

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08939

研究課題名(和文) 甲状腺未分化癌に対するLAT1とGlut1の二重阻害による分子標的治療の有用性

研究課題名(英文) Synergistic Effects of LAT1 and Glut1 Inhibitors against Anaplastic Thyroid Cancer in Vitro

研究代表者

榎本 圭佑 (Enomoto, Keisuke)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：30805750

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)：甲状腺未分化癌・細胞株を用い、各種グルコーストランスポーター阻害剤とLAT1の投与による相互作用による分子標的治療と、上流シグナルであるHIF2aの関連を探索した。細胞増殖試験では、LAT1阻害とGlut1阻害を併用で強く腫瘍の増殖を抑えた。MIB1の発現低下を認めた。ウェスタンブロットは、Glut1阻害でLAT1発現、逆にLAT1阻害でGlut1発現が細胞株により結果が異なった。HIF2aをmiRNAでノックダウンした所、LAT1の発現低下と腫瘍増殖の低下を認めた。LAT1とGlut1の二重阻害が癌の制御に結び付く可能性を証明した。HIF2aのメカニズムを介している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甲状腺未分化癌は、1年生存率が30%以下の極めて予後不良な高悪性度癌の一つである。治療法は外科的治療に加え、近年開発がすすむ分子標的治療が行われる。分子標的治療は単剤使用で、耐性を生じる為、数年は病状を安定させるもその後は増悪が予想される。本研究を通じ、甲状腺未分化癌の二重阻害による新しい治療方法を模索する事が出来た。今までに無いメカニズムからの癌細胞制御の結果から、新しい治療を求めている甲状腺未分化癌患者にとって非常に有意義である。一連の研究から得られた知見で、今後の橋渡し研究を経て臨床薬剤の開発、治験へと結び付く可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Using anaplastic thyroid carcinoma and cell lines, we explored the relationship between molecular target therapy by the interaction of various glucose transporter inhibitors and LAT1 administration and HIF2a, an upstream counter. In a cell proliferation test, combination of LAT1 inhibition and Glut1 inhibition suppressed strong tumor growth. Decreased expression of MIB1 was observed. Western blot showed that Glut1 inhibition resulted in LAT1 expression, and conversely, LAT1 inhibition resulted in Glut1 expression, which differed depending on the cell line. Knockdown of HIF2a with miRNA reduced LAT1 expression and decreased tumor growth.

We demonstrated that dual inhibition of LAT1 and Glut1 could lead to cancer regulation. It was suggested that it may be mediated by HIF2a mechanism.

研究分野：癌

キーワード：Glut1 LAT1

## 1. 研究開始当初の背景

甲状腺未分化癌は、分化型甲状腺癌を発生母地とする高悪性度の疾患である。甲状腺未分化癌は甲状腺悪性腫瘍の 1~2%と発生頻度は少ないものの、甲状腺癌による死亡の 14~40%を占める。その予後は極めて不良であり、診断からの生存期間・中央値は約 5 カ月であり、1 年生存率は 30%以下、腫瘍が頸部にとどまる場合の平均生存期間は 8 カ月であるのに対し、頸部外に進展している場合には平均生存期間は 3 カ月程度である。長期生存が望めるのは、外科的に根治切除が可能であった場合に限り、一般的な化学療法や放射線療法は効果が乏しく、甲状腺未分化癌に対する治療戦略として確立したものがないのが現状である。

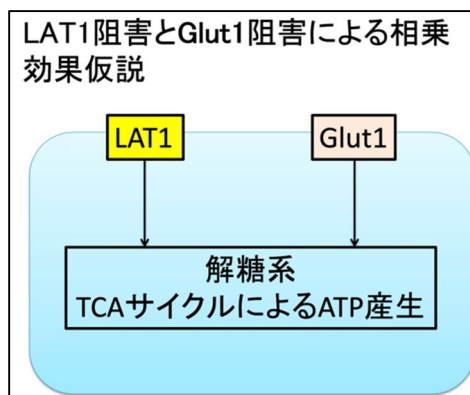
近年、VEGF-R 阻害剤の登場により、頸部外に進展している甲状腺未分化癌に対する第一治療選択となりつつある[1]。しかし、VEGF-R 阻害剤への耐性化の獲得や VEGF-R 阻害による腎機能障害、高血圧、倦怠感などの副作用の問題があり、VEGF-R 阻害剤の長期使用が困難となる症例も多数存在する。そのため、VEGF-R 阻害剤以外の新たな分子標的薬治療の開発が急務である。

