

令和 6 年 5 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16836

研究課題名（和文）脂質代謝を標的とした新規免疫抑制解除型治療の基盤研究

研究課題名（英文）Basic research on novel immunosuppression-releasing therapies targeting lipid metabolism

研究代表者

國定 勇希（Kunisada, Yuki）

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：10779416

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：口腔がん患者、主に舌がん患者の切除標本パラフィンブロックを用いて、脂肪酸合成に関与している分子であるFatty acid synthase(FASN)や免疫細胞である制御性T細胞（Treg）、CD8T細胞、CD3T細胞を蛍光免疫組織化学により多重染色を行い、腫瘍組織とその周囲組織における脂肪酸合成の変化、免疫細胞の局所浸潤の解析を行っている。腫瘍組織では明らかにFASN分子の発現強度が増加しており、腫瘍が進展すると共に周囲組織のFASN分子の発現強度が増加している傾向にあることを確認した。また、腫瘍局所におけるTregの数も腫瘍の増大に伴い、増加傾向にあることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内代謝経路と免疫細胞の分化および機能の関係、免疫細胞の代謝変化とがん増悪化について非常に大きな注目を集めており、多くの代謝薬についてがん治療へのドラッグリポジショニングが検討されている。本研究でスタチン系薬剤により、がんの腫瘍増殖が制御出来たり、既存の抗腫瘍薬と併用することで抗腫瘍効果が増強することが分かれば、患者のQOLの維持に大きく貢献することが予想される。さらに代謝パラメーターは既存のがん治療の効果判定、予後予測のバイオマーカーとしても応用可能であり、医療の発展にも大きく貢献するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We are conducting multiplex immunofluorescence staining using paraffin-embedded blocks of excised specimens from oral cancer patients, primarily tongue cancer patients, to analyze changes in fatty acid synthesis and the local infiltration of immune cells such as regulatory T cells (Treg), CD8 T cells, and CD3 T cells in tumor tissues and their surrounding tissues. In tumor tissues, the expression intensity of Fatty Acid Synthase (FASN) molecules is clearly increased, and we have confirmed a tendency for the expression intensity of FASN molecules in surrounding tissues to increase as the tumor progresses. Additionally, we have observed an increase in the number of Treg cells in the tumor microenvironment with tumor growth.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：制御性T細胞 脂肪酸合成 腫瘍免疫 口腔癌

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔がんは顎口腔領域に発生するがんであり、その治療法は進歩しつつある。しかし、stage が進行した場合は再発・転移は未だに多く、治療法は審美面・機能面にも大きく関与し、患者の QOL への影響は大きい。これらの問題解決のため、口腔がん領域においてもがん免疫療法が適応されている。がん免疫療法には制御性 T 細胞 (Treg) のような免疫抑制細胞の抑制能を阻害する抑制解除型免疫療法がある。マウスモデルにおいて Treg を抗体によって除去すると、腫瘍の増殖抑制、拒絶が報告されているが、この方法は全身の Treg を除去するため、ヒトでは副作用として重篤な自己免疫疾患が生じる危険性が高く、腫瘍局所に限局した Treg 除去が現在でも課題である。Treg のような免疫抑制能を有する免疫細胞には脂質代謝 (脂質分解) が重要であることが報告されており、また、がん細胞は糖を利用して脂肪酸を産生し、脂質を分泌すること、がん細胞の脂肪酸合成が患者予後に関与していることが報告されている。これらの報告から、がん細胞の活発な脂肪酸合成、脂質の分泌を介して、Treg の免疫抑制能、腫瘍局所への集積が促進されるのではないかと仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究では、上記仮説の検証のため、がん細胞の産生する脂肪酸と腫瘍局所の Treg 蓄積に相関関係があるかどうか、また、がん細胞の脂肪酸合成阻害、およびそれによる腫瘍局所の脂質量低下により腫瘍局所の Treg 減少が観察されるかどうか、それが抗腫瘍作用につながるかどうかを検討する。腫瘍局所脂質量と Treg をはじめとする免疫抑制細胞の集積の関係に着目した研究報告はなく、本研究でそのメカニズムが明らかになれば、腫瘍局所の脂質量制御が、腫瘍局所の免疫抑制細胞を減少させる新規がん治療として非常に有望であると考えられる。また、脂肪酸や脂質の減少を見込む脂肪酸合成阻害剤は既に臨床で使用されているものもあり、早期に臨床応用できるという利点、比較的安価であるため多くの患者に治療提供可能と考えられる。前述のとおり、口腔がんにおいては審美面・機能面からみた治療選択は必要であり、同薬剤が利用可能であれば、患者の QOL の維持に大きく貢献する。また、がん細胞の脂質合成を標的にしたより効果的な薬剤の創薬に繋がるのが考えられる。さらに代謝パラメーターは既存のがん治療の効果判定、予後予測のバイオマーカーとしても応用可能であり、医療の発展にも大きく貢献するものと考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 材料

(日) 細胞株はマウス口腔扁平上皮癌細胞株である SCCVII を使用した。同細胞株は山口大学の原田先生のより寄与して頂いた。SCCVII は 5% ウシ胎児血清を含む DMEM F12 培地にて培養し、37°C/5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養維持した。

