

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790793

研究課題名（和文）肺癌におけるアミノ酸輸送体発現阻害による抗腫瘍効果

研究課題名（英文）

Inhibition of L-type amino acid transporter 1 has antitumor activity in lung cancer

研究代表者

解良 恭一 (KAIRA KYOICHI)

群馬大学・医学部・医員

研究者番号：40400783

研究成果の概要（和文）：L型アミノ酸輸送体(LAT1)は、様々な悪性腫瘍で高発現している。肺癌(非小細胞癌)においてLAT1阻害することで抗腫瘍効果を認めるかどうかを検討した。本研究では、まず肺癌細胞株(NSC-H1395)を使い、LAT1発現の阻害効果(古典的アミノ酸輸送体阻害剤であるBCHを用いた)をin vitroで検討した。In vitroの実験の結果は、BCHにてH1395のcell viabilityは濃度依存的に抑制された。BCHとGefitinibとの併用では、gefitinibの相加効果が認められた。そして、LAT1阻害により、mTOR、p70S6K、4EBP1のリン酸化は抑制され、LAT1発現におけるmTORシグナル伝達の関与が示唆された。次に、肺癌臨床検体(外科的切除標本)120症例を用いて、臨床病理学的な検討も行った。LAT1高発現は、EGFR wild typeに関与し、肺癌における独立した予後因子であることが証明された。以上の実験結果より、LAT1発現は、EGFR遺伝子変異を持たない肺癌に多く、LAT1阻害は、EGFR野生型の肺癌における治療薬としての意義があるのかもしれない。

研究成果の概要（英文）：L-type amino acid transporter 1 (LAT1) is highly expressed in various neoplasms. Antitumor activity of inhibiting LAT1 was analyzed in non-small cell lung cancer (NSCLC). Expression of LAT1 mRNA in 54 lung cancer cell lines was examined by RT-PCR. An inhibitor of LAT1, 2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid (BCH), was administered to H1395 cell. LAT1 expression was examined in correlation with clinical features and outcome in 120 NSCLC patients. Inhibition of LAT1 by BCH reduced cell viability in H1395 cells. Furthermore, co-administration of gefitinib with BCH reduced the viability of the cells more than either agent alone. Inhibition of LAT1 reduced the level of phosphorylation of mTOR, p70S6K and 4EBP1. LAT1 protein expression was closely associated with wild type EGFR, and was an independent significant factor to predict a poor prognosis. Inhibition of LAT1 may be a new rationale to the effective therapy of NSCLC without EGFR mutation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			0
年度			0
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：肺癌

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：アミノ酸トランスポーター、肺癌、予後因子、抗腫瘍効果

1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞は、増殖や進展のためアミノ酸の細胞内への取り込みが行進している。それを担当しているのがアミノ酸トランスポーターである。悪性腫瘍に高発現しているのが、輸送系Lアミノ酸トランスポーター1(L-type amino acid transporter 1; LAT1)であり、4F2hc とヘテロ二量体を形成してその機能を果たす。LAT1 の高発現が悪性腫瘍における予後不良因子であることは、脳腫瘍、肺癌、泌尿器生殖器腫瘍で報告されてきた。特に、肺癌においては、血管新生、細胞増殖と LAT1 発現は強く関連し、非小細胞肺癌においては、独立した予後因子としても重要な役割がある事を我々は報告してきた。そのため、肺癌において、LAT1 を阻害することが抗腫瘍効果につながるのかどうかを検討することは、この分野における治療薬開発という側面より意義あるものと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

最近、LAT1 の古典的阻害薬 BCH (2-aminobicyclo-(2, 2, 1)-heptane-2-carboxylic acid) により、腫瘍細胞増殖が抑えられることが報告されている。そのため、肺癌細胞株を用いて、腫瘍増殖抑制効果があるかどうかを MTT assay などの手法を用いて検討する。さらに、肺癌の治療薬として重要な gefitinib などの分子標的治療薬との相加・相乗効果があるかどうか、そして、gefitinib の治療効果の指標である EGFR (上皮成長因子受容体) の遺伝子変異の有無と LAT1 発現との関係も臨床検体を用いて、in vitro, in vivo にて LAT1 阻害による抗腫瘍効果の可能性について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

