

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06879

研究課題名(和文) アミノ酸トランスポーター機能調節による癌の制御

研究課題名(英文) inhibition of cancer progression by regulation of amino acid transporters

研究代表者

木村 徹 (Kimura, Toru)

杏林大学・医学部・学内講師

研究者番号：30433725

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)：アミノ酸は生体にとって必須の栄養素である。また一部のアミノ酸は、シグナル分子としての役割を持ち、多様な生体反応に関与している。このアミノ酸の細胞内外の濃度調節を行っている分子がアミノ酸輸送体である。今回の研究では、癌の増殖、進展に関与すると考えられるアミノ酸トランスポーターについて検討を行った。

細胞増殖に重要なロイシンやNO合成に必須なアルギニンを輸送する輸送体に関して検討を行った結果、癌の増殖にはLAT1が最も重要であると示唆された。そこで、LAT1の機能調節を行う分子の同定と解析を行った。その結果、LAT1の機能調節に関わりそうな、分子シャペロンやタンパク質分解系のタンパク質が得られた。

研究成果の概要(英文)：Amino acids are essential for our body. Some of the amino acids have a role for signaling molecules and are involved in various reaction in our body. Amino acid transporters has an ability to regulate amino acid gradient across membrane. In this study, we examined amino acid transporters related with cancer progression.

We focused on transporters that transport leucine and arginine important for cell growth and NO production. It was suggested that LAT1 is the most important transporter in cancer growth. We also searched and investigated regulators of LAT1 transporter. We found molecular chaperone and one of the protein related with protein degradation pathway for LAT1 interacting proteins.

研究分野：薬理学

キーワード：トランスポーター 癌

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸は生体にとって必須の栄養素であり、タンパク質合成などの基質として使われている。また一部のアミノ酸は、シグナル分子としての役割を持ち、神経の興奮や細胞増殖の促進など多様な生体反応に参与している。特に必須アミノ酸に含まれるロイシンとアルギニンは細胞増殖、シグナル伝達に重要な役割を果たしていると考えられる。細胞内に流入したロイシンとアルギニンは、mammalian target of rapamycin (mTOR) 系を活性化し、細胞増殖を増加させることが知られている(図1)(Jewell et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013, Bauchart-Thevret et al. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010)。

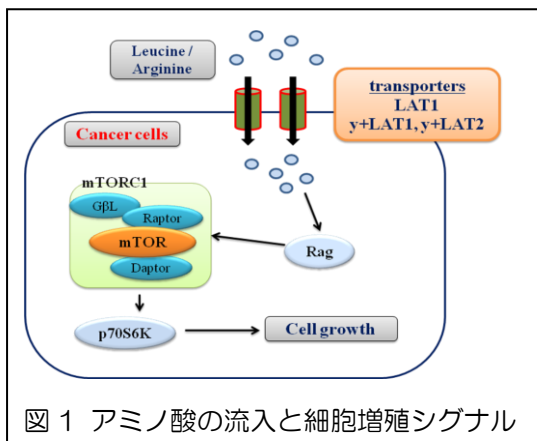


図1 アミノ酸の流入と細胞増殖シグナル

またアルギニンは一酸化窒素(NO)合成の際の基質となり、そのNOは様々なシグナリングに参与している(図2)。近年、慢性炎症組織から放出されるNOが、良性の大腸腺腫細胞から悪性の大腸癌細胞へ進展する原因となることが示された(Tazawa et al. Exp Cell Res. 2013)。つまり、ロイシンやアルギニンの取り込みを担うアミノ酸トランスポーターがこれら機能を調節していると言える。