(月) ヒト口腔がん組織 ヒト口腔がん患者は、岡山大学病院口腔顎顔面外科学で舌口腔扁平上皮癌と診断され、治療を受けた 17 名の切除標本パラフィンブロックを使用した。本研究は岡山大学倫理委員会の承認を受け、同意書を取得して行っている。

#### (2) 試薬・使用器械

(日) ウェスタンブロッティング法を用いた脂肪酸合成阻害剤による代謝変化の解析

SCCVII 細胞株を脂肪酸合成阻害剤 0, 0.05 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M, 5 $\mu$ M に濃度をふって 24 時間培養し、培養皿からトリプシン/EDTA 法によって剥離した。RIPA Buffer のプロトコールに従い、タンパクの回収を行った。各サンプルのタンパクは BCA 法によりタンパク定量を行い、4x Laemmli 緩衝液を加えた後に、95°C で 5 分間加熱し、SDS-PAGE 用サンプルとした。SDS-PAGE ゲルにアプライし、100V, 2 時間電気泳動した後にトランスブロット TurboTM 転写システムを使用して、PVDF 膜に転写した。転写後は 1 時間 5% スキムミルクによりブロッキングを行い、TBS-T で洗浄した。それぞれの抗体を用いて一次抗体反応 (4°C, 24h) を行い、洗浄後に二次抗体反応 (室温, 1 時間) を行い、可視化して解析した。

(月) 蛍光免疫組織染色によるがん細胞における脂肪酸合成の発現量の解析

舌口腔扁平上皮癌患者の切除標本パラフィンブロックから 4 $\mu$ m パラフィン切片を作成し、65°C でベイクを行った。キシレン、エタノールを用いて脱パラフィン後に、室温で 30 分間 0.3% 過酸化水素水メタノール溶液にて内因性ペルオキシダーゼをブロックし、精製水で洗浄した。蛍光免疫組織化学は OpalTM 7-Color Manual IHC Kit を用いて行った。脂肪酸合成酵素である FaFoxp3 は Target Retrieval Solution を用いて、それ以外の抗体は AR6 を用いて 15 分間、加熱処理により抗原賦活化を行った。一次抗体反応はそれぞれ 4°C, overnight で行い、二次抗体反応は室温で 10 分間、蛍光標識抗体は室温で 7 分間反応させた。同行程を 4 回行い、解析した。画像解析には Image J を使用し、統計処理は t-test を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 脂肪酸合成阻害剤使用時の SCCVII細胞株の変化 (図 1)

マウス扁平上皮癌細胞である SCCVIIをある脂肪酸合成阻害剤存在下で培養を行うと、細胞死のマーカーである Cleaved caspase-3 は脂肪酸合成阻害剤の濃度依存的に発現上昇を認めた。また、がん抑制遺伝子とされている PTEN は脂肪酸合成阻害剤の高濃度でリン酸が高発現していることが明らかとなった。一方、癌細胞の解糖代謝を示す Akt のリン酸化は脂肪酸合成阻害剤の高濃度で発現低下を認めた。

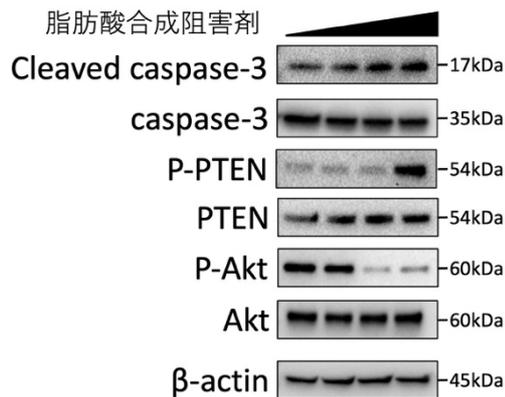


図 1. 脂肪酸合成阻害剤使用時のマウス口腔扁平上皮癌細胞の分子の変化

(2) 蛍光免疫組織染色によるがん細胞における脂肪酸合成の発現量の解析 (図 2)

ヒトの舌口腔扁平上皮癌の切除標本を用いて、腫瘍組織と周囲間質との (Fatty acid synthase ; FASN) の発現量を比較したところ、有意に腫瘍組織での発現上昇を認めた。

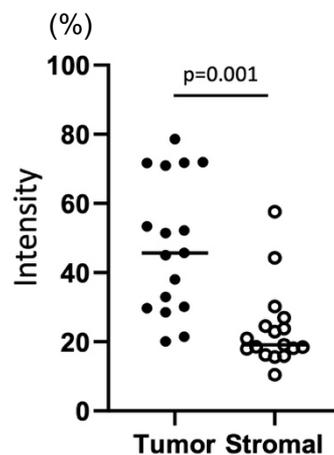


図 2. ヒト口腔扁平上皮癌における腫瘍組織と周囲間質の FASN の発現量の比較

これらの結果から、ヒト口腔扁平上皮癌においても、腫瘍組織では脂肪酸の合成が活性化されており、それを阻害することにより、抗腫瘍効果が生じる可能性を示唆する結果となった。本研究途中で申請者はアメリカへ留学することとなり、研究が一時中断したため、現在解析が遅れている。しかし、留学中に得た知見も加味して、帰国後に新たなデータを得ており、現在解析を行っている途中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------