肺癌細胞株に対して、LAT1 プライマーを用いて real-time PCR を行い、mRNA レベルで LAT1 発現を調べる。さらに、4F2hc の発現についても real-time PCR にて調べて、LAT1 発現との相関の有無、定量化により mRNA レベルでの LAT1 と 4F2hc の発現プロファイルを調べる。肺癌細胞株に、LAT の古典的阻害薬である BCH を 1mM、5mM、10mM、20mM と濃度を変えて、MTT assay を行い、細胞増殖抑制効果について検討する。BCH と gefitinib との相加・相乗効果についても細胞株を用いて検討する。さらに、肺癌臨床検体を用いて、腫瘍組織の EGFR 遺伝子変異、KRAS 遺伝子変異、LAT1 蛋白発現、その他、4F2hc、VEGF、CD34、Ki-67 などの血管新生、細胞増殖マーカーも合わせて免疫染色して、LAT1 発現と

EGFR 遺伝子変異の関係含めて評価する。

4. 研究成果

54 株の肺癌細胞株を用いて、LAT1 と 4F2hc の mRNA に発現を、real-time RT PCR にて定量的に測定したところ、H1395 の細胞株で、LAT1 発現量が最も高かった。そして、LAT1 と 4F2hc の mRNA 発現量は有意に相関していた。EGFR wild type である H1395 細胞株に対して、BCH で MTT assay を施行したところ、濃度依存的に細胞株の cell viability は抑制された。そして、EGFR-TKI である gefitinib を BCH と併用して、H1395 の肺癌細胞株における抗腫瘍効果を MTT assay で評価したところ、濃度依存性に腫瘍の増殖が抑えられており、相加効果を認めた。さらに、この細胞株について、LAT1 発現と mTOR シグナル伝達の間接的な関係を検討するため、BCH にて LAT1 阻害を施行した。WB の結果では、mTOR、p70S6K、4EBP1 のリン酸化は抑制され、LAT1 発現における mTOR シグナル伝達の間接的な関与が示唆された。

次に、非小細胞肺癌切除標本 120 症例のパラフィン切片を薄切して、LAT1、4F2hc、VEGF、Ki-67 の抗体で、免疫組織学的に蛋白発現を評価した。さらに、EGFR 遺伝子変異についても合わせて、PCR 法を用いて評価した。LAT1 発現と EGFR 遺伝子変異との相関を評価したところ、LAT1 発現は、EGFR wild type と有意な相関が認められた。そして、LAT1 発現は、VEGF や Ki-67 などの血管新生と細胞増殖マーカーと有意な相関を認めた。さらに、LAT1 高発現は、非小細胞肺癌において予後不良を予測する独立した因子であり、肺癌の進展、病因において重要であることも明らかになった。LAT1 発現は、EGFR 遺伝子変異を持たない肺癌に多く、LAT1 阻害は、EGFR wild type の肺癌における治療薬としての意義があるのかもしれない。

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 50 件)

(すべて査読有)

