

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591925

研究課題名(和文) 乳癌における免疫抑制的腫瘍微小環境と免疫学的治療戦略についての検討

研究課題名(英文) Study of immunosuppressive tumor microenvironment and therapeutic strategy in breast cancer

研究代表者

関 直子 (SEKI, Naoko)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：40226634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト乳癌組織における免疫組織学的検討において、Cancer testis (CT)-antigen発現はTriple negative乳癌症例で高頻度に発現していた。ALDH-1発現もTriple negative症例で有意に高く、CT-antigenとALDH-1の発現相関も示唆された。Triple negative細胞株・ALDH-1高活性細胞集団において高発現するCT-antigenも認められることから、Triple negative乳癌・化学療法抵抗性症例に対する免疫療法における免疫ターゲットとしてのCT-antigenの有用性について、今後さらに検討が必要であると思われた。

研究成果の概要(英文)：Cancer testis (CT)-antigens were expressed in a large proportion of triple negative (TN)- and ALDH-1 positive breast cancer specimens.

NY-ESO-1, MAGE-A10, and MAGE-C1 antigens were immunohistochemically expressed in 6%, 15%, and 12% of patients with primary invasive breast carcinoma, respectively. NY-ESO-1 and MAGE-A10 were preferentially expressed in TN or estrogen receptor negative breast cancers ($p < 0.05$). ALDH-1 expression, which have been reported as predictive marker of cancer stem cells in terms of resistance to chemotherapy, was observed in 22% of tumor specimens, and was most prevalent in the TN breast cancers ($p < 0.001$). Moreover, 41% of ALDH-1 positive specimens were accompanied with expression of any of CT-antigens, some of which showed concomitant expression of CT-antigens and ALDH-1.

Because of the limited therapeutic modalities for these phenotypes, significance of CT-antigens expressions should be further studied for beneficial immunotherapy in breast cancer patients.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：癌 免疫学

1. 研究開始当初の背景

申請者ら研究グループは乳癌における免疫治療の基礎的研究、細胞免疫療法および癌ワクチン臨床試験を通じた臨床的研究を継続して行ってきた。これらの基礎的・臨床的研究結果は乳癌における免疫治療の今後の可能性を示唆するものではあったが、依然その治療効果は限られており、より有効な治療法の確立が望まれる。今後、治療戦略の少ない triple negative 乳癌や癌幹細胞を標的とした免疫治療の開発が望まれるが、近年の研究からは、有効な癌治療のためには免疫抑制的癌微小環境の解除を目指した治療戦略が必要なが示唆されている。免疫細胞は癌細胞と相互干渉しながら、抑制的癌微小環境を形成し、癌の進展に寄与すると共に、癌免疫治療のみならず従来の化学療法や癌分子標的治療の治療成績にも大きな負の影響を与えていると考えられ、その理解は癌の治療戦略を構築する上で非常に重要である。

2. 研究の目的

本研究では、癌細胞～免疫抑制的癌微小環境を軸とした宿主免疫システムが乳癌の治療成績・予後に及ぼす影響とそのメカニズムについて、triple negative 乳癌や癌幹細胞への免疫治療の展開の可能性について、臨床検体の解析・in vitro 実験により検討することを目的とする。

3. 研究の方法

[免疫組織学的検討] 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 (Table.1.) その局所免疫環境について免疫組織学的検討を行った。また、CT-antigen の発現 (NY-ESO-1 抗体 (E978)、MAGE-A 抗体 (6C1)、MAGE-C1 (CT7-33Santa Cruz Biotechnology) 抗体) ALDH1A1 抗体 (ab52492 : abcam) による免疫染色による発現解析を行った (Fig.1)。腫瘍細胞での発現をそれぞれ評価し、臨床プロファイルとの相関を検討した。

[乳癌細胞株を用いた検討] CT-antigen と ALDH1 の発現相関について、in vitro において検討した。Triple negative 乳癌株 SUM159, MDA-MB-157 を用いて、ALDEFLUOR - Assay (Stem Cell Technology) を行い、ALDH 活性陰性・陽性細胞をセルソーターで単離、Real-Time PCR 法により、CT-antigen 遺伝子 (CTAG1A1B (NY-ESO-1), CTAG 2、MAGEA3、MAGEA6) 等について検討した。

