様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 29 年　6 月 15 日現在

機関番号：12605
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2014～2016
課題番号：26450409

研究課題名（和文）臨床応用を目指した腫瘍胎児性アミノ酸トランスポーターの基礎的研究

研究課題名（英文）Fundamental study of the tumor-related amino acid transporter LAT1 for clinical application

研究代表者
打出　毅（Uchide, Tsuyoshi）

東京農工大学・（連合）農学研究科（研究院）・特任教授

研究者番号：20327456

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では腫瘍胎児性アミノ酸トランスポーターの一つであるL type amino acid transpoter-1 (LAT1)が犬の腫瘍性疾患において、新たな治療ターゲット分子として有望であるか否かを基礎的観点から検討を行った。LAT1は正常組織と比較して犬血管肉腫、犬悪性黒色腫、犬乳腺腫瘍等でその発現量が高値を示した。また、これらの腫瘍由来株化細胞を用いてLAT1阻害薬による細胞増殖抑制試験を行ったところ、株化細胞の増殖性は阻害薬によって用量依存的に抑制された。
以上より、LAT1は犬腫瘍の新たな治療のターゲットに成り得ることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：L-type amino acid transporter 1 (LAT1), an isoform of amino acid transport system L, transports branched or aromatic amino acids essential for fundamental cellular activities such as cellular growth, proliferation and maintenance. This amino acid transporter recently has received attention because of its preferential and up-regulated expression in a variety of human tumors in contrast to its limited distribution and low-level expression in normal tissues. In this study, we explored the feasibility of using LAT1 inhibitor as a new therapeutic agent for canine hemangiosarcoma (HSA), mammary gland tumor (MGT) and malignat melanoma (MM). The LAT1 mRNA levels in HSA, MGT and MM tissues as well as the levels in their cell lines were significantly ($P<0.01$) higher than in normal tissues. Functional analysis of LAT1 showed that the cellular growth activities in these cell lines were inhibited in a dose-dependent manner by selective LAT1 inhibitors.

研究分野：獣医学

キーワード：腫瘍　アミノ酸　トランスポーター　LAT1

１．研究開始当初の背景

L-type amino acid transporter 1(LAT1)はアミノ酸トランスポーターの１つで、胎生期の細胞で発現し生命活動に必要な分枝アミノ酸や芳香族アミノ酸を細胞内へ供給する重要な役割を果たしている。最近ではヒトの腫瘍で LAT1 が高発現していることが明らかにされ、所謂、oncofetal protein （成人の組織では発現せず、細胞分裂増殖の盛んな胎生期と腫瘍で発現する蛋白）の１つと考えられている(Histol. Histopathol. 2013)。LAT1 は、活発な細胞活性を維持するために必要となるアミノ酸を腫瘍細胞に供給し、腫瘍細胞の増殖・維持に重要な役割を果たしていることから、腫瘍の治療ターゲット分子として注目されている。近年、腫瘍の増殖活性を抑える特異的阻害剤の開発が進められている（J. Pharm. Sci. 2013, 102：3228-3238）。しかしながら、獣医学領域では、LAT1 の腫瘍性疾患における役割について十分検討されていない。

２．研究の目的

本研究では犬の自然発生腫瘍サンプルおよび犬腫瘍由来株化細胞を用いて、LAT1 が腫瘍性疾患の新たな治療ターゲット分子になり得るかを検討する。

３．研究の方法

（１）犬腫瘍組織における LAT1 の発現解析

酪農学園大学附属動物病院に来院し、術後の病理組織診断により腫瘍と診断された症例を対象に行った。また、コントロールとして実験動物として飼育されている健常犬を用いた。組織を採取し、各組織における LAT1 の発現を mRNA レベルで解析した。

（２）犬腫瘍における LAT1 阻害薬の有効性の評価

LAT1 の高発現が確認され、しかも獣医臨床上重要と判断される①犬血管肉腫、②犬乳腺腫瘍、③犬悪性黒色腫の３つの腫瘍に着目し、その株化細胞を用いた LAT1 阻害薬による増殖抑制試験を行った。

４．研究成果

（1）犬腫瘍組織における LAT1 の発現解析

①正常組織における LAT1 の発現

犬の正常組織における LAT1 の網羅的発現解析を行った。様々な組織（腫瘍が発生しうる様々な正常組織）における ***LAT1*** mRNA の発現を qRT-PCR により解析した。人での報告と同様に、犬においても脳と精巣でその発現量は有意に高かった（図1）。

