

## 최종보고서 [기관고유연구사업]

과제고유번호	1310340	연구분야 (코드)	X02	지원 프로그램	창의과제	공개가능여부 (공개, 비공개)	공개
연구사업명	국립암센터 기관고유연구사업						
연구과제명	유방암 치료 반응 및 예후 지표로서의 면역 표지자 연구						
과제책임자	성명	박인혜	소속	유방내분비연구과	직위	선임연구원	
세부과제	구분	과제명			과제책임자		
	(1세부)	유방암 치료 반응 및 예후 지표로서의 면역 표지자 연구			성명	소속(직위)	전공
	(2세부)				박인혜	유방내분비연구과 (선임연구원/의사)	종양학
	(3세부)						
총연구기간	2013년 1월~ 2015년 12월 (총 3년)	해당단계 참여 연구원 수	총: 7 명 내부: 5 명 외부: 2 명	해당단계 연구개발비	연구비: 30,000 천원 민간: 천원 계: 30,000 천원		
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 9 명 내부: 5 명 외부: 4 명	총연구개발비	연구비: 130,000 천원 민간: 천원 계: 130,000 천원		
연구기간 및 연구비 (단위:천원)	구분	연구기간	계	국립암센터	기업부담금		
	계	2013.1~2015.12	130,000	130,000	소계	현금	현물
	제1차	2013.1~2013.12	50,000	50,000			
	제2차	2014.1~2014.12	50,000	50,000			
	제3차	2015.1~2015.12	30,000	30,000			
참여기업	참여기업명 :						
국제공동연구	상대국명:				상대국 연구기관명:		
위탁연구	연구기관명:				연구책임자:		

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

2015 년 10 월 28 일

과제책임자 : 박인혜 (인)

국립암센터 원장 귀하

< 국문 요약문 >

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 연구의 목적                     <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유방암 환자 종양 조직 내 면역 세포와 환자 예후 관련성 평가</li> <li>- 유방암 환자 혈중 사이토카인과 종양 조직 내 면역 세포와의 상관성 및 예후 관련성 평가</li> <li>- 임상에 적용할 수 있는 예후 관련 면역 지표 선정</li> </ul> </li> <li>● 연구의 내용 1) 유방 조직 내 TIL (CD8+ T cell, FOXP3+ T cell) 의 정도와 tumor cell 에서의 PD-L1 expression 과의 관계를 분석하고 각 subtypes 에 따른 차이를 보았음. 2) 환자의 clinical outcomes 과 TIL 및 PD-L1 expression 과의 상관성을 보았음. 3) 같은 환자군에서 말초 혈액 내 여러 가지 cytokine profile을 multiplex &amp; ELISA 의 방법으로 분석하고 환자의 예후와 연관된 혈액 내 cytokine을 선정하였음. 4) 선정된 IL-18 의 종양세포에 대한 기전을 분석하기 위해 여러가지 in vitro analysis를 수행함. 5) IL-18 과 peripheral NK cell function 과의 연관성을 알아보기 위해 전이성 유방암 환자에서 NK cell 의 profiles 및 activity를 분석함. 6) NK cell 의 profiles 과 항암제의 감수성과의 연관성을 분석함.</li> </ul>																
<p>연구개발성과</p>	<p>&lt;정량적 성과<sup>1)</sup>&gt;</p> <table border="1" data-bbox="462 862 1396 1008"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>달성치/목표치<sup>1)</sup></th> <th>달성도(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SCI 논문 편수</td> <td>1/2</td> <td>50%</td> </tr> <tr> <td>IF 합</td> <td>2.107/8</td> <td>26%</td> </tr> <tr> <td>기타 성과</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>&lt;학술대회 발표&gt;                      1) SABCS 2014, 2014.12, Decreased functions of natural killer cells in peripheral blood of advanced triple negative breast cancer patients.</p> <p>&lt;논문&gt;                      1) Prognostic implications of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in association with PD-L1 expression in early breast cancer. Clinical breast cancer (IF: 2.107),accepted                      2) Decreased functions of natural killer cells in peripheral blood of advanced triple negative breast cancer patients.(In Preparation).                      3) Evaluation of serum IL-18 as a poor prognostic factor in early breast cancer and its association with tumor cells. (In preparation).</p> <p>&lt;정성적 성과&gt;                      -TNBC 환자의 혈액내 NK cell profile 분석법을 구축하여, NK cell의 function 분석과 치료 반응에 따른 면역세포 변화분석 프로토콜을 수립함.</p>					구분	달성치/목표치 <sup>1)</sup>	달성도(%)	SCI 논문 편수	1/2	50%	IF 합	2.107/8	26%	기타 성과		
구분	달성치/목표치 <sup>1)</sup>	달성도(%)															
SCI 논문 편수	1/2	50%															
IF 합	2.107/8	26%															
기타 성과																	
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 유방암 환자에서 조직에서 임상적으로 의미가 있는 면역 지표인 CD8+ TIL 과 PD_L1 expression 정도를 찾아내고 예후를 예측하는 데 활용할 수 있음.</li> <li>2. immune modulating agent 와 같은 면역 치료에 있어 biomarker 로 활용할 수 있으며 candidate patients를 selection 하는 데 활용할 수 있음.</li> <li>3. NK cell 의 function 에 영향을 줄 수 있는 인자로서 tumor origin 의 IL-18 을 찾아냄으로써 새로운 면역치료의 target 으로 활용할 수 있음.</li> </ol>																
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>유방암</p>	<p>조직내 림프구</p>	<p>PD-L1</p>	<p>IL-18</p>	<p>NK cell</p>												

