

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590248

研究課題名（和文） コリントランスポーターを標的とした分子標的癌治療法の開発

研究課題名（英文） Development of cancer therapeutic agents targeting choline transporter

研究代表者

稲津 正人（INAZU MASATO）

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00297269

研究成果の概要（和文）：

コリンは、全ての動物細胞にとって重要な必須栄養素であり、細胞膜の構成成分であるリン脂質の合成や神経伝達物質であるアセチルコリンの前駆体として利用されている。癌細胞においてコリン代謝系の異常が報告され、細胞増殖との関連性が指摘されている。我々は、多くの癌細胞において choline transporter-like proteins (CTLs) が高発現し異常増殖と密接に関連している事を明らかにした。さらに、CTLs の機能を阻害する事によりアポトーシスによる細胞死が誘導されることを明らかにした。新たに同定された CTLs を介したコリン取り込み機構は、癌治療における新規標的分子としての可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Choline is essential for the synthesis of major membrane phospholipid phosphatidylcholine and neurotransmitter acetylcholine. Elevated levels of choline and up-regulated choline kinase activity have been detected in cancer cells. We found that choline transporter-like proteins (CTLs) are highly expressed in various cancer cells and are also involved in abnormal proliferation. Furthermore, the functional inhibition of CTLs could promote apoptotic cell death. Identification of this new CTLs-mediated choline transport system provides a potential new target for therapeutic intervention.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：トランスポーター、コリン、癌、細胞増殖

### 1. 研究開始当初の背景

**Choline transporter-like protein 1 (CTL1)**は様々な組織に発現し、CTL1を介するコリン取り込みは、細胞膜の構成成分であるリン脂質の合成に深く関与しており、細胞増殖に重要な機能分子であると考えられる。最近、癌細胞においてコリン代謝系の活性増加が報告されており、細胞増殖との関連性が指摘されている。臨床において、PET/CTを用いた癌の画像診断に<sup>11</sup>C-コリンや<sup>18</sup>F-コリンが用いられるようになり、コリンの腫瘍細胞への集積性の高さが確認されその特性が臨床応用されている。従って、癌細胞は積極的にコリンを取り込み細胞増殖に利用していることが推察される。そこで我々は、癌細胞におけるコリン代謝系の律速段階に関与するコリントランスポーター分子に注目し、その分子同定と機能解析を行い、癌細胞の異常増殖機能との関連性を明らかにすることを目的とし、新たな分子標的癌治療の研究開発に取り組んでいる。

### 2. 研究の目的

臨床において、<sup>11</sup>C-コリンや<sup>18</sup>F-コリンを用いたPET/CT画像診断の有用性が確認されている癌種として、肺癌、乳癌、大腸癌、前立腺癌、神経芽腫、グリオーマなどがある。これらの癌種におけるCTLファミリー(CTL1-5)のmRNAおよびタンパク質発現を正常組織と比較検討し、癌細胞に高発現ないしは特異的に発現しているトランスポーター分子を同定する。癌細胞に高発現ないしは特異的に発現しているCTL分子の機能的特徴を明らかにする目的で、さまざまな培養癌細胞を用いてコリン輸送活性の特徴を明らかにする。また同時に、すでに臨床応用されている医薬品の中から、各種癌細胞へのコリン輸送を抑制する薬物をスクリーニングし、癌治療に適応外使用できる候補薬物の探索を行う。CTL分子を介したコリン取り込み機構と癌細胞増殖との関連性を明らかにする。また、CTL分子の機能抑制によるアポトーシス誘導についても検討する。

### 3. 研究の方法

(1) PET/CTにおいてコリンの集積性が確認されている癌種におけるCTLファミリー(CTL1-5)のmRNAおよびタンパク質発現を正常組織と比較検討する。さらに、癌細胞に高発現ないしは特異的に発現しているCTL分子を免疫組織化学的解析により同定する。