アミノ酸トランスポーターは、近年その働きが注目される分子であり、生体の正常機能維持に重要と考えられている。中でも LAT1 は、多くの必須アミノ酸を輸送するトランスポーターであり、癌細胞で発現が増加していることが報告されている。我々は 2019 年に甲状腺未分化癌でも LAT1 過剰発現が認められることを Vitro モデル、Vivo モデルにて報告した[2]。加えて、過剰発現した LAT1 を阻害することで、mTOR シグナルを介した細胞増殖を制御し、新しい分子標的治療になり得る事を証明した[3]。

しかし、実臨床においては多くの単剤投与で耐性が生じるため、多剤を組み合わせたコンビネーションによる治療が標準的である。我々は偶然に Glut1 阻害が、LAT1 の発現を亢進させることを発見した。LAT1 阻害に Glut1 阻害を加えることで相乗効果が期待でき、二重阻害による全く新しいコンセプトの分子標的治療の可能性を予測した。

## 2. 研究の目的

LAT1 阻害剤の治療効果を最大限に高めるためのコンビネーション治療の開発を目標とし、Glut1 阻害を併用することで腫瘍抑制効果を評価することを目的とする。LAT1 阻害単剤治療が注目される中、Glut1 阻害を加えることで相乗効果を予測し[図]、コンビネーションによる分子標的治療を先駆けて試みることが非常に独創的であり、悪性度が極めて高い本疾患の新たな治療戦略の開発につながる事を最終的な目標としている。



## 3. 研究の方法

方法 1 甲状腺未分化癌・細胞株を用い、LAT1 阻害とシグナル解析

甲状腺未分化癌・細胞株(8505C, TOC1, KMH2, ASH3, OCUT2, 8305C)や頭頸部癌(HSC-3)、脳腫瘍(A-172)、悪性黒色腫(MM)、乳癌(MCF7)を用い、siRNAを用いた Glut1 ノックダウンで定量的 PCR、ウェスタンブロット法により LAT1 が過剰発現を認めるかを検証した。逆に LAT1 ノックダウンで Glut1 が変化するかを確認した。

加えて LAT1 阻害と Glut1 阻害併用による腫瘍増殖能、アミノ酸摂率および転移浸潤能の抑制が見られるか評価した。具体的には XTT/MTT アッセイにより IC50 算定を行なった後に、細胞増殖能が抑制されることを明らかにする。さらに、定量的 PCR、ウェスタンブロット法によりアミノ酸代謝に関連する mTOR のリン酸化シグナルの確認、Ki67 免疫染色による腫瘍増殖能の評価、フローサイトメトリーによる細胞周期解析とセルサイクル関連蛋白の減弱について解明した。

HIF2a に着目し、低酸素状態(1%-5%)を作成した細胞株で、LAT1 の発現と糖代謝に関して評価した。画像の定量には ImageJ、統計解析は Prism などのソフトを用いた。

方法 2 Xenograft node mouse モデルを用いた in vivo モデルにおける LAT1 阻害剤と Glut1 阻害剤の併用に関する有用性評価

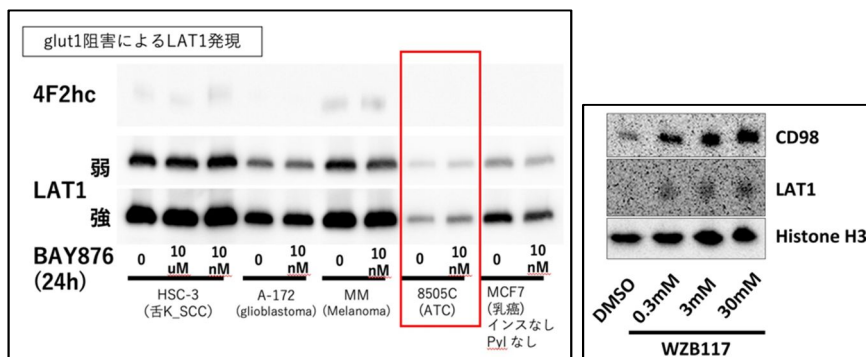
BALB/cAJcl-nu/nu mice を用い、甲状腺未分化癌・細胞株を Xenograft マウスに移植した、Xenograft node mouse モデルに LAT1 阻害剤(JPH203)と Glut1 阻害剤(WZB117)を投与することで、抗腫瘍効果の相乗効果を明らかにした。

