

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10547

研究課題名(和文) 内因性抗HER2自己抗体高値の乳癌患者において術後再発が抑制される免疫学的機序

研究課題名(英文) Association of autoantibodies to HER2 with tumor microenvironments for humoral immunity and prognosis in patients with breast cancer

研究代表者

下田 雅史 (Shimoda, Masafumi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30644455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は血清中抗HER2自己抗体の濃度が高い早期乳癌症例の予後が良好であることを見出し既に報告している。本研究ではHER2自己抗体が高値の乳癌腫瘍における免疫学的微小環境を検討した。抗HER2自己抗体値の高値群33例および低値群20例を研究対象とした。抗HER2自己抗体高値群は低値群よりも有意に予後良好であった。高値群は低値群よりも腫瘍浸潤B細胞、形質細胞、CXCL13陽性リンパ球が有意に多く、腋窩リンパ節における濾胞性CD4陽性リンパ球も有意に多かった。以上より、抗HER2自己抗体が高値の乳癌腫瘍微小環境において、液性免疫系が活性化されてい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、HER2自己抗体高値の患者群においては腋窩リンパ節においてB細胞の成熟が促され、CXCL13陽性リンパ球によってB細胞が原発巣にリクルートされることで液性免疫が活性化されるという一連の機序が明らかとなってきた。この流れが乳癌患者において実際に示された意義は大きい。乳癌は腫瘍の体細胞変異が比較的少なく、腫瘍免疫の関与は限定的と思われてきた。しかし本研究で示唆されたように、液性免疫が乳癌の腫瘍免疫においてポジティブな役割を担うとすると、本研究成果を手掛かりとして、新たな免疫療法の進展が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that high serum concentration of anti-HER2 autoantibody (HER2-AAb) is associated with favorable outcomes in patients with early-stage breast cancer. In the present study, we investigated the immunological tumor microenvironment in patients with early-stage breast cancer whose serum HER2-AAb was high. Subjects included 33 patients with high levels of serum HER2-AAb and 20 patients with low levels of serum HER2-AAb. The high HER2-AAb group showed significantly longer RFS than the low HER2-AAb group. Cell counts of tumor-infiltrating B cells, plasma cells, and CXCL13-positive lymphocytes in the high HER2-AAb group were significantly greater than those in the low HER2-AAb group. Follicular CD4-positive lymphocytes in the axillary lymph nodes of the high HER2-AAb group were more present than those of the low HER2-AAb group. Thus, our results suggest that humoral immunity was enhanced in the tumor microenvironment of the high HER2-AAb group.

研究分野：乳腺外科学

キーワード：腫瘍微小環境 液性免疫 自己抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍免疫における主役は細胞性免疫であるが、近年、液性免疫も腫瘍免疫の重要な役割を果たしている事実が報告され始めている。特に乳癌において、腫瘍の免疫シグネチャーの網羅的解析により形質細胞のシグネチャーが最も良好な予後と相関すること(Gentles et al., Nat Med. 2015)、B 細胞シグネチャーと乳癌の良好な予後も相関すること、B 細胞および形質細胞の乳癌組織への浸潤が良好な予後と相関することが証明された(Iglesia et al., Clin Cancer Res. 2014; Mahmoud et al., Breast Cancer Res Treat. 2012; Schmidt et al., Clin Cancer Res. 2012)。さらに、マウスモデルによって、腫瘍細胞に結合した腫瘍抗原に対する抗体が樹状細胞を活性化し、最終的に細胞性免疫によって腫瘍が排除されることも明らかとなった(Carmi et al., Nature 2015)。

