

# 内 容 要 旨 目 次

## 主 論 文

**Tumour-infiltrating lymphocytes (TILs)-related genomic signature predicts chemotherapy response in breast cancer**

(原発性乳癌における腫瘍浸潤リンパ球 (TILs) 関連遺伝子マーカーは化学療法の治療効果を予測する)

河内麻里子、岩本高行、新倉直樹、Giampaolo Bianchini、増田しのぶ、溝尾妙子、野上智弘、枝園忠彦、元木崇之、平 成人、徳田 豊、土井原博義、松岡順治、藤原俊義

**Breast Cancer Research and Treatment** (掲載予定)

平成 27 年 12 月 San Antonio Breast Cancer Symposium に発表

平成 28 年 6 月 第 24 回 日本乳癌学会学術総会に発表

## 主 論 文

### Tumour-infiltrating lymphocytes (TILs)-related genomic signature predicts chemotherapy response in breast cancer

(原発性乳癌における腫瘍浸潤リンパ球 (TILs) 関連遺伝子マーカーは化学療法の治療効果を予測する)

#### 【緒言】

ホルモン受容体 (HR) 陽性/ヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2) 陰性乳癌では、癌増殖能と関連した第一世代の多遺伝子アッセイが、予後予測や化学療法の治療効果予測に広く利用されている。近年、これら第一世代の多遺伝子アッセイの有用性が複数の前向きランダム化試験で検討され、いくつかの結果が報告されている。多遺伝子アッセイを用いた予後予測・治療効果予測により、不必要な抗癌剤の使用や副作用を回避するだけでなく、医療経済面における費用対効果についても議論されている他、質調整生存年においても、従来の臨床病理学的因子と比較し、多遺伝子アッセイの有益性が示されている。一方で、HER2 陽性乳癌や HR 陰性乳癌においては、従来の臨床病理学的因子以外に、標準化されかつ臨床的に利用可能な予後予測・治療効果予測因子がないのが現状である。近年いくつかの臨床試験で、HE 染色や免疫染色を用いた腫瘍浸潤リンパ球 (TILs) の形態学的評価が、年齢、リンパ節転移の有無、腫瘍の大きさに関わらず、エストロゲン受容体 (ER) 陰性乳癌やトリプルネガティブ (TN) 乳癌、HER2 陽性乳癌において、予後予測・治療効果予測に有用であることが報告された。最近のメタアナリシスでも、TN 乳癌で TILs の発現が高い症例は有意に予後良好であることが示されている。したがって、形態学的な TILs の評価は、乳癌サブタイプによっては化学療法の治療効果予測や予後予測に有用であることが期待されている。

一方で、形態学的な評価は病理医や施設間での再現性が得られにくく、その確立には課題が多い。手技の標準化を目指した international TILs working group からの推奨(R Salgado et al, *Annals Oncology* 2013)があるが、非常に煩雑で日常臨床に取り入れるには病理医の負担も大きく、課題が多い。

そこで本研究では、再現性・客観性の得られやすい cDNA マイクロアレイを用いた TILs 関連遺伝子マーカー (TILs-GS) を構築し、HE 染色で評価した形態学的な間質および腫瘍内 TILs の発現レベルと TILs-GS の相関を評価し、TILs-GS の化学療法の治療効果予測能および予後予測能について検討した。

#### 【材料と方法】

##### Training data set と TILs-GS

研究包括同意がある原発性乳癌 40 検体からの cDNA マイクロアレイデータとそれに対応するパラフィンブロックを用いた。HE 染色で TILs の発現レベルを low (0%)、intermediate ( $1 \leq$

50%)、high (50% ≤)の3群に層別化し、Leave one out cross validation test で HE-TILs の発現 low と high に関連する 22 遺伝子群を抽出 (Class comparison test  $p < 0.001$ )、これを TILs-GS とした。

### TILs-GS の検証解析

Public data base より 2337 例の原発性乳癌の cDNA マイクロアレイデータを使用し、抽出した TILs-GS の予後予測能、治療効果予測能を、Luminal-low (ER/PgR 陽性、HER2 陰性、低増殖能)、Luminal-high (ER/PgR 陽性、HER2 陰性、高増殖能)、HER2 陽性 (HER2+)、トリプルネガティブ (TN: ER/PgR 陰性、HER2 陰性) の乳癌 4 サブタイプに分類して検証した。

#### **【結果】**

まず、各サブタイプにおける TILs-GS の発現レベルについて検討した結果、TILs-GS は TN および HER2 陽性乳癌において、ER 陽性乳癌よりも有意に高い発現がみられた ( $p < 0.001$ )。

