

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24650501

研究課題名（和文）加齢および炎症性腸疾患におけるアミノ酸トランスポーターとプロスタグランジンの役割

研究課題名（英文）The role of prostaglandins and amino acid transporters in aging and inflammatory bowel disease

研究代表者

伴場 裕巳（BAMBA, Hiromi）

埼玉医科大学・保健医療学部・講師

研究者番号：80453447

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）：大腸の炎症から発癌の過程におけるプロスタグランジン（PG）のアミノ酸トランスポーター（LAT1）発現に与える影響を検討した。各種PGの刺激により腸上皮細胞におけるLAT1の発現は増強せず、各種アミノ酸の取り込み量にも一定の変化は見られなかった。よってPGは、LAT1の発現やアミノ酸取り込みに関して直接的な影響は与えず、LAT1との連携によって大腸における慢性炎症から発癌過程への関与の可能性は低いと考えられた。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that prostaglandins (PGs) promote inflammation and carcinogenesis in colon through amino acid transporter expression. In this study, we examined the effects of PGs on LAT1, L-type amino acid transporter, expression in human colon epithelial cells. Western blot analyses showed that PG did not effect on LAT1 expression. Further, the high performance liquid chromatography analyses revealed that there was no tendency to enhance the uptake of amino acid in human colon epithelial cell by PGs. These results suggest that PG-LAT1 pathway may be not important role of chronic inflammation and carcinogenesis in colon.

研究分野：総合領域、生活科学、食生活学、食と栄養

キーワード：アミノ酸トランスポーター LAT1 プロスタグランジン 炎症 発癌 腸上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 腸管の表面を覆う上皮細胞層には、栄養素の特異的輸送に関わるトランスポーターが存在し、栄養素の吸収など腸管の機能を司っている。近年、腸上皮細胞膜における各種栄養素のトランスポーターが栄養素を取り込むことにより細胞にシグナルが伝達され、炎症や癌の増殖性に寄与している可能性が報告されている¹⁾。数あるトランスポーターのうち、必須アミノ酸を含む中性アミノ酸を輸送する L 型アミノ酸トランスポーター1 L-type amino acid transporter 1 (LAT1) は、正常細胞より腫瘍細胞に高発現している。LAT1 は必須アミノ酸を腫瘍細胞内に供給することによって増殖や亢進した細胞内代謝を維持している²⁾と考えられているが、発癌過程における役割は詳細には検討されていない。

(2) 腸管の病気としては潰瘍や癌が知られているが、その前段階には炎症が存在すると考えられる。これらの炎症場面で惹起されるプロスタグランジン prostaglandin (PG) は誘導型合成酵素のシクロオキシゲナーゼ-2 cyclooxygenase-2 (COX-2) により合成される³⁾。大腸癌の前癌病変である腺腫の間質細胞に COX-2 が発現することから³⁾、この間質細胞から産生された COX-2 由来の PG が上皮細胞に働きかけ、発癌を促している機構が報告されている⁴⁾。

2. 研究の目的

腫瘍細胞に高発現する LAT1 とプロスタグランジン (PG) の加齢および炎症性腸疾患における役割を解明する事により、加齢や炎症の慢性化によって生じる様々な疾患の惹起・進行・重症化を予防するための新たな治療法の礎の創出を目的とする。特に LAT1 と PG の間に相互作用があるのか否かを解明することにより、炎症性腸疾患や癌における効果的な治療法を探索する。今回は発癌の過程における LAT1 の役割を明らかにするために腸上皮細胞における PG のアミノ酸トランスポーター発現に与える影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒト腸上皮細胞モデル

ヒト腸上皮細胞のモデルとして HT-29 (ATCC)を用いた。HT-29 細胞は 10%牛胎児血清添加 McCoy's 5A 培地 (Life Technologies) にて 37°C、5%炭酸ガス存在下で継代維持した。対数増殖期の細胞を 5×10^4 / mL に調整後播種し、コンフルエンスまで増殖させ、1%牛胎児血清 (FBS) 添加もしくは 0.1%牛胎児アルブミン (BSA) 添加 McCoy's 5A 培地に交換し、24 時間培養して実験に供した。

