

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：82838

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20838

研究課題名（和文）悪性腫瘍における細胞外AA流入制御機構の解明とその制御破綻による新規治療戦略の創出

研究課題名（英文）A novel therapeutic strategy for malignant tumors by regulating the influx of extracellular Arachidonic acid

研究代表者

工藤 海（Kudo, Kai）

一般社団法人AIM医学研究所・研究部門・リサーチフェロー

研究者番号：60967165

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）：腫瘍細胞は自身の生存に有利な微小環境を構築するために細胞内外の脂質組成を統御することが知られているが、その分子機序や生物学的意義等の詳細は不明である。本研究では、腫瘍細胞が炎症惹起性脂質であるアラキドン酸(AA)のトランスポーターであるFATP2の発現調節を介して細胞内AA量を減少させることでFerroptosisへの耐性を獲得し、腫瘍の成長を促していることが明らかとなった。またTCGAの公共データベース解析と異種移植モデルの解析より、膠芽腫やメラノーマのような予後不良の癌においても上記細胞外脂質の流入制御機構が腫瘍増生に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかとなった悪性腫瘍の持つ脂質制御機構の一つであるFATP2の発現量は、リンパ腫のみならず多くのがんにおける予後予測マーカーとなり得る可能性が示された。今後は悪性腫瘍や過活動状態の免疫細胞を標的とした本分子の発現誘導法やリポソームを用いたアラキドン酸輸送法の検討を通じて、より副作用の少ない新規治療戦略の開発へと繋がることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Tumor cells are known to regulate intracellular and extracellular lipid composition to create a microenvironment favorable for their own survival, but the details of the molecular mechanisms and biological significance of this regulation are unknown. In this study, we found that tumor cells acquire resistance to ferroptosis and promote tumor growth by decreasing intracellular AA levels by regulating the expression of FATP2, a transporter of arachidonic acid (AA), a proinflammatory lipid. Public database analysis of TCGA and xenograft models revealed that the above-mentioned regulatory mechanism of extracellular lipid influx also plays an important role in tumor growth in poor prognosis cancers such as glioblastoma and melanoma.

研究分野：脂質生物学

キーワード：脂質代謝 過酸化脂質 Ferroptosis 悪性リンパ腫 がん

1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr Virus (EBV) 陽性リンパ腫は、ヒトがんウイルスである EBV の感染した成熟リンパ球細胞に起因する造血腫瘍である。本腫瘍は、EBV 感染細胞を排除するために惹起された炎症反応の遷延化から誘導される腫瘍微小環境がその根本にあると考えられている。一方で、生体内では上記のような炎症反応が引き起こされる際には炎症惹起性脂質である ω -6 不飽和脂肪酸(PUFA)とその代謝物が利用され、惹起された炎症を鎮静化するためには抗炎症性脂質である ω -3 PUFA およびその代謝物が利用される。正常ではそれらが一定のバランスを保つよう統御されることで個体の恒常性が保たれるが、悪性腫瘍においてはこの秩序が乱れ、腫瘍細胞に有利な環境となっている場合が多い。これまでに我々のグループでは EBV 陽性リンパ腫において発生する「脂質の歪み」に着目し、腫瘍細胞の脂質組成とその役割を調査してきた。この過程で申請者は、EBV 感染細胞株 Akata LCL(野生型 EBV 感染細胞)と B95-8 LCL(EBV 由来小分子 RNA(BART miRNA)欠損株感染細胞)において ω -6 PUFA(アラキドン酸: AA)の割合が激減することを見出した(図 1)。しかし哺乳類細胞においては ω -6 脂肪酸や ω -3 脂肪酸を合成する酵素は同定されておらず、実際にその組成変化に対応する酵素活性は見られなかった。以上より悪性リンパ腫細胞における上記脂質組成変化が de novo 合成以外の経路、細胞外からの AA の流入制御機構に依存している可能性が示唆された。