一方、我々は乳癌の 25-30% で過剰発現し悪性化を促進する HER2/ERBB2 チロシンキナーゼ受容体に対する自己抗体に着目し、乳癌における抗 HER2 自己抗体(HER2-AAb)の臨床病理学的意義を検討した。ELISA 法を応用し、高感度かつ特異的な HER2-AAb の検出系を構築したのちに健康人 100 例および治療前の早期乳癌患者 600 例(非浸潤性乳管癌 100 例、浸潤性乳癌 500 例)における血清 HER2-AAb 値を測定し、各種臨床病理学的因子との関連を検討した(Tabuchi et al., Breast Cancer Res Treat. 2016)。その結果、(1) HER2-AAb 値は健康人よりも非浸潤性乳管癌患者および浸潤性乳癌患者で有意に低値であった。(2) 浸潤性乳癌患者において、HER2-AAb 高値群は低値群よりも有意に予後が良好であり、かつ独立した予後規定因子であった。(3) 浸潤性乳癌患者の 5.2% は健康人および非浸潤性乳管癌患者の最高値よりも高い HER2-AAb 値を示し、全例無再発であった。

以上より、浸潤性乳癌患者の一部では、乳癌の罹患によって HER2-AAb が産生されるような腫瘍免疫が誘導され、乳癌術後の微小残存病変が排除されて再発が抑制されるのではないかと仮説を立てた。従って本研究では、HER2-AAb が高値の乳癌患者における免疫学的な腫瘍微小環境を多方面から検討し、局所で何が起きているのかを明らかにすることにした。

2. 研究の目的

下記の 3 つの事項を小目的とし、全体として HER2-AAb 高値の乳癌患者における免疫学的な腫瘍微小環境を明らかにすることを目指した。

- (1) 血清抗 HER2 自己抗体高値の患者における腫瘍免疫の特徴を明らかにする
- (2) 腫瘍浸潤 B 細胞受容体のレパトア解析を行い、血清 HER2-AAb 高値の患者において抗原特異的な免疫反応が生じているのかを明らかにする
- (3) 腫瘍の HER2 の状況を検討し、HER2 の免疫原性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 患者

対象は、先行研究(Tabuchi et al., Breast Cancer Res Treat 157:55, 2016)で使用した健康人 100 例及び浸潤性乳管癌患者 500 例から抽出した。この患者群は 2005 年から 2011 年に当科で術前治療なしに手術を施行され、手術前に血清が採取・保管された全症例である。健康人 100 例の血清中抗 HER2 自己抗体(HER2-AAb)濃度の対数変換値の平均 \pm 2SD を算出し、平均+2SD を超えるものを HER2-AAb 高値群、その範囲内のものを HER2-AAb 中間群、平均-2SD 未満のものを HER2-AAb 低値群とした。先の浸潤性乳管癌患者 500 例のうち、HER2-AAb 高値群に当てはまる 33 例及び HER2-AAb 低値群に当てはまる 20 例を本研究の解析対象とした。

(2) 免疫染色

対象症例のうち、手術時の乳癌原発巣のパラフィン包埋標本(高値群 31 例、低値群 18 症例)及び及び同側腋窩リンパ節のパラフィン包埋標本(高値群 29 例、低値群 18 例)を用いて免疫染色を行なった。染色に用いた一次抗体は anti-Kappa Light Chain、anti-CD20、anti-HLA class I、anti-CD8、anti-FOXP3、anti-CXCR5、anti-CD4、anti-CXCL13、anti-PD-L1 (SP142)である。CD4 と CXCR5 の二重染色には Double Stain IHC Kit (Abcam)を用い、腋窩リンパ節を染色した。HER2 の免疫染色には HercepTest II Kit (Dako)を用いた。

(3) 組織学的評価

腫瘍浸潤免疫細胞(IC)は 3 つの領域(腫瘍内[IT]、腫瘍隣接間質[AS]、及び間質)に分けて 1 個ずつ計数した。40 倍の視野でランダムに 5 視野を計数し、その総和を記録した。腋窩リンパ節については、CXCR5 陽性の濾胞内にある CD4 陽性リンパ球(Follicular CD4-positive IC)を計数した。腫瘍細胞(TC)で発現する免疫関連分子については、染色された腫瘍細胞を全腫瘍細胞の割合(%)として表した。HER2 については ASCO/CAP のガイドラインに従った。

