

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32203

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670631

研究課題名(和文)cMyc-LAT1 axisを基盤とした胸腺上皮性悪性腫瘍治療戦略の確立

研究課題名(英文)Strategy for epithelial thymic malignancy treatment focusing on L-type amino acid transporter 1

研究代表者

千田 雅之(CHIDA, MASAYUKI)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：70333812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺癌における、癌細胞特異的発現を示すアミノ酸トランスポーターLAT1の発現ならびにその制御に関わる因子を明らかにすることを目的として、胸腺癌由来培養細胞Ty82を用いた検討を行った。Ty82にLAT1は発現していた。LAT1の特異的阻害薬であるJPH203にてTy82の発育は阻害された。JPH203は濃度依存的にTy82におけるS6 kinaseを脱リン酸化し、eukaryotic initiation factor or 4E-binding protein 1をリン酸化した。JPH203は、mTORの不活化を通してTy82の増殖を抑制した。ヒト検体でもLAT1の発現を胸腺癌に認めた。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the effect of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and cMyc-LAT1 axis in thymic carcinoma, we analyzed the function of LAT1 in Ty82 human thymic carcinoma cells. LAT1 was detected in Ty82 cells by Western blot. A LAT1-specific inhibitor, JPH203, reduced the cell growth of Ty82. JPH203 promoted the dephosphorylation of S6 kinase and phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1, indicating that a LAT1-specific inhibitor inactivates mTOR, and leading to the suppression of Ty82 cell proliferation. LAT1 was detected in human thymic carcinoma specimens, but not in those of thymoma.

研究分野：医学 胸部外科学 呼吸器外科学

キーワード：胸腺癌 胸腺腫 アミノ酸トランスポーター LAT1

1. 研究開始当初の背景

胸腺癌、胸腺腫など胸腺上皮性悪性腫瘍は稀な疾患ということもあり、肺癌に比べその研究は遅れている。胸腺腫には核異型は少なく、癌とは診断されないが悪性の振る舞いをする浸潤型胸腺腫の存在が知られており、浸潤型胸腺腫と胸腺癌の関係は未だ明らかでない。近年、胸腺癌は胸腺腫とは独立した疾患であるとされた一方、type B3、type A 胸腺腫からの胸腺癌への移行も時に認められることが知られている。これまでの探索的研究では、胸腺癌と胸腺腫の比較においてにおいて、Vascular Endothelial Growth Factor 等の一般的な癌関連遺伝子の発現にある程度の差異は認められる()ものの有効な指標はなく、胸腺癌の治療戦略を構築するにあたり、新たな視点が必要であった。

最近、中性アミノ酸トランスポーター(L-type amino acid transporter 1: LAT1)は癌細胞特異的に発現されることが知られ、ある種の癌種でその発現が認められている()。しかし、胸腺癌、胸腺腫における検討はなされておらず、またその臨床的意義も不明である。

2. 研究の目的

本研究では、癌細胞特異的発現を示す LAT1 とその発現に関わる癌遺伝子 cMyc の関連性 (cMyc-LAT1 axis) の観点から、その発現を胸腺癌、胸腺腫で検討することにより、胸腺癌における LAT1 を分子標的とする診断および治療な

どの新たな治療戦略の可能性を明らかとすること目的とし、1)胸腺癌培養細胞株を用いた LAT1 に対する基礎実験、2)胸腺癌、胸腺腫のヒト切除検体を用いた LAT1 発現についての検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 胸腺癌由来培養細胞 Ty82 (Japanese Collection of Research Bioresource Cell Bank 社、茨城) を用い以下の実験を行なった。Ty82 の培養は 10%FCS を含む RPMI1640 にて行なった。

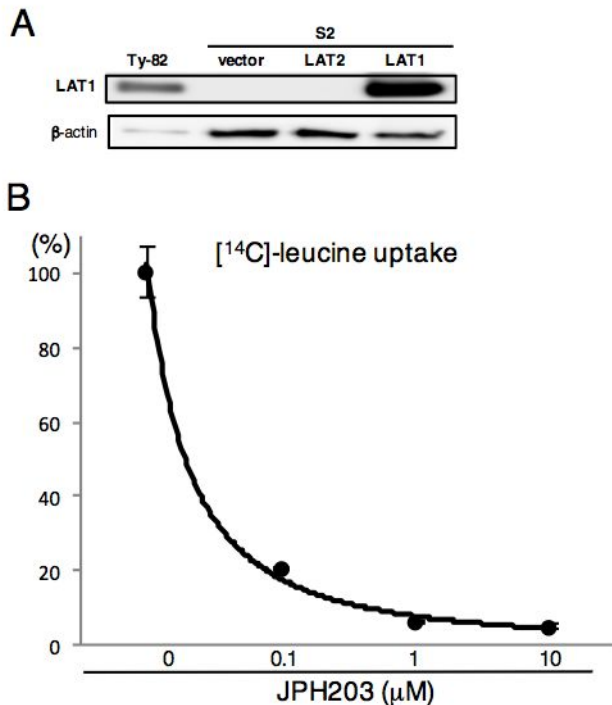
Ty82 における LAT1 の発現の検討: Ty82 細胞、ならびに対照として、LAT1、LAT2 を transfect した S2 細胞を用い、LAT1 の発現を Western-blot 法にて検討。LAT1 の機能評価: ¹⁴C でラベルしたロイシンの細胞内への取り込みをシンチレーションカウンターにて測定した。(2) LAT1 の阻害実験: LAT1 の特異的阻害薬である JPH203 の、Ty82 への効果を検討するため、培養細胞数、細胞死、細胞周期を測定した。細胞周期の解析は、細胞を 70%エタノールにて固定し、RNase A (100ug/ml) 30 分、37 °C、propidium iodide 30 分、室温にて処理し、FACS にて測定した。(3) LAT1 と mammalian target of rapamycin (mTOR) : LAT1 を介した細胞内アミノ酸量の変化が、mTOR に与える影響を明らかにするため、S6 kinase (S6K) 、 eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1)のリン酸化、脱リン酸化を anti-phospho p70S6K, anti-p70S6K、

anti-phospho 4E-BP1、anti-4E-BP1 抗体 (Cell Signaling Technology 社、USA) を用いて、immunoblot 法にて測定した。

