

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08664

研究課題名（和文）細胞外小胞の脂質組成に注目した乳癌免疫療法の新規バイオマーカーの探索

研究課題名（英文）Guiding the immunotherapy for breast cancer based on the lipid profiling of extracellular vesicles

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、血中細胞外小胞（EV）の脂質プロファイルの違いによって、乳がんの有無や腫瘍のサブタイプ、病期を識別することができるかどうかを、日本人乳がん患者、および健常者由来の血漿検体を用いて検討した。スクロースクッション超遠心法を用いることで、リポタンパク質のコンタミネーションなく高品質のEV分離精製できることを確認。乳がん患者、良性乳腺疾患患者、健常人よりなる、2つの独立したコホートを用いた検証で、EVの脂質組成の違いをベースにした乳がんの診断モデルを作成することに成功した。探索的解析で、乳がんのステージやサブタイプの違いを反映する脂質が存在する可能性も確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血漿由来EVの脂質のプロファイリングを、乳がんの有無、病期やサブタイプを診断できるリキッドバイオプシーとして応用できる可能性が示唆された。EVの脂質組成が乳がん診断に応用できるとした報告はこれまでに前例がなく、ユニークな研究結果であると考えられる。血液による診断は、従来の病理組織診断に比べるとはるかに低侵襲であり、本成果が患者負担の少ない優れた診断法開発の一助となる可能性がある。ただし、臨床使用に十分な性能を達成するためには、EV分離技術の向上も含めたさらなる技術革新と、より大規模なコホートでの検証が必要である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated whether breast cancer, its subtypes and clinical stages, can be diagnosed from differences in the lipid profile of circulating extracellular vesicles (EVs) using plasma samples from a cohort of Japanese breast cancer patients and healthy subjects. We found that sucrose cushion ultracentrifugation was the best method to isolate high-quality EVs from plasma samples without contamination of lipoproteins. We analyzed samples from two independent cohorts consisting of breast cancer patients, patients with benign breast disease and healthy subjects, and successfully developed a breast cancer diagnostic model based on differences in the lipid composition of EVs. Exploratory analyses also suggested that the lipid profile of EVs may be used for the prediction of clinical stage and subtype of breast cancer.

研究分野：乳癌外科学

キーワード：乳癌 細胞外小胞 脂質代謝 リキッドバイオプシー

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、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)」は、現在、高悪性度のトリプルネガティブ乳癌の治癒率向上を目指して、早期乳癌に対する周術期補助療法としての適応拡大が検討されている段階であった。研究期間中に同療法は臨床病期 ~ B のトリプルネガティブ乳癌の周術期補助療法として保険承認に至ったが、適応症例を判別するバイオマーカーはなく、一律に投与が行われている。一方腕、抗 PD1/PD-L1 療法は副腎不全や甲状腺機能障害といった免疫関連有害事象によって、永続的な後遺症が一定数生じる療法であり、より精密に適応を判断できるバイオマーカーの開発は依然として喫緊の課題のままである。

申請者は根治的手術を受けた乳癌患者約 60 例の乳癌原発組織を用いて高解像度質量顕微鏡による脂質イメージングを行うことで、組織内の免疫チェックポイントの Pathway の活性が高い腫瘍では、リン脂質中の一つであるフォスファチジルイノシトール (PI) の多価/単価不飽和脂肪酸比が乳癌細胞でのみ高くなっていることを発見した (Kawashima M et al. Br J Cancer. 122, 245-257 (2020),)。即ち、組織中の乳癌細胞の PI 組成の違いによって、抗 PD1/PD-L1 療法の適応を判断できる可能性が示唆される結果であった。

臨床研究を進める上で、最も大きな問題点は、乳癌細胞の脂質を質量顕微鏡という特殊な装置を用いることなくいかに非侵襲的に測定するかという点であった。本研究では、癌細胞から循環中に放出される細胞外小胞 (Extracellular vesicles: EVs) の脂質が、由来する癌細胞の脂質の違いを反映しているのではないかと仮説を検証し、最終的に、血漿中 EVs の脂質解析で乳癌組織中の脂質組成・免疫チェックポイントの活性を間接的に予測することは可能か、という命題を検証することを最終目標として開始された。

