

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16254

研究課題名（和文）乳がんの免疫チェックポイント活性化に関わる脂肪酸の同定とその分子機構の解明

研究課題名（英文）Exploration of fatty acid metabolism that can activate immune checkpoint pathway in breast cancer

研究代表者

川島 雅央（Kawashima, Masahiro）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80766676

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、乳がん臨床検体の解析で明らかになった、乳がん組織中の脂肪酸代謝と腫瘍免疫活性の強い相関の背景にある分子機構の探索を行った。結果、乳がん細胞において脂肪酸結合タンパク質 FABP7 の発現が 1) 免疫チェックポイントの制御分子 PD-L1 の発現を制御すること、2) 単細胞からの増殖能を強く規定すること、3) 放射線照射や低酸素などの酸化ストレス耐性に関与すること、4) 細胞の熱産生と温度調節に関与することが明らかになった。FABP7 と腫瘍免疫活性は単純な 1対1 の相関関係ではなく、FABP7 がストレス応答や熱代謝など多彩な生理機能に影響を与えることで腫瘍免疫の調節を行っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FABP7 が乳がん細胞の免疫反応、増殖能、幹細胞性、ストレス耐性、細胞温度など様々な機能を直接的あるいは間接的に制御していることが示唆された。特に、FABP7 による PD-L1 の発現制御や温度制御との関連はこれまでに既報がない重要な発見であった。本研究で得られた知見を、今後乳がんの免疫療法の進歩にどのように繋げていくかについてはさらなる注意深い検証が必要であるが、乳がんの生物学に「温度と免疫と脂肪酸」という全く新しい概念を提示できたことは本研究の貴重な成果であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we explored the molecular mechanisms underlying the strong correlation between fatty acid metabolism and tumour immune activity in breast cancer tissue, as revealed by the analysis of clinical breast cancer samples. The results showed that the expression of a fatty acid binding protein, FABP7 in breast cancer cells 1) regulates the expression of PD-L1, a regulatory molecule of the immune checkpoint, 2) strongly determines the ability to proliferate from a single cell, 3) is involved in resistance to oxidative stress such as irradiation and hypoxia, 4) is involved in cellular heat production and temperature regulation. These results suggested that FABP7 and tumour immune activity do not simply correlate one-to-one, and that FABP7 regulates tumour immunity by modifying multiple cellular functions especially stress response and thermal metabolism.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：脂肪酸 免疫チェックポイント 乳癌 温度 代謝 低酸素 ストレス応答 放射線治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究開始当時は、免疫反応のブレーキを解除する「免疫チェックポイント阻害療法(抗 PD1/PD-L1 療法)」が肺がんや悪性黒色腫などを中心にその効果が確認され、乳がんにおいてもこれまでにない新しい治療法として臨床導入がいよいよ開始されるという時期であった。免疫療法が実臨床に導入されるということに大きな期待が膨らむ一方で、臨床試験の結果からは乳がん患者において何らかの効果が確認できるのはせいぜい 10~20%程度であろうという厳しい現実も把握されたことで、「何が抗 PD1/PD-L1 療法の治療効果の違いを決めているのか」、「どうすれば治療効果を向上させることができるのか」という命題に対し、学术界が強い関心を向け始めていた。

一部の脂肪酸が炎症性メディエーターとして免疫調節作用を有することは古くから知られていたが、免疫チェックポイントの活性調整に脂肪酸が関わるのかどうかに関してほとんど知見は得られていなかった。当時、我々のグループでは、高解像度質量顕微鏡と呼ばれる最先端の脂質イメージング装置を行い、ヒト乳がん組織の脂肪酸の組成と分布の特徴を解析していた。その過程で、脂肪酸結合タンパク質 Fatty acid binding protein 7 (FABP7)などの多価不飽和脂肪酸の代謝を制御する遺伝子の発現が、乳がん組織中の不飽和脂肪酸の分布や PD1/PD-L1 関連免疫チェックポイントの活性、リンパ節転移といった事象と強く相関する可能性を確認していた。

