

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07001

研究課題名(和文) がん型アミノ酸トランスポーターLAT1を標的とした胆道癌治療効果と発癌経路の解明

研究課題名(英文) L-type amino acid transporter 1(LAT1) as a molecular target for chemotherapy against bile duct carcinoma

研究代表者

柳澤 信之 (Yanagisawa, Nobuyuki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80337914

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)：ヒト胆道癌細胞株についてcell block免疫染色、Real time RT-PCR、western blotting法でLAT1・LAT2の発現を確認した。うちTFK1がLAT1高発現・良好な細胞増殖能を示したため、LAT1新規阻害薬JPH203と標準治療薬ゲムシタピン、mTOR分子治療薬エベロリムスの細胞増殖抑制効果について検討した。細胞増殖抑制効果はゲムシタピン>JPH203・エベロリムスの順で強く、共投与による効果増強がみられた。siRNA・レンチウイルスベクターを用いたshRNAによるLAT1 knockdown細胞株を複数作製しLAT1発現低下を確認した。現在実験継続中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以前我々は胆道癌において正常上皮よりもLAT1が発現亢進し、その高発現は独立した有意な予後不良因子であることを報告した(Cancer Med., 2014)。今回我々はLAT1高発現で新規阻害薬JPH203での効果が期待され、かつ悪性度の高い胆道癌細胞株について、新規LAT1選択的阻害薬JPH203による腫瘍抑制効果を確認した。また現在胆道癌の標準的治療薬のひとつであるゲムシタピン、あるいはLAT1下流経路であるmTORの分子標的阻害薬エベロリムスの共投与によって追加の抗腫瘍効果を認めた。LAT1を新たな標的としたがん治療の臨床応用のための基礎的データが得られた。

研究成果の概要(英文)：The expression of LAT1 and LAT2 was confirmed for human biliary tract cancer cell lines by cell block immunostaining, Real time RT-PCR and western blotting. Of these, TFK1 showed high LAT1 expression and appropriate cell proliferation, therefore we investigated the cell proliferation inhibitory effects of LAT1 novel inhibitor JPH203, Gemcitabine and mTOR molecular therapeutic agent Everolimus. The cell growth inhibitory effect was stronger in the order of Gemcitabine> JPH203 / Everolimus, and the effect was enhanced by co-administration. Multiple LAT1 knockdown cell lines were prepared by both siRNA and shRNA using lentivirus vector, and the decrease in LAT1 expression was confirmed. Further experiments are currently underway.

研究分野：人体病理学

キーワード：胆道癌 アミノ酸トランスポーター 抗がん剤

## 1. 研究開始当初の背景

分岐アミノ酸や芳香族アミノ酸など、大きな側鎖を持つ中性アミノ酸の細胞内への取り込みにはシステム L と呼ばれる Na<sup>+</sup>非依存性アミノ酸トランスポーターが重要な役割を果たしている (Kanai Y. *et al.*, *J Biol Chem.*, 1998)。L-type amino acid transporter 1 (LAT1、SLC7A5) は、悪性神経膠腫など種々の悪性腫瘍細胞で高発現していること、かつ近位尿管など正常細胞で主に発現しているそのホモログ LAT2 とは発現パターンが異なっていることから、がん型トランスポーターと考えられており、現在がん型として LAT1・LAT3、正常型として LAT2・LAT4 の LAT ファミリーが同定されている。

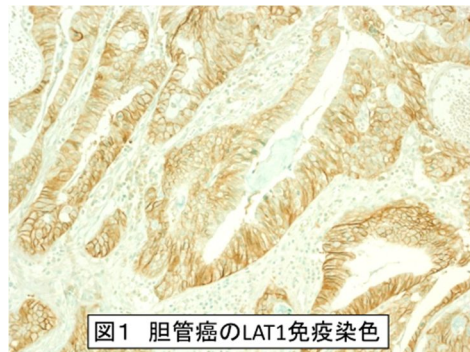


図1 胆管癌のLAT1免疫染色

免疫染色による我々の解析では、(1)胆道癌(乳頭部癌・肝外総胆管癌・肝門部胆管癌・肝内胆管癌)は正常胆管上皮と比較し細胞膜の LAT1 発現が亢進しており(図1) LAT1 高発現群は低発現群よりも有意に予後が悪かった(図2)。LAT1 発現量と Ki-67 陽性率の間に有意な正の相関がみられた。多変量解析では分化度・LAT1 発現量・切除断端・pT stage が有意な予後因子であった。LAT1 優位発現群と LAT2 優位発現群では前者で予後が悪い傾向がみられ、アミノ酸取込み機能が高く「悪性度の高い」LAT1 と、正常タイプである LAT2 の性格の違いが生物学的に影響しているものと推測された。また(2)蛍光二重免疫染色では腫瘍細胞での LAT1・LAT2 の局在は異なっていた(図3)(Yanagisawa N. *et al.*, *Cancer Med.*, 2014)。これらの結果から、LAT1 高発現と腫瘍の悪性度は強い相関があると考えられる。