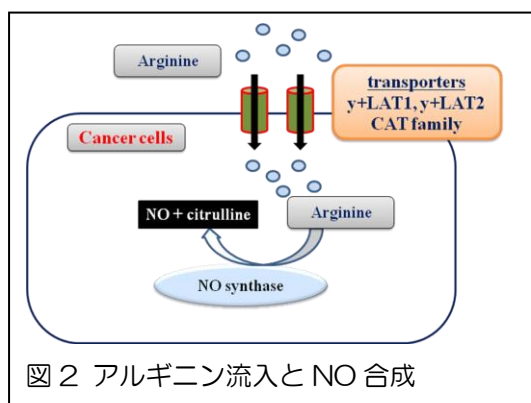


図2 アルギニン流入とNO合成

癌は我が国において死亡原因の第1位であり、一部を除きその治療効果は満足できるものではなく、新規の治療法確立が待望されている。増殖が盛んな癌細胞は、多くのグルコースやアミノ酸などの栄養素を外部から必要とする。したがって、アミノ酸トランスポ

ーターは癌細胞の成長・増殖過程において非常に重要な分子であり、細胞の癌化に伴って強い発現の認められるトランスポーターを分子標的とした、癌細胞の増殖抑制が可能であると考えられる。LAT1(L-type amino acid transporter 1)は、当研究室により同定された、多くの必須アミノ酸を含む中性アミノ酸を輸送するアミノ酸トランスポーターの1つであり、多種類の癌細胞に高発現を示すことが明らかとなっている。このことから、研究協力者の遠藤仁氏はLAT1の特異的阻害剤JPH203を創製し、新規抗癌薬として開発を進めている(Oda et al. Cancer Sci. 2010)。その後の我々の研究で、乳癌細胞や前立腺癌細胞においてJPH203非感受性のロイシン取り込み、細胞増殖を観察した。つまり、LAT1以外に癌細胞の増殖に重要なアミノ酸トランスポーターが存在することになる。その候補分子として挙げられるものがy+LAT1とy+LAT2である。これらは、Na⁺依存的に必須アミノ酸を含む中性アミノ酸を輸送するだけでなく、Na⁺非依存的に塩基性アミノ酸、つまりアルギニンを輸送する。これらのことから、y+LAT1とy+LAT2はmTORを活性化し、細胞増殖を増加させ、さらにはNO合成も増加させることが示唆される。また、アルギニン(+リジン)を特異的に輸送するトランスポーターとして、cationic amino acid transporter (CAT) familyがある。特にCAT1は、大腸癌組織において高発現するということが報告されている(Lu et al. PLOS ONE, 2003)。

2. 研究の目的

本研究計画では、トランスポーターの発現・機能解析を介して以下の点を明らかにすることを目的とする。

- (1) 各種癌培養細胞や癌組織でのアミノ酸トランスポーターの発現様式を明らかにする。
- (2) アミノ酸トランスポーター発現による、癌細胞の増殖やLAT1阻害剤JPH203の感受性の違いを明らかにする。
- (3) 癌の進展に関与するアミノ酸トランスポーターの調節因子を同定し、その抑制効果を検討する。

これら研究を進め、特定のアミノ酸トランスポーターによる癌発生・進展への関わりを明らかにし、それが癌の新たな治療標的となりうる可能性に関して検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 癌培養細胞・癌組織におけるアミノ酸トランスポーターの発現解析

RT-PCR およびウエスタンブロッティング、免疫染色によって、LAT1, y+LAT, CAT familyの発現解析を行う。癌培養細胞としては、ヒト骨肉癌細胞Ca9-22, ヒト妊娠性絨毛癌細胞JEG-3, ヒト喉頭癌細胞HEp-2細胞、膀胱癌細胞T24を用いた。ヒト癌組織は購入可能

であった、胃癌、乳癌、大腸癌の組織切片を用いた。

(2) トランスポーター発現による細胞増殖抑制効果の検討

LAT1 特異的阻害剤 JPH203 を用い、細胞増殖の抑制効果を検討した。またその際、y+LAT、CAT family を過剰発現させて、トランスポーター発現による JPH203 の感受性の変化を観察した。

