

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460655

研究課題名(和文) 乳腺髄様癌における腫瘍浸潤リンパ球の役割の解明

研究課題名(英文) To clarify the role of tumor infiltrate lymphocytes in mammary medullary carcinoma

研究代表者

荒川 敦 (ARAKAWA, Atsushi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70245695

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)：初年度では、非常にまれな乳腺髄様癌という特殊型の新鮮凍結検体の入手に困難を極め、2年次は、対象群の通常型浸潤性乳管癌のリンパ球浸潤について調べた。最終年次は、対象群となった浸潤性乳管癌の中でもいわゆるトリプルネガティブ乳癌症例という予後不良グループの中でリンパ球の浸潤がある症例は、ない症例に比べ予後が良いという事実からこの2群における抽出をHE染色のみでし、その後DNA抽出精製をし精度の高いDNAを獲得しリアルタイムPCRでQuality controlし、増幅、共通定量し、tumor driverとして報告ある遺伝子に対し、網羅的に変異解析を行い、リンパ球浸潤癌に特異な遺伝子変異を検討した。

研究成果の概要(英文)：On first year, we could not get fresh frozen specimen, because of its rare special type of breast cancer. On our second year, we evaluated lymphocyte infiltrate pattern of conventional invasive ductal carcinoma as control group. In last year, we focus triple-negative breast cancer (negative hormon (estrogen and progesterone) receptor and HER2 negative), which is the worst prognostic group and have no therapeutic choice. We picked up two groups; much of tumor infiltrate lymphocytes and no lymphocytic infiltrate group in triple-negative breast cancer, searched by pathologist on HE sections only. DNA extraction and purifying by using QIAGEN FFPE tissue kit quality control and amplified by Real-time PCR. We tested gene mutation specifying lymphocytic infiltrate breast cancer by comprehensive mutation analysis.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 乳腺髄様癌 腫瘍浸潤リンパ球 トリプルネガティブ乳癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 髄様癌は独特の生物学的特徴を持つ髄様癌は乳癌の中で特殊型に分類される。ホルモン感受性は陰性で核異型度や細胞増殖マーカーも高く(いずれも予後不良因子)、一見悪性度が高い乳癌の様相を呈する。当院髄様癌手術症例18例でも80%がホルモン感受性陰性(乳癌全体の平均は30%程度)、悪性度の1つの指標である核異形度は61%で高く(同10%以下)細胞増殖マーカーのKi67も94%が高値であった。しかしながら髄様癌は非常に良い予後を示し(Cancer, 1977)、そのため通常は乳癌の術後に投与される再発予防目的の抗がん治療を省略すべきとの意見が多いほどである。前述の当院の18例も現在のところ一人も再発をみとめていない(観察期間中央値5年半)。なぜ髄様癌がこのような特徴を示すのか20-30年以上前から模索されてきたが、その理由は未だに明確にはされていない。

(2) 髄様癌は著明なリンパ球浸潤を伴う髄様癌の特徴的な病理所見として腫瘍内に著明なリンパ球浸潤を伴うことが挙げられる。一般的に患者自身の腫瘍免疫が癌の浸潤・転移を抑制しうることが指摘されているが(図1)(Science, 2011)、実際髄様癌の癌細胞が免疫の攻撃を受けやすい性格を持つこと(Cancer Res, 2006)やアポトーシス(細胞死)におちいりやすい可能性が報告されている(Cancer Res, 2006, J Pathol, 2005)。また腫瘍中の腫瘍浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocytes、以下TILs)については、制御性T細胞の割合が多いという報告がある(Histopathology, 2008)。しかしこれらはいずれも免疫染色による検討であり、例えば最近では制御性T細胞をどの蛋白で定義するか自体で意見が分かれるなど、その評価には限界がある。そこで本研究ではより本質に迫るため腫瘍から抽出したTILs

をフローサイトメトリーで解析することにより、細胞表面、細胞内マーカーだけでなく、サイトカイン産生能を含めた機能面で検討することを計画した。

図1 腫瘍免疫のメカニズム

2. 研究の目的

(1) 何をどこまで明らかにするか
髄様癌におけるTILsの詳細をマルチカラーフローサイトメトリーによって明らかにする
癌細胞側の特徴についても癌幹細胞性等を含めた解析を同時に行う

