

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08938

研究課題名（和文）免疫応答から捉えたトリプルネガティブ乳癌における全身反応および微小環境変化の検証

研究課題名（英文）Verification of systemic response and tumor microenvironment change in triple-negative breast cancer based on immune response

研究代表者

柏木 伸一郎（Kashiwagi, Shinichiro）

大阪公立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80637017

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：腫瘍組織は、癌細胞と周囲の間質細胞との相互作用により腫瘍微小環境（TME）という特徴的な環境を呈している。宿主におけるTMEの評価が治療効果や予後予測に関わるために、TMEのモニタリングは癌治療において大きな鍵となる。本研究では、「免疫応答から捉えたトリプルネガティブ乳癌における全身反応および微小環境変化の検証」と題して、免疫療法を柱とする次世代の乳癌薬物個別化療法を検証した。免疫療法においては、併用する抗癌剤により腫瘍免疫の増強される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍微小環境は薬剤修飾によりダイナミックな変化を示すために、この動的な変化をモニタリングすることでトリプルネガティブ乳癌の新たな治療戦略の構築に寄与する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Tumor tissues present a characteristic environment called the tumor microenvironment (TME) due to interactions between cancer cells and surrounding stromal cells. Since evaluation of the TME in the host is related to predicting therapeutic effects and prognosis, monitoring the TME is a key factor in cancer treatment. In this study, titled "Verification of systemic reactions and microenvironmental changes in triple-negative breast cancer as seen from immune responses," we examined next-generation personalized breast cancer drug therapy centered on immunotherapy. It was suggested that immunotherapy may enhance tumor immunity by using anticancer drugs in combination.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 腫瘍微小環境 腫瘍免疫 トリプルネガティブ乳癌 免疫療法

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織は、癌細胞とその周囲に存在する線維芽細胞や血管構成細胞、免疫細胞などの間質細胞から構成され、“tumor-stromal interactions” という相互作用により腫瘍微小環境 (tumor microenvironment, TME) と称される特徴的な環境を形成している。そして癌治療において、宿主のTMEの評価が、予後や治療効果を予測する上で重要な役割を担うことが明らかにされている。申請者はこれまで癌細胞自身が持つ悪性形質獲得にはTMEにおける動的変化が関与していることを検証してきた。また近年、乳癌領域においても免疫療法 (アテゾリズマブ、ペンブロリズマブ) の有用性が報告され、乳癌治療の鍵となっている。免疫療法は、とくに免疫原性が高いとされるトリプルネガティブ乳癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) における有用性が示されている。

また宿主の免疫微小環境 (tumor immune microenvironment, TIME) は、癌免疫サイクルの障害の状況により3つの免疫フェノタイプを呈すると報告されている。申請者はTIMEにおける動的変化に注目し、モニタリング指標の開発、評価の方法・タイミングなどを探究してきた。

2. 研究の目的

本研究では、「免疫応答から捉えたトリプルネガティブ乳癌における全身反応および微小環境変化の検証」と題して、免疫療法を柱とする次世代の乳癌薬物個別化療法の構築を目指している。宿主の全身反応やTIMEの変化をダイナミックに捉え、その動態変化や免疫フェノタイプの理解により従来の薬物療法と免疫療法との併用療法や逐次療法などの有用性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

「課題 1：宿主の全身反応および TIME の動態変化の検証」「課題 2：免疫療法におけるバイオマーカー検索」「課題 3：併用療法・逐次療法の可能性の検索細」を課題として、基礎的手法を用いて腫瘍微小環境のダイナミックな変化と薬剤修飾を検証した。

☑ 課題 1：宿主の全身反応および TIME の動態変化の検証

腫瘍免疫応答は薬物療法の修飾によりダイナミックな変化を示し、原発巣と再発巣では異なる TIME を形成する。乳癌手術症例の手術標本 (原発巣) および転移巣の FFPE 標本での TILs の評価を行い、不均一性や可塑性、動的変化に関わる臨床的因子を明らかにしていく (再発症例 50 例程度)。またサブセット解析 (CD8, PD-L1, FOXP3, PD-1 など) を免疫組織化学染色にて行い、原発巣および転移巣での免疫フェノタイプ (immune desert, immune excluded, immune inflamed) を明らかにし、TIME 変化が治療効果や予後に与える影響を検証する。同様に

EMT 関連因子 (microRNA 200b/c, microRNA 544a, E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Snail, Twist, ZEB1/2 など), 低酸素関連マーカー (microRNA 210, HIF-1, CA9, VEGF など), 代謝系マーカー (Glut-1, Glutaminase など) を評価し, TME 変化が及ぼす影響についても検証をすすめる. 乳癌術前化学療法症例約 300 例に対して同様の検討を行い, 化学療法の修飾における TME 変化を明らかにする. さらにこれらの組織標本から得られた情報と, 採血による全身炎症性マーカー (NLR, PLR, LMR など) との相関についても検討し, 宿主の全身反応と局所の TIME との関連性を確認する.