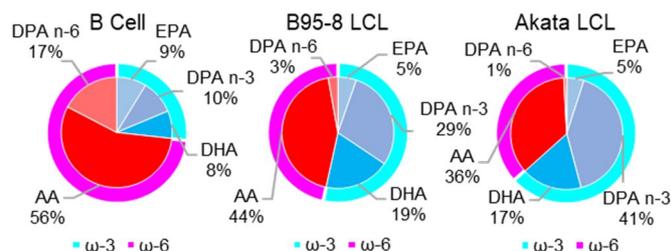


図 1 EBV 感染・非感染細胞における PUFA 組成

そこで、申請者は EBV 感染細胞における AA の取り込みについて、Akata LCL と B95-8 LCL にて代表的 Transporter である FATP ファミリーの発現を確認したところ、AA に強い選択性を示す FATP2(SLC27A2)の発現が Akata LCL にて低下していることを見出し(図 2)、細胞外 AA の流入制限が FATP2 発現調節に起因する可能性が示唆された。

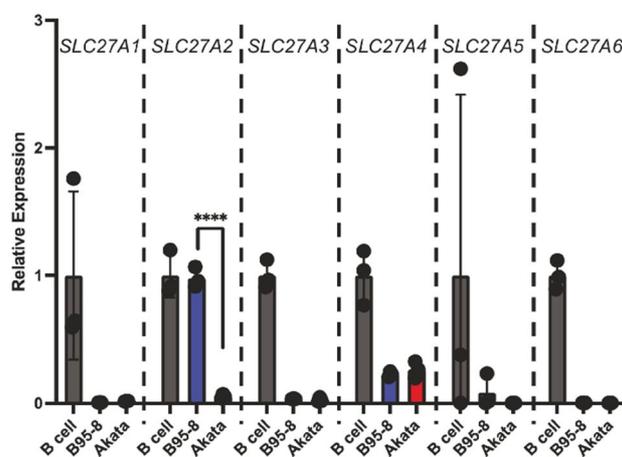


図 2 EBV 感染細胞における FATP ファミリーの発現

2. 研究の目的

本腫瘍の発生メカニズムは未だ完全には解明されておらず、悪性リンパ腫治療におけるゴールドスタンダードである R-CHOP 療法を含む欧米型治療抵抗性であり、有効な治療法が確立されていない。本研究で着目する細胞外脂質流入制御機構による治療戦略は悪性腫瘍の脂質組成を正常細胞に近づけることで腫瘍細胞の膜脂質酸化を誘導するため、副作用の小さくかつ腫瘍細胞に対する特異性の高い治療法の開発へと繋がるのが期待される。本研究の目的は EBV 陽性リンパ腫細胞における上記脂質流入制御機構の詳細なメカニズムの解明を第一に目指し、FATP2 ならびに脂質過酸化を標的とした新規治療戦略基盤の創出を目指す。またこの脂質制御機構がほかの組織に由来する非血球系のがん細胞においても共通であるか検証する。

3. 研究の方法

(1) EBV 感染がもたらす脂質組成の変化と脂質過酸化への影響評価

生体においても FATP2 による腫瘍生存機構が機能していることを確認するため、Akata LCL と FATP2 (SLC27A2) 過剰発現 Akata LCL をそれぞれ用いた Xenograft モデルを作成し、腫瘍生着率や腫瘍径、腫瘍組織における脂質組成変化、Ferroptosis(脂質過酸化)の有無を評価する。造血系ヒト化マウスを用いることで、霊長類にしか感染しない EBV をマウスに感染させ、ウイルス感染後の FATP2 の発現を経時的に評価する。また、EBV 感染マウスおよび EBV 陽性患者における血清中の AA 量を測定することでマウス、ヒト両方において細胞内外の AA 量がどのように異なるか評価する。In vitro においては FATP2 の過剰発現や FATP2 発現の低下していない EBV 陽性リンパ腫細胞株である B95-8 LCL と比べて Akata LCL がどの程度過酸化・Ferroptosis に耐性を示

すか評価する。一方で、B95-8 LCL は EBV 由来の小分子 RNA である BART miRNA が欠損しており、この点が Akata LCL との最も大きな相違点であることが知られている。そこでこの BARTmiRNA と FATP2 との間にはどのような関係性があるか、RNA-Seq 解析および Gene Set Enrichment Analysis より探索する。

