

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08648

研究課題名（和文）独自の遺伝子パネル作成によるトリプルネガティブ乳癌の革新的免疫併用治療戦略の構築

研究課題名（英文）Construction of an innovative immunocombined treatment strategy for triple-negative breast cancer by creating a unique gene panel

研究代表者

池田 直也（Ikeda, Naoya）

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20336861

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）における多様性に着目し、TNBCに対する独自の遺伝子パネルを作成し、各々の分子サブタイプで効果が期待できる薬剤を新たな免疫不活化阻害分子（分子X）と共に用いるといった免疫療法を主軸においた、新たなTNBCの「個別化治療」の礎を構築することを目的とし研究を開始した。CD200及びCD155が分子Xとなる可能性を見出し、ヒト乳癌細胞株を用いたCD200及びCD155阻害によるin vivo抗腫瘍効果の検証を行った。また、マウス乳癌細胞株を用いたCD200及びCD155阻害によるin vivo抗腫瘍効果の検証及び特異的免疫誘導に関する検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トリプルネガティブ乳癌（TNBC）の定義として、HER2陰性、ホルモン受容体陰性の乳癌を全てTNBCと括られている点に大きな問題がある。実はTNBCは多様な癌種が含まれているため、従来の一通りの治療法では対処できない。そのためTNBCの多様性に着目し、TNBC内の分子サブタイプ別に分類するため独自の遺伝子パネルを作成し、各々の分子サブタイプで効果が期待できる薬剤を新たな免疫不活化阻害分子（分子X）と共に用いるといった研究を開始した。本研究は未だ進行中であるが、免疫療法を主軸においた新たなTNBCの「個別化治療」の礎を構築することを目的としたことに学術的意義や社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to establish the foundation for a novel "personalized therapy" for triple-negative breast cancer (TNBC) by focusing on its diversity. We created a unique gene panel for TNBC and initiated research with the main focus on immunotherapy, utilizing a combination of novel immunoinhibitory molecules (referred to as molecule X) and drugs with expected efficacy in each molecular subtype. We identified the potential of CD200 and CD155 as molecule X and verified the in vivo anti-tumor effects of CD200 and CD155 inhibition using human breast cancer cell lines. Additionally, we conducted verification of the in vivo anti-tumor effects of CD200 and CD155 inhibition using mouse breast cancer cell lines and investigated their role in specific immune induction.

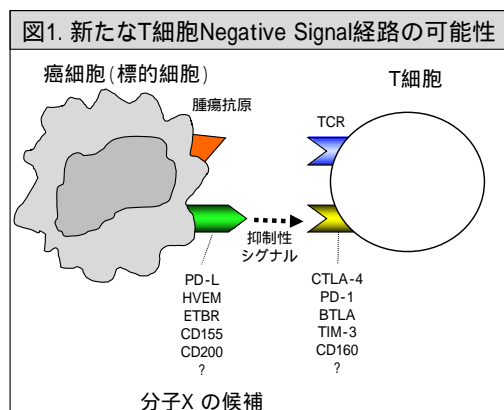
研究分野：乳癌

キーワード：トリプルネガティブ乳癌 分子サブタイプ 遺伝子パネル 免疫療法 個別化治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

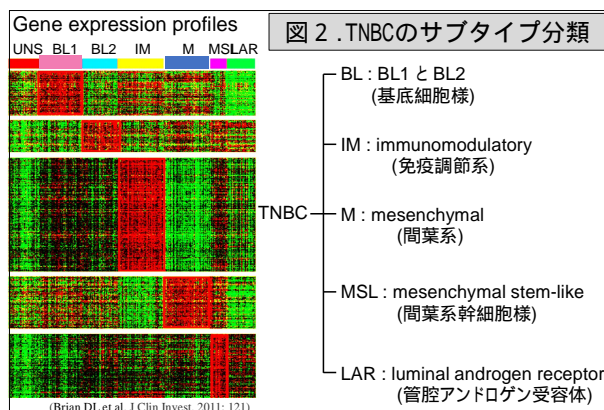
### 1. 研究開始当初の背景

トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) は、生物学的悪性度が高く、高再発率、治療抵抗性から予後不良乳癌として知られている。TNBC は Luminal や HER2 タイプ乳癌と異なり、明確な治療の標的が存在しないことが最大の問題であり、新たな治療法が切望されている。一方、TNBC は、他の乳癌よりも免疫原性が高いことが知られるようになり、免疫不活化経路阻害は、TNBC に対する新たな治療戦略として有望視されている。最近になって、TNBC に対して抗 PD-L1 抗体と抗癌剤の



