

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18073

研究課題名（和文）乳がんにおけるIL17RBの細胞生物学的・腫瘍免疫学的・臨床的意義の解明

研究課題名（英文）Exploring the cell biology, tumor immunology and clinical significance of IL17RB in breast cancer

研究代表者

尾崎 由記範（OZAKI, Yukinori）

公益財団法人がん研究会・有明病院 乳腺内科・副医長

研究者番号：60756683

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：転移・再発性の乳がんを克服することを最終目標に、IL17RB発現の意義を明らかにするために研究を行った。我々はIL17RB強制発現細胞株の樹立に成功し、IL17RB強制発現細胞株はEMTを惹起するとともに、抗がん剤治療に反応してIL33を放出し、これがマスト細胞の浸潤を招いて腫瘍の増殖を促進していることが示唆された。また患者の腫瘍組織を用いた解析ではIL17RB発現の高い腫瘍細胞は高い浸潤能を有し、乳がんの再発に関わっていることが示唆された。以上のことから、乳がん治療においてIL17RB-IL33軸を標的とする臨床的意義が提示され、治療成績の向上に貢献できる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

早期/局所進行乳癌の約3割は再発をきたし、転移再発乳癌は依然として根治不能である。その背景には、がんの上皮間葉転換（EMT）やEMTs制御機構が関わっていると考えられる。乳癌においてIL17RBがEMTや再発にどのように関わっているかを解明することで、乳癌の再発抑制、再発後の転移制御を目指した治療開発が可能となり、乳癌再発の低下や長期生存を目指すことができるようになる。今回我々は、IL17RBが乳癌細胞のEMTを惹起する予後不良因子であり、それを克服するためのIL17RB-IL33軸を標的とした治療開発の臨床的意義を提示することができた。

研究成果の概要（英文）：To explore the way to overcome metastatic or recurrent breast cancer, we conducted research to clarify the significance of IL17RB expression in breast cancer. We have established a cell line with forced expression of IL17RB, which induces EMT and releases IL33 in response to 5FU therapy. And we found this cell induced mast cell infiltration and promoted tumor growth. Analysis of tumor tissues of breast cancer suggested that tumor cells with high IL17RB expression have high invasive potential and is associated with poor outcome of disease-free survival. These findings suggest the clinical significance of targeting the IL17RB-IL33 axis in breast cancer therapy and may contribute to improving outcomes of breast cancer.

研究分野：腫瘍内科

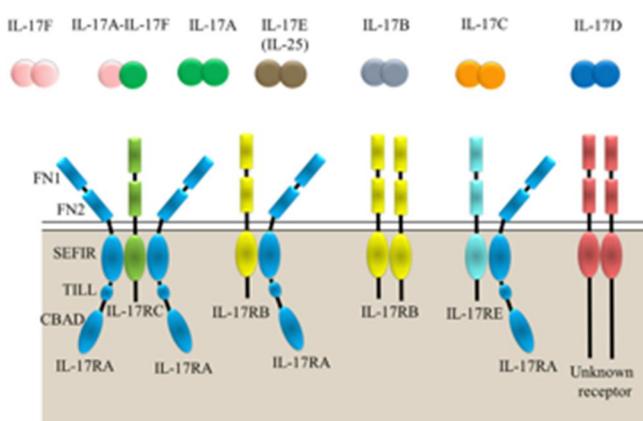
キーワード：乳癌 EMT IL17RB IL33 FSTL1 腫瘍免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国において、乳がん患者は1960年代より徐々に増加し、1995年には胃がんを抜いて女性の悪性腫瘍罹患率第一位となった。乳がんは比較的予後良好ながんとされているが、転移または再発乳がんは根治困難であり、依然として予後不良である。手術不能な局所進行、あるいは転移・再発乳がんに対しては、症状緩和と延命を目的とした薬物療法が治療の主体となる。近年、免疫チェックポイント阻害薬である抗PD-1/PD-L1抗体の開発が様々ながん種で行われている。しかしながら、乳がんに対する抗PD-1/PD-L1抗体単剤の治療成績は不良であり、その奏効率は1割程度と報告されている (Emens et al. JAMA Oncol. 2018)。そのため、抗PD-1/PD-L1抗体とは異なるメカニズムに基づく、より優れた免疫治療の探索が急務である。

近年、乳がんにおけるIL17RBの発現と予後との関連が注目されている。IL17サイトカインファミリーと悪性腫瘍との関連は報告が散見されている。IL17を産生する細胞として主に17型ヘルパーT細胞(Th17)が知られており、Th17と制御性T細胞とのバランスががんや自己免疫疾患に関わっていると報告されている (Knochelmann et al. Cell Mol Immunol.