(3) LAT1 結合タンパク質の同定と機能解析

Yeast hybrid screening によって、LAT1 と相互作用する分子を急性リンパ芽球性白血病の Jurkat 細胞ライブラリーを用いてスクリーニングした。同定した結合タンパク質に関して、その阻害剤を用いて効果を検討した。

4. 研究成果

癌培養細胞における y+LAT1, 2 の発現

LAT1 以外に癌細胞の増殖に重要なアミノ酸トランスポーターの候補分子として挙げられるものが y+LAT1 と y+LAT2 である。これらは、Na⁺ 依存的に必須アミノ酸を含む中性アミノ酸を輸送するだけでなく、Na⁺ 非依存的に塩基性アミノ酸、つまりアルギニンを輸送する。これらのことから、y+LAT1 と y+LAT2 は mTOR を活性化し、細胞増殖を増加させ、さらには NO 合成も増加させることが示唆される。そこで、ウエスタンブロットを用いて、癌培養細胞でこれらトランスポーターの発現を確認した。その結果、多くの癌培養細胞でその発現が確認できた (図 3)。

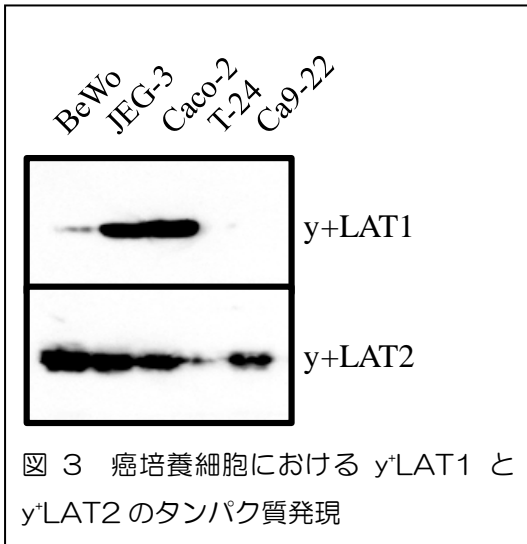


図 3 癌培養細胞における y+LAT1 と y+LAT2 のタンパク質発現

癌培養細胞における CAT トランスポーターの発現

アルギニン (+リジン) を特異的に輸送するトランスポーターとして、cationic amino acid transporter (CAT) family がある。特に CAT1 は、大腸癌組織において高発現するということが報告されている (Lu et al. PLOS ONE, 2003)。この CAT family に関して、RT-PCR を用いて mRNA レベルであるが、発現を確認した。その結果、癌細胞の種類によ

って発現はまちまちであるが、少なくとも 1 種類の CAT トランスポーターの発現が確認できた (図 4)。

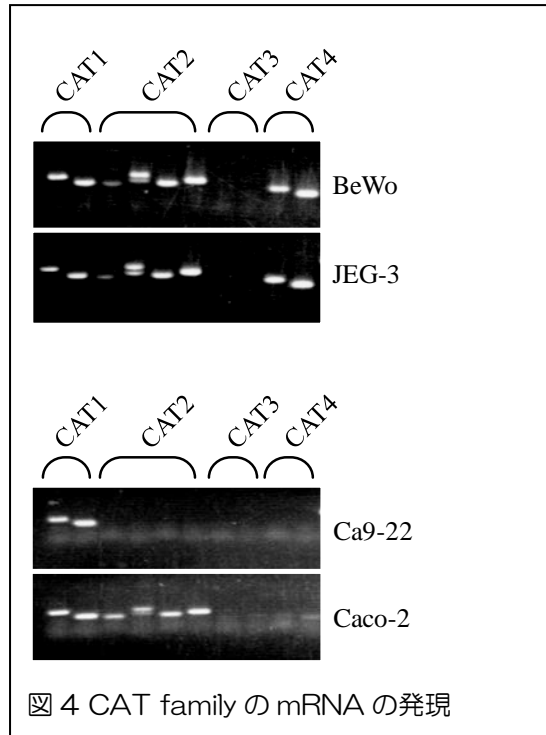


図 4 CAT family の mRNA の発現

癌組織における y+LAT1, 2 の発現

癌組織切片として、前立腺癌、乳癌、胃癌、大腸癌組織を入手し、y+LAT1、y+LAT2 トランスポーターの発現を免疫染色によって観察を行った。その結果、癌組織によって違いはあるものの、y+LAT1、y+LAT2 の両トランスポーターの発現が確認できた (図 5)。