併用治療が行えるようになったが、その効果は限定的であることから、他に免疫不活化経路阻害経路が存在する可能性があると考えられる (図1)。応募者らは、これまで様々な癌腫に関する臨床研究とともに、免疫を中心とした基礎的研究を精力的に行い、論文発表を行ってきた。特に腫瘍領域において、(1) T細胞の不活化・抑制経路である PD-L/PD-1, B7-H3, HVEM, ETBR 等に関する新たな知見を見だし、それらの臨床的意義、及び新規癌免疫療法の

可能性を世界に先駆けて報告してきた背景がある。一方、近年の全ゲノム遺伝子発現プロファイリング解析によって TNBC の分子サブタイプが複数存在することが報告された。TNBC の分子サブタイプは、BL (BL1 と BL2, 基底細胞様), IM (immunomodulatory 免疫調節系), M (mesenchymal 間葉系), MSL (mesenchymal stem-like 間葉系幹細胞様), 及び LAR (luminal androgen receptor 管腔アンドロゲン受容体), の少なくとも 5 種類の安定な転写サブタイプに



分類できることがわかってきた (図2)。各サブタイプの特徴として、BL1 サブタイプはゲノムが最も不安定なサブタイプで、TP53 変異、及び DNA 修復メカニズムに関わる遺伝子 (BRCA, MDM2, PTEN, RB1, TP53 等) のコピー数減少が高いことが知られており、IM タイプは、免疫シグネチャーと PD1, PDL1, CTLA4 などの免疫チェックポイント阻

害遺伝子の発現レベルが高い特徴を有する。M サブタイプには EGFR 及び Notch シグナル伝達経路が多く認められる。MSL 腫瘍は、遺伝子の安定性が高いにもかかわらず無選別の TNBC 群とは対照的に PDGFR 及び VEGFR に有意な mRNA 過剰発現を示す特徴を有する。LAR 腫瘍には CDK4/6 阻害剤が有効である可能性が示唆される。しかしながら、これらのサブタイプ別 TNBC の特徴と至適治療法との関係についてまだ立証はされていない。これまでのように HER2 陰性、ホルモン受容体陰性の乳癌を全て TNBC とする分類が疑問視されるようになってきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、TNBC におけるこの多様性に着目して、TNBC に対する独自の遺伝子パネルを作成し、各々の分子サブタイプで効果が期待できる薬剤を選別することを第一の目的とした。また、

既知の T 細胞不活化分子以外にも，生体内腫瘍免疫機構において重要な機能を有する他の分子（分子 X）が存在する可能性があり（図 1），PD-1/PD-L1 経路以外の免疫不活化経路阻害の Key 分子となる分子 X の探索・同定を行い，分子 X を用いた免疫療法，並びに分子 X に各サブタイプ別療法を上乗せした，新たな個別化免疫併用化学療法を確立することを第二の目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 新規 T 細胞 Negative Signal 分子 X の探索:

新規 T 細胞 Negative Signal 分子と想定れる HVEM/BTLA-LIGHT，CD155，CD200，CD160，Endothelin B receptor (ETBR)，TIM-3，GAL-9 について，TNBC 切除標本を用いて発現を評価する。各分子の発現と CD45RO 陽性メモリー T 細胞を含む各種腫瘍内浸潤免疫担当細胞との相関及び，予後，再発形式，臨床病理学的因子との関連について解析する。有意な結果が得られたものについては，さらなる選別のため，患者末梢血中の発現についても FACS により解析し，再発，転移，予後に最も影響を及ぼす分子を絞り込む。

図3. 既にサブタイプが判明しているヒトTNBC細胞株

TNBC サブタイプ	代表的細胞株	各々の遺伝子変異
BL	HCC2157	<i>BRCA1 ; STAT4 ; UTX</i>
	HCC1599	<i>BRCA2 ; TP53 ; CTNND1 ; TOP2B ; CAMK1G</i>
	HCC1937	<i>BRCA1 ; TP53 ; MAPK13 ; MDC1</i>
	CAL-851	<i>RBI ; TP53</i>
IM	HCC1187	<i>TP53 ; CTNNA1 ; DDX18 ; HUWE1 ; NFKBIA</i>
	DU4475	<i>APC ; BRAF ; MAP2K4 ; RBI</i>
M	BT-549	<i>PTEN ; RBI ; TP53</i>
	CAL-120	<i>TP53</i>
MSL	HS578T	<i>CDKN2A ; HRAS ; TP53</i>
	MDA-MB-231	<i>BRAF ; CDKN2A ; KRAS ; NF2 ; TP53 ; PDGFRA</i>
LAR	CAL-148	<i>PIK3CA ; RBI ; TP53 ; PTEN</i>
	MDA-MB-453	<i>PIK3CA ; CDH1 ; PTEN</i>

