

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：20101  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2020～2023  
課題番号：20K08935  
研究課題名（和文）トリプルネガティブ乳癌におけるER01-L をターゲットにした複合免疫療法の開発  
  
研究課題名（英文）development of combined immunotherapy targeting ero1 in triple negative breast cancer  
  
研究代表者  
九富 五郎（Kutomi, Goro）  
  
札幌医科大学・医学部・講師  
  
研究者番号：10404625  
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）：本研究では、治療抵抗性のTN乳癌において、過去にその関連性が示唆されている主種の分子を用いて*in vitro*および*in vivo*実験を行った。まずはER01-L 阻害剤誘導体自体の機能解析を行い、実際に阻害自体がノックダウンと同様の事象を示したことを確認した。次にマウスの実験としてER01-L 阻害剤誘導体を用いてER01-L をブロックし、同時に抗PD-L1抗体や抗VEGF抗体を用いたトリプルブロックによる複合免疫療法として治療実験を行い、その結果としてER01-L 阻害剤誘導体、抗PD-L1抗体や抗VEGF抗体を複合して用いることにより抗腫瘍効果を認めた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、治療法の限られているトリプルネガティブ（TN）乳癌の新たな治療標的の発見という点で、次世代のTN乳癌治療の発展に貢献できると考え計画した。乳癌細胞におけるER01-L の発現と悪性度について研究を進められてきた。そのER01-L の発現を阻害することにより癌細胞特異的であり、ER01-L 誘導体阻害剤を用いて、さらに抗VEGF抗体と抗PD-L1抗体を加えることによって、標的をトリプルにすることで強力な免疫複合治療を開発できるという可能性が強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed *in vitro* and *in vivo* experiments with the main species of molecules whose relevance has been suggested in the past in treatment-resistant triple-negative breast cancer. First, we performed functional analysis of the ER01-L inhibitor derivative itself, and confirmed that inhibition itself actually caused events similar to knockdown. Next, we conducted experiments in mice by blocking ER01-L using an ER01-L inhibitor derivative and simultaneously using anti-PD-L1 and anti-VEGF antibodies as combined immunotherapy with a triple blocking target, and the results showed that the ER01-L inhibitor derivative, anti-PD-L1 and anti-VEGF antibodies were effective in blocking ER01-L. The results showed that the combined use of ER01-L inhibitor derivatives, anti-PD-L1 and anti-VEGF antibodies showed anti-tumor effects, which are very important research results as the first step in the development of immunocompound therapy.

研究分野：乳癌腫瘍免疫治療

キーワード：腫瘍免疫 乳癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、乳癌は年間 100,000 人を超える罹患数で、日本人女性の癌腫別罹患数第一位であり、9 人に 1 人が生涯のうちに罹患すると報告されている。乳癌は他の癌腫に比べ、比較的予後良好な癌腫の一つであるが、転移・再発時の予後は不良である。その中でも TN 乳癌はアグレッシブな臨床病理学的特徴(例えば、より大きな腫瘍サイズ、高いグレードの腫瘍、より悪い予後、より早い再発、および高い死亡率)と報告されているが他のサブタイプに比べ有効的な治療法がないのが現状である。そこで、TN 乳癌において有効的な治療法としてエリブリン、ペンプロリズマブに ERO1-L 阻害剤を含めた 3 剤併用療法の開発が難治性治療困難 TN 乳癌の治療成績向上に必須であると考え本研究を想起した。

### 2. 研究の目的

私たちは TN 乳癌症例において、酸化還元酵素 Endoplasmic reticulum oxidoreductin1-L (ERO1-L) の発現が予後不良であることを報告してきた。また免疫チェックポイント分子の代表的リガンドの Programmed cell Death ligand (PD-L1)が ERO1-L のシグナル伝達の下流に存在することを明らかにした。本研究では、ERO1-L 阻害剤を用いて ERO1-L をブロックし、殺細胞性抗がん剤のエリブリンと抗 PD-L1 抗体(ペンプロリズマブ)を用いた 3 剤併用による複合免疫療法を開発し、TN 乳癌の治療成績向上を目指した臨床応用への橋渡し研究への前臨床試験を企図した。

