

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591606
 研究課題名（和文） 悪性神経膠腫に対する中性アミノ酸トランスポーター標的の新規治療法の開発
 研究課題名（英文） Targeting of neutral amino acid transporters as a novel therapeutic strategy for malignant glioma
 研究代表者
 小林 啓一（KOBAYASHI KEIICHI）
 杏林大学・医学部・助教
 研究者番号：70406990

研究成果の概要：

アミノ酸トランスポーター機能抑制を目的とする system L: LAT1/4F2hc 標的治療は有力な悪性 glioma 治療戦略の一つと期待される。System L 阻害剤である BCH 治療により、glioma 細胞死は亢進したが、PTEN 遺伝子異常をもつ glioma 細胞では、生存に関与する内因性シグナル分子 Akt のリン酸化はむしろ亢進し、paradoxical な変化が認められた。siRNA による選択的 LAT1 機能阻害を目的に LAT1 siRNA 発現ベクターを作製し、LAT1 蛋白の発現が低下した glioma 株を分離樹立した。ヌードマウス皮下腫瘍形成能実験にて本細胞の造腫瘍性の低下が認められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	1,500,000	0	1,500,000
平成 19 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 20 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：amino acid transporter, glioma, LAT1, 4F2hc, inhibitor, siRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 原発性脳腫瘍の中で、神経膠腫を代表とする悪性脳腫瘍の予後、生存率は未だ極めて不良である。特に全脳腫瘍のうち約 3 分の 1 を占めるグリオーマの悪性型である膠芽腫は、手術、放射線・化学療法などの多角的包括的治療にも拘らず、1 年生存率が 5 割強、5 年生存率は 1 割に満たない状況にある。これらの腫瘍が治療抵抗性である原因のひとつに、腫瘍細胞及び腫瘍環境による薬剤耐性の存在があげられる(1)。従って、従来の治療法に変わる新規治療法の開発が極めて重要な課題となってきた。

ている。

(2) 悪性腫瘍細胞は正常細胞或いは低悪性度の腫瘍細胞に比べ、細胞分裂・増殖能が大幅に上昇しており、その結果細胞内での代謝・酵素反応も極めて亢進していると考えられる。故に、アミノ酸を含めた栄養源の細胞内取り込み機構も悪性腫瘍細胞の維持に重要な役割を果たしているものと考えられる。Na 非依存性の中性アミノ酸輸送系、システム L トランスポーター、は、広い基質選択性をもち、特に近年当大学研究科において発見された LAT1 は癌細胞の

多くに発現がみられ, 1 回膜貫通型アミノ酸輸送活性因子である 4F2hc との共発現により必須アミノ酸を含む大型の中性アミノ酸の細胞内輸送を司っていることから, 腫瘍細胞の増殖能との強い関連があることが推測される(2, 3). LAT1 は他臓器では悪性腫瘍に特異的な発現が認められ, LAT1 を標的とした悪性腫瘍の治療の可能性が示唆されてきている.

- (3) これまでの研究で, 腫瘍化に関連する癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異常に加えて, 細胞の活性に直接かかわる中性アミノ酸トランスポーターLAT1/4F2hc が, 実際に悪性脳腫瘍において発現の亢進が認められ, また, その発現亢進が腫瘍細胞の造腫瘍性の亢進に関与することが明らかとなった(4). 従って, 中性アミノ酸トランスポーターLAT1/4F2hc システムを標的とした新規治療法の開発は, 膠芽腫などの悪性脳腫瘍治療への貢献が期待される.

