

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18108

研究課題名(和文)腎癌におけるアミノ酸トランスポーターを標的とした新規治療標的の開発

研究課題名(英文)Exploration of new therapeutic strategy targeting amino acid transporter in renal cell carcinoma

研究代表者

山岸 敦史 (Yamagishi, Atsushi)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：70571678

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)：ヒト腎癌細胞株ACHNとラパマイシン抵抗ACHN株(ACHN/RR)の網羅的代謝物解析を行ったところ、多くのアミノ酸は耐性株で高値、グルタミンだけ低値であった。また、LAT1と4F2の二量体はグルタミンを細胞外へ排出、その他のアミノ酸を細胞内へ取り込むトランスポーターであるが、これらはACHN/RRで高発現だった。そこで、ヒト腎癌細胞株についてACHNとACHN/RR、他のヒト腎癌細胞株について、ラパマイシンの効果を比較したところ、LAT1、4F2の発現が高い株でラパマイシンの効果は低かった。しかし、LAT1や4F2をノックダウンしてもラパマイシンの効果は増強しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までの研究で、LAT1、4F2がラパマイシン耐性のマーカーとなる可能性は示されているものの、臨床検体を用いてマーカーとなるかの検索はできていない。また、LAT1、4F2の阻害がラパマイシン耐性の克服に寄与する可能性を探索してきたが、本検討では否定的な結果となった。これまでの研究でLAT1、4F2の発現を制御している因子がラパマイシン耐性機序に関与していることが示唆されるため、LAT1、4F2の制御の観点から研究を継続する予定である。

研究成果の概要(英文)：Comparison between human renal cell carcinoma cell line ACHN and rapamycin resistant ACHN (ACHN/RR) using metabolome analysis, most of amino acids were high level but glutamine was low level in ACHN/RR. In addition, the mRNA expressions of LAT1 and 4F2 were high, which form a dimer, transport amino acids intracellularly, and pump glutamine out of cell. In ACHN, ACHN/RR, and other human renal cell carcinoma cell lines, the rapamycin susceptibility is low in cells with high expression of LAT1 and 4F2. However, knockdown of LAT1 or 4F2 did not enhance the susceptibility of rapamycin.

研究分野：泌尿器科

キーワード：LAT1 4F2 amino acid transporter renal cell carcinoma

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

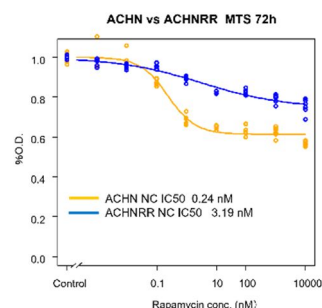
mTOR は栄養、細胞内代謝に強くかかわる分子である。腎細胞癌は mTOR 経路が更新していることが知られており、実際 mTOR 阻害剤は腎癌治療に使用される。しかしその効果は限定的で、腎癌治療の中心は免疫チェックポイント阻害剤や抗 VEGFR 薬であり、mTOR 阻害剤使用が選択される局面は限られている。それでもなお免疫チェックポイント阻害剤、抗 VEGFR 薬耐性後の治療は腎細胞癌治療の課題であり、mTOR 阻害剤の効果予測、ラパマイシン耐性の克服は依然、大きな意味がある。

2. 研究の目的

腎癌細胞株、および mTOR 阻害剤 (rapamycin) 耐性腎癌細胞株を作成し、網羅的遺伝子発現解析、網羅的代謝物解析を行い比較することにより、mTOR 阻害剤の耐性機序を解明、mTOR 阻害剤使用のマーカー探索、mTOR 阻害剤の効果を増強する治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト腎癌細胞株 ACHN に少量の rapamycin を添加、徐々に rapamycin 濃度を上昇させることにより rapamycin 耐性 ACHN 株 (ACHN/RR) を作成する。ACHN/RR 株は右図に示すように rapamycin に対して耐性を示している。作成した ACHN/RR および ACHN 親株について RNAseq による網羅的発現解析、LC/MS 法による網羅的代謝物解析を行い、ACHN、ACHN/RR の代謝物及び代謝にかかわる分子の発現を比較した。



(3) ACHN、ACHN/RR、および他のヒト腎癌細胞株 A498、786O、769P、Caki-2 について、着目した分子の発現を RT-qPCR 法、ウェスタンブロット法で確認する。また、rapamycin への感受性を MTS 法で確認する。