### 3. 研究の方法

In vivo における ERO1-L 阻害剤の proof of concept の獲得

NOD/SCID マウスに TN 乳癌細胞株(MDA-MB231)と ERO1-L をノックダウンした細胞株をそれぞれ接種し、マウスを ERO1-L 阻害剤投与群と非投与群に分け、腫瘍が 120-130mm<sup>3</sup> になったところで、投与群に ERO1-L 阻害剤を投与し、1 週間後にマウスを sacrifice して、PD-L1 の発現の変化を、western blot 法と免疫染色を用い蛋白レベルで検討する。

#### 免疫不全マウスを用いた治療実験

1) NOD/SCID マウスに TN 乳癌細胞株を接種し、腫瘍のサイズが 120-130mm<sup>3</sup> になったところで治療の前日に抗原特異的 CTL クローンを iv する。ここでは、我々が以前より実験を行っている Survivin の CTL クローンを用いる。マウスを Placebo 群、エリブリン投与群、抗 PD-L1 抗体投与群、ERO1-L 阻害剤投与群および 3 剤併用群の 5 群に分け治療実験を行う。薬剤投与後に腫瘍を摘出して免疫染色を行い、HIF-1、PD-L1、ERO-L1 の発現量を調べる。

2) NOD/SCID マウスに TN 乳癌細胞株の ERO1-L をノックダウンした細胞株を接種し、腫瘍増殖能、関連蛋白の発現量を同様に調べる。

#### 腫瘍周囲微小環境の評価

上記治療が腫瘍増殖に与える影響について、腫瘍周囲微小環境に関して評価する。組織レベルでの CTL の浸潤や血管新生などをそれぞれ CD8 および CD31 を用いて評価する。また、CD8+ T cell をフローサイトメーターで分離し、エリスポットアッセイにてペプチド特異的 CTL が誘導されているかを評価する。

### 4. 研究成果

NOD/SCID マウスに TN 乳癌細胞株(MDA-MB231)と ERO1-L をノックダウンした細胞株をそれぞれ接種し、マウスを ERO1-L 阻害剤投与群と非投与群に分け、腫瘍が 120-130mm<sup>3</sup> になったところで、投与群に ERO1-L 阻害剤を投与したところ腫瘍の増殖が抑えられた。

1) NOD/SCID マウスに TN 乳癌細胞株を接種し、腫瘍のサイズが 120-130mm<sup>3</sup> になったところで治療の前日に抗原特異的 CTL クローンを iv する。ここでは、我々が以前より実験を行っている Survivin の CTL クローンを用いる。マウスを Placebo 群、エリブリン投与群、抗 PD-L1 抗体

投与群、ER01-L 阻害剤投与群および3剤併用群の5群に分け治療実験を行ったところ、3剤併用群で最も腫瘍の抑制を認めた。

2) NOD/SCID マウスに TN 乳癌細胞株の ER01-L をノックダウンした細胞株を接種し、腫瘍増殖能をみたところ、腫瘍増殖能は抑えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	島 宏彰  (Shima Hiroaki)  (00404616)	札幌医科大学・医学部・講師   (20101)	
研究分担者	和田 朝香  (Wada Asaka)  (10830151)	札幌医科大学・医学部・研究員   (20101)	
研究分担者	鳥越 俊彦  (Torigoe Toshihiko)  (20301400)	札幌医科大学・医学部・教授   (20101)	
研究分担者	廣橋 良彦  (Hirohashi Yoshihiko)  (30516901)	札幌医科大学・医学部・准教授   (20101)	
研究分担者	竹政 伊知朗  (Takemasa Ichiro)  (50379252)	札幌医科大学・医学部・教授   (20101)	

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
---------	---------