(4) 参考文献

1. Nagane M et al. Causes of drug resistance and novel therapeutic opportunities for the treatment of glioblastoma. Drug Resistance Updates 2: 30-37, 1999
2. Kanai Y and Endou H. Heterodimeric amino acid transporters: molecular biology and pathological and pharmacological relevance. Curr Drug Metab 2001 Dec;2(4):339-54
3. Yanagida O et al. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. Biochimica et Biophysica Acta 1514: 291-302, 2001
4. Kobayashi K, Ohnishi A, Promsuk J, Shimizu S, Kanai Y, Shiokawa Y, Nagane M. Enhanced tumor growth elicited by L-type amino acid transporter 1 in human malignant glioma cells. Neurosurgery 62 (2): 493-504, 2008

2. 研究の目的

- (1) 必須アミノ酸の供給無しでは, 悪性腫瘍細胞は無尽蔵の増殖を続けることは不可能である. 従って, 腫瘍細胞にお

ける中性アミノ酸トランスポーターシステムを阻害することは, 腫瘍細胞の代謝障害を誘発し, 増殖抑制効果・細胞死誘導効果が期待でき, 新たな腫瘍治療法となる可能性が考えられる. 実際, 中性アミノ酸トランスポーター機構を構成する LAT1 は, 他臓器では悪性腫瘍に特異的な発現が認められ, LAT1 を標的とした悪性腫瘍の治療の可能性が示唆されてきている. 膠芽腫を始めとする悪性脳腫瘍においても, 中性アミノ酸トランスポーターである LAT1 及びその共因子である 4F2hc 発現が腫瘍増殖に関与する可能性が示された. 腫瘍細胞における LAT1 の特異的阻害による抗腫瘍効果を明らかにすることが, 難治性悪性神経膠腫の治療成績を向上へつなげることが期待される.

- (2) 今回, 悪性脳腫瘍, 特にその代表的腫瘍である悪性神経膠腫に対する中性アミノ酸トランスポーターを特異的にターゲットとした分子標的治療の可能性を検討するというのが本研究の目的である.

3. 研究の方法

- (1) **siRNA.** LAT1 と 4F2hc に特異的な siRNA 配列を Dharmacon および Santa Cruz 社の HP より作成・検索し, そのオリゴを作成・購入した. 細胞へは DharmaFECT (Dharmacon) を用いて transfection した. siRNA 発現ベクター pSuper-Retro-Puro および pSuper-Retro-Blasticidin は Dr. F. Frank より供与を受けた. 各 cloning site に LAT1 及び 4F2hc の siRNA 配列を組み込み, 精製, シークエンスを行い, 目的の siRNA 発現ベクターを作製した.

(2) siRNA 発現ベクターの細胞内導入.

293GP 細胞に siRNA 発現ベクターと VSV-G plasmid を co-transfection することで, siRNA 発現ウイルスベクターを作製した. ヒト glioma 細胞株に当該ベクターを感染させ, 薬剤選択をすることで, siRNA 導入細胞を確立した.

- (3) **Western blotting.** 全細胞蛋白抽出液は RIPA buffer を用いて抽出し, Western blot 解析法は以前に報告した通り (Nagane M et al. Cancer Res 56: 5079, 1996).

- (4) **動物実験.** ヒト glioma 細胞 (2×10^6 個 / 0.1 ml PBS) を週齢 4-5 週のメス nude mouse (BALB/CA 系, 埼玉実験動物) の皮下に移植した. 腫瘍容積を計測し (Nagane M et al. J Neurosurg 95: 472, 2001), 全身への毒性は体重を測定し検討した. マウスは二酸化炭素吸入法により sacrifice した. 本実験法は本大学医学部実験動物委員会により承認されている.

4. 研究成果

- (1) **LAT1 mRNA 特異的 siRNA の作成.** ヒト glioma 細胞において, 中性アミノ酸トランスポーターである system L の亢進, その構成分子である LAT1 の発現亢進が認められること, LAT1 の強制発現により, ヒト glioma 細胞の腫瘍形成能が亢進すること, system L の選択的阻害剤である BCH 治療により, LAT1 を高発現している LN2308 細胞では細胞増殖能の低下と apoptosis の亢進が誘導されたことを報告してきたことを受け, 選択的に LAT1 の関与を検討するため, まず LAT1 mRNA に特異的な siRNA をデザインした. Dharmacon 社の HP より, LAT1 mRNA 配列を用いて, 適切な siRNA 配列をデザインし, そのオリゴ DNA を作製した. 作製した siRNA をヒト glioma 細胞に transfection した後, 細胞を回収し, 細胞内蛋白を抽出した. 無治療, 或は対照である non-targeting siRNA を transfection した細胞とともに, 抽出した蛋白を用いて Western blot 法で LAT1 発現量を検出した. 最も LAT1 蛋白発現の減少が認められた siRNA オリゴの配列を選択し, 次の発現ベクター作成へと進めた.

