

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16743

研究課題名(和文) アミノ酸シグナル経路における輸送体LAT1下流の未知のリン酸化ネットワークの解明

研究課題名(英文) Revealing of phosphorylation signaling in the downstream of LAT1 in cancer cells

研究代表者

岡西 広樹(Hiroki, Okanishi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70792589

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)：がん細胞特異的アミノ酸輸送体LAT1は、リン酸化シグナルを刺激するアミノ酸の輸送を介して、がん細胞内環境を形成する。本研究では、LAT1依存的リン酸化動態を網羅的に解明した。LAT1阻害薬JPH203が有意な抗腫瘍効果を示した胆道がん細胞株4種で、LAT1阻害薬によるリン酸化・発現タンパク質変動をプロテオーム解析技術で解析した。数千のリン酸化変動・タンパク質発現変動を同定し、LAT1の広範な影響を明らかにした。有意な変動分子群を統合・抽出し、分子ネットワーク解析により重要な経路・調節因子の関与を示した。特に顕著だったCDKsなどは阻害薬検証を行い、臨床応用可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LAT1はがん細胞特異的に発現し、シグナル分子として働くアミノ酸の取り込みを介して細胞内環境を制御すると考えられている。しかし、mTORC1などよく知られた例以外はまだ不明な点が多かった。本研究により、LAT1阻害に伴う大規模なリン酸化動態変動が解明されたことは、今後のLAT1研究の基盤情報を提供するとともに、LAT1阻害による抗腫瘍作用を理解するために有用である。また、本研究ではがん細胞増殖抑制に関係する細胞周期停止におけるLAT1のかかわりを検証するのみならず、細胞周期関連リン酸化酵素阻害薬とLAT1阻害薬との併用で有用な抗腫瘍効果を明らかにした。これは今後の臨床応用可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：L-type amino acid transporter, LAT1, is highly expressed in cancers, and regulates phosphorylation signals which is stimulated by amino acids. We comprehensively elucidated LAT1-dependent phosphorylation dynamics in four biliary tract cancer cell lines sensitive to LAT1-specific inhibitor, JPH203. By using proteomic techniques, we analyzed changes in phosphorylation and protein expression induced by the LAT1 inhibitor. Thousands of differentially phosphorylated sites and differentially expressed proteins were identified, which suggests the broad influence of LAT1 on cancer cells. Molecular network analysis indicated influences of LAT1 inhibition on important pathways and regulators. Notably, inactivation of CDKs were found in all four cell lines. We found combination of CDK inhibitors and LAT1 inhibitor significantly reduced cancer cell proliferation compared with single inhibitor alone, which suggests clinical potentials of the combination in cancer therapies.

研究分野：プロテオーム解析

キーワード：アミノ酸 トランスポーター プロテオミクス リン酸化プロテオミクス シグナル伝達 アミノ酸トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