(4) B 細胞受容体(BCR)レパトア解析

対象症例のうち、乳癌原発巣の新鮮凍結標本が得られ、かつ B 細胞の浸潤の多かった高値群 10 例、低値群 5 例を対象とした。新鮮凍結標本から RNA を抽出し、BCR IgHV、IgHJ の CDR3 領域について、バイアスを最小化するように設計したプライマーで RT-PCR を行い、産物を次世代シーケンサーを用いてシーケンスを行なった。解析手法は既報のもの(Kitaura et al., BMC Immunol 17:38, 2016)を用いた。

(5) HER2 の評価

HER2 の遺伝子増幅は fluorescence in situ hybridization によって検出し、CEP17 のコピー数に対する HER2 のコピー数の比を算出して評価した。HER2 の遺伝子変異については、凍結標本から腫瘍を切り出し、DNA を抽出した。評価可能な DNA は HER2-AAb 高値群 22 例、低値群 14 例であった。DNA から xGen custom probes (IDT) によって HER2/ERBB2 の全エクソンを増幅し、Illumina MiSeq にてシーケンスした。Mutant allele frequency は 8% 以上を有意とした。

(6) 統計解析

HER2-AAb の分布の正規性の検定には Shapiro-Wilk 検定を用いた。生存率の評価には Kaplan-Meier 曲線を用い、log-rank 検定で比較した。腫瘍浸潤リンパ球数、腫瘍発現タンパクの陽性率、及び BCR レパトアの群間比較には Mann-Whitney U 検定を用いた。HER2 IHC 及び臨床病理学的因子の群間比較にはカイ 2 乗検定もしくは Fisher の正確検定を用いた。任意の 2 因子間の相関を Spearman のノンパラメトリック相関係数及び p 値で検討した。全ての検討は両側検定で行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

4. 研究成果

(1) 患者選択とその予後 (Fig. 1)

健康人 100 名の血清 HER2-AAb 濃度の対数変換値の分布は正規分布を示した。平均 \pm 2SD をカットオフとして 500 例の乳癌患者を 3 群に分けると、33 例が高値群、447 例が中間群、20 例が低値群に分類された。無再発生存率を 3 群間で比較すると、高値群と低値群の間に有意な差を認められた。そこで高値群と低値群を本検討の対象とすることにした。各種臨床病理学的因子は両群間に差を認めなかった。

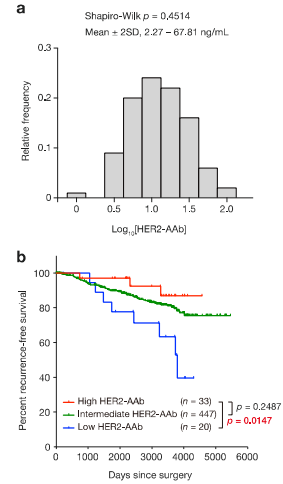


Figure 1.

(2) 血清中抗 HER2 自己抗体濃度と腫瘍浸潤免疫細胞との関連 (Fig. 2)

高値群と低値群の間で、乳癌原発巣における腫瘍浸潤リンパ球数の比較を行った。すると、CD20 陽性リンパ球(B 細胞)、IGKC 陽性リンパ球(形質細胞)、及び CXCL13 陽性リンパ球が高値群で有意に多く浸潤していた。一方、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、PD-L1 陽性リンパ球、CD8 陽性リンパ球(細胞障害性 T 細胞)、及び FOXP3 陽性リンパ球(制御性 T 細胞)は 2 群間に有意差を認めなかった。さらに乳癌の所属リンパ節である腋窩リンパ節において、CXCR5 陽性リンパ濾胞に存在する CD4 陽性リンパ球(濾胞性ヘルパー T 細胞)は高値群で有意に多いことが判明した。

