

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07327

研究課題名（和文）新規細胞内アミノ酸センサーの同定と分子機構解明および創薬標的としての可能性の探索

研究課題名（英文）Identification and mechanistic analysis of intracellular amino acid sensors and their potential as drug targets

研究代表者

奥田 傑（Okuda, Suguru）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授

研究者番号：50511846

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）：がん細胞が増殖するには多くの栄養が必要であり、その栄養の一つであるアミノ酸を細胞に取り込んでがん細胞が増殖するために必要な仕組みを明らかにした。また、この仕組みを薬剤を用いて阻害することで、がん細胞の増殖を抑制することができた。この成果は、将来的に、がんの薬剤による新たな治療法の確立に貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞増殖は生物において普遍的な現象であり、重要な栄養の一つであるアミノ酸がどのように細胞内に取り込まれて細胞増殖に関与するかを明らかにすることは、学術的に非常に重要な課題である。また、アミノ酸による細胞増殖機構を明らかにすることで、その過程を阻害する薬の開発や、その新たな薬を用いたがんの治療法の確立などへとつながる可能性があるという点で、社会に貢献する成果である。

研究成果の概要（英文）：Cancer cells require a lot of nutrients for proliferation, and amino acids are one of the most important nutrients. In this research, mechanism of amino acids uptake and cell proliferation by them was revealed. Drugs to inhibit the mechanism successfully repress the cancer cell proliferation. The results obtained in this research are expected to contribute the establishment of new drug therapy for cancer in the future.

研究分野：蛋白質科学、生化学、薬理学

キーワード：トランスポーター アミノ酸 がん

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸はタンパク質を構成するだけでなく、細胞における様々な機能制御に関わるシグナル因子としての役割を持つ。細胞膜に局在するトランスポーターによって細胞内へ取り込まれたアミノ酸の情報は、酵母から哺乳類細胞に至るまで高度に保存されたセリン/スレオニン系キナーゼ **mTOR** へと伝達され、細胞内代謝や増殖・成長を制御する。**mTOR** は哺乳類細胞においては様々な制御因子と相互作用し、**mTORC1** という複合体を形成している。**mTORC1** はアミノ酸以外の栄養素の変動や細胞へのストレスなどにも応答するが、アミノ酸は最も効率的に **mTOR** を活性化する因子であると考えられている。**mTORC1** は、細胞へのアミノ酸供給量を感じることによってその下流の **p70S6K** や **4EBP1** といったタンパク質のリン酸化を介して遺伝子の転写と翻訳を制御し、アミノ酸供給量を越えたタンパク質合成が起こらないよう監視する役割を果たしている。アミノ酸情報伝達は細胞が成育し生存が維持されるために極めて重要であり、その経路の解明に近年多くの努力が注がれている。細胞内に取り込まれたアミノ酸を感じてその情報を **mTORC1** に伝達する役割をもついくつかのアミノ酸センサー因子が、これまでに同定されている。また、アミノ酸センサー因子という特定のタンパク質ではなく、ロイシン等の大型中性アミノ酸を輸送するトランスポーター **LAT1** のリソソーム局在が重要であるとの報告も最近増えている。がん特異的に高発現する **LAT1** は、がん細胞において細胞膜に局在し、細胞増殖を促すアミノ酸の取り込みを行う主要なタンパク質であるが、リソソームタンパク質 **LAPTM4b** やアクチン結合因子 **Girdin**、オートファジー調節因子 **DRAM1** などとの相互作用によりリソソーム膜にも局在し、細胞質またはリソソーム内のアミノ酸濃度の変化を引き起こしてリソソーム膜上の **mTORC1** 活性に影響を及ぼすと報告されている (*Nat Commun* 6:7250, 2015, *PLoS Biol* 16, e2005090, 2018, *Mol Cell* 76, 163-176, 2019)。このように、がん細胞におけるアミノ酸刺激による細胞増殖に **LAT1** が重要なことは明らかである。しかしながら、**LAT1** を介して細胞内に取り込まれたアミノ酸がどのように細胞増殖に関与するかの全貌は依然として不明である。