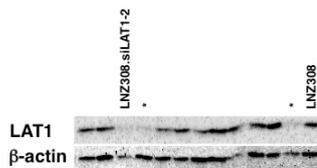
- (2) **LAT1 mRNA に対する特異的 siRNA 発現ベクターの作成.** 上記(1)で得られた LAT1 mRNA に特異的に作用する siRNA 配列を用いて, 次にヒト glioma 細胞内で恒常的に発現する siRNA 発現ベクターを作製した. ベクターは retroviral vector で siRNA 発現用に開発された pSuper-Retro-Puro ベクターを用いた (Dr. F. Furnari, Ludwig Institute for Cancer Research at San Diego branch の御供与による). LAT1 mRNA に対する siRNA 配列を本ベクターのクローニングサイトに挿入した pSuper-Retro-Puro-siLAT1 を作製し, 2 本鎖 DNA を精製した. 精製された DNA を

2 カ所の制限酵素部位で切断し, 目的の siRNA 配列が正しく挿入されていることを確認した. 次に, 挿入された LAT1 siRNA の配列に変異等の異常がないことを確認するために, siRNA クローニングサイトの両脇のベクター配列部に hybridize する primer set を作成し, siRNA 部の直接シーケンスを施行した. その結果, 正しい LAT1 siRNA 配列であることが確認された. ウイルスベクターを調整するため, 本 DNA ベクターを 293GP 細胞に VSV-G ベクターとともに co-transfection し, 上清に含まれる本ウイルスベクターを回収し, filter sterilization の後, -80°C で保存し, 以下の実験で使用するものとした.

- (3) **4F2hc mRNA に対する特異的 siRNA の作成および発現ベクターの作成.** 上記(2)と同様に, 中性アミノ酸トランスポーター system L の主要構成分子である 4F2hc に対する特異的 siRNA についても, 作成を検討した. siRNA 配列については, Santa Cruz 社から本遺伝子の mRNA に対する特異的 siRNA 配列が市販されており, それを購入し, 実験に使用した. ヒト glioma 細胞株にその siRNA オリゴを transfection し, 4F2hc の蛋白発現が減少するか否かを Western blot 法で検証した. その結果, 当該 siRNA オリゴにより 4F2hc の発現低下が認められたため, 引き続き発現ベクターの作成に進めた. 上記(2)と同様に, pSuper-Retro-based のウイルス発現ベクターを使用した. LAT1 に対する siRNA 発現ベクターと 4F2hc に対する siRNA 発現ベクターを同じ細胞に導入する可能性がある (system L の両構成分子の一方, 或いは両方を downregulation することで, その形質変化の程度を比較検討するため) ことから, 本ベクターには puromycin ではなく blastacidin の薬剤選択マーカーを使用し, pSuper-Retro-Blast-si4F2hc を作製した. 作製したベクターの siRNA 部のシーケンスの結果, siRNA 部の遺伝子配列変化はなく, 現在引き続きヒト glioma 細胞への導入を計画している.
- (4) **LAT1 siRNA 発現ベクターの細胞内導入.** 次に, LAT1 が高発現しており, system L 活性が高値を示すヒト glioma 細胞株の LN2308 株に, pSuper-Retro-Puro-siLAT1 ベクターを感染させ, puromycin にて drug

selection を行い，生存した細胞を subcloning し，得られたクローンに対して，実際に本発現ベクターが機能しているか否かを確認するため，LAT1 蛋白の発現量を Western blot 法にて screening した (図). その結果，いくつかの subclone (図中の LNZ308.siLAT1-2, *の細胞: LNZ308 は対照の無治療親株) で無治療の親株である LNZ308 細胞と比較し LAT1 蛋白の発現低下が認められた.