(2) ウェスタンブロット法によるアミノ酸トランスポーターの発現解析

PGE₁, Prostacyclin (PGI₂) および 15d-PGJ₂ (Cayman) の各薬剤を 1% FBS McCoy's 5A で 10^{-6} M に調整し、増殖休止状態の細胞に添加後 12 時間刺激培養した。各薬剤刺激もしくは無刺激の細胞に対し、プロテアーゼ阻害剤を含む細胞溶解液 (Nacalai Tesque) でタンパク質を抽出し、クイックブロットインアッセイ (Bio-Rad) にてタンパク定量を行なった。タンパク量として 20 µg の細胞抽出液を 2 倍濃縮の SDS サンプルバッファーにて 100 °C で 3 分間熱処理した。これを 10%アクリルアミドゲルにて電気泳動を行い、PVDF 膜 (Immobilon-P membrane, Merck Millipore) に転写した。タンパクが転写された PVDF 膜を 5%BSA 添加 0.1% Tween20-トリス緩衝生理的食塩水 (TBS-T) にて 4°C で一晩振盪し、ブロッキングした。その後、一次抗体を 1000 倍に、二次抗体を 2000 倍に 3%BSA-TBS-T で希釈し、各々室温で 1 時間振盪反応を行なった。一次抗体はマウス抗ヒト LAT1 モノクローナル抗体、ヤギ抗ヒト LAT2 ポリクローナル抗体、ウサギ抗ヒト ASCT2 ポリクローナル抗体、およびヤギ抗ヒト CD98 抗体 (Santa Cruz) を使用した。また、内在性コントロールとして glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現を見るために一次抗体としてウサギ抗ヒト GAPDH ポリクローナル抗体 (Santa Cruz) を使用した。二次抗体は西洋ワサビペルオキシダーゼを結合したヤギ抗マウス IgG 抗体、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体、およびロバ抗ヤギ IgG 抗体 (Santa Cruz) を使用した。抗原抗体反応させた膜を ECL ウェスタンブロットティング検出試薬 (GE Healthcare) にて検出した。

(3) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) によるプロスタグランジン受容体の発現解析

HT-29 細胞から Isogen (Nippongene)を用いて total-RNA の抽出を行った。PGE の細胞膜受容体である EP₂ と EP₄, PGI の細胞膜受容体である IP, 15d-PGJ₂ の核内受容体である PPAR_γ, および PGI の核内受容体である PPAR_δ の mRNA レベルの発現を確認するために、ReverTra Dash (Toyobo) を用いてツーステップ RT-PCR 法を行なった。内在性コントロール遺伝子は GAPDH とした。抽出した total-RNA 1 µg を用いて 30°C 10 分、58°C 30 秒、74°C 30 秒で逆転写反応を行なった。合成された cDNA 20 µL を熱変成 98°C 10 秒、アニーリング 58°C 30 秒、伸長反応 74 °C 30 秒を 1 サイクルの条件として 30 サイクル行ない、増幅させた。用いたプライマーを以下に示す。

EP₂ センスプライマー：5'-ACA CAG TCA GAT GCC AGT AA-3', EP₂ アンチセンスプライマー：5'-AAA TAA AGG GTT CGC TAA GT-3', EP₄ センスプライマー：5'-AAG GAG CAG AAG GAG ACG AC-3', EP₄ アンチセンスプライマー：5'-GTG GCG AGA ATA GGA AGG A-3', IP センスプライマー：5'-TGC TCC CTG CCT CTC ACG AT-3', IP アンチセンスプライマー：5'-TGG CTT CTG CTT TGG ACG AC-3', PPAR_γ センスプライマー：5'-TCT GGC CCA CCA ACT TTG GG-3', PPAR_γ アンチセンスプライマー：5'-CTT CAC AAG CAT GAA CTC CA-3', PPAR_δ センスプライマー：5'-GCC CTT TGT GAT CCA CGA CA-3', PPAR_δ アンチセンスプライマー：5'-GGA TGC TCT TGG CGA ACT CAG -3', GAPDH センスプライマー：5'-CCAGCCGAG CCA CATCGCTC-3', GAPDH アンチセンスプライマー：5'-ATG AGC CCC AGC CTT CTC CAT-3'

PCR 産物は 5%アクリルアミドゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色にてバンドの位置を確認した。

