

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22961

研究課題名（和文）がん微小環境におけるムチン発現と免疫細胞浸潤様式の関連性についての包括的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of mucin expression and immune infiltrates in human cancer.

研究代表者

芝 聡美（Shiba, Satomi）

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：70721603

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）：多重免疫染色によるイメージサイトメトリー解析技術を駆使して、糖尿病合併乳癌25例とpropensity scoreでmatchさせた糖尿病非合併乳癌25例の切除標本中のムチンの発現パターンと腫瘍浸潤免疫細胞を検討した。糖尿病の合併は、各ムチン発現の様式に顕著な差をもたらさなかったが、浸潤するM2マクロファージの割合を増加させ、CD8陽性Tリンパ球の割合を低下させて、免疫学的微小環境に変化を与えることで乳癌の病態や患者予後に影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌は年々罹患数が増加しており、女性癌罹患率の1位を占めている。糖尿病は乳癌発症のリスク因子であるとともに乳癌の予後不良因子であることが報告されている。本研究結果は、糖尿病ががん微小環境を腫瘍許容的環境に変化させることを示唆しており、糖尿病合併乳癌の治療を考える上で重要な知見が得られたと考えられる。この方法論を駆使し、より多くのサンプルを用いて乳癌の免疫学的微小環境の包括的解析を行い、新規バイオマーカーの探索や治療法の開発につなげたい。

研究成果の概要（英文）：Using image cytometric analysis technology by multiple immunostaining, we investigated the expression pattern of various Mucin and tumor-infiltrating immune cells in resected specimens of 25 breast cancers without diabetes and 25 breast cancers without diabetes matched by probability score. The complications of diabetes did not result in significant differences in the mode of expression of each Mucin, but increased the proportion of infiltrating M2 macrophages and decreased the proportion of CD8-positive T lymphocytes, resulting in changes in the immunological microenvironment. It was suggested that diabetes may affect the pathophysiology of breast cancer and the prognosis of patients.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：ムチン 腫瘍浸潤リンパ球 乳癌 多重免疫染色 固形腫瘍 腫瘍関連マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

日本人女性の乳癌の年齢調整罹患率は、年次推移をみると増加傾向が続いており、日本人女性の罹患率 1 位を占めている。年齢調整死亡率においては増加傾向から近年横ばいに転じたところである。欧米諸国においては、罹患率および死亡率も減少傾向にあり、乳癌の罹患および予後改善が日本において望まれる。消化管や乳腺などの腺上皮細胞が分泌する粘液の主成分である”ムチン”は、蛋白骨格に多数の糖側鎖が付いた分子量 40 万以上の巨大分子で、内腔面の潤滑や水分保持、病原菌からの保護作用を担っている。ムチンは”MUC”と総称され、MUC1 などの膜結合型ムチンと MUC2, MUC5AC などの分泌型ムチンに分類される。近年の研究で、癌微小環境におけるムチンの質的・量的変化が、様々な癌腫の悪性度や薬剤抵抗性と密接な関係を持つことが解ってきた。一方、近年のがん免疫療法の進歩に伴い、がん微小環境内に浸潤した免疫細胞の動態が治療に対する反応性、特に免疫チェックポイント(IC)阻害療法の奏効を規定する重要な因子であることが解ってきた。しかし、がん組織におけるムチンの発現様式と免疫細胞の浸潤様式の関連性については十分には検討されていない。2 型糖尿病(DM)は、さまざまな癌の発症リスクを高めることがよく知られており、乳癌などの予後不良因子といわれている。現在、高血糖、インスリン抵抗性、およびインスリンやインスリン様成長因子のレベルの上昇等が、腫瘍形成および腫瘍進行を増強する上で主要な役割を果たすと考えられているが、糖尿病合併乳癌とムチンの発現様式についての報告はない。

2. 研究の目的

近年開発された組織における細胞/分子の定量、局在の解析を可能とする多重免疫染色によるイメージサイトメトリー解析技術を駆使して、ヒト膀胱癌と乳癌におけるムチンの発現パターンとリンパ球、マクロファージ、好中球のフェノタイプと浸潤様式の相関性を明らかにし、ムチン分子群が、がんに対する局所免疫に如何なる影響を与えているか？また、糖尿病合併乳癌におけるムチン発現と免疫学的微小環境の関連性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