本研究課題は、これらの知見を背景として、乳がん細胞による多価不飽和脂肪酸の代謝と免疫チェックポイントを含む腫瘍免疫の関連をより詳細に解析し、免疫チェックポイント阻害療法の治療効果向上への手がかりとなる知見を得るべく計画され、開始されたものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、乳がんの臨床検体の解析から得られた、多価不飽和脂肪酸の代謝と免疫チェックポイントの活性の関連について、乳がん細胞株を用いた基礎実験の系を通して、その背景にある詳細な分子メカニズム明らかにしようとするものである。

3. 研究の方法

(1)細胞株と RNA 干渉による遺伝子 knockdown

乳がん細胞株 MCF7 と HCC1806 はそれぞれ American Type Culture Collection より入手。生体環境になるべく近づけるべく、10mM のグルコース濃度を有する DMEM 培地で培養した。FABP7 の knockdown は、抗生物質耐性遺伝子と FABP7 を標的にした short-hairpin RNA(sh-RNA)、無標的の sh-RNA それぞれをコードするプラスミドをレンチウイルス粒子を用いて細胞株に transduction を行った。FABP7 の発現が抑制されていることは定量的 PCR を用いて確認した。

(2)免疫チェックポイント活性の確認

各細胞株における PD-L1 の発現は定量的 PCR、ウエスタンブロット、フローサイトメトリーを用いてそれぞれ確認した。網羅的遺伝子発現解析は、Smart-seq2 (Nat. Protoc. 9, 171–181, 2014) による RNAs シークエンス法で行い、パスウェイエンリッチメント解析は両細胞株で有意に発現が異なる遺伝子セットを抽出した後、Metacore™ (Thomson Reuters)を用いて解析を行った。

(3)細胞増殖アッセイと Clonogenic assay

細胞増殖アッセイは、細胞カウントによる方法と CyQUANT Cell Proliferation Assay kit(Thermo Fisher Scientific)を用いた核酸定量法により行った。Clonogenic assay は 10 cm Dish 中に Single cell の状態にした細胞を播種し、クリスタルバイオレットを用いて染色を行った後コロニー形成能とコロニーの成長度を評価した(Nat. Protoc. 1, 2315–2319, 2006)。低酸素培養は INVIVO2 400 hypoxic workstation (Baker Ruskinn)を用いて 0.1%O₂ の設定で行った。

(4)公共データベースを用いた遺伝子発現解析

乳がん原発巣の遺伝子発現データは Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium (METABRIC)と The Cancer Genome Atlas (TCGA)にて登録されているものを cBioPortal (<https://www.cbioportal.org>)よりダウンロードし、R software の sigQC パッケージ等を用いて行った。

(5)脂質過酸化反応測定、ミトコンドリア膜電位測定、細胞温度測定

脂質過酸化反応とミトコンドリア膜電位はそれぞれ Image-iT® Lipid Peroxidation Kit (Thermo Fisher)と BD™ MitoScreen Kit (BD Bioscience)を用いてフローサイトメータにより測定解析を行った。細胞温度は蛍光寿命型細胞温度感知プローブにて細胞を処理した後、温度コントロールチャンバーを搭載した Leica SP8X 倒立型共焦点 STED 顕微鏡を用いて蛍光寿命イメージングデータを取得し、推計値として算出した。

4. 研究成果

- (1) FABP7 は乳がん細胞のリン脂質の脂肪酸組成の制御に関与し、PD-L1 発現に影響を与える。乳がんの臨床検体を用いた解析から、多価不飽和脂肪酸代謝に関わる FABP7, PLA2G2D,

ACSL4 の発現が免疫チェックポイント関連遺伝子の発現と強い相関を有すことを確認していたため、乳がん細胞株 MCF7, HCC1806 におけるこれらの遺伝子の発現状況を定量的 PCR を用いて確認した。結果、HCC1806 を低酸素処理した際に、FABP7 の発現が亢進することが確認されたため、以降 FABP7 に注目して解析を進めることとした。shRNA による FABP7 の安定的 knockdown 処理を行った HCC1806 細胞株を樹立 (sh-FABP7)。同細胞株で PD-L1 の発現を確認したところ、sh-FABP7 では対照株 (sh-Ctrl) に比べ、PD-L1 の mRNA の発現、タンパク発現いずれもが有意に亢進していることが確認された。さらに、RNA sequencing による網羅的遺伝子発現解析を行い、sh-FABP7 と sh-Ctrl では PD-L1 関連免疫チェックポイントパスイエイを含む免疫反応に関連する複数のパスイエイの活性に有意な違いがあることが判明した。