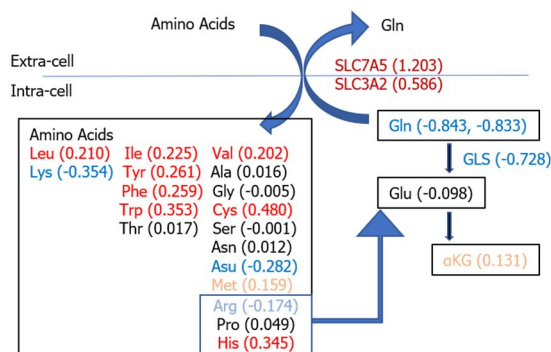
(4) rapamycin の感受性が低い細胞株について siRNA 法により着目した分子をノックダウンし、ノックダウンの効果、rapamycin 感受性の違いについて検討する。

4. 研究成果

(1) ACHN と ACHN/RR のメタボローム解析、RNAseq によるアミノ酸代謝の比較

ACHN と ACHN/RR についてメタボローム解析を行ったところ、グルタミン酸を除く多くのアミノ酸が ACHN/RR 株に多く含まれていた。

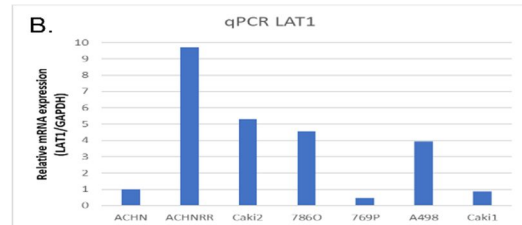
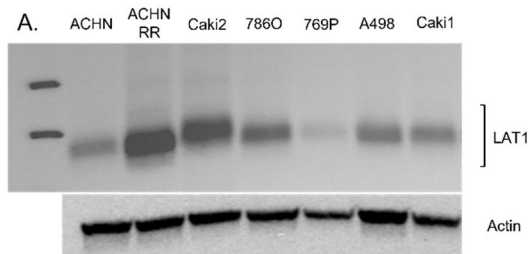
そこで、アミノ酸トランスポーターに着目し、RNAseq による発現解析からアミノ酸トランスポーターにかかわる分子の発現を比較したところ、SLC7A5 (LAT1)、SLC3A2 (4F2) の発現が ACHN/RR で高かった。LAT1、4F2 はヘテロダイマーを



形成し、グルタミン酸を細胞外へ、その他の大分子量アミノ酸を細胞内へ移行させるアミノ酸トランスポーターである。(図のカッコ内は \log_2 ACHN/RR/ACHN)。

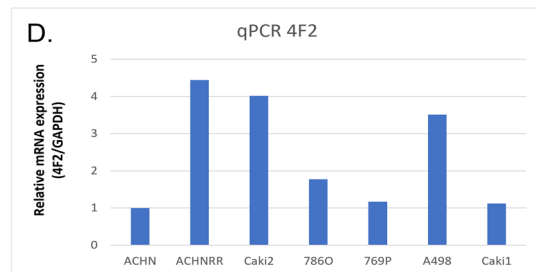
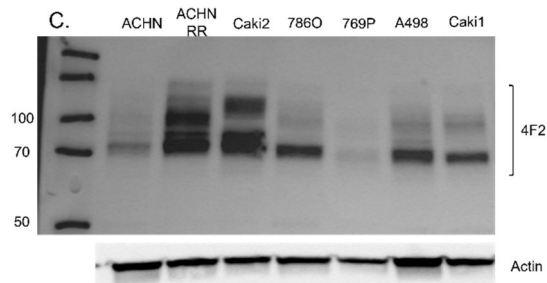
(2) 腎癌細胞株における LAT1、4F2 の発現とラパマイシンの効果の関連

ヒト腎癌細胞株について、LAT1、4F2 の発現をウェスタンブロット法、RTqPCR 法で確認した。LAT1 の発現は蛋白レベル (A)、mRNA レベル (B) で同様の傾向を認めた。LAT1 発現は 786O、A498 で高く、Caki1、769P で低い傾向を認めた (A, B)。また、RNAseq で示されていた通り、ACHN では蛋白レベル、mRNA レベルとも LAT1 の発現は低く、ACHN/RR では LAT1 の発現が高かった。



