

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21133

研究課題名(和文) LAT1/4F2hc-インテグリン複合体を介するがん細胞特異的な生存機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of cancer specific survival system via LAT1/4F2hc-integrin complex

## 研究代表者

兼田 加珠子(中島加珠子)(Kaneda, Kazuko)

大阪大学・理学研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：00533209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：LAT1は大型中性アミノ酸を輸送するシステムLアミノ酸輸送体であり、様々ながん種において、その高発現と予後不良が相関する。LAT1を介した栄養制御ががん細胞生存に不可欠である一方、インテグリンはがん進展、転移に重要な働きを果たす。また、LAT1はインテグリンと複合体を作ることが知られているが、その共役関係は未だ明らかではない。本研究において、がん細胞特異的な栄養制御によりLAT1の発現のコントロールが可能となる事、LAT1の抑制によりインテグリンが発現抑制を受け、細胞生存・増殖能の低下が認められた。このことによりがん細胞への転化において細胞外栄養環境がその要因の一つである事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：LAT1 (L-type amino acid transporter 1) is a system L amino acid transporter that transports large neutral amino acids in a sodium independent manner, and correlation between its high expression and poor prognosis in various cancer types has been reported. It is clear that nutritional control via LAT1 is essential for cancer cell survival. On the other hand, integrins are molecules that play an important role in cancer development and metastasis. It is known that LAT1 forms a complex with integrin, but its conjugate relationship is still unknown. In this study, the expression of LAT1 was regulated by cancer cell-specific nutritional control. Expression levels of integrin are inhibit by LAT1 inhibition. LAT1 inhibition also decrease survival rate and growth speed of cancer cells. From these results, this study suggested that extracellular nutritional environment is one of the factors in conversion from normal cells to cancer cells.

研究分野：薬理学

キーワード：アミノ酸トランスポーター インテグリン 栄養制御

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞が正常の細胞とは異なり、エネルギー産生に解糖系を用いている事は、100年近く前にワーブルグによって発見されている(ワーブルグ効果)。この理由の一つとして、がん細胞は無秩序に増殖する為に血液の供給が不足して低酸素になり、低酸素の環境に適応するために、嫌気性解糖系が普段から高まっていると考えられている。また、がん細胞では酸化的リン酸化で働く酵素の異常など、ミトコンドリアの機能が低下している為に、TCA 回路と電子伝達系における酸化的リン酸化を使う事が出来ないという説もある。がん特異的転写因子の発現とインテグリン及び各種トランスポーターの発現は密接に関わっており、がん細胞の特性と物質取込機構が同時に制御されている可能性が示唆された。本研究では、がん特異的に高発現しているアミノ酸トランスポーターである LAT1 (L-type amino acid transporter 1; SLC7A5) と接着分子であるインテグリンの複合体を標的とする。LAT1 は、正常細胞における発現は血液脳関門や胎盤関門などに限られ、その発現レベルは低い、多くの悪性腫瘍細胞で発現が亢進し、腫瘍細胞の成長・増殖に重要な輸送体であると考えられる。

## 2. 研究の目的

LAT1(L-type amino acid transporter 1) は大型中性アミノ酸を Na<sup>+</sup> 非依存的に輸送するシステム L アミノ酸輸送体であり、様々ながん種において、その高発現と予後不良の相関が報告されている。LAT1 を介した栄養制御はがん細胞生存に必要不可欠であることが明らかであるが、アミノ酸シグナル応答経路に関しては不明な点が多い。一方、インテグリンはがん進展、転移に重要な働きを果たす分子である。LAT1 はインテグリンと複合体を作ることが知られているが、その共役関係は未だ明らかではない。本研究はがん細胞特異的な栄養制御と接着分子との共役関係を明らかにすることにより、LAT1/4F2hc-インテグリン複合体を介するがん細胞特異的な生存機構を解明し、正常細胞からがん細胞への転化を明らかにすることを目指すものである。

## 3. 研究の方法

### 1. LAT1/4F2hc-インテグリンの転写制御機構の解明

LAT1/4F2hc-インテグリンは各種がんにおいて高発現しているが、その転写制御機構は未だ明らかではない。LAT1/4F2hc-インテグリン複合体の発現における重要な分子及び転写活性化因子の同定により、本複合体ががん細胞で高発現する機構の解明を目指す。