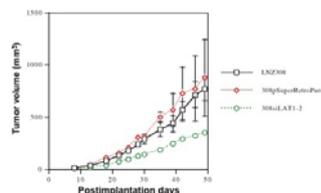
LNZ308 Subclones with Reduced LAT1 Expression by Constitutive siRNA Expression



(5) LAT1 siRNA 発現による腫瘍増殖抑制効果.

次に，LAT1 の蛋白発現の減少が認められた LNZ308.siLAT1-2 細胞を用いて，LAT1 高発現であった細胞が LAT1 発現の抑制によって腫瘍形成能に変化が生じるか否かを検討した. 親株の LNZ308 細胞，対照の空ベクターを感染させ，puromycin に耐性となった LNZ308.pSuper-Retro-Puro 細胞とともに，ヌードマウスの皮下に腫瘍細胞を同数移植し，腫瘍の形成後の腫瘍体積を経時的に計測観察した. その結果，親株と対照の空ベクターを導入した細胞から形成された腫瘍はほぼ同じ速度で腫瘍を形成し増大したが，LAT1 siRNA を導入した細胞は著明に増大が抑制され，約 50% 以上の腫瘍体積にとどまった (親株 vs. siLAT1-2: $p < 0.05$, pSuper vs. siLAT1-2: $p < 0.01$) (図). この結果から，LAT1 を選択的に抑制することで，glioma 細胞の腫瘍増殖が抑制されることが示唆された.

Suppression of Tumor Growth of Xenografts derived from LNZ308 Cells Expressing siRNA for LAT1

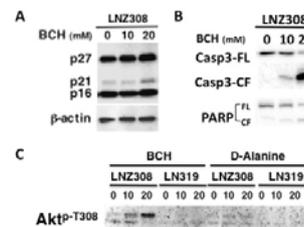


(6) System L 阻害による細胞内シグナル伝達の変化. LAT1 の発現を抑制することで，腫瘍形成能が低下したことから，細胞膜

に発現する LAT1 からの何らな細胞内シグナル伝達に変化が生じ，最終的に腫瘍形成能が低下した可能性が考えられる.

従って，今回まず system L の選択的阻害剤である BCH を使用し，LAT1 を高発現している，system L による中性アミノ酸輸送が亢進しているヒト glioma 細胞株の LNZ308 と，LAT1 の発現がほとんど認められない LN319 細胞株に対して system L 阻害による影響を検討した. BCH 治療により MIB1 染色により判定される細胞増殖能が低下することに伴って，細胞周期阻害因子である p21 の発現が軽度増加することが LNZ308 細胞でのみ確認された (図 A). 一方，BCH 治療では LNZ308 細胞に細胞死も誘導されたが，それに伴い下流 caspase である caspase-3 の切断・活性化が明らかに生じ，その結果 caspase-3 の細胞内気質の一つである PARP の切断が生じていることが明らかになった (図 B). このように，BCH により caspase 活性化に伴う apoptosis の誘導が認められたことから，次に glioma における細胞生存に寄与することが知られている Akt の活性化に変化が生じているか否かを検証するため，リン酸化 Akt 特異的抗体を用いて，Western blot 法にて解析した. その結果，BCH 治療により apoptosis が誘導された LNZ308 細胞において，Akt のリン酸化が誘導されていることが明らかになった. BCH の対照である D-Alanine による治療では Akt のリン酸化は生じておらず，また，LN319 細胞でも同様な変化は認められなかった (図 C). Akt シグナルの下流に位置する mTOR のリン酸化は明らかな増加を認めておらず，Akt リン酸化の Akt 経路における意義は今のところ不明である. Akt の活性化はむしろ細胞生存を推進する作用があると考えられており，BCH による細胞死促進とは相反する結果であった.