2. 研究の目的

本研究では、がん細胞におけるアミノ酸感知に関与する因子を同定し、その創薬標的としての可能性を探索することを目的とする。がん細胞において細胞増殖を促進するアミノ酸の取り込みを担う **LAT1** を最上流として、その下流で起こる様々な現象を、生化学的手法にプロテオミクスやリン酸化プロテオミクスといった網羅的な解析手法を組み合わせることで、細胞内に取り込まれたアミノ酸と関連する因子を絞り込み、アミノ酸による細胞増殖機構の全容解明へとつなげる試みである。また、アミノ酸感知に関与する因子の創薬標的としての可能性について、阻害剤を用いた実験によって評価する。がん細胞において細胞増殖を促すアミノ酸の取り込みを担う **LAT1** は、がん治療のための創薬標的として注目されており、その阻害剤の開発が進められている。がん細胞におけるアミノ酸の取り込み阻害と同様に、取り込まれたアミノ酸の感知に関わる因子の阻害も、がん細胞の増殖抑制効果があると予想される。また、アミノ酸の取り込みと感知を同時に阻害することで、さらに強い増殖抑制効果が得られる可能性も期待できる。

3. 研究の方法

細胞内におけるアミノ酸感知に直接的または間接的に関与する因子がアミノ酸トランスポーターと相互作用するという仮説のもと、がん細胞においてアミノ酸トランスポーター **LAT1** と相互作用する因子の解析を行った。培地へのアミノ酸添加の有無、**LAT1** 阻害薬の有無など、細胞内アミノ酸量に変化を引き起こすことが予想される条件下でがん細胞を培養し、細胞を回収、破碎後、膜画分を調製した。膜画分に界面活性剤を加えて **LAT1** およびその相互作用因子を可溶化し、抗 **LAT1** 抗体を用いて共免疫沈降実験を行い、**LAT1** と共に免疫沈降された因子を **SDS-PAGE** によって解析した。細胞培養条件によって違いが見られたバンドを切り出し、質量分析計を用いた解析を行うことで、細胞内アミノ酸量に依存して **LAT1** との相互作用に変化のみられる因子の同定を試みた。また、細胞内アミノ酸を感じ取る因子は、瞬間的な細胞内アミノ酸量の増減によってリン酸化状態に変動がある可能性も考えられるため、**LAT1** 阻害による細胞内のシグナル変動について、タンパク質リン酸化ネットワーク経路全体を対象とした網羅的な解析を進めた。同時にシグナル伝達によって制御される様々なタンパク質の発現量の変動も解析することで、細胞内アミノ酸感知に関連する経路および因子の同定を試みた。また、本研究で用いた **LAT1** 阻害薬 **JPH203** が、がん細胞に及ぼす効果について、細胞生物学的および生化学的手法で解析を行った。

4. 研究成果

アミノ酸存在下で培養した細胞から膜面分を調製し、抗 LAT1 抗体を用いた共免疫沈降実験を行い、LAT1 と共免疫沈降された試料を SDS-PAGE によって分離した。ネガティブコントロールとして用いたマウス IgG の試料と比較して LAT1 抗体使用時に特異的に検出された 12 本のバンドについて、質量分析計を用いて解析を行った結果、LAT1 と相互作用する因子を同定することができた。しかしながら、コンタミネーションと思われる因子を除いても検出された因子が合計で数十以上あったため、アミノ酸添加の有無または LAT1 阻害薬の有無の条件下で培養したがん細胞から膜面分を調製して、同様の実験を行った。その結果、それぞれの条件特異的に LAT1 と相互作用する因子に起因すると考えられるバンドを複数検出することができた。本研究では LAT1 阻害薬として JPH203 を用いたが、まずはその効果についての評価を行い、がん細胞においてアミノ酸取り込みを強く阻害すること、および mTORC1 経路と GAAC (General Amino Acid Control) 経路に大きなシグナル変動を引き起こすことが示された (Nishikubo *et al.*, *J Cell Mol Med.* 2022)。さらに、翻訳途中のタンパク質をピューロマイシン標識することでタンパク質合成量の評価を行った結果、JPH203 による LAT1 の阻害によって、全体的なタンパク質合成量が減少することが明らかになった。また、ショ糖密度勾配遠心分離によって mRNA に結合しているリボソームの量を評価するポリソームアッセイの結果からも、JPH203 による LAT1 阻害によって、細胞内ではタンパク質合成が抑制されていることが示唆された。

