

令和 4 年 4 月 26 日現在

機関番号：11501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22830

研究課題名(和文) 中性アミノ酸輸送体LAT1を標的とした新規がん放射線療法の開発へ向けた基礎的研究

研究課題名(英文) LAT1 inhibitor JPH203 sensitizes cancer cells to radiation by enhancing radiation-induced cellular senescence

研究代表者

房 知輝 (BO, Tomoki)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：90878141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は放射線が生存したがん細胞のエネルギー代謝を亢進することに加え、中性アミノ酸量を増加させることを明らかにしていたことから、中性アミノ酸代謝を標的としたがん放射線療法の可能ではないかと推測した。そこで、本研究では中性アミノ酸の細胞内への取込みに働くL-type amino acid transporter 1 (LAT1)の特異的阻害剤JPH203が放射線増感効果を引き起こせるかどうか検討した。その結果、JPH203が複数のがん細胞株で放射線感受性を増強した。また、その増感メカニズムにはmTORシグナル減弱を介した細胞老化の誘導が寄与すること明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はLAT1を介して取込まれる中性アミノ酸が放射線照射を受けたがん細胞の生存に重要であることを明らかにしたことから、放射線生物学の知見を一層深化させた。また、本研究はLAT1を標的としたがん治療薬JPH203が放射線増感を引き起こすことを明らかにした初の研究報告である。JPH203が放射線療法との併用されることで今後臨床応用される可能性を提示し、社会的意義も高い研究内容である。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that radiation activated energy metabolism and increased neutral amino acid content in cancer cells. We speculated that neutral amino acid metabolism can be a target for cancer radiation therapy. In this study, we examined the effect of neutral amino acid transporter, L-type amino acid transporter 1 (LAT1) inhibition on radiosensitivity after irradiation.

We showed that LAT1 inhibitor JPH203 inhibited the radiation-induced increase in neutral amino acid uptake. We also demonstrated that JPH203, at minimally toxic concentrations, significantly sensitized cancer cells to radiation. In addition, JPH203 significantly downregulated mTOR activity and enhanced cellular senescence post-irradiation. These results indicate that LAT1 inhibition by JPH203 sensitizes cancer cells to radiation by enhancing cellular senescence via mTOR downregulation. Thus, neutral amino acid metabolism may be a potent target of cancer radiation therapy.

研究分野：放射線生物学

キーワード：がん 放射線 中性アミノ酸代謝 LAT1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、放射線照射したがん細胞にミトコンドリア形態・機能の変化が生じ、これが放射線の傷害作用に対する生存のための適応応答である可能性が示唆されている。これまでに申請者は、放射線照射を受けたがん細胞ではミトコンドリア量、電子伝達系に由来する酸素消費量ならびに細胞内 ATP 量が増加することを報告している。実際に、ミトコンドリア電子伝達系を阻害または修飾する薬剤を放射線と併用することで、放射線増感効果が得られるという結果が複数報告されている。このように、放射線照射の際に、ミトコンドリア機能とそれに関わる代謝経路を標的とする治療を併用することで、放射線による殺がん細胞効果を高めることが期待できる。

また近年では、がん細胞に特有のアミノ酸代謝が注目されており、様々ながん種において糖代謝だけでなくアミノ酸代謝にもリプログラミングが生じていることが明らかとなっている。これまでに、それぞれのがん細胞種が特定のアミノ酸に依存した代謝を行っているとの報告が複数あり、アミノ酸代謝を標的としたがん治療法の研究が進められている。そこで申請者は、アミノ酸取込みに働く輸送体の中で、L-type amino acid transporter 1 (LAT1)に着目した研究を予定している。LAT1 は、Na⁺非依存性にイソロイシンやバリン、フェニルアラニンなどの中性アミノ酸を細胞内に取込む輸送体である。様々ながん種で、非がん部に比べて LAT1 の発現量が増加しており、その発現量と悪性度との間に相関が認められている。このように、LAT1 ががん細胞の生存において重要な役割を担う可能性が示唆されている。しかしながら、LAT1 を介して取込まれた中性アミノ酸が、がん細胞のエネルギー代謝にどの程度寄与しているかについては、これまでに検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では、放射線ががん細胞のエネルギー代謝を亢進させるという申請者らの知見に基づき、LAT1 機能亢進により中性アミノ酸が増加し、それががん細胞のエネルギー代謝を亢進させて細胞保護に働き、放射線感受性を低下させる要因となることを証明し、LAT1 を新たな標的とする新たながん放射線療法の開発の可能性について検討を行う。

