

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590328

研究課題名(和文) 必須アミノ酸トランスポーターLAT1のT細胞活性化における役割

研究課題名(英文) Role of LAT1 in T cell activation

研究代表者

林 啓太郎 (Hayashi, Keitaro)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10323106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：LAT1は必須アミノ酸を細胞内に取り込むトランスポーターであり、癌細胞の増殖に非常に重要であることがわかっている。しかし、本研究ではヒト末梢血T細胞の活性化によりLAT1の発現が顕著に上昇することに着目し、LAT1のヒトT細胞における役割を解析した。LAT1特異的阻害薬はサイトカイン産生などのヒトT細胞の機能を阻害した。さらに、そのメカニズムとして、LAT1特異的阻害薬により新規アミノ酸欠乏ストレス応答反応が誘起され免疫学的機能を抑制することが明らかとなった。以上の結果から、LAT1はT細胞活性化のために必須のアミノ酸トランスポーターとして機能していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We characterized L-type amino acid transporter 1 (LAT1) as an essential amino acids transporter in activated human T cells. Full activation of primary human T cells triggers the dramatic induction of LAT1. JPH203, a specific inhibitor of LAT1 suppressed amino acid incorporation and immunological function in T cells. We also identified the novel mechanism for suppression of cellular metabolism in LAT1-disturbed T cells. These results indicate that LAT1 expression is induced by full activation of T cells and LAT1 works as a central transporter for essential amino acids in activated T cells. Our result uncover the previously unknown mechanism by which T cells accelerate essential amino acid uptake upon activation and adapt to essential amino acid starvation.

研究分野：免疫学

キーワード：LAT1 アミノ酸トランスポーター T細胞 アミノ酸欠乏ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

LAT1(System L amino acid transporter 1)は必須アミノ酸を細胞内に取り込むトランスポーターである。その発現は、正常組織においては脳や精巣などの極一部の限られた組織に弱くみられるのに対し、癌細胞においては非常に高いことがわかっている。

一方で、研究代表者は、抗原刺激によって完全活性化されたヒト末梢血 T 細胞が LAT1 の発現を顕著に上昇させることを見出した。この知見は T 細胞が LAT1 の発現上昇により細胞活性化の維持に必要な必須アミノ酸を細胞内に効率よく取り込んでいることを示唆している。そこで、本研究では LAT1 のヒト T 細胞活性化における重要性を調べた。

2. 研究の目的

本研究では LAT1 が活性化 T 細胞における主要な必須アミノ酸トランスポーターとして機能することを明らかにし、LAT1 機能障害により T 細胞にどのような変化が表れるか、あるいは細胞活性化に伴ってどのような分子メカニズムで LAT1 が発現上昇するかを詳細に調べ、これまでほとんど不明であった活性化 T 細胞におけるアミノ酸輸送の分子機構を解明することを目的としている。さらに、将来的に LAT1 特異的阻害薬を新規免疫抑制剤として臨床応用することを目指す。

3. 研究の方法

(1) LAT1 の T 細胞活性化に伴う発現誘導とその分子メカニズム

ヒト末梢血 CD4 T 細胞を FACS により精製し、抗 CD3、CD28 抗体により刺激活性化後、タンパクを抽出してウエスタンブロットにより LAT1 の発現を確認した。また、T 細胞活性化に重要な転写因子の阻害薬を作用させた時の LAT1 の発現の影響を調べた。

(2) LAT1 が活性化 T 細胞における主要な必須アミノ酸トランスポーターであることの確認

LAT1 阻害薬 JPH203 を T 細胞に作用させて、活性化 T 細胞における必須アミノ酸の取り込みに影響があるか調べた。JPH203 存在下で抗 CD3、CD28 抗体により刺激活性化し、 $[^{14}\text{C}]$ でラベルしたロイシンと一定時間培養後、細胞内の放射活性を測定した。放射活性を指標にしてアミノ酸の取り込み量を同定した。

(3) ヒト活性化 T 細胞における LAT1 機能障害の影響

T 細胞活性化に対する LAT1 機能障害の影響を、サイトカイン産生能から検討した。ヒト末梢血 T 細胞を JPH203 存在下で活性化し、数日間培養後、培養上清のサイトカイン濃度を ELISA により測定した。

(4) JPH203 によるヒト活性化 T 細胞の遺伝子発現変動の解析

JPH203 存在下で活性化させたヒト T 細胞の mRNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイの結果を基に JPH203

の有無で発現が大きく異なる遺伝子を選び出し、さらにそれらの遺伝子の発現変動を Real Time PCR を用いて再度確認し、マイクロアレイの結果と比較した。両解析の結果が一致する遺伝子を調べ、それらの強制発現用ベクターを作製しヒト T 細胞に遺伝子導入してサイトカイン産生をしらべ、候補遺伝子の機能を確認した。また、そのメカニズムを調べために、T 細胞活性化に重要な転写因子に対する DDIT3 の影響をレポーターアッセイにより解析した。