#### a. プロモーター活性の評価

promoter 領域を単離し、活性化に関わる領域の同定を行う。プロモーターアッセイによ

り活性化制御領域を絞り込み、ChIP Assay を用いて活性化領域の確認を行う。

#### b. 複合体の中での key molecule の同定

LAT1/4F2hc-インテグリンそれぞれの発現を siRNA 法で抑制し、複合体発現に最も重要な因子を決定する。その後、過剰発現系において検証を行う。

## 2. LAT1/4F2hc-インテグリンを介する特異的生存機構の同定

#### a. メタボローム解析による代謝物の網羅的解析

LAT1 の阻害剤である BCH(2-aminobicyclo-(2, 2, 1)-heptane-2carboxylic acid) を用い、LAT1/4F2hc-インテグリン高発現細胞における BCH 処理前後における代謝物のメタボローム解析を行う。細胞の全代謝物を包括的に解析することにより、がん細胞特異的代謝機構の同定を試みる。

#### b. 比較定量リン酸化プロテオミクスによる網羅的解析

a. 同じ条件下で比較定量的プロテオミクスを実施する。アミノ酸による栄養刺激またはインテグリンリガンドとの接着刺激により生じるタンパク質のリン酸化を iTRAQ (Isobaric tag for relative and absolute quantitation) 法による網羅的比較定量リン酸化プロテオミクスにより解析する。サンプル間の相対定量の後、リン酸化が大きく変動するものを候補因子とする。

## 3. LAT1/4F2hc-インテグリンの関わる生存、浸潤及び転移機構の検討

#### a. 特異的リガンドによる細胞運動能の評価

ボイデンチャンバーを用いた Migration assay により、LAT1/4F2hc-インテグリンの特異的リガンド存在下における細胞の運動能力の評価を行う。また、LAT1/4F2hc-インテグリンの発現抑制及び過剰発現系を用いて同様の検討を行い、細胞生存、浸潤及び転移における影響を検討する。

#### b. 特異的リガンドによるシグナルの増強の検討

2 で絞り込んだ経路における、インテグリンリガンド及び、LAT1 を介して輸送される中性アミノ酸による刺激による変化を検証し、LAT1/4F2hc-インテグリン特異的なシグナルの同定を試みる。具体的には、各種刺激後のアミノ酸シグナル系 mTORC1 下流の p70S6K のリン酸化、及び接着シグナル系下流の Akt のリン酸化の増強を指標として検討を行う。

#### c. アミノ酸シグナルおよび接着シグナルに対する LAT1/4F2hc の影響の検討

LAT1/4F2hc-インテグリン発現抑制及び過剰発現系を用いて、b の検証を行う。

#### 4. Xenograft モデルを用いた検証

##### a. Xenograft モデルの構築

前年度に構築した LAT1/4F2hc-インテグリン発現抑制及び発現増強株を用いて、Xenograft モデルを構築する。

##### b. 免疫不全マウスに移植して作製した腫瘍塊における標的分子の発現の確認

NOG マウスで担がんマウスを作成し、形成された腫瘍塊において LAT1/4F2hc-インテグリンを介したシグナルの増強が見られるかを検討する。LAT1 を発現抑制または機能阻害した場合の増殖への影響、逆に発現増強した場合の浸潤及び転移における影響を比較し、LAT1/4F2hc-インテグリンのがん生存機構への影響を評価する。

#### 4. 研究成果

##### 1. LAT1/4F2hc-インテグリンの転写制御機構

###### a. プロモーター領域の解析結果

LAT1 の promoter 領域を単離し、活性化に関わる領域として、上流 3.5kb 周辺に活性化制御領域を同定した [図 1a]。その後、ChIP Assay を用いて活性化領域の確認を行い、標的領域への標的転写因子の結合を確認した [図 1b]。また、本制御領域には標的転写因子結合配列のみならず、AARE (amino acid reactive element) も存在している。このことにより、標的転写因子がアミノ酸シグナルとも強く関連する事が示唆された。

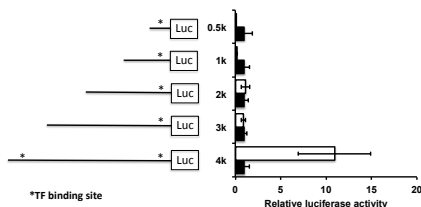


図1a Promoter assay

###### b. 複合体の中での key molecule の同定

まず、LAT1 の発現を siRNA 法で抑制したところ 4F2hc の発現に大きな変化は認められなかった。mRNA レベルで発現に高い相関の認められたインテグリンであるインテグリン  $\alpha v \beta 3$  の発現が LAT1 の発現に相関して明らかに低下し、LAT1 が最も重要な因子であると考えられた [図 1c]。