### TILs-GS の予後予測能および治療効果予測能

各サブタイプにおける予後予測能について、全身療法未施行例の dataset を用いて、Kaplan-Meier 法および log-rank test で検討した。Luminal type は増殖能にかかわらず、TILs-GS による予後予測はできなかった。HER2 陽性では、TILs-GS が高い症例は低い症例と比較し有意に予後良好であったが ( $p=0.001$ )、TN では有意差はみられなかった ( $p=0.729$ )。タモキシフェン治療例の dataset では、Luminal type は増殖能に関わらず、予後予測能はみられなかった。

各サブタイプにおける化学療法の治療効果予測能について、アンストラサイクリンおよびタキサンを含む術前化学療法施行例の dataset を用いて検討した。術前化学療法によって pCR (pathological Complete Response) が得られた症例と non-pCR であった症例における TILs-GS の発現レベルをサブタイプごとに比較した結果、Luminal-low を除く、Luminal-high, HER2 陽性、TN の 3 サブタイプでは、pCR が得られた症例において、TILs-GS は有意に高い発現がみられ (Luminal-high:  $p = 0.013$ , HER2 陽性:  $0.005$ , and TN:  $0.016$ )、多変量解析においても TILs-GS は独立した予測因子であった (オッズ比 2.02、95%信頼区間 1.30 - 3.14、 $p=0.025$ )。一方、HER2 陽性乳癌におけるトラスツズマブ併用化学療法治療例の dataset を用いた検討では、pCR/non-pCR 群間で TILs-GS の発現レベルに有意差を認めなかった。

#### **【考察】**

本研究で、遺伝子マーカーが HE-TILs の発現レベルと相関することが示された。Gu-Trantien らは種々の乳癌におけるリンパ球浸潤を検討し、75%が T リンパ球、20%未満が B 細胞、10%未満が単球、5%未満がナチュラルキラー細胞もしくはナチュラルキラー T 細胞であったと報告している。我々が行った HE 染色スライドによる TILs の評価においても、TILs 関連遺伝子は免疫機

能に関連する働きがあり、特に T リンパ球に関連していた (例: ICOS、TCF7、LCK、LCP1)。さらに我々は、HE-TILs の発現レベルが high 群と low 群が異なる遺伝子発現パターンを持つことを示し、より悪性度の高いサブタイプにおいて、TILs-GS の発現レベルも高くなることを示した。同様の結果が、過去の研究でも示されている。しかし、我々はこれらの結果の臨床的意義について検討し、さらに TILs-GS がサブタイプによって化学療法の治療効果とも関連することを発見した。

本研究では、間質および腫瘍内双方の TILs を含んで検討している。International working group の推奨では、間質 TILs の評価を求めているが、一方で近年、術前化学療法の臨床試験からの報告などで、間質・腫瘍内双方の TILs が術前化学療法の治療効果予測や、予後予測に関連しているとの結果も示されている。日常臨床における cDNA マイクロアレイの検体は通常、腫瘍細胞・間質細胞双方を含んでおり、より実用的な予測因子の確立を目指すという点においても、この手法は reasonable なものであると思われる。

TILs-GS の化学療法効果予測能について、過去の文献でも、免疫に関連した遺伝子マーカーが non-luminal subtype における効果予測能を示した報告が複数みられている。Luminal-low type で効果予測因子とならないのは、増殖能の低いサブタイプでは、化学療法そのものの効果が得られにくいことや、術前化学療法後の pCR が治療効果を評価する指標として適切ではない可能性が考えられる。

本研究では、全身治療未施行例での検討で、TILs-GS は HER2 陽性乳癌でのみ予後予測能を示した。既存の報告では、複数の研究で、TN 乳癌における予後予測能が示されている。これらの研究は、化学療法や分子標的治療施行例における予後予測能を検討しており、われわれが用いた全身治療未施行例における予後予測能は不明瞭である。全身治療未施行例の dataset 中には、リンパ節転移のない stage I・II の症例も含まれており、TILs の臨床生物学的意義が早期癌と進行癌では異なっている可能性も考えられる。これらの課題を検討するには、進行癌で全身治療を施行していない症例における前向き研究が必要と思われるが、倫理面などの問題もあり、現実的には困難と考えられる。

本研究の限界として、検証解析に用いた sample size が比較的小さく、予測能の弱い因子については、有意差を検出できていない可能性が挙げられる。また、既存の免疫関連マーカーとの比較検討も今後必要と考えられる。

## 【結論】

TILs-GS は HE 染色で評価した形態学的な間質および腫瘍内 TILs の発現レベルと相関し、特定のサブタイプにおいて化学療法の治療効果予測能を示した。既存の乳癌サブタイプと TILs-GS レベルを層別化するには、さらなる検討が必要である。