4. 研究成果

ヒト末梢血 T 細胞を抗 CD3、CD28 抗体によりより活性化すると LAT1 の発現が顕著に上昇することがわかった。しかし、刺激前、及びそれぞれの抗体単独刺激では、LAT1 の発現は見られなかった。さらに、LAT1 の発現上昇は NF- κ B 及び AP1 の阻害薬により抑制された。以上の結果から、T 細胞は完全活性化により、免疫学的反応を誘起させると同時に LAT1 の発現も上昇させることがわかった。

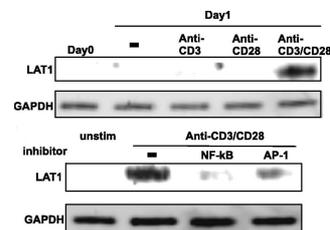


図 1. T 細胞完全活性化に伴う LAT1 の発現増加

そこで、LAT1 がヒト T 細胞におけるアミノ酸トランスポーターとして機能することを確認するために、活性化ヒト T 細胞に LAT1 特異的阻害薬を作用させたところ、ロイシンの取り込みが大幅に抑制された。この結果は LAT1 がヒト活性化 T 細胞における主要な必須アミノ酸トランスポーターとして機能していることを示している。

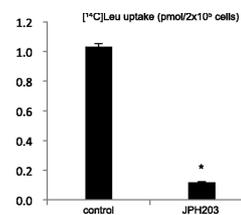


図 2. 活性化 T 細胞における JPH203 のロイシン取り込みへの影響

さらに、LAT1 特異的阻害薬により、活性化ヒト T 細胞の IL-4、IL-17、IFN γ といったサイトカイン産生が抑制された。この結果は、LAT1 がヒト活性化 T 細胞において活性化維持のためのアミノ酸の供給をするために必須であることを示している。

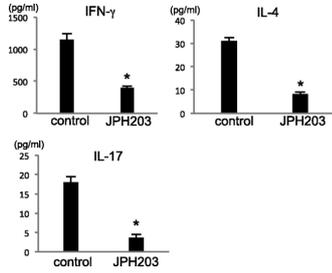


図 3. 活性化 T 細胞における JPH203 のサイトカイン産生への影響

LAT1 阻害による T 細胞機能抑制のメカニズムを調べるためにマイクロアレイを行ったところ、JPH203 により転写抑制因子 DDIT3 の発現が上昇することがわかった。この DDIT3 の発現上昇はアミノ酸を減少させた培地で T 細胞を活性化した時にも見られた。

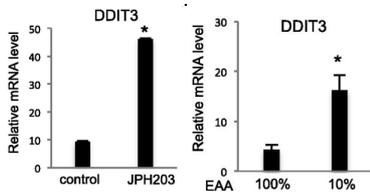


図 4. 活性化 T 細胞における DDIT3 の発現 (EAA: essential amino acid)

そこで、活性化ヒト T 細胞における DDIT3 の機能を調べるために、DDIT3 の強制発現ベクターをヒト末梢血 T 細胞に遺伝子導入したところ、サイトカインの産生が抑制された。この結果は DDIT3 が T 細胞における抑制因子として機能することを示している。

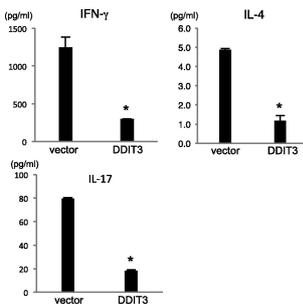


図 5. 活性化 T 細胞における DDIT3 のサイトカイン抑制効果

そこで、DDIT3 の T 細胞抑制のメカニズムを探るために T 細胞活性化に重要な転写因子である NF-κB、NFAT 及び AP1 の活性に対する DDIT3 の影響をレポーターアッセイにより調べたところ、DDIT3 は NF-κB、NFAT の活性を阻害することがわかった。一方で、AP1 の活性への影響は見られなかった。この結果から、DDIT3 は T 細胞活性化に重要な転写因子を選択的に阻害することにより、T 細胞機能を抑

制することが示された。

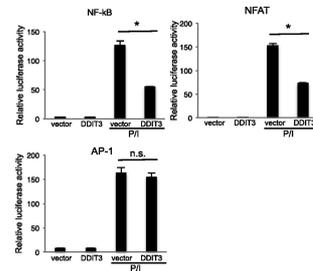
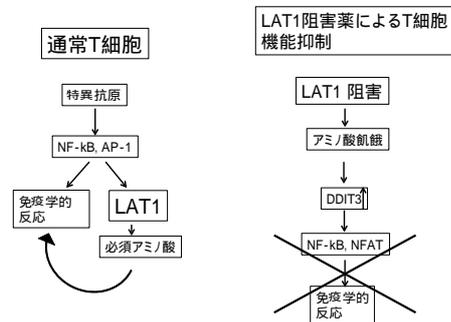


図 6. DDIT3 の転写因子抑制効果

以上の結果から、本研究課題において LAT1 が活性化 T 細胞における主要な必須アミノ酸トランスポーターとして機能し、さらに、LAT1 の機能阻害が活性化 T 細胞における新規アミノ酸欠乏ストレス応答反応を誘起し免疫学的機能を抑制することが明らかと



