

# トリプルネガティブ乳癌に対する局所エピジェネティック治療を用いた新規免疫療法の開発

信州大学医学部外科学教室乳腺内分泌外科学分野 助教 大場 崇旦

## 要 約

トリプルネガティブ乳癌(TNBC)に対する新たな治療法として免疫チェックポイント阻害剤(ICIs)の使用が可能になったものの、その効果は限定的で、TNBCに対するICIsの効果を増強させる治療戦略の開発が求められている。本研究では、新たな治療戦略の一つとして、ヒストン修飾やDNAメチル化を制御するエピジェネティック治療薬の腫瘍内注入による腫瘍微小環境変化の誘導を用いた免疫療法の開発を目的とした。一方で、エピジェネティック治療薬は、乳癌に対しては未だ保険未収載で、実臨床において、ICIsは化学療法剤との併用で用いられている。そのため、まずは、ICIsの効果をより高める併用化学療法剤を同定することが、TNBCに対するより効果的な治療の構築に繋がると考えられる。本検討では局所エピジェネティック治療開発の前段階として、腫瘍宿主の免疫機構によりよい影響を及ぼし、ICIsの効果を増強する化学療法剤を同定するために、微小管阻害剤であるエリブリンとパクリタキセルが免疫細胞に与える影響について解析した。健常者のヒト末梢血単核細胞、マウスの脾臓細胞から得られた免疫細胞を*in vitro*で活性化させると同時にエリブリン、パクリタキセルを添加し、細胞増殖と表面マーカーの発現変化を解析したところ、パクリタキセルの投与では細胞増殖が抑制される一方で、エリブリンの投与では抑制されなかった。また、エリブリンの投与によりCD8T細胞の増殖が促進され、その中でもCD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>細胞比の上昇を認めた。さらに、TNBC細胞株との共培養試験では、エリブリンは活性化T細胞の殺細胞効果を増強させた。エリブリンがICIsとの併用薬剤として有用である可能性が示唆され、局所エピジェネティック治療も、エリブリンの併用によりその効果を高めることができる可能性があり、今後も開発を継続していく。

## 緒 言

トリプルネガティブ乳癌(TNBC)は悪性度が高いため、術後再発率も高い。TNBCに対し免疫チェックポイント阻害剤(immune checkpoint inhibitors; 以下ICIs)の使用が可能になったが、その治療もTNBCに対する効果は限定的であり、ICIsの効果を増強させる治療戦略の開発が喫緊の課題となっている。ICIsの効果を高める方法として、ヒストン修飾やDNAメチル化を制御するエピジェネティック治療薬の全身投与が、腫瘍微小環境(tumor microenvironment; 以下TME)を変化させることでICIsへの反応性を変えることが報告されているが、TMEにだけでなく全身的反応も引き起こすため有害事象も多いという問題がある。一方、TMEを変えるための方法として、薬剤を腫瘍内に直接注入するintratumoral approachが、全身投与と比べてより少ない投与量で、同等もしくはそれ以上のTMEを変化させる効果を誘導し、さらに全身的有害事象

の軽減などの利点も有することから注目されている<sup>1,2</sup>。本研究では、体表に近い部位に発生するためintratumoral approachが容易という乳癌の特徴を活かし、エピジェネティック治療薬の腫瘍内投与によりTMEの変化を誘導し、TNBCをICIs反応性に変化させる可能性を検証し、臨床応用への可能性を探索することを目的とした。

しかし、エピジェネティック治療薬は皮膚悪性リンパ腫などに対しては保険収載されているものの、乳癌に対しては未だ保険収載に至っていない。実臨床においては、TNBCに対し、ICIsは化学療法剤と併用して用いられており、まずはICIsとの併用でその効果をより誘導できる化学療法剤を同定することが、TNBCに対するよりよい治療の構築に繋がると考えられる。近年、化学療法剤の単独での治療において、末梢血中のリンパ球数やリンパ球/好中球比が、エリブリンやパクリタキセルなどの化学療法剤の治療効果予測因子となることが報告されてお