(2) EBV 陽性リンパ腫以外での検証

EBV リンパ腫以外の様々ながん細胞株を用いて、FATP2 (*SLC27A2*) 過剰発現により Ferroptosis 感受性や細胞形態に変化が見られるか *In vivo* および *In vitro* の両面から検証する。また、実際にヒトの悪性腫瘍において FATP2 の発現が予後に影響を与えるかについても *In silico* 解析にて検証する。

4. 研究成果

(1) EBV 感染による脂質組成と FATP2 発現の変動

各細胞株の *In vitro* の実験の結果、以下の新知見が見出された (図3)。EBV 未感染正常細胞 (末梢血単核球; PBMC) および B95-8 LC では Ferroptosis 誘導剤である RSL-3 により細胞死 (Ferroptosis) が誘導されるが、Akata LCL はこれに耐性を示す。RSL-3 存在下で AA を添加した場合には上記細胞は細胞死が加速するが、Akata LCL はこれに対しても耐性を示す。B95-8 LCL では RSL-3 の添加により細胞形態と過酸化脂質量が変化するが Akata LCL では変化は見られない。BARTmiRNA を過剰発現させた EBV 非感染細胞株では低酸素関連遺伝子の発現が増加し、実際に低酸素状態に細胞を曝露させると *SLC27A2* の発現が低下する。Akata LCL に *SLC27A2* を過剰発現させると AA の流入が 10 倍程度増加し、RSL-3 に対して感受性を示すようになる。また RSL-3 による Viability 低下は膜脂質過酸化阻害剤である Ferrostatin-1 (Fer-1) の添加により抑制される。

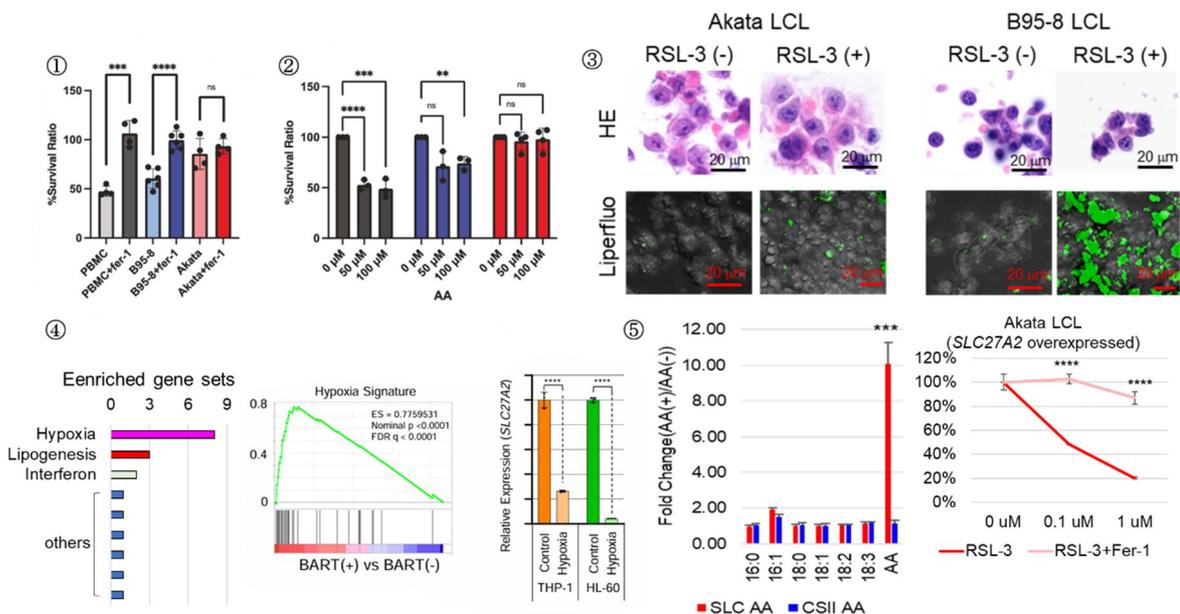


図3 *In vitro* の研究成果 - *SLC27A2* の発現が Ferroptosis への感受性を変化させる

これらのデータは、EBV 感染により誘導されるウイルス由来の miRNA が低酸素関連遺伝子発現を変化させることで *SLC27A2* の発現低下および細胞内への AA 流入の低下、Ferroptosis への耐性獲得へと繋がることを示唆した。