②犬腫瘍組織における LAT1 の発現解析

様々な犬腫瘍組織における ***LAT1*** mRNA の発現解析を qRT-PCR により実施した。犬腫瘍組織の ***LAT1*** mRNA の発現量は正常組織と比較して有意に高かった（図2）。

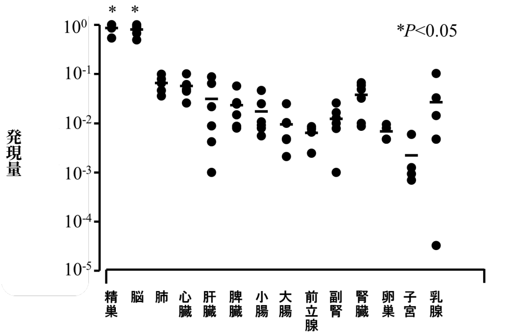

図１　犬正常組織における *LAT1* mRNA の発現

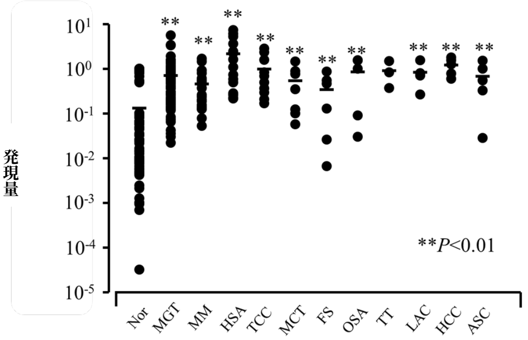

図２　腫瘍組織における *LAT1* mRNA の発現量

Nor: 正常組織，MGT: 乳腺腫，MM: 悪性黒色，HSA: 血管肉腫，TCC: 移行上皮癌,MCT: 肥満細胞腫，FS: 線維肉腫，OSA: 骨肉腫，TT: 精巣腫瘍，LAC: 肺腺癌，HCC: 肝細胞癌，ASC: 肛門嚢腺癌

（２）犬腫瘍における LAT1 阻害薬の有効性の評価

①血管肉腫（HSA）株化細胞における評価

HSA 株化細胞における ***LAT1*** mRNA の発現解析を実施したところ、HSA 株化細胞において腫瘍組織と同様に ***LAT1*** mRNA の高い発現が確認された(図３)。

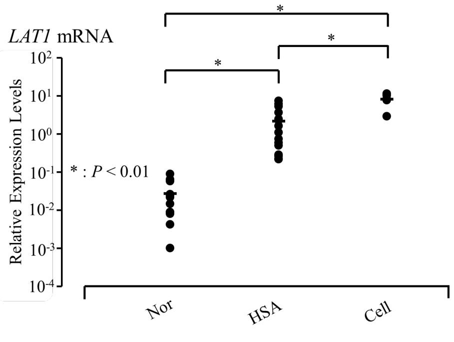

図３　犬血管肉腫における *LAT1* mRNA の発現解析

Nor: 正常脾臓組織，HSA: 血管肉腫組織，Cell: HSA 株化細胞

LAT1 mRNA の高発現が確認された株化細胞を用いて、LAT1 阻害薬による増殖抑制効果を検討した。実験は犬血管肉腫の治療に用いられる抗癌剤（ドキソルビシン(DOX)）の増殖抑制効果に対し、阻害薬が増強作用を有するか否かを指標に行った（表１）。その結果、LAT1 阻害剤は DOX の持つ腫瘍増殖抑制効果を増強

することが明らかになった。

表１　LAT1 阻害剤（melphalan）による DOX による抗腫瘍効果の増強

Name of cell lines	IC50 without melphalan (μM)	IC50 with melphalan (μM)	P value
Ud2	≥100	45 ± 18	<0.01
Ud6	85 ± 23	38 ± 11	<0.01
JuA1	3.6 ± 1.1	0.72 ± 0.25	<0.01
JuB2	9.8 ± 2.8	4.2 ± 1.8	<0.01
JuB4	15 ± 3.6	5.2 ± 1.1	<0.01

②乳腺腫瘍株化細胞における評価

乳腺腫瘍(MGT)株化細胞における ***LAT1*** mRNA の発現解析を実施したところ、MGT 株化細胞において腫瘍組織と同様に ***LAT1*** mRNA の高い発現が確認された(図 4)。

