

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16770

研究課題名（和文）誘導型一酸化窒素合成酵素制御による乳癌肝転移微小環境のリプログラミング

研究課題名（英文）Reprogramming of breast cancer liver metastasis microenvironment by inducible nitric oxide synthase regulation

研究代表者

河口 浩介（Kawaguchi, Kosuke）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30516927

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）：乳癌肝転移巣におけるがん免疫療法の効果は限定的であることが問題点として挙げられる。乳癌患者において予後に強く関連する肝転移の制御は不可欠であると考え、マウスを用いた乳癌肝転移モデル並びにヒト臨床サンプルを利用し、乳癌肝転移巣の腫瘍免疫微小環境における解析を行った。肝転移巣に関しては、原発巣並びに肺転移モデルと比べ、治療効果が乏しい事を確認した。さらに肝転移巣における網羅的遺伝子発現パターンを解析したところ、補体経路を代表とする特徴的な免疫・代謝経路と関わる事が示唆された。以上より、肝転移巣特異的な腫瘍免疫微小環境リプログラミングを行うことにより、乳癌肝転移の制御が可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、肝転移巣特異的な腫瘍免疫微小環境形成に補体経路が関わる事が示唆された。肝転移の制御は乳癌患者の生存のみならず生活の質に大きく関わる為、非常に重要な社会的意義を持つ。今後の継続研究により、肝転移巣の腫瘍免疫微小環境をターゲットとした治療ストラテジーの開発が急務であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The limited efficacy of cancer immunotherapy in breast cancer liver metastases is a problem. In this study, we analyzed the tumor immune microenvironment of breast cancer liver metastases using a mouse model of breast cancer liver metastases and human clinical samples. We found that liver metastases did not respond well to treatment compared to primary tumors and lung metastases. Furthermore, comprehensive analysis of gene expression patterns in liver metastases suggested that they are associated with distinct immune and metabolic pathways, such as the complement pathway. These results suggest that liver metastases from breast cancer can be controlled by reprogramming the tumor immune microenvironment, specifically in liver metastases.

研究分野：腫瘍免疫微小環境

キーワード：腫瘍免疫微小環境 乳がん 肝転移

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害薬は腫瘍微小環境において、活性化 T 細胞の免疫抑制機構を解除する治療薬であり、特に免疫原性の高い腫瘍に効果的であることが報告されている。従来、乳癌は免疫原性の少ない癌種とされてきたが、近年の前臨床試験及び臨床試験において抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 CTLA4 抗体療法をはじめとする免疫チェックポイント阻害薬の進行・転移乳癌への有効性が報告されている。免疫チェックポイント阻害薬の乳癌に対する奏功率は約 5% と限定的であるが、奏功例では従来の殺細胞性抗癌剤では得る事の出来ない長期生存が認められ、投与中止後も効果が継続することが特徴として挙げられる。そのため免疫チェックポイント阻害薬の効果予測並びに奏功率の改善は、乳癌治療において取り組むべき大きな課題である。特に肝転移の有する患者においては免疫チェックポイント阻害薬の効果が得られにくいという報告がある。これらの先行研究より、肝転移巣の腫瘍微小環境 (Microenvironment of Liver Metastasis: MLM) の治療標的としての重要性が高まっている。我々研究グループは腫瘍モデルにおいて、誘導型一酸化窒素合成酵素 (Inducible Nitric Oxide Synthase: iNOS) の制御が腫瘍血管の正常化に寄与することを発見し、Nature medicine 誌に発表した。さらに腫瘍血管の正常化は腫瘍免疫を改善することを報告した。我々研究グループはこれらの学術的重要性並びに「問い」に対して、マウスを用いた乳癌肝転移モデルを用いて、iNOS 制御による MLM に対する新規治療戦略の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

目的 1-A : iNOS 制御による腫瘍血管のリプログラミングを評価する

目的 1-B : iNOS 制御による腫瘍免疫微小環境のリプログラミングを評価する

目的 2 : iNOS 制御による MLM リプログラミングが免疫チェックポイント阻害薬の効果を増強するかを評価する

## 3. 研究の方法

マウス乳癌細胞株はトリプルネガティブ乳癌細胞株である E0771、4T1 並びに EMT6 を用いる。肝転移モデルは既に予備研究において確立しており、腫瘍量については腫瘍にトランスフェクションしたガウシアルシフェラーゼを用いて定量的に測定した。腫瘍血管の評価は我々が開発した Liver Window システムを用いて MLM 生体内イメージングを行った。生体内イメージングは Doppler Optical Coherence Tomography を利用して行った。更に血管内皮細胞の並びに低酸素領域の評価を免疫染色行い、共焦点顕微鏡を用いて評価する。