り<sup>3,4</sup>、化学療法剤が腫瘍細胞に対する直接的な殺細胞効果だけでなく、投与された患者の免疫機構にも何らかの作用を及ぼしている可能性が考えられており、その詳細なメカニズムを解明することで腫瘍宿主の免疫機構に最もよい影響を及ぼす化学療法剤を同定でき、最適なICIとの併用療法の構築ができる可能性がある。

本検討では局所エピジェネティック治療開発の前段階として、免疫細胞に最もよい影響与え、ICIの効果を増強する化学療法剤を同定するために、微小管阻害剤であるエリブリンとパクリタキセルが免疫細胞に及ぼす効果について解析した。

## 方法

- (1) ヒトTNBC細胞株(MDA-MB-231、Hs578T)を用いて、エリブリン、パクリタキセルの細胞増殖に与える影響を増殖アッセイで解析した。
- (2) 健常者の血液から末梢血単核細胞(Peripheral blood mononuclear cells; 以下PBMC)を分離し、抗CD3 /CD28抗体を用いて*in vitro*で6日間活性化すると同時にエリブリン、パクリタキセルを添加し、細胞増殖を増殖アッセイで解析した。回収した活性化PBMCの表面マーカーをフローサイトメトリーで解析した。
- (3) Balb/cマウスの脾臓細胞を採取し、抗CD3 /CD28抗体、IL-7、IL-15を用いて*in vitro*で6日間活性化すると同時にエリブリン、パクリタキセルを添加し、細胞増殖を増殖アッセイで解析した。回収した活性化脾臓細胞の表面マーカーをフローサイトメトリーで解析した。
- (4) MDA-MB-231、Hs578Tを用いて、上記(2)で活性化したPBMCとの共培養(エリブリン、パクリタキセルも同時に添加)を行い、化学療法剤がT細胞の殺細胞能に与える影響を、共培養後にTNBC細胞株の細胞数を計測し、解析した。
- (5) 本研究計画は信州大学医学部附属病院倫理委員会にて審査され、承認を得ている(承認番号5336)。

## 結果

- (1) エリブリン、パクリタキセルのヒトTNBC細胞に対する抗腫瘍効果  
MDA-MB-231、Hs578Tにエリブリン、パクリ

タキセルを3日間添加し、増殖アッセイを行った。エリブリンの50%増殖阻害濃度はMDA-MB-231で1.04nM、Hs578Tで1.47nM、パクリタキセルはMDA-MB-231で1.32nM、Hs578Tで0.54nMであった。

### (2) ヒトPBMC活性化の過程でエリブリン、パクリタキセルが細胞増殖に与える影響

エリブリン、パクリタキセルはそれぞれ約1nMでTNBC細胞に対して抗腫瘍効果を示すため、以後のPBMC活性化の際に添加する薬剤濃度を両薬剤ともに1nMに設定した。

健常者から採取したヒトPBMCの活性化と同時に、エリブリン、パクリタキセルを添加し、細胞増殖を解析したところ、パクリタキセル投与では対照に比べ細胞増殖が抑制されたが、エリブリン投与では抑制されなかった(図1)。

### (3) ヒトPBMC活性化の過程でエリブリン、パクリタキセルがT細胞の分化に与える影響

活性化PBMCの表面マーカーをフローサイトメトリーで解析したところ、CD3<sup>+</sup>細胞中のCD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>細胞比は、パクリタキセル投与では対照と比べて差は認めなかったが、エリブリン投与により有意に低下した(図2A)。

また、CD8T細胞中のCD45RA、CD45ROの発現を解析したところ、パクリタキセル投与では対照と比べ差は認めなかったが、エリブリン投与によりCD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>細胞比が有意に上昇した(図2B)。

