

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430121

研究課題名(和文)がん微小環境におけるアミノ酸トランスポーターLAT1の役割

研究課題名(英文)Functional analysis of amino acid transporter LAT1 in tumor endothelial cells

研究代表者

末弘 淳一 (Suehiro, Jun-ichi)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：80572601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は腫瘍血管内皮細胞におけるアミノ酸トランスポーターLAT1の発現とその役割を明らかにすることを目的として、LAT1選択的阻害薬であるJPH203を処理した臍帯静脈内皮細胞を用いてin vitroにおける内皮機能を、マウスB16F10メラノーマ固形腫瘍モデルを用いてin vivoにおける抗血管新生、抗腫瘍効果を検討した。その結果、JPH203はアミノ酸枯渇によるストレス応答を誘導することで増殖、遊走、チューブ形成を阻害し、in vivoにおいて血管新生を抑制し、腫瘍進展を阻害することが見出された。以上の成果は抗血管新生薬剤としてのLAT1阻害薬の新たな可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathological roles of system L amino acid transporter LAT1 in tumor microenvironment, we examined in vitro endothelial function and in vivo tumor angiogenesis using LAT1 selective inhibitor, JPH203. JPH203 elicited amino acid deprivation stress and impaired endothelial cell growth, migration and tube formation in human umbilical vein endothelial cells. In mouse B16F10 melanoma xenograft model, JPH203 significantly inhibited tumor growth by attenuating angiogenesis. Taken together, these findings have provided the new insight in LAT1 function in tumor progression and showed the possibility of JPH203 as an angiogenesis inhibitor.

研究分野：血管生物学

キーワード：がん微小環境 アミノ酸トランスポーター 腫瘍血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

がん微小環境における血管新生は腫瘍進展や転移と密接に関わり、血管内皮細胞増殖因子 VEGF モノクローナル抗体 Bevacizumab をはじめとする抗血管新生薬剤が抗癌治療における新たな選択肢として用いられるようになった。ハーバード大学 Folkman 博士が提唱したこのような抗癌療法は、癌組織に酸素・栄養素を供給する経路を標的とし、癌細胞における生存・増殖に必須なエネルギーを枯渇されるということが基本的なコンセプトとなっている。本治療法においてキーとなる栄養素(糖、アミノ酸)は容易に細胞膜を通過できないことから、栄養素を細胞内へ取り込むトランスポーターの局在・機能により治療効果が大きく左右されることが推察される。

我々は以前より、癌細胞に対する栄養供給経路である病的血管新生メカニズム解明を目的とし、VEGF 刺激下の臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を病的血管内皮細胞のモデルとして用いた研究を行ってきた。そのなかで DNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム(Suehiro J, et.al. *Blood*, 2010)、次世代高速シーケンサーによるエピゲノム解析(Suehiro J et.al. *J Biol Chem*, 2014)を行い、血管新生に関わる遺伝子を網羅的に抽出する中から、Na<sup>+</sup>非依存アミノ酸トランスポーターLAT1、ヘテロダイマーを形成する4F2hc が内皮細胞に発現することを見出した。LAT1 は中性アミノ酸を基質とするトランスポーターであり、種々の癌細胞に高発現し、アミノ酸の取り込みを促進することで細胞増殖に寄与している。そのため、癌治療薬開発の有望な分子標的として考えられてきた。2010年 Oda らの報告によると LAT1 を選択的に競合阻害する化合物 JPH203 を用いて細胞内へのアミノ酸の取り込みを阻害すると、ヒト結腸腺癌 HT-29 の *in vitro* における細胞増殖抑制、ゼノグラフトモデルにおける抗腫瘍効果を示すことが報告されている(OdaK, et.al., *Cancer Sci*, 2010)。

この JPH203 の腫瘍抑制効果は LAT1 を高発現する癌細胞の増殖抑制による直接的作用と考えられていたが、我々による予備的検討により JPH203 は VEGF 刺激下の血管内皮細胞に対して作用し、LAT1 機能抑制によりアミノ酸取り込み、増殖、チューブ形成を阻害することが確認された。