LC-MS を用いたこれら細胞株のリン脂質組成のプロファイリングでは、sh-FABP7 と sh-Ctrl の間では、臨床検体での観察で確認された多価不飽和脂肪酸(C20:3)を含む PI(18:0/20:3)の組成割合が有意に異なっていることも確認された。FABP7 は多価不飽和脂肪酸の細胞内輸送に関わるタンパク質であるため、以上の結果から、FABP7 を介した多価不飽和脂肪酸の輸送が、乳がん細胞のリン脂質組成を規定し、PD-L1 の発現状況や免疫に関連する種々の遺伝子群の発現を制御している可能性があると考えられた。

(2) FABP7 は脂質過酸化に対し保護的に作用し、乳がん細胞の単細胞からの増殖能を規定する。

FABP7 は多価不飽和脂肪酸を輸送するだけでなく、多価不飽和脂肪酸と結合することでこれを過酸化反応から保護する機能を有することが知られている。過酸化脂質には強い免疫調整作用があることから、FABP7 が脂質過酸化反応の制御を介して腫瘍免疫を制御しているのではないかと推定した。そこで、脂質過酸化反応の程度をフローサイトメトリーを用いて確認すると、sh-Ctrl に比して sh-FABP7 で有意に脂質過酸化反応が亢進していることが確認された。次に、脂質過酸化反応の亢進が細胞の variability に与える影響を調べるため、sh-Ctrl/sh-FABP7 の細胞増殖能の違いを確認した。興味深いことに、通常の細胞増殖アッセイでは sh-Ctrl と sh-FABP7 の間には細胞増殖にごくわずかな違いしか観察されなかったが、Clonogenic assay を行って単細胞のプレート生着率、単細胞からの増殖能を比較すると、sh-FABP7 では sh-Ctrl に比べて極めて強く細胞増殖能が抑制されていることが明らかになった。さらに、これらの細胞株に低酸素処理、放射線照射による処理を行い、酸化ストレスに対する耐性を確認したところ、sh-FABP7 は sh-Ctrl に比し、低酸素処理・放射線照射、いずれに対しても脆弱となっていることが明らかになった。FABP7 と関連する過酸化脂質と腫瘍免疫の関連、および、通常の細胞増殖アッセイと clonogenic assay でみられた細胞増殖能の相違の原因は、本研究期間内で完全に明らかにすることはできなかったが、FABP7 の機能が細胞の幹細胞性や細胞間相互作用に何らかの影響を与えていることを示唆する興味深い結果であった。

(3) FABP7 は、乳がん細胞のミトコンドリア由来熱産生に関与する可能性がある

FABP7 knockdown に伴ってどのような遺伝子が増加するのかを詳細に解析していたところ、褐色脂肪細胞特異的に発現して熱産生を行う Uncoupling protein 1 (UCP1) の発現が sh-FABP7 で強く亢進していることが分かった。熱は分子間相互作用や膜の流動性、酵素反応など多彩な事象に影響を及ぼし、生体の免疫反応を規定する極めて重要な因子であるため、この UCP1 の発現亢進は大変興味深い現象であると考えられた。その一方で、UCP1 は本来、褐色脂肪細胞特異的に発現するタンパクであるため、乳がん細胞株観察された UCP1 の発現亢進が本当に細胞の温度上昇に関与しているのかを多角的に検証することにした。まず、温度感受性蛍光プローブを用いて細胞温度の違いを調べたところ、UCP1 を高発現している sh-FABP7 では sh-Ctrl に比べて細胞温度が約 2.5°C 高いことが明らかになった。また、UCP1 は電子伝達系で蓄えられたミトコンドリア膜間のプロトン勾配を脱分極することで熱を産生するが、予想通り sh-FABP7 では sh-Ctrl に比して、ミトコンドリアの膜の脱分極が高頻度に生じていることが確認された。さらに、TCGA / METABRIC に公開されている乳がん組織の遺伝子発現データを用いた解析では、乳がん組織内 FABP7, UCP1 の発現は相互に排他的な関係にあり、乳がん細胞株での観察結果と同様の傾向を示すことも確認された。これらの結果から、FABP7 が乳がん細胞における UCP1 の発現を制御し、細胞の温度のコントロールに関与している可能性が示唆された。