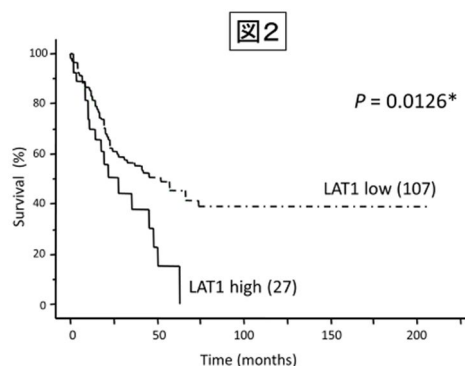


図2

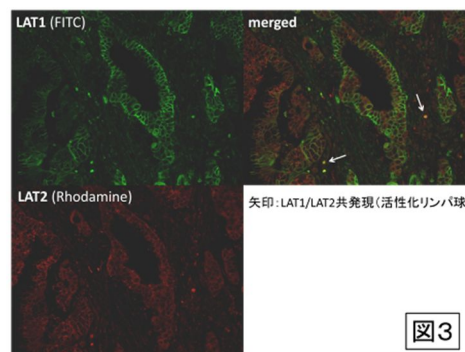


図3

## 2. 研究の目的

そこで、上述の我々の臨床材料での結果を踏まえて、

(1) LAT1 高発現で悪性度の高いヒト胆道癌の細胞株を用いて LAT1 発現を変化させ、細胞増殖能や正常型 LAT2 発現量の変化、LAT1 下流経路の変化を調べる。

(2) LAT1 阻害薬 JPH203 単独及び他の抗がん剤(ゲムシタピン等、あるいは mTOR 阻害剤)との併用投与による腫瘍増殖抑制効果を確認する。

(3) 胆道手術材料で癌・前癌病変について LAT1・LAT2 の発現量・局在の差を免疫組織化学的に解析することで、臨床応用のための胆管癌 LAT1 の基礎的データ収集と胆道発癌経路の解明を目的とする。