(4) また、胸腺腫、胸腺癌の検体における LAT1 の発現を免疫染色にて検討した。

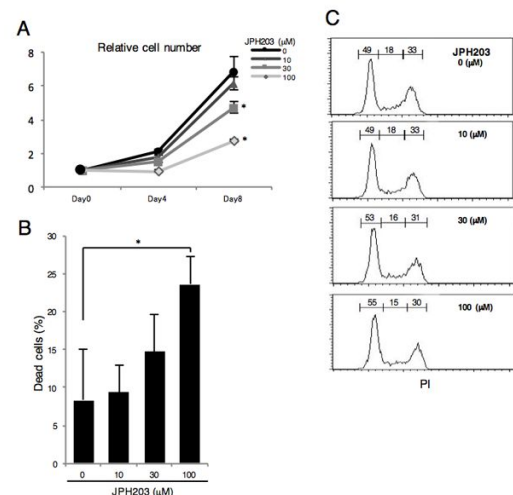
4. 研究結果

(1) 胸腺癌培養細胞 Ty82 に LAT1 の発現を認めた (図 1 A)。LAT1 の特異的阻害薬である JPH203 は濃度依存的に Ty82 細胞のアミノ酸 (ロイシン) 取り込みを阻害した (図 1 B)。Ty82 におけるアミノ酸取り込みに LAT1 が重要な役割を果たしていることが示された。

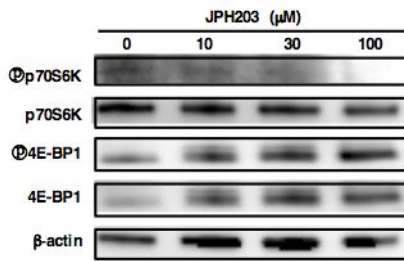


(2) JPH203 は濃度依存的に Ty82 培養細胞数を減少させた (図 2 A)。また、高濃度で

死細胞数を増加させた (図 2 B)。また、細胞周期の検討を行うと、JPH203 により、S 期の細胞数が減少し、G1 期の細胞数が増加していた (図 2 C)。JPH203 の Ty82 細胞への増殖抑制効果は、細胞死と分裂阻止の両者に寄ることが示された。



(3) JPH203 は濃度依存的に、S6K を脱リン酸化し、4E-BP1 をリン酸化した (図 3)。mTOR は、細胞内アミノ酸過剰状態で、S6K をリン酸化し 4E-BP1 を脱リン酸化することにより蛋白合成し細胞分裂を進める、一方、アミノ酸欠乏状態で S6K を脱リン酸化、4E-BP1 をリン酸化することが知られている。LAT1 の特異的阻害薬である JPH203 は細胞内アミノ酸枯渇状態をもたらすことにより mTOR を不活化すると考えられた。



(4) ヒト切除検体において、胸腺腫には LAT1 の発現は認めず、胸腺癌にのみ、LAT1 の発現を認めた。

引用文献

Seki N, Sakamoto S, Karube Y, Oyaizu T, Ishihama H, Chida M. ¹⁸F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for evaluation of thymic epithelial tumors: utility for World Health Organization classification and predicting recurrence-free survival. *Ann Nucl Med* 28, 2014, 257-262.

Oda K, Hosoda N, Endo H, Saito K, Tsujihara K, Yamamura M, et al. L-type amino acid transporter 1 inhibitors inhibit tumor cell growth. *Cancer Sci* 101, 2010, 173-179.

5. 主な発表論文等

雑誌論文 (2件)

Karube Y, Kobayashi S, Maeda S, Sado T, Ishihama H, Chida M. Tumor-related gene expression levels in thymic carcinoma and type B3 thymoma. *J Cardiothorac Surg*, 査

読あり、11, 2016, 印刷中

DOI: 10.1186/S13019-016-0468-1

Oyaizu T, Matsumura Y, Kobayashi S, Sado T, Ishihama H, Chida M. Tumor-related gene expression levels in pulmonary pleomorphic carcinoma. *J Cardiothorac Surg* 査読あり 10, 2015, 79.

DOI: 10.1186/S13019-015-0282-1

学会発表 (3件)

林啓太郎、Promsuk Jutabha、千田雅之、遠藤仁、安西尚彦．アミノ酸トランスポーター-LAT1 特異的阻害薬による胸腺癌抑制．第 132 回日本薬理学会間当部会 .2015 年 7 月 4 日 .「明海大学浦安キャンパス(千葉県浦安市)」

林啓太郎、Promsuk Jutabha、遠藤仁、安西尚彦．アミノ酸トランスポーター-LAT1 阻害薬による血管形成阻害．第 88 回日本薬理学会年会 . 2015 年 3 月 20 日 .「名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)」

林啓太郎、Promsuk Jutabha、遠藤仁、安西尚彦．必須アミノ酸トランスポーター-LAT1 阻害薬の胸腺がんに対する増殖抑制効果．第 73 回日本癌学会学術集会 . 2014 年 9 月 25 日 .「パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)」

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

千田 雅之 (CHIDA, Masayuki)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 70333812

(2) 研究分担者

林 啓太郎 (HAYASHI, Keitaro)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 10323106