

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16623

研究課題名(和文) 明細胞肉腫に対するLAT-1阻害剤を用いた新たな抗癌剤治療法の開発

研究課題名(英文) Antitumor effect of LAT1 inhibition on clear cell sarcoma

研究代表者

森下 雅之(Morishita, Masayuki)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：30814321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：L-type amino acid transporter 1 (LAT1)は、種々の悪性腫瘍に発現しており、悪性腫瘍において必須アミノ酸取り込みに重要な役割を果たす。LAT1の高発現を認めるヒト明細胞肉腫細胞株において、LAT1を標的とした治療の可能性について検討を行った。ヒト明細胞肉腫細胞株MP-CCS-SYにおいて、LAT1選択的阻害薬JPH203は、ロイシン等の必須アミノ酸の細胞内取り込みを低下させ、ドキソルビシンとの併用において、細胞増殖抑制とアポトーシスの増強効果を認めた。本研究により、標準的な薬物治療の無い明細胞肉腫において、LAT1が有用な治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

明細胞肉腫においてLAT1の高発現に着目した治療はこれまでに報告がない。本研究によりLAT1の選択的阻害が明細胞肉腫の治療において新たな知見を得た。LAT1の選択的阻害が、既存のドキソルビシンなどの抗がん剤に併用することで治療効果の増強につながる可能性が示唆された。LAT1選択的阻害剤JPH203は他の癌種での試験において人体に安全に投与可能であることが報告されており、明細胞肉腫においても従来の抗がん剤への「上乗せ効果」が期待される。新規治療開発が困難な希少癌である明細胞肉腫において非常に有用な成果であり、社会的意義も高いものである。

研究成果の概要(英文)：L-type amino acid transporter 1 (LAT1) is expressed in various malignancies and plays an important role in the uptake of essential amino acids. Meanwhile, herein, the therapeutic potential of targeting LAT1 was investigated using a human clear cell sarcoma cell line in which LAT1 is highly expressed. In the human clear cell sarcoma cell line MP-CCS-SY, JPH203, a selective LAT1 inhibitor, decreased the cellular uptake of essential amino acids, such as leucine; in combination with doxorubicin, it inhibited cell growth and promoted apoptosis. This study suggests that LAT1 could be a useful therapeutic target for clear cell sarcoma for which no standard drug therapy exists. JPH203 administration is expected to have an add-on effect on conventional anticancer drugs. This is a very useful achievement and is of great social significance for clear cell sarcoma, a rare cancer for which it is difficult to develop new treatments.

研究分野：骨軟部悪性腫瘍

キーワード：明細胞肉腫 LAT1 アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

明細胞肉腫は、若年成人の四肢に好発する予後不良な悪性腫瘍であり、2006～2013年の間に89例しか報告されていない、極めて稀な疾患である。しかし、治療は外科的切除以外に有効な治療法がなく希少疾患ゆえに、新たな抗癌剤治療法の検討はほとんどなされていない。

近年、腫瘍細胞膜に特異的に発現するアミノ酸輸送体として同定された LAT1 (L-Type Amino Acid Transporter 1) は、細胞増殖に必要な必須アミノ酸だけで無く、ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) という新たな治療方法での治療効果の鍵となるホウ素製剤の腫瘍細胞選択的な取り込みにも関与していることが明らかとなっている。BNCT は、腫瘍細胞に集積したホウ素に対する熱中性子の照射により腫瘍細胞を選択的に死滅させる。さらに、Fujimoto らは、明細胞肉腫は LAT1 を介してホウ素製剤を取り込み、動物実験レベルであるが明細胞肉腫に対する局所的なホウ素中性子捕捉療法の抗腫瘍効果を明らかにしている (Fujimoto T et al. Appl. Radiat. Isot. 2013; 96-100)。

LAT1 は、腫瘍細胞の細胞膜に発現し、正常細胞にはほとんど発現しない。その機能は、細胞増殖に必要な必須アミノ酸を中心とした大型の中性アミノ酸を細胞内に取り込むことである。これは、LAT1 が選択的に阻害されれば、腫瘍細胞は必須アミノ酸を生成できないことから、腫瘍細胞はいわゆる“兵糧攻め”状態に陥り死滅することを意味する。そこで、Fujimoto らは明細胞肉腫におけるこの LAT1 の高発現を初めて確認し学会報告した (L-type Amino Acid Transporter1 (LAT-1) Expression in Clear Cell Sarcoma. ISOLS2017, Kanazawa)。つまり、これは BNCT による明細胞肉腫に対する局所の治療方法に加えて、LAT1 阻害剤による明細胞肉腫への全身治療が可能なことを示唆する。