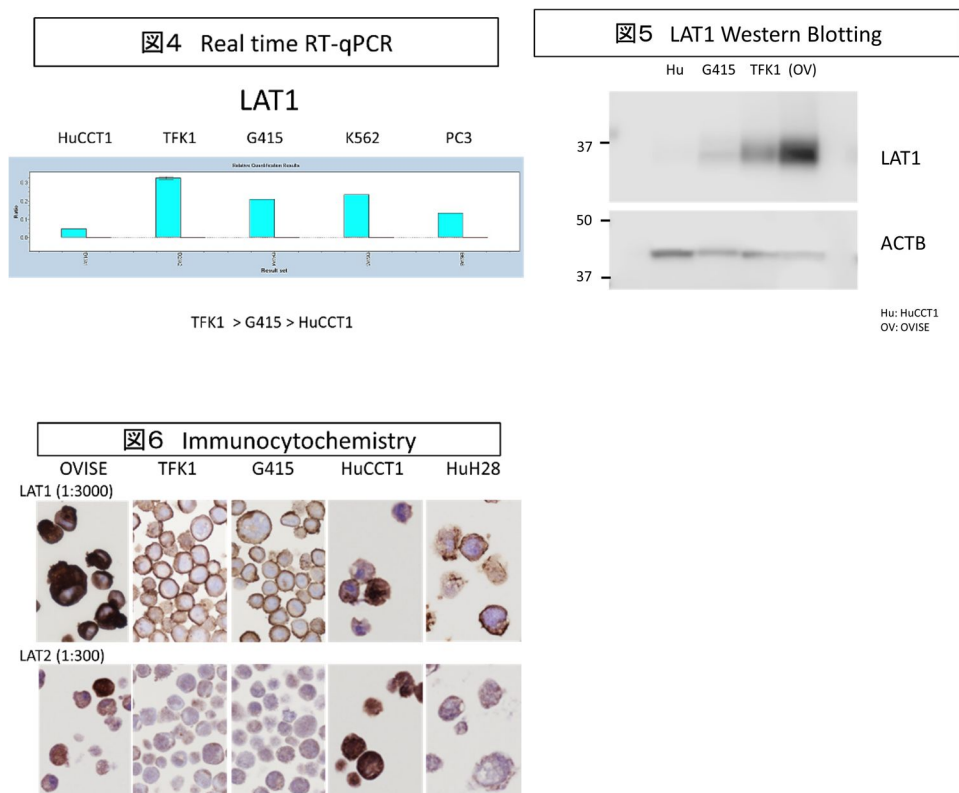
### 3. 研究の方法

ヒト胆道癌細胞株 (TFK1・HuCCT1・HuH28・G415、全て理研 BRC より購入) を使用し以下の解析を行った。

- (1) 東洋紡 THUNDERBIRD Probe RT-qPCR キットを使用して各培養細胞より mRNA を抽出し cDNA 合成後、PrimeTime qPCR Assay (Integrated DNA technologies) で Real time RT-qPCR を行った。
- (2) 各培養細胞のタンパクを抽出し、抗 LAT1 マウスモノクローナル抗体 (J-Pharma、一部 CST 社製でも確認) 抗 LAT2 ラビットポリクローナル抗体 (MBL) 抗 ACTB マウスモノクローナル抗体 (MBL) を用いて Western Blotting を行った。
- (3) 各培養細胞ペレットをホルマリン固定・パラフィン包埋しセルブロックを作製して、上記抗体についての免疫染色を行った。
- (4) LAT1 選択的阻害薬 JPH203 (J-Pharma) 胆道癌の標準治療薬ゲムシタピン (ジェムザール注射液、日本イーライリリー) LAT1 下流 mTOR 経路に対する分子治療薬エベロリムス (Sigma-Aldrich) についての毒性実験を行った。CCK-8 (同仁科学) で吸光度を計測し生存細胞数とした。
- (5) siRNA (Invitrogen Stealth siRNA)・Lipofectamine RNAi MAX (Thermo Fisher Scientific) を用いて LAT1 knockdown 細胞株を複数作製し、LAT1 の mRNA・タンパク発現を確認した。
- (6) レンチウイルスベクター・MISSION shRNA (Sigma-Aldrich) で遺伝子導入を行い puromycin 選択培地を用いて stable な LAT1 knockdown 細胞株を作製し、LAT1 の mRNA・タンパク発現を確認した。

### 4. 研究成果

上記の胆道癌細胞株と対照とした別細胞株について Real time RT-qPCR・Western Blotting・セルブロック免疫染色で LAT1・LAT2 の発現を確認した (図 4~6)。



これらの結果から LAT1 高発現かつ細胞膜への発現局在がみられた TFK1・G415 について、JPH203 製剤とゲムシタピン、さらにエベロリムスの細胞増殖抑制効果を検討した。

細胞増殖抑制効果はゲムシタピン > エベロリムス > JPH203 製剤の順で強く、エベロリムス・JPH203 共投与による効果増強がみられた (図 7~12)。