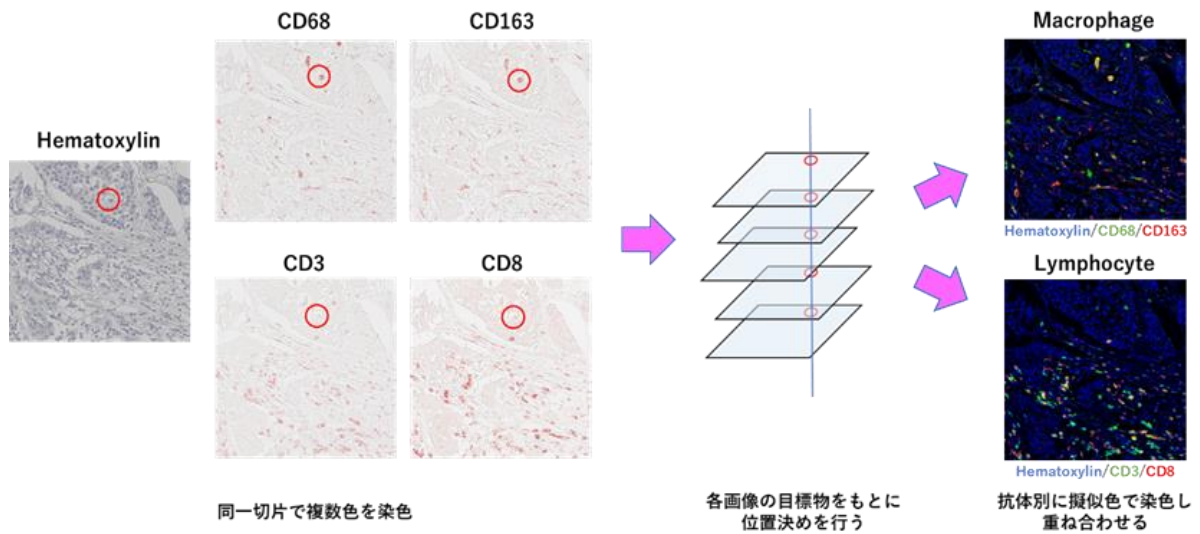
乳癌の切除検体を用いた多重免疫組織化学染色(Multiplex IHC)

当科にて過去に切除した糖尿病合併乳癌 25 例と propensity score で match させた糖尿病非合併症例 25 例の計 50 例のホルマリン固定組織切片を作製し、MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6 に焦点を絞り、免疫染色を施行し、腫瘍細胞における発現を検討した。また、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を CD3(clone: SP7, Thermo Fisher Scientific, USA)と CD8 α (clone: 1G2B10, Protein Tech, 日本)、腫瘍関連マクロファージ(TAM)は CD68(clone: KP1, abcam, USA)と CD163(clone: OTI2G12, abcam, USA)に対するモノクローナル抗体を使用して染色した。

染色後の画像処理

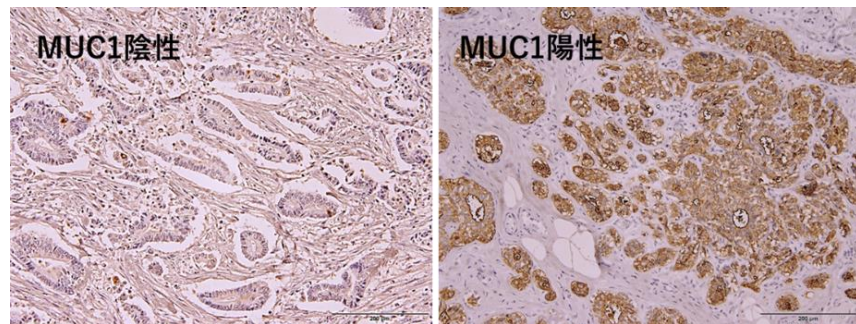
GPLv2(General Public License バージョン 2.0)で利用可能な CellProfiler バージョン 2.1.1 パイプライン「Alignment_Batch.cppipe」を使用して、単一細胞ごとに重なるように、画像をデジタル化した。細胞は抗体ごとに疑似カラーで視覚化し、ImageJ Fiji(National Institutes of Health, MD)によって重ね合わせた。乳癌組織に浸潤した免疫細胞数の評価は、癌先進部の間質で行った。無作為に選択された 3 領域(1 領域:1.0 \times 1.0mm²)で陽性細胞数の平均とした。CD3 陽性 T リンパ球または CD68 陽性マクロファージは単一染色画像でカウントし、CD3 陽性 CD8 陽性 T リンパ球または CD68 陽性 CD163 陽性マクロファ

