

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2023
課題番号：21K15529
研究課題名（和文）トリプルネガティブ乳癌に対する局所エピジェネティック治療を用いた免疫療法の創出
研究課題名（英文）Development of Immunotherapy for Triple-Negative Breast Cancer Using Local Epigenetic Therapy
研究代表者
大場 崇旦（Oba, Takaaki）
信州大学・学術研究院医学系（医学部附属病院）・助教
研究者番号：90724906
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：トリプルネガティブ乳癌に対するエピジェネティック治療薬の腫瘍内注入による治療開発を目的としたが、エピジェネティック治療薬は保険対象外であり、まずはエピジェネティック治療薬との併用でより効果を上昇させる化学療法剤を同定するために、微小管阻害剤のエリブリンとパクリタキセルが免疫細胞に与える影響の解析を行った。健常者ヒト末梢血単核細胞を活性化させる過程でエリブリンを添加すると、CD8T細胞の増殖が促進されたが、パクリタキセルでは促進されなかった。RNAシーケンスでは、エリブリンは細胞増殖や免疫反応に関連する遺伝子パスウェイの発現上昇が認められたが、パクリタキセルではこれらの変化は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、乳がんに対するキードラッグとして使用されるエリブリンがCD8T細胞の増殖を促進させることが明らかとなった。これにより、エピジェネティック治療薬による腫瘍内注入療法のみならず、実臨床ですでに使用されている免疫チェックポイント阻害剤との併用で、さらにこれらの効果を高めることができる可能性が示唆された。今後、エリブリンと他剤との併用療法による、乳癌の新たな治療戦略の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：In an effort to develop a treatment for triple-negative breast cancer through intratumoral administration of epigenetic therapy agents, we faced the challenge of these agents not being covered by insurance. Thus, our initial goal was to identify chemotherapeutic agents that, when used in combination with epigenetic therapies, would enhance their efficacy. We focused on analyzing the effects of the microtubule inhibitors eribulin and paclitaxel on immune cells. When eribulin was added during the activation process of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors, it notably promoted the proliferation of CD8+ T cells. In contrast, paclitaxel did not exhibit this effect. RNA sequencing analysis revealed that eribulin upregulated gene pathways associated with cell proliferation and immune response, whereas paclitaxel did not induce such changes.

研究分野：乳癌

キーワード：エリブリン 免疫細胞 エピジェネティック治療薬

1. 研究開始当初の背景

乳癌は女性に発生する癌の中で最も頻度が高く、死亡者数も年々増加している。その中でもトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) は悪性度が高く、術後再発率も高い。さらに、TNBC には estrogen receptor、human epithelial growth factor receptor-2 (HER2) が発現しておらず、それらを標的とする内分泌療法や抗 HER2 抗体療法の効果が期待できないため、再発 TNBC に対する治療選択肢は限られ、その予後は不良である。TNBC の予後を改善するための新規治療戦略の開発が求められており、2019 年に TNBC に対し免疫チェックポイント阻害剤 (immune checkpoint inhibitors; ICIs) の使用が可能になったものの、その治療も TNBC に対する効果は限定的で、TNBC に対する ICIs の効果を増強させる治療戦略の開発が喫緊の課題となっている。

ICIs の効果を高める一つの方法として、ヒストン修飾や DNA メチル化を制御するエピジェネティック治療薬 (epigenetic modulator) の全身投与が、腫瘍細胞の MHC-class I や、T 細胞の PD-1 発現の上昇などにより腫瘍微小環境 (tumor microenvironment; TME) を変化させることで、ICIs 抵抗性の腫瘍を ICIs 反応性に変えることが報告されているが、epigenetic modulator の全身投与は、TME にだけでなく全身的反応も引き起こすため有害事象も多いという問題がある。

一方、薬剤による TME 変化誘導効率をよくするための薬剤投与方法として、薬剤を腫瘍内に直接注入する intratumoral approach が注目されている。Intratumoral approach では薬剤を直接 TME 内に投与できるため、全身投与と比べてより少ない投与量で、同等もしくはそれ以上の TME を変化させる効果を誘導でき、さらに局所への投与となるため、全身的な有害事象が軽減できる。