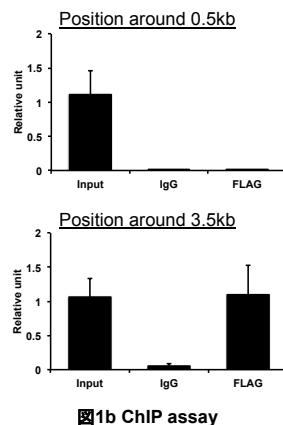


図1b ChIP assay

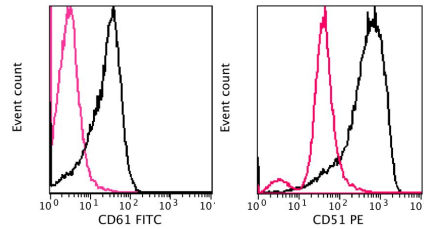


図1c 細胞表面におけるインテグリンの発現 (黒: コントロール, 赤: LAT1 knock down)

##### 2. LAT1/4F2hc-インテグリンを介する特異的生存機構の同定

###### 比較定量リン酸化プロテオミクスによる網羅的解析

LAT1 の阻害剤である BCH (2-aminobicyclo-(2, 2, 1)-heptane-2carboxylic acid) を用い、LAT1/4F2hc-インテグリン高発現ヒトがん細胞株における BCH 処理前後における比較定量的プロテオミクスを実施した。その結果、BCH 処理により mTORC シグナル系のみならず、RhoA シグナルにおいて抑制が認められることが明らかとなり、栄養刺激が細胞骨格に関わる RhoA シグナルを介して細胞生存・細胞運動能を制御している可能性が示唆された。

そこで、LAT1 抑制条件において細胞周期を確認したところ、LAT1 抑制条件において S 期の減少が認められ、LAT1 の抑制が生存・増殖機構に関わる事が確認された [図 2]。

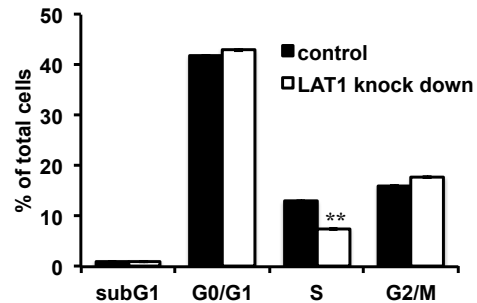


図 2. LAT1 抑制条件における細胞周期

また、同条件においてメタボローム解析を行う為のサンプリングを行った。

##### 3. LAT1/4F2hc-インテグリンの関わる生存、浸潤及び転移機構の検討

###### a. 特異的リガンドによる細胞運動能の評価

ボイデンチャンバーを用いた Migration assay により、LAT1/4F2hc-インテグリンの特異的リガンド存在下における細胞の運動能

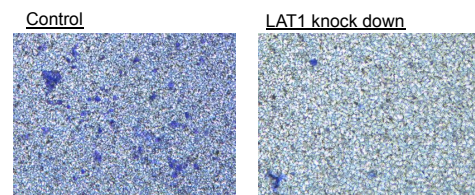


図3a Migration assay

力を評価した。また、LAT1/4F2hc-インテグリンの発現抑制系を用いて同様の検討を行った。その結果、本分子の抑制により、細胞移動能が著明に抑制される事が明らかとなった[図 3a]。

#### b. LAT1 の発現と細胞浸潤能

創傷治癒アッセイにより細胞の運動能力を評価するために、同抑制系を用いて検討したところ、LAT1 発現抑制株では明らかに細胞浸潤能も抑制されている事が確認された[図 3b]。