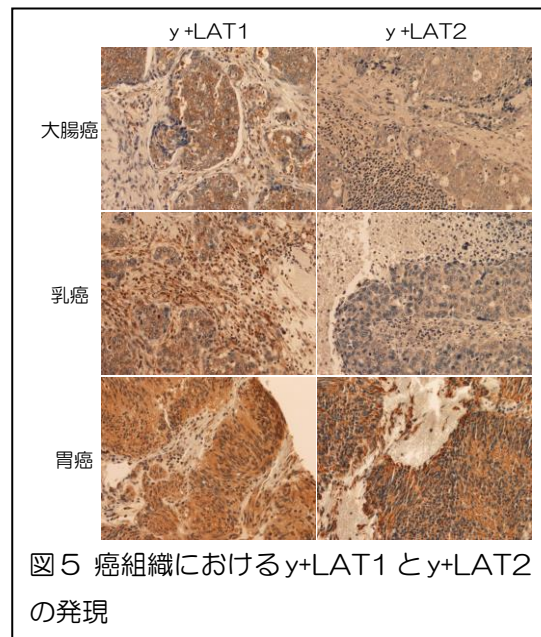


図 5 癌組織における y+LAT1 と y+LAT2 の発現

細胞増殖過程における JPH203 の影響

LAT1 特異的阻害剤 JPH203 を用いて、Ca9-22、JEG-3、HEp-2、T24 細胞の増殖抑制効果を検討した (図 6)。Captisol は、コントロール

ール試薬となる。それぞれの細胞において、JPH203 による抑制効果が異なっており、他のトランスポーターによる可能性が示唆された。

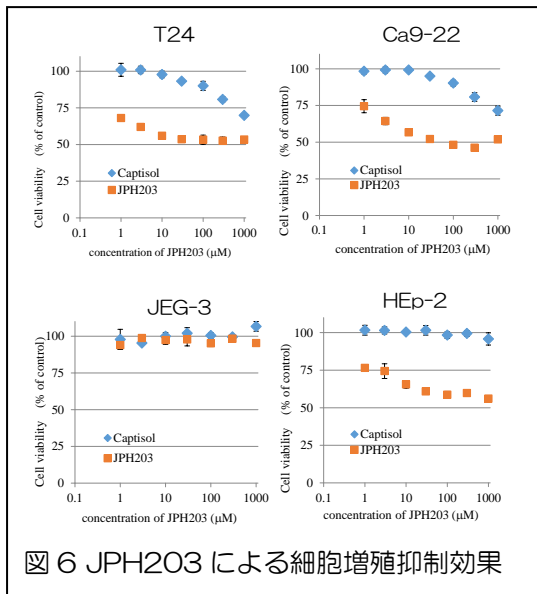


図 6 JPH203 による細胞増殖抑制効果

細胞増殖におけるトランスポーターの影響

比較的 JPH203 の感受性が高い細胞を用いて、LAT1 以外のアミノ酸トランスポーターを過剰発現させ、JPH203 感受性の変化や増殖能の変化を観察した (図 7)。アミノ酸トランスポーターとして、LAT2, y-LAT1, y-LAT2 を過剰発現させたが、JPH203 の感受性に変化は見られなかった。また、LAT1 の機能調節に重要であると報告されている LAPT4b や JPH203 の取り込み過程に関与すると言われる OATP1B1 や OATP1B3 も強制発現させたが、その感受性に変化はなかった。

