

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461980

研究課題名(和文) 乳癌に対するトラスツズマブ効果予測因子としてのニューロピリン1陽性免疫細胞の意義

研究課題名(英文) A role of NRP-1 expressing immune cells in predictive factor of trastuzumab treatment for breast cancer.

研究代表者

鈴木 栄治 (Suzuki, Eiji)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00612897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：NRP1はマクロファージの運動能並びにケモカイン分泌を上方制御することを示した。また、ヒト化マウスモデルではNRP1ノックダウンマクロファージの注射では、NRP-1が正常なその注射と比較して抗腫瘍活性と腫瘍内への免疫細胞浸潤が減弱することを示した。さらに、腫瘍浸潤免疫細胞(TILs)においてはCD4+T細胞においてNRP-1が発現していることを示した。これはin vitro実験でCD4+T細胞のNRP-1発現がマクロファージからNRP-1のprotein transferによって誘導されることを示した。HER2+乳癌患者において、NRP-1陽性TILsは有意に良好な臨床結果と相関した。

研究成果の概要(英文)：We show that NRP-1 on macrophages regulated the migration of and chemokine secretion from macrophages in vitro. Furthermore, in vivo studies using a humanized mouse model showed that NRP-1 knockdown of macrophages in adoptively transferring peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) suppressed anti-tumor activity and infiltration of CD45+ immune cells into tumors. Interestingly, NRP-1 expressing TILs were mainly CD4+ T cells, despite little expression of NRP-1 on CD4+ T cells in PBMCs. We found that NRP-1 expression on CD4+ T cells was induced by NRP-1 transfer from macrophages to T cells. In HER2+ BC patients, NRP-1 expressing TILs correlated with better clinical outcomes. These results demonstrate that NRP-1 expressing macrophages are key subsets of immune cells in trastuzumab-mediated anti-tumor activity and may predict better outcomes for HER2+ BC patients.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 腫瘍微小環境 ニューロピリン トラスツズマブ HER2

1. 研究開始当初の背景

腫瘍微小環境における免疫細胞の役割は腫瘍細胞の傷害活性:antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) 腫瘍血管新生の調節 腫瘍細胞の増殖、転移能への正負の調節などがあげられる(Kerbel RS, NEJM 2008)。免疫細胞に影響を与えるタンパク質として腫瘍細胞あるいは 間質細胞(腫瘍浸潤 regulatory T cell、線維芽細胞など)などから分泌される VEGF や Semaphorin(SEMA) (Catalano A, J Immunol 2010) などが考えられる。

VEGF や SEMA のレセプターとして VEGFR1,2,3 そしてニューロピリン(NRP)-1 がまた関連レセプターとして Plexin A1などがある。それらリガンドレセプター結合パターンやレセプター以下のシグナルの選択性は多様で、それぞれのパターンにより機能も異なってくるものと思われる。

実際に健常者の単球を NRP-1 陽性細胞と陰性細胞にわけて sorting すると、VEGF 添加の有無によって単球の ADCC 活性は NRP-1 陽性細胞が陰性細胞に比べ強い傾向を示した。さらに単球の形態を観察すると NRP-1 陽性細胞と陰性細胞とは異なった分化パターンを示すことが示唆された。

以上から腫瘍微小環境における免疫細胞は VEGF, SEMAなどにより機能、分化の調節がなされており、そのレセプターである VEGFR1,2,3,NRP-1,Plexin A1の発現状況やその遺伝子多型が重要な役割をもつことが示唆された。

さらに試験的臨床研究において、乳がん患者の単球におけるそれぞれのレセプター発現状況をFACSで解析すると個体間での多様性が示唆され、また化学療法により単球NRP-1発現が制御されていることも示唆された。また林らは、骨髄由来単球/マクロファージ前駆細胞が receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)によってそのNRP-1発現が抑

性されるが、NF κ B阻害剤で解除されると報告している(Hayashi et al. Nature 2012)。NF κ Bは化学療法により活性化されるとの報告もあり、トラスツズマブと併用される化学療法ならびに新規骨転移治療薬であるRANKL阻害剤デノスマブの単球 NRP-1 発現制御は HER2 陽性乳癌に対するトラスツズマブ治療効果に影響を及ぼすことが示唆される。

本研究ではこれまで述べてきた背景をもとに、トラスツズマブ治療効果に関わる免疫反応側面の分子機構について NRP-1 を中心に解析し、その結果を臨床応用するのみならず治療効果増強への新規治療法開発のための基礎となる研究を目指す。

