

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791248

研究課題名（和文） トラスツズマブ投与患者における細胞性免疫応答の誘導と抗腫瘍効果における役割の検討

研究課題名（英文）

Induction of HER2-specific cellular immunity after trastuzumab therapy

研究代表者

齋藤 佳菜子 (Kanakano Saito)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90447871

研究成果の概要（和文）：

HER2 陽性乳癌患者において、抗 HER2 モノクローナル抗体である Trastuzumab を投与することで、HER2 特異的細胞性免疫応答がされるかどうか検証した。患者末梢血中に、HER2 特異的細胞障害性 CD8 陽性 T 細胞が誘導されるかどうかテトラマーアッセイと ELISPOT アッセイを用いて検討した。進行乳癌患者においては、trastuzumab 投与後に HER2 特異的 CD8 陽性 T 細胞をテトラマーアッセイにて検出する症例があった。しかしながら原発腫瘍の根治手術後、術後 trastuzumab 療法後においては検出困難であった。原発腫瘍の摘出後であるため、腫瘍量が少ないことから HER2 特異的 CD8+T 細胞の誘導が検出できない可能性があった。しかしながら技術的な問題点として、HLA-A2402 に拘束される HER2 エピトープの検出力が低いことが挙げられた。

研究成果の概要（英文）：

We have investigated whether HER2-specific cellular immunity could be induced after trastuzumab therapy in HER2-positive breast cancer patients. We analyzed the induction of HER2 specific CD8+T cells before and after trastuzumab therapy by tetramer assay and ELISPOT assay. HER2p369 specific CD8+T cells after trastuzumab were detected in only HER2-positive metastatic breast cancer patients. We could not detect HER2-specific CD8+T cells in early breast cancer patients after trastuzumab.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：腫瘍内科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：HER2、トラスツズマブ、CTL

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗HER2ヒト化モノクローナル抗体であるトラスツズマブはHER2陽性転移再発乳癌に対する分子標的薬として、我が国では2001年より一般臨床で使用が開始された。以来、トラスツズマブはHER2陽性転移再発乳癌患者の予後を大きく改善し、HER2陽性乳癌の治療体系を大きく変革した。またHERA試験では、HER2陽性早期乳癌患者に対してトラスツズマブを術後標準化学療法後に1年間投与すると、2年の観察期間ではあるが、観察群にくらべて再発リスクを36%減少させ、死亡リスクも34%減少させるという高い再発抑制効果が示された。これを受けて、2008年2月から我が国でも早期乳癌でのadjuvant療法での使用が可能となった。

(2) HER2は染色体17q21に位置する癌遺伝子であり、遺伝子産物であるHER2蛋白はチロシンキナーゼ活性を有する分子量185kDの細胞膜を貫通する糖蛋白である。HER2蛋白は多くの分子によって細胞内シグナルをtransduceし、その下流にあるMAP-kinaseやPI3-kinaseにつながり、細胞の増殖や癌化が促進される。トラスツズマブはHER2蛋白の細胞外ドメインを認識する抗体であり、単一の分子シグナルをブロックするのではなく、HER2発現そのものをブロックするため細胞増殖抑制は効果的である。しかし、これらの治療を実施しても早期に耐性を獲得する症例が出現することが経験的にわかってきた。

(3) 抗体は細胞表面抗原を認識し、結合することにより標的分子シグナルの増強・抑制、補体経路の活性化、Fcレセプターを介した殺細胞効果によりその効果を発揮することが示されてきた。トラスツズマブはヒト化モノクローナル抗体(IgG1)であり、Fc部分を介した免疫担当細胞による抗体依存性効果も抗腫瘍効果の一部を担っていると考えられている。一方、抗CD20抗体であるリツキシマブと違い、トラスツズマブ投与患者においてADCC効果が抗腫瘍効果の中でどの程度占めているのかは現時点では不明であるが、トラスツズマブ投与中の腫瘍周辺にはNK細胞が点在していることが確認されており、この現象は化学療法のみでは認められない。しかし、NK細胞等が関与するADCC効果の有無、強弱によって治療効果の持続を説明することは困難である。

(4) 一方、近年in vitroで、抗体が抗原と複合体(Immuno-complex)を形成することで、通常の外來抗原が抗原提示されるMHC

class II pathwayに加えてMHC class I pathwayに提示されること、HER2陽性腫瘍細胞株はトラスツズマブを作用させることで、MHC class Iへの抗原提示能が上がることで、動物モデルにより、抗HER2抗体投与により特異的CD8+T細胞が誘導され、これらの細胞はメモリー型であることが示された。そこで本研究では下記の可能性を推測し、検討する。