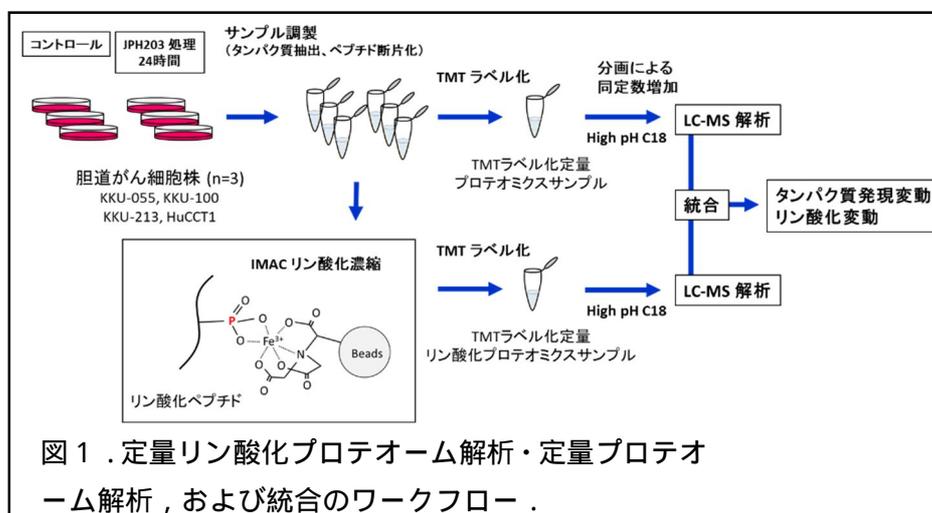
正常細胞と異なり急速な細胞増殖を行うがん細胞では、細胞内代謝が亢進されている。そのため、アミノ酸をはじめとした栄養素を正常細胞より多く取り入れる特異な機構が必要となる。L-type amino acid transporter 1 (LAT1)は、Na⁺非依存的に大型中性側鎖を持つアミノ酸を交換輸送するアミノ酸輸送体であり、研究開始当時の時点で、すでに大腸がん、肺がん、胆道がんをはじめとする多くのがんで発現が上昇することが明らかにされ、すい臓がんをはじめとする多くのがんで、予後不良との関係が示唆されていた。また、様々な癌腫においてLAT1を標的とした阻害薬の腫瘍抑制効果が報告されていた。アミノ酸は、タンパク質生合成等に必須の栄養素であるのみならず、シグナル分子として働き、細胞増殖等の調節に関わるシグナルを伝達するタンパク質リン酸化ネットワークを刺激する。たとえば、細胞増殖をはじめ広範な細胞機能に関わるmTORC1は、アミノ酸刺激に応答して、p70S6Kおよび4EBP1のリン酸化を介したタンパク質リン酸化ネットワークにより、タンパク質の翻訳を促進することはよく知られている。がん特異的に発現するアミノ酸トランスポーターLAT1は、アミノ酸輸送を介して細胞内のタンパク質リン酸化ネットワークを刺激することで、がん細胞を特徴づけるシグナル伝達形成に寄与しているものと考えられており、有用な治療標的として研究が進められていた。しかし、その一方で、前述のmTORC1等の非常によく知られた例を除けば、LAT1によるシグナル伝達には、不明な点が多かった。LAT1依存的なリン酸化ネットワークの全容を解明することは、LAT1により活性化される未知のタンパク質リン酸化経路を明らかにするのみならず、LAT1阻害による腫瘍抑制効果を理解することに繋がることと期待された。

2. 研究の目的

がんで発現上昇が知られるLAT1はアミノ酸取り込みに寄与し、必要な栄養の確保のみならずアミノ酸のシグナル分子としての働きから、細胞内シグナル調節機構への寄与が示唆されていた。しかし、mTORC1などよく知られた例を除けば、LAT1下流のシグナルの全容は不明な点が多かった。本研究では、LAT1依存的なリン酸化ネットワークの全容を解明することを目的とした。これはがん細胞におけるLAT1依存シグナルの働きを明らかにするのみならず、様々な癌腫で報告されているLAT1標的阻害薬による抗腫瘍作用を理解することに役立つものと期待された。さらに、リン酸化ネットワークにより伝達されたシグナルによって、タンパク質/酵素の翻訳調節がなされることで細胞機能が制御されることを考え、LAT1依存的な発現タンパク質/酵素の変動の全容を併せて明らかにすることで、LAT1を介するアミノ酸シグナル機構を理解する手がかりを得ることも目的として研究を行った。よって、本研究では、「タンパク質リン酸化ネットワーク全体において、いずれの経路がLAT1依存的にリン酸化動態変動するのか」また「LAT1特異的シグナル伝達による翻訳調節でいずれの細胞機能に関わるタンパク質/酵素群が発現変動するのか」を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

LAT1特異的なシグナル伝達において、活性化/不活性化されるタンパク質のリン酸化ネットワーク、および伝達の結果として調節されるタンパク質翻訳動態の全容を明らかにすることを目的として、(1)がん細胞特異的に恒常的に発現するLAT1を特異的に阻害したうえで、(2)LAT1発現状態との比較を網羅的手法によって行った。図1で示すように、本研究では、(1)申請者の所属する研究室で近年開発され精力的に研究を進めている非常に特異性の高いLAT1選択的阻害薬JPH203を使用することで、LAT1による下流のアミノ酸シグナル経路を遮断したサンプルを準備