2. 研究の目的

Fujimoto らは、免疫組織化学的検討にて明細胞肉腫は LAT1 を強力に瀰漫性に発現することを見出しており、明細胞肉腫ではこれらを阻害することで抗腫瘍効果が期待できることは容易に推察される。しかし、明細胞肉腫においては LAT1 を標的とした代謝制御による抗腫瘍効果の検討はこれまでに行われていない。

そこで、本計画では、LAT1 阻害剤の明細胞肉腫に対する抗腫瘍効果の機序についてアポトーシスを中心とした検討を行う。さらに、明らかになった機序から一般的に用いられている抗癌剤を用いて LAT1 阻害剤との有効な併用薬についても検討を行う。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト明細胞肉腫細胞株 MP-CCS-SY を用いて *in vitro* にて検討を行った。LAT1 選択的阻害剤として JPH203 を用いて、下記のごとく評価を行った。

(1) LAT1 選択的阻害剤の抗腫瘍効果

JPH203 による抗腫瘍効果の検討のため、まず、培養した明細胞肉腫細胞株に対して JPH203 (ドキシソルピシン) 処理を行い、WST アッセイを行った。さらに、アポトーシスの評価のため、AnnexinV/PI 染色を行い、FACS にて検討を行った。カスパーゼ依存アポトーシスの評価のため、Caspase Glo3/7 アッセイを行った。

(2) メタボローム解析 (GC/MS 解析)

JPH203 による LAT1 の阻害効果の検討のため GC/MS 解析を行い、JPH203 処理群とコントロール群の比較検討を行った。

(3) 薬剤スクリーニング

臨床においては、明細胞肉腫に対してドキシソルピシンが一般的に使用されているが、それ以外の薬剤との併用の可能性を模索することとした。スクリーニングには、文部科学省新学術領域研究、先端モデル動物支援プラットフォーム・分子プロファイリング支援活動班 (課題番号 16H06276) より提供を受けた標準阻害剤パネルを用いた。

(4) 網羅的遺伝子解析

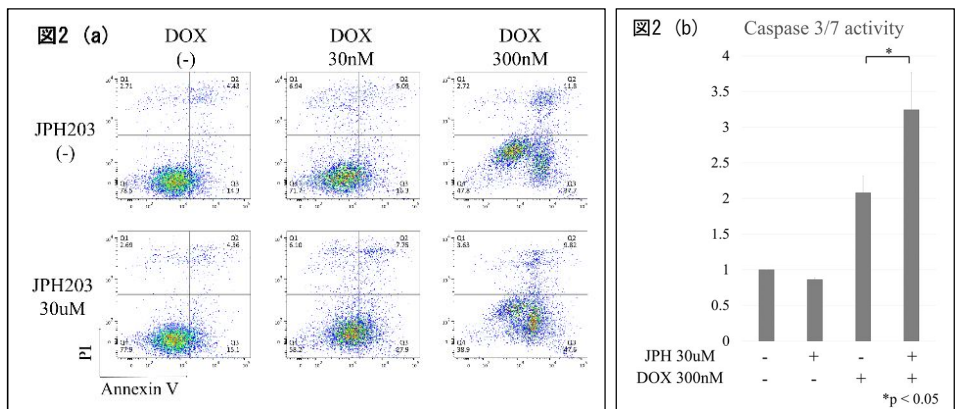
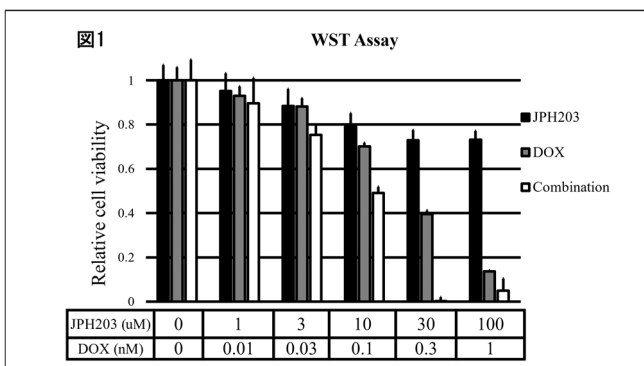
JPH203 処理による遺伝子の変動について網羅的解析を行うため、RNA シークエンスを行った。JPH203 処理群とコントロール群よりサンプルを回収して比較検討した。

