

令和 4 年 5 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17560

研究課題名（和文）がん免疫活性化を介した乳がんに対する革新的治療法の開発と免疫寛容メカニズムの解明

研究課題名（英文）Development of novel immunotherapy against breast cancer through eliciting anti-tumor immunity and mechanism of cancer immune tolerance

研究代表者

寺田 満雄（Mitsuo, Terada）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・臨床研究医

研究者番号：70847441

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：乳癌患者の末梢血中の免疫細胞を解析することで、乳癌の予後予測因子となる免疫集団を同定した。また、乳癌細胞株とヒトの免疫細胞を共に培養する実験において、乳癌細胞株上にHLA-DRと呼ばれる抗原提示に重要な分子が発現することを見出した。このHLA-DRが乳癌細胞で発現することは、我々が同定した免疫集団が乳癌細胞を攻撃する際に重要となり、乳癌患者の予後に関与すると考えられた。今後、乳癌組織を用いて、腫瘍環境において我々の同定した細胞集団がどのように抗腫瘍免疫に関与しているかについてのさらなる解析を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌の腫瘍免疫においてどのような免疫細胞が重要で、どのような免疫細胞が腫瘍細胞を攻撃しているのかはまだ明らかになっていないことが多い。これは腫瘍の種類や状態および宿主側の因子によっても変化すると考えられる。今回の我々の研究成果は、免疫の観点からの癌治療における個別化医療につながるものである。

研究成果の概要（英文）：We identified an immune population that is a predictor of breast cancer prognosis by analyzing immune cells in the peripheral blood of breast cancer patients. In addition, we found that an important molecule for antigen presentation, called HLA-DR, is expressed on breast cancer cell lines in experiments in which the breast cancer cell lines and human immune cells were cultured together. The expression of HLA-DR on breast cancer cells may be important for the immune population we identified to attack breast cancer cells and may play a role in the prognosis of breast cancer patients. In the future, breast cancer tissue will be used to further analyze how our identified cell populations are involved in anti-tumor immunity in the tumor environment.

研究分野：乳癌

キーワード：腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

乳がんは、日本人女性が最も多く罹患する悪性腫瘍であり、死亡数は増加の一途をたどっている。乳がんは、一旦再発すると治癒することはなく、患者は死に直面する。そのため乳がんの再発予防による治療成績向上が喫緊の課題となっている。

最近、「がん」への「免疫」の関与が非常に注目されてきた。がん細胞を攻撃する免疫細胞の主力は「リンパ球」であるため、がん組織周囲の微小環境に浸潤したリンパ球 (TILs: tumor infiltrating lymphocytes) の存在は、「予後良好因子」とされてきた。

しかし、「制御性 T 細胞」と呼ばれるリンパ球は、逆にがん細胞への攻撃にブレーキをかけてしまうことがわかった。制御性 T 細胞は、従来、FOXP3 と CD4 と呼ばれる抗原が陽性のリンパ球、と定義されてきた。

しかし、私たちは、「制御性 T 細胞」のなかで、がん細胞への攻撃にブレーキをかけているリンパ球は、FOXP3 を高発現している「エフェクター制御性 T 細胞 (eTreg)」と呼ばれるリンパ球だけであることを世界で初めて発見し、Nature medicine 誌に報告した (Sato T, Nishikawa H, et al. *Nature Medicine* 2016)。さらに、従来の制御性 T 細胞の中でも、FOXP3 低発現の集団は、がん細胞への攻撃にブレーキかける能力を持たないリンパ球 (ナイーブ制御性 T 細胞、非制御性 T 細胞) であることを明らかにした。

最近、乳がんにおいても「eTreg」が多く浸潤すると術後再発率がきわめて高いことが報告された (Wang L, et al. *Nature Immunol* 2019)。しかし、乳がん組織を取り巻く微小環境に eTreg が誘導される因子はあきらかでなく、従来の免疫療法は乳がんには有効ではなかった。「eTreg」の浸潤はきわめて強い予後不良因子であるにもかかわらず、乳がんに対する「eTreg」を標的とした治療は確立されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、乳がん組織周囲の微小環境を決定づける因子を同定し、それを標的とした新たな治療薬の開発である。

