

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19724

研究課題名（和文）脂肪細胞のリポクオリティが腫瘍増殖・浸潤に及ぼす影響

研究課題名（英文）Effect of lipo-quality of adipocytes on tumor growth and invasion

研究代表者

大和田 祐二（Owada, Yuji）

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20292211

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：メタボリック症候群をはじめとする生活習慣病の一因である脂質過剰摂取が、癌をはじめとする様々な疾患に作用するメカニズム解明は急務である。本研究では、食事摂取によって変化する癌微小環境の脂質構成や脂質代謝の変化が、がんの生物学的活性に与える影響について検証した。その結果、必須脂肪酸であるリノール酸やリノレン酸が、膵がん細胞の細胞死に重要な役割を担うこと、さらにオレイン酸およびオレイン酸の細胞内キャリアーである脂肪酸結合タンパク質（FABP7）が皮膚がんの遠隔転移能に関与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

栄養のアンバランス、とりわけ偏った脂質摂取は、発癌リスクや癌の予後と密接に関連していることが指摘されている。まさに脂肪組織の量と質の変化が特徴とされる肥満や、るい瘦（やせ）が、癌リスクと深く関連するのは周知の事実であるが、そのメカニズムに関する基礎的知見は未だ乏しい。本研究結果により、脂質嗜好性や食物の脂質成分により癌の増殖や浸潤が変化することが強く示唆された。今後、栄養と癌の相互関係がさらに明らかになることで、新たな治療法確立に向けて道を拓く可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：There is an urgent need to elucidate the mechanisms by which excessive lipid intake, a factor in metabolic syndrome and other lifestyle-related diseases, acts on various diseases, including cancer. In this study, we examined the effects of changes in lipid composition and lipid metabolism in the cancer microenvironment, which are altered by dietary intake, on the biological activity of cancer. The results indicated that linoleic acid and linolenic acid, essential fatty acids, play an important role in cell death of pancreatic cancer cells, and that oleic acid and fatty acid binding protein (FABP7), an intracellular carrier of oleic acid, may be involved in the distant metastatic potential of skin cancer.

研究分野：栄養科学

キーワード：必須脂肪酸 メラノーマ 膵癌 転移 細胞死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メタボリック症候群をはじめとする生活習慣病の一因である脂質過剰摂取が、癌をはじめとする様々な疾患に作用するメカニズム解明は急務であるが、がんを取り巻くがん微小環境ともいえる脂質環境が皮膚がんや消化器がんの増殖や浸潤にどのようなメカニズムで関与するかについては殆どわかってなかった。中でも、長鎖脂肪酸代謝の変化が、がん細胞自身あるいは微小環境を構成する様々な細胞（免疫系細胞や線維芽細胞等）に対して影響を及ぼす影響については、不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、がん微小環境の脂質構成や脂質代謝の変化が、皮膚がんや膵癌の増殖あるいは遠隔転移に与える影響、およびそのメカニズムについて、マウスモデルおよび細胞レベルで検証することを目的とした。

3. 研究の方法

細胞培養と治療

マウスメラノーマ細胞株、ヒト膵臓細胞株等は東北大学医用細胞資源センターより入手した。細胞は、ダルベッコ改変イーグル培地 (Sigma Aldrich, Co.) で、いずれも 10% (v/v) 熱不活性化ウシ胎児血清 (FBS) (Thermo Fisher Scientific Inc.) および 1% (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific Inc.) を添加し、37℃、5%CO₂ で維持した。

細胞増殖アッセイ

細胞は 12 ウェルプレートに 1×10⁴ 個/ウェルの密度で播種した。細胞増殖は、自動セルカウンター (CellDrop FL, DeNovix, DE, USA) を用いて評価した。生細胞と死細胞を識別するために、トリパンブルー排除染色を用いて細胞を数えた。細胞を 2 回洗浄し、死細胞を除去してから計数した。