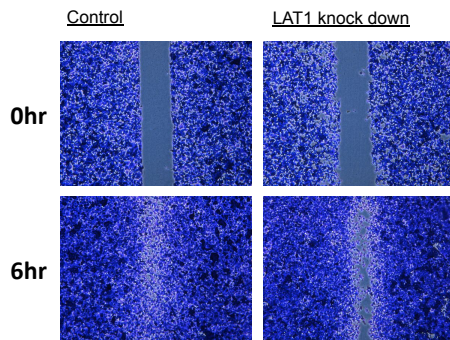


図3b 創傷治癒アッセイ

#### c. アミノ酸シグナルによる LAT1 の増強

がん特異的に LAT1 のシグナル分子であることが知られているロイシンを枯渇させることにより、LAT1 の発現に増強が認められた[図 3c]。

今後、他のアミノ酸においても検討を行うと同時にアミノ酸取り込み能の評価も必要であると考えられた。

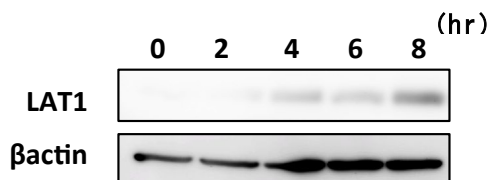


図 3c ロイシン飢餓による LAT1 の発現

### 4. マウスモデルを用いた検証

#### a. マウスモデルの構築

マウスメラノーマ細胞 B16-F10 及び LAT1 発現抑制株を用いて、マウス後肢底部への同所移植モデル及び、経静脈移植による肺転移モデルを構築した。同所移植は、 $2 \times 10^5$  cells/mouse で後肢底部に移植し、三週間後に安楽死後に腫瘍サイズの計測及び転移

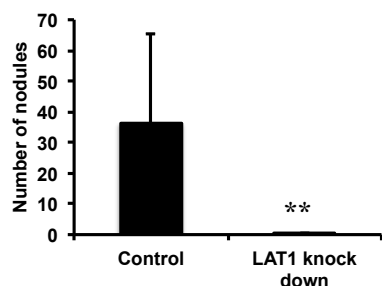


図 4a 肺転移モデルにおける結節数

の有無を評価した。肺転移モデルは、 $2 \times 10^5$  cells/mouse で経静脈移植を行い、二週間後に安楽死後に肺への結節数を計数し、転移能を比較した[図 4a]。\*\*p<0.01



図4b メラノーマ同所移植モデル

#### b. マウスモデルに移植して作製した腫瘍塊における標的分子の発現の影響

LAT1 抑制細胞株を移植した群は、肺転移モデルにおいて、明らかに結節数の減少が認められた。また、同所移植モデルにおいては、明らかに腫瘍のサイズに縮小が認められた。これらの結果から、細胞の運動能が LAT1 の阻害により阻害される事が明らかとなった[図 4b]。

Xenograft モデルの構築に先立って、ウイルスベクター及び CRISPER/Cas9 system を用いてヒトがん細胞株において LAT1 抑制株の構築を試みた。しかしながら、LAT1 を強く抑制すると細胞増殖が著しく抑制され、研究期間内に使用に適した細胞の構築が出来なかった。今後、細胞株の構築と共にヒト細胞を用いた検討に同様の傾向が認められるかの検証が必要であると考えられる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) Ohgaki R, Ohmori T, Hara S, Nakagomi S, Kanai-Azuma M, Kaneda-Nakashima K, Okuda S, Nagamori S, Kanai Y. Essential roles of L-type amino acid transporter 1 in syncytiotrophoblast development by presenting fusogenic 4F2hc. Mol Cell Biol. 2017 Mar 20. pii: MCB.00427-16.
- (2) Kongpracha P, Nagamori S, Wiriyasermkul P, Tanaka Y, Kaneda K, Okuda S, Ohgaki R, Kanai Y. Structure-activity relationship of a novel series of inhibitors for cancer type transporter L-type amino acid transporter 1 (LAT1). J Pharmacol Sci. 2017 Feb;133(2):96-102.
- (3) Shigemura T, Shiohara M, Kato M, Furuta S, Kaneda K, Morishita K, Hasegawa H, Fujii M, Gorlach A, Koike K, Kamata T. Superoxide-Generating Nox5 $\alpha$  Is Functionally Required for

the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Induced Cell Transformation Phenotype. *J Virol.* 2015 Sep;89(17):9080-9.

〔学会発表〕(計 11 件)