3. 研究の方法

(1)コロニー形成法による細胞の放射線感受性の評価

細胞はヒト肺腺がん由来 A549 細胞およびヒト膵臓がん由来 Mia Paca2 細胞を用いた。放射線感受性の評価はコロニー形成法を用いた。シャーレに一定数の細胞を播種し、6 時間培養後に shimadzu X-TITAN 225S を用いて X 線照射を行った。X 線照射後、LAT1 特異的阻害剤 JPH203 を含む新鮮培地に交換し約 2 週間培養した。その後、細胞はメタノールで固定し、3% ギムザ染色液により染色してコロニー数をカウントして生存率を算出した。

(2)LC-MS を用いた細胞内アミノ酸量の測定

JPH203 による LAT1 阻害効果の確認ならびに X 線照射の影響を評価するため、細胞内アミノ酸量の定量評価を LC/MS を用いて行った。使用機器は Ultimate300 liquid chromatography system および Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer を用いた。カラムには SeQuant® ZIC®-pHILIC column を、バッファーには 100% acetonitrile および 20 mM ammonium bicarbonate, pH9.8 を使用した。

(3)細胞内 ATP 量の定量評価

X 線照射および薬剤処理した細胞は Cell ATP Assay reagent を用いた ATP-Luciferase 法により測定した。プレートリーダーは ARVO X3 を使用した。

(4)ウエスタンブロット法による mTOR 活性および p21 発現量の評価

回収した細胞は RIPA buffer に溶解し、18,000 g, 15 min, 4 °C の条件で遠心して上清を回収した。その後、上清に 3 x Laemmli sample buffer を加え、SDS-PAGE に用いた。メンブレンは 5% スキムミルク TBST で 1 時間ブロッキングしてから一次抗体と一晩 4 °C で反応させた。翌日、二次交代と反応させた後、Western Lightning Plus-ECL を使用してバンドを撮像した。

(5)SA-gal 染色による細胞老化の評価

X 線照射および薬剤処理した細胞を 5%パラホルムアルデヒドによって固定した。固定した細胞

は senescence associated beta-galactosidase staining kit を用いて染色した。

4. 研究成果

はじめに、LAT1 特異的阻害剤である JPH203 のがん細胞に対する毒性をコロニー形成法により評価したところ、MIA Paca-2 細胞、A549 細胞いずれも濃度依存的に生存率が低下することを確認した。今後、放射線との併用処理を考慮し約 90%の生存率となる濃度 (MIA Paca-2 細胞は 20 μ M、A549 細胞は 10 μ M)を以降の実験で使用した (図 1A, B)。まず、JPH203 の LAT1 阻害効果を確認するために細胞内アミノ酸量を評価した。その結果、両細胞において JPH203 は細胞内中性アミノ酸量を低下させたことから LAT 阻害効果を確認した(図 1C-F)。さらに、多くの細胞内中性アミノ酸量は X 線照射によって増加することが明らかとなったとともに、JPH203 がこの増加を打ち消した。以上の結果から、X 線照射により LAT1 を介した中性アミノ酸の取込みが亢進すること、JPH203 がこれを抑制して細胞内中性アミノ酸量を低下させることが示唆された。次に、JPH203 が細胞の放射線感受性に与える影響を評価したところ、いずれの細胞でも JPH203 が放射線感受性を有意に増強した(図 2)。