2018)。IL17A~IL17Fまで6タイプ存在するIL17は、IL17RA~IL17REの5タイプ存在する受容体にそれぞれホモまたはヘテロダイマーを形成して結合し、自己免疫疾患や腫瘍微小環境、治療抵抗性などを制御していることが知られている (Alinejad V et al. Biomed Pharmacother. 2017, Zhu X et al. Breast Cancer Res. 2008)。その中でも、IL17B/IL17RBシグナルの増加は、乳がんの腫瘍増殖や治療抵抗性において重要な役割を担っており、IL17RBの高発現性は予後不良因子であることも報告されている (Huang CK et al. Oncogene. 2014, Chen WC et al. Histopathology. 2013, Laprevotte E et al. Oncotarget. 2017)。しかしながら、IL17RBのがん細胞における生物学的機能は、未だ明らかでない。また、がん細胞に大きな影響を与える乳がん微小環境や免疫ネットワーク機構などのエピジェネティック要因との関連性も明らかでない。つまり、科学的エビデンスが不足しているため、その治療介入も難しいのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は、乳がんでは予後不良因子として注目されている【IL17RB】分子の細胞生物学的・腫瘍免疫学的・臨床的意義を明らかにすることで、IL17RBを標的とした臨床治療の可能性を追究して、その研究基盤を確立することを目指す。

3. 研究の方法

・細胞株を用いた解析

乳がん病態におけるIL17RB分子の発現意義を基礎と臨床の両側面から追究するため、ヒトやマウスの乳がん細胞株を用いて、フローサイトメトリーや免疫染色によりIL17RB

ならびに EMT などに関連する分子群の発現を広範に解析する。IL17RB 高発現細胞株については、siRNA などを用いて分子発現をノックダウンし、細胞の増殖性や浸潤転移性、EMT 関連分子発現などに対する影響を *in vitro*, *in vivo* で広範に比較解析する。逆に、IL17RB 非発現細胞株または IL17RB 低発現細胞株については、レンチウイルスベクターなどを用いて IL17RB を強制発現させ、ノックダウン時と同様に、細胞の発現型や細胞機能の変化を網羅的に解析する。特に、マウス乳がん 4T1 細胞を用いて作製した IL17RB 強制発現細胞株については、同系マウスに移植して *in vivo* における増殖性や転移性などを腫瘍生物学的に比較解析するだけでなく、皮下移植腫瘍組織や脾臓、末梢血、骨髄などにおける様々な細胞集団をフローサイトメトリーで解析し、免疫学的な解析を網羅的に行う。

・臨床検体を用いた解析

一方、基礎実験で見出した分子機序の臨床的意義を明らかにすべく、乳がん患者の腫瘍組織を用いて、IL17RB 発現とその関連分子を免疫染色などで解析し、そのデータと患者の診療データ（年齢、性別、進行期、無再発生存期間や全生存期間など）との関係性を統計学的に解析する。

4 . 研究成果

・ IL17RB の細胞生物学的意義

IL17RB 発現が低レベルのマウス乳がん細胞株 4T1 を用いて IL17RB 強制発現細胞株を作製・樹立し、その形態学的変化、増殖能、接着能、浸潤能を *in vitro* にて評価した。その結果、親株や Mock 株と比較して、IL17RB の強制発現によって、細胞の増殖性と接着性はともに有意に低下し、浸潤性は増強されることが分かった。つまり、IL17RB 発現によって EMT 形質に転じることが示唆された。

樹立した IL17RB 強制発現細胞株を用いて、臨床治療で使用されている様々な低分子阻害剤に対する反応性を *in vitro* 試験で比較評価した。その結果、IL17RB 強制発現細胞株は、IL17RB を発現しない mock 株と比較して、低濃度の薬剤に対してむしろ反応して過増殖を呈し、極めて抵抗性であることが分かった。我々はこれまで、がん幹細胞性の一つとして注目される polyploidy に焦点を当てて研究を進めており、polyploidization 制御分子として IL33 を同定してきたが、IL17RB 強制発現細胞株の核内にも IL33 発現が誘導されていることが分かった。Polyploidy とは、細胞周期を逸脱して巨大化し、治療ストレスに反応して大量の娘細胞を一気に放出する機構であり、我々の結果から、乳がんを高発現する IL17RB は、上皮間葉転換 (EMT) を超えて polyploidization をも制御する機能分子である可能性が示唆された。