2. 研究の目的

本研究では、体表に近い部位に発生するため intratumoral approach が容易という乳癌の特徴を活かし、エピジェネティック治療薬の腫瘍内投与により TME の変化を誘導し、TNBC を ICIs 反応性に変化させる可能性を検証し、臨床応用への可能性を探索することを目的とした。しかし、エピジェネティック治療薬は皮膚悪性リンパ腫などに対しては保険収載されているものの、乳癌に対しては未だ保険収載に至っていない。実臨床においては、TNBC に対し、ICIs は化学療法剤と併用して用いられており、まずは ICIs との併用でその効果をより誘導できる化学療法剤を同定することが、TNBC に対するよりよい治療の構築に繋がると考えられる。近年、化学療法剤の単独での治療において、末梢血中のリンパ球数やリンパ球/好中球比が、エリブリンやパクリタキセルなどの化学療法剤の治療効果予測因子となることが報告されており、化学療法剤が腫瘍細胞に対する直接的な殺細胞効果だけでなく、投与された患者の免疫機構にも何らかの作用を及ぼしている可能性が考えられており、その詳細なメカニズムを解明することで腫瘍宿主の免疫機構に最もよい影響を及ぼす化学療法剤を同定でき、最適な ICIs との併用療法の構築ができる可能性がある。

本検討では局所エピジェネティック治療開発の前段階として、免疫細胞に最もよい影響を与え、ICIs の効果を増強する化学療法剤を同定するために、微小管阻害剤であるエリブリンとパクリタキセルが免疫細胞に及ぼす効果について解析した。

3. 研究の方法

(1) ヒト TNBC 細胞株 (MDA-MB-231、Hs578T) を用いて、エリブリン、パクリタキセルの細胞増殖に与える影響を増殖アッセイで解析した。

(2) 健常者の血液から末梢血単核細胞 (Peripheral blood mononuclear cells; 以下 PBMC) を分離し、抗 CD3 /CD28 抗体を用いて in vitro で6日間活性化すると同時にエリブリン、パクリタキセルを添加し、細胞増殖を増殖アッセイで解析した。回収した活性化 PBMC の表面マーカーをフローサイトメトリーで解析した。

(3) Balb/c マウスの脾臓細胞を採取し、抗 CD3 /CD28 抗体、IL-7、IL-15 を用いて in vitro で6日間活性化すると同時にエリブリン、パクリタキセルを添加し、細胞増殖を増殖アッセイで解析した。回収した活性化脾臓細胞の表面マーカーをフローサイトメトリーで解析した。

(4) MDA-MB-231、Hs578T を用いて、上記(2)で活性化した PBMC との共培養(エリブリン、パクリタキセルも同時に添加)を行い、化学療法剤が T 細胞の殺細胞能に与える影響を、共培養後に TNBC 細胞株の細胞数を計測し、解析した。

(5) 本研究計画は信州大学医学部附属病院倫理委員会にて審査され、承認を得ている(承認番号 5336)。

4. 研究成果

(1) エリブリン、パクリタキセルのヒト TNBC 細胞に対する抗腫瘍効果

MDA-MB-231、Hs578T にエリブリン、パクリタキセルを 3 日間添加し、増殖アッセイを行った。エリブリンの 50%増殖阻害濃度は MDA-MB-231 で 1.04nM、Hs578T で 1.47nM、パクリタキセルは MDA-MB-231 で 1.32nM、Hs578T で 0.54nM であった。

(2) ヒト PBMC 活性化の過程でエリブリン、パクリタキセルが細胞増殖に与える影響

エリブリン、パクリタキセルはそれぞれ約 1nM で TNBC 細胞に対して抗腫瘍効果を示すため、以後の PBMC 活性化の際に添加する薬剤濃度を両薬剤ともに 1nM に設定した。健常者から採取したヒト PBMC の活性化と同時に、エリブリン、パクリタキセルを添加し、細胞増殖を解析したところ、パクリタキセル投与では対照に比べ細胞増殖が抑制されたが、エリブリン投与では抑制されなかった(図 1)。

