

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月7日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591685

研究課題名（和文）HER2陽性乳癌における免疫学的解析  
-免疫学的治療戦略の有効性についての検討研究課題名（英文）Immunological study of HER2+ breast cancer  
-study of strategy for effective cancer-immunotherapy

研究代表者

関 直子（SEKI NAOKO）

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：40226634

研究成果の概要（和文）：

HER2陽性乳癌を含む乳癌生検組織および手術切除組織を用いた病理学的・免疫組織学的解析を中心とした解析を行い、癌局所のリンパ球浸潤におけるプロファイルの検討～従来のリンパ球サブセットに加え、FoxP3によるTreg、pSTAT3発現等についての検討を行った。その結果局所浸潤リンパ球発現FOXP3のみならず、腫瘍発現FOXP3も予後に影響を及ぼすことが示された。今後、腫瘍内FOXP3発現の機能的意味について更に検討が必要であると共に、Treg/FOXP3をターゲットとした治療ストラテジーにおいては、腫瘍発現FOXP3への影響についても十分考慮されるべきであることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The transcription factor forkhead box protein3 (FOXP3) is highly expressed not only in regulatory T cells (Tregs), but also in tumor cells. FOXP3 possesses a tumor-enhancing role through Tregs and their effect on tumor tolerance, but also suppresses carcinogenesis as a potent repressor of several oncogenes. In this study, we immunohistochemically studied the prognostic significance of FOXP3 expression both in tumor cells and tumor infiltrates of lymphocytes in breast cancer patients.

Of 100 tumor specimens with primary invasive breast carcinoma (including 23 HER2-overexpressing specimens), 63% and 57% were evaluated as FOXP+ tumor cells and high infiltrate of FOXP3+ lymphocytes, respectively. FOXP3 expression in tumor cells did not show prognostic significance, while FOXP3+ lymphocytes was significantly associated with poor overall survival (OS; n=98, log-rank test p=0.008). The heterogeneous subcellular localization of FOXP3 was observed in tumor cells (cytoplasm, 31%; nucleus, 26%; and both, 6%), and interestingly, cytoplasmic and nuclear FOXP3 were associated with poor (p=0.058) and improved (p=0.016) OS, respectively. These findings indicate that FOXP3 expression in both lymphocytes and tumor cells could be a prognostic marker for breast cancer. FOXP3 in tumor cells might have distinct biological activities and prognostic values according to the localization, which would be help identify appropriate therapy for the patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：癌 免疫 乳腺外科学

### 1. 研究開始当初の背景

Tyrosine kinase receptor HER2 は、乳癌の 25-30%に過剰発現、腫瘍の増殖・進展、予後に大きくかかわっており、治療上の重要な分子ターゲットである。HER2 陽性乳癌患者の治療において、HER2 受容体を分子標的とするヒト化抗体製剤 Trastuzumab が臨床応用されたことは画期的であり、単剤、多剤併用により一定の治療効果をあげている。Trastuzumab の作用機序として、HER2 レセプターを介したシグナル抑制の他に、抗体製剤に特徴的である Fc-レセプターから宿主免疫系を介した効果が従来あげられているが、この機構が Trastuzumab の臨床効果においてどの程度関与しているのかについて詳細な検討は少ない。我々の検討からは、Trastuzumab ~Fc レセプターを介した抗原提示細胞（樹状細胞:DC）の活性化・腫瘍抗原の提示を通して、腫瘍抗原特異的細胞性免疫の賦活化が効率的に起こりうることより、この免疫系を介した機構が癌の退縮に関与する可能性が示された。

HER2 陽性乳癌において Trastuzumab 抵抗性癌の存在、耐性獲得の問題は今後の大きな課題である。抵抗性のメカニズム解析、耐性回避のための様々な併用ストラテジーや新規分子標的治療薬の臨床試験が進められているが、免疫系について考慮した検討は数少ない。

一方、癌患者において良好な免疫状態を維持すること~免疫抑制状態の解除、抗腫瘍免疫を誘導、維持することは病態の改善や予後、転移・再発防止に重要であり、近年様々な化学療法剤、また新規分子標的治療薬の宿主免疫系に対する副次的効果が検討され、一部では各種免疫治療との併用ストラテジーの有効性が検討されるようになった (Dudlay ME et al, J Clin Oncol 23(10), 2005)。従来から癌局所免疫細胞の浸潤と予後については様々な見解~正の相関、またそれに反して負の相関が報告されてきたが、癌局所にみられる炎症性マクロファージ (or M2 酸化型 TAM) や未分化骨髄球 (ImC) の産生する TGF- $\beta$ 、IL-10 を初めとする多種のサイトカイン・ケモカイン、増殖因子類は、免疫抑制~DC 成熟抑制や抑制性 T 細胞 (Treg)・Th2 の誘導に働くのみならず、腫瘍細胞や癌新生血管の増殖に作用することが近年注目されてきた。本研究で HER2 陽性乳癌における様々な Biomarker