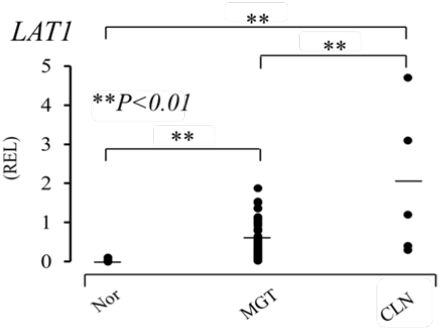

図４　犬乳腺腫瘍における *LAT1* mRNA の発現解析
REL: relative expression levels（発現量）, Nor: 正常乳腺組織, MGT: 乳腺腫瘍組織, CLN: 株化細胞

LAT1 mRNA の高発現が確認された株化細胞のうち１細胞株を用いて、LAT1 阻害薬による増殖抑制効果を検討した。その結果、阻害薬による容量依存的増殖抑制効果が確認された（図５）。

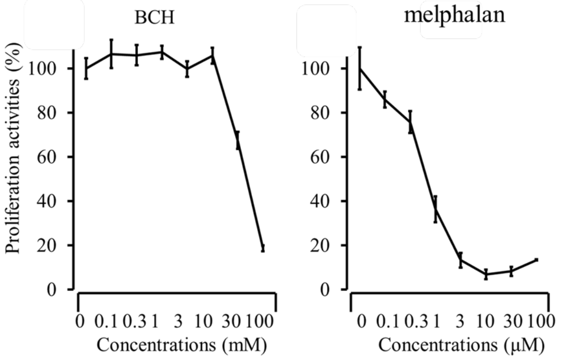

図５ LAT1 阻害剤による細胞増殖抑制作用
阻害剤の濃度に依存し細胞増殖が抑制され、IC50 は BCH で 48.2 ± 3.5 mM、melphalan で 18.9 ± 2.3μM と算出された。

ヌードマウスに MGT 由来株化細胞(CHM-M)を接種した後、LAT1 阻害剤である melpahalan と抗癌剤であるミトキサントロンを投与しこれらの薬剤の増殖抑制効果を検討した(図 6)。その結果、LAT1 阻害薬(melpahalan)はミトキサントロンの増殖抑制効果を増強した。

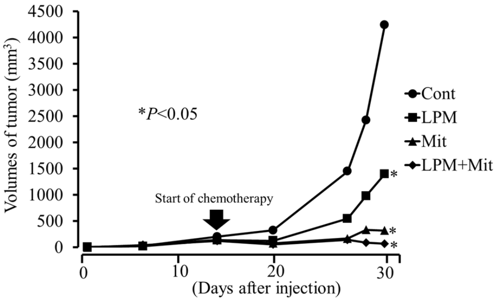

図 6 ヌードマウスに接種した MGT 由来株化細胞（CHM-M）の増殖に対する LAT1 阻害剤の効果
ヌードマウスの右臀部に CHM-M を 5×10^6 細胞接種し、平均腫瘍体積が 100mm^3 に達した時点（CHM-M 接種後 14 日目）より、melpahlan および mitoxantrone の投与を開始した。コントロール群（Cont）、melphalan 投与群（LPM）、mitoxantrone 投与群（Mit）、melphalan および mitoxantrone 投与群（LPM+Mit）の腫瘍体積の推移を示している。
Cont: コントロール群, LMP: melphalan（LAT1 阻害薬）群, Mit: mitoxantrone 群, LPM+Mit: 併用群

③犬悪性黒色腫(MM)における評価

犬悪性黒色腫(MM)株化細胞における ***LAT1*** mRNA の発現解析を実施したところ、MM 株化細胞において腫瘍組織と同様に ***LAT1*** mRNA の高い発現が確認された(図 7)。

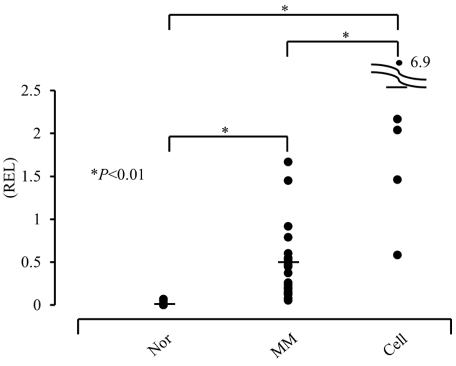

図 7 犬 MM 株化細胞における *LAT1* mRNA の発現解析

LAT1 mRNA の高発現が確認された株化細胞のうち１細胞株を用いて、LAT1 阻害薬による増殖抑制効果を検討した。その結果、阻害薬による容量依存的増殖抑制効果が確認された（図 8）。