2. 研究の目的

乳癌患者由来血漿中の EVs の脂質組成を測定し、臨床病理学的特徴を反映する脂質組成上の特徴 (Lipid signature) を探索する。さらに、同定した Lipid signature の臨床的有用性を検証する。

3. 研究の方法

脂質分析に適した EV 分離精製法の確立

脂質分析に適した EV 分離精製法は不明であり、既存の手法のパフォーマンスを脂質分析という観点から比較検討した。具体的には 1 : 超遠心法、2 : スクロースクッション超遠心法、3 : Size exclusion chromatography 法の 3 法で、EV の収量、品質、リポタンパク粒子など血中を循環する EV 以外の脂質粒子のコンタミネーションの程度を評価した。EV の収量とサイズ分布は Nano Sight を使用して定量的に解析。電子顕微鏡を用いて、EV の形態やコンタミネーションの評価を定性的に行った。リポタンパク粒子のコンタミネーションや EV の純度はそれぞれのマーカータンパクに対する Western blot を行い評価した (EV のマーカー : CD9, TSG101, Hsp90a、リポタンパクマーカー : ApoB, ApoE)

食事摂取が EV 分離精製に与える影響の評価

解析を予定しているアーカイブ血漿サンプルは、絶食等の指定なくランダムに採取されたサンプルであったため、食事摂取が EV 分離精製能に与える影響の評価を行った。健常者から、絶食時、高脂質食後 3 時間、高脂質食後 6 時間で血液を採取し、分離した血漿から 確定したスクロースクッション超遠心法を用いて EV の分離精製を実施した。EV の純度や量、質を と同様の手法を用いて評価した。

EV 脂質組成による乳がん診断モデルの作成と検証

乳がん患者 (n=105)、良性乳腺疾患患者 (n=11)、健常人 (n=43) よりなる、2 つの独立したコホート (n=126 と n=33) からアーカイブ血漿を入手。スクロースクッション超遠心法を用いて血漿由来 EV を分離し、LC-MS を用いた網羅的脂質分析を実施した。EV からの脂質抽出には modified Bligh-Dyer 法を用いた。LC/MS 分析はサンプルをランダム化して同一属性のサンプルが固まって測定されないように配慮を行うとともに、数サンプル毎に補正用内部標準の測定を行ってサンプル間データ補正を行った。乳がん患者検体と非乳がん患者検体で有意に異なる脂質を事前に設定した基準に基づいてスクリーニングした (variable importance projection > 1, |log₂ fold change| > log₂^{1,2}, and p-value < 0.05)。有意に異なる脂質を用いて Lasso regression を用いてトレーニングセットから診断モデルを作成。モデルは内部検証セットと外部検証セットでそれぞれ診断能の検証が行われた。

サブタイプ、病期分類と EV 脂質の相関解析

探索的解析として腫瘍のサブタイプ、病期を識別することができる脂質を探索し、EV の脂質組成の違いから、サブタイプや病期が推定可能かを調査した。

4. 研究成果

脂質分析に最も適した EV 分離精製法

3 法を比較した結果、スクロースクッション超遠心法が脂質分析用の EV 精製分離として最も適した方法であることがわかった。Size exclusion chromatography 法は他 2 法と比較して収量は最も多かったが、電顕像およびウエスタンブロットにて大量のリポタンパク粒子のコンタミネーションが生じていることが分かった。一方、超遠心法、スクロースクッション超遠心法ではリポタンパク粒子のコンタミネーションはほとんど確認されなかった。超遠心法とスクロースクッション超遠心法ではスクロースクッション超遠心法の方が収量の面で超遠心法よりも優れており、スクロースクッション超遠心法が、最適の方法であることが分かった。

