

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：24601
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K08548
研究課題名(和文)トリプルネガティブ乳癌における新規免疫不活化経路阻害分子探索および治療への展望

研究課題名(英文)Prospects for a therapy using novel immunity inactivation pathway inhibition systems in triple negative breast cancer

研究代表者
池田 直也(Ikeda, Naoya)
奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20336861
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)：本研究では(1)TN乳癌の切除標本を用いた予後、並びに臨床病理学的因子の多角的解析によるTN乳癌に対する新規免疫治療標的分子の探索、(2)TN乳癌幹細胞に対する免疫不活化阻害効果の検証を目的とした乳癌切除標本を用いた実験系では、治療前の腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)濃度を評価し、術前化学療法後に腫瘍の病理学的完全消失(pCR)、腋窩リンパ節転移完全消失(Ax-pCR)との関連を検討したところ、TN乳癌においてTIL濃度が高いこと、また免疫の指標の一つであるTIL濃度が高い症例ではpCR、Ax-pCRが有意に得やすいことが判明し、腋窩郭清省略などの縮小手術に結びつく成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(学術的成果)乳癌治療前の腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)濃度を評価し、術前化学療法後に腫瘍の病理学的完全消失(pCR)、腋窩リンパ節転移完全消失(Ax-pCR)との関連を検討したところ、トリプルネガティブ(TN)乳癌、HER2陽性乳癌においてTIL濃度が高いこと、また免疫の指標の一つであるTIL濃度が高い場合にpCR、Ax-pCRが有意に得やすいことが判明し、論文発表を行なった(Surgery Today, 51:595-604, 2021)。
(社会的成果)腋窩郭清省略などの縮小手術に結びつく成果を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, (1) prognosis using resected specimens of TN breast cancer, and search for new immunotherapeutic target molecules for TN breast cancer by multifaceted analysis of clinical pathological factors, and (2) immunoinactivation inhibitory effect on TN breast cancer stem cells. In an experimental system using breast cancer resected specimens, the intratumoral infiltrative lymphocyte (TIL) concentration before treatment was evaluated, and the pathological complete disappearance (pCR) of the tumor and axillary fossa after preoperative immunotherapy were performed. When the relationship with complete elimination of lymph node metastasis (Ax-pCR) was examined, pCR and Ax-pCR were significantly higher in cases with high TIL concentration in TN breast cancer and high TIL concentration, which is one of the indicators of immunity. It turned out to be easy to obtain, and we obtained results that led to reduction surgery such as omission of axillary dissection.

研究分野：乳癌腫瘍免疫

キーワード：乳癌 トリプルネガティブ乳癌 免疫不活化阻害 腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)

1. 研究開始当初の背景

トリプルネガティブ(TN)乳癌は、乳癌患者の15~20%を占め、若年・閉経前女性の割合が高く、高悪性度であるため、初発時に遠隔転移を有する割合が高いことや、根治手術後の再発率が高いことが知られている。TN乳癌はluminalやHER2サブタイプ乳癌と異なり、明確な「治療の標的が存在しないこと」が最大の問題であるため、新たな治療法が求められている。一方、TN乳癌は、他のタイプの乳癌よりも免疫原性が高い傾向にあることや、腫瘍浸潤リンパ球の発現が高いことがわかってきたことから、免疫不活化経路阻害は、TN乳癌患者に対する新たな治療戦略となる可能性がある。

2. 研究の目的

これまで応募者らが蓄積してきた一連の研究成果と最新の免疫学的・腫瘍学的知見に基づき、(1)TN乳癌に対する新規免疫治療標的分子の探索と(2)TN乳癌幹細胞に対する免疫不活化阻害効果の検証である。研究が順調に運ばば、以下の基礎的・臨床的検討により、TN乳癌に対する各種抗体併用や化学療法、放射線療法との併用を行う新たな癌免疫集学的治療法の開発の礎を築きたいと考える。

3. 研究の方法

➤ TN乳癌における新規T細胞Negative Signal分子発現の臨床的意義の解明(平成30年度)