(4) 酵素法による分岐鎖アミノ酸 branched-chain amino acids (BCAA)の比色定量分析

HT-29 を 1%BSA 下において各薬剤で刺激もしくは無刺激で 12 時間培養後に培養上清を回収し、BCAA Assay kit (Bio Vision) の手順に従いアミノ酸量を測定した。すなわち、BCAA に特異的な酵素を用い、サンプル中の BCAA が酸化的脱アミノ化される際に生成する NADH が試薬中に含まれる色素を還元して生じた呈色 ($\lambda_{\max}=450 \text{ nm}$) を測定した。

(5) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるアミノ酸分析

HT-29 を 0.1%BSA 下において各薬剤で刺激もしくは無刺激で 24 時間培養、あるいは 48 時間培養した後に培養上清を回収し、1000rpm で 5 分遠心した後、残存する細胞などを除去した。アミノ酸分析には島津製作所製 LC-10AD-VP・HPLC システムにより構築されたものを用いた。

4. 研究成果

(1) 各 PG によるアミノ酸トランスポーターに与える影響

HT-29 細胞にはアミノ酸トランスポーターである LAT1, LAT2, ASCT が発現していた。LAT1 とヘテロ二量体を作る一回膜貫通型タンパク質 24F2hc (CD98) の発現も認めた (data 非提示)。各 PG よる刺激では LAT1, LAT2 および CD98 の発現に大きな影響はなかった。典型的な発現パターンとして

PGE₁ による LAT1 の発現を図 1-A に示す。一方 ASCT は PGE₁, Prostacyclin, 15d-PGJ₂ の刺激に対し発現が低下した (図 1-B)。

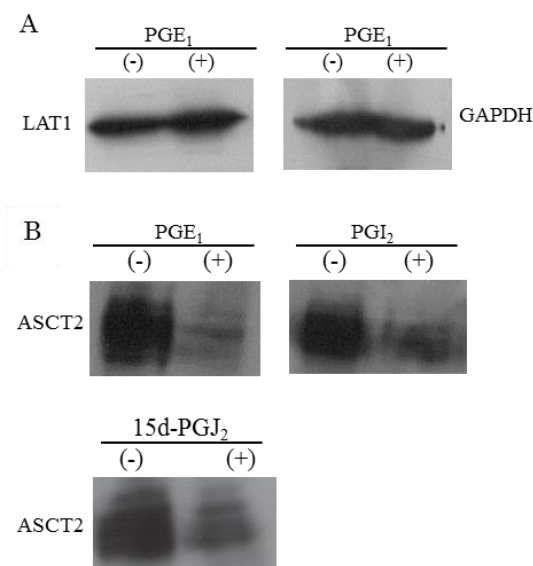


図 1. PG 刺激によるアミノ酸トランスポーターの発現 (A) PGE₁ 刺激による LAT 発現の影響 [(-): 刺激なし, (+) 刺激あり]. (B) PGE₁, PGI₂, および 15d-PGJ₂ 刺激による ASCT 発現の影響 [(-): 刺激なし, (+) 刺激あり].

(2) PG 受容体の遺伝子発現

HT-29 には PGE の細胞膜受容体である EP₂ と EP₄, PGI₂ の細胞膜受容体 である IP, 15d-PGJ₂ の核内受容体である PPAR_γ, および PGI₂ の核内受容体である PPAR_δ の確認された (図 2)。

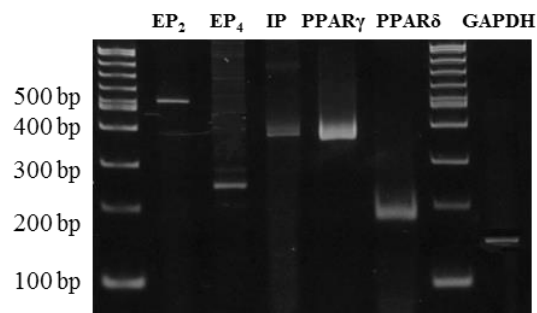


図 2. HT-29 における PG の細胞膜受容体と核内受容体の発現. 内在性コントロールとして GAPDH の発現も認められた。

(3) PG 刺激による BCAA 取り込み量の変化

トランスポーターのタンパク質レベルでの発現が正しいのかを検討するためにアミノ酸の取り込み量を検討した培養上清中に残存する BCAA 量を測定することにより PG 刺激による BCAA の取り込み量の変化を検討したところ、アミノ酸量の変化に有意義な変化が得られず、一定の傾向も得られなかった (data 非提示)。