☑ 課題 2: 免疫療法におけるバイオマーカー検索

IMPassion130 試験では PD-L1 抗体 (SP142) がコンパニオン診断に必要であり, 腫瘍領域に対して, 「染色強度に関係なく, PD-L1 による陽性反応が認められる腫瘍浸潤免疫細胞の割合 (IC) が 1%以上を占める」ことと明記された. しかしながら PD-L1 発現の不均一性や他の PD-L1 抗体との相違点などが指摘されており, 本研究では SP142, 22C3, SP262 などの抗体を使用して乳癌生検標本約 300 例において, 腫瘍細胞 (TC) と免疫細胞 (IC) の一致率や, 染色濃度や染色領域割合などを評価して臨床病理学因子と照合する. さらにアテゾリズマブ使用症例約 20 例についても同様の検討を行い, 免疫療法およびその併用療法において普遍で再現性のある PD-L1 評価の構築を目指す. 次に免疫療法施行症例 (アテゾリズマブ使用症例約 20 例) の治療前・後での採血検体を採取し, 全身性炎症マーカーおよび FACS により免疫関連マーカー (CD8, CD4, Treg など) の発現状況の動的変化を確認していく.

☑ 課題 3: 併用療法・逐次療法の可能性の検索細

腫瘍免疫応答は化学療法・免疫療法の修飾によりダイナミックな変化を示し, 腫瘍免疫サイクルの障害により異なる TIME を形成する. 免疫療法施行症例 (アテゾリズマブ使用症例約 20 例) の治療前・後での採血検体より TCR/BCR レパトア解析を実施して, 薬物療法により変化する腫瘍免疫応答の多様性を明らかにしていく. すなわち, 従来の殺細胞性抗癌剤や分子標的治療薬に免疫療法を加えることで, 腫瘍免疫応答がどのように変化するのかを解明することで, 併用療法や逐次療法など TNBC に対する次世代個別化治療戦略の構築の手がかりとする. さらに細胞株を用いた研究として, 申請者が樹立した EMT 抑制 TNBC 細胞株を用いて, 従来の殺細胞抗癌剤や分子標的薬, さらにアテゾリズマブやペンブロリズマブによる形態的・機能的および代謝競合変化を確認する (invasion assay, migration assay, proliferation assay, apoptosis assay, メタボロミクスなど).

4. 研究成果

申請者は, 腫瘍微小環境のダイナミックな変化を上皮間葉移行(EMT), 腫瘍低酸素, 癌代謝競合や腫瘍免疫応答などの観点より検証し, その変化に関わる因子や 可塑性・不均一性を明らかにしてきた. そこで全身および局所の腫瘍免疫反応はリンクしているものかという疑問が生じた. 血管リモデリングや EMT 抑制作用を有するエリブリン使用症例を用いて, 使用前後での全身および局所

の免疫反応を検証した。その結果は、エリブリン化学療法において投与前後標本における EMT 抑制、低酸素解除および腫瘍免疫亢進は TGF- β を介して誘導され、またその動的変化は絶対的リンパ球数 (ALC) にて評価できる可能性が示された (Anticancer Res 40:3345-3354, 2020)。

また TIME のモニタリング指標である腫瘍浸潤リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs) の評価を fibrotic foci にて行うことの有用性を検討し、FF-TILs として新たな指標の確立に成功した (Anticancer Res 42(3):1421-1431, 2022)。さらにダイナミックに変化する TIME では、TILs の評価を各フェーズにて施行するのが望ましいことを明らかにした (Cancer Diagn Progn 2(4):443-451, 2022)。

