

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16463

研究課題名（和文）gBRCA変異陽性トリプルネガティブ乳がんにおける腫瘍微小環境解析

研究課題名（英文）Tumor Microenvironment Analysis of germ-line BRCA mutated Triple Negative Breast Cancer

研究代表者

高橋 侑子（Takahashi, Yuko）

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：90892191

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はTNBCに対する免疫チェックポイント阻害剤の治療効果予測のため腫瘍微小環境における免疫応答機序を解明することを目的とする。TNBCは他サブタイプに比べ細胞浸潤に関与し予後との相関報告されているpre-B-cell leukemia homeobox 4（PBX4）と、変異によってNK細胞機能が低下しICI治療抵抗性が報告されているkiller cell immunoglobulin-like receptor 3 Ig domains and short cytoplasmic tail 1（KIR3DS1）はTNBCで高発現であった。さらにPBX4はBRCA陽性BCでも高発現であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年免疫チェックポイント阻害剤（ICI）はトリプルネガティブ乳がん（TNBC）の標準治療の一つとして位置付けられており、PD-L1等以外の治療効果を予測するバイオマーカーの同定が期待されている。本研究ではTNBCの微小環境において、三次リンパ組織様構造を構成するT・Bリンパ球等免疫関連細胞の遺伝子群の発現を検討した。TNBCの微小環境において、PBX4やKIR3DS1などが関与する免疫応答細胞の関与が示唆された。今後症例数を増やしたvalidation studyが必要であるが、本研究の結果は、本邦におけるICI既治療例の治療効果を予測するバイオマーカーの同定に有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to evaluate the immune response in the tumor microenvironment to predict the therapeutic effect of immune checkpoint inhibitors against triple-negative breast cancer (TNBC). In TNBC, we investigated the involvement of B cells and tertiary lymphoid tissue-like structures in anti-tumor activity, which have been reported in recent years in several other malignant tumors but not in breast cancer. In TNBC, pre-B-cell leukemia homeobox 4 (PBX4), which is involved in cell infiltration and has been reported to be correlated with prognosis in several malignant tumors, and killer cell immunoglobulin-like receptor 3 Ig domains and short cytoplasmic tail 1 (KIR3DS1), which has been reported to have reduced NK cell function and resistance to ICI therapy due to mutations, were highly expressed in TNBC. Furthermore, PBX4 was also highly expressed in BRCA-positive BC.

研究分野：乳腺内分泌外科

キーワード：乳がん トリプルネガティブ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### トリプルネガティブ乳がんと BRCA1/2 遺伝子変異

トリプルネガティブ (ホルモン受容体 [HR] 陰性、ヒト上皮成長因子受容体タイプ 2 [HER2] 陰性) 乳がん (TNBC) は乳がん全体の 15~20% を占める最も予後不良のサブタイプであり、新規治療戦略の開発が急務である。遺伝性乳がん卵巣がん症候群の原因である生殖細胞系 BRCA1/2 遺伝子変異は、TNBC 全体の 15~19.5% に認められ、乳がん全体では約 2~4% の希少フラクションを構成する。TNBC における免疫学的背景これまで複数試験で、薬物治療の種類にかかわらず、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の存在している TNBC では予後が良好であることが示され、TNBC における獲得免疫の重要な役割が示唆された (Mahmoud SM, et al. 2011)。制御性 T 細胞、腫瘍細胞の PD-L1 発現は、組織学的高悪性度、HR 陰性および TIL との関連が報告されている (Ghebeh H, et al. 2006.)。また、PD-L1 は乳がん全体の約 60% に発現し TIL の増加と正の相関があることも報告された (Schalper KA, et al. 2014)。さらに PD-L1 発現は、非 TNBC に比べて TNBC で顕著に高いことが示された (Mittendorf EA, et al. 2014)。これらの報告から TNBC は PD-L1 陽性および TIL の存在によって特徴付けられ、TNBC に対する治療戦略の 1 つとして PD-1 の免疫チェックポイント阻害が重要であると考えられる。