3. 研究の方法

<研究当初予定していた計画>

乳がん組織を取り巻く微小環境における eTreg の誘導メカニズムを解明するために、eTreg 浸潤の程度に着目して解析を行う。検討項目は以下の 4 つである。

- A. 臨床検体のマルチカラーフローサイトメトリー解析: ヒト乳がん臨床検体を用いた eTreg 浸潤の程度による腫瘍免疫環境の違い

乳がん新鮮組織検体の一部から TILs を取り出す。リンパ球マーカーを中心に多重蛍光染色後、マルチカラーフローサイトメトリー解析することで、TILs の構成や活性を網羅的に明らかにする。そのうち、乳がん組織ごとの eTreg 浸潤の違いに注目し、eTreg 浸潤の多い組織と少ない組織に分類する。

B. シングルセル RNA シークエンス解析：eTreg 浸潤の差を特徴づける遺伝子の同定

A. で同定した eTreg 浸潤の程度で分類した乳がん組織を、シングルセル RNA シークエンス解析用に単一細胞化する（シングルセルライブラリー調整）。それをを用いて、網羅的にシングルセル RNA シークエンス解析し、eTreg 浸潤の差を特徴づける遺伝子を同定する。ここで候補としてあがった遺伝子と A. で解析した TILs の構成や活性と照らし合わせ、最も関連が強い遺伝子を同定する。

C. 同定された遺伝子の *in vitro/vivo* での検討：同定された差を特徴づける遺伝子の eTreg および腫瘍免疫環境への影響

同定された遺伝子を CRISPR/Cas9 ゲノム編集を用いてノックイン/ノックアウトすることで発現を調整した乳がん細胞株を樹立し、Xenograft マウスモデルを作成することで、腫瘍環境での eTreg および腫瘍免疫環境への影響を検討する。

D. 同定された遺伝子の臨床的意義の検討

同定された遺伝子について当研究室で保存している乳がん手術検体で測定（mRNA 発現/免疫染色）し、臨床病理学的データから予後に与える影響を検討する。

新型コロナウイルス感染症蔓延の影響を受け、乳癌組織検体採取を行う名古屋市立大学から検体解析を行う名古屋大学への検体輸送に必須となる試薬の供給が滞った。そのため、令和2年度より一部計画を変更し、乳癌組織を用いず、乳癌患者の末梢血単核細胞(PBMC)と乳癌細胞株を用いて、乳癌の新たな免疫逃避メカニズムの解析を開始した。そのため、本報告書ではその計画変更後の内容を報告する。

<新たな研究計画>

A. PBMC を用いた予後に関連する免疫細胞集団の同定（CyTOF）

特定の治療に対する奏効例と非奏効例を比較し、奏効例で多く見られる免疫細胞集団をマサイトメトリー（CyTOF）を用いて網羅的に解析することで同定する。

B. PBMC と乳癌細胞株の共培養によって、A. で同定した細胞集団と癌細胞の関係性の検討

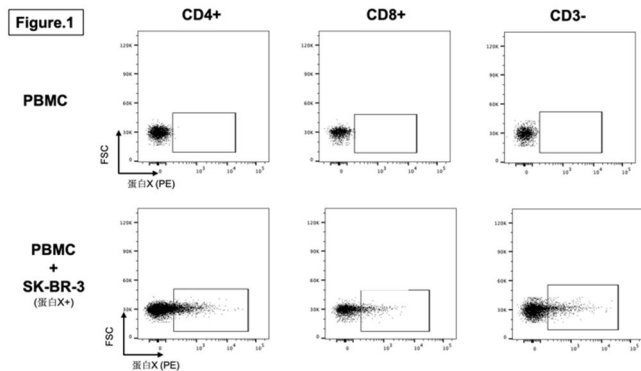
PBMC と乳癌細胞株（SK-BR-3）を共培養して起こる反応をフローサイトメトリーを用いて解析する。