図7 TFK1 Gemcitabine 投与実験

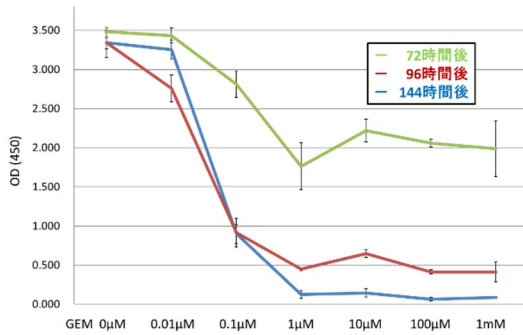


図8 G415 Gemcitabine 投与実験

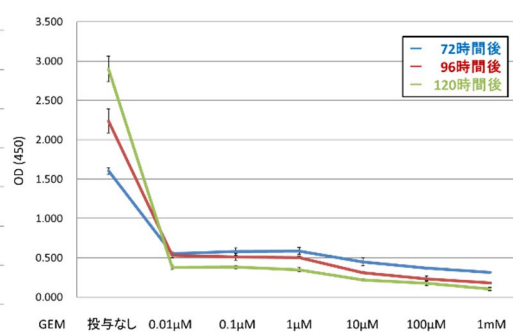


図9 TFK1 JPH203製剤 投与実験

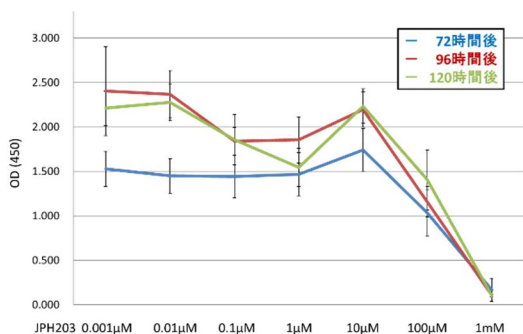


図10 G415 JPH203製剤 投与実験

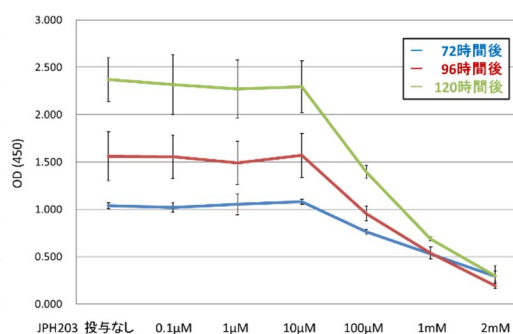


図11 TFK1 Everolimus 投与実験

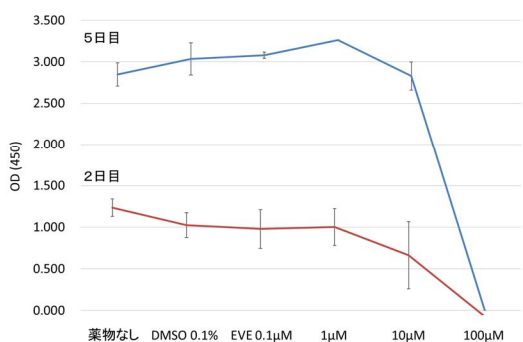
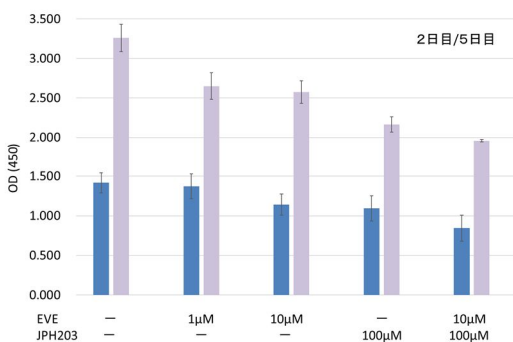


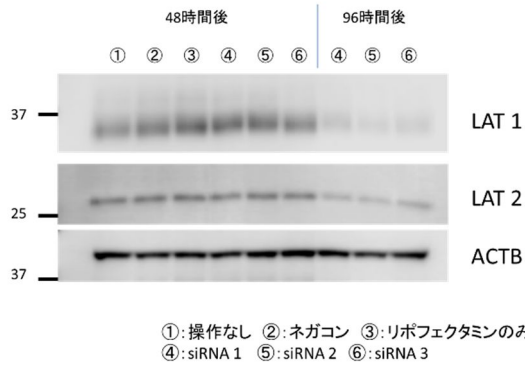
図12 TFK1 Everolimus + JPH203製剤 投与実験



次に TFK1 に対して RNAi 実験を行った。

3 種類の siRNA を用いて導入操作後 48 時間では明らかな LAT1 発現抑制はみられなかったが、96 時間後より約 1 週間以上の LAT1 の一時的な発現低下が確認された (図 13)。

図13 TFK1 siRNA Western Blotting



またレンチウイルスベクターを用いた shRNA による stable な LAT1 knockdown 細胞株を複数作製し、LAT1 発現低下を確認した(図 14・15)。現在追加実験を含め解析を継続中である。

図14 TFK1 shRNA Western Blotting

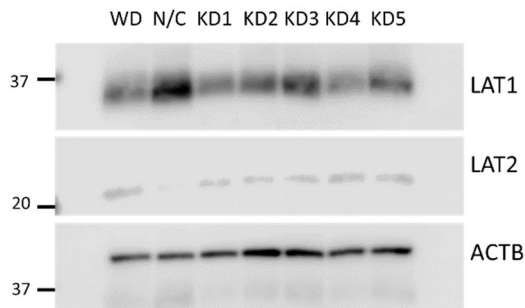
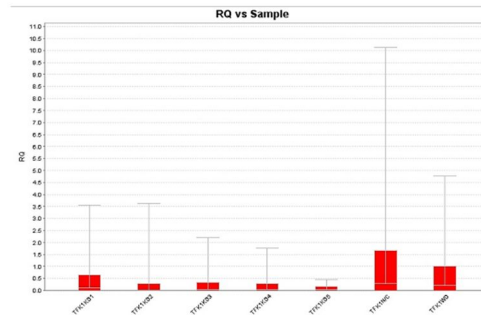


図15 TFK1 Real Time RT-qPCR (LAT1)



## 参考文献

1. Yanagisawa N., *et al.*: High expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinomas. *J. Clin. Pathol.*, 65(11): 1019~1023, 2012.
2. Yanagisawa N., *et al.*: High expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) as a prognostic marker in bile duct adenocarcinomas. *Cancer Med.*, 3(5): 1246~1255, 2014.

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