4. 研究成果

(1) LAT1 選択的阻害剤の抗腫瘍効果

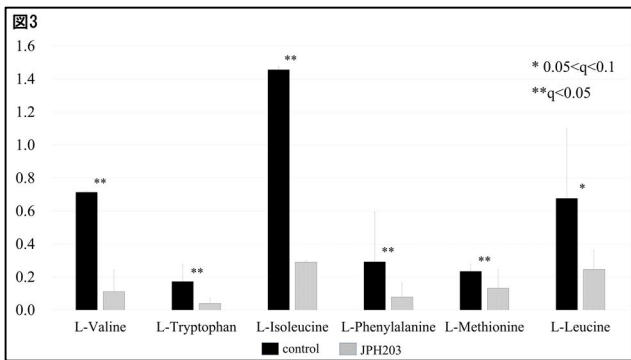
LAT1 選択的阻害剤 JPH203 処理単独では、抗腫瘍効果は明らかではなかった。続いて、明細胞肉腫の薬物治療として一般的に用いられているドキシソルピシン (以下 DOX) との併用による効果を検討した。WST アッセイでは、JPH203 は DOX との併用 (併用群) において非併用群と比較して有意な増殖抑制効果を認めた (図 1)。さらに、併用群では、Annexin V/PI 染色による FACS 解析にて有意にアポトーシスの誘導を認め (図 2.a) Caspase Glo 3/7 アッセイにて、有意にカスパーゼ活性の増加が認められた (図 2.b)。これにより、LAT1 選択的

阻害剤により DOX の増感作用が得られた可能性が示唆された。



(2) LAT1 選択的阻害剤による LAT1 の阻害効果

GC/MS 解析にて、JPH203 処理群では LAT1 を介して取り込まれる必須アミノ酸であるバリン、ロイシン、イソロイシン等の有意な低下を認めた (図 3)。LAT1 選択的阻害剤 JPH203 が LAT1 を阻害するためと考えられる。ヒト明細胞肉腫細胞株において、JPH203 によりこれらの必須アミノ酸の取り込み低下を確認したのは本研究が初めてである。

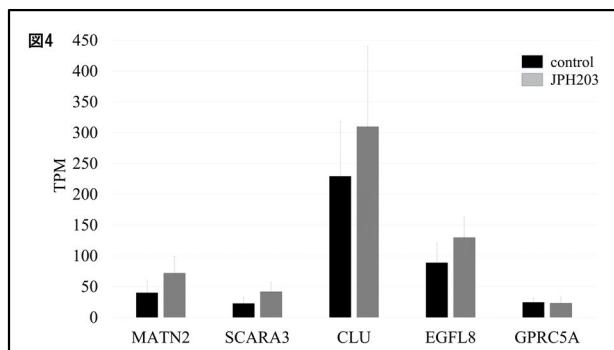


(3) 併用が有用な可能性のある薬剤

標準阻害剤パネルによるスクリーニングの結果、併用により相乗効果を認める可能性のある複数の薬剤を特定した。そのうち、V-ATPase 阻害剤 Bafilomycin A1 は、個別に行った WST assay にて併用により有意な増殖抑制効果を認めた。Bafilomycin A1 はオートファジー阻害作用を示すことから、LAT1、オートファジーをともに阻害することで抗腫瘍効果が増強される可能性が示唆される。

(4) 網羅的遺伝子解析 (図 4)

RNA シークエンスによる網羅的遺伝子解析では、コントロール群と比較して有意に発現が低下した遺伝子は G protein-coupled receptor family C group5 member A (GPCR5A)、発現が上昇した遺伝子は、Matrin 2 (MATN2)、Scavenger receptor class A member 3 (SCARA3)、Clusterin (CLU)、Gene EGF like domain multiple 8 (EGFL8)であった。これらの遺伝子群の中で、明細胞肉腫において変動が指摘されているものは無い。これらの個々の遺伝子が、診断や治療効果の評価の指標、治療標的等になり得るのか、今後さらなる検討が必要である。



上記(1)-(4)の結果から、LAT1 選択的阻害剤 JPH203 は、ヒト明細胞肉腫細胞株において薬物治療の増強効果を示す可能性が示唆された。JPH203 は、他の癌腫において臨床試験が実施されたこともあり、人体への安全性は担保されており、臨床応用へのハードルは低いものと考えられる。本研究により、標準的な薬物治療の無い明細胞肉腫に対する有用な結果を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森下 雅之
2. 発表標題 Anti-tumor effect of LAT1 inhibitor in clear cell sarcoma
3. 学会等名 25th CTOS virtual Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森下 雅之
2. 発表標題 明細胞肉腫に対する LAT1 阻害剤の抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第52回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森下雅之, 藤本卓也, 河本旭哉, 秋末敏宏, 藤田郁夫, 重本理花, 竹森俊幸, 藤原周一, 北山和道, 川上洋平, 深瀬直政, 原仁美, 須藤保, 黒田良祐
2. 発表標題 明細胞肉腫に対するLAT1阻害剤の抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第2回日本サルコーマ治療研究学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森下雅之, 藤本卓也, 河本旭哉, 須藤保, 藤田郁夫, 藤田昌秀, 黒田良祐, 秋末敏宏
2. 発表標題 明細胞肉腫薬物治療におけるLAT1阻害剤による増感効果の検討
3. 学会等名 第55回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------