

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：85402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10053

研究課題名(和文) Immune checkpointを標的としたHER2乳癌に対する薬物療法の開発

研究課題名(英文) targeting therapy of immuncheckpoint in HER2 positive breast cancer

研究代表者

重松 英朗 (Shigematsu, Hideo)

独立行政法人国立病院機構(呉医療センター臨床研究部)・その他部局等・その他

研究者番号：40543707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：gentle MACS Dissociatorを用いてHER2陽性乳癌の針生検検体よりTILを抽出、flow cytometryによりTreg分画に分類した。乳癌組織ではPBMCおよび正常乳腺組織中リンパ球よりも、functional TregであるFr IIの割合を多く認めた。Fr II分画はpCR例で25.1%、non pCR例で29.3%であり、non pCR例でFr II分画が高い傾向が認められた。HER2陽性乳癌組織におけるPD-L1発現を半定量的免疫組織染色にて評価した。35%の症例がPD-L1陽性であり、PD-L1陽性乳癌は予後が良好な傾向を認めた。

研究成果の概要(英文)：1. Tumor infiltrating lymphocyte was extracted using gentle MACS Dissociator from specimens of core needle biopsy in HER2 positive breast cancer who underwent neoadjuvant chemotherapy. Functional assay of Treg was performed by flow cytometry using fluorescent anti-body for CD4, CD4, CD45RA and FOXP3. In breast cancer tissue, proportion of functional Treg was significantly higher than proportions in PBMC and normal breast tissue. Fraction of Treg was significantly lower in pCR population than in non pCR population (25.1% vs. 29.3%, $p = 0.044$). 2. Expression of PD-L1 in HER2 positive breast cancer was evaluated using auto staining system and semi-quantitative immunohistochemical analysis. The proportion of PD-L1 positive (>1%) was 35%, and there was tendency of better relapse-free survival in patients with PD-L1 positive breast cancer compared with those with PD-L1 negative breast cancer.

研究分野：breast

キーワード：breast HER2 Treg PD-L1

1. 研究開始当初の背景

immunocheckpoint 標的療法の皮膚悪性黒色腫、腎臓癌および肺癌の臨床的な大成功により免疫療法は、従来の標準治療である手術療法、抗がん剤療法および放射線療法にならぶ癌治療における柱となっている。

一方で、乳癌に対する免疫療法の有用性は依然として確立しておらず、今後の研究成果が待たれる状態である。乳癌に対する免疫療法が奏効しない理由の一つとして腫瘍悪性度が低いことが挙げられる。乳癌 subtype のひとつである HER2 陽性乳癌は高悪性度を特徴とし、腫瘍リンパ球浸潤 (TIL) を多くの症例で認めていることから immunocheckpoint 標的療法が奏効する可能性がある。しかしながら乳癌組織における TIL の効果予測因子としての臨床的意義は確立していない。また immunocheckpoint の重要な効果予測因子とされる PD-L1 について乳癌組織における測定方法や cut-off については確立されていない。Immune checkpoint の機序の一つとして坂口らが発見した Treg が重要な役割を果たしていることが判明しているが、HER2 陽性乳癌における Treg の意義は明らかとされていない。

申請者らは腫瘍検体から TIL の回収し flow cytometry を用いて Treg の機能解析を推し進め、HER2 陽性乳癌に対する immune checkpoint を標的とした新規薬物療法を開発する。また当院にて確立している半定量的免疫組織学的検査方法を用いて、乳癌組織における PD-L1 発現を解析し、HER2 陽性乳癌の PD-L1 発現の臨床的意義を明らかとする。

2. 研究の目的

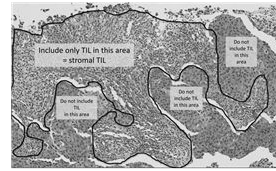
- 乳癌術前化学療法における TIL の効果予測因子としての意義を明らかとする。
- HER2 陽性乳癌 TIL における Treg 機能解析を行い、HER2 陽性乳癌術前化学療法における効果予測因子としての意義を明らかとする。
- HER2 陽性乳癌における PD-L1 発現の半定量的解析方法の確立し、HER2 陽性乳癌における PD-L1 発現の予後因子としての意義を明らかとする。