新規T細胞Negative Signal分子(Immune Checkpoint Molecule)あるいはCancer Immunity Cycleに関わると想定されるHVEM/BTLA-LIGHT, CD155, CD200, CD160, Endothelin B receptor(ETBR), TIM-3, GAL-9について、手術で切除したTN乳癌標本を用いて、免疫染色による各分子の蛋白発現や、Real-time PCRによるmRNA発現を評価し、定量化する。臨床病理学的因子あるいは予後との関連において有意な結果が得られたものについては、さらなる選別のため患者末梢血中の発現についてもFACSにより解析し、再発、転移、予後に影響を及ぼす分子を絞り込む。

➤ 新規T細胞Negative Signal分子の機能同定ならびにTN乳癌幹細胞との関連についての検討(平成30~31年度)

上記の検討から、有意な新規T細胞Negative Signal分子が得られれば、Ki-67, Tunnel法によるApoptosis, Microvessel Density算定による血管新生、トランスウェル、金コロイド法による細胞運動評価、FACSによる細胞周期解析などの関与する機能の解析を行う。また癌幹細胞マーカー(CD24, CD44, CD133, CD200等)発現との統合解析を行い、腫瘍免疫との関連について、さらに詳細な精査を行う。

➤ 個別遺伝子背景とT細胞Negative Signal分子発現との統合解析

TN乳癌患者血液および切除標本を用いて、遺伝子解析(MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EpCAM, Kras, p53等)を行い、前項で絞り込んだ新規T細胞Negative Signal候補分子の発現との関連を、予後や再発、臨床病理因子の観点から、総合的に解析する。この統合解析により、TN乳癌の遺伝子発現頻度とImmuno Checkpointとの相互関連の臨床的意義が明らかとなることが予想される。

➤ T細胞Negative Signal阻害によるin vivo抗腫瘍効果及び特異的免疫誘導に関する検討(平成30~31年度)

新規T細胞Negative Signal分子のin vivoでの抗腫瘍効果を検討するため、マウス

乳癌細胞株移植モデルを用いて、モノクローナル阻害抗体あるいは siRNA 法による遺伝子ノックダウンにてシグナル阻害を行う。治療後には、腫瘍、脾臓、リンパ節から T 細胞を分離、抽出して、CD45RO, CD45RA, CD44, CD62L, CCR7, CD28, CD27 等の発現を解析し、腫瘍抗原特異的免疫応答が誘導し得るかを検討する。in vivo で効果が確認できれば臨床応用へ一歩近づくことが可能となる。

➤ TN 乳癌幹細胞を標的とした T 細胞 Negative Signal 阻害による抗腫瘍効果の検討

(平成 31 ~ 32 年度)

本研究の二本目の柱となる実験系であるが、既知の T 細胞 Negative Signal 分子である CTLA-4 や PD-1 の阻害が、TN 乳癌幹細胞と想定される腫瘍細胞に対してどの程度抗腫瘍効果(免疫応答)を惹起し得るかを検討する。上記野生型マウス腫瘍モデルを用いて、乳癌において癌幹細胞の表面マーカーとして報告されている CD24, CD44, CD90, CD133, EpCAM 等により FACS sorting を行い、癌幹細胞を分別する。これらの癌幹細胞と想定される細胞を同系マウスに移植した後、抗 PD-1 抗体、抗 CTLA-4 抗体、抗 B7-H3 抗体を投与し、腫瘍増殖、マウス生存率等から in vivo における抗腫瘍効果を検証する。さらに腫瘍抗原特異的免疫応答が誘導されたか否かを検討するために、治療後マウスの脾臓を摘出後、FACS 解析を行う。脾臓・リンパ節から FACS sorting により回収し、同系担癌免疫不全マウス(Rag KO)に養子移入し、腫瘍増殖抑制効果および転移抑制効果を検証する。Naive T 細胞移入との比較を行い、腫瘍抗原特異性および抗腫瘍効果の強度を検証する。さらに十分な抗腫瘍効果が得られなかった場合には、各抗体併用や化学療法、放射線療法との併用を行うことで、より効率的に腫瘍特異的免疫応答が誘導される可能性を検証する。