した。そのうえで、(2)タンパク質リン酸化ネットワーク全体の対象とした網羅的かつ定量的な解析(定量リン酸化プロテオーム解析)を行った。また、シグナル伝達によって制御されるタンパク質の翻訳変動の全体を対象とした網羅

的かつ定量的な解析(定量プロテオーム解析)を併せて実施した。そのための予備的検討として、現在 JPH203 で臨床試験が進められている胆道がんの細胞株に着目し、濃度依存的な LAT1 阻害薬による細胞増殖変化を、WST assay により評価し、網羅的解析の対象とする細胞株 4 種を決定した。有意な抗腫瘍効果(図 2)を示した細胞株について、定量リン酸化プロテオーム解析・定量プロテオーム解析をそれぞれ行い、(a) 細胞内全タンパク質発現動態、(b) 細胞内全タンパク質のリン酸化動態を詳細に解明した。具体的には、LAT1 阻害薬の添加の有無のそれぞれの条件で細胞株を培養(n=3)し、細胞サンプルから、膜タンパク質を含む多くのタンパク質の可溶化法(相間移動溶解剤による抽出法)でタンパク質を抽出し、定量プロテオーム解析による発現差異解析、定量リン酸化プロテオーム解析による修飾動態差異解析に供した。さらに、(3) これらの結果を統合して、すべての発現変動分子群の統計学的抽出およびデータベース化し、統計学的に有意な発現変動分子群、およびリン酸化修飾変動分子群を抽出し、分子ネットワーク解析ソフト IPA およびリン酸化酵素活性予測の手法である Kinase substrate enrichment 解析を行った。(4) 抽出された LAT1 阻害薬による変動分子群のうち、特に細胞株間で共通して重要性が示唆されたものについて検証し、(5) 顕著な発現変動差異が確認できた分子群に関して、特異的阻害薬による治療標的候補分子の臨床応用の可能性の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 胆道がん細胞株における LAT1 阻害薬によるリン酸化変動・タンパク質発現変動の網羅的解析

予備的検討として、胆道がん細胞株 4 株(KKU-055, KKU-100, KKU-213, HuCCT1)において、研究室で開発に携わった非常に特異的な LAT1 阻害薬 JPH203 による増殖抑制能を評価し、有意な抗腫瘍作用を確認できた(図 2)。この 4 細胞株を対象として、JPH203 処理 1 日の細胞サンプルおよびそのコントロール細胞サンプルを準備し、定量リン酸化プロテオーム解析および定量プロテオーム解析を行った(図 1)。結果、平均 6431 タンパク質が同定され、TMT ラベル化による定量値が平均 4983 タンパク質で得られた。また、平均 15019 箇所の定量可能なリン酸化部位が同定された。そのうち、KKU-055, KKU-100, KKU-213, HuCCT1 において、JPH203 処理による発現変動が 348, 342, 252, 1315 タンパク質で明らかになり、リン酸化変動が 4777, 3943, 3990, 5574 部位で示すことができた。これは、がん細胞において LAT1 がシグナルおよびタンパク質発現調節に与える広範な影響を示したものであった。