iNOS 制御について shRNA を用いたノックダウン細胞株を用いて解析を行った。

#### 4. 研究成果

2 系統 2 細胞株、EMT6 並びに 4T1 マウス乳がん細胞株を用いて肝転移モデルを確立した。乳癌肝転移巣に対しては免疫チェックポイント阻害薬の効果は認められず、CD8 陽性細胞の腫瘍浸潤が原発巣に比べて乏しいことを確認した (図 1)。また、肝転移巣並びに原発巣をそれぞれ RNA シークエンスを行い、肝転移巣特異的な遺伝子発現群を特定した (図 2)。さらに肝転移巣における腫瘍血管の生体内イメージングを行い、肝転移巣の vascular normalization について評価することに成功した。本研究により、肝転移巣特異的な腫瘍免疫微小環境形成に補体経路に関わる事が示唆された (図 3)。肝転移の制御は乳癌患者の生存のみならず生活の質に大きく関わる為、非常に重要な社会的意義を持つ。今後の継続研究により、肝転移巣の腫瘍免疫微小環境をターゲットとした治療ストラテジーの開発が急務であると考ええる。

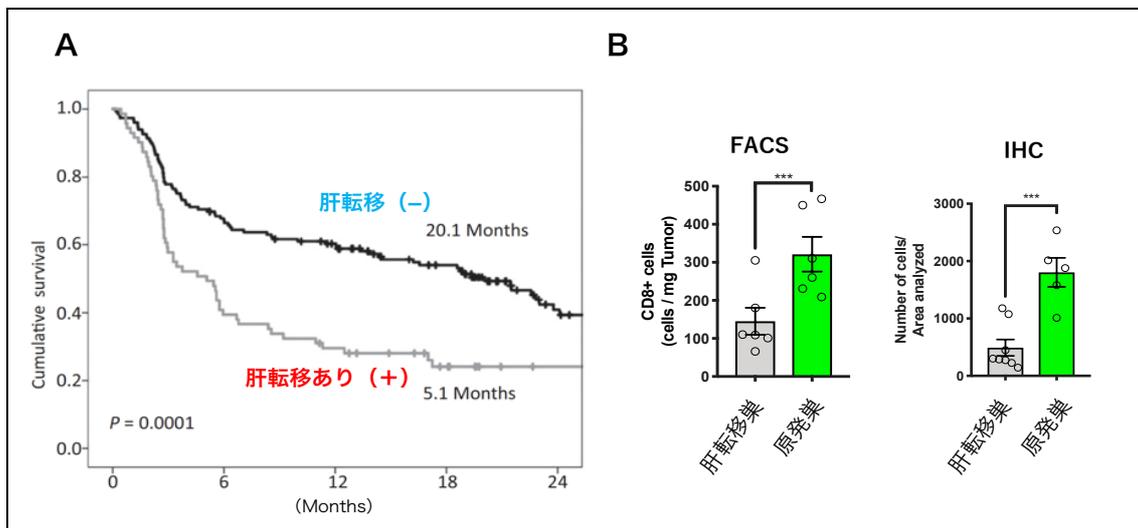


図 1

A:肝転移巣の有無による抗 PD-L1 療法の効果. 肝転移巣は抗 PD-L1 療法に対して治療抵抗性を示す. (*Cancer Immunol Res.* CIR-16-0325 (2017)を一部改変.)

B:乳癌肝転移 syngenic マウスモデルにおける腫瘍浸潤 CD8 陽性 T 細胞の評価. (*Kawaguchi, K.* 未発表データ)