と共に、これら免疫環境の詳細な解析を行い、予後・治療成績との相関について検討することは興味深く、Trastuzumab をはじめとする癌治療抵抗性における免疫学的側面についても重要な所見が得られるものと期待された。

### 2. 研究の目的

乳癌における様々な Biomarker と共に、免疫環境の詳細な解析を行い、予後・治療成績との相関について検討することで、今後の免疫学的治療戦略についての知見を得る。

### 3. 研究の方法

1995~2005 年までの病理組織学的検討可能であった浸潤性乳癌 100 手術例を対象として (HER2 陽性例 23 症例を含む)、病理学的・免疫組織学的解析を中心とした解析を行い、癌局所のリンパ球浸潤におけるプロファイルの検討~従来のリンパ球サブセットに加え、FoxP3 による Treg、pSTAT3 発現等についての検討を行った。FoxP3 については、腫瘍細胞での発現 (細胞質、核) についても検討を行った。

### 4. 研究成果

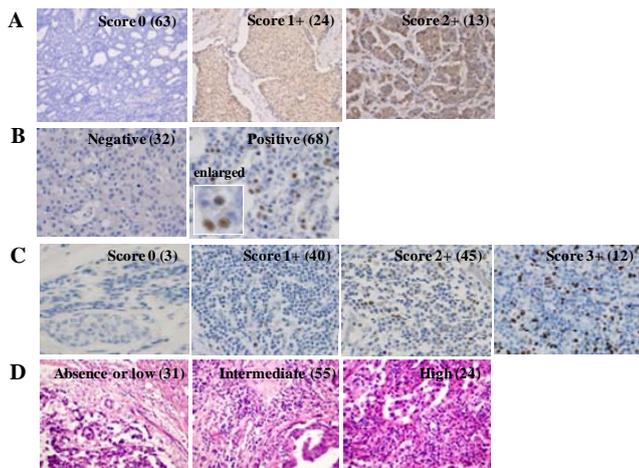
浸潤性乳癌 100 手術例を対象として (HER2 陽性例 23 症例を含む)、FOXP3 抗体を用いた免疫組織学的検討を行った。

63%が腫瘍内 FOXP3 陽性、57%が浸潤リンパ球 FOXP3 強陽性と評価された。腫瘍内 FOXP3 は核、細胞質への染色性を示し、その内訳は Table 1 の如くであった。浸潤リンパ球 FOXP3 強陽性例と腫瘍内 FOXP3 陽性例の分布に正の相関は認めなかった。

Table 1. FOXP3発現と局在の関連

	Cytoplasm			Nucleus		
	FOXP3+	FOXP3-	P*	FOXP3+	FOXP3-	P*
<b>Cytoplasm</b>						
FOXP3+				6/32(18.8)	31/68(45.6)	
FOXP3-				26/32(81.3)	37/68(54.4)	0.014
<b>Nucleus</b>						
FOXP3+	6/37(16.2)	26/63(41.3)				
FOXP3-	31/37(83.8)	37/63(58.7)	0.014			
<b>Lymphocyte</b>						
FOXP3+	23/37(62.2)	34/63(54.0)		11/32(34.4)	46/68(67.6)	
FOXP3-	14/37(37.8)	29/63(46.0)	0.531	21/32(65.6)	22/68(32.4)	0.002

Evaluated by Fisher's exact test. \*FOXP3+, high infiltrate; FOXP3-, absent-low infiltrate of FOXP3-expressing lymphocytes



**Figure 1; Immunohistochemical FOXP3 staining of breast cancer.**

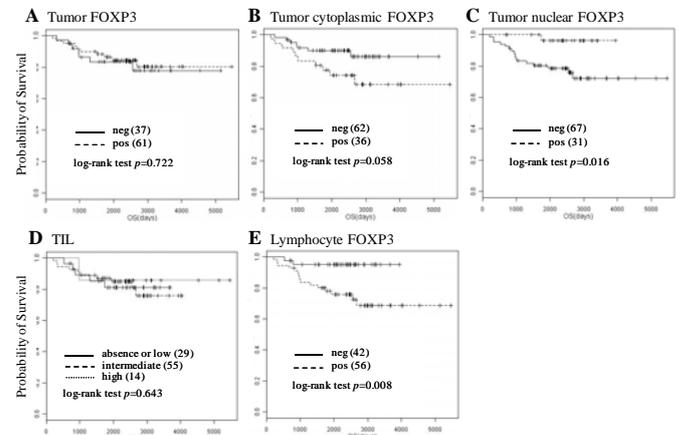
Representative photos of FOXP3-expressions scored as described in "patients and methods" are shown for cytoplasm (magnification,  $\times 100$ ) (A) and nucleus ( $\times 400$ ) (B) of tumor cells, and infiltrate of lymphocytes ( $\times 400$ ) (C). HE staining for intensity of TILs ( $\times 200$ ) (D) were also shown. The number of specimens in each graded group is indicated in parenthesis. Score 1+ /2+ in (A) or score 2+ /3+ in (C) are defined as positive for tumor cytoplasmic FOXP3 or lymphocyte FOXP3 (i.e. high infiltrate of FOXP3+ lymphocyte) for the further analysis, respectively.