これらの実験から LAT1 阻害剤(JPH203)と Glut1 阻害剤(BAY876, WZB117)併用による腫瘍の増殖・サイズの抑制を明らかにするとともに、安楽死後に得た腫瘍組織よりアミノ酸代謝関連蛋白

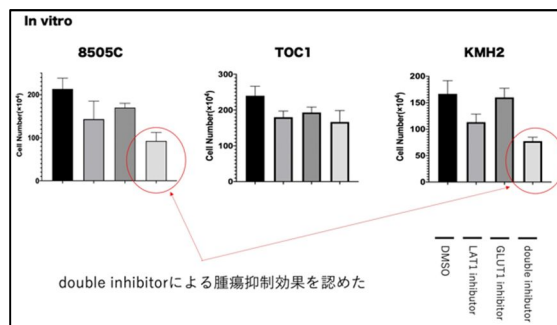
や細胞周期関連蛋白の発現量の抑制効果を、免疫組織染色およびウェスタンブロット法により解明を試みた。

#### 4. 研究成果

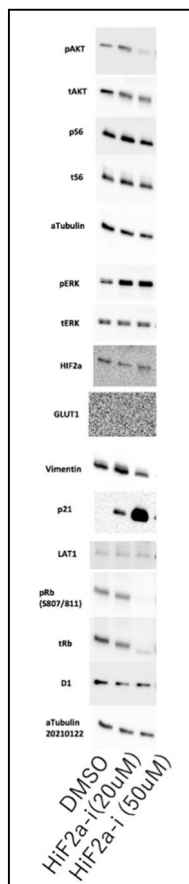
我々は、まず最初に甲状腺未分化癌を含み(8505C)、頭頸部癌(HSC-3)、脳腫瘍(A-172)などにおいて、Glut1阻害剤の投与により、LAT1が過剰発現することを証明した(図)。一方、悪性黒色腫(MM)、乳癌(MCF7)では、LAT1の過剰発現は認めなかった。そこで、今回の甲状腺未分化癌・細胞株(8505C)に絞り、量依存的にLAT1/CD98発現が強くなる事を確認した(図)。さらにLAT1阻害によりGlut1が過剰発現することも証明した。蛍光細胞染色実験においても、細胞膜上での過剰発現が誘導されることを確認した。



細胞増殖試験において、LAT1阻害剤とGlut1阻害剤を併用する事で、LAT1阻害剤・単剤投与やGlut1阻害剤・単剤投与よりも、強く腫瘍細胞の増殖を抑えることができた(右図)。加えて、腫瘍増殖に関わるMIB1の発現も細胞免疫染色にて発現低下が証明された。



これらの相乗効果は、Glut1阻害によるLAT1過剰発現を基盤としていると仮説を立てていた。また逆にLAT1阻害はGlut1過剰発現を生むと予想していた。しかし、当初の予想とは異なり、一部の細胞株(ASH3, OCUT2, 8305C)ではGlut1阻害でもLAT1が過剰発現せず、逆に低下した。同様にLAT1阻害でGlut1の発現が上昇する細胞株と、低下する細胞株にわかれ、一定の傾向は認めなかった。一連の細胞実験から得られた結果は、LAT1とGlut1の二重阻害が甲状腺未分化癌の腫瘍増殖の制御に結び付き可能性を示唆しているが、発癌遺伝子の状況によって(細胞株によって)異なる反応を見せる事がわかった。



最近の報告によりLAT1は低酸素応答分子であるHIF2aの制御をうける事が証明された[4]。そこでグルコーストランスポーターを介した糖代謝と、アミノ酸トランスポーターを介したアミノ酸代謝機構のメカニズムとして低酸素誘導因子であるHIF2aの関連も含めて、甲状腺未分化癌の細胞株を用いて調査した。ウェスタンブロットによる蛋白定量を行い、低酸素状態HIF2a阻害がLAT1を過剰発現させる事を証明した(左図)。AKT, S6などのアミノ酸代謝に関わるマーカーの発現低下、pRb, サイクリンD1などのセルサイクル関連蛋白の発現も量依存的に減少している事を確認した。細胞増殖試験において、低酸素状態では、腫瘍細胞の増殖が有意に低下した。細胞増殖実験にて、HIF2aの阻害は、有意にコントロール群よりも腫瘍増殖を抑制した。