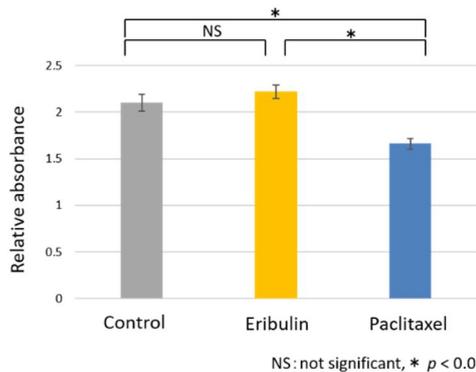


図 1 ヒト PBMC 活性化の過程でエリブリン、パクリタキセルが細胞増殖に及ぼす効果

(3) ヒト PBMC 活性化の過程でエリブリン、パクリタキセルが T 細胞の分化に与える影響

活性化 PBMC の表面マーカーをフローサイトメトリーで解析したところ、CD3⁺細胞中の CD4⁺/CD8⁺細胞比は、パクリタキセル投与では対照と比べて差は認めなかったが、エリブリン投与により有意に低下した(図 2A)。

また、CD8T 細胞中の CD45RA、CD45RO の発現を解析したところ、パクリタキセル投与では対照と比べ差は認めなかったが、エリブリン投与により CD45RA⁺ CD45RO⁻細胞比が有意に上昇した(図 2B)。

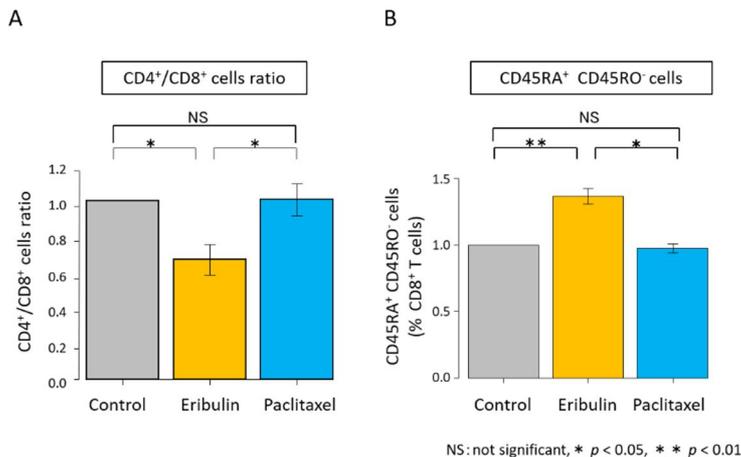


図 2 ヒト PBMC 活性化の過程でエリブリン、パクリタキセルが T 細胞の分化に与える影響

(A) CD4⁺/CD8⁺細胞比(CD3⁺細胞中)、(B) CD45RA⁺CD45RO⁻細胞の割合(CD3⁺ CD8⁺細胞中)

(4) マウス免疫細胞活性化の過程で T 細胞の増殖にエリブリン、パクリタキセルが与える影響
マウス脾臓細胞の活性化と同時に、エリブリン、パクリタキセルを添加し、細胞増殖を解析したところ、パクリタキセル投与では対照と比べ細胞増殖に差を認めなかったが、エリブリン投与により細胞増殖が促進された(図 3A)。

活性化脾臓細胞の CD45⁺細胞中の CD3⁺細胞比は、パクリタキセル投与では対照群と比べて差は認めなかったが、エリブリン投与により有意に上昇した(図 3B)。

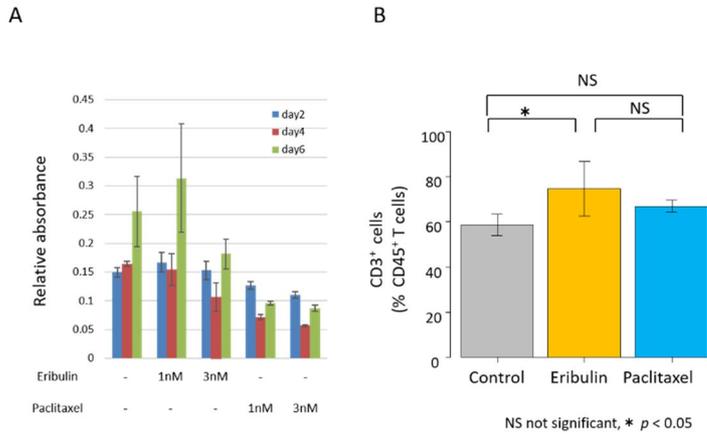


図3 マウス免疫細胞活性化の過程でT細胞の増殖にエリ布林、パクリタキセルが与える影響 (A) 活性化後6日目の細胞増殖、(B) CD3⁺細胞の割合(CD45⁺細胞中)