#### TNBC サブタイプ分類のための遺伝子パネル作成:

BL (BL1 と BL2，基底細胞様)，IM (immunomodulatory，免疫調節系)，M (mesenchymal，間葉系)，MSL (mesenchymal stem-like，間葉系幹細胞様)，および LAR (luminal androgen receptor，管腔アンドロゲン受容体) の5種類の分子サブタイプに特徴的な24遺伝子

を全ゲノム遺伝子発現プロファイリング解析の結果より選抜し，独自の遺伝子パネルを作成する。パネルの検証は，既にサブタイプが判明している22種類のヒトTNBC細胞株 (Brian DL et al. J Clin Invest. 2011; 121, 図3) を用いて検証する。作成後は当施設での切除症例TNBC96例の切除標本から核酸を抽出し，独自の遺伝子パネルを用いた次世代シーケンシング (NGS) にてTNBCサブタイプ分類を行い，各々のサブタイプにおける予後，転移再発率，臨床病理学的特徴を評価する。さらに，TNBCサブタイプ別にMEK1/2，PI3K/AKT，EGFR，MSL，CDK4/6等の発現を評価し，その発現と予後，転移再発率，臨床病理学的特徴を検証し，治療効果予測を行う。

#### ヒト乳癌細胞株を用いた新規 T 細胞 Negative Signal 分子 X 阻害による in vivo 抗腫瘍効果の検証:

分子 X の in vivo における抗腫瘍効果を検証するため，各々のヒトTNBC細胞株 (BL，IM，M，MSL，LARタイプ) をNOD.SCID免疫不全マウスに皮下移植し，この分子に対するモノクローナル阻害抗体あるいは siRNA 法による遺伝子ノックダウンにてシグナル伝達阻害を行い，腫瘍縮小効果を評価する。次に，各々のサブタイプで効果が期待できる既存薬剤 (例えば，BLタイプにPARP阻害薬，MEK1/2阻害薬，PI3K/AKT/mTOR経路阻害剤，MタイプにEGFR阻害剤，MSL，LARタイプにCDK4/6阻害薬等) を分子 X に上乗せし，相乗効果を認める組み合わせをスクリーニングする。さらに，分子 X 同様に抗PD-L1抗体 (アテゾリズマブ，デュルバルマブ)，抗PD-1抗体 (ニボルマブ，ペムブロリズマブ) とサブタイプ別既存薬剤の組み合わせも検証する。

## マウス乳癌細胞株を用いた新規 T 細胞 Negative Signal 分子 X 阻害による in vivo 抗腫瘍効果の検証及び特異的免疫誘導に関する検討:

腫瘍縮小効果並びに免疫応答を検証するため、野生型マウス乳癌モデルを用いる。4T1, EMT6, MA-Balb(共にBALB/cマウス由来乳癌細胞株)皮下移植にて作成した正常免疫能を有するマウス乳癌モデルを作成し、マウスにおける分子Xに対する阻害抗体投与を行い、抗腫瘍効果を検証する。阻害抗体が入手できない場合には siRNA 法によって knockdown を行い、治療効果を同様に検証する。治療後には、腫瘍、脾臓、リンパ節から T 細胞を分離、抽出して、CD45RO, CD45RA, CD44, CD62L, CCR7, CD28, CD27 等の発現を解析し、腫瘍抗原特異的免疫応答が誘導し得るかを検証する。さらにリンパ球を用いた ELISPOT にて IFN-g, IL-2, IL-10 の測定を行い、免疫応答活性を測定して、宿主免疫応答の抗原特異的な賦活化の程度を評価する。以上から、in vivo において、分子 X 阻害による 治療抵抗性制御効果、並びに免疫賦活化効果を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### 新規 T 細胞 Negative Signal 分子 X の探索について:

新規 T 細胞 Negative Signal 分子と想定れる HVEM/BTLA-LIGHT, CD155, CD200, CD160, Endothelin B receptor (ETBR), TIM-3, GAL-9 についての絞り込みを行い、CD155, CD200 が TNBC における新規 T 細胞 Negative Signal 分子と評価した。