2. 研究の目的

HER2 陽性乳癌を対象に、トラスツズマブ治療効果に関わる免疫反応側面の分子機構について特に NRP-1 発現免疫細胞の意義を基礎研究と臨床研究の両面から明らかにする。また得られた結果を臨床応用するのみならず治療効果増強への新規治療法開発のための基礎となる研究を目指す。

3. 研究の方法

(1)NRP-1 発現免疫細胞のプロファイルを確認する。(2)NRP-1 発現免疫細胞の役割を *in vitro* 及び *in vivo* において検証する。(3)NRP-1 発現免疫細胞の役割を臨床上の意義に関連して解析する。

4. 研究成果

ニューロピリン-1 は単球由来マクロファージに発現し、腫瘍局所において CD4 陽性 FOXP3 陰性 T 細胞に発現する

末梢血単核球中のニューロピリン-1 発現をフローサイトメータ、ウエスタンブロット、qRT-PCR にて確認したところ、単球由来マクロファージにのみ強く発現していることを発見した。一方腫瘍局所においてニューロピリン-1 は TII 中の CD4 陽性 FOXP3 陰性 T 細胞にのみ強く発現していた。

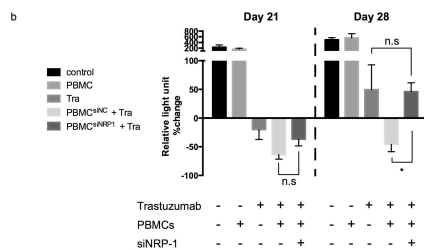
マクロファージに発現するニューロピリン-1 は細胞間接触により CD4 陽性 T 細胞を活性化する

in vitro においてニューロピリン-1 発現マクロファージとナイーブ CD4 陽性 T 細胞を共培養行った。結果、両細胞が直接接触する

条件のみにおいてナイーブ CD4 陽性 T 細胞は活性化された。さらにタイムラプス解析において、直接接合する際に、マクロファージ膜上のニューロピリン-1 分子が CD4 陽性 T 細胞上に移動することが確認された。

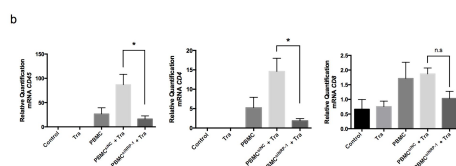
ニューロピリン-1 をノックダウンする事により、抗体依存性の抗腫瘍効果は減弱するマウスに移植するマクロファージのニューロピリン-1 を siRNA によりノックダウンを行った。ノックダウン群のマウスに対する抗体依存性抗腫瘍効果は非ノックダウン群に対して有意に減弱することを確認した (図 1)

図1 Anti-tumor activity decreased by knockdown of NRP-1



更にノックダウン群では TIIIs 上のニューロピリン-1 陽性 CD4 陽性 T 細胞が有意に減少した (図 2)。この結果からマクロファージ上

図2 Knockdown of NRP-1 suppressed CD4+ TIIIs



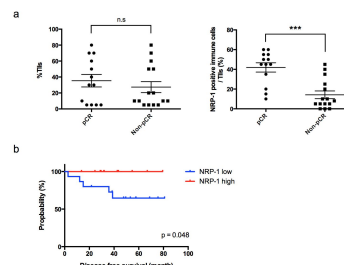
のニューロピリン-1 は、CD4 陽性 T 細胞の活性化を介して抗体依存性抗腫瘍効果に寄与する事が示唆された。

ニューロピリン-1 陽性 TIIIs は抗 HER2 療法の効果予測因子となりうる

京都大学の組織バンクシステムを利用して術前化学療法として抗 HER2 療法を行った

28 症例を初期解析として検討した。結果、治療前のニューロピリン-1 陽性 TIIIs は抗 HER2 療法の効果並びに予後と相関を示した (図 3)

図3 NRP-1 positive TIIIs may predict ADCC activity in HER2+ breast cancer patients



5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

Eiji Suzuki et al. Proteomics analysis of breast cancer cell -specific proteins that are transferred to immune cells via trogocytosis. AACR 2016.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木栄治 (Eiji Suzuki)

京都大学 医学(系)研究科(研究院)乳
腺外科 助教

研究者番号：00612897

(2)研究分担者

佐藤史顕 (Fumiaki Sato)

京都大学 医学(系)研究科(研究院)乳
腺外科 准教授

研究者番号：20467426

(3)連携研究者

()

研究者番号：