3. 研究の方法

HER2 陽性乳癌における TIL 発現解析と術前化学療法の効果予測

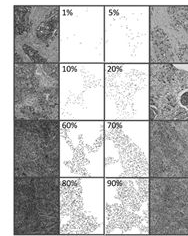
Anthracycline および taxane 順次投与による術前化学療法が施行されたのちに根治術が施行された、HER2 陽性乳癌 53 症例および TNBC 66 症例の合計 119 症例を対象に、Str-TIL (間質浸潤) を半定量的に評価し (引用文献 1)、TIL50%以上を LPBC と定義、TIL 10-40%を中等度発現、TIL 5%以下を低発現として定義し、pCR (病理学的完全奏功) および臨床病理学的因子と Str-TIL の相関を検討した。

腫瘍辺縁の間質浸潤リンパ球 (Str-TIL) を評価



乳がんTILの評価方法 (International TILs Working Group) (Ann Oncol 2015)

半定量的評価



HER2 陽性乳癌 TIL における Treg 機能解析と臨床的意義の検討

対象

術前化学療法 (アンスラサイクリンおよびタキサン+トラスツズマブ併用療法) が施行された HER2 陽性*乳癌のうち、針生検検体から TIL を回収し Treg の機能解析が可能であった HER2 陽性乳癌

*HER2 陽性は IHC 法で 3+または FISH 法で HER2/CEP 17 > 2.0 の遺伝子増幅と定義

乳癌組織からの TIL 回収方法 (引用文献 2)

針生検により乳癌検体を採取した。

採取した乳癌検体を細断した後に、gentle MACS Dissociator (Miltenyi Biotec) のプロトコール 1 に従ってホモジナイズした細胞浮遊液から TIL を抽出した。

比較対象として末梢血液中のリンパ球 (PBMC) を density gradient centrifugation using Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) により抽出した。

TIL からの Treg 同定方法 (引用文献 3)

蛍光標識した CD4, CD8, CD45RA および FOXP3 抗体にて TIL を染色し flow cytometry にて TIL の機能解析を施行した。

CD4+CD8-細胞を識別し、さらに FOXP3 および CD45RA 染色により Treg 分画 (FrI, FrII, FrIII) に分類した。

において FrII を functional Treg*として臨床病理学的因子および術前化学療法による pathological complete response (pCR) との相関を検討した。

*functional T reg は suppression assay を行い Tcell 増殖抑制作用を示すこと、一方で Fr と Fr は Tcell 抑制作用を示さないことを確認した。

HER2 陽性乳癌における PD-L1 発現の半定量的解析による臨床的意義の検討

対象

針生検または手術標本が利用可能であった HER2 陽性*早期乳癌

*HER2 陽性は IHC 法で 3+または FISH 法で HER2/CEP 17 > 2.0 の遺伝子増幅と定義

方法

1. 乳癌組織における免疫組織化学染色法による PD-L1 発現の半定量的解析 (引用文献 4)

ホルマリン固定（15-60 時間）された乳癌組織をパラフィン包埋後、3-4 μm 連続切片を作成し、免疫染色を labeled streptavidin biotinylated-peroxidase (LSAB) 法にて施行した。PD-L1 一次抗体として SP263, VENTANA を用いた。