今回の結果、リンパ球 FOXP3 強浸潤例は生存率低下を示し、多変量解析にても独立した予後不良因子であった。それに対し、腫瘍細胞質内 FOXP3 は予後不良を示し、一方、腫瘍核内 FOXP3 は予後良好を示したことから、腫瘍内での FOXP3 局在が予後因子となる可能性が示唆された (Fig. 2)。

HER2 陽性例 23 例でも同様の傾向がみられており、今後症例数を増やしての検討、また Trastuzumab 治療症例での検討を予定している。

近年、FOXP3 変異マウスにおいて高率に HER2 陽性乳癌が発生し、FOXP3 は癌抑制遺伝子の一つであることが報告された。また、FOXP3 による HER2 や SKP2 の転写抑制により、腫瘍の成長が抑制されることが示された (Zuo *et al. Cell* 2007.)。腫瘍細胞内で核内 FOXP3 は癌抑制遺伝子として機能するが、一方で癌において高率に FOXP3 の遺伝子変異が起こることも報告されており、核移行シグナルの欠失に伴う細胞質内発現の可能性も示唆される。また一方では膵臓癌においては腫瘍内 FOXP3 が *in vitro* で T cell 増殖を抑制することから、腫瘍局所環境の中で腫瘍内 FOXP3 が免疫抑制状態を誘導し、腫瘍の増殖に寄与している可能性も示唆されている (Hinz *et al. Cancer Res.* 2007.)。乳癌を含めた各種癌における腫瘍内 FOXP3 の発現意義、予後との関連性については、一定の見解に至っていない。

今後、腫瘍内 FOXP3 発現の機能的意味について更に検討が必要であると共に、Treg-FOXP3 をターゲットとした治療のストラテジーにおいては、腫瘍内発現 FOXP3 の影響についても十分考慮されるべきであることが示唆された。



**Figure 2; Kaplan-Meier curves for overall survival associated with FOXP3 expression in breast cancer.**

Kaplan-Meier curves in two groups divided to FOXP3-positive (+/-, -/+, and +/+ as to cytoplasmic/nuclear expression) and -negative (-/-) (A), cytoplasmic FOXP3-positive (+/- and +/+) and -negative (-/- and -/-) (B), and nuclear FOXP3-positive (-/+ and +/+) and -negative (+/- and -/-) (C) of tumor cells. Stratified according to intensity of TILs (D) and FOXP3+ lymphocytes (E) as follows; absence-low, intermediate, and high infiltrate in (D); negative (absence-low) and positive (high infiltrate of FOXP3+ lymphocytes) in (E). Number of specimens in each group is presented in parenthesis. *P*-values were calculated with use of the log-rank test. neg, negative; pos, positive.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 6 件)

- 1) 関直子、Expression of cancer-testis antigens in breast cancer、8<sup>th</sup> European Breast Cancer Conference、2012年3月22日、Vienna, Austria
- 2) 竹中美貴、FOXP3 expressions in both tumor cells and tumor infiltrating lymphocytes are associated with the prognosis in breast cancer patients、8<sup>th</sup> European Breast Cancer Conference、2012年3月22日、Vienna, Austria
- 3) 唐宇飛、The Combination Therapy of Trastuzumab and Adoptive Cell Therapy for Refractory Breast Cancer、BIT's 3rd World Cancer Congress-Breast Cancer Conference、2010年4月26日、Shanghai, China

- 4) 関 直子、Strategy to Augment the Efficacy of Immunotherapy For Refractory Breast Cancer: a Pilot Clinical Study of Adoptive Cell Therapy Combined with Trastuzumab、7th European Breast Cancer Conference、2010年3月24日、Barcelona、Spain

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 直子 (SEKI NAOKO)  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号：40226634

(2) 研究分担者

唐 宇飛 (TOH UHI)  
久留米大学・医学部・講師  
研究者番号：60268901

藤井 輝彦 (FUJII TERUHIKO)  
久留米大学・医学部・准教授  
研究者番号：50199288

(3) 連携研究者

山名 秀明 (YAMANA HIDEAKI)  
久留米大学・医学部・教授  
研究者番号：30140669