### gBRCA1/2 変異を有する乳がんに対する免疫チェックポイント阻害剤の有用性

一方で、免疫チェックポイント阻害剤は、ゲノム不安定性の特徴を持つがんのサブセット (ミスマッチ修復欠損、MSI-high など) で抗腫瘍効果を示す。BRCA1/2 は二本鎖 DNA 修復に関与しゲノム安定性を維持する上で不可欠であることより、BRCA1/2 の機能喪失により乳がん細胞の免疫原性が高まると考えられている。一方、BRCA1/2 欠損と免疫チェックポイント関連分子の発現との関連では、BRCA1/2 欠損乳がん腫瘍において、PD-L1 および PD-1 の発現増加と、TIL の増加が報告されている (Wen W, et al. 2019)。

### TNBC における microenvironment cell populations (MCP)-counter signature および三次リンパ組織様構造と治療奏効性の検討

今回、抗 PD-1 抗体薬ペムプロリズマブを含む免疫チェックポイント阻害剤は、これまでも乳がんを含め複数の悪性腫瘍で有用性が示されているが、効果的に治療を行うために治療効果を予測するバイオマーカーが必要である。2020 年 1 月に Cabrita ら、Petitprez ら、Helmink らの 3 つの研究グループが、MCP-counter signature (8 つの免疫細胞: T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、細胞傷害性リンパ球、ナチュラルキラー細胞、B 細胞系列、単球系列、骨髄系樹状細胞および好中球) と 2 つの間質集団 (内皮細胞および線維芽細胞) の発現量により算出されるスコアにより抽出された遺伝子集団) と、腫瘍組織内における異所性

リンパ濾胞様構造である三次リンパ組織様構造 (Tertiary Lymphoid Structures: TLS) が、悪性黒色腫、腎臓がん、肉腫における免疫チェックポイント阻害剤の奏効性と関連することを同時に報告した (Bruno TC. 2020)。しかしながら、この MCP-counter signature および TLS と乳がんにおける免疫チェックポイント阻害剤の治療奏効性との関連性は国内外で未だ報告されていない。上述のように TNBC においてはこれまで、細胞性免

疫応答が注目されてきたが、今回報告された B 細胞性免疫応答の関与について検討する。

## 2 . 研究の目的

本研究は、gBRCA1/2 遺伝子変異 (gBRCA1/2m) を有するトリプルネガティブ乳がん (TNBC) に対する免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) の治療効果予測のため、腫瘍微小環境における免疫応答機序を解明することを目的とする。現在、申請者は gBRCA1/2 遺伝子変異を有する TNBC において、PARP 阻害剤および抗 PD-L1 抗体薬を用いた、本申請者が独自に発案、計画した新規周術期薬物療法の有効性を評価する多施設共同第 Ⅲ 相医師主導治験を治験調整医師として実施中である。2022 年 8 月米国で TNBC 周術期治療においてペムプロリズマブが FDA に承認され、その後本邦でも承認された。ICI は TNBC 治療において重要な役割を果たすと予測される。これまで gBRCA1/2m 乳がんでは、PD-L1 および PD-1 の発現増加と、腫瘍浸潤リンパ球の増加が報告されている。これらより、ICI の治療効果が期待される gBRCA1/2mTNBC において、近年他の複数の悪性腫瘍で報告されているが乳がんでは報告のなかった B 細胞や三次リンパ組織様構造の抗腫瘍免疫への関与について追究する。