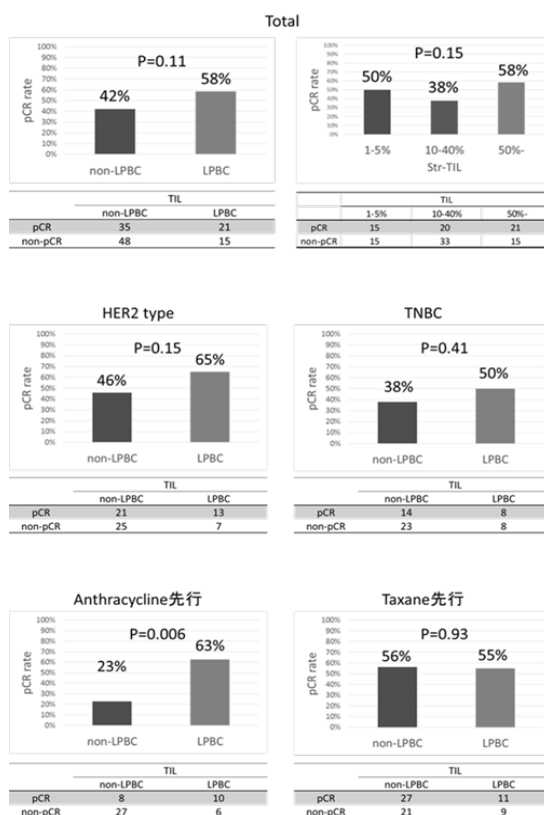
免疫染色は Benchmark XT (Roche, Basel, Schweiz) を用い、マニュアルに従って自動染色した。二次抗体から発色までは I-VIEWDAB ユニバーサルキット (Roche) を用いた。

PD-L1 染色結果の半定量的評価として、virtual microscopy (Hamamatsu photonics) により取り込んだ画像を免疫染色自動解析ソフト Genie を用いて発現解析を行った。

4. 研究成果

HER2 陽性乳癌および TNBC における TIL 半定量的評価と術前化学療法レジメン毎の治療効果の相関 Treg

- Anthracycline および taxane 順次投与による術前化学療法が施行された HER2 陽性乳癌、TNBC を対象とした検討において TIL と pCR に有意な相関を認めなかった。
- Anthracycline 先行レジメンが施行された症例群において TIL 高発現は pCR と相関したが、taxane 先行レジメンが施行された症例群においては TIL 発現と pCR に有意な相関を認めなかった。
- 乳癌における TIL の効果予測因子としての意義については、各レジメン毎の検討を要するものと考えられ、また各種抗癌薬による immunocheckpoint を含めた腫瘍免疫に与える影響についての検討を要するものと考えられた。



HER2 陽性乳癌における Treg 分画

- 本手技により乳癌組織より採取できた細胞数の平均は 3.9×10^5 であり flow cytometry による機能解析は十分に可能であった (Figure 1)。
- PBMC および正常乳腺組織中リンパ球との比較において、乳癌組織 TIL では Fr II の割合が有意に多く認められた (Fr II 分画: PBMC vs. 正常乳腺リンパ球 vs. 乳癌組織 TIL, 4.5% vs. 5.2% vs. 27.3%)。

Functional Treg 割合と臨床病理学的因子との相関

- 臨床病理学的因子との相関では、FrII 分画は腫瘍径 ($T1 < T2$)、高悪性度乳癌において高い割合を認めた。
- pCR との相関において、FrII 分画の割合は pCR 例で 25.1%、non pCR 例で 29.3% であり、non pCR 例で FrII 分画が高い傾向が認められた ($p = 0.044$) (Figure 2)。

Figure 1. Representative flow cytometry analysis of for fractionation of Treg (Fr I, II, III) in HER2 positive breast cancer

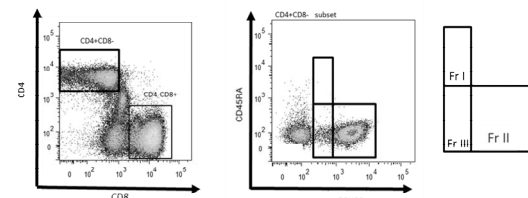


Figure 2. Box plot of the percentage of FrII in relation to pCR. The box shows the 25-75 percentile.