< 영문 요약문 >

<p>Purpose&amp; Contents</p>	<p><b>1-1 Purpose.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- to evaluate the association between clinical prognosis and immune cells in blood or tissue in breast cancer patients</li> <li>- to evaluate the association between clinical prognosis and serum cytokines in breast cancer patients. to evaluate the relationship between serum cytokines and immune cells in breast cancer tissue.</li> <li>- to develop the immune profiles which can be used in clinic as a prognostic factor</li> </ul> <p><b>1-2. contents</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1) analyze the association between the extent of tumor infiltrating lymphocytes (TILs, CD8+ , FOXP3+ T cells) and PD-L1 expression in tumor cells and its differences based on breast cancer subtypes</li> <li>- 2) analyze the association between patient clinical outcomes and TILs with or without PD-L1 expression.</li> <li>- 3) analyze various cytokine profiles in the same population using multiplex ELISA and select specific cytokines which show the relationship with patient prognosis.</li> <li>- 4) From the experiment 3), we found out IL-18 and performed in vitro study to observe the mechanism of IL-18 on tumor cells.</li> <li>- 5) analyze function of NK cells in metastatic breast cancer patient blood sample to see the association of tumor origin IL-18.</li> <li>- 6) investigate the association between functions of NK cells and tumor status.</li> </ul>				
<p>Results</p>	<p>1) SABCS 2014, 2014.12, Decreased functions of natural killer cells in peripheral blood of advanced triple negative breast cancer patients.</p> <p>2) Prognostic implications of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in association with PD-L1 expression in early breast cancer. Clinical breast cancer (IF: 2.107),accepted</p> <p>3) Decreased functions of natural killer cells in peripheral blood of advanced triple negative breast cancer patients. In Preparation.</p> <p>4) Evaluation of serum IL-18 as a poor prognostic factor in early breast cancer and its association with tumor cells. In preparation.</p>				
<p>Expected Contribution</p>	<p>1) Immune profiles including CD8+ TILs and PD_L1 expression can be used in clinic as a prognostic factor in early breast cancer. 2) It can be also used as a biomarker of immune modulating agents such as anti-PD-L1 or PD1 antibodies in breast cancer. 3) tumor origin IL-18 can affect the function of NK cells in metastatic breast cancer and it can be developed as a new therapeutic target.</p>				
<p>keywords</p>	<p>b r e a s t cancer</p>	<p>t u m o r infiltrating lymphocytes</p>	<p>PD-L1</p>	<p>IL-18</p>	<p>NK cells</p>

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	5
2. 국내외 기술개발 현황 .....	6
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	6
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	11
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	12
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	12
7. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	13
8. 참여연구원 현황 .....	13
9. 참고문헌 .....	14

<별첨> 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

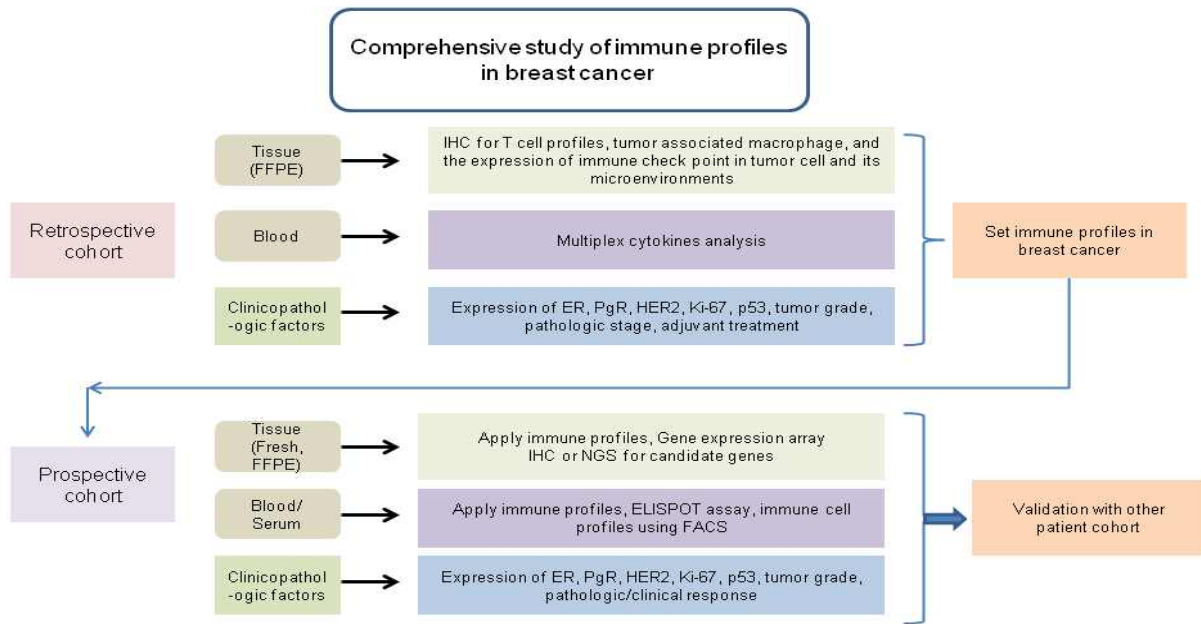
- 유방암 환자 종양 조직 내 면역 세포와 환자 예후 관련성 평가
- 유방암 환자 혈중 싸이토카인과 종양 조직 내 면역 세포와의 상관성 및 환자 예후 관련성 평가
- 임상에 적용할 수 있는 예후 관련 면역 지표 선정