以上の結果、FABP7 が乳がん細胞の免疫反応、増殖能、幹細胞性、ストレス耐性、温度制御など様々な機能や性質を直接的あるいは間接的に制御していることが示唆された。FABP7 がどのようなメカニズムでこれらを制御しているかについては今後のさらに注意深い検証が必要であるが、FABP7 と PD-L1 の発現制御や温度制御との関連はこれまでに既報がないもので、乳がんの新しい生物学的特性に迫る重要な成果であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawashima Masahiro, Bensaad Karim, Zois Christos E., Barberis Alessandro, Bridges Esther, Wigfield Simon, Lagerholm Christoffer, Dmitriev Ruslan I., Tokiwa Mariko, Toi Masakazu, Papkovsky Dmitri B., Buffa Francesca M., Harris Adrian L.	4. 巻 8
2. 論文標題 Disruption of hypoxia-inducible fatty acid binding protein 7 induces beige fat-like differentiation and thermogenesis in breast cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer & Metabolism	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40170-020-00219-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawashima Masahiro, Bensaad Karim, Zois Christos E., Barberis Alessandro, Bridges Esther, Wigfield Simon, Lagerholm Christoffer, Dmitriev Ruslan I., Tokiwa Mariko, Toi Masakazu, Papkovsky Dmitri B., Buffa Francesca M., Harris Adrian L.	4. 巻 8
2. 論文標題 Correction to: Disruption of hypoxia-inducible fatty acid binding protein 7 induces beige fat-like differentiation and thermogenesis in breast cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer & Metabolism	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40170-020-00224-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawashima Masahiro, Tokiwa Mariko, Nishimura Tomomi, Kawata Yukiko, Sugimoto Masahiro, Kataoka Tatsuki R., Sakurai Takaki, Iwaisako Keiko, Suzuki Eiji, Hagiwara Masatoshi, Harris Adrian L., Toi Masakazu	4. 巻 122
2. 論文標題 High-resolution imaging mass spectrometry combined with transcriptomic analysis identified a link between fatty acid composition of phosphatidylinositols and the immune checkpoint pathway at the primary tumour site of breast cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 245 ~ 257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-019-0662-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 川島雅央
2. 発表標題 乳がん細胞による内因性熱産生機構
3. 学会等名 第1回 日本癌学会若手の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawashima M, et al.
2. 発表標題 Fatty acid binding protein 7 regulates beige fat-like differentiation of breast cancer cells and thermogenesis
3. 学会等名 AACR2020 Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masahiro Kawashima, Tomomi Nishimura, Yukiko Kawata, Eiji Suzuki, and Masakazu Toi
2. 発表標題 High-resolution imaging mass spectrometry identified the missing link between fatty acid remodeling of phosphatidylinositols and the activity of PD1-related immune checkpoint pathway
3. 学会等名 Cell Symposia Translational immunometabolism (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川島雅央、常盤麻里子、西村知美、川田有希子、片岡竜樹、桜井孝規、祝迫恵子、鈴木栄治、戸井雅和
2. 発表標題 脂質代謝物は乳癌の新しいバイオマーカーとなるか？ - 高解像度質量顕微鏡の解析から見えてきた事 -
3. 学会等名 第26回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2018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
研究協力者	原田 浩 (Harada Hiroshi) (80362531)	京都大学・放射線生物研究センター・教授 (14301)	

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			
英国	University of Oxford			
アイルランド	University College Cork			