

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 6 年 4 月 28 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15925

研究課題名（和文）同系免疫応答間質豊富大腸癌モデルでのLAT1阻害剤の腫瘍間質・免疫への作用評価

研究課題名（英文）Evaluation of the efficacy of LAT1 inhibitor to tumor stroma and immunity in an allogenic mouse model of colon cancer having abundant stroma.

研究代表者

瀧川 英彦（Takigawa, Hidehiko）

広島大学・病院（医）・助教

研究者番号：10883027

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：必須アミノ酸の細胞内取り込みを担うアミノ酸トランスポーターファミリー（LAT1-4）のうち、LAT1は癌細胞で特異的に発現する。新規のLAT1特異的阻害剤、JPH203は、癌特異的に飢餓を誘導することが期待されるが、大腸癌に対する抗腫メカニズムは不明であった。本研究では、LAT1発現の癌進展における意義をデータベース解析、臨床検体、in vitro実験により解明し、マウス由来大腸癌細胞株と間葉系幹細胞のマウス回盲部同所移植により作製した、間質豊富な同系免疫応答マウス大腸腫瘍に対する治療実験に、網羅的遺伝子発現解析を加え、JPH203が癌増殖のみならず、腫瘍間質抑制にも有効であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌において、LAT1と腫瘍進展の関連性を解明し、治療標的としてのLAT1の意義を見いだした。新規のLAT1阻害剤JPH203は、LAT1を特異的に抑制する点で、従来のLAT family阻害剤とは差別化がはかれる薬剤であるが、同薬剤の大腸癌に対する有用性を示した。JPH203は胆道癌のPhase2トライアルで良好な治療成績を示しているが、大腸癌への適応を考える際に意義のある結果を示した。さらに本研究で示したJPH203の有する腫瘍間質への抑制作用は、新規の知見であり、間質豊富な腫瘍への有用性を示すと共に、併用レジメでシナジー効果を発揮する薬剤を探索する際にも、有用な知見であると考えている。

研究成果の概要（英文）：The large neutral amino acid transporter family (LAT1-4) plays an important role in the intracellular uptake of essential amino acids. Among them, LAT1 is specifically expressed in cancer cells. A novel LAT1-specific inhibitor, JPH203, is expected to cause cancer-specific starvation and possess anti-tumor effects; however, the anti-tumor mechanism for colorectal cancer (CRC) remains unclear. In this study, we clarified the significance of LAT1 expression in cancer progression in database analysis, clinical specimens, and in vitro experiments. Subsequently, we demonstrated the effect of JPH203, using a stroma-abundant allogeneic immunoreactive mouse colorectal tumor created by the orthotopic transplantation of a mouse-derived CRC cell line and mesenchymal stem cells into mouse cecum. Comprehensive analysis with RNA sequences showed the efficacy of JPH203 not only in cancer proliferation but also in tumor stromal activation.

研究分野：消化器内科

キーワード：LAT1 大腸癌 アミノ酸トランスポーター 腫瘍間質 同系免疫応答 同所移植モデル 腫瘍微小環境 JPH203

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

近年、腫瘍免疫を標的とする PD-1 阻害剤等の薬剤が臨床応用され始めたが、大腸癌で頻度の高い、マイクロサテライト安定性症例や、間質の豊富な腫瘍においてはその効果は十分に発現されない(Tirosh I et al. Science 2016)等、課題が残っている。

アミノ酸トランスポーターである LAT は、人体の維持に必須である必須アミノ酸を細胞内に取り込む役割を担う。LAT family (LAT1~4 が存在) 蛋白のうち、LAT1 は腫瘍特異的に発現するため”腫瘍細胞型”、LAT2 は主に正常細胞に発現するため”正常細胞型”等とも呼称されている。