図 1

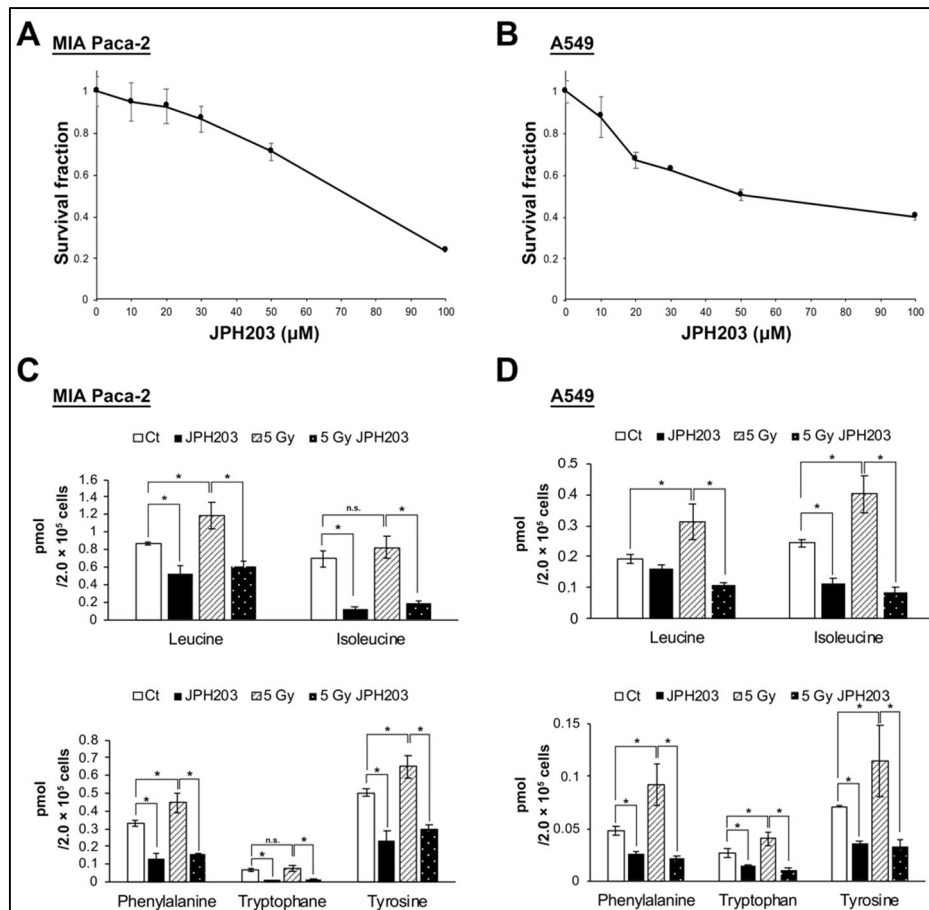
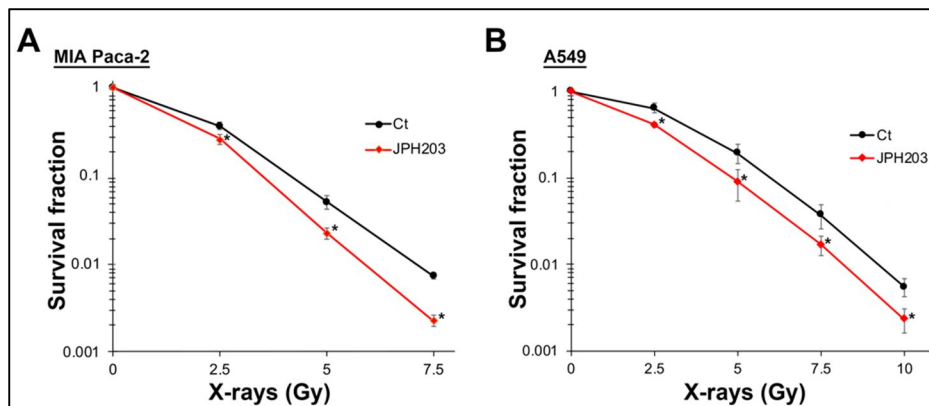
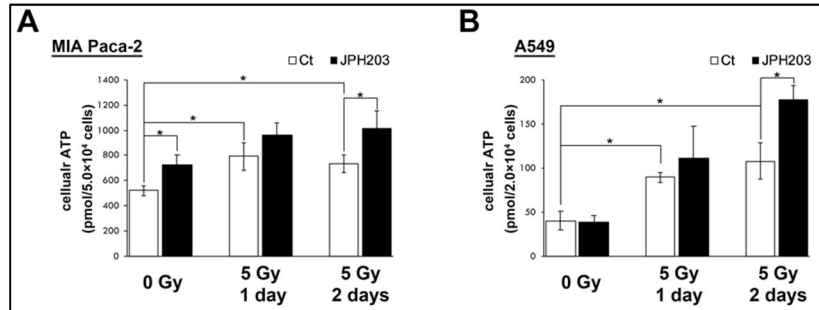


