

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461960

研究課題名(和文) 乳癌治療中の免疫モニタリングによる治療効果の予測

研究課題名(英文) Prediction of therapeutic effect by immunomonitoring during breast cancer treatment

研究代表者

堀本 義哉 (Horimoto, Yoshiya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40424246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は乳癌患者の治療中の免疫状態を経時的に解析することで、新たな治療効果予測因子を同定することを目的としている。

これまでにのべ250検体の末梢血単核球および血清の単離と凍結保存を行った。ホルモン療法を施行された乳がん患者の治療前後の末梢血単核球、血清を保存し、ホルモン療法が宿主免疫系に与える影響および宿主免疫状態がホルモン療法の治療効果に影響を与えるかについて現在、解析中である。末梢血における解析については、マルチカラーフローサイトメーターを用いた免疫プロファイリング解析を行い、血清については血中のエストラジオール濃度、各種サイトカイン、免疫関連タンパクの濃度を測定している。

研究成果の概要(英文)：This study aims to identify new predictive markers for therapeutic effect with analyzing the immune status during treatment for breast cancer patients.

We isolated and cryopreserved peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and serum from over 250 patients. Blood samples were collected before and during endocrine treatment for breast cancer patients. The influence of hormone therapy on the host immune system and whether the host immune status affects the therapeutic effect of hormone therapy have been analyzed. Immuno-profiling analysis using a multicolor flow cytometer is performed for PBMC analysis. Also, using serum, estradiol concentration in blood, various cytokines, and concentration of immune related protein are measured.

Finally, in this study we would like to elucidate whether hormonal therapy reduces immunosuppressive cells in the blood, including regulatory T cells, and whether the immune status before treatment relates with the effect of hormonal therapy.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 免疫モニタリング 腫瘍免疫 内分泌療法

## 1. 研究開始当初の背景

### 個別化が進み混沌とする乳がん治療

乳がんは非常に多様性に富み、10cm のサイズでもリンパ節転移がない一方で5mm の腫瘍が診断時既に肺転移を伴っていたり、術後 20 年経ってから骨転移が起きたりすることも珍しくない。治療については新しい薬が次々と開発される中、再発予防として選べる薬剤はここ 10 年以上ほとんど変わっていない。その代わり抗がん剤が不必要な患者の選別など、より効果的に治療を選択する、いわゆる治療の個別化が求められるようになってきた。そのため再発リスクを予想するための高額な遺伝子解析キットが手に入るまでになったが、誰がそのツールを使うべきかは明確ではなく臨床の現場では治療の選択に難渋することが少なくない。

### がん細胞解析による治療効果予測の限界

これまでの研究で様々な治療効果予測因子が模索されてきたものの、実際にその情報により治療を選択できるほどに強力な因子は全くと言っていいほど同定されていない。最近 20-30 年で乳がんの分野に限れば、トポイソメラーゼ II $\alpha$  の発現が低下するとアンシクリン系薬剤の効果が高いことが示された程度である<sup>1</sup>。前述の遺伝子解析キットも再発リスクを予想するものであり、治療効果を予測するものではない。従って抗がん治療の効果予測にはがん細胞側の解析のみでは限界があると考えられ、がんの微小環境や免疫応答を含めた、治療に対する患者自身の局所・全身の反応に注目すべきである。

### 抗がん剤による免疫系への影響

これまで抗がん剤はその骨髄毒性のため、免疫系に負の影響を与えると理解されていた。しかし最近では基礎実験によって少なくとも部分的に免疫系に好ましい影響を与える可能性が報告されてきている。例えば抗がん剤による腫瘍細胞死の過程で免疫応答が強く惹起されること<sup>2</sup>、治療によるリンパ球減少によりリンパ球の恒常性維持のための増殖が促進され、腫瘍特異的キラーT

細胞がより効率的に誘導されること<sup>3</sup>などである。一方で抗がん剤による免疫系への影響は薬の種類や投与量、投与方法により多様に変わりうると考えられており、このことはヒトにおいて標準的治療の投与下で解析をすることの重要性を示している。いずれにしても、抗がん剤が免疫系に及ぼす影響については未だに情報が乏しいのが現状である。