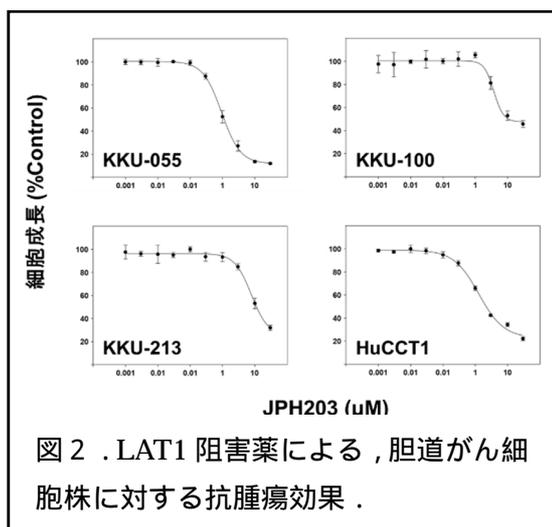


図 2 . LAT1 阻害薬による、胆道がん細胞株に対する抗腫瘍効果。

(2) 胆道がん細胞における LAT1 阻害に伴う変動分子のパスウェイ解析

JPH203 処理 1 日で変動を明らかにした分子を、定量リン酸化プロテオーム解析、定量プロテオーム解析のそれぞれで抽出し、パスウェイ解析によって活性変動経路の抽出を行った(Ingenuity Pathway Analysis, IPA)。さらに、細胞株間で共通した活性変動を示す経路を抽出した(図 3)。結果、定量プロテオーム解析の結果からは、細胞周期停止の誘導経路の活性化、細胞周期進行経路の不活性化が示唆された。これは、LAT1 阻害により示された増殖抑制効果(図 1)に一致するものであり、作用経路を示唆する結果を得ることができた。また、tRNA にアミノ酸を付加する経路の活性化が示唆された。これは LAT1 阻害による細胞内アミノ酸レベルの変動、および減少が予想されるアミノアシル tRNA 量を補う反応と考えられた。リン酸化プロテオーム解析の結果からは、アクチン細胞骨格制御経路の活性化、ERK/MAPK 経路の活性化、ストレス活性化タンパク質キナーゼ経路の活性化が示唆され、LAT1 阻害による細胞内に与える影響および調節経路を新たに示すことができた。

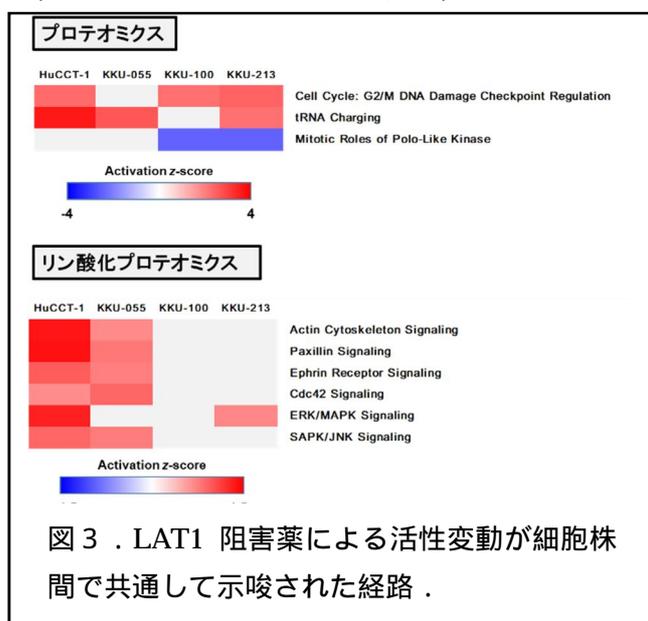
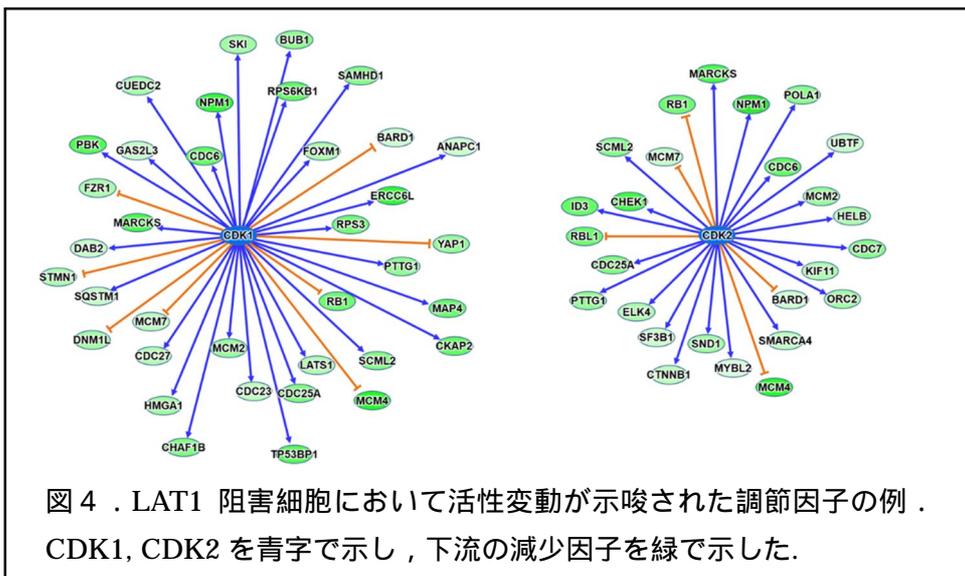