アミノ酸トランスポーター (LAT) 阻害剤は、癌を兵糧攻めにするという、他にない作用機序を有する興味深い薬剤であるが、これまで LAT1~4 をブロードに阻害する汎 LAT 阻害剤が主に使用されていた。汎 LAT 阻害剤では、LAT2 も同時に阻害することから、正常細胞に対する障害性も報告されている(Kim CS et al. Biol Pharm Bull 2010)。近年、癌特異的に発現する LAT1 の特異的阻害剤である JPH203 が開発され、正常組織への障害性を最小に、抗腫瘍作用を発揮する可能性が高い薬剤であると考え、本薬剤に注目した。

近年 *in vitro* での網羅的解析で、LAT1 の発現が間葉系フェノタイプの維持に必須の蛋白質である可能性が報告されている他、腫瘍免疫への影響が報告されているが、*in vivo* での詳細な検討はなく、上皮間葉系転換に伴う間質活性化や腫瘍免疫に及ぼす影響については未解明である。腫瘍の増殖・浸潤・転移に関して、癌細胞そのものだけでなく、その周囲に存在する腫瘍微小環境との相互作用が重要と言われており、本研究では、そこに着目した。LAT1 阻害剤が、癌細胞の上皮間葉系転換や腫瘍間質活性化や腫瘍免疫に与える影響を評価するため、腫瘍微小環境に着目して、抗腫瘍効果の機序を同系免疫応答間質豊富大腸癌マウスモデルを用いて解析することとした。

2. 研究の目的

同系免疫応答間質豊富大腸癌マウスモデルを用いて、新規の LAT1 特異的阻害剤 JPH203 を用いた治療実験を行う。本研究は、腫瘍の免疫組織学的変化、遺伝子発現変化の網羅的解析により抗腫瘍効果の機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

癌間質相互作用、腫瘍免疫に着目し、大腸癌の進展における LAT1 分子発現の意義と、LAT1 阻害剤の抗腫瘍効果とその機序を下記の 6 つの検討により検証した。

【検討 (1) データベースを用いた大腸癌での LAT family 遺伝子発現状況解析】

ゲノムと表現型の変数間の相関を調べるために機能的ゲノムデータセットを探索するために使用される統計マイニングツールである UCSC Xena (<https://xena.ucsc.edu/> (accessed on 21 May 2020))を用いて、結腸や他の臓器から得られた正常組織と腫瘍組織における LAT1 の発現を解析し、予後との関連性を評価した。正常大腸粘膜と大腸腫瘍における LAT1 と LAT2 の相対発現レベルも評価した。

【検討 (2) 154 例の大腸癌臨床検体を用いた免疫組織学的検討 (LAT1 免疫染色)】

LAT1 阻害剤の標的となりうる腫瘍の臨床的ステータスや LAT1 進展が腫瘍進展において果たす役割を明らかにする目的で、154 例の外科切除標本を用いて LAT1 の免疫染色を行った。基本的な臨床データに加え、マイクロサテライト不安定性、T 細胞浸潤形式、KRS/BRAF 変異、間質量等の評価がなされた検体を用いて、LAT1 発現腫瘍の割合や腫瘍特異的な発現の確認、LAT1 発現と変異ステータス、腫瘍間質、腫瘍免疫、腫瘍進展度との関連性を評価した。

【検討 (3) *in vitro* での LAT1 阻害剤の細胞増殖抑制効果の評価】

大腸癌において LAT1 阻害剤 JPH203 がどの程度普遍的に効果を発揮するか評価するため、*in vitro* で複数の大腸癌細胞株を用いて細胞増殖抑制作用を評価した。マイクロサテライト安定性や遺伝子変異ステータスの異なる細胞株を用いて、LAT1 mRNA 発現量を PCR で評価の上、LAT1 発現量依存性の効果を検証した。増殖能の評価には生細胞イメージングシステム (Incucyte; Essen BioScience)、を用いた。