## 1-2. 연구개발의 필요성

- 종양을 둘러싼 미세 환경에서 중요한 요소 중 하나인 면역 세포는 정상적인 면역 반응과는 다른 식으로 종양 세포에 대해 반응하는 것으로 알려져 있음. 면역 반응을 촉진하는 요인과 억제하는 요인들 간의 균형이 깨지고 오히려 종양 세포에 대한 면역 반응이 억제되는 환경이 종양 세포나 그 주변 세포에 의해 형성되는 것으로 알려져 있음 (OJ Finn, N Engl J Med 2008; 358:2704-15).
- 최근 PD-L1, PD1 antibody 를 포함해 많은 종양 면역 관련 약제들이 기존 항암제에 저항성을 보이는 암종에서 그 효과가 큰 것으로 보고가 되어 있으나 유방암종에서는 PD-L1/PD-1 antibody 의 효과가 입증되지 않은 상태임. 유방암에서 어떤 인자를 찾아내고 어떤 환자군에서 이런 약제들의 효력을 기대할 수를 알 수 있는 biomarker 가 현재 없는 상태임.
- 전이성 유방암의 경우 기존의 항암제에 대한 첫 반응은 50~70% 이나 이후 내성이 문제가 되며 결국 약제 내성 및 병의 진행으로 대부분 사망하게 되며 일부의 환자에 있어서는 약제에 대한 독성 문제로 제대로 치료를 받지 못하게 됨으로 이들에 대한 좀 더 효과적이면서 안전한 치료제의 개발은 계속 필요한 상태임.
- breast cancer 에서도 타 암종과 유사하게 종양 조직 내 림프구의 침투 정도가 환자의 임상 예후- 항암제에 대한 반응과 생존 기간-와 연관성이 높음이 입증된 바 있으나 아직까지 유방암종에서 효과적인 면역 치료가 도입되지는 않았음. 하지만 이런 여러 가지 면역 관련 지표들이 유방암 환자에서도 환자 예후와 관련되어 있으며 특히나 삼중 음성 유방암이나 HER2 amplified 유방암에서 이런 경향이 더욱 뚜렷한 것으로 보아 유방암에 특이적인 면역 억제 관련 기전이 있을 수 있으며 이에 대한 연구 및 치료제의 개발이 가능할 수 있겠음.

## 1-3. 연구개발 내용

- 혈액 내 면역 세포 분석을 위한 검체 저장법 수립
- 유방암 환자의 종양 조직에서 면역 세포 검사법 수립
- 종양 은행 검체를 이용한 종양 조직 면역 세포의 예후 관련성 평가
- 종양과 혈액에서 보인 면역 profile 간의 연관성 분석
- 수집된 검체에서 조직과 혈액에 나타나는 immune profile 과 유방암 환자의 생존과의 상관성을 파악함.
- 유방암 환자에서 특이적으로 보이는 면역 특성의 기전을 파악하고 원인 인자를 분석함.



## 2. 국내외 기술개발 현황

- 현재 국내에서 종양 면역학에 대한 관심이 급증하고 있는 상황이나 아직 약제의 개발이나 실질 임상 적용할 수 있는 기술이 개발되지는 않은 현황임.
- 하지만 국내 임상연구자들도 anti-PD-L1/PD-1 antibody 나 CTLA4 antibody 같은 immune modulating agents 에 대한 관심과 임상 경험이 증가되고 있으며 이에 대한 biomarker 연구도 진행되고 있음.
- 특히 국립암센터에서는 자체 autologous T cell therapy 의 기술을 개발하고 이를 적용하는 phase I 임상연구가 활발하게 진행되고 있으며 치료의 안전성에 대한 일차 검증을 마친 상태임.

## 3. 연구수행 내용 및 결과

### ○ 연구 내용 및 결과

- 환자 종양 조직 (N=333) 내에서 PD-L1 expression 과 TIL 과의 관련성을 평가함.(그림1)

가

나

-

- 그림1) 가. correlation between CD8+ TILs and FOXP3+ TILs. 나. relationships between PD-L1 expression in tumor cells and TILs

-

- PD-L1 expression 및 TIL 의 정도와 환자의 임상 특성 및 결과와의 연관성 평가함.
- CD8+ TIL 과 PD-L1 expression 은 negative correlation을 보였으며 CD8+ TIL 의 경우 HR negative subtypes 에 더 dominant 한 것을 할 수 있었음. 반대로 PD-L1 expression 은 HR+ subtypes에서 expression 이 더 강하게 나타났었음. (표1)
- PD-L1 expression, CD8+ TIL, FOXP3+ TIL 중 환자의 예후와 관련된 인자는 CD8+ TIL 이었고 이런 연관성도 HR- BC에서 더 통계적으로 의미있게 나타났음. (그림2)