図 3 . LAT1 阻害薬による活性変動が細胞株間で共通して示唆された経路。

(3) 胆道がん細胞における LAT1 阻害に伴う変動分子の上流調節因子解析

JPH203 処理 1 日で変動を明らかにした分子を、定量リン酸化プロテオーム解析、定量プロテオーム解析のそれぞれで抽出し、上流調節因子解析によって活性変動経路の抽出を行った (IPA)。さらに、細胞株間で共通した活性変動を示す経路を抽出した。結果、転写因子、リン酸化酵素、miRNA など LAT1 の下流にあり、さらに下流のリン酸化シグナルあるいはタンパク質発現を調節していることが示唆される因子を数十示すことができた。たとえば、細胞周期関連リン酸化酵素 CDK1 や CDK2 では数十の下流因子が減少していることが明らかになった (図 4)。これらの因子を研究することで LAT1 依存的な働きが今後明らかになることが期待された。

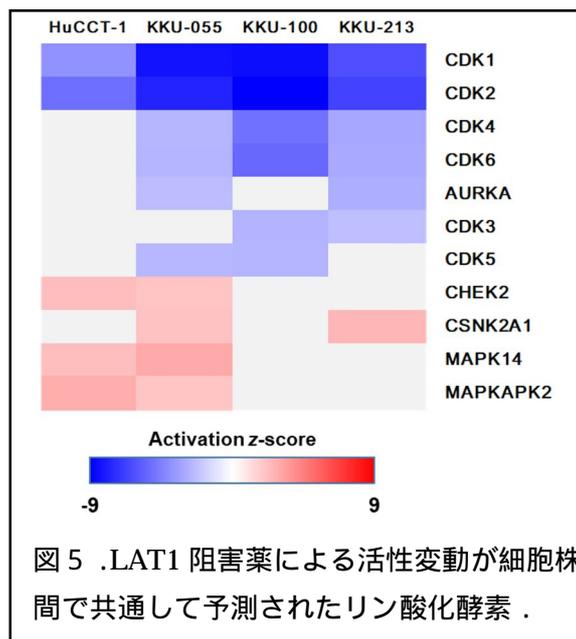


(4) 胆道がん細胞における LAT1 阻害に伴う変動リン酸化部位の責任酵素予測

JPH203 処理 1 日で変動を明らかにしたリン酸化部位を抽出し、それらリン酸化部位を触媒するリン酸化酵素を予測する Kinase substrate enrichment 解析を施行した。さらに、細胞株間で共通した活性変動が示唆されたリン酸化酵素を抽出した (図 5)。結果、特に細胞周期関連のリン酸化酵素が、LAT1 阻害細胞において、細胞株間で共通して活性抑制されていることが示唆された (CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK6, AURKA)。特に、CDK1, CDK2 はすべての細胞株で抑制が示唆された。また、以上の結果から LAT1 阻害薬 JPH203 による細胞周期停止機構が示唆されたため、その影響を調べたところ、すべての細胞株で JPH203 処理により G0/G1 期細胞の増加が検出され、LAT1 阻害による G0/G1 アレストが示された。