Table1 Clinicopathologic characteristics of patients

Characteristic	No. / Total (%)	Characteristic	No. / Total (%)
Age (years)		Tumor grade	
≤ 50	29 / 100 (29)	I+II	77 / 100 (77)
> 50	71 / 100 (71)	III	23 / 100 (23)
Tumor size (cm)		HER2	
≤ 2.0	59 / 100 (59)	Positive	23 / 100 (23)
> 2.0	41 / 100 (41)	Negative	77 / 100 (77)
Axillary nodal status		ER	
Positive	45 / 100 (45)	Positive	56 / 100 (56)
Negative	47 / 100 (47)	Negative	44 / 100 (44)
Not performed resection	8 / 100 (8)	Triple negative*	21 / 100 (21)

* ER-, PgR- and HER2- phenotype

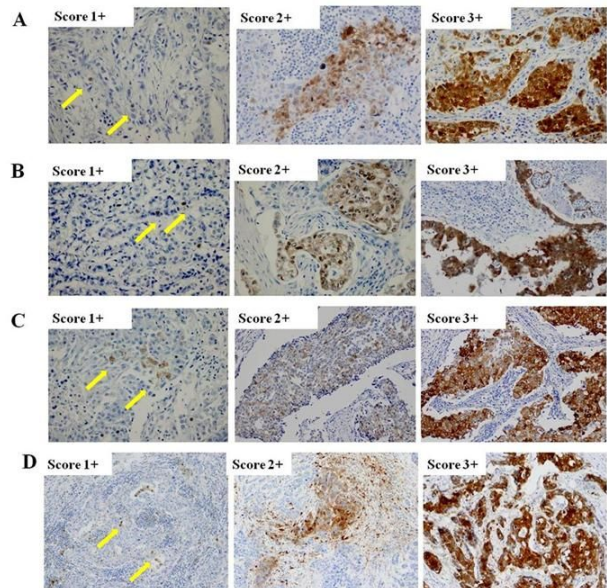


Figure 1; Immunohistochemical staining of CT-antigens and ALDH-1 in breast cancer. A: NY-ESO-1, B: MAGE-A, C: MAGE-C1, and D: ALDH-1.

4. 研究成果

■ 免疫組織学的検討における CT-antigen 発現は NY-ESO-1:6%, MAGE-A:15%, MAGE-C1:12% であり、陽性率は低いものの、それぞれ腫瘍細胞内に発現を認めた。

■ 一方で、CT-antigen は ER 陰性乳癌、Triple negative 乳癌で高頻度に発現していた。NY-ESO-1 と MAGE-A 発現は Triple negative 乳癌において有意に高く、CT-antigen 3 種のうちいずれかに陽性を示す症例も ER 陰性乳癌、Triple negative 乳癌で有意に多かった (Table.2.)

Table 2. Frequency clinicopathologic characteristics of patients according to CT-antigen (and ALDH-1) expression