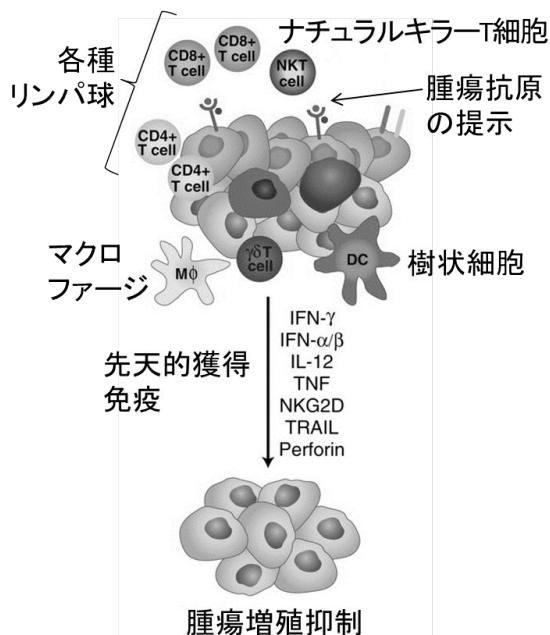
乳癌の転移制御機構として一般化できるかを免疫染色により明らかにする

(2) 本研究の独創性と意義

本研究では手術時に採取した癌組織からリンパ球を分離し、フローサイトメトリーによる分析を行うことで、髄様癌における腫瘍浸潤リンパ球の実態を解明する。本研究では腫瘍局所での免疫応答のしくみを明らかにすることができるため、これまでに報告されてきた臨床情報や免疫染色所見から得られた様々な情報よりもさらに詳細な解析が可能であり、髄様癌以外の乳癌治療に発展できる可能性がある。これまででは、髄様癌についての過去の研究は主に癌細胞側の免疫染色中心に行われてきた。免疫染色では使用できる抗体に限りがあること、機能面での解析ができないこともあり、限られた解析しかできなかった。本研究ではリンパ球側に注目しフローサイトメトリーで凍結前の検体を用いて、より詳細な検討を行うことでより本質に迫ることが期待される。また髄様癌が様々な予後不良因子を持つにも関わらずそれを克服している腫瘍免疫のしくみを本研究で明らかにすることで、髄様癌以外の乳癌治療に発展できる可能性がある。

3. 研究の方法

初年度は、手術時に採取した髄様癌組織でマルチカラーフローサイトメトリーにより表面抗原分析および細胞内サイトカインの分析を行い、髄様癌のTILsにおける各種免疫担当細胞の数的、機能的な解析を行う。また同時に癌細胞のmutanome解析を行い、遺伝子変異による変異蛋白質を含んだ髄様癌の癌特異的抗原を同定し、TILsの標的抗原となるような蛋白質を推定、TILsの誘導の関与を解明する。次年度以降は、ホルマリン固定病理標本にて前年度までのフローサイトメトリーによる解析で重要であると判明したマーカーの免疫細胞が腫瘍のどの領域にどのように浸潤しているかを確認し、癌表面抗原候補の発現の局在と一致することを確認する。その後、髄様癌を含め、そのほか



の癌腫についてもこれらのリンパ球マーカーの発現の有無が良好な予後と相関するかを確認する。

(1) 髄様癌における TILs の詳細をフローサイトメトリーによって明らかにする
手術時に採取した癌組織からリンパ球を分離し、マルチカラーフローサイトメトリーによる分析を行う。制御性 T 細胞を始めとした各種免疫担当細胞の数的、機能的な解析を行い、髄様癌における TILs の実態を解明する。対照として髄様癌以外の浸潤性乳癌のうち高度なリンパ球浸潤を伴うものを同数程度解析する。

< 研究の流れ > 手術前の針生検で髄様癌の症例を事前に把握 手術当日に術中に腫瘍の一部を採取し、解析のためがんセンターに搬送 腫瘍の組織からリンパ球及び癌組織を抽出した後フローサイトメトリーによる解析

フローサイトメトリーによる表面マーカー解析は以下のように行う。表面抗原については分離したリンパ球を各種標識抗体で多重染色する。細胞内分子測定の場合は膜透過処理と細胞内抗原の固定処理を行い、洗浄処理を行った後、標識抗体で染色する。測定には LSR Fortessa Cell Analyzer (BD 社, US) を、解析には FlowJo Software (TOMY Digital Biology 社, 日本) を用い、主要な免疫担当細胞 (T 細胞、B 細胞、NK 細胞、単球、制御性 T 細胞、骨髄由来抑制細胞 (MDSC) 等) の表面抗原分析および細胞内サイトカイン分析を行う。そのために以下の抗原に対する標識抗体を用いる。CD4, 8, 11b, 11c, 14, 15, 16, 19, 20, 24, 25, 27, 33, 43, 44, 45, CCR7, CD56, 123, 127, CCR4, HLA-DE, IgD, Tim-3, LAG-3, ICOS, PD-1, PD-L1, NKG2D, Eomesodermin, FOXP3, Perforin, Granzyme B, IFN- γ , TNF- α , IL-2, 4, 5, 10, 13, 17A, Ki67

(2) 癌細胞側の解析も同時に行う

標的項目としては乳癌幹細胞マーカー (CD44, CD24, ALDH1) 、細胞死マーカー (Bcl2) 、Notchシグナル (Notch1-4受容体、リガンド Jagged1, DLL4) 、Fas ligand (O'Connell J et al. *Nature Medicine*, 1999) 等を予定している。また癌細胞のmutanome解析を行う。すなわち癌細胞の全ゲノム解析を次世代シーケンサーにて解読し、変異のある遺伝子を網羅的に抽出する。変異遺伝子から合成された変異タンパク質は一部が癌細胞内で代謝・分解され、HLAにより癌細胞表面に提示される (がん特異的抗原となる) ことで、免疫細胞に認識される。このように髄様癌に特徴的ながん特異的抗原を同定しそれに反応するリンパ球

