

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03065

研究課題名（和文）リキッドバイオプシーとAI活用による泌尿器科がん発現トランスポーター分子標的創薬

研究課題名（英文）Transporter-targeted drug development against urological cancers by utilizing liquid biopsy and AI

研究代表者

安西 尚彦（ANZAI, Naohiko）

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70276054

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、Liquid BiopsyとAIを活用した泌尿器科がん関連トランスポーターの網羅的探索と同定分子を標的とする創薬を行うことを目的とした。メインのLiquid Biopsyを活用した網羅的トランスポーター解析に関しては、治療抵抗性前立腺癌患者の血漿からExosomeから抽出したRNAにおけるLAT1発現同定に関し継続的な解析を実施した。トランスポーター阻害薬適応患者選定のための網羅的分子マーカー同定に関してはランダム サバイバル フォレスト（RSF）とサバイバル ツリーを用いた機械学習を適用し、前立腺がん患者の新しい予後予測モデルの構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

経時的な腫瘍プロファイルのモニタリングの手法として、Liquid Biopsy を活用し、多角的な経時的変化を解析する上で、AI を活用した本研究は、泌尿器がんにおける網羅的なトランスポーターの発現解析と創薬の可能性を問うことを目的として実施され、特にAI 解析の取り組みが成果をあげた。治療開始前の乳酸脱水素酵素（LDH）と治療後120日のアルカリホスファターゼ（ALP）の値を組み合わせが、OSとCSSの生存ツリーを使用した臨床適用可能な予後予測モデルを作成され、治療介入前の転移性前立腺がんの予後を予測するための有用な情報を提供を可能とした。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to comprehensively explore urological cancer-related transporters using Liquid Biopsy and AI and to develop drugs targeting the identified molecules. Regarding the comprehensive transporter analysis using Liquid Biopsy, we performed continuous analysis of LAT1 expression in RNA extracted from exosomes from the plasma of treatment-resistant prostate cancer patients. Regarding the comprehensive molecular marker identification for selecting patients suitable for transporter inhibitors, we applied machine learning using random survival forest (RSF) and survival tree, and succeeded in constructing a new prognosis prediction model for prostate cancer patients.

研究分野：薬理学

キーワード：トランスポーター 泌尿器科がん 分子標的創薬 リキッドバイオプシー AI

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

必須アミノ酸輸送体である L-type amino acid transporter 1 : LAT1 (LAT1-4F2hc 二量体を形成) は、がん特異的に発現するアミノ酸トランスポーターで、細胞増殖を制御する mTOR の上流に存在。ロイシンを取り込むことで、mTOR を活性化してがんの増殖に関与する。2016 年に前立腺がんに対して米国 FDA で認可された FACBC - PET は、LAT1 の基質をラジオアイソトープ認識させていることから、LAT1 のがん特異性は、画像認識や分子標的としても注目されつつある。近年、申請者らの研究グループは、この LAT1 が、Enzalutamide など AR を阻害(去勢)することで上昇する(AR により抑制される)ことから、新たな去勢抵抗性獲得のメカニズムであることを報告した(Xu, Sakamoto et al., J Urol. 2016; 195:1588)。さらに、LAT1 と同一ファミリーのトランスポーター LAT3 が、(AR により促進され)ホルモン感受性癌で亢進していることを見出した(梨井ら、2019 年日本癌学会にて発表)。つまり、前立腺がん細胞は、非去勢環境下では、LAT3 に依存し、去勢環境下では、LAT1 にスイッチ【LAT スイッチ】することで生命力を向上する可能性が示唆された。

2021 年、AR/AR-V7 抗体ならびにヒストン修飾(H3K4me1,H3K4me3,H3K27ac)に対する免疫沈降(ChIP)を行い、次世代シーケンサー(NGS)を用いた網羅的解析(ChIP-seq)により、339 の候補遺伝子を抽出。その中から、AR-V7 蛋白がエンハンサー領域に結合し特異的に発現を活性化させるに標的遺伝子として SLC3A2 遺伝子(LAT1 結合蛋白 4F2hc を規定する遺伝子)を最近同定した(Sugiura, Sakamoto, Anzai et al., Transl Oncol, 2021; 14: 100915)。