Characteristic	Score	n	Tumor Size : cm		P-value	LN metastasis		P-value	ER		P-value	HER2		P-value	Triple negative		P-value
			≤ 2.0	> 2.0		negative	positive		negative	positive		negative	positive		ER-, PgR-, HER2-	others	
NY-ESO-1	0	94	55 (58.5)	39 (41.5)	0.694	42 (48.8)	44 (51.2)	0.204	38 (40.4)	56 (59.6)	0.006	71 (75.5)	22 (24.5)	1	78 (83.0)	16 (17.0)	0.001
	1-3	6	03 (50.0)	3 (50.0)		05 (83.3)	01 (16.7)		6 (100)	0 (0.0)		5 (83.3)	01 (16.7)		01 (16.7)	05 (83.3)	
MAGE-A	0	85	51 (60.0)	34 (40.0)	0.400	40 (51.3)	38 (48.7)	1	36 (42.4)	49 (57.6)	0.574	63 (74.1)	22 (25.9)	0.512	70 (83.5)	14 (16.5)	0.015
	1-3	15	07 (46.7)	8 (53.3)		7 (50.0)	7 (50.0)		8 (53.3)	07 (46.7)		13 (86.7)	02 (13.3)		08 (53.3)	07 (46.7)	
MAGE-C1	0	88	54 (61.4)	34 (38.6)	0.116	41 (51.3)	39 (48.8)	1	36 (40.9)	52 (59.1)	0.123	69 (78.4)	19 (21.6)	0.153	71 (80.7)	17 (19.3)	0.270
	1-3	12	4 (33.3)	8 (66.7)		6 (50.0)	06 (50.0)		08 (66.7)	04 (33.3)		07 (58.3)	05 (41.7)		08 (66.7)	04 (33.3)	
NY-ESO-1 or MAGE-A or MAGE-C1	0	74	47 (63.5)	27 (36.5)	0.069	33 (49.3)	34 (50.7)	0.643	26 (35.1)	48 (64.9)	0.003	57 (77.0)	17 (23.0)	0.790	65 (87.8)	09 (12.2)	
	1-3	26	11 (42.3)	15 (57.7)		14 (56.0)	11 (44.0)		18 (69.2)	08 (30.8)		19 (73.1)	07 (26.9)		14 (53.8)	12 (46.2)	<0.001
ALDH-1	0	78	45 (57.0)	33 (42.3)	1	34 (45.9)	40 (54.1)	0.065	28 (35.9)	50 (64.1)	0.003	58 (74.4)	20 (25.6)	0.580	69 (88.5)	09 (11.5)	<0.001
	1-3	22	13 (59.1)	9 (40.9)		13 (72.2)	5 (27.8)		16 (72.7)	06 (27.3)		18 (81.8)	04 (18.2)		10 (45.5)	12 (54.5)	<0.001

Evaluated by Fisher's exact test.

LN, lymph node; Triple negative, ER-, PgR- and HER2- phenotype. (%)

Table 3. Association of CT-antigens and ALDH-1 expression

CT-antigens	Score	n	ALDH-1		P-value
			low	high	
NY-ESO-1	0	93	73 (78.5)	20 (21.5)	0.612
	1-3	06	04 (66.7)	2 (33.3)	
MAGE-A	0	84	68 (81.0)	16 (19.0)	0.093
	1-3	15	9 (60.0)	06 (40.0)	
MAGE-C1	0	87	71 (81.6)	16 (18.4)	0.023
	1-3	12	6 (50.0)	06 (50.0)	
NY-ESO-1 or MAGE-A or MAGE-C1	0	73	60 (82.2)	13 (17.6)	0.100
	1-3	26	17 (65.4)	09 (34.6)	

Evaluated by Fisher's exact test (%)

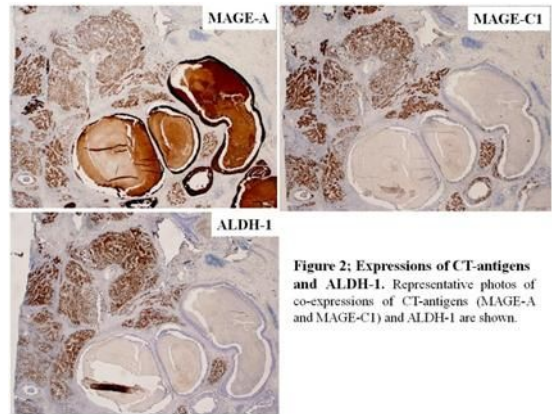


Figure 2: Expressions of CT-antigens and ALDH-1. Representative photos of co-expressions of CT-antigens (MAGE-A and MAGE-C1) and ALDH-1 are shown.