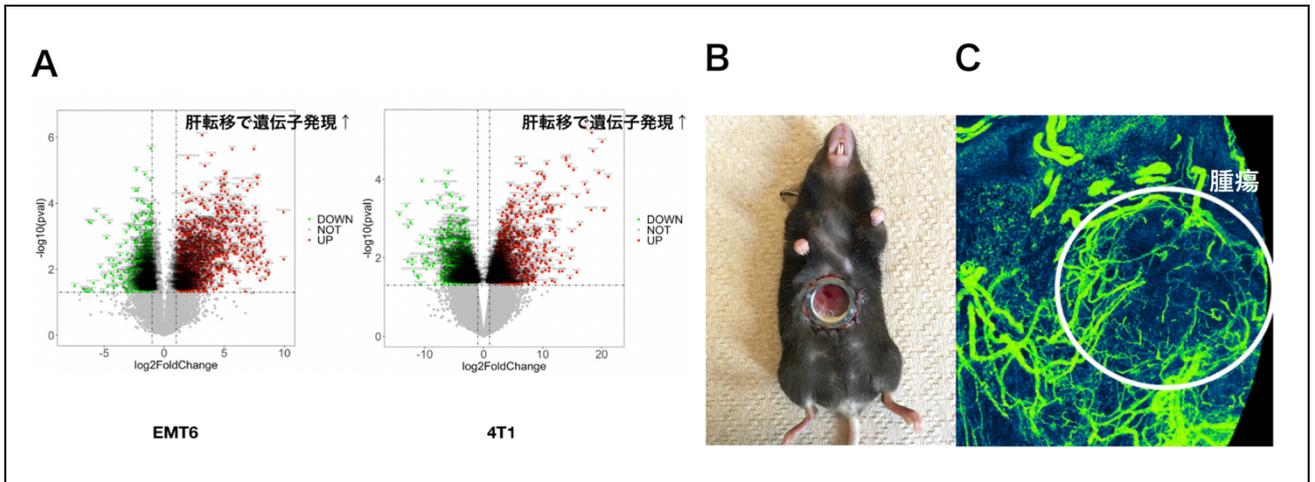


図2 A: syngeneic マウスモデルにおける肝転移巣特異的な遺伝子発現パターン. B: 乳癌肝転移 Liver Window システムを用いた腫瘍免疫微小環境評価モデル. C: Doppler Optical Coherence Tomography を用いた腫瘍血管の生体内イメージング (Kawaguchi. K, 未発表データ)

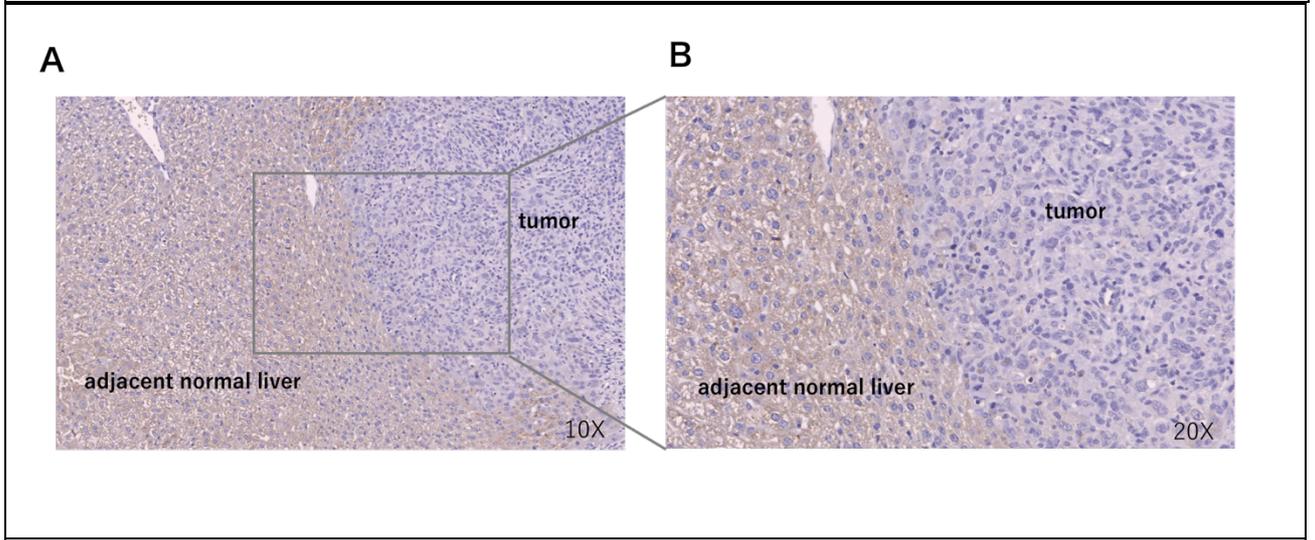


図3 マウス syngeneic 肝転移モデルにおける補体経路活性の評価 (茶: 抗 CFI 抗体). 原発巣モデルや肺転移モデルと比べ肝転移巣特異的な免疫・代謝環境が構成されていることが予測される. A: 10X. B: 20X. (Kawaguchi. K, 未発表データ)

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 He, Chenfeng Kawaguchi, Kosuke Toi, Masakazu	4. 巻 27
2. 論文標題 DNA damage repair functions and targeted treatment in breast cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 355-362
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12282-019-01038-	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河口 浩介
2. 発表標題 Transcriptional profiling of triple negative breast cancer liver metastasis using syngeneic mouse model
3. 学会等名 日本癌治療学会
4. 発表年 2019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
---------	---------