【検討 (4) *in vivo* での “同系免疫応答間質豊富大腸癌マウスモデル” を用いた治療実験】

LAT1 阻害剤 JPH203 の腫瘍間質・腫瘍免疫への作用に着目してその抗腫瘍効果の機序を明らかにするため、マウス大腸癌細胞株 CT26 と間葉系幹細胞 (MSC) をマウス回盲部に同所共移植し、同系免疫応答・間質豊富大腸癌マウスモデルを作成して、LAT1 阻害剤 JPH203 の治療実験を行った。control 群 12 匹、LAT1 阻害剤 JPH203 投与群 12 匹の 2 群による治療実験を行う。癌細胞にはルシフェラーゼ遺伝子導入細胞を用いて IVIS による腫瘍動態モニタリングを行い、細胞株移植

の1週間後から、臨床使用相当量（50mg/kg/day）の腹腔内投与を2週間連日行いサクリファイスし、腫瘍容積、転移の有無等を評価した。2週間の治療後、腫瘍径、転移の有無を評価する。

【検討（5） 抗腫瘍効果の網羅的解】

治療群、コントロール群の腫瘍組織から RNA を抽出し、RNA シークエンスによる網羅的な遺伝子発現解析を行う。個々の遺伝子発現変化の比較のみならず、転写因子に着目した解析、Gene set enrichment analysis、Gene ontology、enrichment analysis、KEGG pathway analysis、Protein-Protein interaction analysis 等により多面的に評価する。LAT1 阻害剤が抑制する pathway を解析することで抗腫瘍効果を発揮する機序を探索する。

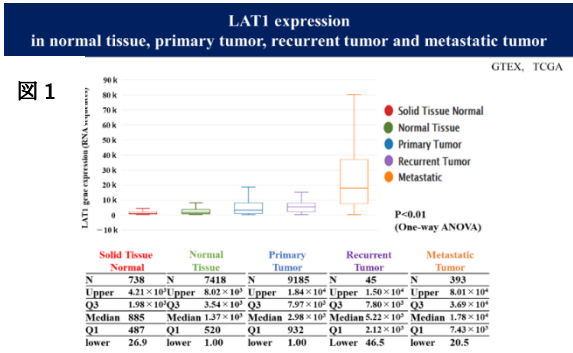
【検討（6） 網羅的解析結果に関する validation study】

RNA シークエンスによって得られた知見に関して、臨床検体での免疫染色、*in vitro* で癌細胞と MSC の相互作用に及ぼす影響評価、動物実験で得られた腫瘍組織検体を用いた validation を行う。

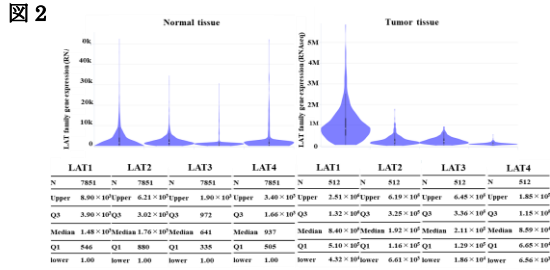
4. 研究成果

【結果(1) Xena を用いたデータベース解析によるヒトでの LAT1 発現】

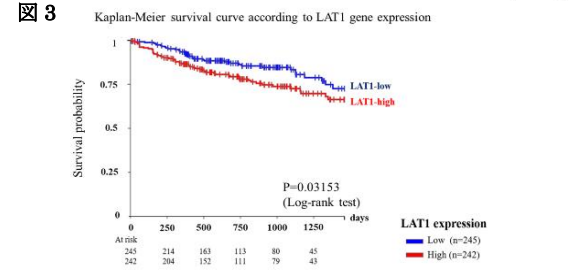
UCSC Xena プラットフォームを用いたデータベース（GTEx および TCGA）解析では、腫瘍組織における LAT1 発現は、正常組織における発現よりも顕著に高く、LAT1 発現は、転移腫瘍、再発腫瘍、原発腫瘍、正常組織の順に高かった（図 1）。癌のタイプ別に LAT1 発現を比較すると、大腸癌では LAT1 発現は中等度程度であった。その後、大腸癌における LAT ファミリーの発現に焦点を当てた追加解析が行われた。腫瘍組織における LAT ファミリー遺伝子発現の特異性を確認するために、正常組織と大腸癌組織における LAT ファミリー遺伝子の発現レベルを解析したところ、正常組織では LAT1 から LAT4 までの発現レベルはほぼ同じであったが、大腸癌組織では LAT1 の発現が LAT2、LAT3、LAT4 よりも明らかに高いことがわかった（図 2）。この結果は、大腸癌組織では LAT2、LAT3、LAT4 の発現ではなく、LAT1 の発現が優位であることを示している。大腸癌の Kaplan-Meier 生存曲線からも、LAT1 発現が高い大腸癌は予後不良であることが示された（ $p < 0.05$ ）（図 3）



