

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591907

研究課題名(和文) 再発乳癌治療における免疫ネガティブシグナル抑制に着目した新世代免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel immunotherapy targeting immune checkpoint blockade for recurrent breast cancer

研究代表者

山本 滋 (YAMAMOTO, Shigeru)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30289178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：1.免疫のNegative signalの強力な制御因子であるPD-L1(B7-H1)の乳癌での発現を検討し、Her-2 enrichedタイプにおいて、腫瘍細胞におけるPD-L1の発現高度群では無再発生存率が不良であることが判明した。2.乳癌細胞におけるB7-H3の高発現および制御性T細胞陽性の高比率の乳癌患者では無再発生存率が不良であることが判明した(P=0.014およびP=0.039)。

研究成果の概要(英文)：1.Programmed death 1 (PD-1) is a co-inhibitory receptor in the immunoglobulin superfamily, and functions as a negative regulator of the immune system. We immunohistochemically investigated the expression of PD-1 and PD-L1 in breast cancer cells and assessed the correlation between the prognosis and clinicopathological factors. Expression of PD-L1 is associated with poor prognosis in HER2-positive breast cancer. 2.B7-H3 belongs to the B7 superfamily of immune regulatory ligands and plays an important role in the adaptive immune response of co-inhibitory/stimulatory factors in regulating T cells. We immunohistochemically investigated the presence of B7-H3 and forkhead box P3 (Foxp3)-positive Tregs in pathological specimens from 90 patients with breast cancer. B7-H3 and Foxp3 can be regarded as markers of poor prognosis in breast cancer. These expressions were not correlated, suggesting that B7-H3 expression plays an independent role in tumor immune evasion, regardless of Tregs.

研究分野：乳癌外科学

キーワード：乳癌 PD-L1 B7-H3

## 1. 研究開始当初の背景

乳癌は女性の癌罹患率第1位の疾患で、年間6万人が新たに診断されている。乳癌再発時には、術後補助療法で使用されているため、すでにホルモン療法剤、抗がん剤、分子標的治療に抵抗性で治療に難渋することが多く、新たな治療法の開発が急務である。乳癌免疫療法は、これまで実臨床では注目されなかったが、副作用が少なく、再発後に長期間に及ぶ治療をうける患者のQOL維持に適し、乳癌治療には最適である。

### (1)免疫のNegative signal

近年、免疫機構が負のバランスに傾くことによる“免疫無力化”(Anergy) 腫瘍の免疫逃避である“寛容化”(Toleralize)といった Negative signal が注目され、免疫のダークサイド (dark side) と名付けられている。これは免疫能の活性化(Positive signal)に重きをおいた従来の免疫療法の考え方を一転させた新知見である。なお、T細胞のNegative signalの1つCTLA-4を阻害する抗CTLA-4抗体 ( ipilimumab または MDX-010 ) は2011年にFDAに転移性悪性黒色腫の治療として認可されている。

### (2)B7-H1 とPD-1 について

- B7-H1 はB7family に属し、樹状細胞の細胞膜や腫瘍細胞に広く発現。B7-H1 は、T細胞表面のPD-1 がレセプターとなり、T細胞にnegative signal を送る。
- Negative signal signal を受けたT細胞表面にも、B7-H1 が発現し、別のT細胞にNegative signal を送る。
- PD-1 は、T細胞表面のB7-H1 のレセプターである。

このB7-H1 によるNegative signal を抗PD-1抗体で阻害する。 ヒト抗PD-1抗体は現在開発中であり、本研究は translational research としてヒトへの応用も可能である。

### (3)Negative signal 阻害によるT細胞の抗腫瘍効果

B7-H1 のようなnegative signal を送る蛋白を阻害すると、Negative signaling から解放されたT細胞は、本来の抗腫瘍免疫が復活し、これまでになかった著しい免疫治療効果をもたらす。

具体的には以下の機序が考えられる。

CD8+ T細胞において、殺細胞効果の増強と、その活性化状態の保持、さらに乳癌細胞をメモリー化した細胞 ( セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞 ) となり抗腫瘍効果を発揮する。このことは、術後長期経過後にも再発がしばしば認められる乳癌の治療には最適である。

CD4+ T細胞において同様にTh1細胞は、長期間にわたって抗腫瘍効果をサポートする。

## 2. 研究の目的

乳癌領域での免疫療法は、再発後も数年間におよぶ乳癌治療において、患者のQOL維持に最適であるが今だ十分な研究がなされていない。我々は、最近注目されている免疫のNegative signal に着目し、未開発の乳癌領域の免疫療法を開発するため以下の研究を行う。

(1)免疫のNegative signal の強力な制御因子である B7-H1 の乳癌での発現と臨床病理学的因子との関連を検討する。

(2)様々な免疫担当細胞間のB7-H1,PD-1の相互作用を抗PD-1抗体を用いた抗体療法により阻害 ( blocking ) することで、Negative signal から解放されたT細胞が本来の抗腫瘍免疫を復活させることを invitro (細胞株) および動物実験で確認する。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト乳癌臨床検体を用いた検討