(4) PGE₁ と PGI₂ の刺激によるタンパク質を構成するアミノ酸取り込み量の変化

増減の解析に耐えうる量の培養上清中のアミノ酸は、プロリン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸であった。アスパラギンとグルタミン酸は分離が悪く、両者の総量で増減を検討した。PG 非刺激時の残存アミノ酸量と PGE₁ や PGI₂ 刺激時の残存アミノ酸量からアミノ酸の取り込み状況の変化を比較検討したものの顕著な変化は現れなかった (data 非提示)。

(5) 考察

何を契機に LAT1 が腫瘍細胞に高発現するのか、その機序を明らかにするため、炎症的に絞って検討を行なった。アミノ酸はタンパク質を構成する成分として、またエネルギー源として利用する細胞にとっては重要な栄養素の 1 つである。アミノ酸が細胞内に供給されるためにはトランスポーターの存在は無視できない。当然のことながら用いた細胞には各種アミノ酸トランスポーターが発現していた。我々は炎症で惹起されるメディエーターとして PG を選択し、HT-29 を刺激したが、アミノ酸トランスポーターの発現、およびアミノ酸取り込み量の結果からは一定の結果が得られなかった。

これまでの知見から PG の刺激を与えることにより、細胞膜受容体と核内受容体を介して腫瘍で高発現している LAT1 と ASCT2、そして LAT1 とヘテロ二量体を作る一回膜貫通型タンパク質 CD98 の発現増強が期待された。しかしながら LAT と CD98 の発現は正常細胞で発現し、腫瘍細胞では発現の増強を認めない LAT2 と同様の発現状況であった。考えられる要因としては用いた腸上皮細胞のモデルは癌細胞であり、正常細胞と比較しアミノ酸トランスポーターの高発現が示されていることから、PG に対する感受性が破綻している可能性が挙げられる。

この状況を反映して LAT1 が取り込む BCAA の培養上清中の残存量も変化比色法および HPLC によるアミノ酸分析の結果も一定の傾向が見られなかった。こうした中で LAT1 と協調してアミノ酸の取り込みを増加させる ASCT2 のみが PG の刺激により発現が低下したことは、LAT1 と ASCT2 の発癌、増殖過程において別な機序が働いている可能性があることが示唆される。PG による ASCT2 の発現低下については、PG 受容体が大きく関与していると思われるが、今後 mRNA レベルでの解析やシグナル伝達機構のレベルでの解析が必要と思われる。

以上より、今回の結果からは明確な PG のアミノ酸トランスポーター発現に与える影響は得られなかった。LAT1 および ASCT2 と PG の関係をより深く把握するには、正常

の腸上皮細胞での検討が必要と考え、研究期間中に正常腸上皮細胞の培養を試みたが、困難を極めた。よって腸上皮細胞モデルの変更のなど、別な検討も必要であると考えられる。また、今回は細胞培養での検討にこだわり過ぎ、加齢に伴う LAT1 の発現変動の解析や炎症性腸疾患における LAT1 の発現の検討の実施が出来なかったが、動物実験による更なる検討も今後必要であると考えられた。

(6) 結語

本研究では、PG は LAT1 の発現やアミノ酸取り込みに関して直接的な影響は認められず、PG と LAT1 の連携によって大腸における慢性炎症から発癌過程への関与の可能性は低いと考えられた。

<謝辞>

本研究に当たり、学術研究助成基金による研究費の助成に感謝する。

<引用文献>

- 1) Fuchs BC, Bode BP. Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime? 2005;26:254-66
- 2) Bamba H, Ota S, Kato A, and Matsuzaki F. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs may delay the repair of gastric mucosa by suppressing prostaglandin-mediated increase of hepatocyte growth factor production. Biophys. Biochem. Res. Commun. 1998;245:567-71.
- 3) Bamba H, Ota S, Kato A, Adachi A, Itoyama S, Matsuzaki F. High expression of cyclooxygenase-2 in macrophages of human colonic adenoma. Int. J.Cancer 1999;83:470-5
- 4) Bamba H, Ota S, Kato A, Kawamoto C, Fujiwara K. Prostaglandins up-regulate vascular endothelial growth factor production through distinct pathways in differentiated U937 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun 2000;273: 485-491.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伴場 裕巳 (BAMBA, Hiromi)
埼玉医科大学・保健医療学部・講師
研究者番号：80453447

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

下垣 里河 (SHIMOGAKI, Satoka)
埼玉医科大学・保健医療学部・助教

研究者番号：50464756