ージは二重染色画像でカウントした。

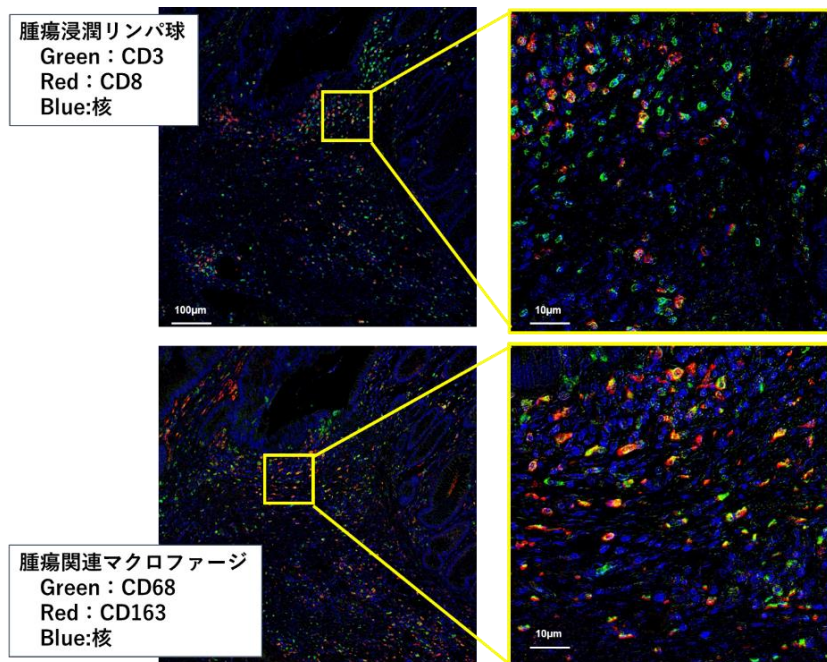


4. 研究成果

糖尿病合併乳癌と非合併乳癌の予後には明らかな差は認めなかった。また、各ムチン発現の様式に関しても糖尿病の有無による顕著な差を認めなかった。



しかし、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、腫瘍関連マクロファージ(TAM)に若干の変化が認められた。CD3(+) および TILCD8(+) 陽性リンパ球数は2群間に有意差は認めなかったが、CD3(+)TIL におけるCD8(+)TIL の割合は、糖尿病合併例で有意に低値を示した。また、CD68(+)TAM の総数は、糖尿病合併群は非合併群と比較して有意な差は認めなかった



が、CD163(+) M2 マクロファージは糖尿病合併群で増加している傾向を示した。また、すべての TAM における M2 マクロファージの割合は、糖尿病合併で有意に高値であった。

まとめ

乳癌の切除検体を用いて、ヒト乳癌細胞におけるムチンの発現、がん微小環境を量的に把握する方法論を確立することができた。糖尿病は乳癌組織に浸潤する M2 マクロファージの割合を増加させ、CD8 陽性 T リンパ球の割合を低下させる傾向があることが示唆された。本研究で確立した方法論を駆使し、より多くの臨床サンプルを用いて乳癌の免疫学的微小環境の包括的解析を行い、新規バイオマーカーの探索や治療法の開発につなげたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 芝 聡美, 原尾 美智子, 丸藤 琴音, 扇原 香澄, 佐々木 裕美子, 西田 紗季, 櫻木 雅子, 水沼 洋文, 北山 丈二, 佐田 尚宏
2. 発表標題 経口糖尿病薬メトホルミン加療歴を有する乳癌患者の特徴
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 芝 聡美, 原尾 美智子, 丸藤 琴音, 扇原 香澄, 佐々木 裕美子, 西田 紗季, 櫻木 雅子, 水沼 洋文, レフォー, アラン, 北山 丈二, 佐田 尚宏
2. 発表標題 術前化学療法施術症例における病理学的治療効果と好中球リンパ球比とKi-67との関連
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原尾 美智子, 丸藤 琴音, 西田 紗季, 佐々木 裕美子, 芝 聡美, 櫻木 雅子, Alan Lefor, 北山 丈二, 佐田 尚宏
2. 発表標題 高齢者乳癌の薬物療法の選択
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原尾 美智子, 丸藤 琴音, 佐々木 裕美子, 西田 紗季, 芝 聡美, 櫻木 雅子, 塩澤 幹雄, 北山 丈二, 佐田 尚宏
2. 発表標題 超高齢者乳癌患者にいかにより適切な治療を選択するか
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 櫻木 雅子, 原尾 美智子, 扇原 香澄, 相良 由佳, 西田 紗季, 芝 聡美, 佐々木 裕美子, 宮崎 千絵子, 大澤 英之, 竹原 めぐみ, 塩澤 幹雄, 水沼 洋文, 北山 丈二, 佐田 尚宏
2. 発表標題 働き方改革：ワーク・ライフ・バランスを意識してのりこえる。Work System Reform : Go well from work-life balance reform
3. 学会等名 第28回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 芝 聡美, 原尾 美智子, 西田 紗季, 櫻木 雅子, 水沼 洋文, 北山 丈二, 佐田 尚宏
2. 発表標題 針生検で悪性リンパ腫が疑われた低分化乳癌の1例
3. 学会等名 乳腺甲状腺超音波医学
4. 発表年 2020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