4. 研究成果

本研究では (1)TN 乳癌の切除標本を用いた予後および臨床病理学的因子の多角的解析による TN 乳癌に対する新規免疫治療標的分子の探索、ならびに、(2)TN 乳癌幹細胞に対する in vivo における免疫不活化阻害効果の検証を目的とした。平成 30 年から令和元年にかけては、臨床検体を用いた実験系において「TN 乳癌における新規 T 細胞 Negative Signal 分子発現の臨床的意義の解明」に関する実験系を進め、(2)TN 乳癌幹細胞を標的とした T 細胞 Negative Signal 阻害による抗腫瘍効果の検討に関する実験系では、既知の T 細胞 Negative Signal 分子である CTLA-4 や PD-1 の阻害が、TN 乳癌幹細胞と想定される腫瘍細胞に対してどの程度抗腫瘍効果(免疫応答)を惹起し得るかを検討した。令和 2 年からは動物実験系において、野生型マウス腫瘍モデルを用いて、乳癌において癌幹細胞の表面マーカーとして報告されている CD24, CD44, CD90, CD133, EpCAM 等により FACS sorting を行い、癌幹細胞を分別した。得られた癌幹細胞と想定される三種類の細胞 (TN-ST1, TN-ST2, TN-ST3)を同系マウスに移植した後、抗 PD-1 抗体、抗 CTLA-4 抗体、抗 B7-H3 抗体を投与し、腫瘍増殖、マウス生存率等から in vivo における抗腫瘍効果を検証した。今後の計画として、腫瘍抗原特異的免疫応答が誘導されたか否かを検討するために、治療後マウスの脾臓を摘出後、FACS 解析を行う。脾臓・リンパ節から FACS sorting により回収し、同系担癌免疫不全マウス(Rag KO)に養子移入し、腫瘍増殖抑制効果および転移抑制効果の検証を計画している。

乳癌切除標本を用いた実験系では、治療前の腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)濃度を評価し、術前化学療法後に腫瘍の病理学的完全消失(pCR)、腋窩リンパ節転移完全消失(Ax-pCR)との関連を検討したところ、TN 乳癌において TIL 濃度が高いこと、また免

疫の指標の一つである TIL 濃度が高い症例では pCR, Ax-pCR が有意に得やすいことが判明し, 腋窩郭清省略などの縮小手術に結びつく成果を得た. 学術的成果として, 乳癌治療前の腫瘍内浸潤リンパ球 (TIL) 濃度を評価し, 術前化学療法後に腫瘍の病理学的完全消失 (pCR), 腋窩リンパ節転移完全消失 (Ax-pCR) との関連を検討したところ, トリプルネガティブ (TN) 乳癌, HER2 陽性乳癌において TIL 濃度が高いこと, また免疫の指標の一つである TIL 濃度が高い場合に pCR, Ax-pCR が有意に得やすいことが判明し, 論文発表を行なった (Surgery Today, 51:595-604, 2021). また, 社会的成果としては, TIL 濃度の高い HER2 陽性乳癌, TN 乳癌において, 腋窩郭清を省略できる可能性を提唱することができた.

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 Yokotani Tomoyo, Ikeda Noaya, Hirao Tomoko, Tanaka Yukimi, Morita Kohei, Fujii Tomomi, Ohbayashi Chiho, Nakamura Takashi, Kobayashi Toyoki, Sho Masayuki	4. 巻 51
2. 論文標題 Predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes for pathological response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients with axillary lymph node metastasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 595 ~ 604
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-020-02157-6	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横谷 倫世, 池田 直也, 平尾 具子, 田中 幸美, 中村 卓, 小林 豊樹, 庄 雅之
2. 発表標題 HER2陽性乳癌に対する治療の最適化 腫瘍組織浸潤リンパ球(TILs)濃度が高く且つHER2発現が陽性の乳癌では腋窩リンパ節の郭清を省略できる可能性がある
3. 学会等名 第82回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横谷 倫世, 池田 直也, 平尾 具子, 田中 幸美, 中村 卓, 小林 豊樹, 森田 剛平, 大林 千穂, 庄 雅之
2. 発表標題 乳癌術前化学療法において腋窩リンパ節転移が陰性化するための効果予測因子の検討
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年 ~ 2021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
研究分担者	庄 雅之 (Sho Masayuki) (50364063)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	

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
---------	---------