Suppression of System L by BCH Upregulates p21 Expression, Activates Caspase, While Concomitant Activation of Akt in LNZ308 Cells



(7) 結論: 以上より，ヒト glioma 細胞においては，LAT1 を高発現している細胞で LAT1 発現を抑制することにより，腫瘍形成能

を低下させる作用があることが明らかとなった。従って、LAT1 を標的としたアプローチは新規の glioma 治療となる可能性が示唆された。一方、system L を薬剤で阻害することにより apoptosis による細胞死が促進されたのに対し、細胞内シグナルの要所であり、細胞死を抑制すると考えられている Akt の活性化が認められたことから、system L を介した腫瘍形成能と細胞生存に関するシグナル伝達は複雑なネットワークを形成してバランスの上に制御されていることが予想される。従って、system L の構成分子である 4F2hc の抑制による細胞への効果、LAT1 siRNA を用いた LAT1 発現阻害による細胞内シグナル伝達への影響、生存シグナルのネットワーク、クロストーク回路の解明など、本研究における今後の課題と考えられる。

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 13 件)

1. Nagane M, Nozue K, Shimizu S, Waha A, Miyazaki H, Kurita H, Homori M, Fujioka Y, Shiokawa Y. Prolonged and severe thrombocytopenia with pancytopenia induced by radiation-combined temozolomide therapy in a patient with newly-diagnosed glioblastoma---analysis of O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase status. *J Neuro-Oncol* 92: 227-232, 2009. 査読有
2. 永根基雄: MGMT と temozolomide. *脳* 21 12 (1): 38-43, 2009. 査読無
3. 永根基雄: 遺伝性脳腫瘍 (神経皮膚症候群含む). In III. 脳・脊髄系の疾患・脳腫瘍, 月刊ナーシング vol 29 (5), 学習研究社, 東京, pp 88-91, 2009. 査読無
4. 小林啓一, 永根基雄: 転移性脳腫瘍. In *Clinical Neuroscience Vol 27 (6)*, 2009. 査読無
5. Kobayashi K, Ohnishi A, Promsuk J, Shimizu S, Kanai Y, Shiokawa Y, Nagane M. Enhanced tumor growth elicited by L-type amino acid transporter 1 in human malignant glioma cells. *Neurosurgery* 62 (2): 493-504, 2008. 査読有
6. 永根基雄: 悪性グリオーマ治療における薬剤耐性機構の最近の知見---temozolomide 耐性・分子標的薬・脳腫瘍幹細胞---. *Jpn J Cancer chemother* 35 (6): 918-925, 2008. 査読無
7. Nagane M, Cavenee WK, Shiokawa Y. Synergistic cytotoxicity through the activation of multiple apoptosis pathways in human glioma cells induced by combined treatment with ionizing irradiation and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Neurosurg* 106: 407-416, 2007. 査読有
8. Nagane M, Kobayashi K, Ohnishi A, Shimizu S, Shiokawa Y. Prognostic significance of O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase protein expression in patients with recurrent glioblastoma treated with temozolomide. *Jpn J Clin Oncol* 37(12): 897-906, 2007. 査読有
9. 小林啓一, 永根基雄, 塩川芳昭. 初発悪性神経膠腫に対する術後放射線併用 PAV 変法療法. *Neuro-Oncology (Tokyo)* 17 (1): 33-35, 2007. 査読無
10. 永根基雄: 悪性神経膠腫の化学療法. *No Shinkei Geka* 35 (5): 433-450, 2007. 査読無
11. 小林啓一, 永根基雄, 藤井芳樹, 塩川芳昭. 再発悪性神経膠腫に対する Carboplatin/高圧酸素併用療法の治療経験---palliation 療法の可能性. *日本臨床高気圧酸素・潜水病学会誌* 3: 37-41, 2006. 査読有
12. 永根基雄, 小林啓一, 塩川芳昭. 再発悪性神経膠腫に対する temozolomide 単独療法の治療成績. *Neuro-Oncology (Tokyo)* 16 (2): 26-29, 2006. 査読無
13. 小林啓一, 永根基雄, 塩川芳昭. 再発中枢神経系リンパ腫に対する second line PAV 療法. *Neuro-Oncology (Tokyo)* 16 (2): 74-77, 2006. 査読無

[学会発表] (計 13 件)