### Clinical implications of CD8+TILs : overall survival (OS) and recurrence free survival (RFS)

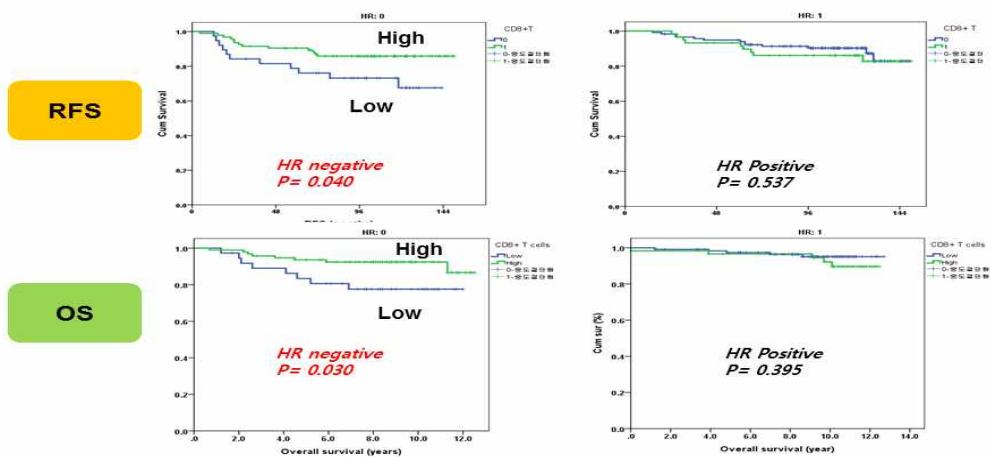
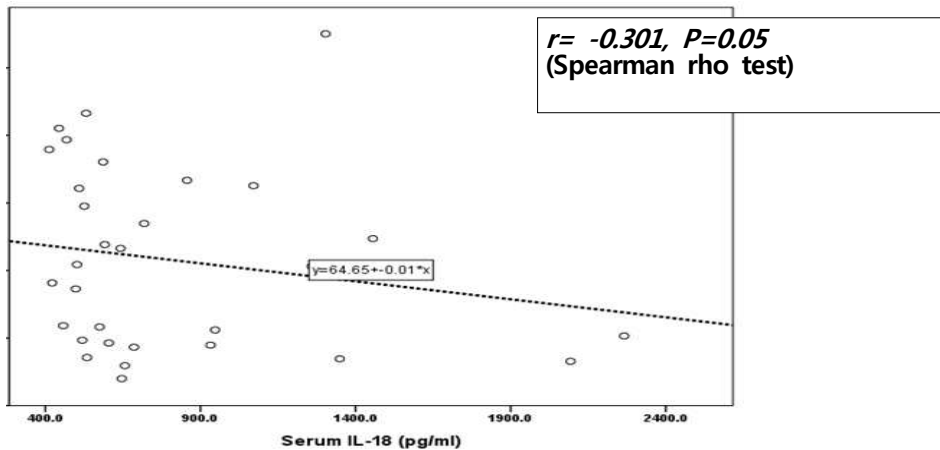


그림2) Clinical implications of CD8+ TILs in terms of overall survival and recurrence free survival in all participants

표1) Clinical characteristics of patients according to TILs and PD-L1 expression

Clinical factors	CD8+ TILs (N=308)		FOXP3+ TILs (N=224)		PD-L1 (N=316)	
	High	Low	High	Low	High	Low
Tumor size	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<2 cm	92 (48.4)	98 (51.6)	75 (49.0)	78 (51.0)	106 (55.5)	85 (44.5)
≥2 cm	61 (51.7)	57 (48.3)	34 (47.9)	37 (52.1)	57 (45.6)	68 (54.4)
	<i>P=0.64</i>		<i>P=0.89</i>		<i>P=0.11</i>	
Nodal involvement						
Negative	100 (51.8)	93 (48.2)	67 (49.3)	69 (50.7)	100 (50.3)	99 (49.7)
Positive	53 (46.1)	62 (53.9)	42 (47.7)	46 (52.3)	63 (53.8)	54 (46.2)
	<i>P=0.35</i>		<i>P=0.89</i>		<i>P=0.56</i>	
Hormone receptor						
Positive	59 (33.5)	117 (66.5)	71 (41.5)	100 (58.5)	119 (67.6)	57 (32.4)
Negative	94 (71.2)	38 (28.8)	38 (71.7)	15 (28.3)	44 (31.4)	96 (68.6)
	<i>P=0.003</i>		<i>P&lt;0.001</i>		<i>P&lt;0.001</i>	
HER2						
Normal	88 (43.6)	114 (56.4)	58 (37.9)	95 (62.1)	118 (56.5)	91 (43.5)
Amplification	63 (61.8)	39 (38.2)	50 (72.5)	19 (27.5)	44 (43.1)	58 (56.9)
	<i>P=0.003</i>		<i>P&lt;0.001</i>		<i>P=0.03</i>	
Ki67 (%)						
<15%	58 (38.1)	94 (61.9)	48 (36.4)	84 (63.6)	90 (58.1)	65 (41.9)
≥15%	95 (62.5)	57 (37.5)	59 (67.0)	29 (33.0)	69 (43.9)	88 (56.1)
	<i>P&lt;0.001</i>		<i>P&lt;0.001</i>		<i>P=0.01</i>	
Age						
≤45 years	89 (51.4)	84 (48.6)	57 (45.6)	68 (54.4)	89 (50.0)	89 (50.0)
>45 years	64 (47.4)	71 (52.6)	52 (52.5)	47 (47.5)	74 (53.6)	64 (46.4)
	<i>P=0.49</i>		<i>P=0.36</i>		<i>P=0.67</i>	

- 같은 환자의 혈액 내 IL-18 의 농도와 조직 내 TIL 과의 연관성을 봄
- serum IL-18 과 CD8+TIL 은 negative correlation을 보임.



- Serum IL-18 level 은 환자의 recurrence 와 cancer death를 예측할 수 있는 prognostic marker 로 의미를 가짐 (그림 3).



