

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19855

研究課題名(和文) 乳癌におけるGalectin-9/Tim-3の発現と臨床病理学的因子の検討

研究課題名(英文) Analysis of Tumor Immune Evasion of T cell immunoglobulin mucin domain-containing molecule 3 (Tim-3) /Galectin-9 interaction in Breast Cancer

研究代表者

前田 訓子 (MAEDA, Noriko)

山口大学・医学部附属病院・診療助教(4日/週)

研究者番号：10738876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌腫瘍におけるTim-3とGalectin-9の発現を免疫染色にて検討した。Tim-3は高発現群と低発現群、Galectin-9は陰性群と陽性群に分類し、臨床病理学的因子との検討を行ったが関連は認められなかった。予後に関して検討したところTim-3高発現群、Galectin-9陰性群にて有意に無再発生存期間が短かった。また無再発生存期間での多変量解析を行ったところTim-3高発現が独立した予後規定因子となった。Tim-3高発現とGalectin-9発現のない群が腫瘍局所の免疫疲弊状態を示唆していることが示された。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated the expression of Tim-3 and Galectin-9 in tumor cells from patients with breast cancer. No significant associations were identified between Tim-3 / Galectin-9 expression and clinicopathological factors. The disease free survival were significantly shorter in the Tim-3-high group as compared with the Tim-3-low group ( $p=0.009$ ). The disease free survival were significantly shorter in the Galectin-9-negative group as compared with the Galectin-9-positive group ( $p=0.008$ ). On univariate analysis, the Tim-3 expression had a significant association with disease-free survival, lymphovascular invasion, HER2, low/absent of Galectin-9 expression and nuclear grade. Multivariate analysis demonstrated the significant role of Tim-3 expression in tumor cells as an independent prognostic factor for patients with breast cancer. The status of Galectin-9 and Tim-3 could be determined on clinical examination and may have treatment value in the future.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：Tim-3 Galectin-9 乳癌

1. 研究開始当初の背景

乳癌は、女性の癌罹患率第1位の疾患で、年間6万人が新たに診断されている。ホルモン療法剤、抗がん剤、分子標的治療など多岐にわたる治療があるが、乳癌再発時には、術後補助療法で使用された薬剤に耐性を示すことが多く、治療に難渋することが多い。乳癌再発時も上述した多岐にわたる治療があり、乳癌に対する免疫療法は、これまで実臨床では注目されてこなかった。しかしながら、最近、抗PD-1療法など乳癌においても免疫療法は注目されてきており、副作用が少なく、再発後に長期間に及ぶ治療をうける患者のQOL維持に適していることで、免疫療法は乳癌治療にも最適であると考えられる。

最近注目されている免疫のNegative signalに着目し、未開発の乳癌領域の免疫療法を開発するため以下の研究を行う。免疫のNegative signalの強力な制御因子の一つであるTim-3は主にType I helper T細胞(Th1)上に発現し腫瘍に発現するGalectin-9と結合する。結合後T細胞がAnergyとなることが報告され、現在注目されているImmune checkpoint分子の一つである。このTim-3とGalectin-9の乳癌での発現と臨床病理学的因子との関連を検討し、in vitro(細胞株)および動物実験で確認する。今後、Translational researchとしてヒトへの応用の可能性も高いと考えられる。

2. 研究の目的

(1)免疫のNegative signal

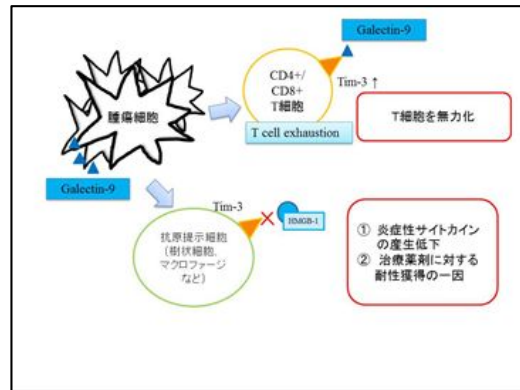
近年、免疫機構が負のバランスに傾くことによる“免疫無力化”(Anergy)、腫瘍の免疫逃避である“寛容化”(Tolerantize)といったNegative signalが注目され、免疫のダークサイド(dark side)と名付けられている。また担癌患者の体内では免疫系の疲弊が生じていることが分子レベルで明らかにされつつある。これは免疫能の活性化(Positive signal)に重きをおいた従来の免疫療法の考え方を一転させた新知見であり、抗腫瘍免疫を抑制するT細胞上の分子(Immune checkpoint)をターゲットとした治療法の開発が近年急速に進められている。