## 2. 研究の目的

以上の背景より、アミノ酸トランスポーターLAT1 は癌細胞のみならず腫瘍血管内皮細胞においても発現・機能し、がん微小環境決定に寄与する可能性が示唆された。そこで本研究では、HUVEC を用いた *in vitro* において LAT1 の発現・機能解析を行うこと、B16メラノーマ細胞を用いて作成された固形腫瘍進展、及び腫瘍血管新生を観察することを通して、がん微小環境下におけるアミノ酸トラン

スポーターLAT1 の役割を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) LAT1 発現、及びプロモータ解析

炎症・血管新生関連因子を HUVEC に作用させ、定量 PCR、ウェスタンブロットティングにより LAT1 の発現を検討する。また、LAT1 遺伝子の 5'-領域をルシフェラーゼベクターに組み込むことでプロモータ活性を検討する。プロモータ上に存在する転写因子結合領域に欠失・変異を加えることにより責任領域を同定し、内皮細胞における LAT1 発現・誘導に必須なゲノム領域を解析する。

### (2) LAT1 を介した血管内皮機能の解析

LAT1 選択的競合阻害薬である JPH203 を種々の濃度で HUVEC に作用させ、

- ① 細胞計数、Propidium Iodide (PI) 色素を用いたフローサイトメトリー(増殖・細胞周期)
- ② スクラッチアッセイ(遊走)
- ③ マトリゲルを用いた 3 次元培養(チューブ形成)
- ④ 放射性同位体標識 L-leucine の細胞内への取り込み(アミノ酸取り込み)

以上の4項目について機能解析を行う。

### (3) LAT1 下流にある遺伝子のエピジェネティクス・転写活性化機構の解析

HUVEC に LAT1 選択的阻害薬である JPH203 を作用させた際の遺伝子発現解析を DNA マイクロアレイにより行う。また、クロマチン免疫沈降法により発現が変動した遺伝子上で H3、H4 アセチル化、H3K4 トリメチル化といったヒストン修飾が増減するか、検討を行う。

### (4) LAT1 選択的阻害薬 JPH203 を作用させた際の血管新生、腫瘍進展

マウス大動脈を用いた Aortic ring アッセイにおいて、種々の濃度の JPH203 を作用させ、血管新生能を検討する。また、C57BL マウスにおいて、B16F10 メラノーマ細胞を用いて皮下移植するモデルを作製する。このモデルで、JPH203 の投与群と非投与群でマウスの体重、腫瘍容積を経時的にモニタリングし、エンドポイントにおいては腫瘍重量を計測する。安楽死後、摘出した固形腫瘍にて凍結切片を作製し、腫瘍内血管密度、及び白血球細胞の存在を CD31(血管内皮細胞)、CD45(白血球細胞)の免疫組織化学にて定量する。

## 4. 研究成果

### (1) LAT1 発現、及びプロモータ解析

HUVEC に血管内皮増殖因子(VEGF)、腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )をそれぞれ作用させると、LAT1 及び 4F2hc が数時間以内に誘導された。また、多くの因子を作用させる中で特に

compound A、compound B（いずれも未発表につき非公開）が LAT1、4F2hc とともに最も強く誘導することが確認された（図 1）。LAT1 遺伝子の翻訳開始点上流 2kbp をルシフェラーゼ発現ベクターに組み込み、上流から段階的に欠失させることで責任領域の同定を行ったところ、5' -UTR 領域を含む GC リッチ領域（404bp）にて全長と同等の活性が認められた。一方、先に検討を行った LAT1 を誘導する因子を作用させ、レポーター活性の検討を行ったところ、いずれの刺激によってもレポーター活性の上昇は見られなかった。このことから、刺激によるプロモータ活性の上昇には他のゲノム領域が必要であると推察された。