図 2



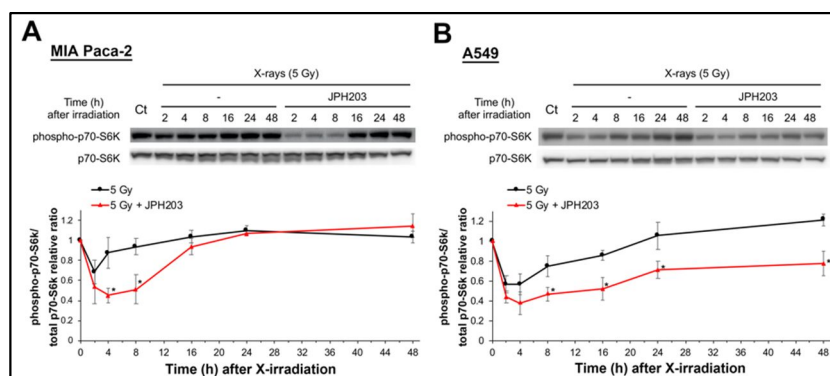
そこで、LAT1 阻害が放射線感受性を増強したメカニズムを明らかにするため、JPH203 が X 線照射後の細胞内 ATP 量ならびに mTOR 活性に与える影響について評価した。LAT1 を介して取り込まれた中性アミノ酸はタンパク質合成に用いられるだけではなく、BCAT や BCKDHA などによる変換を受けて最終的に TCA 回路によるエネルギー代謝に動員される。そこで、LAT1 阻害が細胞内 ATP 量に与える影響を評価した。その結果、JPH203 併用処理は X 線照射単独処理によって増加する細胞内 ATP 量をさらに増加させた(図 3)。このことから、LAT1 阻害による中性アミノ酸の枯渇が ATP 産生を抑制していないことが示唆された。