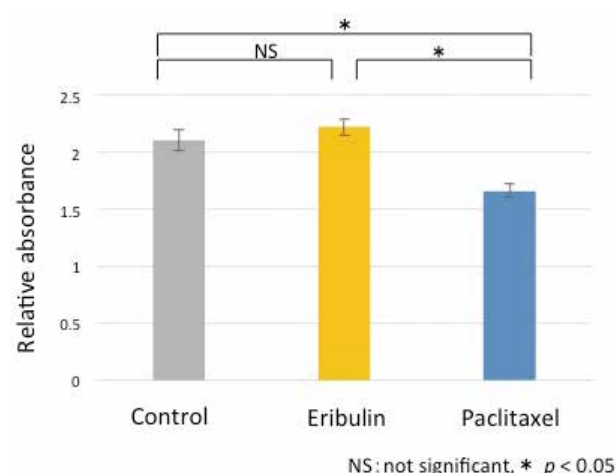


図1. ヒトPBMC活性化の過程でエリブリン、パクリタキセルが細胞増殖に及ぼす効果

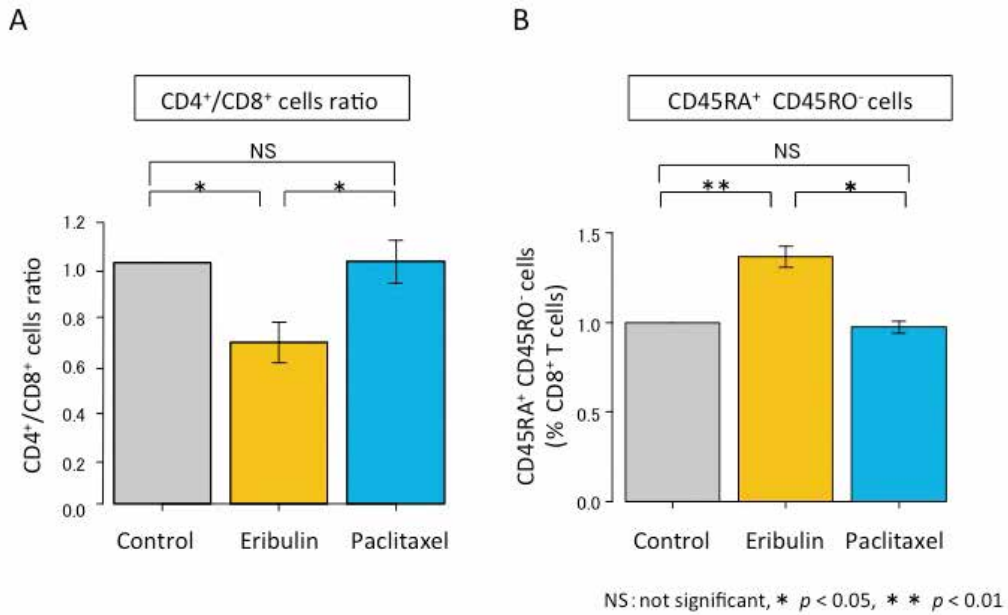


図2. ヒトPBMC活性化の過程でエリブリン、パクリタキセルがT細胞の分化に与える影響  
(A) CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>細胞比(CD3<sup>+</sup>細胞中)、(B) CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>細胞の割合(CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>細胞中)