### 免疫応答モニタリング法の開発

分担者は従来の免疫系解析方法とは一線を画した新しい手法を習得している。がん免疫療法の新規薬剤「抗 CTLA-4 抗体」の臨床開発に成功したメモリアル・スローン・ケタリングがんセンターの Drs. Jedd Wolchok and James Allison の下で、最新のマルチカラーフローサイトメトリーをベースとした免疫応答モニタリング法の開発に主体的に携わり多数の成果を上げてきた。代表的成果として、CTLA-4 抗体投与患者におけるがん精巣抗原 NY-ESO-1 特異的細胞障害性 CD4 陽性 T 細胞の誘導<sup>4</sup>や、進行期悪性黒色腫患者末梢血における骨髄由来抑制細胞(MDSC)を予後予測マーカーとして同定した<sup>5</sup>。この新しい解析手法を用いることにより、これまで研究されてこなかった抗がん剤治療が免疫系に及ぼす影響を詳細に知ることができると期待されている。

### トラスツズマブによる抗体依存性細胞障害作用

約 20%の乳がんでは過剰発現する HER2 蛋白は細胞表面に存在する上皮成長因子受容体であるが、この HER2 に特異的に結合し細胞内増殖シグナルを低下させたり、抗がん剤の効果を高めたりするのが分子標的治療薬のトラスツズマブである。このトラスツズマブには NK 細胞、単球を介した抗体依存性細胞障害作用 (ADCC) による抗腫瘍効果があることが指摘されている。さらにはトラスツズマブによって壊れた細胞から放出された HER2 蛋白が、抗原としてリンパ球に取り込まれ免疫応答が賦活化される可能性も指摘されている。しかしなが

らこれら免疫反応の詳細は動物モデルを用いたデータからの推察にすぎず、これまでヒト生体内においては評価されてこなかった。本研究のモニタリング方法では HER2 抗原を取り込んだ制御性 T 細胞や MDSC の追跡・解析が可能であり、トラスツズマブを含む治療を行った場合には、この解析も行う。

#### <参考文献>

1. O'Malley FP et al. *J Natl Cancer Inst*, 2009
2. Kroemer G et al. *Annu Rev Immunol*, 2013
3. Datta S et al. *Trends Immunol*, 2009
4. Kitano S et al. *Cancer Immunol Res*, 2013
5. Kitano S et al. ASCO Annual Meeting 2012 abstract #2518

## 2. 研究の目的

### **(1) 抗がん剤治療前の免疫状態と治療効果との相関を明らかにする**

抗がん剤治療前に末梢血中の免疫細胞の詳細な解析を行い、バイオマーカーの探索を行う。さらに術前化学療法を受ける症例においては、治療前の腫瘍生検検体から浸潤リンパ球を抽出し免疫細胞の詳細な解析を行い、治療効果・予後に関連するバイオマーカーの探索を行う。

### **(2) 抗がん剤治療中、治療後の免疫応答と治療効果との相関を明らかにする**

抗がん剤治療中、治療後の末梢血中の免疫細胞の詳細な解析を行い、治療前の免疫状態と比較することで抗がん剤に対する免疫応答を明らかにする。さらに免疫応答の違いがバイオマーカーとなりうるかを検討する。さらに術前化学療法を受けた症例においては、手術で摘出した腫瘍検体から浸潤リンパ球を抽出し免疫細胞の詳細な解析を行い、バイオマーカーの探索を行う。

### **(3) トラスツズマブ治療に対する免疫応答の詳細を明らかにする**

再発乳癌の治療を対象に加え、従来から

提唱されているトラスツズマブの ADCC 効果に加え、破壊された腫瘍細胞由来の HER2 抗原の免疫系への再利用の実態を明らかにしたい。この解析によって例えばどのような患者にトラスツズマブの高い効果が期待でき単独投与が可能か（副作用の強い抗がん剤の併用が省略できる）を明らかにすることができる。

### **(4) 上記(1)-(3)を基に、新たな免疫療法の開発に繋げる**

上記(1)-(3)の知見を基に化学療法だけでは克服できない免疫病態を明らかにすることで、効果的な免疫調整薬の開発や化学療法と免疫療法の効果的な併用方法を検討する。

## 3. 研究の方法

乳がん術前抗がん剤治療を行う患者を対象として免疫モニタリングを行う。治療前及び治療中の血液をマルチカラーフローサイトメトリーによって解析し、患者の免疫応答と治療効果（手術標本により病理学的に効果を判定）との関連を明らかにする。

また治療前の針生検検体からサンプルを採取して同様の解析方法により腫瘍局所のリンパ球の詳細と治療効果との関連を明らかにする。ところで診断目的に行われる針生検の際に本研究目的の検体が十分に採取できない可能性がある。そこで FFPE 検体を用いて多重免疫染色により免疫担当細胞のプロファイリングを評価する方法を同時に検討する。