- ① Kaira K, Endo M, Nakagawa K, *et al.* Biologic correlates of ¹⁸F-FDG uptake on PET in pulmonary pleomorphic carcinoma. *Lung Cancer* 2011;71:144-50
- ② Kaira K, Serizawa M, Koh Y, *et al.* Expression of Excision Repair Cross-Complementation Group 1, Breast Cancer Susceptibility 1, and β III-Tubulin in Thymic Epithelial Tumors. *J Thorac Oncol* 2011;6:606-13.
- ③ Kaira K, Okumura T, Ohde Y, *et al.* Correlation Between ¹⁸F-FDG Uptake on PET and Molecular Biology in Metastatic Pulmonary Tumors. *J Nucl Med* 2011;52:705-11.
- ④ Kaira K, Murakami M, Serizawa M, *et al.* MUC1 expression in thymic epithelial tumors: MUC1 may be useful marker as differential diagnosis between type B3 thymoma and thymic carcinoma. *Virchows Arch* 2011;458:615-20.
- ⑤ Kaira K, Horie Y, Ayabe E, *et al.* Pulmonary pleomorphic carcinoma: a clinicopathological study including EGFR mutation. *J Thorac Oncol* 2010;5:460-5
- ⑥ Kaira K, Endo M, Abe M, *et al.* Biologic correlation of ¹⁸F-FDG PET in thymic epithelial tumors. *J Clin Oncol* 2010;28:3746-53
- ⑦ Kaira K, Takahashi T, Abe M, *et al.* CD98 expression is associated with the grade of malignancy in thymic epithelial tumors. *Oncol Rep* 2010;24:861-7
- ⑧ Ebara T, Kaira K, Saito J, *et al.* L-type amino acid transporter 1 expression predicts the response to preoperative hyperthermia-chemoradiotherapy for advanced rectal cancer. *Anticancer Res* 2010;30:4223-7
- ⑨ Kaira K, Oriuchi N, Shimizu K, *et al.* Comparison of L-type amino acid transporter 1 expression and L-[3-¹⁸F]-a-methyl tyrosine uptake in outcome of non-small cell lung cancer. *Nucl Med Biol* 2010;37:911-6
- ⑩ Imai H, Kaira K, Oriuchi N, *et al.* Inhibition of L-type amino acid transporter 1 has antitumor activity in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2010;30:4819-28.
- ⑪ Kaira K, Naito T, Takahashi T, *et al.* Pooled analysis of the reports of erlotinib after failure of gefitinib for non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2010;68:99-104.
- ⑫ Kaira K, Takahashi T, Murakami H, *et al.* Long-term survivors of more than 5 years in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2010;67:120-3.
- ⑬ Kaira K, Endo M, Asakura K, *et al.* Ratio of standardized uptake value on PET helps predict response and outcome after chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Ann Nucl Med* 2010;24:697-705
- ⑭ Kaira K, Oriuchi N, Yanagitani N, *et al.* Assessment of therapy response in lung cancer with ¹⁸F- α -methyl tyrosine PET. *AJR Am J Roentgenol* 2010;195:2104-11
- ⑮ Kaira K, Oriuchi N, Imai H, *et al.* Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2hc heavy chain (CD98) expression in stage I pulmonary adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2009;66:120-6.
- ⑯ Kaira K, Oriuchi N, Imai H, *et al.* L-type amino acid transporter 1 (LAT1) is frequently expressed in thymic carcinomas but is absent in thymomas. *J Surg Oncol* 2009;99:433-8
- ⑰ Imai H, Kaira K, Oriuchi N, *et al.* L-type amino acid transporter 1 expression is a prognostic marker in patients with surgically resected stage I non-small cell lung cancer. *Histopathology* 2009;54:804-13
- ⑱ Kaira K, Oriuchi N, Shimizu K, *et al.* Correlation of angiogenesis with ¹⁸F-FMT and ¹⁸F-FDG uptake in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2009;100:753-8.

- ⑱ Kaira K, Oriuchi N, Shimizu K, *et al.*
Evaluation of thoracic tumors with 18F-FMT
and 18F-FDG PET-CT: a clinicopathological
study.
Int J Cancer 2009;124:1152-60.
- ⑳ Kaira K, Oriuchi N, Shimizu K, *et al.*
18F-FMT uptake seen within primary cancer
on PET helps predict outcome of non-small
cell lung cancer.
J Nucl Med 2009;50:1770-6.

〔学会発表〕（計 10 件）

- ① 解良恭一、胸腺上皮腫瘍の FDG 集積に関する臨床病理学的検討、2010. 11. 17, 第 50 回日本核医学会学術総会、大宮ソニックスティール（埼玉県）
- ② 解良恭一、胸腺上皮腫瘍の FDG 集積に関する臨床病理学的検討、2010. 11. 4, 第 51 回日本肺癌学会総会、広島国際会議場（広島県）
- ③ 解良恭一、非小細胞肺癌におけるゲフィチニブ無効後のエルロチニブ投与の文献的統合解析、2009. 11. 13, 第 50 回日本肺癌学会総会（東京）

〔その他〕

ホームページ等

<http://lib.bioinfo.pl/user:123723>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

解良 恭一 (KAIRA KYOICHI)
群馬大学・医学部・医員
研究者番号：4 0 4 0 0 7 8 3