一方で、*In vivo* の実験では次の結果が得られた (図4)。Akata LCL を用いた Xenograft モデルでは *SLC27A2* を過剰発現した細胞の腫瘍形成が有意に抑制された。造血系ヒト化マウスへの EBV 感染モデルでは感染後 1 週目から脾臓組織内の FATP2 の発現が著しく低下した。

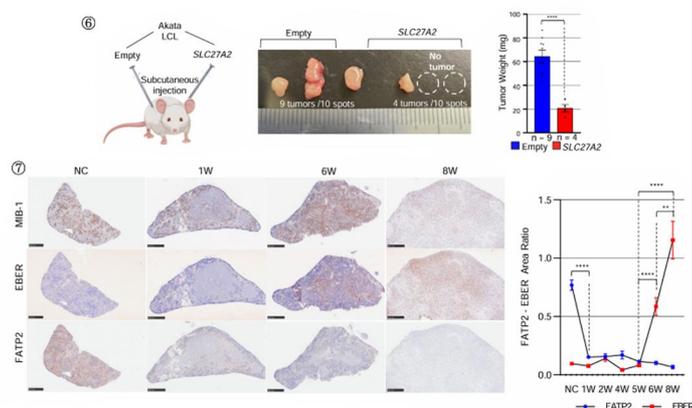


図4 *In vivo* の研究成果 - Xenograft モデルと EBV 感染モデルにおける検証

ヒト検体を用いた解析からは次の結果が得られた(図5)。ヒトの血清では健康人よりもEBV陽性患者でAA量が多く、腫瘍細胞(Akata LCL)の脂質組成との乖離がみられた。悪性リンパ腫の中でもEBV陽性の場合にはFATP2の発現が低下していることが多い。悪性リンパ腫においてFATP2陰性の場合にはEBVの有無を問わず予後が不良となる。

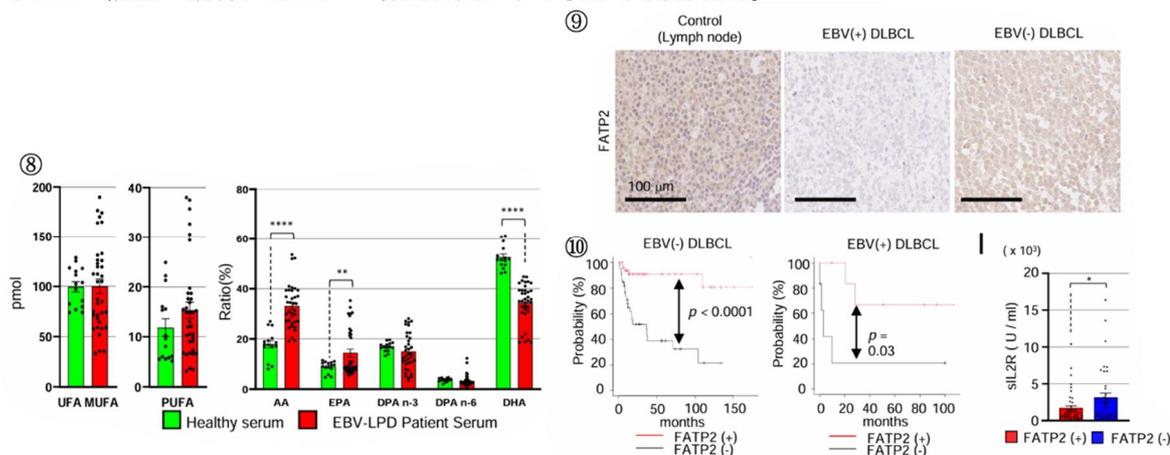


図5 ヒト検体(臨床検体)を用いた解析結果

以上の結果より、腫瘍細胞におけるSLC27A2の発現が実際に腫瘍形成や予後に影響を及ぼすこと、そしてEBV陽性リンパ腫の場合は腫瘍形成がみられる前段階である感染初期の段階からSLC27A2の発現が抑制されていることが明らかとなり、この機構がEBV感染細胞の生存・免疫監視からの回避をサポートしていることが示唆された。