Fabp7 欠損細胞および発現抑制細胞の作製

CRISPR/Cas9 Fabp7 ノックアウト B16F10 細胞は、sgRNA 発現プラスミド、マウス Fabp7 遺伝子のエクソン 1 内の標的部位を選択し、定法に従ってベクターに挿入し、メラノーマ細胞株 B16F10 細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションから 48 時間後に細胞を回収し、緑色蛍光を発現する細胞を BD FACS Aria II (日本ベクトン・ディッキンソン社製) を用いたフローサイトメトリーで選別後、96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり単一細胞として播種した。FABP7 の完全ノックアウトは DNA 配列決定分析で確認し、Fabp7 mRNA タンパク質の発現がないことを、qRT-PCR、ウェスタンブロッティング、免疫蛍光染色で確認した。

細胞移植モデル

ヘアレス SCID あるいは B6 系マウス (6 週齢) に、メラノーマおよび膵がん細胞株 (合計 3.0×10⁶ 細胞; PBS 中 1.5×10⁷ 細胞/ml の 200 μl) を、イソフルラン吸入麻酔下、25G 注射針で左骨盤肢に皮下注射した。

タイムラプスイメージング

細胞を 5×10³ cells/well の密度で 35 mm ガラス底ディッシュに播種した。血清遮断から 24 時間後、ディッシュをタイムラプスイメージングシステムを備えた顕微鏡 (BZ-X800、キーエンス、大阪、日本) にセットした。細胞追跡は、培養液を FA 培地に交換した直後から 48 時間かけて行った。

脂質過酸化アッセイ

脂質過酸化のレベルは、Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (Abcam, Cat. No. ab118970) を用いて、製造されたプロトコールに従って評価した。脂質過酸化レベルは、BSA 標準を用いた BCA アッセイ (Thermo Fisher Scientific Inc.) で評価したタンパク質レベルで正規化した。

本研究で実施した動物実験を含む実験は、東北大学医学部倫理委員会の承認を得ており、すべての実験は倫理・安全ガイドラインに従って実施された。

4. 研究成果

長鎖脂肪酸による膵癌細胞の細胞死誘導 (Sci Rep 2023)

膵癌細胞株における脂肪酸による細胞死の誘導

リノール酸(LA)および リノレン酸(LA)で処理した膵臓がん細胞株でネクロプトーシス / フェロプトーシスが誘導された。また LA および LA 処理によって上昇した脂質過酸化も、フェロスタチン-1 処理によって BSA 対照と同レベルまで抑制された

LA および LA 誘導性フェロプトーシスにおける RIP/MLKL 依存性経路

FAs 処理後 12 時間と 18 時間における MIA-Paca2 の RIP3 と MLKL のリン酸化をウェスタンブロットで評価したところ、LA 処理後 12 時間と 18 時間では RIP3 のリン酸化レベルの上昇が観察され、 LA 処理後 12 時間では RIP3 のリン酸化レベルの上昇のみが観察された

LA と LA の腹腔内投与による膵臓癌の増殖を抑制

LA および LA の Suit-2 皮下異種移植モデルの腹腔内投与では、がんの増殖を有意に抑制し、移植マウスの生存率の低下を改善した。in vitro の結果と同様に、フェロスタチン-1 は、移植後 19 日目の LA の抗がん作用と移植後 15 日目の LA の効果を消失させ、その結果、移植マウスの生存率が低下した。

脂肪酸結合タンパク質 (FABP7) によるメラノーマ細胞浸潤制御 (論文投稿中)

FABP7 欠損メラノーマ細胞株の樹立

転移性の高いマウス黒色腫細胞株 B16F10 では、転移性の低い細胞株 B16F10 と比較して、Fabp7 mRNA およびタンパク質が高発現していることを確認した。免疫細胞化学染色では、FABP7 が細胞質および核に局在していることが分かった。

CRISPR/Cas9 スプライシングシステムを用いて Fabp7 ノックアウト (KO) B16F10 細胞株を作製した。ノックアウトは qRT-PCR および、ウェスタンブロット、免疫蛍光染色により確認した。