## 3 . 研究の方法

### TNBC における MCP-Counter Signature 発現の評価

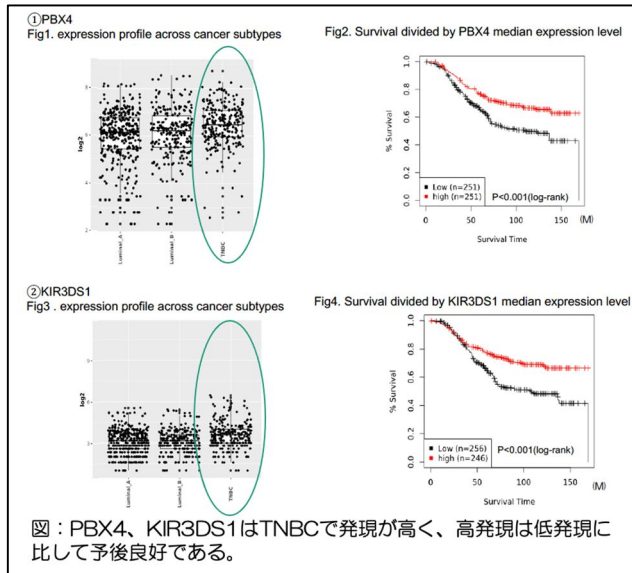
NCBI Gene Expression Omnibus National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (GEO) repository (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)から臨床病理学的情報を有する未治療乳がんより採取された検体を用いた cDNA 発現データである dataset を抽出して構築された Public database (Gene Expression database of Normal and Tumor tissues 2, GENT2)を用いて以下の解析を行った。複数の他悪性腫瘍において ICI の治療効果と相関することが報告された microenvironment cell populations (MCP)-counter signature (8 つの免疫細胞 : T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、細胞傷害性リンパ球、NK 細胞、B 細胞系列、単球系列、骨髄系樹状細胞および好中球と 2 つの間質細胞 : 内皮細胞および線維芽細胞の遺伝子発現量によりスコア化された遺伝子集団) (Petitprez et al., Nature, 577, 556–560, 2020) を構成する 109 個の遺伝子の mRNA 発現について、TNBC と Luminal タイプ乳がん (Luminal A および B) で比較検討を行った。また、これまで報告されていた TNBC と細胞性免疫活性の関連を評価するため、我々の研究グループが開発してきた TIL を予測する Genesignature (Iwamoto T, et al. 2018) の発現を評価する。さらに、上記解析にて抽出されてきた遺伝子発現について、BRCA1/2 の病的バリエーションを有する Dataset においても mRNA 発現量による差異について評価した。

## 4 . 研究成果

### TNBC における microenvironment cell populations (MCP) -counter signature および三次リンパ組織様構造と ICI 治療効果との関連

MCP-counter signature を開発した Dr. Petitprez より signature に用いられている遺伝子群 8 つの免疫細胞 : T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、細胞傷害性リンパ球、NK 細胞、B 細胞系列、単球系列、骨髄系樹状細胞および好中球と 2 つの間質細胞 : 内皮細胞および線維芽細胞の遺伝子発現量によりスコア化された遺伝子集団) の詳細情報提供を得た。

NCBI Gene Expression Omnibus から遺伝子発現データと予後情報を有するdataset を抽出して構築されたPublic databaseを用いてMCP-counter signatureを構成する109遺伝子の発現において、TNBCとLuminal タイプ乳がん（Luminal A および B）で比較検討を行った。109遺伝子のうち、67遺伝子でTNBCとLuminalタイプ乳がんとで遺伝子発現に差を認めた（ $P<0.001$ ）。67遺伝子の中でB細胞浸潤および細胞障害性T細胞の活性化に関与し複数の悪性腫瘍で予後と関連することが報告されているpre-B-cell leukemia homeobox 4（PBX4）と、変異によってNK細胞機能が低下しICI治療抵抗性が報告され



ている killer cell immunoglobulin-like receptor 3 Ig do-mains and short cytoplasmic tail（KIR3DS1）はTNBCで高発現し、databaseに登録された502例の乳がん患者でその遺伝子発現と良好な予後との相関が示唆された（ $P<0.001$ ）（上図）（申請者ら第31回日本乳癌学会学術総会, 2023）。

さらに、一方これらを別の BRCA 変異 Variant を含む Dataset（GSE1411142）においても同様の解析を施行した。PBX4 および KIR3DS1 はいずれも高発現しており、さらに、PBX4 においては BRCA2 変異は BRCA1 変異より低発現であった。TNBC の微小環境において免疫応答細胞の関与が示唆された。また、BRCA 変異陽性の TNBC においても両者は高発現しており、今後症例数を増やした validation study が必要であるが、本研究の結果は、本邦における ICI 既治療例の治療効果を予測するバイオマーカーの同定に有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋 侑子, 突沖 貴宏, 岩本 高行, 岩谷 胤生, 枝園 忠彦
2. 発表標題 トリプルネガティブ乳がんにおける免疫関連細胞の遺伝子発現の検討
3. 学会等名 第31回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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