### Association between serum IL-18 and survival in early breast cancer

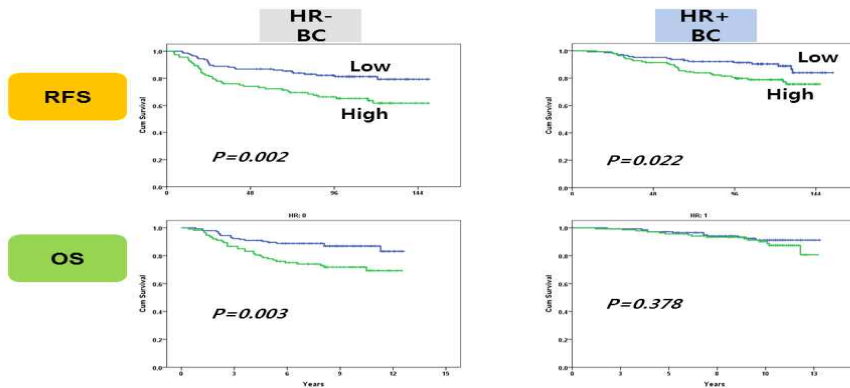


그림 3. 혈장내 IL-18 의 농도와 조기 유방암 환자에서의 생존간의 상관성

- breast cancer cell lines에서 IL-18 의 발현 여부를 western blot과 PCR을 통해 분석하였음 (그림 4)

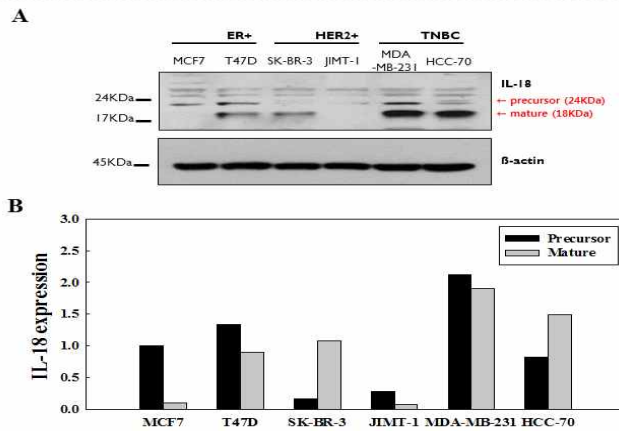
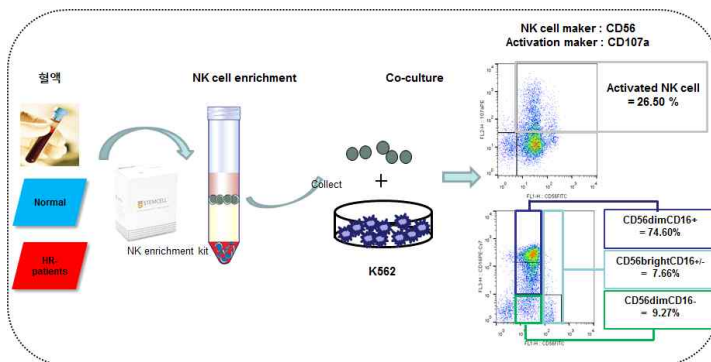
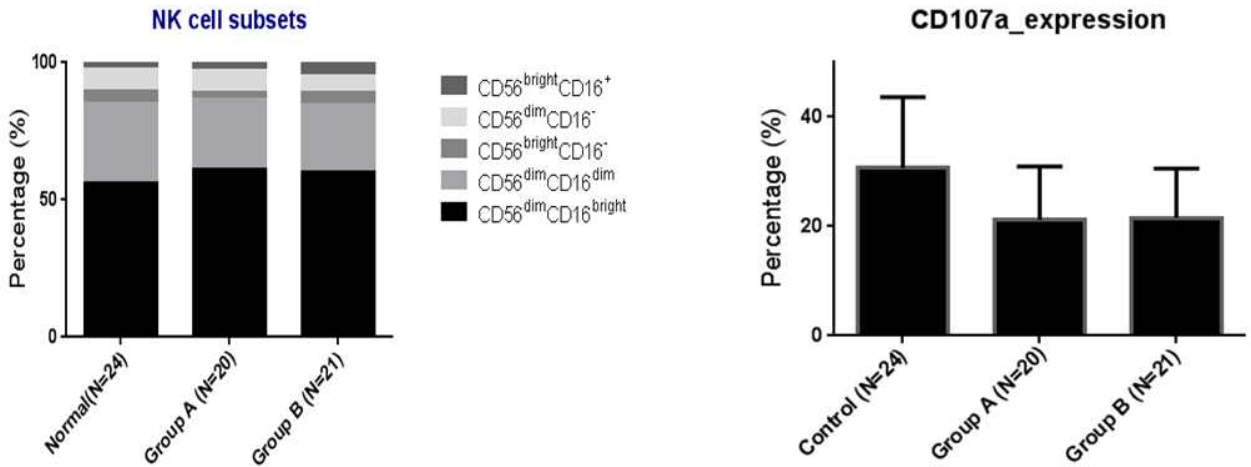


그림 4. 유방암 cell line에서 IL-18 의 발현정도를 western blot (A) 과 PCR (B) 로 분석함.



- 종양세포에서 분비되는 IL-18 의 NK cell 에 대한 영향을 분석하기 위해 전이성 유방암 환자에서의 말초 혈액 내 NK cell profile을 분석하고 그 activation 정도를 봄.  
 - 정상인에 비해 전이성 유방암 환자에서 CD56brightCD16+ NK cell proportion 이 높아지는 반면 CD56dimCD16+ NK cell proportion 은 낮아지는 것을 알 수 있었음. 그리고 NK cell activation 정도도 낮아지는 것을 볼 수 있음 (그림 5).