また、腎がんと膀胱がんにおいても、LAT1 の m-TOR Pathway を介した増殖促進効果と予後(治療抵抗性)について報告(Higuchi, Sakamoto, Anzai, et al. Sci Rep. 9: 16776, 2019)、RNA シークエンスを用いた網羅的解析から LAT1 の下流に IGFBP-5 を同定(Maihulan, Sakamoto, Anzai, et al. Sci Rep. 10: 1292, 2020)した。よって、泌尿器科がんの治療抵抗性のメカニズムにおけるアミノ酸トランスポーターの関与が示唆される。

以上より、経時的な腫瘍プロファイルのモニタリングの手法として、Liquid Biopsy を活用するとともに、多元的な経時的变化を解析する上で、AI を活用する本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

申請者らは、以下に記す学術的独自性と創造性に基づき、Liquid Biopsy と AI を用いた、泌尿器がんにおける網羅的なトランスポーターの発現解析の実施と創薬の可能性を問うこと本研究の目的とした。

(1) 申請者らの研究グループ(安西と坂本)は、アミノ酸トランスポーターの世界的第一人者である金井好克教授、LAT1 阻害剤を供給するジェイファーマ株式会社の遠藤仁氏(杏林大学薬理学教室名誉教授)らと院生時代以来(2001 年 4 月~)の共同研究を行ってきた。

(2) 創薬の実現性として、金井らはクローニングした Na⁺依存性グルコーストランスポーター SGLT2 の分子標的創薬を行い、糖尿病で実際に臨床応用されている SGLT2 阻害薬を開発した(2020 年内閣総理大臣賞受賞)ことから、他のトランスポーターにも臨床応用の可能性が示唆される。特に、以前から研究してきた LAT1 には、JPH203 という特異的阻害剤が存在する。特許、並びに、阻害剤を供給するジェイファーマ株式会社との MTA も当大学と締結済みで協力体制も整っている。

(3) 薬剤抵抗性に関する網羅的新規トランスポーター分子の発現解析方法として、Cell free (cf)DNA(RNA)と Exosome 解析を活用する。cfDNA 解析は、西尾和人教授 近畿大学(2018 年~) Exosome 解析は、落谷孝広教授 東京医大(2020 年~院生派遣)と共同研究を進めてきた。薬剤抵抗性獲得過程で経時的に変化する cfDNA(RNA)と Exosome 中の DNA(RNA)の発現プロファイルと比較する中で、網羅的な薬剤抵抗性に関わるトランスポーターの同定を行う。並行して、薬剤抵抗性や、転移を規定する分子の同定を行う。複数分子の発現プロファイルは、多元的、かつ、経時的に変化することから、AI 解析を活用する。

(4) その後、千葉大学が保有する Chiba Chemical Library (CCL)と既存の薬剤の Library から阻害効果をもつ薬剤を選定し、In Vitro、In Vivo 解析後に、新規候補薬剤(LAT1 阻害剤: JPH203 を含む)について、千葉大学医学部付属病院が、臨床試験拠点病院である環境を生かした医師主導試験を目指す。

3. 研究の方法

(1) Liquid Biopsy を活用した網羅的トランスポーター解析

cfRNA と Exosome 中 RNA を基にした治療抵抗性に関与するトランスポーターの同定

千葉大泌尿器科では、過去 10 年間、3000 検体の前立腺がんをはじめ、腎がん、膀胱がんの血清/血漿の冷凍保存検体を保有している。近年、cfDNA のみならず cfRNA の抽出が可能となった(Quick-cfRNA Serum & Plasma Kit ZYMO RESEARCH)。治療抵抗性となった患者の cfRNA を用いて RNA Seq(かずさ DNA 研究所 小原収教授と共同研究)にてアミノ酸トランスポーターの網羅的な発現解析を行った。

Exosome 中 RNA についても、分担者である落谷教授の指導のもと同様に解析する。具体的には、

治療抵抗性患者 50 例の血漿（同 50 例治療前血漿と比較）から cfRNA と Exosome 中 RNA を抽出し、治療抵抗性獲得過程で、発現上昇したトランスポーターを RNA Seq にて網羅的に解析する。この過程で発現亢進をみとめた複数のトランスポーター阻害の抗腫瘍効果を、siRNA にてノックダウンした細胞株にて抵抗性の変化を元にスクリーニングする。