(2) 非血球系の悪性腫瘍における検討

EBV陽性リンパ腫で観測されたFATP2発現制御による腫瘍生存機構がほかの悪性腫瘍にも適用されているか確認するため、がんにおける大規模なデータベースであるTCGAのデータセットを用いて登録されている全がんにおけるSLC27A2の発現とその予後について解析した。この結果、全がんを対象とした場合、SLC27A2の発現が低い方が予後不良となり、SLC27A2に突然変異がある場合も予後不良となること、頭頸部癌や膠芽腫、メラノーマなどの予後不良がんではほかのがんに比べ特にSLC27A2の発現が低下していること、皮膚メラノーマと脳腫瘍(膠芽腫)それぞれの中においてもSLC27A2の発現が低いほうがより予後不良となることが明らかとなった。

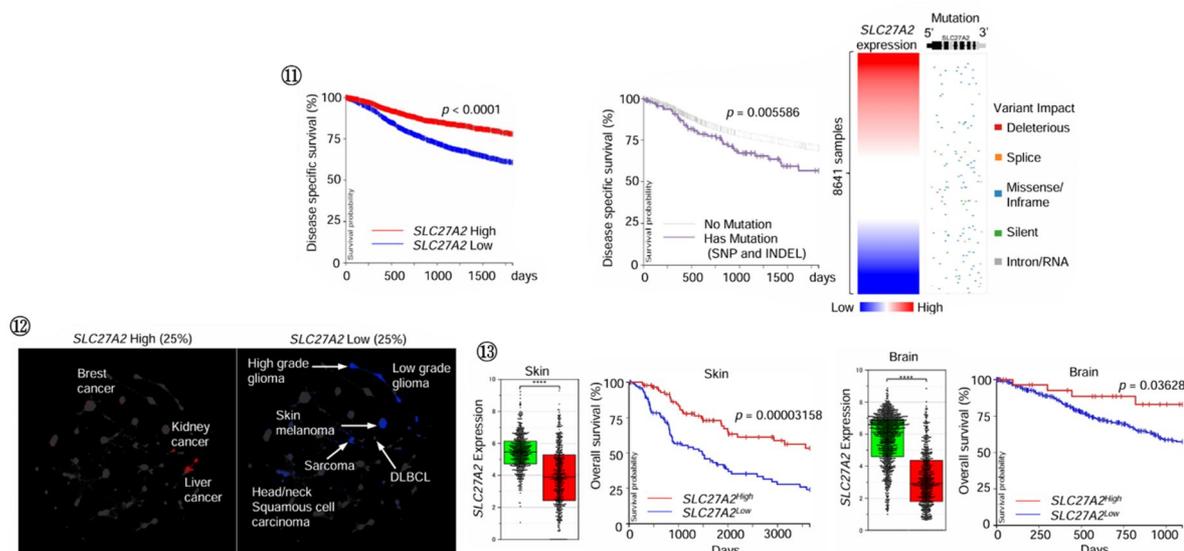


図6 TCGAデータベースを用いたIn silico解析の結果

上記の結果より、悪性リンパ腫以外にもFATP2の発現制御が腫瘍細胞の生存に寄与する可能性が強く示唆された。そこで次のがんの中でもSLC27A2の発現が特に低い、膠芽腫(Glioblastoma)細胞株であるA-172、皮膚メラノーマ細胞株COL0679、頭頸部扁平上皮癌細胞株HSC-2を用い、SLC27A2の過剰発現とXenograftモデルの作製を試み、以下の実験結果を得た(図7)。各細胞株へのSLC27A2の過剰発現はそれぞれ細胞形態の変化を誘導する。SLC27A2の過剰発現細胞ではRSL-3誘導性のFerroptosisが亢進し、このとき発生する過酸化脂質はFerrostatin-1(Fer-1)によりキャンセルされる。XenograftモデルにおいてはEBV陽性リンパ腫と同様腫瘍径と生着率の低下がみられ、腫瘍組織を占める腫瘍細胞の割合を減少させた。