- 그림 5. 정상인 (normal group) 에 비해 전이성 유방암 환자 group A 와 group B에서 NK cell 의 profiles 중 CD56 bright CD16+ 의 비율이 증가되며 CD56dim CD16+ 의 비율은 상대적으로 감소함을 볼 수 있음. 107A expression 으로 본 NK cell activity analysis 에서는 control 에 비해 전이성 유방암 환자 group A 와 group B에서 상대적 활성도가 낮음을 볼 수 있음.
- 
- tumor origin IL-18 의 NK cell 의 분화 및 function 에 미치는 영향을 분석하기 위해 tumor cell 에 si-IL18을 처리하고 tumor cell 과의 co-culture를 시행하였으며 결과는 리포트 예정임.

### NK function analysis

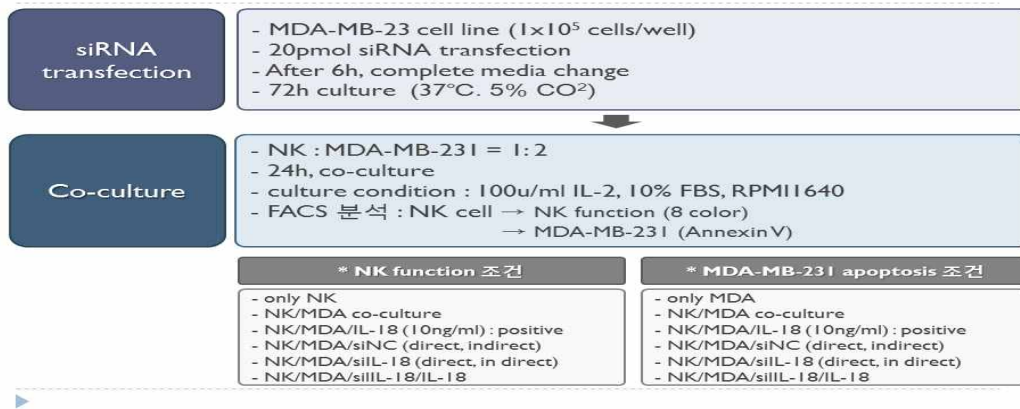


그림 6. Tumor origin IL-18 의 NK cell 의 분화 및 기능에 미치는 영향 분석

○ 연구 성과

- 학회 발표 :

- 1) SABCS 2014, 2014.12, Decreased functions of natural killer cells in peripheral blood of advanced triple negative breast cancer patients.
- 2) SABCS 2013, 2013.12 Prognostic implications of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in association with PD-L1 expression, and serum cytokine levels in early breast cancer
- 3) 40th Annual meeting of Korean Cancer Association, 2014. Prognostic implications of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) in association with PD-L1 expression, and serum IL-18 levels in early breast cancer

- 논문 발표 : 항목 7 참조

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

구분	세부연구목표	평가의 착안점 및 척도	달성도	기여도
1차년도 (2013~ )	임상 자료 검토 및 검체 수집	- 기 보관된 종양 은행 검체의 임상 자료 검토 후 필요 검체 선정 - 검체 수집을 위한 흐름도 확립 - 검체 수집 - 임상 양상 및 예후 관련 자료 수집	100%	실험을 위한 기술적인 문제를 해결하고 흐름을 확립함
	혈액 내 면역 세포 분석을 위한 검체 저장법 수립	- 보관 조건 비교를 통해 향후 면역 세포 검사를 위한 최적의 저장법 수립 - 혈중 면역 세포 분포 확인을 위한 다중 염색 유세포 분석법 수립	100%	
	유방암 환자의 종양 조직과 혈액 내에서의 면역 세포 및 사이토카인 검사법 수립	- 최소량 검체를 이용한 면역 세포 검사를 위해 다중 면역염색법 수립 - 파라핀 고정 조직의 면역 염색 최적화를 위해 기관 내에서 개발된 디바이스의 응용 - 신선 종양 조직의 면역 세포 검사법 수립 - 신선 종양 조직의 유전자 발현 분석 - 혈액과 종양 조직 면역 세포와 관련성 높은 사이토카인 측정	80%	
	종양 은행 검체를 이용한 종양 조직 면역 세포의 예후 관련성 평가	- 분석된 지표들의 상호 상관성 평가 - 분석된 지표들의 치료 반응 예측 및 예후 평가 지표로서의 역할 검증	100%	
2차년도 (2014~ )	종양과 혈액에서 보인 면역 profile 의 연관성 분석	- 후향적으로 수집된 검체에서 조직에 침윤된 면역 세포 (CD8+ T cell, FOXP3+ T cells) 와 혈액에 나타나는 사이토카인 profile 들 간의 연관성을 분석함.	100%	serum 내 IL-18 과 TIL, P D - L 1 expression 과