(2) 癌細胞におけるコリン輸送活性の特徴

を明らかにする。CTL分子が高発現ないしは特異的に発現している癌種の培養癌細胞を用いて、<sup>3</sup>Hコリン取り込み機構の特徴を明らかにする。検討項目として、Na<sup>+</sup>依存性、Kinetics、薬物感受性、細胞内外のpH依存性などを<sup>3</sup>Hコリン輸送活性測定にて検討し、CTLを介するコリン取り込み機構の生化学的特徴を明らかにする。また、CTL分子の機能解析には、RNA干渉法を用いた特異的なmRNA発現抑制法が有用であるため、各種癌細胞に特異的に発現しているCTL mRNAを選択的にノックダウンするCTL-shRNA発現ベクターを用いて、<sup>3</sup>Hコリン取り込みに及ぼす影響を検討する。

(3) コリン輸送活性を阻害する既存の医薬品をスクリーニングする。すでに臨床応用されている医薬品の中から、癌細胞へのコリン輸送を抑制する薬物のスクリーニングを行う。これまでの我々の研究では、有機カチオン系の医薬品(キニン、キニジン、デシプラミン、ジフェンヒドラミン、クロニジンなど)がコリン取り込みを抑制することを見出しているため、カチオン系薬物を中心にスクリーニングを行う。

(4) 癌細胞に高発現ないしは特異的に発現しているCTL分子の機能と細胞増殖との関連性を明らかにし、アポトーシス誘導について検討する。

### 4. 研究成果

神経芽腫細胞へのコリン取り込みは、細胞内プロトンとコリンの交換輸送により行われており、その分子の実体はNa<sup>+</sup>非依存性のcholine transporter-like protein 1(CTL1)を介して行われていることを明らかにした。さらに、CTL1タンパクは細胞膜分画に発現していた。また、CTL1を介したコリン取り込み作用はNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1(NHE1)およびNHE5と機能共役していることも明らかにし、両トランスポーターは協調的に働いていると考えられる。コリン系の神経芽腫細胞LA-N-2はアセチルコリン合成酵素を発現しており、コリンからアセチルコリンへの変換能を有していた。一方、非コリン系の神経芽腫細胞SH-SY5Yは、アセチルコリン合成能は有していなかった。従って、LA-N-2細胞はアセチルコリンを合成および遊離してauto/paracrine systemを介して細胞増殖などの機能亢進を行っている可能性が考えられる。また、非コリン系の神経芽腫細胞SH-SY5Yにおけるコリン取り込みは、主に細胞膜の主成分であるフォスファチジルコリ

ンの合成系に関与していると思われる。

次に、小細胞肺癌、膵臓癌およびグリオーマにおけるコリン取り込み機構とコリントランスポーター分子についての解析を行った。いずれの癌細胞において、コリン取り込みは、細胞内プロトンとコリンの交換輸送により行われており、新規の Na<sup>+</sup>非依存性 choline transporter-like protein 1(CTL1) および CTL2 を介して行われていることを明らかにした。これらのコリントランスポーターに対する特異的抗体を作成し、ウエスタンブロット解析や免疫染色にてタンパク発現も確認した。更に、CTL1 の mRNA 発現抑制やコリン取り込み阻害により、アポトーシスによる細胞死が誘導された。小細胞肺癌においては、アセチルコリン合成酵素 (ChAT) ならびに分解酵素 (AChE, BuChE) の mRNA 発現を有しており、細胞外から CTL1 を介して取り込まれたコリンからアセチルコリン合成を行っていることを確認した。いずれも細胞増殖に関与する重要な代謝経路であることを解明した。CTL1 および CTL2 を介したコリン取り込みは、既存の医薬品であるフルボキサミン、デシプラミン、フルオキセチン、パロキセチンなどの抗うつ薬により強く阻害され、さらに、アポトーシスによる細胞死を惹起することを見いだした。9種類の癌細胞株における14種類のカチオン系医薬品のコリン取り込み阻害作用を細胞生存との相関関係を検討した結果、高い相関関係が認められた(図1)。よって、コリン取り込み作用は細胞増殖と密接な関係にあると考えられる。