PD-L1 と臨床病理学的因子との相関

CPS (combined positive score): PD-L1 positive cell/all cells を評価し cut-off value 1%および 10%における臨床病理学的因子との相関を検討した。

各 cut-off による PD-L1 陽性および陰性の無再発生存割合を比較検討した。

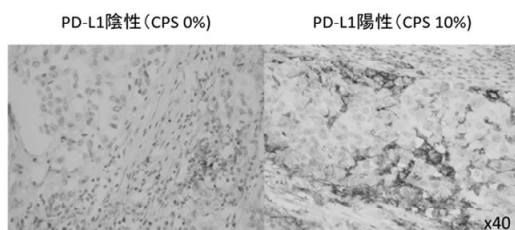
HER2 陽性乳癌における PD-L1 発現の頻度

- 本手技による半定量的 PD-L1 発現解析において、cut-off 1%および 10%における PD-L1 陽性乳癌は 35%および 15%であった (Figure 3)。
- PD-L1 陽性は腫瘍径、高増殖能および TIL

陽性と相関する傾向を認めた。

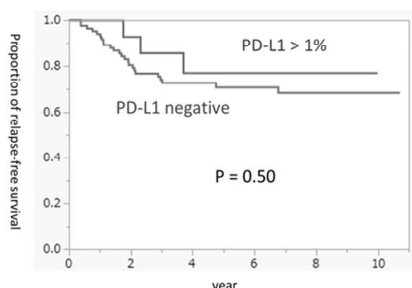
- HER2 陽性乳癌における PD-L1 発現と予後の相関。
- 臨床病理学的因子との相関では、FrII 分画は腫瘍径 (T1 < T2)、高悪性度乳癌において高い割合を認めた。
- 無再発生存割合 (relapse-free survival: RFS) において PD-L1 発現 (>1%) は有意な予後因子とならなかった (Figure 4)。

Figure 3. Representative case of PD-L1 positive and negative in HER2 positive breast cancer



CPS (combined positive score): PD-L1 positive cell/all cells

Figure 4. Kaplan meyer survival curve stratified of PD-L1 negative and positive (>1%) in HER2 positive breast cancer



引用文献

1. Salgado R, et al; International TILs Working Group 2014. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015 Feb;26(2):259-71
2. <https://www.miltenyibiotec.com/US-en/products/macs-sample-preparation/tissue-dissociators-and-tubes/gentle-macs-dissociator/gentlemacstm-dissociator.html/>
3. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer.* 2010 Aug 15;127(4):759-67.
4. Miho TANAKA, et al, Auto-Analysis of Immunohistochemical Findings for Breast Cancer Using Specified Software and Virtual Microscopy. *Inscho Byori* 60: 206-211, 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. Shigematsu H, et al. Overexpression of topoisomerase II alpha protein is a factor for poor prognosis in patients with luminal B breast cancer. *Oncotarget.* 2018 Jun 1;9(42):26701-26710. doi: 10.18632/oncotarget.25468. eCollection 2018 Jun 1.
2. Shigematsu H, et al. Comparison of CK-IHC assay on serial frozen sections, the OSNA assay, and in combination for intraoperative evaluation of SLN metastases in breast cancer. *Breast Cancer.* 2018 Mar;25(2):191-197. doi: 10.1007/s12282-017-0811-y. Epub 2017 Nov 1.

[学会発表](計 2 件)

1. 重松 英朗、尾崎 慎治他、早期乳癌における TOP2A 過剰発現および遺伝子増幅の臨床的意義についての検討、第 26 回日本乳癌学会学術総会、2018
2. 重松 英朗、尾崎 慎治他、術中 CK-IHC および術中 OSNA の併用によるセンチネルリンパ節転移の術中確定診断、第 25 回日本乳癌学会学術総会、2017

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

- (1)研究代表者
重松英朗 (SHIGEMATSU, Hideo)
独立行政法人国立病院機構(呉医療センター臨床研究部)・その他部局等・その他
研究者番号: 40543707
- (2)研究分担者
岡田守人 (OKADA, Morihito)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号: 70446045
- (3)連携研究者
()
研究者番号:
- (4)研究協力者
尾崎慎治 (OZAKI, Shinji)