		- 조직에 침윤된 면역 세포의 분포와 PD-L1 발현과의 상관성 봄		의 상관성에 대한 결과 획득
	후향적으로 수집된 검체에서 조직과 혈액에 나타나는 immune profile 과 유방암 환자의 생존과의 상관성을 파악함.	- 분석된 immune profile 의 임상적 의미를 후향적 환자집단에서는 전체 생존기관과의 연관성 연구 - 유방암의 아형별로 immune profile 의 차이를 파악 - Ki-67, tumor grade, p53 expression 등의 여러 가지 marker 와 immune profile 과의 상관성을 봄	100%	유 방 암 의 subtypes 에 따른 면역 지표의 차이를 파악하고 위의 결과를 모아 논문 작성함.
3차년도 (2015~ )	T N B C 에 서 disease status 와 NK cell function간의 상관성을 탐색하고 NK cell의 function을 조절 함 으 로 써 disease control 이 가능할 수 있는 인자의 발굴	TNBC 환자의 혈액 샘플에서 NK cell 분리 후 NK cell profile 및 function 분석 Disease status 및 치료 반응에 따른 NK cell의 profile 및 function의 변화 분석 MDA-MB-231 cell line을 이용하여 tumor origin의 IL-18의 여부를 확인함 IL-18BP 및 anti-PD1을 처리한 후에 변화되는 NK cell profile 및 function 확인 IL-18BP 및 anti-PD1 처리한 후의 NK cell과 co-culture한 MDA-MB-231의 proliferation/apoptosis 및 paclitaxel response의 변화를 봄	70%	tumor origin IL-18 의 기능을 분석하고 IL-18 과 연관된 환자 혈액 내 NK cell proportion 과 function을 분석함.
	연구 결과 정리 및 발표	논문 작성	33%	

## 5. 연구결과의 활용계획

- 1) TNBC 환자의 혈액내 NK cell profile 분석법을 구축하여, NK cell의 function 분석과 치료 반응에 따른 면역세포 변화분석을 가능하게 함. 향후 NK cell function 분석법을 기반으로 한 각 subgroup별 유방암 환자의 보다 정밀한 치료 반응 평가 수행의 기반을 마련함.
- 2) 본 연구를 수행하며 축적된 경험을 토대로 면역 세포를 이용한 표지자 연구에서 본원이 선도적 역할을 할 수 있을 것으로 기대됨.
- 3) 향후 tumor origin IL-18 의 NK cell에 대한 영향을 종양 세포의 증식 및 항암 저항성의 관점에서 분석하고 이의 기전을 분석할 필요가 있음.
- 4) 이를 면역 세포 치료의 보조적인 치료로 응용 활용 할 가능성을 타진할 계획임.

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

- Melanoma 의 조직에서 보았을 때 CD8+ TIL 과 종양 조직에서의 PD-L1 발현 간에는 양의 상관 관계에 있음.
- PD-L1 의 발현정도가 anti-PD-L1/anti-PD1 antibody 효과의 biomarker 인지의 여부에 대해서는 아직 논란이 있음.
- 종양 조직의 mutation burden 의 정도가 anti-PD-L1/PD-1 antibody 의 효과를 예측할 수 있는 biomarker 일 수 있음.
- immune modulating agent 의 개발로 기존의 면역 치료에 이런 약제를 더하는 병합요법에 대한 연구가 진행되고 있음.

## 7. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Prognostic Implications of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Association With Programmed Death Ligand 1 Expression in Early-Stage Breast Cancer	국립암센터	1저자	Clinical breast cancer	2.107	2015	단독	SCIE

## 8. 참여연구원 현황

번호	소속기관명	직위	생년월일	전공 및 학위		연구담당 분야
	성명	과학 기술인등록 번호	성별	취득 년도	학위 (전공)	과제참여 기간
	유방내분비암연구과 박인혜					

## 9. 참고문헌

1. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumor-host interface. *Nature* 2001;411(6835):375-379.
2. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 2006;6(1):24-37.
3. Disis ML. Immune regulation of cancer. *J Clin Oncol* 2010;28(29):4531-4538.
4. Loi S, Sirtaine N, Piette F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG02-98. *J Clin Oncol* 2013;31(7):860-867.
5. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T cells, recurrence and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003;348(3):203-213.
6. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313(5795):1960-1964.
7. Bates GJ, Fox SB, Han C, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol* 2006;24(34): 5373-5380.
8. Seo AN, Lee HJ, Kim EJ, et al. Tumor infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. *Br J Cancer* 2013;109(10):2705-2713.
9. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12439 patients. *Ann Oncol* 2014; 25:1536-1543.
10. Demaria S, Volm MD, Shapiro RL, et al. Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2001;7(10): 3025-3030.
11. Denkert C, Loibl S, Noske A, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010;28(1):105-113.

<별첨작성 양식>

[별첨]

## 자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	1310340		
사업구분	기관고유연구사업				
연구분야	X02			과제구분	단위
사업명	기관고유연구사업				주관
총괄과제	유방암 치료 반응 및 예후 지표로서의 면역 표지자 연구			총괄책임자	박인혜
과제명	유방암 치료 반응 및 예후 지표로서의 면역 표지자 연구			과제유형	(응용)
연구기관	국립암센터			연구책임자	박인혜
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	연구비	민간	계
	1차년도	2013.1-2013.12	50,000		50,000
	2차년도	2014.1-2014.12	50,000		50,000
	3차년도	2015.1-2015.12	30,000		30,000
	계	3년	130,000		130,000
참여기업					
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2015/10/28

3. 평가자(과제책임자) :