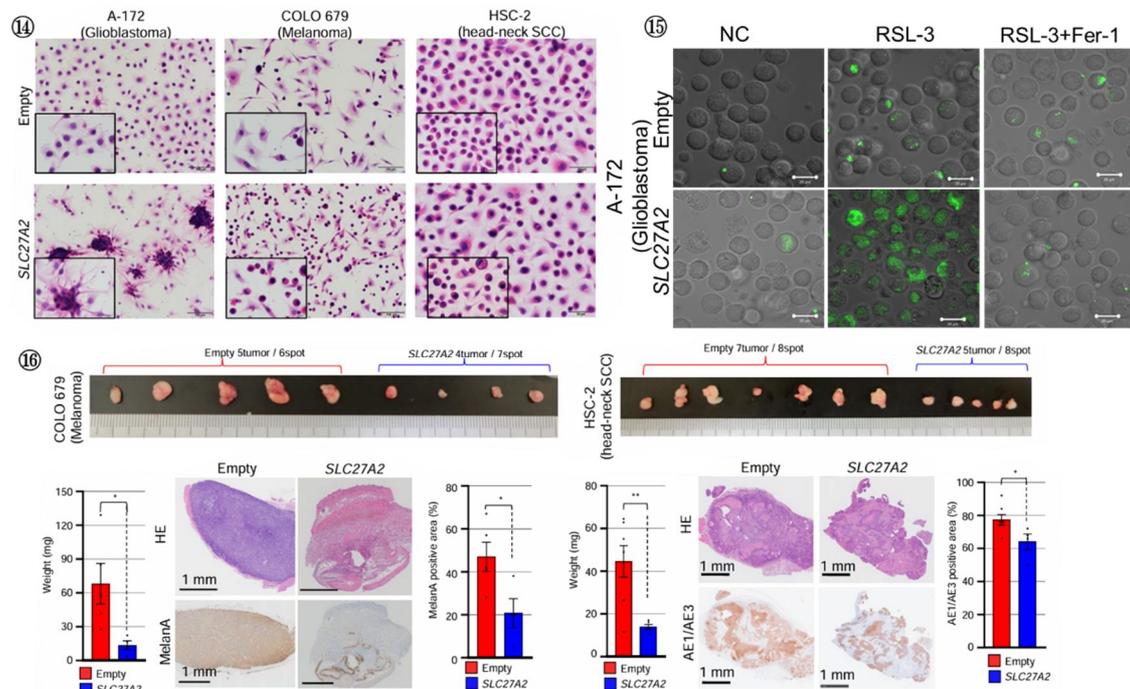


図7 非血球系腫瘍細胞株を用いた Xenograft モデルでの解析

以上の結果より、EBV 陽性リンパ腫では起点に BARTmiRNA の存在がある点が異なるが、多くのがんにおいて FATP2/SLC27A2 発現制御機構が存在し、これにより外因性 AA の取り込みが制限され Ferroptosis への耐性を獲得し、腫瘍細胞の生存・腫瘍形成の促進に寄与していることが明らかとなった。この新規の腫瘍形成促進軸が、EBV 陽性リンパ腫のみならず多くのがんの新規治療標的となりうることを期待される。しかし、AA の血中投与等ではほかの細胞への AA 流入により AA 由来脂質メディエーター合成の亢進による炎症の惹起・遷延が別の経路での発がんを誘導しかねない、という懸念点もあり、FATP2 を腫瘍細胞特異的に発現させるという課題とともに AA を腫瘍細胞特異的に届ける方法という点が大きな課題となる。AA を FATP2 非依存的に細胞に届けかつ腫瘍細胞への Targeting も可能とする方法として、リン脂質に AA を組み込んだリポソームの開発と検証も進行中であるが、今後の更なる調査と検討が望まれる。

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 Kudo Kai, Yanagiya Ryo, Hasegawa Masanori, Carreras Joaquim, Miki Yoshimi, Nakayama Shunya, Nagashima Etsuko, Miyatake Yuji, Torii Kan, Ando Kiyoshi, Nakamura Naoya, Miyajima Akira, Murakami Makoto, Kotani Ai	4. 巻 10
2. 論文標題 Unique lipid composition maintained by extracellular blockade leads to prooncogenicity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41420-024-01971-y	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 工藤 海、長谷川 政徳、三木 寿美、村上 誠、幸谷 愛
2. 発表標題 FATP2を介したアラキドン酸(AA)の流入制御は悪性リンパ腫におけるフェロトーシス抵抗性を誘導する
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------