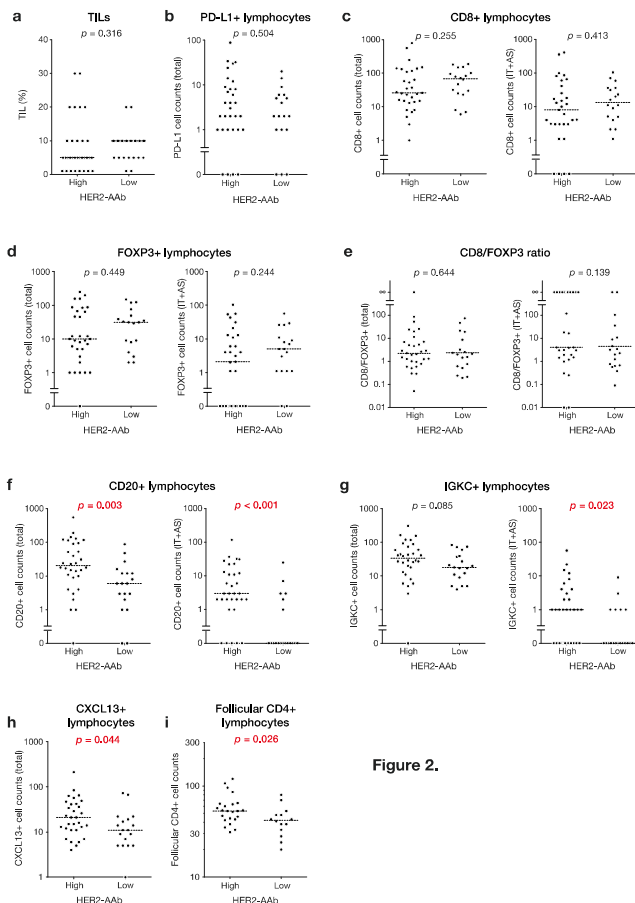


Figure 2.

(3) 腫瘍浸潤免疫細胞における BCR のレパトア解析 (Fig. 3)

BCR レパトアの多様性を Shannon のエントロピーで表すと、HER2-AAb 高値群、低値群ともレパトアの偏りが認められることがわかった。すなわち、腫瘍浸潤 B 細胞においては、HER2-AAb 値に関わらず何らかの特異的免疫反応が生じていることが示唆された。

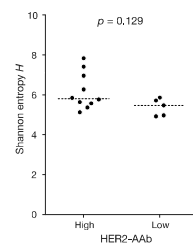


Figure 3.

(4) 腫瘍における免疫関連分子の発現及び HER2 の発現・遺伝子変化 (Fig. 4)

腫瘍細胞における CXCL13、MHC class I 分子、PD-L1 の発現陽性率を検討したところ、いずれも HER2-AAb 高値群と低値群の間に有意差は認められなかった。また、HER2 遺伝子の増幅、発現強度、及びミスセンス変異も高値群と低値群の間に有意差は認められなかった。

(5) 解析した各因子の相関 (Fig. 5)

以上、本研究で検討した全ての因子

のうち、任意の 2 つの因子の間で相関が見られるかどうかを検討した。CD20 陽性リンパ球は IGKC 陽性リンパ球と強い正の相関を認め、CXCL13 陽性リンパ球、CD8 陽性リンパ球、FOXP3 陽性リンパ球、PD-L1 陽性リンパ球・腫瘍細胞との間に概ね正の相関を認めた。