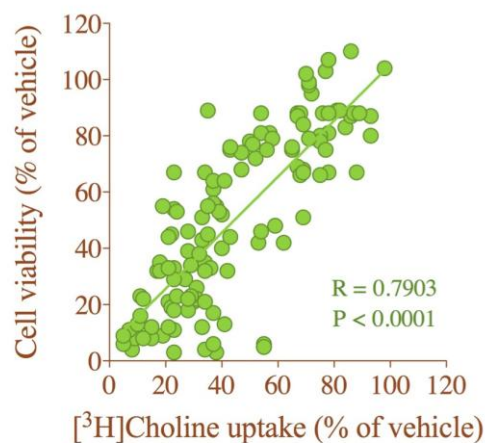


図 1

以上の結果より、癌細胞に高発現する CTL1 および CTL2 は、細胞膜のリン脂質合成系およびアセチルコリン合成系を介した細胞増殖と関連しており、新しい癌治療のターゲット分子であると思われる。また、既存の医薬品

から癌治療への適応拡大の可能性が示唆された。今後は、コリントランスポーター阻害作用を有する医薬品と抗癌剤との併用による効果増強などの検討を行う必要があると思われる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

(1) Hurd TW, Otto EA, Mishima E, Gee HY, Inoue H, Inazu M, Yamada H, Halbritter J, Seki G, Konishi M, Zhou W, Yamane T, Murakami S, Caridi G, Ghiggeri G, Abe T, Hildebrandt F. Mutation of the Mg<sup>2+</sup> Transporter SLC41A1 Results in a Nephronophthisis-Like Phenotype. *J Am Soc Nephrol.* 24, 2013, 967-977. doi:10.1681/ASN.2012101034. 査読有

(2) Inazu M, Sasaki J, Moriyama M, Hosoya R, Tai R. Functional analysis of choline transporter in pancreatic cancer cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 121, 2013, 198P. 査読無

(3) Moriya S, Che XF, Komatsu S, Abe A, Kawaguchi T, Gotoh A, Inazu M, Tomoda A, Miyazawa K. Macrolide antibiotics block autophagy flux and sensitize to bortezomib via endoplasmic reticulum stress-mediated CHOP induction in myeloma cells. *Int J Oncol.* 42, 2013, 1541-1550. doi: 10.3892/ijo.2013.1870. 査読有

(4) Inazu M, Fujita S, Yamazaki T, Aratani S, Nakajima T, Nishioka K. Functional analysis of choline transporters in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Journal of Pharmacological Sciences*, 118, 2012, 208P. 査読無

(5) Komatsu S, Miyazawa K, Moriya S, Takase A, Naito M, Inazu M, Kohno N, Itoh M, Tomoda A. Clarithromycin enhances bortezomib-induced cytotoxicity via endoplasmic reticulum stress-mediated CHOP (GADD153) induction and autophagy in breast cancer cells. *Int J Oncol.* 40, 2012, 1029-1039. doi: 10.3892/ijo.2011.1317. 査読有

(6) Yamada T, Inazu M, Tajima H, Matsumiya T. Functional expression of choline transporter-like protein 1 (CTL1) in h

uman neuroblastoma cells and its link to acetylcholine synthesis. *Neurochemistry International*, 58, 2011, 354-365. 査読有. doi: 10.1016/j.neuint.2010.12.011

(7) Inazu M, Fujita Y, Inuzuka M, Matsuoka M. Molecular and functional characterization of choline transporter in human leukemia cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 115, 2011, 178P. 査読無

[学会発表] (計 13 件)