これらよりアミノ酸代謝をおさえるLAT1の効果発現は、低酸素応答分子であるHIF2aのメカニズムを介している可能性が示唆された。

Xenograft node mouseモデルを用いたin vivoモデルでは、LAT1阻害剤とGlut1阻害剤の併用を行ったマウス腫瘍径はコントロールDMSO群と腫瘍径、重量に差を認めなかった(右図)。



一連の実験結果から、当初の研究仮説とは異なり、HIF2a阻害剤とGlut1阻害による二重阻害が、甲状腺未分化癌において腫瘍増殖を抑制する可能性が考えられた。LAT1阻害とGlut1阻害ではなく、HIF2a阻害剤とGlut1阻害によるさらなる解析が望まれ、今後の応用展開が期待される。

#### 「引用文献」

[1] Huang D, Zhang J, Zheng X, Gao M. Efficacy and Safety of

Lenvatinib in Anaplastic Thyroid Carcinoma: A Meta-Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Jun 30;13:920857. doi: 10.3389/fendo.2022.920857. eCollection 2022. PMID: 35846304

[2] Enomoto K, Sato F, Tamagawa S, Gunduz M, Onoda N, Uchino S, Muragaki Y, Hotomi M. A novel therapeutic approach for anaplastic thyroid cancer through inhibition of LAT1. *Sci Rep*. 2019;9(1):14616. doi: 10.1038/s41598-019-51144-6. PMID: 31601917

[3] Enomoto K, Hirayama S, Kumashiro N, Jing X, Kimura T, Tamagawa S, Matsuzaki I, Murata SI, Hotomi M. Synergistic Effects of Lenvatinib (E7080) and MEK Inhibitors against Anaplastic Thyroid Cancer in Preclinical Models. *Cancers (Basel)*. 2021;13(4):862. doi: 10.3390/cancers13040862. PMID: 33670725

[4] Onishi Y, Hiraiwa M, Kamada H, Iezaki T, Yamada T, Kaneda K, Hinoi E. Hypoxia affects Slc7a5 expression through HIF-2 in differentiated neuronal cells. *FEBS Open Bio*. 2019;9(2):241-247. doi: 10.1002/2211-5463.12559. PMID: 30761250; PMCID: PMC6356171.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Enomoto Keisuke, Hirayama Shun, Kumashiro Naoko, Jing Xuefeng, Kimura Takahito, Tamagawa Shunji, Matsuzaki Ibu, Murata Shin-Ichi, Hotomi Muneki	4. 巻 13
2. 論文標題 Synergistic Effects of Lenvatinib (E7080) and MEK Inhibitors against Anaplastic Thyroid Cancer in Preclinical Models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 862 ~ 862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13040862	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榎本圭佑, 平山俊, 熊代奈央子, 武田早織, 木村貴任, 玉川俊次, 早田幸子, 保富宗城
2. 発表標題 甲状腺未分化癌に対するレンパチニブ・MEK阻害剤併用療法の可能性：前臨床試験からの今後の展望
3. 学会等名 第54回日本内分泌外科学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榎本圭佑, 平山俊, 熊代奈央子, 京雪楓, 木村貴任, 玉川俊次, 早田幸子, 保富宗城
2. 発表標題 甲状腺癌に対する分子標的薬・レンパチニブ服薬の現状と、MEK阻害剤を用いた併用治療の可能性
3. 学会等名 第25回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榎本圭佑, 平山俊, 熊代奈央子, 京雪楓, 木村貴任, 玉川俊次, 保富宗城
2. 発表標題 甲状腺未分化癌に対するレンパチニブとMEK阻害剤を併用した分子標的薬併用治療の可能性
3. 学会等名 第45回日本頭頸部癌学会
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
研究分担者	大谷 真喜子 (Otani Makiko) (00795594)	和歌山県立医科大学・医学部・講師  (24701)	
研究分担者	玉川 俊次 (Tamagawa Shunji) (40543781)	和歌山県立医科大学・医学部・講師  (24701)	
研究分担者	熊代 奈央子 (Kumashiro Naoko) (50746435)	和歌山県立医科大学・医学部・助教  (24701)	

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