免疫療法においては、併用する抗癌剤により腫瘍免疫の増強される変化を明らかにした。そして腫瘍微小環境は薬剤修飾によりダイナミックな変化を示すために、この動的な変化をモニタリングすることでトリプルネガティブ乳癌の新たな治療戦略の構築に寄与する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Goto W, Kashiwagi S, Takada K, Asano Y, Ogisawa K, Morisaki T, Shibutani M, Tanaka H, Maeda K.	4. 巻 28
2. 論文標題 Clinical verification on the relationship between serum lipid metabolism and the immune activity in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Medical Research	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40001-022-00964-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takada K, Kashiwagi S, Imori N, Yabumoto A, Goto W, Asano Y, Tauchi Y, Morisaki T, Ogisawa K, Shibutani M, Tanaka H, Maeda K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Impact of oral statin therapy on clinical outcomes in patients with cT1 breast cancer.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-023-10631-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Goto W, Kashiwagi S, Imori N, Kouhashi R, Yabumoto A, Takada K, Asano Y, Tauchi Y, Ogisawa K, Morisaki T, Shibutani M, Tanaka H, Maeda K.	4. 巻 43
2. 論文標題 Eribulin treatment promotes re-expression of estrogen receptor in endocrine therapy-resistant hormone receptor-positive breast cancer cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 603-611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.16196.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Goto W, Kashiwagi S, Matsuoka K, Imori N, Kouhashi R, Yabumoto A, Takada K, Asano Y, Tauchi Y, Ogisawa K, Morisaki T, Shibutani M, Tanaka H, Maeda K.	4. 巻 43
2. 論文標題 Clinical verification of the predictors for febrile neutropenia in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 247-251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.16156.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takada K, Kashiwagi S, Iimori N, Kouhashi R, Yabumoto A, Goto W, Asano Y, Tauchi Y, Ogisawa K, Morisaki T, Shibutani M, Tanaka H, Maeda K.	4. 巻 43
2. 論文標題 Factor analysis of intraoperative bleeding loss and its impact on prognosis in breast cancer.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 191-200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.16149.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kashiwagi S, Asano Y, Takada K, Goto W, Morisaki T, Shibutani M, Tanaka H, Hirakawa K, Ohira M.	4. 巻 42
2. 論文標題 Outcome prediction after neoadjuvant chemotherapy (NAC) for breast cancer, using tumor-infiltrating lymphocytes within fibrotic foci of tumor stroma (FF-TILs).	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1421-1431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15612.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Asano Y, Kashiwagi S* Takada K, Ishihara S, Goto W, Morisaki T, Shibutani M, Tanaka H, Hirakawa K, Ohira M.	4. 巻 42
2. 論文標題 Clinical significance of expression of immunoadjuvant molecules (LAG-3, TIM-3, OX-40) in neoadjuvant chemotherapy for breast cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 125-136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15466.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kashiwagi S, Asano Y, Goto W, Takada K, Morisaki T, Kouhashi R, Yabumoto A, Tanaka S, Takashima T, Ohsawa M, Hirakawa K, Ohira M.	4. 巻 40
2. 論文標題 Validation of systemic and local tumour immune response to eribulin chemotherapy to treat breast cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3345-3354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.14317.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Takada K, Takahashi K, Shibutani M, Amano R, Takashima T, Tomita S, Hirakawa K, Ohira M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in endocrine therapy for stage IV breast cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 195-202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2020.2063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Goto W, Kashiwagi S, Asano Y, Takada K, Morisaki T, Takahashi K, Fujita H, Shibutani M, Amano R, Takashima T, Tomita S, Hirakawa K, Ohira M.	4. 巻 20
2. 論文標題 Inhibitory effects of iron depletion plus eribulin on the breast cancer microenvironment.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-020-07673-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takada K, Kashiwagi S, Asano Y, Goto W, Kouhashi R, Yabumoto A, Morisaki T, Fujita H, Shibutani M, Takashima T, Hirakawa K, Ohira M.	4. 巻 18
2. 論文標題 The effect of smoking on biological change of recurrent breast cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12967-020-02307-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takada K, Kashiwagi S, Asano Y, Goto W, Morisaki T, Takahashi K, Fujita H, Takashima T, Tomita S, Hirakawa K, Ohira M.	4. 巻 20
2. 論文標題 Factors predictive of invasive ductal carcinoma in cases preoperatively diagnosed as ductal carcinoma in situ.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-020-07001-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takada K, Kashiwagi S, Asano Y, Goto W, Kouhashi R, Yabumoto A, Morisaki T, Shibutani M, Takashima T, Fujita H, Hirakawa K, Ohira M.	4. 巻 20
2. 論文標題 Prediction of lymph node metastasis by tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in T1 breast cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-020-07101-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	浅野 有香 (Asano Yuka) (10806376)	大阪公立大学・大学院医学研究科・病院講師 (24402)	
研究分担者	藤田 寿一 (Fujita Toshikazu) (30212187)	大阪公立大学・大学院看護学研究科・准教授 (24402)	

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