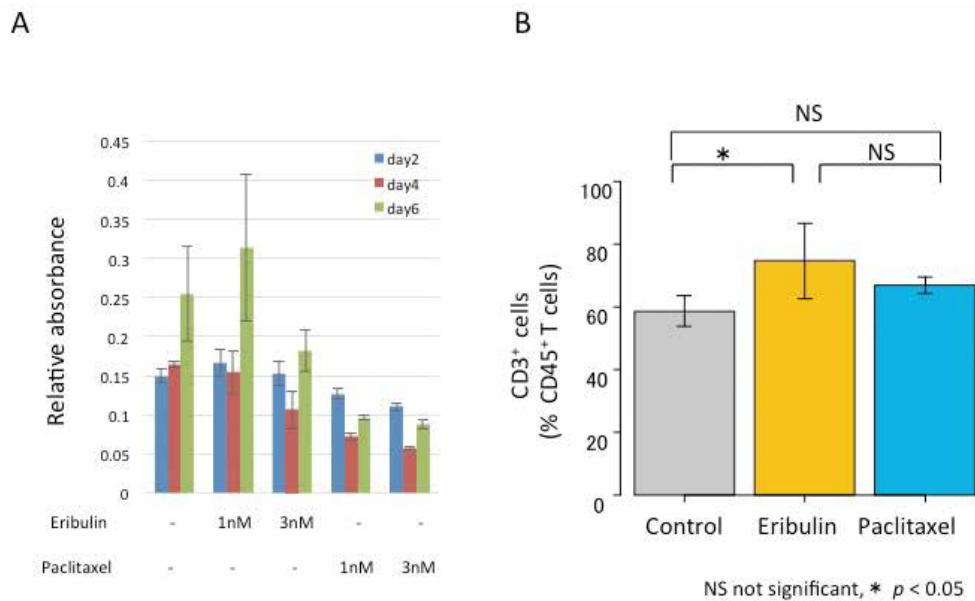


図3. マウス免疫細胞活性化の過程でT細胞の増殖にエリブリン、パクリタキセルが与える影響

(4) マウス免疫細胞活性化の過程でT細胞の増殖にエリブリン、パクリタキセルが与える影響

マウス脾臓細胞の活性化と同時に、エリブリン、パクリタキセルを添加し、細胞増殖を解析したところ、パクリタキセル投与では対照に比べ細胞増殖が抑制されたが、エリブリン投与では抑制されなかった(図3A)。

活性化脾臓細胞のCD45<sup>+</sup>細胞中のCD3<sup>+</sup>細胞比は、パクリタキセル投与では対照群と比べて差は認めなかったが、エリブリン投与により有意に上昇した(図3B)。

(5) ヒトTNBC細胞に対する活性化T細胞の殺細胞効果にエリブリン、パクリタキセルが与える影響

上記の結果から、エリブリンがCD8T細胞の増殖を促進させることで、腫瘍細胞に対するT細胞の抗腫瘍効果を高める可能性が推測されたため、MDA-MB-231、Hs578Tと活性化ヒトPBMCとの共培養にエリブリン、パクリタキセルを添加することで、これらの化学療法剤がT細胞の殺細胞効果に与える影響を解析したところ、エリブリンの添加によりMDA-MB-231、Hs578Tに対する活性化ヒトPBMCの抗腫瘍効果の増強が認められた(図4)。

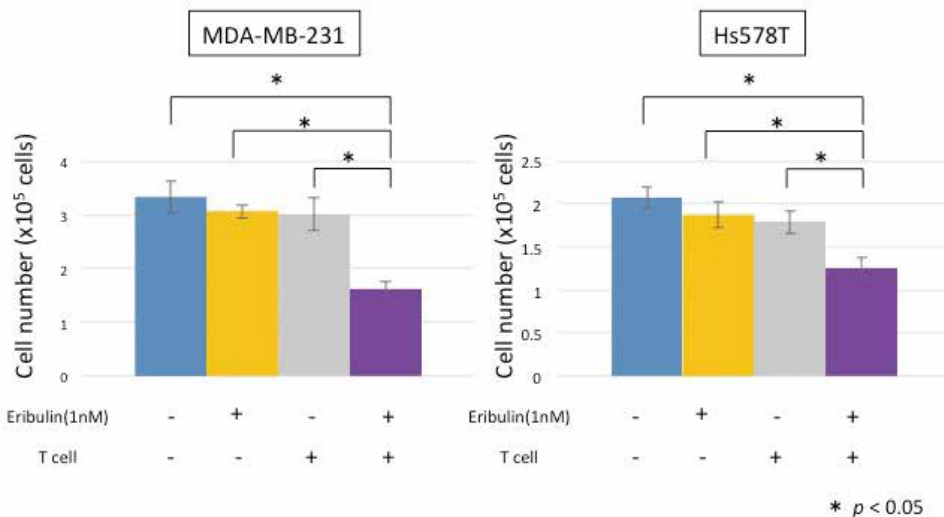


図4. ヒトTNBC細胞に対する活性化T細胞の殺細胞効果にエリブリン、パクリタキセルが与える影響

## 考 察

本検討では局所エピジェネティック治療開発の前段階として、ICIsとの併用で用いられる薬剤として最適な化学療法剤を同定するために、エリブリン、パクリタキセルが免疫細胞に及ぼす影響についての解析を行った。