- ① Inazu M, Sasaki J, Moriyama M, Hosoya R, Tai R. Functional analysis of choline transporter in pancreatic cancer cells. 第 86 回日本薬理学会年会. 平成 25 年 3 月 21 日～23 日. 福岡国際会議場 (福岡県)
- ② Inazu M, Yamada T, Kubota N, Yamanaka T, Tajima H. Functional expression of choline transporter-like proteins in small cell lung carcinoma cells: A target molecule for lung cancer therapy. 5th International Conference on Drug Discovery and Therapy. 2013 年 02 月 18 日～21 日. Dubai (UAE).
- ③ Hurd T, Otto E, Inoue H, Yung Gee H, Inazu M, Konishi M, Ghiggeri G, Abe T and Hildebrandt F. Mutation of the Renal Mg<sup>2+</sup> Transporter SLC41A1 Causes a Nephronophthisis-like Phenotype. *Kidney Week 2012*. 2012 年 11 月 04 日. San Diego, CA.
- ④ 森山 充、佐々木 惇、細谷 龍作、戴黎、稲津 正人. 腫瘍細胞におけるコリントランスポーターの機能解析. 第 170 回東京医科大学医学会総会. 2012 年 11 月 17 日. 東京医科大学病院 (東京都)
- ⑤ 稲津 正人、山田 朋子、田島 裕久. コリントランスポーターは癌治療の標的分子である. 第 7 回トランスporter研究会年会. 2012 年 06 月 09 日. 京都大学農学部 (京都府)
- ⑥ 稲津 正人. コリントランスポーターを標的とした癌治療薬の開発. BIO tech 2012 アカデミックフォーラム. 2012 年 04 月 25 日～27 日. 東京ビックサイト (東京都)
- ⑦ 稲津 正人、山田 朋子、田島 裕久、松

宮 輝彦、西岡 久寿樹. 小細胞肺癌における choline transporter-like protein 1 と Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 の機能的連関とアセチルコリン合成との関連性について. 日光シンポジウム. 2011 年 12 月 17 日. 日光東照宮晃陽苑 (栃木県)

- ⑧ 藤井 翔太、山崎 友也、稲津 正人、荒谷 聡子、中島 利博、西岡 久寿樹. 関節リウマチ滑膜繊維芽細胞におけるコリントランスポーターの機能解析. 第 168 回東京医科大学医学会総会. 2011 年 1 月 5 日. 東京医科大学 (東京都)
- ⑨ 稲津 正人、山田 朋子、田島 裕久、松宮 輝彦、西岡 久寿樹. ヒト神経芽腫細胞における choline transporter-like protein と Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger の機能的連関とアセチルコリン合成との関連性について. 第 34 回日本神経科学大会. 2011 年 9 月 15 日. 横浜パシフィコ (神奈川県)
- ⑩ 稲津 正人、西岡 久寿樹. 小細胞肺癌におけるコリントランスポーターの機能解析と癌治療への応用. 第 13 回応用薬理シンポジウム. 2011 年 9 月 4 日. 千葉大学 (千葉県)
- ⑪ Inazu M, Yamada T, Tajima H, Matsumiya T, Nishioka K. Functional expression of choline transporter-like protein 1 (CTL1) in human neuroblastoma cells and its link to acetylcholine synthesis. 8th IBRO World Congress of Neuroscience. 2011 年 7 月 16 日. Florence, Italy.
- ⑫ Inazu M, Fujita Y, Inuzuka M, Matsuoka M. Molecular and functional characterization of choline transporter in human leukemia cells. The 84th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. 2011 年 3 月 23 日. 横浜パシフィコ (神奈川県)
- ⑬ 稲津 正人、黄司 博展、田島 裕久、山田 朋子、松宮 輝彦、西岡 久寿樹. 大腸癌細胞におけるトランスporterの機能解析および癌治療法の研究. 第 12 回応用薬理シンポジウム. 2010 年 9 月 19 日. 横浜シンポジア (神奈川県)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：癌治療剤

発明者：稲津正人、山田朋子、田島裕久

権利者：東京医科大学

種類：特許

番号：特願 2011-188053

出願年月日：2011 年 8 月 30 日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

稲津 正人 (INAZU MASATO)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00297269

### (2) 研究分担者

田島 裕久 (TAJIMA HIROHISA)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：50306833

### (3) 連携研究者

山田（大原） 朋子 (YAMADA TOMOKO)

東京医科大学・医学部・助手

研究者番号：20468648