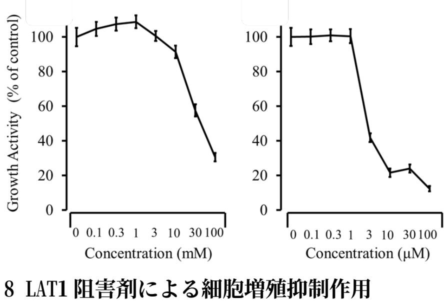

図 8 LAT1 阻害剤による細胞増殖抑制作用

このグラフから各阻害薬の IC_{50} を算出した。この IC_{50} 濃度の阻害薬を様々な抗癌剤とともに株化細胞に作用させ、抗癌剤の増殖抑制効果に与える影響を検討した（図8）。その結果、阻害薬は抗癌剤の作用を増強することが確認された。

図8　LAT1阻害剤と抗癌剤の組み合わせによる抗腫瘍効果（IC_{50}）

Anti-cancer drugs	Single use	Combination with BCH	Conbination with LPM
carboplatin (μM)	1.3 ± 0.15	0.66 ± 0.12 *	0.58 ± 0.09 *
cyclophosphamide (mM)	9.7 ± 2.7	5.3 ± 0.74 *	5.8 ± 0.91 *
dacarbazine (μM)	10 ± 1.3	6.3 ± 2.0 *	5.9 ± 1.1 *
doxorubicin (μM)	3.5 ± 0.33	1.5± 0.12 *	1.6 ± 0.13 *
mitoxantrone (μM)	1.8 ± 0.24	0.66 ± 0.07 *	0.63 ± 0.08 *
nimustine (μM)	8.9 ± 2.2	3.9 ± 0.65 *	3.3 ± 0.67 *
vinblastine (μM)	52 ± 5.1	20 ± 2.4 *	17 ± 2.8 *
vincristine (μM)	62 ± 0.14	18 ± 3.4 *	19 ± 4.4 *

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９件）

1. Fukumoto S, Saida K, Sakai H, Ueno H, Iwano H, **Uchide T**.
Therapeutic potential of endothelin inhibitors in canine hemangiosarcoma.
Life Sci(査読有) 159巻　2016　55-60

2. Ito Y, Maehara S, Itoh Y, Matsui A, Hayashi M, Kubo A, **Uchide T**.
Effect of refractive error on visual evoked potentials with pattern stimulation in dogs.
J Vet Med Sci(査読有)78巻　2016　505-508

3. Ueno H, Yamato O, Sugiura T, Kohyama M, Yabuki A, Miyoshi K, Matsuda K, **Uchide T**.
GM1 gangliosidosis in a Japanese domestic cat: a new variant identified in Hokkaido, Japan.
J Vet Med Sci(査読有)78巻　2016　91-95

4. Fukumoto S, Miyasho T, Hanazono K, Saida K, Kadosawa T, Iwano H, **Uchide T**
Big endothelin-1 as a tumour marker for canine haemangiosarcoma.
Vet J(査読有)　204巻　2015　269-74

5. Okamatsu G, Komatsu T, Kubota A, Onaga T, **Uchide T**, Endo D, Kirisawa R, Yin G, Inoue H, Kitazawa T, Uno Y, Teraoka H.
Identification and functional characterization of novel feline cytochrome P450 2A.
Xenobiotica(査読有)　45巻　2015　503-510

6. Hanazono K, Fukumoto S, Kawamura Y, Endo Y, Kadosawa T, Iwano H, **Uchide T**.
Epidermal growth factor receptor expression in canine transitional cell carcinoma.
J Vet Med Sci(査読有)　77巻　2015　1-6

7. Kozakai T, Sakate M, Takizawa S, **Uchide T**, Kobayashi H, Oishi K, Ishida N, Saida K.
Effect of feeding behavior on circadian regulation of endothelin expression in mouse colon.
Life Sci(査読有)　118巻　2014 232-237.

8. Fukumoto S, Hanazono K, Miyasho T, Endo Y, Kadosawa T, Iwano H, **Uchide T**.
Serum big endothelin-1 as a clinical marker for cardiopulmonary and neoplastic diseases in dogs.
Life Sci(査読有)　118巻　2014 329-232.

9. Ueno H, Miyoshi K, Fukui S, Kondo Y, Matsuda K, **Uchide T**.
Extranodal lymphoma with peripheral nervous system involvement in a dog.
J Vet Med Sci(査読有)　76巻　2014　723-727.