1. トラスツズマブが結合した腫瘍細胞は、抗体の直接作用、ADCC効果によりNK細胞などのエフェクター細胞によって破壊される
2. 細胞断片、すなわち腫瘍抗原が周囲に放出され、トラスツズマブと結合することにより抗原抗体複合体(immuno-complex)が形成され、マクロファージに貪食されたり、樹状細胞に取り込まれる
3. 取り込まれたHER2抗原はMHC class II pathwayに抗原提示されるとともに、抗体が抗原と複合体(Immuno-complex)を形成することで、通常の外來抗原が抗原提示されるMHC class II pathwayに加えてMHC class I pathwayに提示され、抗原特異的CD8+T細胞に認識され、免疫記憶を誘導する。

2. 研究の目的

(1) HER2陽性早期乳癌患者に術後adjuvant療法としてトラスツズマブを投与することで、患者体内に細胞性免疫応答が誘導されたかどうかを末梢血単核球にて検討する。これらの患者において、細胞性免疫応答誘導と抗体の治療効果の持続との相関を腫瘍増悪までの期間を比較検討することで抗体と細胞性免疫との関わりを明らかにする。

現在経験的に明らかになってきたトラスツズマブ投与による臨床効果の持続性の違いに関して、細胞性免疫応答の関与という独自の観点から解析する。これにより、トラスツズマブによる抗腫瘍効果の新規メカニズムの解明が期待できるとともに、細胞性免疫応答を誘導しやすい患者群を同定することで、トラスツズマブ長期投与の必要性の有無を早期に推測することが可能となる。これは抗体の長期投与による心毒性の懸念や治療費が高額となることも回避できる可能性を秘めている。更に免疫誘導をおこしにくい患者群においては再発予防に他のがんワクチン療法を施行する等の新たな治療法の必要性を早期に明らかにするバイオマーカー開発にもつながると考えられ、研究成果は極めて意義深いと考えられる。

3. 研究の方法

【対象症例】

(1)HER2 陽性乳癌患者*で、トラスツズマブ療法**の適応のある症例

①早期乳癌術後、②進行・再発乳癌

*HER2 発現；腫瘍組織上での免疫組織染色にての評価 3+、あるいは FISH 法にて HER2 遺伝子増幅ありの症例に限る。

**術後トラスツズマブ療法；初回 8mg/kg、2 回目以降 6mg/kg にてトラスツズマブを 3 週間毎に 18 回（1 年間）投与する。

(2)既に HER2 の MHC class I エピトープが同定され、テトラマーが有用である HLA-A0201（日本人の発現頻度 10.7%）、HLA-A2402（日本人の発現頻度 38.8%）を有する症例。

①②を満たし、かつ本研究に対するインフォームドコンセントを行い承諾が得られた症例。

【方法】

(1) 患者末梢血約 50ml をトラスツズマブ投与前、投与中（約 6 ヶ月後）、投与終了後に採取し、末梢血単核球(PBMC)に分離した。また末梢血を用いて HLA-A0201, A2401 発現を解析した。

(2) PBMC から単離した CD8+T 細胞を、HLA class I に認識される HER2 エピトープ (A0201;p369-377, A2402;p63-71) ペプチドをパルスし、放射線照射した抗原提示細胞 (non-CD8+T 細胞) とともに 7-10 日間、IL-2、IL-7 存在下に培養した。

後に HLA-A2402 に認識される HER2 エピトープのペプチド 4 種類 (p8-16, p342-350, p485-492, p553-561) を加えて培養・解析した。

(3) 特異的 CD8+T 細胞誘導を以下の方法により解析した。

1. ELISPOT assay を行い、HER2 特異的 IFN γ 産生 CD8+T 細胞が誘導されるかどうか解析した。

2. HLA class I に認識される数種類の HER2 ペプチド・HLA-A*0201/A*2402 テトラマーを使用し、フローサイトメトリーにて HER2 特異的 CD8 細胞の誘導を確認した。

Positive control :