(6) 本研究成果の位置付けとインパクト、今後の展望

我々は先行研究において、早期乳癌患者の血清中に HER2-AAb が認められること、及び HER2-AAb 高値では再発が有意に抑制されることを報告した。そこで、血清中 HER2-AAb 濃度が高い患者では腫瘍免疫が活性化されて再発が抑制されているのが最大の関心事である。本研究では、血清中 HER2-AAb 濃度が高い患者の乳癌原発巣において、CXCL13 陽性リンパ球、B 細胞、形質細胞の浸潤が高度であること、かつ乳腺の二次リンパ組織である腋窩リンパ節において、多くの濾胞性ヘルパー T 細胞が存在することが示唆された。濾胞性ヘルパー T 細胞は液性免疫において要となるサブセットであり、二次リンパ組織において B 細胞の成熟を促進する。CXCL13 は B 細胞を強力に誘引するケモカインであり、濾胞性ヘルパー T 細胞や濾胞性樹状細胞から主に分泌される。以上より、HER2-AAb 高値の患者群においては腋窩リンパ節において B 細胞の成熟が促され、CXCL13 陽性リンパ球によって B 細胞が原発巣にリクルートされることで液性免疫が活性化されるという一連の機序が明らかとなってきた。この流れが乳癌患者において実際に示された意義は大きい。乳癌は腫瘍の体細胞変異が比較的少なく、腫瘍免疫の関与は限定的と思われてきた。しかし本研究で示唆されたように、液性免疫が乳癌の腫瘍免疫においてポジティブな役割を担うとすると、本研究成果を手掛かりとして、新たな免疫療法の進展が期待される。

では、液性免疫の活性化が再発の抑制に寄与するのだろうか。冒頭に述べたように、今までに様々な研究手法を用いて、乳癌患者における液性免疫の活性化と予後が検討され、乳癌患者における液性免疫の活性化が良好な予後と正の相関を示すことが報告されている。従って、乳癌においては液性免疫が抗腫瘍免疫に果たす役割は少なくないと考えられ、本研究の趣旨とも一致する。今後、HER2-AAb 高値の乳癌患者で活性化されることが判明した液性免疫が、どのような機序で抗腫瘍効果を示すのかを明らかにする必要があるだろう。

なぜ特定の患者でのみ HER2-AAb が産生されるのかを明らかにすることも重要である。本研究では、HER2-AAb の値と HER2 の発現、遺伝子増幅、あるいは遺伝子変異との間には相関が認められなかった。従って、HER2 を修飾する分子に免疫原性があるのか、あるいは全く別の免疫学的な機序により HER2 に対する自己抗体が作られやすくなるのか、これらの可能性を検討していくことによって、新規の乳癌免疫療法の開発につながることを期待される。

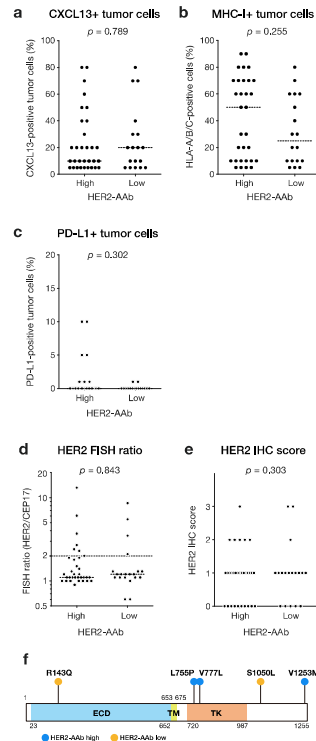


Figure 4.

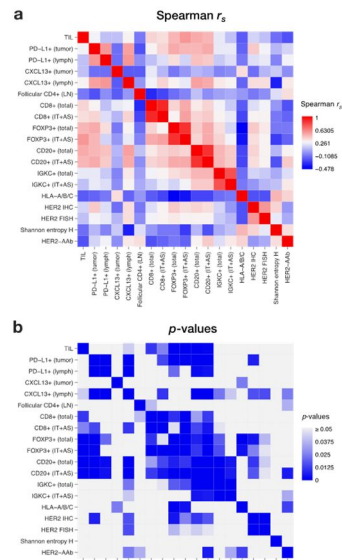


Figure 5.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 下田雅史
2. 発表標題 乳癌患者における HER2 自己抗体と腫瘍浸潤 B 細胞との相関
3. 学会等名 第25回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤泰史
2. 発表標題 HER2自己抗体高値乳癌患者における液性免疫
3. 学会等名 第27回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masafumi Shimoda
2. 発表標題 Association of autoantibodies to HER2 with tumor microenvironments for humoral immunity and prognosis in patients with breast cancer
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Virtual Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----