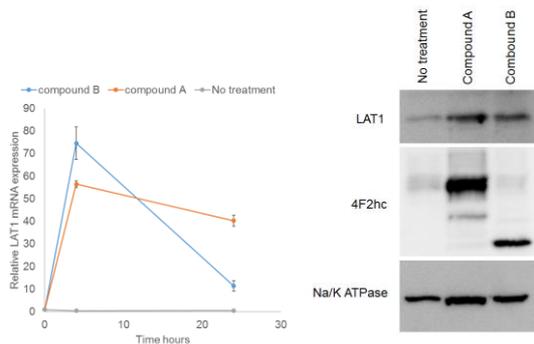


図 1 LAT1、4F2hc mRNA 及びタンパク質の誘導

### (2) LAT1 を介した血管内皮機能の解析

HUVEC を用いて MTT アッセイにて JPH203 による増殖抑制の用量反応関係を検討したところ、IC50: 5-10 $\mu$ M となり、真皮微小血管、真皮リンパ管由来の内皮細胞でも同様の傾向が認められた。この濃度において放射性同位体標識 L-leucine の取り込みを検討したところ、コントロールに比して 90%以上抑制されていた。また、PI を用いたフローサイトメトリーによる細胞周期の検討では、JPH203 は G0/G1 期でのアレストを誘導することが確認された。以上で見出された LAT1 阻害による増殖抑制に伴い、JPH203 (100 $\mu$ M) 処理により、スクラッチアッセイによる細胞遊走、マトリゲル上での三次元培養によるチューブ形成が有意に低下することを明らかにした。

### (3) LAT1 下流にある遺伝子のエピジェネティクス・転写活性化機構の解析

LAT1 選択的阻害薬である JPH203 を 100 $\mu$ M にて HUVEC に 24 時間作用させ、DNA マイクロアレイにより網羅的発現解析を行った。コントロールに比して、JPH203 処理細胞では 4 倍以上に発現が上昇したプローブが 212、減少したプローブが 488 見出された（図 2）。DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) を用いたジーンオントロジー解析では、変動した遺伝子の多くが細胞周期、DNA 複製、細胞骨格に関

わる遺伝子として分類された。特に、Cyclin D2 の上昇、Cyclin A2 の減少、ATF4 をはじめとするストレス応答性遺伝子の誘導が顕著であり、LAT 阻害で生じた必須アミノ酸欠乏によるストレス応答によって細胞増殖が抑制されている可能性が示された（図 3）。

また、LAT1 阻害時に誘導される因子のプロモーター領域においてヒストン修飾パターンに変化がみられるかを ChIP-qPCR 法にて検討したところ、LAT1 阻害による発現誘導に対し、転写亢進時に増加することが知られるアセチル化ヒストンやメチル化 H3K4 が増加していることが確認された。

