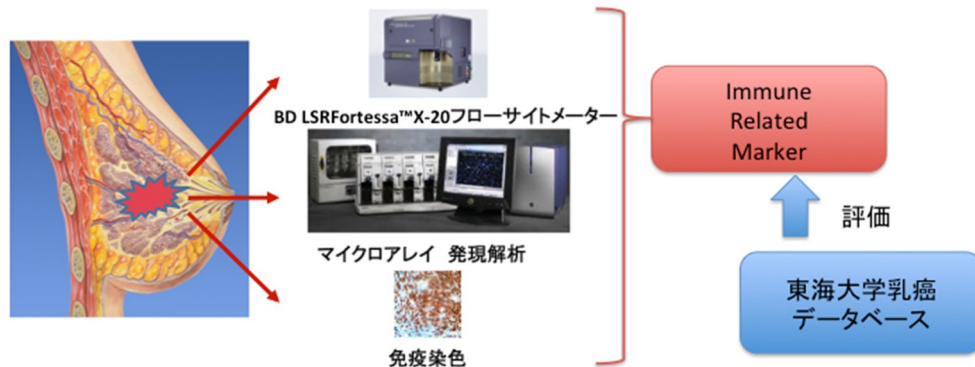
上記の研究成果をもとに、本研究は乳癌の腫瘍内における免疫関連細胞の発現の働き、予後因子、抗がん剤の効果予測因子となるかをヒト乳癌腫瘍サンプルを用いて検討を行い、新しい免疫関連細胞をターゲットにした新規治療薬の開発につなげる研究を行う。

**このような研究はマウスでの報告は有るが人での報告は世界的にもなく、乳癌の腫瘍内の免疫細胞の働きを理解する上で 重要な知見となる。**

## 3. 研究の方法

(1) 乳癌原発腫瘍の凍結検体のサスペンションを行い FACS 解析、CyTOF 解析が可能な状態で保存した凍結検体、ホルマリン固定された検体、術前の末梢血単核球を保存する。

- (2) 凍結保存された検体で国立がんセンター、埼玉医科大学との共同研究としてFACS解析、CyTOF解析を行う。
- (3) また凍結検体、PBMC、腫瘍内での免疫関連細胞の3つのペアマッチサンプルが集まっている症例に対し凍結検体のRNAシーケンスを施行する
- (4) FACS 解析、CyTOF 解析で得られた、乳がん組織と、血液中の免疫細胞の相関とマイクロアレイ発現解析の結果から、予後予測、効果予測となりえる因子の同定、治療ターゲットとなる分子の検討を行い、マイクロアレイ解析から新規の immune related marker を作成し、公共マイクロアレイデータセットを用いて評価する。



#### 4. 研究成果

- (1) 臨床検体については、倫理委員会の承認を経て乳癌原発腫瘍の凍結検体のサスペンションを行い FACS 解析、CyTOF 解析が可能な状態で保存した凍結検体、ホルマリン固定された検体、術前の末梢血単核球を集めるためにさらに追加の時間を要した。合計 63 例の症例、138 検体を集めたうえで、埼玉医科大学との共同研究として FACS 解析、CyTOF 解析を行なっているが、まだ解析が終了していない。
- (2) 3 つのペアマッチサンプルが集まっている症例に対し凍結検体の RNA シーケンスは終了しているが他のデータがそろっていないため、解析は進んでいない。
- (3) 当院で、予備的検討として行った TNBC あるいは HER2 陽性乳癌症例（9 例）について、TIL を回収し、フローサイトメトリー解析を行った。同時に末梢血液よりリンパ球を分離し、TIL との性状の差異を確認した。

結果として細胞数には大きな差異があるものの、全例の腫瘍塊より TIL が回収された。CD8<sup>+</sup> T 細胞は、末梢血由来細胞ではほとんど CD39<sup>+</sup>細胞は検出されないが、TIL からは様々な頻度（7~80%）にて検出され、大腸癌・肺癌にて報告された結果（*Nature* 557:575, 2018）と一致した（図1参照）。そこで、TIL 由来 CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup> T 細胞に着目し、細胞表面上の PD-1 および細胞内の TCF-1 の発現量を調べた。

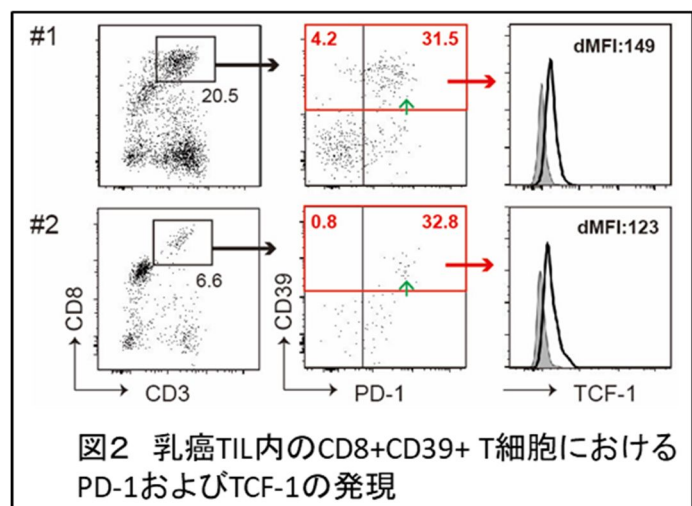


図2 乳癌TIL内のCD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup> T細胞におけるPD-1およびTCF-1の発現

その結果、TCF-1 の発現は、PD-1 発現量と逆相関を示し、PD-1 弱陽性画分（図2、緑矢印より低位）では TCF-1 が高く、PD-1 強陽性画分（同、緑矢印近傍）は低いことが示された。

TNBC あるいは HER2 陽性乳癌組織由来 TIL 中にて、腫瘍応答性細胞障害 T 細胞とされる CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup> T 細胞を検出し、同細胞にて PD-1 と TCF-1 の発現が逆相関することを示した。この結果は、TIL でのフローサイトメトリー解析による CTL/Treg 細胞比に加えて、CD39、PD-1 の発現が、免疫 CP 阻害剤適応症例の選択において、宿主側の免疫 CP 阻害剤応答能を推測するための有用な指標となることが期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iwamoto T, Niikura N, Ogiya R, Yasojima H, Watanabe KI, Kanbayashi C, Tsuneizumi M, Matsui A, Fujisawa T, Iwasa T, Shien T, Saji S, Masuda N, Iwata H.	4. 巻 13343
2. 論文標題 Distinct gene expression profiles between primary breast cancers and brain metastases from pair-matched samples.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50099-y.	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 -

1. 著者名 Ochi T, Bianchini G, Ando M, Nozaki F, Kobayashi D, Criscitiello C, Curigliano G, Iwamoto T, Niikura N, Takei H, Yoshida A, Takei J, Suzuki K, Yamauchi H, Hayashi N.	4. 巻 118
2. 論文標題 Predictive and prognostic value of stromal tumour-infiltrating lymphocytes before and after neoadjuvant therapy in triple negative and HER2-positive breast cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 41-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejca.2019.05.014.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 津田万里, 新倉直樹
2. 発表標題 乳がん患者T 細胞サブセットの詳細な解析方法 の検討
3. 学会等名 日本臨床腫瘍学会 学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ochi T, Niikura N,
2. 発表標題 Predictive and prognostic value of stromal tumor-infiltrating lymphocytes before and after neoadjuvant therapy in triple negative and HER2-positive breast cancer
3. 学会等名 San antonio Breast cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----