なった。

図 7. T 細胞活性化における LAT1 の機能と JPH203 の影響

これらの知見より、LAT1 特異的阻害薬が新規免疫抑制薬として有用である可能性が考えられた。

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 4 件)

1. Hayashi K, Anzai N. Role of LAT1 in promotion of amino acid incorporation in activated T cells. Crit Rev Immunol. 34: 467-479 (2014) 査読有

doi: 10.1615/CritRevImmunol.2014011872

2. Hayashi K, Jutabha P, Kamai T, Endou H, Anzai N. LAT1 is a central transporter of essential amino acids in human umbilical vein endothelial cell. J Pharmacol Sci. 124: 511-513 (2014) 査読有

doi: 10.1254/jphs.13255SC

3. Hayashi K, Jutabha P, Endou H, Sagara H,

Anzai N. LAT1 is a critical transporter of essential amino acids for immune reactions in activated human T cells. J Immunol. 191: 4080-4085 (2013) 査読有

doi: 10.4049/jimmunol.1300923

4. Hayashi K, Jutabha P, Endou H, Anzai N. c-Myc is crucial for the expression of LAT1 in MIA Paca-2 human pancreatic cancer cells. Oncol Rep. 28: 862-866 (2012) 査読有 doi: 10.3892/or.2012.1878

〔学会発表〕(計 15 件)

国内学会

1. 林 啓太郎 T細胞におけるアミノ酸トランスポーターLAT1の役割 2015.3.21 第92回日本生理学会大会(神戸)

2. 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 2015.3.20 第88回日本薬理学会年会(名古屋)

3. 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 2014.9.25(横浜)

4. 林 啓太郎, 安西 尚彦. 必須アミノ酸トランスポーターLAT1の機能阻害による破骨細胞分化の抑制. 第32回日本骨代謝学会学術集会 2014.7.24(大阪)

5. 林 啓太郎, Promsuk Jutabha, 遠藤 仁, 安西 尚彦. LAT1特異的阻害薬による破骨細胞分化及びT細胞機能の抑制効果. 第一回骨免疫会議 2014.7.4(名護)

6. 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の特異的阻害薬によるヒトT細胞の活性化抑制. 第124回日本薬理学会総会 2014.3.20(仙台)

7. 林 啓太郎, Promsuk Jutabha, 遠藤 仁, 安西 尚彦. T細胞活性化における必須アミノ酸トランスポーターLAT1の重要性. 第10回宮崎サイエンスキャンプ 2014.2.14(宮崎)

8. 林 啓太郎, 遠藤 仁, 安西 尚彦. LAT1特異的阻害薬によるT細胞活性化の抑制. 第41回日本臨床免疫学会総会 2013.11.27(下関)

9. 林 啓太郎, 安西 尚彦. Suppressive effects of LAT1-specific inhibitor on the activation of human T cells. 第7回次世代を担う医療薬科学シンポジウム 2013.11.24(仙台)

10. 林 啓太郎, Promsuk Jutabha, 遠藤 仁, 安西 尚彦. 癌胎児性中性アミノ酸トランスポーターLAT1特異的阻害薬によるT細胞活性化の抑制. 第129回日本薬理学会関東部会 2013.10.19(東京)

11. 林 啓太郎, 遠藤 仁, 安西 尚彦. ヒトスキルス胃癌におけるLAT1発現減少による遺伝子変化の解析. 第86回日本薬理学会年会

2013.3.23(福岡)

12. 林 啓太郎, 遠藤 仁, 安西 尚彦. スキルス胃癌細胞44As3-11におけるLAT1の発現現象による遺伝子発現変化の解析. 第71回日本癌学会学術集会 2012.9.21(札幌)

13. 林 啓太郎, 遠藤 仁, 安西 尚彦. 癌胎児性中性アミノ酸トランスポーターLAT1の発現低下に伴う癌細胞の遺伝子発現変化. 第16回日本がん分子標的治療学会学術集会 2012.6.28(北九州)

国際学会

1. Hayashi K, Endou H, Anzai N. Suppressive Effects of LAT1-Specific Inhibitor on the Activation of Human T Cells. 13th Cytokines & Inflammation Conference. 2015. 1. 29 (San Diego)

2. Hayashi K, Endou H, Anzai N. Induction of expression of LAT1, an essential amino acids transporter, in activated T cells. AAI IMMUNOLOGY 2013 2013. 5. 6 (Honolulu) [図書](計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類: 特許

番号:

出願年月日:

国内外の別: 国内

取得状況(計 1 件)

名称: 免疫抑制剤

発明者: 林 啓太郎, 安西 尚彦

権利者: ジェイファーマ株式会社

種類: 特許

番号: 特許第5470665号

出願年月日: 平成25年8月20日

取得年月日: 平成26年2月14日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 啓太郎 (HAYASHI Keitaro)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 10323106

(2) 研究分担者

Promsuk Jutabha (PROMSUK Jutabha)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90541748

(3) 連携研究者

安西 尚彦 (ANZAI Naohiko)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号: 70276054

(4)研究協力者

遠藤 仁 (ENDO Hitoshi)