(2) トランスポーター阻害薬適応患者選定のための網羅的分子マーカー同定

当科では、2019 年から川上教授と共同研究にて（大学院生 齋藤派遣）機械学習におけるランダムフォレスト分類と次元圧縮法を用いて クラスタリング（分類） 時系列解析を行い、Disease free survival (DFS)、再発、死亡について検討してきた。374 症例におけるすべての採血項目を経時的にフォローする中で、予後を予測するクラスタリングの手法を確立する。

この手法を cfDNA、Exosome 中のゲノム情報の解析に応用する中で、予後不良な母集団、並びに、LAT1、並びに、NTRX の発現と相関する因子の解析を行う中で、将来的な LAT1、並びに、新規 NTRX 阻害剤のコンパニオン診断につなげることをめざした。

(3) 分子標的創薬を目指す化合物ライブラリースクリーニング

同定した新規トランスポーター X (NTRX) に対して、薬理学教室にて、千葉大学の有する CCL (1000 種類以上存在) 既存薬剤の Off Label 使用にて創薬を目指す。並行して、すでに開発した LAT1 阻害剤 JPH203 の臨床応用解析を進めることを予定していた。

4. 研究成果

(1) Liquid Biopsy を活用した網羅的トランスポーター解析

研究分担者である東京医大の落谷教授の研究室に派遣されている研究協力者である院生の田村が、これまでに成功した治療抵抗性前立腺癌患者の血漿から Exosome から抽出した RNA における LAT1 発現同定に関する解析を実施し、治療抵抗性前立腺癌患者の血漿から Exosome から抽出した RNA における LAT1 発現の同定に成功した。しかし標的とする新規トランスポーター X (NTRX) の具体化までには至らなかった。

(2) トランスポーター阻害薬適応患者選定のための網羅的分子マーカー同定

研究分担者の坂本が、初年度に次世代シーケンサー (NGS) にて cfDNA の解析を実施し、患者予後予測因子となりうる網羅的な遺伝子変異の候補を探すための基盤データの取得した。そのブラッシュアップのために引き続き次世代シーケンサー (NGS) を用いた cfDNA の解析を継続し、研究分担者である川上教授 (人工知能 (AI) 医学) の下で研究協力者の齋藤心平氏が前立腺がん患者 340 人の診断時年齢、末梢血および尿検査から得られた縦断的データに基づいて、前立腺がん患者の新しい予後予測モデルを構築に成功した。

(3) 分子標的創薬を目指す化合物ライブラリースクリーニング

上述のように、(1) にて標的とする新規トランスポーター X (NTRX) の具体化までには至らなかったために、本テーマに関しては達成が困難であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Saito Shinpei, Sakamoto Shinichi, Higuchi Kosuke, Sato Kodai, Zhao Xue, Wakai Ken, Kanesaka Manato, Kamada Shuhei, Takeuchi Nobuyoshi, Sazuka Tomokazu, Imamura Yusuke, Anzai Naohiko, Ichikawa Tomohiko, Kawakami Eiryo	4. 巻 13
2. 論文標題 Machine-learning predicts time-series prognosis factors in metastatic prostate cancer patients treated with androgen deprivation therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-32987-6	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 -

1. 著者名 Zhao Xue, Sakamoto Shinichi, Wei Jiaying, Pae Sangjon, Saito Shinpei, Sazuka Tomokazu, Imamura Yusuke, Anzai Naohiko, Ichikawa Tomohiko	4. 巻 24
2. 論文標題 Contribution of the L-Type Amino Acid Transporter Family in the Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6178 ~ 6178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24076178	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 -

1. 著者名 Akiyama Masahiro, Unoki Takamitsu, Aoki Hanako, Nishimura Akiyuki, Shinkai Yasuhiro, Warabi Eiji, Nishiyama Kazuhiro, Furumoto Yuka, Anzai Naohiko, Akaike Takaaki, Nishida Motohiro, Kumagai Yoshito	4. 巻 57
2. 論文標題 Cystine-dependent antiporters buffer against excess intracellular reactive sulfur species-induced stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Redox Biology	6. 最初と最後の頁 102514 ~ 102514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.redox.2022.102514	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Hirayama Yuri, Anzai Naohiko, Kinouchi Hiroyuki, Koizumi Schuichi	4. 巻 27
2. 論文標題 P2X7 Receptors in Astrocytes: A Switch for Ischemic Tolerance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3655 ~ 3655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27123655	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 -