本検討の結果から、エリブリンはヒトPBMCの活性化の過程においてCD8T細胞優位の増殖を促進させ、さらにマウスのT細胞の増殖促進効果も有する可能性が示唆された。

近年、CD8T細胞の中で、長期生存可能でかつ自己複製能をもつstem cell memory T細胞(CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>)が注目されている。この細胞は、活性化刺激によりeffector memory T細胞(CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>)へと分化していくが、stem cell memory T細胞を増やすことが、腫瘍免疫を増強させる鍵となることが報告されている<sup>5</sup>。本検討の結果から、エリブリンがT細胞のeffector T cell細胞への分化を抑制し、stem cell memory T cellを増やす効果を有している可能性が示唆された。

さらに、CD8T細胞中は抗腫瘍免疫の中心的な役割を担っているため、エリブリンによるCD8T細胞の増殖促進によって、T細胞による抗腫瘍効果の増強される可能性が考えられるが、本研究での共培養アッセイでの結果はその仮説を支持するものと考えられた。

本検討の結果から、エリブリンがT細胞の増殖や分化の過程で抗腫瘍効果を高める方向に作用し、ICIsとの併用薬剤として有用である可能性が示され

た。本研究課題の目的である、局所エピジェネティック治療を利用した新たな免疫療法の開発においてもエリブリンの併用により効果を高めることができる可能性があり、今後、さらに局所エピジェネティック治療の開発研究を継続していく予定である。

## 参考文献

1. Oba T, Long MD, Keler T, et al. Overcoming primary and acquired resistance to anti-PD-L1 therapy by induction and activation of tumor-residing cDC1s. *Nat Commun.* 2020;11(1):5415.
2. Oba T, Kajihara R, Yokoi T, et al. Neoadjuvant In Situ Immunomodulation Enhances Systemic Antitumor Immunity against Highly Metastatic Tumors. *Cancer Res.* 2021;81(24):6183-95.
3. Oba T, Maeno K, Ono M, et al. Prognostic Nutritional Index Is Superior to Neutrophil-to-lymphocyte Ratio as a Prognostic Marker in Metastatic Breast Cancer Patients Treated With Eribulin. *Anticancer Res.* 2021;41(1):445-52.
4. Miyagawa Y, Yanai A, Yanagawa T, et al. Baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio and c-reactive protein predict efficacy of treatment with bevacizumab plus paclitaxel for locally advanced or metastatic breast cancer. *Oncotarget.* 2020;11(1):86-98.
5. Gattinoni L, Speiser DE, Lichterfeld M, et al. T memory stem cells in health and disease. *Nat Med.* 2017;23(1):18-27.

**Abstract**

Although immune checkpoint inhibitors (ICIs) are available for treatment of triple negative breast cancer (TNBC), their efficacy is limited, and novel therapeutic strategies to enhance the efficacy of ICIs are needed. In this study, we aimed to develop a novel immunotherapy using intratumor injection of epigenetic modulators, which regulate histone modification or DNA methylation. On the other hand, epigenetic modulators are still not available for breast cancer. In clinical practice, ICIs are used in combination with chemotherapeutic agents. Hence, to identify chemotherapeutic agents that can enhance the efficacy of ICIs will lead to the development of more effective treatment for TNBC. We analyzed the effects of microtubule inhibitors, eribulin and paclitaxel, on immune cells in order to identify chemotherapeutic agents that can better influence the immune system of the tumor host as a preliminary step in the development of local epigenetic therapy. Peripheral blood mononuclear cells obtained from healthy human and mouse splenocytes were activated in vitro and simultaneously treated with eribulin and paclitaxel. Cell proliferation and alteration of surface marker expression were analyzed. Cell proliferation was inhibited by paclitaxel, but not by eribulin. Administration of eribulin promoted the proliferation of CD8T cells, among which the CD45RA+CD45RO- cell ratio was increased. Furthermore, in co-culture studies with TNBC cell lines, eribulin enhanced the cytotoxicity of activated T cells. Eribulin may be useful in combination with ICIs, and efficacy of local epigenetic can be also enhanced in combination with eribulin. we will continue to explore the novel therapeutic strategy to TNBC.