また、共免疫沈降実験と並行して、タンパク質リン酸化ネットワーク経路全体を対象とした網羅的な解析を、LAT1 阻害薬の有無の条件下で培養したがん細胞のライセートを用いて行った。シグナル伝達によって制御されるタンパク質の発現量の変動解析も同時に行い、これらの結果を統合して、分子ネットワーク解析ソフトウェア IPA (Ingenuity Pathway Analysis) およびリン酸化酵素活性予測手法 Kinase substrate enrichment 解析を行った。JPH203 を様々ながん細胞株に作用させ、解析を行った結果、JPH203 による LAT1 阻害によって細胞内の多くの経路に変動が見られることが明らかとなり、特定の細胞株に特異的な経路の変動も観察することができた。胆道がん由来の細胞株を用いた実験では、LAT1 阻害によって胆道がん由来細胞の細胞増殖は強く抑制されること、また細胞内では細胞周期経路に大きなリン酸化シグナルの変動が見られることが示された (Okanishi *et al.*, *Cancer Sci.* 2021)。特に CDK1 や CDK2 といった細胞周期関連キナーゼの活性は、本実験で用いた 4 種類の胆道がん由来細胞株全てにおいて抑制されており、さらなる解析の結果、LAT1 によるアミノ酸取り込み阻害によって、G0/G1 アレストが引き起こされていることも示唆された。細胞周期関連キナーゼはアミノ酸感知に直接関与しているわけではないと予想されるが、アミノ酸取り込み阻害によって強く影響を受けるため、間接的にアミノ酸感知に関与している可能性も考えられる。そこで、アミノ酸取り込みおよび細胞周期関連キナーゼの同時阻害による細胞増殖抑制効果について解析を進めた。その結果、LAT1 阻害薬と FDA 承認済みの Dinaciclib や臨床試験段階の AT7519 といった CDK 阻害薬を併用した場合、それぞれ単独で用いた場合よりも強い増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。すい臓がん由来の細胞株を用いた場合も同様の結果が得られ、LAT1 とその下流因子である細胞周期関連キナーゼの同時阻害は、将来的に、がんの新たな薬物療法の一つの選択肢となる可能性が示された。他にも様々ながん細胞株で解析を進めており、LAT1 を介したアミノ酸取り込みを阻害することで、細胞周期関連経路の他にも大きなシグナル変動が見られた経路が存在することが明らかとなっている。研究期間内に特定のアミノ酸センサーの同定まで至らなかったが、共免疫沈降実験によって得られた LAT1 相互作用因子の情報と、プロテオミクス、リン酸化プロテオミクスで得られた細胞内アミノ酸アミノ酸感知に関連することが示唆された様々な経路の情報を組み合わせ、さらなる解析を進めることで、アミノ酸取り込みおよび細胞内におけるアミノ酸感知関連シグナルによる細胞増殖機構の全容解明へとつながることが期待できる。また、細胞内アミノ酸アミノ酸感知に関与する経路の創薬標的としての可能性についても、今後、動物実験などによってさらなる評価をしていくことで、臨床応用へと続くことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Okanishi Hiroki, Ohgaki Ryuichi, Okuda Suguru, Endou Hitoshi, Kanai Yoshikatsu	4. 巻 112
2. 論文標題 Proteomics and phosphoproteomics reveal key regulators associated with cytostatic effect of amino acid transporter LAT1 inhibitor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 871 ~ 883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14756	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Quan Lili, Ohgaki Ryuichi, Hara Saori, Okuda Suguru, Wei Ling, Okanishi Hiroki, Nagamori Shushi, Endou Hitoshi, Kanai Yoshikatsu	4. 巻 39
2. 論文標題 Amino acid transporter LAT1 in tumor-associated vascular endothelium promotes angiogenesis by regulating cell proliferation and VEGF-A-dependent mTORC1 activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13046-020-01762-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Jin Chunhuan, Wei Ling, Ohgaki Ryuichi, Tominaga Hideyuki, Xu Minhui, Okuda Suguru, Okanishi Hiroki, Kawamoto Yasuharu, He Xin, Nagamori Shushi, Kanai Yoshikatsu	4. 巻 375
2. 論文標題 Interaction of Halogenated Tyrosine/Phenylalanine Derivatives with Organic Anion Transporter 1 in the Renal Handling of Tumor Imaging Probes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 451 ~ 462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/jpet.120.000235	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato Takafumi, Kusakizako Tsukasa, Jin Chunhuan, Zhou Xinyu, Ohgaki Ryuichi, Quan LiLi, Xu Minhui, Okuda Suguru, Kobayashi Kan, Yamashita Keitaro, Nishizawa Tomohiro, Kanai Yoshikatsu, Nureki Osamu	4. 巻 13