1. 著者名 Ouchi Motoshi, Morita Asuka, Satoh Keitaro, Kobayashi Shunsuke, Terada Misao, Kon Hiroe, Hayashi Keitaro, Suzuki Tatsuya, Oba Kenzo, Sugihara Hitoshi, Yasutake Masahiro, Anzai Naohiko, Fujita Tomoe	4. 巻 149
2. 論文標題 Effects of 1,5-anhydro-D-glucitol on insulin secretion both in in vitro and ex vivo pancreatic preparations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 66 ~ 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2022.03.005	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 -

1. 著者名 Otani Naoyuki, Ouchi Motoshi, Misawa Kazuharu, Hisatome Ichiro, Anzai Naohiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Hypouricemia and Urate Transporters	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 652 ~ 652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10030652	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 -

1. 著者名 Zhao X, Sakamoto S, Maimaiti M, Anzai N, Ichikawa T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Contribution of LAT1-4F2hc in Urological Cancers via Toll-like Receptor and Other Vital Pathways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14010229	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 -

1. 著者名 Hayashi K, Anzai N.	4. 巻 148
2. 論文標題 L-type amino acid transporter 1 as a target for inflammatory disease and cancer immunotherapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 31-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2021.09.006.	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 -

1. 著者名 Betsunoh H, Sakamoto S, Kaji Y, Nukui A, Kobayashi M, Yashi M, Hayashi K, Anzai N, Kamai T.	4. 巻 41
2. 論文標題 Clinical Significance of 18 F-fluorodeoxyglucose and Glucose Transporter 1 mRNA in Clear Cell Renal Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 5179-5188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15336	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Rii J, Sakamoto S, Sugiura M, Kanesaka M, Fujimoto A, Yamada Y, Maimaiti M, Ando K, Wakai K, Xu M, Imamura Y, Shindo N, Hirota T, Kaneda A, Kanai Y, Ikehara Y, Anzai N, Ichikawa T.	4. 巻 112
2. 論文標題 Functional analysis of LAT3 in prostate cancer: Its downstream target and relationship with androgen receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 3871-3883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14991. Epub 2021 Jul 8	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 梨井 隼菱, 坂本 信一, 溝上 敦, 安西 尚彦, 金井 好克, 市川 智彦
2. 発表標題 アミノ酸トランスポーターLAT1はカバジタキセル耐性前立腺癌においてCDK1とCDK2を介して細胞増殖に寄与する
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本 信一, 齋藤 心平, 安藤 敬介, 梨井 隼菱, 徐 旻恵, 金井 好克, 安西 尚彦, 市川 智彦
2. 発表標題 去勢抵抗性前立腺癌におけるアミノ酸トランスポーターLAT1選択的阻害薬JPH203の効果
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2022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	金田 篤志 (Kaneda Atsuh) (10313024)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	市川 智彦 (Ichikawa Tomohiko) (20241953)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	大内 基司 (Ouchi Motoshi) (20409155)	獨協医科大学・医学部・准教授 (32203)	
研究分担者	川上 英良 (Kawakami Eiryo) (30725338)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	落谷 孝広 (Ochitya Takahiro) (60192530)	東京医科大学・医学部・教授 (32645)	
研究分担者	坂本 信一 (Sakamoto Shinichi) (70422235)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	
研究分担者	前田 敏郎 (Maeda Toshiro) (80278027)	千葉大学・医学部附属病院・特任教授 (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	花岡 英紀 (Hanaoka Hideki) (80361426)	千葉大学・医学部附属病院・教授 (12501)	
研究分担者	橋本 弘史 (Hashimoto Hirofumi) (10454935)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	

	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
研究協力者	田村 貴明 (Tamura Takaaki)		
研究協力者	齋藤 心平 (Saito Shinpei)		

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