- (1) 魏 玲, 大垣 隆一, 富永 英之, 兼田 加珠子, 奥田 傑, 永森 收志, 金井 好克. 有機アニオントランスポーター OAT1 に対する芳香族アミノ酸誘導体の構造活性相関: イメージングプローブの腎臓におけるバックグラウンド集積を誘起する分子内構造の同定. Structure-activity relations of aromatic amino acid derivatives to interact with organic anion transporter OAT1 reveal critical moieties for renal accumulation of imaging probes. 第 90 回 日本薬理学会年会. 平成 29 年 3 月 15 日 (水) ~ 17 日 (金) 長崎ブリックホール, 長崎新聞文化ホール アストピア, 長崎
- (2) 兼田 加珠子, 魏 玲, Pornparn Kongpracha, 大垣 隆一, 永森 收志, 金井 好克. アミノ酸トランスポーター LAT1 阻害によるがん転移抑制効果の検討. 第 130 回 日本薬理学会近畿部会. 平成 28 年 11 月 19 日 (土) 京都大学百年時計台記念館, 京都
- (3) 兼田 加珠子, 永森 收志, 疋田 隼人, 竹原 徹郎, 金井 好克. Effects of non-competitive LAT1-inhibitor on anti-cancer drug-resistant cell lines, LAT1 非競合阻害薬の抗がん剤耐性細胞株への薬効の検討. 第 75 回 日本癌学会学術総会. 平成 28 年 10 月 6 日 (木) ~ 8 日 (土). パシフィコ横浜, 神奈川
- (4) 兼田 (中島) 加珠子, 陳 映安, 伊藤 万理子, Quan Lili, Ling Wei, Pornparn Kongpracha, 大垣 隆一, 永森 收志, 金井 好克. LAT1 阻害薬の抗がん剤耐性株への効果の検討. 第 11 回トランスポーター研究会年会 2016 年 7 月 2 日 (土)・3 日 (日) 京都大学 宇治キャンパスきはだホール, 京都
- (5) 兼田 (中島) 加珠子, 疋田 隼人, Pornparn Kongpracha, Ling Wei, 大垣 隆一, 永森 收志, 竹原 徹郎, 金井 好克. Inhibitor of amino acid transporter is useful as a novel anti-cancer drug. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015 年 12 月 1 日 (火) ~ 4 日 (金) 神戸ポートアイランド, 兵庫
- (6) Pornparn Kongpracha, Noriyuki Isozumi, Pattama Wiriyasermkul, Kazuko Kaneda-Nakashima, Suguru Okuda, Ryuichi Ohgaki, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai. Leucine transported

by cancer-type amino acid transporter LAT1 affects multiple cellular processes in pancreatic cancer cells. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015 年 12 月 1 日 (火) ~ 4 日 (金) 神戸ポートアイランド, 兵庫

- (7) 兼田 加珠子, Pornparn Kongpracha, Ling Wei, 大垣 隆一, 永森 收志, 金井 好克. アミノ酸トランスポーター阻害薬による抗腫瘍薬作用増強効果についての検討 第 37 回生体膜と薬物のシンポジウム 2015 年 11 月 19 日 (木)・20 日 (金). 熊本大学薬学部, 熊本
- (8) 兼田 (中島) 加珠子, 永森 收志, 金井 好克. Investigation of regulation mechanisms of cancer specific amino acid transporter, LAT1. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日 (木) ~ 10 日 (土). 名古屋国際会議場, 愛知
- (9) 兼田 加珠子, Pornparn Kongpracha, Ling Wei, 大垣 隆一, 永森 收志, 金井 好克. アミノ酸輸送体阻害薬による抗がん剤作用増強効果についての検討 第 24 回日本 Cell Death 学会学術集会 2015 年 7 月 11 日 (土)・12 日 (日). 大阪大学会館, 大阪
- (10) Kazuko Kaneda, Yusuke Saito, Akira Suekane, Shingo Nakahata, Gene Kurosawa, Koichi Sato, Yukio Sudo, Kazuhiro Morishita. A Novel Molecular-target Therapy for Therapy-resistant AML by Human Anti-ITGA6/B4 Antibody. The Latest Advances in Hematological Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics. The 5th JCA-AACR Special Joint Conference. July 13-15, 2016. Tokyo Bay Maihama Hotel Club Resort, Japan.
- (11) Kazuko Kaneda-Nakashima, Yusuke Saito, Akira Suekane, Shunsuke Shimosaki, Kazuhiro Morishita. Inhibition of GPR56 by PI-polyamide targeting the EVII-binding site with suppression of leukemia. International society for experimental hematology, 44th annual scientific meeting. September 17-19, 2015. Kyoto International Conference Center, Japan.

〔図書〕(計 1 件)

宮崎大学動物実験プロトコル編集委員会編 「大・中・小動物実験プロトコル」宮日文化情報センター 2016 年

- (1) 兼田 加珠子. 2-2-2. 免疫不全動物とは. 第 2 章 動物実験の対象; 27-29.

(2) 森下和広, 兼田 加珠子. 4-10. ATL 関連  
遺伝子群の単離・機能解析. 第4章 動物実験  
手法; 84-87.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 化合物またはその塩および医薬組成物  
発明者: 森下 和広, 兼田 加珠子, 斎藤 祐  
介, 永瀬 浩喜  
権利者: 国立大学法人宮崎大学  
種類: 特開  
番号: 2016-179973  
出願年月日: 平成 28 年 3 月 23 日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし。

## 6. 研究組織

- (1) 兼田 加珠子 (KANEDA, Kazuko)  
大阪大学・大学院理学研究科・特任助教  
(常勤)  
研究者番号: 00533209