C. 腫瘍検体のパラフィン包埋サンプルを用いた免疫染色

A.で同定した細胞集団およびB.で観察された反応が腫瘍局所で起こっていることを同定するために、乳癌検体のパラフィン包埋検体を用いて、多重蛍光免疫染色を行うことで確認する。

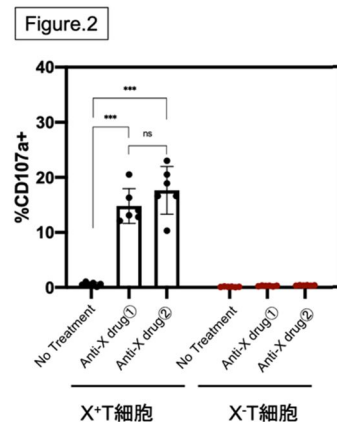
4. 研究成果

今回我々は、乳癌全体の約15%で発現するある蛋白(蛋白Xとする)が免疫細胞細胞に直接的に作用し、免疫細胞の活性を低下させる可能性を見出した。通常、リンパ球をはじめとした免疫細胞には蛋白Xは発現していない。しかし、蛋白Xが発現した細胞株(SK-



BR-3)と免疫細胞を共培養すると免疫細胞にも蛋白Xの発現が観察された(現象Y, Figure.1)。この現象は分子Xが発現していない細胞株と共培養した際には観察されなかった。蛋白Xが発現した免疫細胞は活性化した状態にあることが明らかになった(Figure.2)。

また、乳癌患者PBMCのCyTOFを用いた解析より、蛋白Xが発現した乳癌で、予後に関連する細胞集団Zを同定した(Figure.3)。また、上記の共培養の実験系の中で、蛋白Xに対する抗体薬を併用することで癌細胞側の抗原提示に関わるHLA-A/B/CおよびHLA-DRが誘導される現象も見出した(Figure.4)。これは我々が見出した予後因子となる細胞集団Zが腫瘍環境で活性化することに関連していることが予想



され、今後、細胞集団Zと

Figure.3

HLA発現、現象Yの関係性についてさらに検討を行い、乳癌の新たな治療戦略確立を目指す。

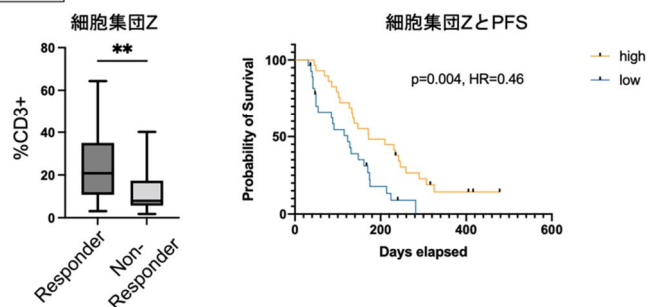
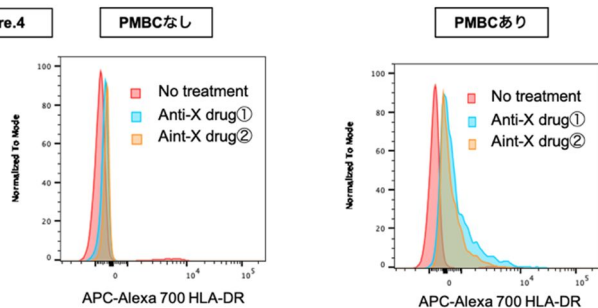


Figure.4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究協力者	西川 博嘉 (Nishikawa Hiroyoshi)		
研究協力者	杉山 大介 (Sugiyama Daisuke)		

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