(5) ヒト TNBC 細胞に対する活性化 T 細胞の殺細胞効果にエリ布林、パクリタキセルが与える影響

上記の結果から、エリ布林が CD8T 細胞の増殖を促進させることで、腫瘍細胞に対する T 細胞の抗腫瘍効果を高める可能性が推測されたため、MDA-MB-231、Hs578T と活性化ヒト PBMC との共培養にエリ布林、パクリタキセルを添加することで、これらの化学療法剤が T 細胞の殺細胞効果に与える影響を解析したところ、エリ布林の添加により MDA-MB-231、Hs578T に対する活性化ヒト PBMC の抗腫瘍効果の増強が認められた(図4)。

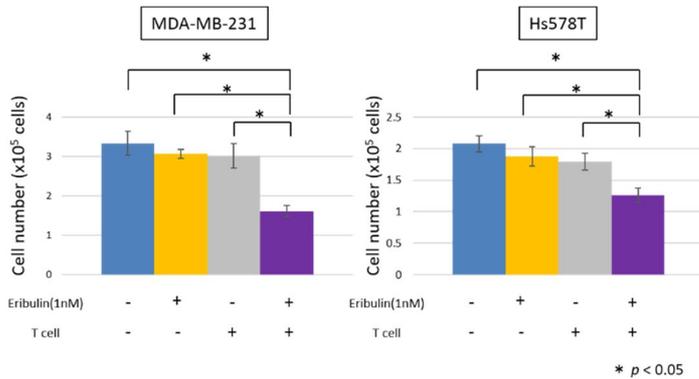


図4 ヒト TNBC 細胞に対する活性化 T 細胞の殺細胞効果にエリ布林、パクリタキセルが与える影響

考察

本検討では局所エピジェネティック治療開発の前段階として、ICIs との併用で用いられる薬剤として最適な化学療法剤を同定するために、エリ布林、パクリタキセルが免疫細胞に及ぼす影響についての解析を行った。

本検討の結果から、エリ布林はヒト PBMC の活性化の過程において CD8T cell 優位の増殖を促進させ、さらにマウスの T 細胞の増殖促進効果も有する可能性が示唆された。

近年、CD8T 細胞の中で、長期生存可能でかつ自己複製能をもつ stem cell memory T 細胞 (CD45RA⁺CD45RO⁻) が注目されている。この細胞は、活性化刺激により effector memory T 細胞 (CD45RA⁻CD45RO⁺) へと分化していくが、stem cell memory T 細胞を増やすことが、腫瘍免疫を増強させる鍵となることが報告されている (6)。本検討の結果から、エリ布林が T 細胞の effector T cell 細胞への分化を抑制し、stem cell memory T cell を増やす効果を有している可能性が示唆された。

さらに、CD8T 細胞中は抗腫瘍免疫の中心的な役割を担っているため、エリ布林による CD8T 細胞の増殖促進によって、T 細胞による抗腫瘍効果の増強される可能性が考えられるが、本研究での共培養アッセイでの結果はその仮説を支持するものと考えられた。

本検討の結果から、エリ布林が T 細胞の増殖や分化の過程で抗腫瘍効果を高める方向に作用し、ICIs との併用薬剤として有用である可能性が示された。本研究課題の目的である、局所エピジェネティック治療を利用した新たな免疫療法の開発においてもエリ布林の併用により効果を高めることができる可能性があり、今後、さらに局所エピジェネティック治療の開発研究を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Shimizu Tadafumi, Oba Takaaki, Oshi Masanori, Ito Ken-ichi	4. 巻 203
2. 論文標題 Eribulin promotes proliferation of CD8+ T cells and potentiates T cell-mediated anti-tumor activity against triple-negative breast cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Breast Cancer Research and Treatment	6. 最初と最後の頁 57 ~ 71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10549-023-07111-x	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水忠史、大場崇旦
2. 発表標題 Analysis of the effect of Eribulin on tumor immunity against triple negative breast cancer
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水忠史、大場崇旦
2. 発表標題 Analysis of the effect of Eribulin on tumor immunity against triple negative breast cancer
3. 学会等名 第30回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水忠史、大場崇旦
2. 発表標題 Analysis of the effect of Eribulin on tumor immunity against triple negative breast cancer
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
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
---------	---------