

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：32644

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22856

研究課題名(和文) Functional analysis of alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding (ZAG) on host immune response in breast cancer microenvironment.

研究課題名(英文) Functional analysis of alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding (ZAG) on host immune response in breast cancer microenvironment.

研究代表者

花村 徹 (Hanamura, Toru)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：00532053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌臨床検体についてAlpha-2-glycoprotein 1;ZAG発現と乳癌の免疫学的状態との関連を解析し、ZAG発現はマクロファージの腫瘍内浸潤および、このM1分化マーカーであるCD86発現と逆相関することを発見した。マクロファージモデル細胞株THP-1を用いたM1/M2分化モデル系において、ZAGはTHP-1の分化に影響を与えなかったが、ヒト末梢血単核球(PBMC)より単離した単球由来マクロファージを用いたM1/M2分化モデル系においてZAGはM1分化マーカーであるCD80の発現をわずかに低下させることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害剤が臨床応用された昨今において、は腫瘍微小環境における免疫制御機構をを明らかにすることは新規治療標的の創出や既存の免疫療法の効果的な利用につながる。本研究の結果からAlpha-2-glycoprotein 1; ZAGはマクロファージをはじめとする免疫細胞に働きかけ、乳癌組織における腫瘍免疫を何らかの形で制御している可能性が示唆される。ZAGの免疫系に対する作用の詳細がさらに明らかになれば、腫瘍免疫を応用した治療に対する効果予測マーカーとしての開発やZAGを標的とした治療開発が期待できる。

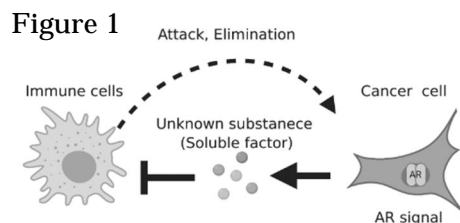
研究成果の概要(英文)：The association between Alpha-2-glycoprotein 1; ZAG expression and the immunological status of breast cancer were analyzed in clinical specimens. We found that ZAG expression was inversely associated with macrophage infiltration into the tumor microenvironment and expression of M1 differentiation marker, CD86. In the M1 / M2 differentiation model system using the macrophage model cell line, THP-1, ZAG did not affect the differentiation of THP-1, but ZAG slightly reduced the expression of a M1 differentiation marker, CD80 in macrophage derived from human peripheral blood.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：乳癌 腫瘍免疫 アンドロゲンレセプター Alpha-2-glycoprotein 1; マクロファージ

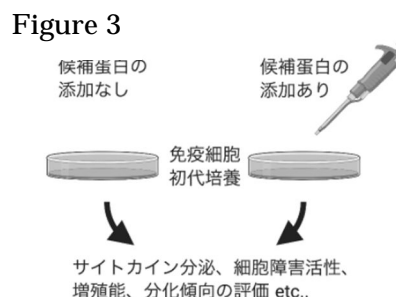
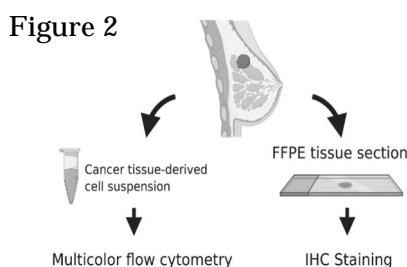
1. 研究開始当初の背景

近年腫瘍免疫学はその治療的側面から癌種を問わず注目されている。乳癌は免疫原性が低く、免疫チェックポイント阻害剤の有効性が低いことが知られているが、乳癌特有の腫瘍免疫制御機構が明らかになれば、新規治療標的の創出、既存の薬剤の効果的利用が期待できる。アンドロゲン受容体(AR)シグナルには各種癌において免疫抑制的な働きがあることが示唆されているがその作用メカニズムはわかっていない。我々は何らかのAR依存性可溶性蛋白が腫瘍免疫制御作用を持つものと推測し、探索を行ってきた(Fig.1)。これまでにAR依存性可溶性蛋白であるAlpha-2-glycoprotein 1;ZAG(AZGP1)に着目し解析を行い、乳癌コホートの遺伝子発現データの解析からAZGP1発現が乳癌微小環境の免疫抑制的フェノタイプと強く相関することを見出し、さらに詳しい解析を行うこととした。