2. 論文標題 Structural insights into inhibitory mechanism of human excitatory amino acid transporter EAAT2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-32442-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishikubo Kou, Ohgaki Ryuichi, Okanishi Hiroki, Okuda Suguru, Xu Minhui, Endou Hitoshi, Kanai Yoshikatsu	4. 巻 26
2. 論文標題 Pharmacologic inhibition of <scp>LAT1</scp> predominantly suppresses transport of large neutral amino acids and downregulates global translation in cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 5246 ~ 5256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcmm.17553	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西窪 航、大垣 隆一、岡西 広樹、奥田 傑、徐 旻恵、遠藤 仁、金井 好克
2. 発表標題 がん細胞におけるLAT1のアミノ酸の取込みへの寄与とLAT1阻害薬によるタンパク質合成抑制効果
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡西 広樹、大垣 隆一、奥田 傑、遠藤 仁、金井 好克
2. 発表標題 胆道がん細胞株におけるアミノ酸トランスポーターLAT1阻害薬が示す増殖抑制作用のタンパク質発現・リン酸化変動の網羅的解析による検討
3. 学会等名 第140回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡西 広樹、大垣 隆一、奥田 傑、遠藤 仁、金井 好克
2. 発表標題 アミノ酸トランスポーターLAT1阻害薬JPH203による胆道がん細胞増殖抑制機構に関わるプロテオミクスおよびリン酸化プロテオミクス解析
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 劉 星明、大垣 隆一、岡西 広樹、奥田 傑、徐 旻恵、金井 好克
2. 発表標題 Suppression of proliferation of cholangiocarcinoma cells by miRNAs targeting L-type amino acid transporter 1 downregulated in cholangiocarcinomas
3. 学会等名 第139回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大垣隆一、全麗麗、奥田傑、岡西広樹、永森収志、遠藤仁、金井好克
2. 発表標題 腫瘍間質の血管内皮細胞に高発現するアミノ酸トランスポーターLAT1は細胞増殖の促進と血管新生促進因子VEGF-AによるmTORC1活性化の制御を介して腫瘍血管新生に寄与する
3. 学会等名 第94回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chunhuan Jin, Ling Wei, Ryuichi Ohgaki, Suguru Okuda, Minhui Xu, Hiroki Okanishi, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai
2. 発表標題 Development of tumor-specific compounds avoiding renal uptake for PET imaging and targeted a-therapy
3. 学会等名 第138回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西窪 航, 大垣 隆一, 岡西 広樹, 奥田 傑, 金井 好克
2. 発表標題 遊離アミノ酸量の定量的経時変化解析によるアミノ酸トランスポーター阻害効果の検討
3. 学会等名 第137回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西窪 航、大垣 隆一、岡西 広樹、奥田 傑、徐 旻恵、遠藤 仁、金井 好克
2. 発表標題 Inhibition of amino acid transporter LAT1 drastically suppresses the transport of large neutral amino acids and induces the downregulation of global translation in cancer cells
3. 学会等名 第96回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西窪 航、大垣 隆一、岡西 広樹、奥田 傑、徐 旻恵、遠藤 仁、金井 好克
2. 発表標題 アミノ酸トランスポーターLAT1阻害薬が腫瘍細胞の大型中性アミノ酸輸送とタンパク質合成に与える影響
3. 学会等名 第141回日本薬理学会近畿部会
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
研究 分 担 者	岡西 広樹 (Okanishi Hiroki) (70792589)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	

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
---------	---------