さらに術後ホルモン療法を行う患者については、治療開始前及び開始数か月後の血液を解析するとともに、血中のエストロゲン濃度を測定し、治療による免疫状態への影響および血中エストロゲンレベルとの関連を明らかにする。閉経後の患者の場合、通常の測定法ではエストラジオールが検出可能濃度未満となる頻度が高いことが予想されるため、そのような患者については微量測定を外注して行う。

#### 4. 研究成果

これまでにのべ280検体の末梢血単核球および血清の単離と凍結保存を行った。術前化学療法が行われた患者が30名、解析のコントロール群としての術前治療が行われなかった患者が75名、術後ホルモン療法を施行した患者80名強である。

術後ホルモン療法を施行した患者については、閉経後患者の血中エストラジオールの変化について先行して解析を行ったところ、ホルモン療法によりエストラジオールの有意な低下を認めたが、治療前の67%、治療開始後3か月では93%の患者においてエストラジオールの値が検出可能値未満であった。そのためこれらの症例については血清を用いてエストラジオールの微量測定による再評価が必要であることがわかった(学会発表1)。あわせてベースラインのエストラジオールのレベルは、肥満患者で高いことが確認された。同時に肥満患者では乳癌原発巣の悪性度が低いことがわかった(学会発表2)。一般的に肥満患者では乳癌の発癌・再発リスクが高いことが知られており<sup>1</sup>、我々のデータが対立する結果となったことについては、日本人独自の傾向を見ている可能性があると考えている。

ホルモン療法が宿主免疫系に与える影響および宿主免疫状態がホルモン療法の治療効果に影響を与えるかについて現在、解析中である。末梢血単核球については、マルチカラーフローサイトメーターを用いた免疫プロファイリング解析を行い、血清については血中のエストラジオール濃度、各種サイトカイン、免疫関連タンパクの濃度を測定している。

治療前の乳癌組織からフローサイトメトリーで免疫担当細胞を解析するためのサンプリングは、患者に侵襲を加えることやサンプリング直後に細胞を抽出・解析するためのシステム構築が困難等様々な理由で困難であった。そこでFFPE検体を用いた多重染色により免疫担当細胞のプロファイリングを免疫染色に評価する方法を検討し、確立した(論文1)。

さらに乳癌リンパ節転移巣の診断後余剰サンプルを用いてプロテオーム解析を行い、

術中にリンパ節転移を診断するOSNA法中の阻害反応の原因となる蛋白質の同定を行った(論文2)。この検討の中で阻害反応が少なく腫瘍の悪性度の低い患者群では細胞障害性T細胞から放出される顆粒であるPerforin-1が有意に多く認められた。この知見は、今後解析を進め得られるデータを解釈する上で有用な情報になりうると考えている。

最終的に、本研究においてホルモン療法が制御性T細胞をはじめとして血中の免疫抑制細胞が減少するか否か、治療前の免疫状態がホルモン療法の治療効果と相関するか否かについて解明したい。

#### <参考文献>

1. Folkerd E et al. *J Clin Oncol* 30:2977-2980, 2012

#### 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 2件)

1. Diagnostic significance of intratumoral CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in medullary carcinoma.  
Igari F, Sato E, Horimoto Y, Takahashi Y, Isomura T, Arakawa A, Kitano S, Saito S. *Human Pathology* 70:129-138, 2017

2. Elucidation of inhibitory effects on metastatic sentinel lymph nodes of breast cancer during One-Step Nucleic Acid Amplification.  
Horimoto Y, Tanabe M, Kazuno S, Miura Y, Mogushi K, Sonoue H, Arakawa A, Kajino K, Kobayashi T, Saito M. *Scientific Reports* 8:7563, 2018

#### [学会発表](計 2件)

1. 肥満におけるアロマターゼ阻害薬のエストラジオール抑制効果について  
松澤円佳、堀本義哉、北野滋久、佐々木律子、氷室貴規、魚森俊喬、森昌子、村上郁、岡崎みさと、三浦佳代、瀬沼幸司、中井克也、飯島耕太郎、齊藤光江

第 25 回日本乳癌学会学術総会 (2017 年 7 月、福岡)

2. 閉経後肥満患者における乳癌の病理学的特徴

堀本義哉、魚森俊喬、荒川敦、飯島耕太郎、齊藤光江

第 79 回日本臨床外科学会(2017 年 11 月、東京)

〔図書〕(計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

堀本義哉 (HORIMOTO, Yoshiya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40424246

### (2)研究分担者

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