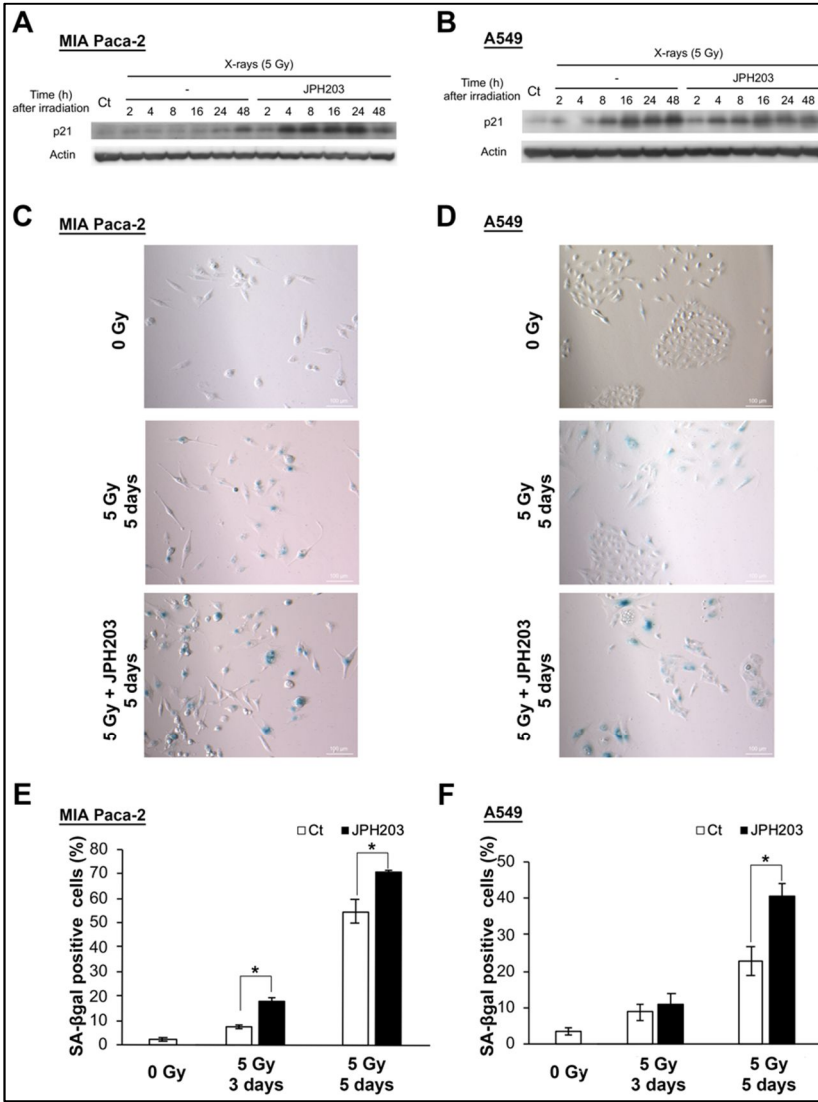
図 3



次に、LAT1 を介して取込まれるロイシンは mTOR を濃度依存的に活性化させるということが報告されていることから、LAT1 阻害が mTOR 活性に与える影響を評価した。mTOR の下流標的である p70-S6K のリン酸化レベルを経時評価したところ、JPH203 による LAT1 阻害が X 線照射単独処理により減弱される p70-S6K のリン酸化レベルをさらに抑制することが明らかとなった(図 4)。mTOR 活性は細胞増殖能に重要であることから、細胞老化に与える影響を p21 発現量ならびに SA-gal 染色により老化細胞を評価したところ、JPH203 による LAT1 阻害は X 線照射により増加する p21 発現量および SA-gal 陽性率をさらに増加させた(図 5)。このことから、JPH203 による LAT1 阻害は X 線照射後の mTOR 活性を抑制することで細胞老化を増強することが示唆された。以上をまとめると、本研究では以下の事項が明らかとなった。放射線照射は LAT1 を介した中性アミノ酸取込みを亢進させた。JPH203 を用いた LAT1 阻害によって が抑制された。JPH203 による LAT1 阻害は細胞内 ATP 量を減少させなかった一方で、mTOR 活性を低下させた。その結果、放射線照射後の細胞老化が増強されて放射線感受性が亢進した。これらことから、LAT1 を介した中性アミノ酸の取込みが放射線増感の標的になることが示唆された。

図 4





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 Bo Tomoki, Kobayashi Sho, Inanami Osamu, Fujii Junichi, Nakajima Osamu, Ito Tsunekata, Yasui Hironobu	4. 巻 14
2. 論文標題 LAT1 inhibitor JPH203 sensitizes cancer cells to radiation by enhancing radiation-induced cellular senescence	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 101212 ~ 101212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tranon.2021.101212	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 房知輝、小林翔、伊藤恒賢、中島修、藤井順逸
2. 発表標題 中性アミノ酸輸送体 LAT1阻害剤 JPH203によるがん放射線増感効果の評価とメカニズムの解明
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会 / 第21回日本NO学会合同学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoki Bo, Sho Kobayashi, Osamu Inanami, Junichi Fujii, Osamu Nakajima, Tsunekata Ito, Hironobu Yasui
2. 発表標題 LAT1 inhibitor JPH203 enhances radiation-induced cellular senescence by downregulation of mTOR activity
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
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
---------	---------