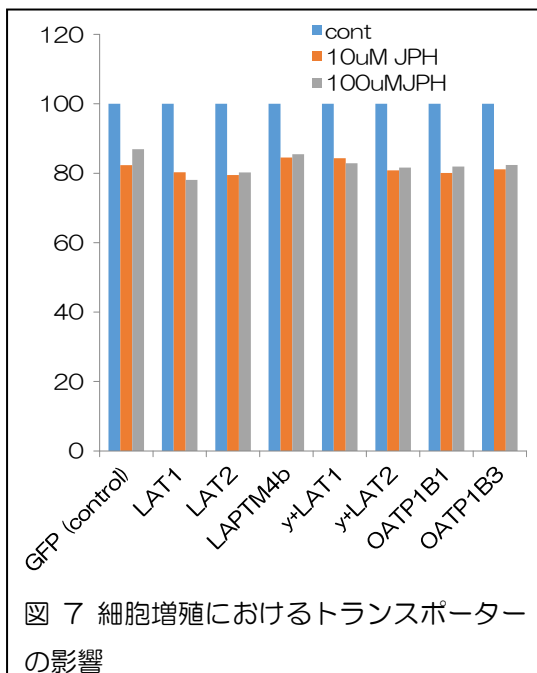


図 7 細胞増殖におけるトランスポーターの影響

LAT1 結合タンパク質の同定と機能解析

Yeast hybrid screening によって、LAT1 と相互作用する分子を急性リンパ芽球性白血病の Jurkat 細胞ライブラリーを用いてスクリーニングした。その結果、LAT1 の機能調節に関わりそうなたんぱく質が多数得られた。そのうち、分子シャペロンとタンパク質分解系の 2 種類のタンパク質に着目して解析を行った。免疫沈降で結合を確認したのち、それらの阻害剤を用いて影響を検討した。その結果、その阻害剤単独でも殺細胞効果は見られるが、JPH を併用すると相加効果が見られた。また、阻害剤存在下でしばらく培養し LAT1 の局在を免疫蛍光染色で観察を行うと、LAT1 の細胞表面での発現が減少していた。したがって、この 2 種類のタンパク質が LAT1 の機能発現に重要な役割を果たしていると考えられた。

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. Prostate Cancer Cells in Different Androgen Receptor Status Employ Different Leucine Transporters. (査読あり)

Otsuki H, Kimura T, Yamaga T, Kosaka T, Suehiro JI, Sakurai H.

Prostate. 2017, 77:222-233.

2. Inhibition of epithelial-mesenchymal transition by cetuximab via the EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 pathway in head and neck cancer.

Matsumoto Y, Sakurai H, Kogashiwa Y, Kimura T, Matsumoto Y, Shionome T, Asano M, Saito K, Kohno N.

Head Neck. 2016, doi: 10.1002/hed.24626.

(査読あり)

3. Metformin enhances anti-tumor effect of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) inhibitor.

Ueno S, Kimura T, Yamaga T, Kawada A¹, Ochiai T, Endou H, Sakurai H J Pharmacol Sci 131:110-117, 2016 (査読あり)

4. Up-Regulation of LAT1 during Antiandrogen Therapy Contributes to Progression in Prostate Cancer Cells.

Xu M, Sakamoto S, Matsushima J, Kimura T, Ueda T, Mizokami A, Kanai Y, Ichikawa T.

J Urol. 15, 05395-1. 2015 (査読あり)

[学会発表](計 1 件)

1. 大槻英男、木村 徹、山賀 貴、末弘淳一、櫻井裕之

「前立腺癌アンドロゲン受容体高発現細胞株におけるロイシン輸送トランスポータ」

第 132 回日本薬理学会関東部会 浦安 2015 年 7 月 4 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 徹 (KIMURA Toru)
杏林大学・医学部・学内講師
研究者番号：30433725

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

遠藤 仁 (ENDO Hitoshi)
杏林大学・医学部・名誉教授
ジェイファーマ (株)