소속	직위	성명
유방내분비연구과	의사/선임연구원	박인혜

4. 평가자(과제책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	
-----	--

## I. 연구개발실적

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구에서 본 TILs 과 PD-L1 발현과의 상관관계는 아직 논란이 많은 상태이나 CD8+ TIL 의 예후 관련성에 있어서는 이전의 결과와 동일하게 확인되었음.
- TIL 의 종양 조직으로의 homing 에 관여하는 여러 가지 사이토카인을 말초혈액에서도 정량 분석한 후 TIL 과의 상관성을 보았으며 이중 IL-18 의 농도가 높아질수록 CD8+ TIL 이 감소하는 경향이 있음을 봄.
- 종양 유래 IL-18을 역기능을 유방암 환자에서 확인하였으며 NK cell 의 분화 및 기능에 미치는 영향을 보려고 하는 연구는 거의 없었음.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 종양 유래 IL-18 의 tumor progression 을 촉진하는 기전을 밝힘으로써 이런 IL-18 을 차단하는 새로운 치료의 방법을 고려해 볼 수 있겠음.
- 전이성 유방암, 특히 삼중음성 유방암에서 NK cell 의 기능 저하와 이와 연관된 임상 결과를 파악함으로써 NK cell 의 기능을 증강시키는 기전의 개발이 유방암에서 고려될 수 있는 하나의 치료 방법이 될 수 있는 가능성을 보여줌

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 전이성 유방암에서 면역치료의 타겟과 가능성을 보여준 결과들이라고 할 수 있으며 향후 새로운 치료제 개발에 근거 자료로 활용할 수 있겠음.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구를 위해 공동 연구자들과의 협력을 공고히 하였으며 이를 위해 매주 연구 미팅을 하며 결과를 검토하고 다음 실험 계획을 세웠으며 cloud system 을 이용하여 자료를 공유하였음.

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)



계획된 논문 수 (2편) 과 IF (8) 에 현재까지 33% 달성한 상태이며 2편의 논문을 더 준비하고 있음.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
임상 자료 검토 및 검체 수집	10	10	목표수의 임상자료 및 검체를 수집함.
혈액 내 면역 세포(NK cell, T cell) 분석을 위한 검체 저장법 수립	10	10	환자의 혈액에서 NK cell 과 T cell을 분리하고 보관 저장하는 방법 확립
유방암 환자의 종양 조직과 혈액 내에서의 면역 세포 (CD8+ T cell, FOXP3+ T cell) 및 사이토카인 (IL10, IL-18, IL-12, TGF-b, IFN-g, 등) 검사법 수립	10	10	FFPE 조직에서 IHC의 방법으로 CD8+ T cell, FOXP3+ T cell 과 PD_L1 발현을 확인함 말초혈액에서 multiplex 기법 및 ELISA를 이용하여 여러 가지 사이토카인을 정량적 측정을 함.
종양 은행 검체를 이용한 종양 조직 면역 세포(CD8+ T cell, FOXP3+ T cell)와 환자의 임상 예후(overall survival, recurrence)와의 관련성 평가	10	10	TILs 과 PD_L1 발현과의 관계를 유방암 subtypes 에 따라 나누어 보았으며 이를 임상결과와 연관하여 분석함. --> 논문 발간
종양 조직내에서 보이는 TIL 의 profile 과 혈액에서 보인 사이토카인과의 연관성 분석	10	10	종양 조직 내의 TILs profile 과 혈중 사이토카인과의 상관성을 보았으며 이중 IL-18 이 CD8+ TIL 과 통계적 유의성은 없으나 음의 상관성을 보이는 경향을 발견함.
종양 조직과 혈액에 나타나는 TILs 및 사이토카인 profile 과 유방암 환자의 생존과의 상관성을 파악함.	10	10	CD8+ T cell, FOXP3+ T cell 과 PD_L1 발현 및 혈중 IL-18 레벨이 유방암 환자의 예후와 관련됨을 확인함.
TNBC에서 disease status와 NK cell function간의 상관성을 탐색	10	8	TNBC 환자에서 말초혈액 내 NK cell 의 profile 이 정상과 다름을 확인하고 그 기능도 감소되어 있음을 확인함. 아직 통계적인 power를 가질 정도의 sample 수집이 되지 않아 향후 sample 수집 및 분석이 더 필요함.
종양 유래 IL-18 의 기전과 NK 의 분화 및 기능에 미치는 영향 분석	15	4	종양 유래 IL-18 의 기능은 기존에 알려진 IL-18 의 기능과는 다를 것으로 보여 여러 가지 cell line 에서의 IL-18 발현 여부와 NK cell 과의 co-culture를 통해 NK cell 의 분화 및 기능에 미치는 영향을 분석함.
연구 결과 정리 및 논문 작성	15	5	1편의 논문을 발표하였으며 현재 2편의 논문을 준비 중임.
합계	100점	77 점	

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구결과를 통해 유방암에 있어 TIL, cytokine 같은 면역지표들이 다른 암종과 유사하게 환자의 예후에 중요하게 작용함을 확인할 수 있었으며 특히 본 연구에서 밝혀진 종양 유래 IL-18의 예후인자로서의 역할이나 이에 의한 NK cell의 기능 저하 및 분화의 장애등은 향후 종양 면역 치료에 중요한 타겟이 될 수 있을 것으로 생각됨.

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

첫 1년간 조직을 수집하는 과정에서 약간의 지체가 있었으며 연구가 진행되면서 유사한 결과들이 발표되어 연구의 창의성과 기여도에서 다소 평가가 감소될 수 있으나 국내 유방암 환자를 대상으로 한 첫 연구로 가치를 인정받을 수 있겠음.

#### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

연구결과를 바탕으로 NK cell의 기능 중 ADCC와 관련하여 종양에서의 NK cell의 기능변이와 유방암 치료 효과에 대해 연구를 전개할 계획임  
최종 결과들을 정리하여 2편의 논문을 마무리하고 발표할 계획임.