(2)Tim-3、Galectin-9について

Tim-3(T cell immunoglobulin and mucin 3)は、活性化T細胞のうち、特にTh1細胞やCD8+T細胞に発現しており、慢性炎症や腫瘍微小環境でのT細胞疲弊(T cell exhaustion)に深く関わっている。T細胞以外にも単球、マクロファージ、樹状細胞にも発現している。

Galectin-9は腫瘍細胞に多く発現しており、Tim-3のリガンドの一つとしてTh1細胞の無力化やアポトーシスを促し免疫抑制に作用することが報告されている。他の作用として好酸球遊走因子としての働きのほか、細胞の接着・増殖、がん転移など様々な機能に関与することが知られている。

これら上述した分子の報告は他癌での報告は散見されるが、とくに患者検体を用いた乳癌の検討は少なく、Tim-3/Galectin-9の相互作用が乳癌腫瘍周囲の微小環境においても明確にされたものはない。(図 腫瘍微小環境におけるTim-3ならびにGalectin-9の作用)



(3)腫瘍微小環境における免疫疲弊状態の解明

腫瘍微小環境におけるTim-3およびGalectin-9の発現は、個々の発現の検討はこれまで行われていたが、ほとんどがin vitroの報告であり、今回我々が行おうとしている患者検体および予後などの臨床病理学的因子との関連を検討した報告は非常に少ない。実際に腫瘍微小環境における免疫疲弊状態は、腫瘍の増殖や進展を阻害する抗腫瘍免疫の作用が非常に減弱しているまたは無力化している状態と考えられる。この免疫疲弊状態を解明することは、阻害する薬剤の開発につながり、本来の抗腫瘍免疫が復活し、著しい治療効果をもたらすと考えられる。

3. 研究の方法

(1)Tim-3/Galectin-9の免疫組織学的染色条件の確立と判断基準のスタンダード化

まずリガンド側のGalectin-9と受容体のTim-3の染色条件の確立を行う。Galectin-9は腫瘍細胞に発現しており、その強陽性、陽性、陰性の判断基準のスタンダード化の確認を行う。次に受容体側のTim-3の染色条件の確立と腫瘍微小環境において、陽性細胞の中でも特に浸潤リンパ球での発現に着目する。腫瘍浸潤リンパ球のサブセットの検討も含め、染色の強陽性、陽性、陰性の判断基準のスタンダード化を行う。Pilot StudyではGalectin-9については染色に成功している。Tim-3に関しては腫瘍細胞および腫瘍の間質も染色され、CD4抗体およびCD8抗体での多重染色を行い腫瘍浸潤リンパ球での発現を検討する。またTim-3は腫瘍周囲の間質細胞やMDSC(Myeloid-derived Suppressor Cells)に発現することも報告されており、これらとの鑑別の目的も含めCD11b抗体およびCD11c抗体での染色も行う予定である。最終的にGalectin-9とTim-3の多重染色を行い、画像解析にてGalectin-9およびTim-3の発現を同一検体にて観察可能とし、これをこのまま続け、のちの研究に耐えうる染色条

件を確立する。

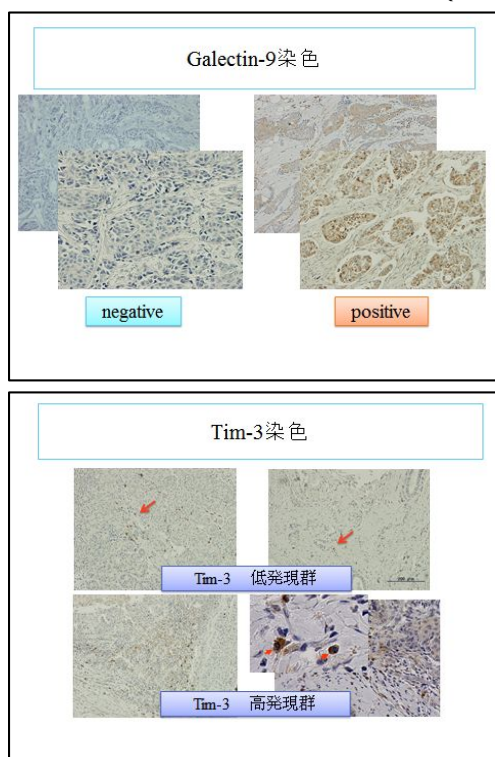
(2)Tim-3/Galectin-9 の染色ならびにこれらの発現と乳癌患者の臨床学的背景との関連を検索