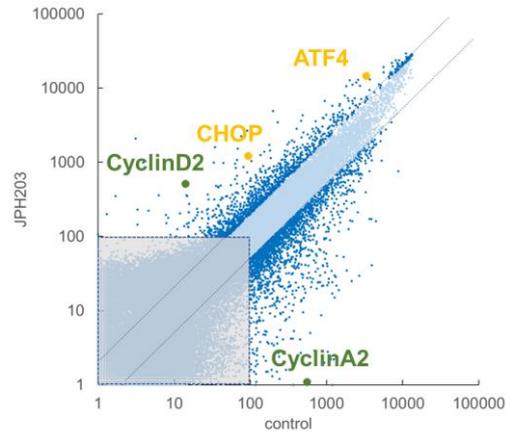


図 2 DNA マイクロアレイによる LAT1 阻害時の変動遺伝子の解析

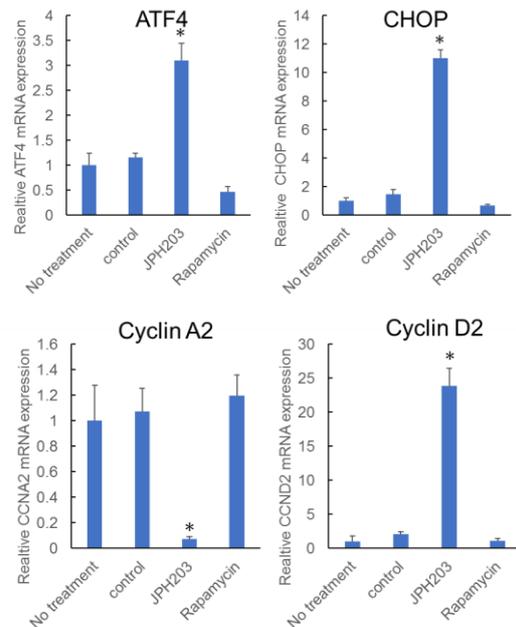


図 3 LAT1 阻害により発現が変動する遺伝子

(4) LAT1 選択的阻害薬 JPH203 を作用させた際の血管新生、腫瘍進展

C57BL/6 マウスから摘出した大動脈をマトリゲル内へ埋め込み、種々の濃度で JPH203 を作用させた血管新生への影響を検討した。その結果、*in vitro* で増殖抑制がみられた濃度より高濃度 (100  $\mu$ M 以上) にて内皮、線維芽細胞の遊走が顕著に抑制されることが明らかとなった。

また、B16F10 メラノーマ細胞皮下移植によって作成された *in vivo* マウス固形腫瘍モデルに対し、JPH203 を 1 日おきに 50mg/kg にて腹腔投与することにより、腫瘍進展に影響があるかを観察した。皮下腫瘍形成時から経時的に観察したところ、JPH203 投与群ではコントロール群に比して、エンドポイントにおける腫瘍容積・重量が有意に低下することが確認された。また、免疫組織化学による解析では、JPH203 投与群で CD31 にて染色される血管密度や CD45 にて染色される腫瘍内白血球浸潤が低下傾向にあることが見出された。本実験を通して、JPH203 によるマウス体重に対する影響は見られなかった。

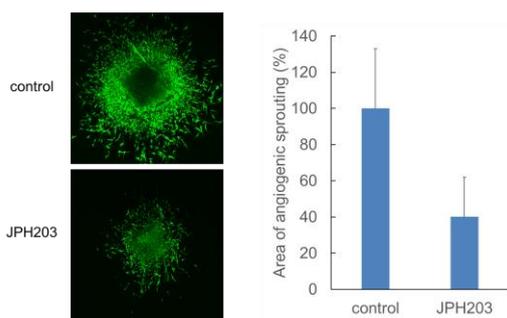


図 4 aortic ring アッセイによる LAT1 阻害時の血管新生能の検討

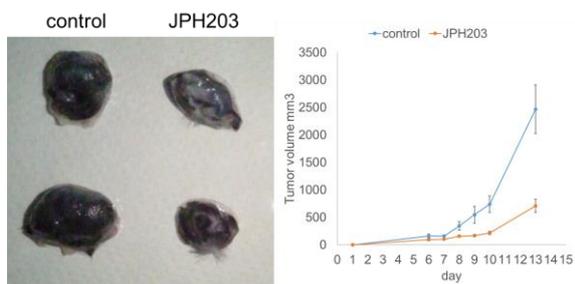


図 5 LAT1 阻害時の B16F10 メラノーマ固形腫瘍進展

## 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 8 件) すべて査読有

① Kanki Y, Nakaki R, Shimamura T, Matsunaga T, Yamamizu K, Katayama S, Suehiro JI, Osawa T, Aburatani H, Kodama T, Wada Y, Yamashita JK, Minami T. Dynamically and epigenetically coordinated GATA/ETS/SOX transcription factor expression is indispensable for endothelial cell differentiation. *Nucleic Acids Res.* 2017 Mar 17. doi: 10.1093/nar/gkx159.

② Pauty J, Usuba R, Takahashi H, Suehiro J, Fujisawa K, Yano K, Nishizawa T, Matsunaga YT. A Vascular Permeability Assay Using an In Vitro Human Microvessel Model Mimicking the Inflammatory Condition. *Nanotheranostics* 2017; 1(1):103-113. doi:10.7150/ntno.18303.