(Histological analysis) : 免疫染色にて B7-H1 の発現を調べ、予後および臨床病理学的因子 (ER, PgR, HER-2, EGFR, p53, ki-67, 核異型度) との関連を調べる。

(2) 乳癌細胞株を用いた検討 (in vitro) : flow cytometry を用いて B7-H1 の発現を検討し、B7-H1 の発現が認められる細胞株を活性化した T 細胞を含む PBMC と共培養し、抗 PD-1 抗体添加による T 細胞の分裂・増殖能を検討する。

(3) 動物実験 (in vivo) : Her-2/neu マウス乳癌発生モデルおよび BALB/c マウスに対し、抗マウス PD-1 抗体を投与した場合の抗腫瘍効果および T 細胞の活性化レベル、殺細胞効果を調べる。

#### 4. 研究成果

乳癌領域での免疫療法は、再発後も数年間におよぶ乳癌治療において、患者のQOL維持に最適であるが今だ十分な研究がなされていない。近年、癌の微小環境において、免疫 Negative signal により、活性化 T 細胞が無力化や寛容化により抑制されることが判明した。この免疫担当細胞間の Negative signal である PD-L1 (B7-H1), PD-1 の相互作用を抗 PD-1 抗体を用いた抗体療法により阻害 (blocking) することで、Negative signal から解放された T 細胞が本来の抗腫瘍免疫を復活させ、未開発の乳癌領域の免疫療法となりうると考え、研究を開始した。

(1) 免疫の Negative signal の強力な制御因子である PD-L1 (B7-H1) の乳癌での発現を、原発性乳癌の切除標本を用いて、腫瘍細胞における PD-L1 (B7-H1) 発現を抗 PD-L1 (B7-H1) 抗体を用いて免疫染色を行った。さらに腫瘍周囲の T リンパ球における PD-1 発現を抗 PD-1 抗体を用いて免疫染色を行った。乳癌サブタイプ別に予後との関連を検討し、Her-2 enriched タイプにおいて、腫瘍細胞における PD-L1 の発現高度群では無再発生存率が不良であること

が判明した。

(2) Negative signal の一つとして腫瘍上に発現し、免疫制御リガンドとして適応免疫反応において抑制系の重要な役割を担うことが報告されている B7-H3 に着目し、乳癌細胞における B7-H3 の発現とその周囲の制御性 T 細胞の有無に対する乳癌患者の予後を免疫組織学的染色を用いて検討した。B7-H3 は、どの程度、直接に腫瘍免疫逃避に関与しているかは不明であり、また制御性 T 細胞は、Negative signal とは独立あるいは相乗的に働く強力な抑制系の T 細胞である。結果として、B7-H3 の高発現および制御性 T 細胞陽性の高比率の乳癌患者では無再発生存率が不良であることが判明した ( $P=0.014$  および  $P=0.039$ )。

#### 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 2 件)

N. Maeda, K. Yoshimura, S. Yamamoto, (16 人 2 番目) Expression of B7-H3, a potential factor of tumor immune evasion in combination with the number of Regulatory T cells, affects against recurrence-free survival in breast cancer patients. *Ann Surg Oncol*, 査読有、21、2014、546-554、DOI: 10.1245/s10434-014-3564-2

Shindo Y, Yoshimura K (13 人中 2 番目) Combination immunotherapy with 4-1BB activation and PD-1 blockade enhances antitumor efficacy in a mouse model of subcutaneous tumor. *Anticancer Res*, 査読有、35、2015、129-136  
<http://ar.iiarjournals.org/content/35/1/129.long>

[学会発表] (計 4 件)

前田和成、HER2 陽性乳癌における PD-L1 の発現と臨床的意義の検討、第 115 回日本外科学会定期学術集会、2015 年 4 月 16 日 ~ 2015 年 4 月

18日、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）

前田訓子、乳癌腫瘍におけるPD-L1発現の臨床的意義、第22回日本乳癌学会学術集会、2014年7月10日～2014年7月12日、大阪国際会議場（大阪府・大阪市）

吉村 清、ULBP1/NKG2D 発現胃癌患者のバイオマーカーとしての意義、第114回日本外科学会定期学術集会、2014年4月3日～2014年4月5日、京都国際会議場（京都府・京都市）

前田訓子、乳癌腫瘍におけるPD-L1発現の臨床的意義、第114回日本外科学会定期学術集会、2014年4月3日～2014年4月5日、京都国際会議場（京都府・京都市）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕  
出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 滋(YAMAMOTO, Shigeru)  
山口大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：30289178

### (2) 研究分担者

吉村 清(YOSHIMURA, Kiyoshi)  
独立行政法人国立がん研究センター・早期・探索臨床研究センター・免疫療法開発分野  
分野長

研究者番号：30346564

(3) 連携研究者  
なし