#### TNBC サブタイプ分類のための遺伝子パネル作成について:

BL (BL1 と BL2, 基底細胞様), IM (immunomodulatory, 免疫調節系), M (mesenchymal, 間葉系), MSL (mesenchymal stem-like, 間葉系幹細胞様), および LAR (luminal androgen receptor, 管腔アンドロゲン受容体) の 5 種類の分子サブタイプに特徴的な 24 遺伝子を全ゲノム遺伝子発現プロファイリング解析の結果より選抜し、独自の遺伝子パネルを作成することを企画し、48 遺伝子まで絞り込んでいるが、24 遺伝子までの絞り込み研究が継続中である。

## ヒト乳癌細胞株を用いた新規 T 細胞 Negative Signal 分子 X 阻害による in vivo 抗腫瘍効果の検証並びにマウス乳癌細胞株を用いた新規 T 細胞 Negative Signal 分子 X 阻害による in vivo 抗腫瘍効果の検証及び特異的免疫誘導に関する検討について:

ヒト乳癌細胞株を用いた CD200 及び CD155 阻害による in vivo 抗腫瘍効果の検証を開始した。CD200 及び CD155 の in vivo における抗腫瘍効果を検証するため、各々のヒト TNBC 細胞株 (BL, IM, M, MSL, LAR タイプ) を免疫不全マウスに皮下移植し、これら分子に対するモノクローナル阻害抗体 (Samalizumab, Anti-PVR / CD155 (Ntx1088)) を用いて腫瘍縮小効果を評価したが、有意な結果は得られなかった。マウス乳癌細胞株を用いた CD200 及び CD155 阻害による in vivo 抗腫瘍効果の検証及び特異的免疫誘導に関する検討腫瘍縮小効果並びに免疫応答を検証するため、野生型マウス乳癌モデル (4T1, EMT6, MA-Balb (共に BALB/c マウス由来乳癌細胞株)) を作成し、マウスにおける抗腫瘍効果を検証する予定であったが、阻害抗体の入手が困難で実験が遅延しているため現在も継続中である。

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 0件）

1. 著者名 Tomoyo Yokotani, Noaya Ikeda, Tomoko Hirao, Yukimi Tanaka, Kohei Morita, Tomomi Fujii, Chiho Ohbayashi, Takashi Nakamura, Toyoki Kobayashi, Masayuki Sho	4. 巻 51
2. 論文標題 Predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes for pathological response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients with axillary lymph node metastasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surg Today	6. 最初と最後の頁 595-604
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-020-02157-6	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 Naoya Ikeda, Takahiro Akahori, Tomoyo Yokotani, Tomomi Fujii, Masayuki Sho	4. 巻 23
2. 論文標題 Total Sealing Technique (TST) with a bipolar vessel sealing system reduces lymphorrhea and seroma formation for axillary lymph node dissection in primary breast cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Surg Open Sci	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.sopen.2024.01.011	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田 直也, 赤堀 宇広, 横谷 倫世, 庄 雅之
2. 発表標題 乳癌腋窩郭清におけるTotal Sealing Technique(TST)の有用性
3. 学会等名 第31回日本乳癌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池田 直也, 赤堀 宇広, 横谷 倫世, 庄 雅之
2. 発表標題 "伝えておきたい"がんの外科治療" Energy Deviceを駆使する乳房全切除術+腋窩郭清術
3. 学会等名 第83回日本臨床外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横谷 倫世, 赤堀 宇広, 池田 直也, 庄 雅之
2. 発表標題 CDK4/6阻害薬の後治療についての検討
3. 学会等名 第123回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横谷 倫世, 池田 直也, 赤堀 宇広, 中村 卓, 小林 豊樹, 庄 雅之
2. 発表標題 CDK4/6阻害薬PD後、次治療についての検討
3. 学会等名 第30回日本乳癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横谷 倫世, 池田 直也, 平尾 具子, 田中 幸美, 森田 剛平, 藤井 智美, 大林 千穂, 小林 豊樹, 中村 卓, 庄 雅之
2. 発表標題 乳癌術前化学療法において腋窩リンパ節転移が陰性化するための効果予測因子の検討
3. 学会等名 第29回日本乳癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横谷 倫世, 池田 直也, 平尾 具子, 田中 幸美, 中村 卓, 小林 豊樹, 森田 剛平, 大林 千穂, 庄 雅之
2. 発表標題 乳癌術前化学療法において腋窩リンパ節転移が陰性化するための効果予測因子の検討
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
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
研究分担者	庄 雅之 (Sho Masayuki)  (50364063)	奈良県立医科大学・医学部・教授  (24601)	
研究分担者	藤井 智美 (Fujii Tomomi)  (50623477)	奈良県立医科大学・医学部・准教授  (24601)	
研究分担者	横谷 倫世 (Yokotani Tomoyo)  (70445055)	奈良県立医科大学・医学部・助教  (24601)	

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