FABP7 の欠損はこれらの細胞の増殖率に有意な影響を与えなかった

FABP7 の欠損メラノーマ細胞における浸潤亢進

Fabp7-KO 細胞は、スクラッチ創傷治癒アッセイと細胞外浸潤アッセイで評価した遊走能と浸潤能の両方で増加を示した。治癒アッセイと細胞外マトリックス (ECM) コート Boyden's chamber アッセイで評価した。Fabp7siRNA 干渉による Fabp7 ノックダウンでも、浸潤の亢進という同様の傾向が見られた。

FABP7 の欠損メラノーマ細胞における転移亢進

コントロール(CT)および Fabp7-KO B16F10 細胞を C57BL/6 マウスに皮下移植した。腫瘍形成は注入後 4-5 日目に見られ始め、KO

99 群は有意にサイズが小さかった。転移形成能を評価するために、同じ細胞株を C57 マウスの尾静脈 101 に静脈注射し、マウスの体重と行動を、注射から 14 日後まで毎日モニターした。

肺を採取して転移形成の有無を評価したところ、KO 群の病巣数は CT 群より有意に多かったが、各腫瘍の大きさは明らかに小さかった

FABP7 欠損メラノーマ細胞における脂肪酸構成

Fabp7-KO B16F10 細胞の細胞脂質含量を、液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS/MS) で評価した。コントロール群およびノックアウト群において、ホスファチジルコリン、ジアシルグリセリド、ホスファチジルエタノールアミンが最も高い脂質組成であった。遊離脂肪酸 (FA) では、アラキドン酸 (C20:4, n-6) 比が高く、次いでオレイン酸 (C18:1, n-9) であった。KO 群ではコントロール群に比べて、二重結合数の多い脂質種が全体的に減少していた。

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 2件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Umaru BA, Kagawa Y, Ohsaki Y, Pan Y, Chen CT, Chen DK, Abe T, Shi SK, Miyazaki H, Kobayashi S, Maekawa M, Yamamoto Y, Wannakul T, Yang S, Bazinet RP, Owada Y.	4. 巻 290
2. 論文標題 Oleic acid-bound FABP7 drives glioma cell proliferation through regulation of nuclear lipid droplet formation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS J	6. 最初と最後の頁 1798-1821,
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.16672.	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 Bando Y, Nagasaka A, Onozawa G, Sakiyama K, Owada Y, Amano O.	4. 巻 -
2. 論文標題 Integrin expression and extracellular matrix adhesion of septoclasts, pericytes, and endothelial cells at the chondro-osseous junction and the metaphysis of the proximal tibia in young mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Anat	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） 10.1111/joa.13820.	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 -

1. 著者名 Maruyama T, Miyazaki H, Lim YJ, Gu J, Ishikawa M, Yoshida T, Asao A, Chen WJ, Owada Y, Shibata H.	4. 巻 2023
2. 論文標題 Pyrolyzed deketene curcumin controls regulatory T cell generation and gastric cancer metabolism cooperate with 2-deoxy-d-glucose.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 1798-1821
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2023.1049713.	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 0件）

1. 発表者名 Tunyanat Wannakul, Hirofumi Miyazaki, Yoshiteru Kagawa, Motoko Maekawa, Yuji Owada
2. 発表標題 Absence of fatty acid binding protein 7 decreases growth and metastasis in murine melanoma models
3. 学会等名 第128回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shuhan Yang, Hirofumi Miyazaki, Yuji Owada
2. 発表標題 High-fat diet intake accelerates the progression of APPNL-G-F/NL-G-F Alzheimer's disease model mice by affecting the functional activity of microglia
3. 学会等名 第128回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hirofumi Miyazaki, Shuhan Yang, Yuji Owada
2. 発表標題 The role of an intracellular chaperones of long-chain fatty acids FABP7 in liver macrophages during liver diseases
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiteru Kagawa, Banlanjo Abdulaziz Umaru, Yijun Pan, Jiaqi Sun, Akane Suda, Joseph Nicolazzo, Yuji Owada
2. 発表標題 Overformation of lipid droplet by altered lipid metabolism in glioma induce ferroptosis-resistance
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
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
研究分担者	宮崎 啓史 (Miyazaki Hirofumi) (90803867)	東北大学・医学系研究科・講師 (11301)	

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
---------	---------