1. 小林啓一, 永根基雄, 塩川芳昭: 中枢神経系リンパ腫に対する大量 MTX 療法単独による初期治療の検討. 第 36 回ニューロオンコロジーの会、東京、2008 年 12 月 6 日.
2. 小林啓一, 永根基雄, 塩川芳昭: 中枢神経系リンパ腫に対する大量 MTX 療法単独による初期治療の検討. 第 26 回日本脳腫瘍学会、松山、2008 年 12 月 1 日.
3. Motoo Nagane, Saki Shimizu, Eiji Mori, Shiro Kataoka, Yoshiaki Shiokawa. Combined treatment with histone deacetylase inhibitors enhances cytotoxic activity of anti-DR5/TRAIL-R2

- monoclonal antibodies in human glioma cells. The 13th Annual Meeting of the Society for Neuro-Oncology. Las Vegas, Nevada, U.S.A. 2008. 11. 22
4. 小林啓一：術中モニターリング及び術中蛍光診断を併用したナビゲーション下神経膠腫摘出術～摘出率向上をめざして. 第13回日本脳腫瘍の外科学会、大阪、2008年11月20日.
 5. 小林啓一, 永根基雄, 永山和樹, 塩川芳昭：杏林大学における転移性脳腫瘍治療の現況. 第67回日本脳神経外科学会、岩手、2008年10月20日.
 6. 小林啓一, 永根基雄, 永山和樹, 塩川芳昭：杏林大学における転移性脳腫瘍治療の現況. 第10回多摩脳腫瘍研究会、三鷹、2008年10月11日.
 7. 小林啓一, 永根基雄, 横矢重臣, 湯山隆次, 水谷徹, 塩川芳昭：治療に難渋している播種性再発髄芽腫の1例. 東京脳腫瘍治療懇話会、東京、2008年6月20日.
 8. Motoo Nagane, Keiichi Kobayashi, Akiko Ohnishi, Katsuyoshi Kanai, Yoshiaki Shiokawa. Enhanced tumor growth elicited by L-type amino acid transporter 1 in human malignant glioma cells. The 17th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy. Hakodate, Hokkaido, Japan, 2008. 6. 10
 9. 小林啓一, 永根基雄, 林基高, 栗田浩樹, 須永茂樹, 清水弘之, 新井信隆, 水谷俊雄, 藤岡保範, 塩川芳昭：難治性てんかんに対する外科的治療後に発症した膠芽腫の一例. 第26回日本脳腫瘍病理学会、東京、2008年5月23-24日.
 10. 小林啓一, 永根基雄, 塩川芳昭：初発悪性生星細胞腫に対する術後放射線併用 PAV 変法療法. 第45回日本癌治療学会総会、京都、2007年10月24日.
 11. 小林啓一, 永根基雄, 甫守正史, 栗田浩樹, 藤岡保範, 土屋一洋, 塩川芳昭：R-CHOP 療法が著功した硬膜病変を伴う頭皮下リンパ腫の3症例. 第66回日本脳神経外科学会総会、東京、2007年10月24日.
 12. 小林啓一, 永根基雄, 甫守正史, 栗田浩樹, 藤岡保範, 塩川芳昭：血液内科での化学療法が奏功した頭皮下リンパ腫の3例. 第35回多摩脳神経外科懇話会、吉祥寺、2007年6月7日.
 13. 小林啓一, 永根基雄, 塩川芳昭：初発悪性生星細胞腫に対する術後放射線併用 PAV 変法療法. 第33回ニューロオンコロジーの会、東京、2007年4月7日.

[図書] (計 3件)

1. 永根基雄：代表的原発性脳腫瘍-神経膠芽腫, 髄膜腫, 聴神経腫瘍, 下垂体腺腫-. 臨床研修医のための画像医学教室-脳神経領域, 川原信隆, 青木茂樹 (編), 医療科学社, 東京, pp140-149, 2008
2. 永根基雄：神経膠腫 (グリオーマ). In 脳腫瘍. がん看護 実践シリーズ1. メジカルフレンド社, 東京. pp25-30, 2007
3. 永根基雄：血管新生. グリオーマ--病態と治療. (田淵和雄 (編), Springer-Verlag, 東京, pp 113-125, 2006

[その他]

6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
小林 啓一 (KOBAYASHI KEIICHI)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号：70406990
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 連携研究者
永根 基雄 (NAGANE MOTOO)
杏林大学・医学部・准教授
研究者番号：60327468