HLA-A0201:CMV 特異的 CD8+T 細胞の認識するエピトープを用いた。

HLA-A2402:EBNA 特異的 CD8+T 細胞の認識するエピトープを用いた。

4. 研究成果

実験計画では術後トラスツズマブ療法適応患者に限定して解析する予定であったが、その後、進行・転移再発症例にも適応を拡大して解析した。

(1) 進行再発症例での HER2 特異的 CD8+T 細胞の誘導

症例 1 : (HLA-A0201) StageIV。HER2 陽性進行乳癌、多発肺転移、皮膚転移、がん性リンパ管症例

Trastuzumab 治療前；HER2 特異的 CD8+T 細胞は Tetramer assay、ELISPOT assay とともに検出できなかった。

Trastuzumab 併用化学療法施行後；

Tetramer assay；

1) 1 ヶ月後：末梢血中に HER2p369-377 特異的 CD8+T 細胞を約 1.0%検出した。

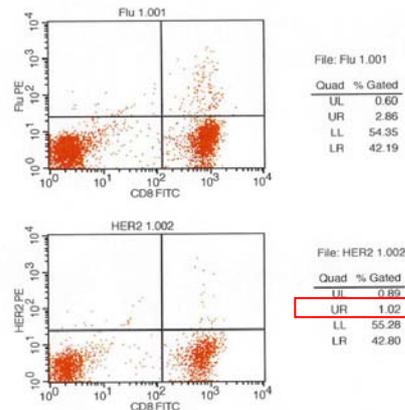


Fig. 1 抗原特異的 CD8+T 細胞の誘導
上段；Flu 特異的 CD8+T 細胞の誘導 (positive control)。
下段；HER2p369-377 特異的 CD8+T 細胞の誘導。

2) 6 ヶ月後：HER2p369-377 特異的 CD8+T 細胞約は 0.5%検出。

ELISPOT 法;

IFN γ 産生 HER2 特異的 CD8+T 細胞は、1 ヶ月後、6 ヶ月後ともに検出できなかった。

(2) 術後 adjuvant 療法としての Trastuzumab 使用症例

早期乳癌術後に術後化学療法終了後にトラスツズマブ療法を1年間実施した症例の末梢血を解析した。トラスツズマブ採取前、6 ヶ月後、12 ヶ月後を解析している。

HLA-A0201 症例 (n=2)

Tetramer assay; 投与前、6 ヶ月後、12 ヶ月後いずれも HER2 特異的 CD8+T 細胞の誘導は検出できなかった。

ELISPOT assay; 同様に HER2 特異的 IFN γ 産生 CD8+T 細胞は検出できなかった。

HLA-A2402 症例 (n=7)

Positive control として、EBNA3A 特異的 CD8+T 細胞の誘導を測定した。

当初、三重大学が報告した HLA-A2402 が認識する HER2 ペプチド p63-71 のみで測定していたが、以前より検出力が低いことが問題であった。当研究においても、HER2p63 特異的 CD8+T 細胞したが、テトラマーアッセイでも ELISPOT でも検出できなかった。そこで、当研究では過去の報告 (Breast Cancer Research and Treatment 86:19-29, 2004) を参考として HLA-A2402 が認識する他の HER2 エピトープを解析に用いることにした。新たに HER2 エピトープ 4 種類 (p8-16, p342-350, p485-492, p553-561)* のペプチドを新たに作成した。Tetramer は未作成のため、ELISPOT assay を行った。

今回新たに用いたペプチドを使用した ELISPOT assay では、trastuzumab 投与前に HER2 特異的 IFN γ 産生 CD8+T 細胞を認める症例があった。

今後、HLA-A2402 を有する症例において、これらのペプチド 5 種類を用いて解析をすすめる予定である。

(まとめ)

当研究では HER2 陽性乳癌患者において、trastuzumab 療法を実施した症例において、HER2 特異的細胞性免疫が誘導されることを検証するものである。今回解析に用いたエピトープであるが、HLA-A0201 が認識する HER2 エピトープ (p369-377) は海外で施行された

HER2 がんワクチンに用いられたこともあり、比較的検出しやすいペプチドと言える。本研究においても、HLA-A0201 を有する進行症例での解析では、少ないながらも HER2 特異的 CD8+T 細胞を検出することができた。しかしながら術後療法として trastuzumab を使用した症例においては、1 年後でも HER2 特異的 CD8+T 細胞の誘導は検出できなかった。これは腫瘍量が少ないことに起因すると考えられる。ただし検討した症例数が少なく、結論は出せない。ただし日本人における HLA-A0201 症例は約 10%と少なく、今後も症例集積が困難であることが予想される。

一方、HLA-A2402 を有する症例の場合、症例は集積しやすいが、HER2 特異的 CD8+T 細胞の検出が困難である。そこで本研究においては、途中から検出するペプチドの種類を増やしたため、今後はこの 5 種類のペプチドで解析をすすめる予定である。

また今後は、局所進行乳癌症例も含めて、解析をすすめていく予定である。

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 0 件)

[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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 佳菜子 (Kanao Saito)
三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90447871

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：