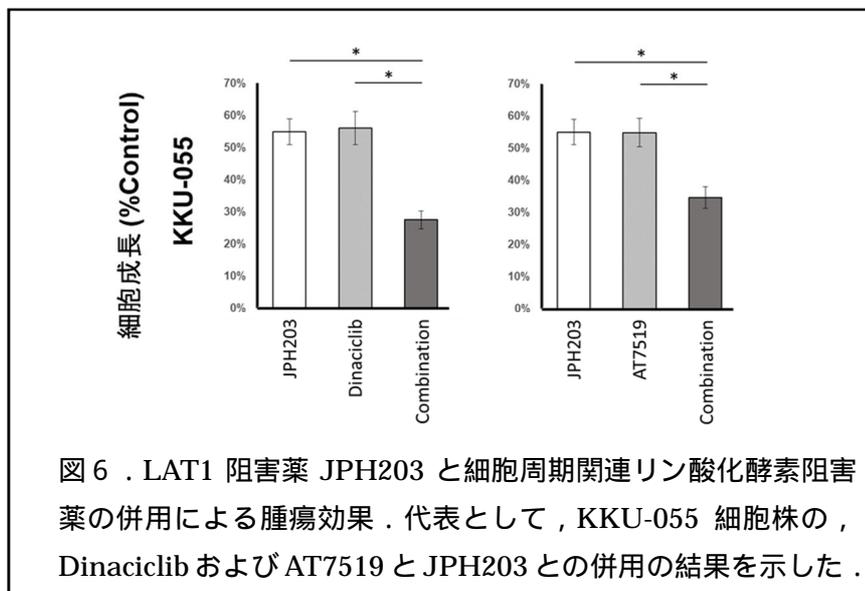
(5) 胆道がん細胞における細胞周期関連リン酸化酵素の併用標的としての評価

(1)-(4) までの結果によって、LAT1 阻害細胞における細胞周期停止に関わる経路、および細胞周期関連リン酸化酵素の活性抑制が、胆道がん細胞株共通の現象として示唆された。そこで、Kinase substrate enrichment 解析で示された細胞周期リン酸化酵素を標的とした阻害薬と JPH203 処理との併用による抗腫瘍効果について評価した。CDKs については、広く標的 CDKs の異なる阻害薬 Dinaciclib, Milciclib, AT7519, Palbociclib を選択した。また、AURKA 阻害薬として Alisertib を選択した。いずれも FDA 承認済みや臨床試験中の阻害薬を選択し、臨床応用の可能性を確保した。結果、今回研究対象とした胆道がん細胞株において広く、細胞周期関連リン酸化酵素阻害薬と JPH203 の併用が、単独処理に比べて有意に強い細胞増殖抑制作用を示すことがわかった (図 5)。特に、Dinaciclib ならびに AT7519 は全細胞株において JPH203 との併用が単独処理よりも有意に大きく増殖を抑制した。また、L タイプアミノ酸輸送体の阻害薬 BCH との併用でも、Dinaciclib は有用な増殖抑制効果を示した。これは、LAT1 阻害薬と細胞周期関連リン酸化酵素阻害薬の併用に関する、胆道がんにおける臨床応用の可能性を示唆する結果であった。また、JPH203 において臨床試験が行われている胆道がんの細胞株だけでなく、将来の臨床



試験が行われている胆道がんの細胞株だけでなく、将来の臨床

応用を考慮し、非常に難治性で知られるすい臓がん由来の細胞株 MIA Paca-2 においても同様の試験を行ったところ、JPH203 と Dinaciclib の併用は単独処理に比べて有意に大きく増殖を抑制した。これは、がん治療における LAT1 阻害薬と細胞周期関連リン酸化酵素阻害薬の併用の、広い臨床応用性を示すものだった。



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 Okanishi Hiroki, Ohgaki Ryuichi, Okuda Suguru, Endou Hitoshi, Kanai Yoshikatsu	4. 巻 112
2. 論文標題 Proteomics and phosphoproteomics reveal key regulators associated with cytostatic effect of amino acid transporter LAT1 inhibitor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 871 ~ 883
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14756	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡西 広樹, 大垣 隆一, 奥田 傑, 遠藤 仁, 金井 好克
2. 発表標題 アミノ酸トランスポーターLAT1阻害薬JPH203による胆道がん細胞増殖抑制機構に関わるプロテオミクスおよびリン酸化プロテオミクス解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡西 広樹, 大垣 隆一, 奥田 傑, 遠藤 仁, 金井 好克
2. 発表標題 胆道がん細胞株におけるアミノ酸トランスポーターLAT1阻害薬が示す増殖抑制作用のタンパク質発現・リン酸化変動の網羅的解析による検討
3. 学会等名 第140回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021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
---------	---------