山口大学医学部附属病院消化器・腫瘍外科で原発巣切除手術を施行された浸潤性乳管癌症例を対象として予定している。これらの腫瘍細胞における Galectin-9 発現と腫瘍浸潤リンパ球での Tim-3 の発現を免疫組織学的染色によって評価する。これら染色結果を臨床学的因子（再発や予後）および病理学的因子（腫瘍径、組織型、ER、PgR、HER2、Ki-67 発現を含むサブタイプ、脈管侵襲、核グレード、リンパ節転移）との関連について検討する予定である。

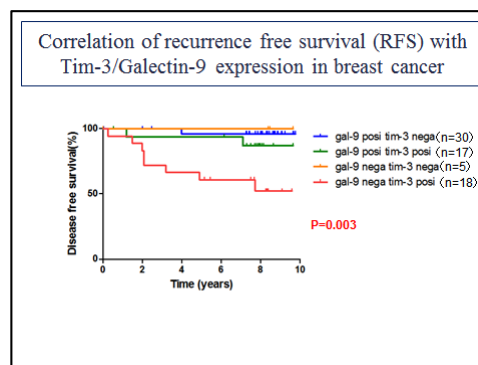
#### 4. 研究成果

免疫の Negative signal の強力な制御因子の一つである Tim-3 は主に Type 1 helper T 細胞 (Th1) 上に発現し腫瘍に発現する Galectin-9 と結合する。結合後 T 細胞が Anergy となることが報告され、現在注目されている Immune checkpoint 分子の一つである。乳癌における微小環境において免疫の主力と考えられる T 細胞の免疫疲弊とその原因に対する研究は今までほとんど行われてきていない。近年注目されている Immune checkpoints の中でも Tim-3 という比較的新しい T 細胞の抑制に関わる共因子に着目し乳癌で検討した。

乳癌腫瘍における Tim-3 と Galectin-9 の発現を免疫染色にて検討した。70 例の乳癌腫瘍パラフィン包埋切片を用い、それぞれ抗体を用いて染色を行った。Tim-3 は低発現群と高発現、Galectin-9 は陰性群と陽性群に分類し臨床病理学的因子との検討を行った（下図）。



Tim-3 ならびに Galectin-9 発現と年齢、腫瘍径、リンパ節転移の有無、リンパ管脈管浸潤の有無、核グレード、ホルモンレセプター発現、HER2 発現の各項目にて検討したが、これらの因子と関連は認められなかった。予後に関して検討したところ Tim-3 高発現群、Galectin-9 陰性群にて有意に無再発生存期間が短かった。また Tim-3 低発現かつ Galectin-9 陽性群が最も予後が良好な群であり、観察期間中に再発をきたした症例を認めなかった。一方 Tim-3 高発現群かつ Galectin-9 陰性群が最も予後不良であった。（下図）



また無再発生存期間での多変量解析を行ったところ Tim-3 高発現が独立した予後規定因子となった。Tim-3 高発現と Galectin-9 陰性となる群が腫瘍局所の免疫疲弊状態を示唆し、予後不良と予想され、今後バイオマーカーとして有用となる可能性がある。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

前田 訓子、乳癌微小環境における Tim-3 と Galectin-9 の発現と予後に関する検討、第 24 回日本乳癌学会総会、2016 年 6 月 17 日、東京ビックサイト（東京都江東区）

前田 訓子、乳癌患者における Tim-3 と Galectin-9 の発現と予後に関する検討 第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016 年 4 月 14 日、大阪国際会議場/リーガロイヤルホテル大阪（大阪府大阪市）

前田 訓子、乳癌腫瘍浸潤リンパ球における Tim-3 発現および乳癌腫瘍の Galectin-9 発現と予後に関する検討 第 23 回日本乳癌学会総会、2015 年 7 月 2 日 東京国際フォーラム（東京都千代田区）

前田 訓子、乳腺・内分泌 乳癌腫瘍浸潤リンパ球における Tim-3 の発現と乳癌細胞における Galectin-9 の発現の検討 第 115 回日本外科学会定期学術集会 2015 年 4 月 16 日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 訓子 (MAEDA, Noriko)

山口大学・医学部附属病院・診療助教

研究者番号：10738876