③ Ito Y, Katayama K, Nishibori Y, Akimoto Y, Kudo A, Kurayama R, Hada I, Takahashi S, Kimura T, Fukutomi T, Katada T, Suehiro J, Beltcheva O, Tryggvason K, Yan K. Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1 epigenetically regulates nephrin gene expression. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017 Feb 22:ajprenal.00305.2016. doi: 10.1152/ajprenal.00305.2016.

④ Takahashi H, Kato K, Ueyama K, Kobayashi M, Baik G, Yukawa Y, Suehiro JI, Matsunaga YT. Visualizing dynamics of angiogenic sprouting from a three-dimensional microvasculature model using stage-top optical coherence tomography. *Sci Rep.* 2017 Feb 10;7:42426. doi: 10.1038/srep42426.

⑤ Otsuki H, Kimura T, Yamaga T, Kosaka T, Suehiro JI, Sakurai H. Prostate Cancer Cells in Different Androgen Receptor Status Employ Different Leucine Transporters. *Prostate.* 2017 Feb;77(2):222-233. doi: 10.1002/pros.23263.

⑥ Suehiro J, Kanki Y, Makihara C, Schadler K, Miura M, Manabe Y, Aburatani H, Kodama T, Minami T. Genome-wide approaches reveal functional vascular endothelial growth factor (VEGF)-inducible nuclear factor of activated T cells (NFAT) c1 binding to angiogenesis-related genes in the endothelium. *J Biol Chem.* 2014 Oct

17;289(42):29044-59. doi:  
10.1074/jbc.M114.555235.

⑦ Maejima T, Inoue T, Kanki Y, Kohro T, Li G, Ohta Y, Kimura H, Kobayashi M, Taguchi A, Tsutsumi S, Iwanari H, Yamamoto S, Aruga H, Dong S, Stevens JF, Poh HM, Yamamoto K, Kawamura T, Mimura I, Suehiro J, Sugiyama A, Kaneki K, Shibata H, Yoshinaka Y, Doi T, Asanuma A, Tanabe S, Tanaka T, Minami T, Hamakubo T, Sakai J, Nozaki N, Aburatani H, Nangaku M, Ruan X, Tanabe H, Ruan Y, Ihara S, Endo A, Kodama T, Wada Y. *PLoS One*. 2014 May 5;9(5):e96005. doi: 10.1371/journal.pone.0096005. eCollection 2014.

⑧ Inoue T, Kohro T, Tanaka T, Kanki Y, Li G, Poh HM, Mimura I, Kobayashi M, Taguchi A, Maejima T, Suehiro J, Sugiyama A, Kaneki K, Aruga H, Dong S, Stevens JF, Yamamoto S, Tsutsumi S, Fujita T, Ruan X, Aburatani H, Nangaku M, Ruan Y, Kodama T, Wada Y. Cross-enhancement of ANGPTL4 transcription by HIF1 alpha and PPAR beta/delta is the result of the conformational proximity of two response elements. *Genome Biol*. 2014 Apr 10;15(4):R63. doi: 10.1186/gb-2014-15-4-r63.

[学会発表] (計 2 件)

① 末弘 淳一, 櫻井 裕之: LAT1 阻害時の血管内皮細胞におけるトランスクリプトーム解析. 第 90 回日本薬理学会年会, 長崎, 2017 年 3 月 15 日-3 月 17 日.

② 末弘 淳一, 田中 弦, 木村 徹, 櫻井 裕之: アミノ酸トランスポーター LAT1 阻害薬は血管内皮細胞増殖及び血管新生を抑制する. 第 23 回日本血管生物医学会学術集会. 神戸, 2015 年 12 月 10 日-12 月 12 日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/user/medicine/pharmaco/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

末弘 淳一 (SUEHIRO, Jun-ichi)  
杏林大学・医学部・助教  
研究者番号: 80572601

(2) 研究分担者  
なし

### (3) 連携研究者

和田 洋一郎 (WADA, Youichiro)  
東京大学・アイソトープ総合センター・教授

研究者番号: 10322033

櫻井 裕之 (SAKURAI, Hiroyuki)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号: 00508294

### (4) 研究協力者

なし