〔学会発表〕（計14件）

1．福本真也 岩野英知 酒井 洋樹 **打出毅**
Endothelin-1(ET-1)受容体拮抗薬による犬血管肉腫に対する治療効果の基礎的検討第159回日本獣医学会学術集会 2016年9月9日 日大（神奈川・藤沢）

2．福本真也 福本恵理子 賀川由美子 **打出毅**
シクロスポリンでコントロール可能であった猫消化管好酸球性硬化性線維増殖症の1例 平成27年度獣医学術北海道地区学会　2015年9 月12日　酪農大（北海道・江別）

3．福本真也 河村芳郎 岩野英知 遠藤能史 廉澤剛 **打出毅** L-type amino acid transporter1(LAT1)阻害薬の犬悪性黒色腫に対する治療効果 第158回日本獣医学会学術集会 2015年9月8日 北里大（青森・十和田）

4．福本真也 坂口鷹子 **打出毅**
ボセンダンによる治療に反応した犬特発性肺血圧症の1症例おける血清endothelin-1 第102回日本獣医循環器学会　2015年6月18日　大宮ソニックシティ（埼玉・大宮）

5．福本真也 華園究 藤崎雄介 河村芳郎 玉本隆司 **打出毅** 犬移行上皮癌の早期診断を目的とした超音波検査および免疫染色の有用性　平成26年度 日本獣医師会獣医学術学会年次大会　2015年2月8日　岡山コンベンションセンター（岡山・岡山）

6．福本真也 永本哲郎 **打出毅**

イヌ悪性黒色腫におけるエンドセリン受容体拮抗薬の有効性の検討第11回 日本獣医内科学アカデミー学術大会　2015 年 2 月 2 日 パシフィコ横浜（神奈川・横浜）

7.　福本真也 宮庄拓 岩野英知 遠藤能人 廉澤剛 **打出毅**　血清中 big Endothelin-1 の犬血管肉腫の腫瘍マーカーとしての有用性 第 11 回 日本獣医内科学アカデミー学術大会 2015 年 2 月 2 日 パシフィコ横浜（神奈川・横浜）

8. 福本真也 坂口鷹子 熊澤りえ 藤崎雄介 田村純 堀あい 中出哲也 山下和人 **打出毅** 犬人工透析におけるメシル酸ナファモスタットの有用性　平成 26 年度獣医学術北海道地区学会　2014 年 9 月 12 日　北大（北海道・札幌）

9. 藤崎雄介 熊澤りえ 華園究 河村芳朗 玉本隆司 福本真也 廉澤剛 **打出毅** 犬移行上皮癌における診断補助としての免疫組織学染色の有用性　平成 26 年度獣医学術北海道地区学会　2014 年 9 月 12 日　北大（北海道・札幌）

10. 熊澤りえ 玉本隆司 藤崎雄介 堀あい 福本真也 三好健二郎 中出哲也 **打出毅** 続発性中枢性尿崩症が疑われた犬の１例性 平成26年度獣医学術北海道地区学会　2014 年 9 月 12 日　北大（北海道・札幌）

11. 玉本隆司 藤崎雄介 熊澤りえ 福本真也 **打出毅** クッシング症候群および糖尿病に続発した肝膿瘍の犬の１例 平成26年度獣医学術北海道地区学会 2014 年 9 月 12 日 北大(北海道・札幌)

12. 華園究 福本真也 岩野英知 谷山弘行 廉澤剛 **打出毅** 犬膀胱移行上皮癌における EGFR の遺伝子発現及び免疫組織化学的発現 平成26年度獣医学術北海道地区学会 2014年 9 月12日　北大（北海道・札幌）

13. 福本真也 岩野英知 遠藤能史 廉澤剛 **打出毅**　L-type amino acid transpoter1阻害薬の犬悪性黒色腫に対する治療効果　第157回日本獣医学会学術集会　2014年9月8日 北大（北海道・札幌）

14. 鈴木啓也 福本真也 玉本隆司 岩野英知 **打出毅** 犬胆嚢粘液嚢腫とATP-binding cassette B4遺伝子変異の関連第157回日本獣医学会学術集会　2014年9月8日　北大（北海道・札幌）

６．研究組織

(1)研究代表者

打出　毅（Uchide Tsuyoshi）
東京農工大学・農学部・特任教授
研究者番号：20327456

(2)連携研究者

廉澤　剛（Kadosawa Tsuyoshi）
酪農学園大学・獣医学群・教授
研究者番号：70214418

斉田　要（Saida Kaname）
独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員
研究者番号：00357055