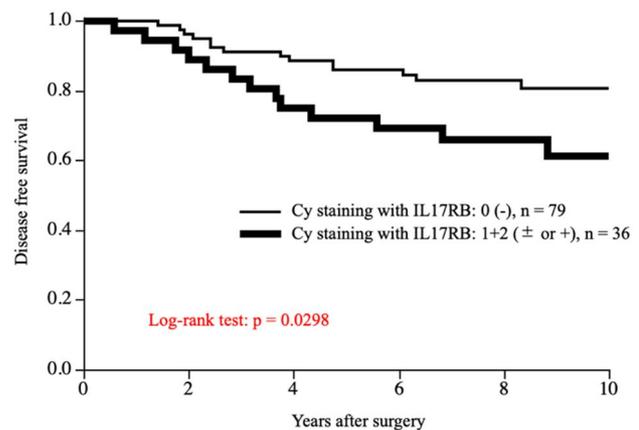
・ IL17RB の免疫学的意義

がん細胞における IL17RB 発現の免疫学的意義を *in vivo* レベルで解析した。IL17RB-TR の腫瘍増殖は、Mock と比較して極めて遅いものの、*in vitro* と同様に、5-Fu 治療ではむしろ Mock 腫瘍以上に増殖は促進されてしまい、その腫瘍内には多数のマスト細胞が浸潤していた。しかし、IL17RB 発現増強に伴って同時に発現してくる IL33 に特異的な阻害抗体を投与すると、マスト細胞の浸潤は有意に減少し、腫瘍増殖も有意に抑制された。つまり、IL17RB-TR は治療に反応して IL33 を放出し、これがマスト細胞の浸潤を招

いて腫瘍の増殖を促進していることが示唆された。

・ IL17RB の臨床的意義

乳がん患者の腫瘍組織切片ならびに臨床情報を 100 症例以上収集し、まずは免疫組織化学染色法で IL17RB 発現を解析し、臨床データとの関係性を比較評価した。その結果、IL17RB の発現パターンは 3 つに分けられ (陰性 69%、弱陽性 23%、陽性 9%) 陰性群に比べて陽性 (弱陽性 + 陽性) 症例群では無再発生存期間が統計学的有意に短いことが分かった (右図)。つまり、乳がん患者の腫瘍組織における IL17RB 発



現は、重要な予後不良規定因子であることが臨床レベルで示唆された。同じ患者の組織を用いて、IL33 の発現を解析した。その結果、IL33 の発現パターンは 4 つに分けられ (陰性 47%、弱陽性 12%、中陽性 32%、強陽性 10%) 低発現性 (陰性 + 弱陽性) と比較して高発現性 (中陽性 + 強陽性) の症例では、統計学的有意に無再発生存期間が短いこと、しかも、IL17RB をも高発現性する症例は、より予後不良であることが分かった。つまり、乳がん患者の腫瘍組織における IL17RB と IL33 の二重発現は、従来法に対する抵抗性を規定する重要なバイオマーカーであることが示唆された。さらに、抗腫瘍免疫で重要な役割を果たす CD8 陽性 T 細胞の浸潤レベルを免疫組織化学染色法で解析した。その結果、CD8 陽性 T 細胞の浸潤レベルは 4 段階 (浸潤なし 39%、低浸潤 39%、中程度の浸潤 21%、高浸潤 1%) に分けられ、低浸潤群 (浸潤なし + 低浸潤) と比較して、高浸潤群 (中程度の浸潤 + 高浸潤) では術後約 5 年までは統計学的有意に無再発期間が長いものの、その後は差が見られなくなること、しかし、IL33 発現レベルと CD8 浸潤レベルは有意な逆相関性を示し、IL33 高発現・CD8 低浸潤症例では術後約 5 年以降も有意に予後不良となることが分かった。IL17RB 発現性とは何も関係性は見られなかった。以上のことから、乳がん治療において IL17RB-IL33 軸を標的にする臨床的意義が提示され、治療成績の向上に貢献できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尾崎由記範、今関洋、下田由季子、木脇圭一、川端英孝、工藤千恵
2. 発表標題 がん転移攻略のための画期的な治療戦略
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------