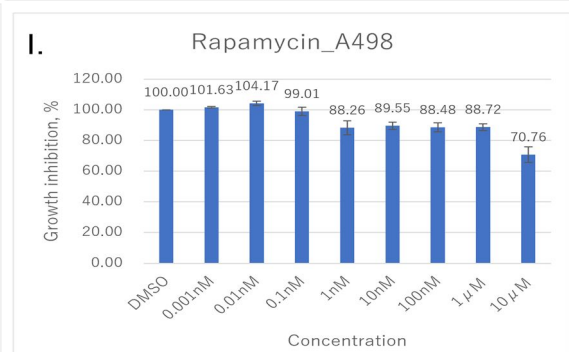
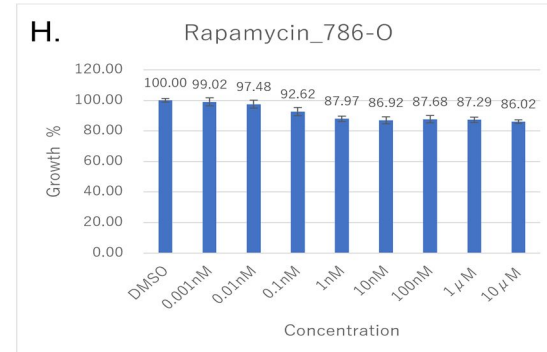
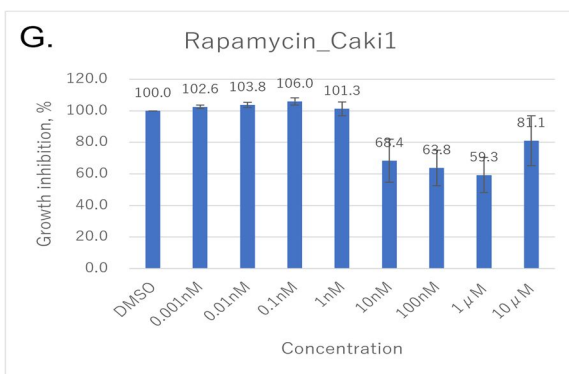
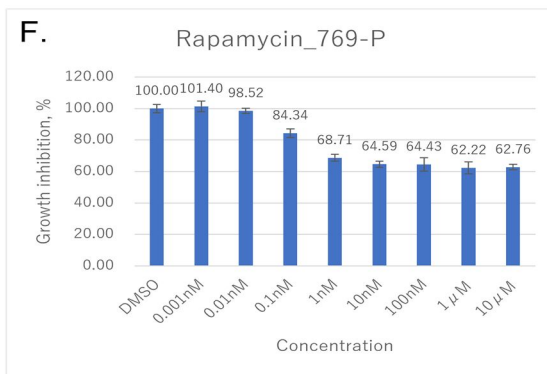
4F2 の発現も、LAT1 の発現と同様、

786O、A498 で高く、Caki1、769P で低い傾向を認めた。4F2 の発現についても RNAseq で示されていた通り、ACHN では蛋白レベル、mRNA レベルとも LAT1 の発現は低く、ACHN/RR では LAT1 の発現が高かった。

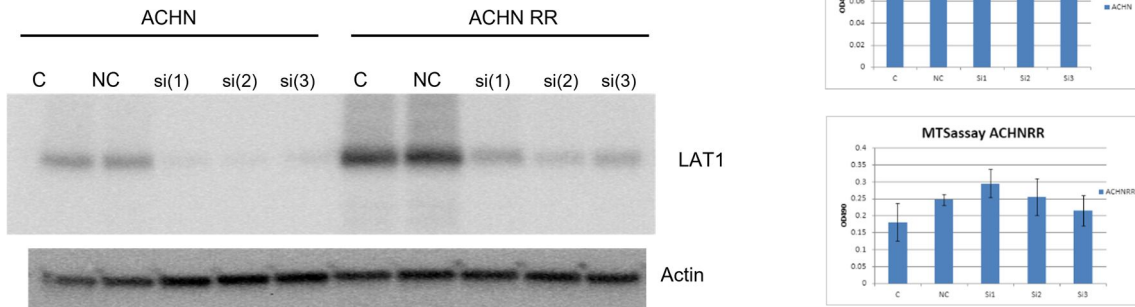


次に各細胞株のラパマイシン感受性を MTS

法で評価したところ、LAT1、4F2 の発現が低い 769P (F)、Caki1 (G) ではラパマイシンの感受性が高く、LAT1 や 4F2 の発現が高い 786O (H)、A498 (I) ではラパマイシン感受性が低かった。