2. 研究の目的

- (1) 乳癌臨床検体を用いZAG発現と腫瘍微小環境における免疫学的フェノタイプとの相関を蛋白レベルで検証し、ZAGの一次標的となる免疫細胞を同定する(Fig.2)。
- (2) ZAGの一次標的となる免疫細胞に相当するモデルを用い、免疫細胞に対するZAGの作用およびその分子メカニズムを解析する(Fig.3)。



3. 研究の方法

- (1) **乳癌微小環境における免疫学的フェノタイプとAR/ZAGの相関解析**：乳癌臨床検体45例についてマルチカラーフローサイトメトリー(FCM)により腫瘍浸潤白血球数、及びこれに占める各種免疫細胞分画の割合を系統的に評価、同様の検体についてAR及びZAG発現を免疫染色法にて定量し、両者の相関解析を行った。
- (2) **ヒト抹消血単核細胞由来Macrophage分化誘導系におけるRecombinant ZAGの作用の解析**：上記の解析結果(後述)からZAGの一次標的としてMacrophageを想定し下記の解析を行った。健常女性より採取した抹消血単核細胞(PBMC)から磁気ビーズ法により単球成分を単離精製、Macrophageに分化させたのちM1及びM2分化モデル系を構築した。続いてRecombinant ZAGの有無によりMacrophageの分化傾向に差異を生じるかどうか蛋白レベルで検証した。

4. 研究成果

- (1) 乳がん臨床検体のFCMによる免疫細胞分画の評価では腫瘍1g中の白血球数及びこれに占める各種免疫細胞分画の割合は概ね既報と矛盾のない結果であった。またARとZAGの発現は互いに強く正相関し(Fig.4)両者は各種臨床病理学的因子と一定の相関関係を示した。またAR発現はNK細胞、NKT細胞の割合と正の相関を示し、ZAG発現はMonocyte(Macrophage様細胞を含む)MDSCとの割合と逆相関を示した(Table1,2)。さらにZAG発現は腫瘍内MacrophageにおけるM1分化マーカーであるCD86の発現と逆相関した(Fig.5)。上記の知見からZAGはMacrophage分化に対し何らかの作用を持つものと考え、In-vitroモデルの解析により、ZAGの免疫応答に対する作用(主にMacrophageに対する作用)を検証することを目標とし、解析を行った。

Figure 4

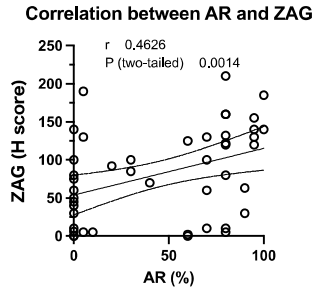


Table 1. Summary of correlation coefficient between AR(%) and immune cell composition (count / g)

	Spearman r	95% confidence interval	p-value
Luekocyte	-0.3467	-0.5870 to -0.05029	0.020*
Total T	-0.218	-0.4876 to 0.08962	0.150
CD4 + T	-0.2354	-0.5015 to 0.07137	0.120
CD8 + T	-0.1543	-0.4357 to 0.1546	0.312
B	-0.1605	-0.4409 to 0.1483	0.292
Mo / Mφ	-0.3805	-0.6119 to -0.08903	0.010*
CD16+ Mo	-0.3028	-0.5538 to -0.001177	0.043*
MDSC	-0.368	-0.6028 to -0.07464	0.013*
DC	-0.4512	-0.6627 to -0.1731	0.002*
mDC	-0.3806	-0.6120 to -0.08910	0.010*
minor NK	-0.2393	-0.5046 to 0.06722	0.113
NK	-0.004357	-0.3056 to 0.2977	0.977
NKT	-0.2389	-0.5042 to 0.06769	0.114