の存在を証明できれば、本研究の目的達成に寄与すると考えられる。

平成 27 年度以降に関しては、平成 26 年度の解析を引き続き継続し解析症例数を蓄積する。髄様癌の手術症例は年 3-5 例程度であることから、3 年間で 10 例 (及び対照 10 例) の解析を予定している。

(3) 乳癌の転移制御機構として一般化できるかを免疫染色により明らかにする

上記研究によって明らかになった特定のリンパ球、またリンパ球や癌細胞が発現する細胞表面マーカー等のタンパク質の発現が、転移再発抑制の機構として髄様癌及び他のタイプの乳癌においても当てはまるか否かを過去の手術症例の手術標本検体を用いて明らかにする。例えば髄様癌において TILs が蛋白 X を癌細胞が蛋白 Y を特異的に発現していた場合、これらが実際に予後良好因子であったかを確認する。またこれらが髄様癌以外の乳癌においても予後良好な因子であるかどうかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 初年度および 2 年次は、当院における過去の乳腺髄様癌を集め、その臨床病理学的検討から行った。そして HE 染色スライドのみから腫瘍とリンパ球の関係を形態のみから検討した。そして、腫瘍周辺のみ、腫瘍内への浸潤のパターンが、いくつか認められた。当院における 18 例のなかでは、パターンには分類できたものの、予後や生物学的特徴をとらえるものではなかった。そして次に対象となる通常型の乳腺の乳管浸潤癌のリンパ球の浸潤の程度、頻度、形態を調べた。この時点では、リンパ球浸潤の多いものを日常診断上でピックアップして調べた。しかし、ある程度のワーキンググループにおけるスコア化はなされているものの、さらなる検討の必要が多いものと考えた。通常型の浸潤性乳管癌における癌巣内におけるリンパ球浸潤の浸潤の様式に関しては、非常に多彩で個体差があり、我々独自のスコア化も考えたが、その複雑さから困難と混乱を極めた。リンパ球浸潤の程度の客観的な評価が非常に難しいことが判明した。

(2) 2 年次後半以降は、腫瘍に集まってくるリンパ球の性質、特性を調べていくということより、おそらくそれらと呼ばために何らかの癌抗原を提示している癌細胞側からの解析も必要と考えられ、非常にまれな特殊型である乳腺髄様癌を集めたり、対象となる通常型の浸潤性乳管癌のリンパ球浸潤を調べることより、リンパ球の多いものと少ないものとの 2 群での比較の検討をはじめた。特に乳癌の中でもホルモンレセプター (エストロゲンとプロゲステロン) の陰性かつ HER2 レセ

プター陰性のいわゆるトリプルネガティブ乳癌症例という化学療法の効果のある患者もいるが、その効果が少ない患者には治療選択のない予後不良のグループに注目した。そしてその予後不良グループの中でもリンパ球の浸潤がある症例では、ない症例にくらべて予後が良いという事実に着目した。そこには、何らかのリンパ球を集める抗原が特異的であるのか、その抗原量が多いのか、共通するものがあるのか、または新たなる抗原として働いている可能性があることから、トリプルネガティブ乳癌グループ中でのリンパ球の浸潤の著明な症例とリンパ球浸潤の少ない症例の2群の抽出を HE 染色のみで顕微鏡下で病理医が行った。抽出する DNA の質の問題上、過去3年の症例の中からリンパ球浸潤例15例およびリンパ球非浸潤例15例を抽出した。それらのなかから QIAGEN FFPE tissue kit を用い、DNA の抽出を行った。AMPure XP を使用して、DNA の精製を行い、精度の高いDNA を獲得した。リアルタイムPCR で Quality control し、Long Primer, Short Primer で増幅、relative standard curve 法で定量し、Long/Short の RQ 値 0.2 以上のものを次世代シーケンシングへとかけた。Quality control を通過した各6例 (normal and tumor で計24件) を Thermo-Fisher 社 Ion-PGM 法を用いて、hot spot を網羅的に変異解析を行った。トリプルネガティブ リンパ球浸潤乳癌に特徴的な遺伝子変異を検討した。結果は、目下解析中である。

今後は、Ion-PGM 法で候補となった遺伝子に対して、免疫染色やターゲットシーケンスなどでより多数例、トリプルネガティブでないリンパ球浸潤癌に対しても対象として validation を行っていく予定である。

<参考文献>

1. Ridolfi RL et al. Cancer, 1977; 40: 1365-85
2. Schreiber RD et al. Science 331:1565-70. 2011
3. Bertucci F et al. Cancer Res 66: 4636-44, 2006
4. Jacquemier J et al. J Pathol 207:260-268, 2005
5. Anz D et al Histopathology 59:965-974, 2011

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〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

荒川 敦 (ARAKAWA, Atsushi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：7024565

(2)研究分担者

堀本 義哉 (HORIMOTO, Yoshiya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40424246

北野 滋久 (KITANO, Shigehisa)

国立研究開発法人国立がん研究セン

ター・早期・探索臨床研究センター・医員

研究者番号：60402682