(3) LAT1 ノックダウン

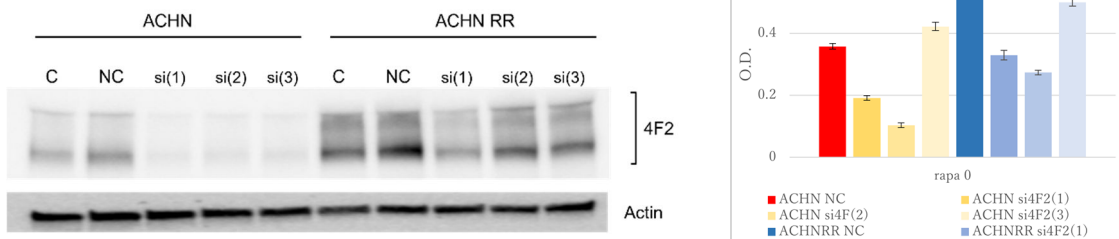


ACHN、ACHN/RR における LAT1 の機能を見るため、siRNA 法を用いて LAT1 のノックダウンを行った。もともと LAT1 の発現が低い ACHN 株において LAT1 をノックダウンしたところ細胞活性低下がみられた。一方、LAT1 の発現が亢進していた ACHN/RR 株で LAT1 をノックダウンしたところ、細胞活性への影響は見せなかった。

次に ACHN/RR で LAT1 をノックダウンしたうえでラパマイシンを添加し細胞活性を確認したが、LAT1 ノックダウンによるラパマイシン耐性化の解除効果は認めなかった。

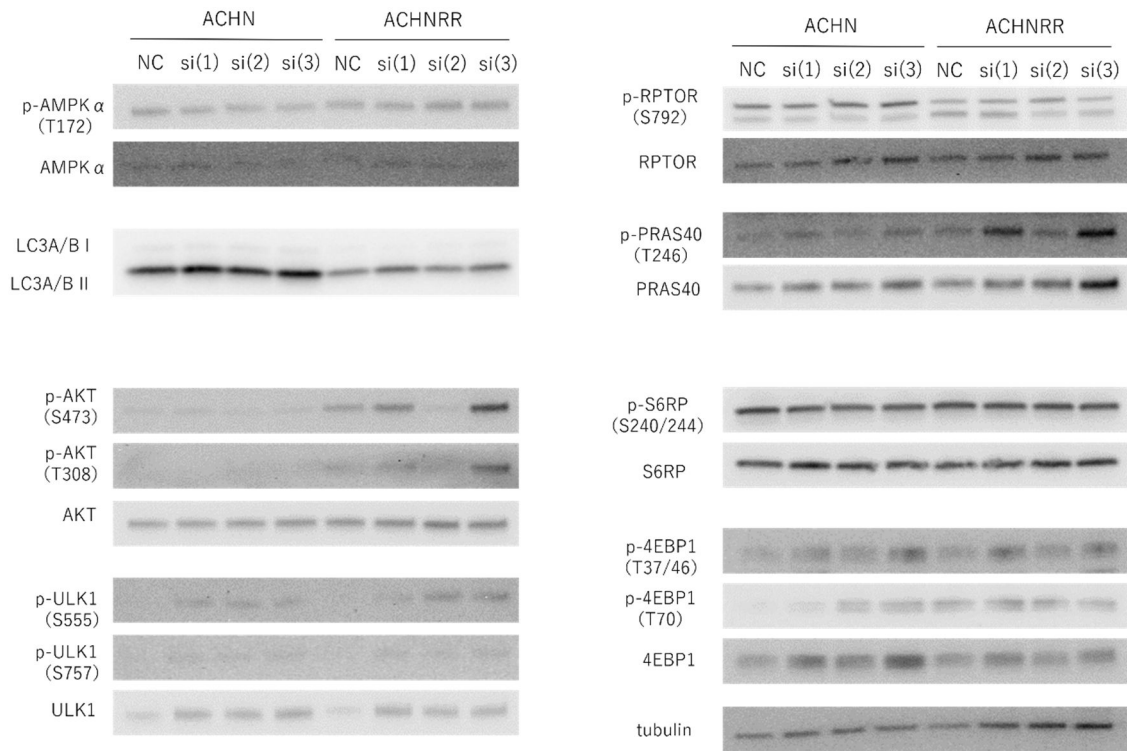
また、LAT1 の発現が高い細胞株 A498、Caki2 において LAT1 のノックダウンし細胞活性を見たが、いずれも細胞活性の低下は見られなかった。