LAT family (LAT1, LAT2, LAT3, LAT4) expression in normal tissue and CRC



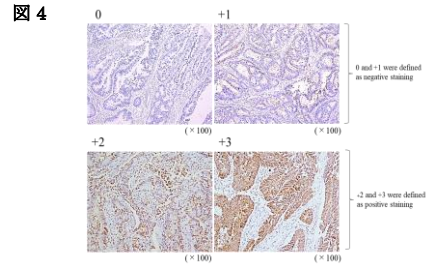
Relationship between LAT1 expression and prognosis in CRC



【結果(2) 大腸癌臨床検体での免疫組織学的検討の結果】

LAT1 発現を、LAT1 染色を 0、1+、2+、3+に分類して評価し、0 と 1+を陰性、2+と 3+を陽性と定義したところ（図 4）、154 例の臨床的大腸癌症例のうち、LAT1 は 68.8%の症例で陽性であった。LAT1 陽性患者と LAT1 陰性患者を比較すると、病期、T 分類、N 分類は LAT1 陽性群で広範囲に高かった。性別、腫瘍部位、組織型、出芽グレード、MSI、KRAS 遺伝子変異、BRAF 遺伝子変異などのその他の臨床病理学的特徴に有意差はなかった（154 例のデータの post hoc power analysis では LAT1 陽性発現と LAT1 陰性発現の統計的検出力が 90%以上（検出力=0.99）であることは確認した）。

Immunostaining of LAT1 in surgically resected human CRC specimens



【結果(3) 大腸癌細胞株での LAT1 発現と *in vitro* で JPH203 が有する増殖抑制効果の検証】

ヒト由来の 9 つの結腸癌細胞株 (DLD1, SW480, HCT116, KM12C, Lovo, HT29, WiDr, Caco2, KM12SM) および Balb/c マウス由来の結腸癌細胞株 (CT26) において、LAT1 の mRNA 発現は HT29 と CT26 で高く (相対発現 17.8 & 22)、SW480 と HCT116 では中程度、DLD1 と Lovo では低かった (相対発現 : 0.3 & 1.5)。MSS 細胞株と MSI 細胞株では、LAT1 の平均発現量に有意差はなかった (図 5)。LAT1 低発現細胞株として DLD1、Lovo、SW480 を、LAT1 高発現細胞株として HCT116、HT29、CT26 を用いて、JPH203 の効果を評価する *in vitro* 実験を行った。各実験は、JPH203 の濃度を 0~20 μ M の範囲で変化させて行った。評価は、がん細胞占有領域をラベリングし、Incucyte Zoom を用いて面積を測定することで行った。その結果、図 6 示すように、JPH203 は濃度依存的に細胞増殖を抑制した。この効果は、LAT1 の発現が一定レベル以上の場合に顕著であった。