Figure 5

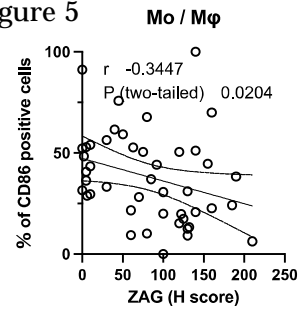
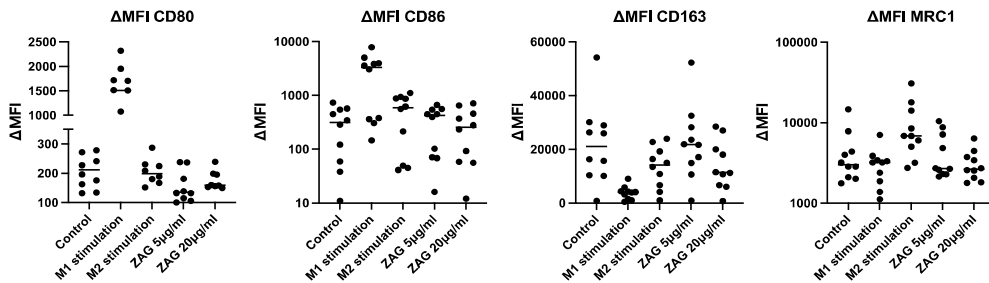


Table 2. Summary of correlation coefficient between ZAG (H score) and immune cell composition (count / g)

	Spearman r	95% confidence interval	p-value
Luekocyte	-0.1401	-0.4238 to 0.1688	0.359
Total T	-0.04952	-0.3460 to 0.2560	0.747
CD4 + T	-0.02987	-0.3286 to 0.2743	0.846
CD8 + T	0.01042	-0.2922 to 0.3111	0.946
B	0.03132	-0.2729 to 0.3299	0.839
Mo / Mφ	-0.366	-0.6013 to -0.07233	0.013*
CD16+ Mo	-0.2586	-0.5197 to 0.04674	0.086
MDSC	-0.3824	-0.6133 to -0.09124	0.010*
DC	-0.197	-0.4707 to 0.1113	0.195
mDC	-0.2531	-0.5154 to 0.05263	0.094
minor NK	-0.06802	-0.3623 to 0.2386	0.657
NK	0.1536	-0.1553 to 0.4351	0.314
NKT	-0.05704	-0.3527 to 0.2489	0.710

- (2) PBMC 由来 Macrophage 分化誘導系におけるリコンビナンと ZAG の採用の解析では、M1 刺激時の各マーカーの変化率が大きいため、多群間比較では統計学的有意差はないが、ZAG 5 μg/ml 添加は Macrophage における M1 マーカーである CD80 発現を低下させる傾向が認められた (Control との 2 群間比較では統計学的に有意に低下)。一方、乳癌臨床検体で ZAG と負の相関が認められた CD86 については本実験系では現時点で有意な変化を認めていない。(Fig. 6)

Figure 6



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 花村 徹
2. 発表標題 乳癌組織における免疫細胞組成と臨床病理学的因子の関連に関する探索的解析
3. 学会等名 第29回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toru Hanamura
2. 発表標題 Systematic analysis of immune cell composition revealed immunological profile of breast cancer microenvironment represented by histologically assessed tumor-infiltrating lymphocyte and PD-L1 expression
3. 学会等名 2021 San Antonio Breast Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 花村 徹
2. 発表標題 Alpha-2-Glycoprotein 1, Zinc Binding; アンドロゲン受容体シグナルによる腫瘍免疫制御機構の可能性
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------