(4) ACHN、ACHN/RR における 4F2 阻害



ACHN、ACHN/RR において 4F2 を阻害したところ、ACHN、ACHN/RR とも細胞活性を阻害する傾向が見られた。

mTORC1 を制御する経路、下流のオートファジー経路、S6RP、4EBP1 経路についてウェスタンブロット法で確認したところ、ACHN/RR では ACHN と比較し mTORC1 上流の Akt リン酸化が亢進、下流の 4EBP1 リン酸化が亢進しており、ラパマイシン耐性の理由として、Akt/mTORC1/4EBP1 経路亢進が関与していることが示唆された。また、ACHN/RR 株では 4F2 ノックダウンにより AMPK リン酸化が亢進している一方、Akt や 4EBP1 のリン酸化はさらに亢進しており、4F2 の阻害が起こす細胞内アミノ酸低下による AMPK リン酸化経路ではなく、Akt/mTOR 経路が亢進されることが示された。オートファジー経路は ACHN/RR で抑制されているが、4F2 ノックダウンで亢進することが示された。



(5) 4F2 ノックダウンとラパマイシン

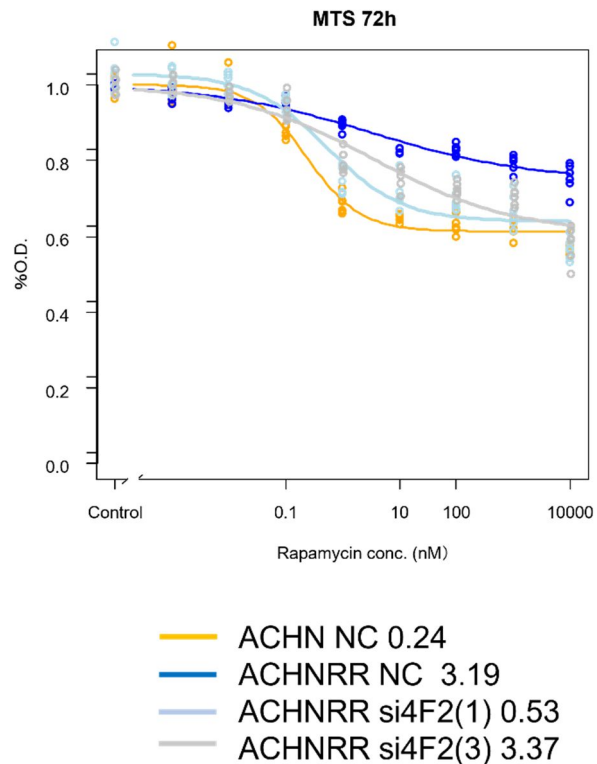
ACHN/RR のラパマイシン耐性は LAT1 ノックダウンでは解除されなかった。

一方、ACHN/RR のラパマイシン耐性は 4F2 阻害により解除されることが MTS で示された (右図)。

(6) これらの結果から示されること

LAT1 と 4F2 はヘテロダイマーを形成しアミノ酸トランスポーターとして働く。ラパマイシンへの耐性化で LAT1、4F2 両者の発現が亢進しており、このアミノ酸トランスポーターの阻害がラパマイシンへの感受性を取り戻すことを期待し検討してきたが、LAT1 阻害でラパマイシン感受性の阻害効果は認めず、このアミノ酸トランスポーターがラパマイシン抵抗性に寄与する可能性は低いと考えられる。一方、4F2 の阻害によりラパマイシン耐性の解除が見られた。これらの知見から、4F2 がラパマイシン感受性のマーカーとなる可能性が示唆される。

4F2 は LAT1 以外の分子ともヘテロダイマーを形成し、アミノ酸トランスポーターとして働くことが報告されており、我々は、次のステップとして 4F2 と関連する他のアミノ酸トランスポーターに着目し、研究を継続している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------