- 22%に ALDH-1 腫瘍細胞内発現を認め、Triple negative 乳癌 において有意に高った。また ALDH-1 陽性症例のうち、多くの 症例が CT-antigen 3 種いずれかに陽性を示し (4 1 %)、中でも MAGE- C1 で有意な相関が見られた (Table.3.)。
- CT-antigen, ALDH-1 いずれも OS, RFS とは 明らかな相関は認めなかった。
- Triple negative 乳癌細胞株を用い、CT-antigen と ALDH 1 の発現相関について解析中である (Fig.3.)。ALDH1 高活性の細胞集団において、SUM15 で MAGEA3, MDA-MB-157 では CATG2 発現が高く認められた。

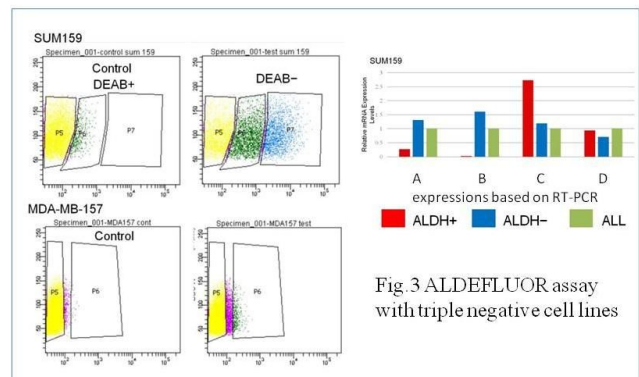


Fig. 3 ALDEFLUOR assay with triple negative cell lines

ヒト乳癌組織における免疫組織学的検討において、CT-antigen 発現は Triple negative 乳癌症例で高頻度に発現していた。ALDH-1 発現も Triple negative 症例で有意に高く、CT-antigen と ALDH-1 の発現相関も示唆された。Triple negative 細胞株・ALDH-1 高活性細胞集団において高発現する CT-antigen も認められることから、Triple negative 乳癌・化学療法抵抗性症例に対する免疫療法における免疫ターゲットとしての CT-antigen の有用性について、今後さらに検討が必要であると思われた。また、ヒト乳癌組織を用いた局所免疫環境についての解析を現在進行中であるが、ALDH-1 発現と癌局所制御性 T 細胞浸潤との相関が示唆されており、今後免疫抑制的環境の解除を目指した治療ストラテジーの開発が重要だと考えられた。

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3件)

(1) Takahashi R, Toh U, Iwakuma N, Takenaka M, Otsuka H, Furukawa M, Fujii T, Seki N, Kawahara A, Kage M, Matsueda S, Akagi Y, Yamada A, Itoh K, Sasada T. Feasibility study of personalized peptide vaccination for metastatic recurrent triple-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2014 Jul 3;16(4):R70. doi: 10.1186/bcr3685. 査読有

(2) Takahashi R, Toh U, Iwakuma N, Mishima M, Fujii T, Takenaka M, Koura K, Seki N, Kawahara A, Kage M, Ogo E, Shirouzu K. Treatment outcome in patients with stage III breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Exp Ther Med.* 2013 Nov;6(5):1089-1095. 査読有

(3) Takenaka M, Seki N, Toh U, Hattori S, Kawahara A, Yamaguchi T, Koura K, Takahashi R, Otsuka H, Takahashi H, Iwakuma N, Nakagawa S, Fujii T, Sasada T, Yamaguchi R, Yano H, Shirouzu K, Kage M. FOXP3 expression in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes is associated with breast cancer prognosis. *Mol Clin Oncol.* 2013 Jul;1(4):625-632. 査読有

[学会発表](計1件)

(1) 竹中 美貴、関 直子 et al.
乳癌における Cnacer/Testis Antigens 発現に関する免疫組織学的検討
第22回日本乳癌学会学術総会
2014年7月10~12日 大阪

6 . 研究組織

(1)研究代表者

関 直子 (SEKI, Naoko)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：40226634

(2)研究分担者

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

2 藤井 輝彦 (FUJII, Teruhiko)

久留米大学・医学部・准教授
研究者番号：50199288

3 鹿毛 政義 (KAGE, Masayoshi)

久留米大学病院・教授
研究者番号：80148840