食事摂取が EV 分離精製に与える影響

これ以降は の結果を受け、すべてスクロースクッション超遠心法で EV 抽出を行った。絶食時、高脂質食後 3 時間、高脂質食後 6 時間の 3 ポイントでの比較では、EV の収量、サイズ、形態ともに有意な違いが無いことが確認された。懸念された、食事に伴うリポタンパク粒子コンタミネーションの増加は、スクロースクッション超遠心法を用いている限り生じないことも確認できた。

EV 脂質組成の違いによる乳がん診断モデル

単変量・多変量解析によって、乳がんと健常者間で割合が異なる 11 種類の脂質 (PS_C36:1, THC_16:0, PS_C38:3, lysoPC_C16:0, DHC_16:0, SM_C44:1, PS_C36:2, TG_C54:4, TG_C54:5, PS_C38:4, PC_C36:3) を同定。この 11 種の脂質を用いて、LASSO regression を行い、3 種の脂質を用いた乳がん診断モデルの作成に成功した。同モデルの診断能を示す ROC 曲線の AUC 値はトレーニングセット、内部検証セット、外部検証セットにおいて、それぞれ 0.759 (感度, 0.741; 特異度, 0.724), 0.743 (感度, 0.679; 特異度, 0.800), 0.804 (感度, 0.696; 特異度, 1.000) と良好な値を示した。また、この診断モデルは DCIS の診断にも一定の診断能を有することが分かった (AUC = 0.711 (感度, 0.733; 特異度, 0.773))。

サブタイプ、病期分類と EV 脂質の相関解析

病期別の解析では、主要なリン脂質であるホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルイノシトール (PI) および、主要なスフィンゴ脂質であるスフィンゴミエリン (SM) の割合が、病期によって異なるパターンを示すことが分かった。異なるステージ間で有意な変動を示す脂質は 53 種にのぼった。Cer_d18:1/17:0, LysoPC_C20:0e, TG_C48:0, TG_C50:0 は DCIS で最も高く、飽和 PC と単価不飽和 PC、PE、PS はステージ III で相対的に高く、多価不飽和 PC と多価不飽和 TG、LysoPC、SM はステージ IV で高い傾向を示した。興味深いことに、多価不飽和 PI (PI_C36:2, PI_C38:3, PI_C38:4) は以前我々が質量顕微鏡を用いて行った乳腺組織内と同じ挙動を示した (非浸潤癌で低く、転移を伴う浸潤癌で高くなる)。

また、サブタイプ別の解析では、PE と飽和 TG がルミナルタイプ乳癌で、PC とセラミドの割合が HER2 陽性乳がん、LysoPC と SM の割合がトリプルネガティブ乳癌患者で相対的に高い傾向を示した。

【結論】血漿由来 EV の脂質のプロファイリングを、乳がんの有無、病期やサブタイプを診断できるリキッドバイオプシーとして応用できる可能性が示唆された。本研究の限界として、日本人の単施設コホートでの検証であり、より大規模なコホートでの検証が必要である点がある。また、EV の分離精製に超遠心が必要といった技術的制約もあり、臨床使用に十分な性能を達成するためには、EV 分離技術の向上も含めたさらなる技術革新が必要である。脂質の変化が乳がんのどのような生物学的側面を反映した変化なのかは依然不明であり、このような基礎的な部分の解明も今後必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Liu Lin, Kawashima Masahiro, Sugimoto Masahiro, Sonomura Kazuhiro, Pu Fengling, Li Wei, Takeda Masashi, Goto Takayuki, Kawaguchi Kosuke, Sato Taka Aki, Toi Masakazu	4. 巻 114
2. 論文標題 Discovery of lipid profiles in plasma derived extracellular vesicles as biomarkers for breast cancer diagnosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4020 ~ 4031
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15935	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masahiro Kawashima
2. 発表標題 Liquid biopsy based on the lipid profiles in plasma-derived extracellular vesicles which can be utilized for breast cancer diagnosis.
3. 学会等名 2023 AACR-NCI-EORTC Molecular Targets and Cancer Therapeutics Conference（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川島雅央
2. 発表標題 血中細胞外小胞の脂質プロファイリングによる乳がんのリキッドバイオプシーの可能性
3. 学会等名 第32回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2024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
---------	---------