LAT1 expression in CRC cell lines

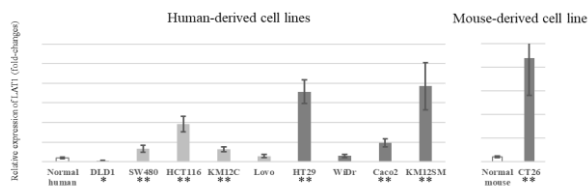


図 5

* LAT1 expression was significantly lower compared to that in normal tissue (Student's t-test, $p < 0.05$)
** LAT1 expression was significantly higher compared to that in normal tissue (Student's t-test, $p < 0.05$)

Inhibitory effect on cell proliferation by LAT1 inhibitor, JPH203

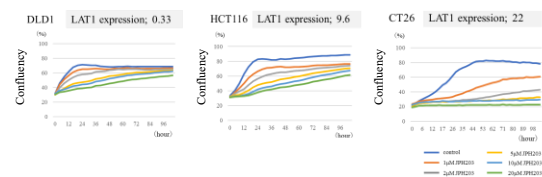


図 6

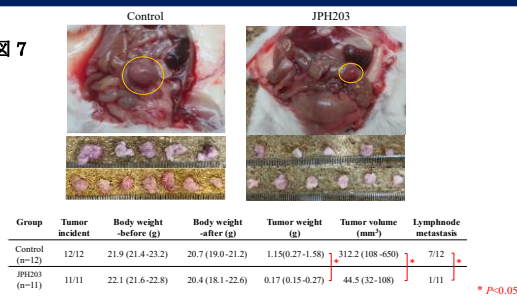
JPH203 was effective for most cell lines except for DLD1 in which LAT1 expression is low.

【結果(4) 間質豊富な同系免疫応答大腸癌同所移植モデルにおける JPH203 投与の効果】

移植 14 日後のサクリフェイス時の代表的な画像と摘出した腫瘍の画像を図 7 に示す。腫瘍のルシフェラーゼ活性を経時的に測定し、対照群と治療群で比較した。ルシフェラーゼ活性は、移植後 14 日目において対照群よりも治療群で顕著に低かった ($p < 0.05$; 図 8)。各群は 12 匹のマウスで構成されていたが、治療群の 1 匹では腫瘍の発生が得られなかった。したがって、対照群では 12 匹、治療群では 11 匹のマウスの腫瘍に関して評価した。JPH203 投与群では、対照群に比べて明らかに腫瘍サイズが縮小した。12 匹の対照群と 11 匹の治療群から得られた結果の要約を示す。治療群では、腫瘍重量、体積、転移の顕著な抑制が観察された (図 7)。

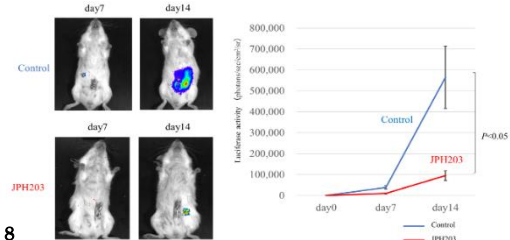
Effect of JPH203 on orthotopic implanted tumor

図 7



Effect of JPH203 on orthotopic implanted tumor

図 8



【結果(5) RNA シーケンスによる網羅的解析による JPH203 の治療効果の検証】

JPH203 投与によるマウス腫瘍の遺伝子発現プロファイルの変化を解析するために、コントロール群と治療群のマウスの回盲部移植腫瘍から RNA を抽出し、RNA シーケンスを用いて解析した。検出された有意な DEG を各サンプルの遺伝子発現レベルに従って統計的にプロットした。JPH203 投与により 163 遺伝子がアップレギュレートし、442 遺伝子がダウンレギュレートした。KEGG pathway 解析の結果をバブルチャートで示す (図 9)。最も変動の大きいパスウェイが同定され、分類された。癌増殖パスウェイやアミノ酸代謝パスウェイが抑制されることは当然ながら、興味深いことに間質関連のパスウェイが大きく抑制されるという結果が得られた。対照的に、非必須アミノ酸経路であるグルタミン代謝は活性化されていた。Cellular Component に関する GO ターム解析においても、細胞外マトリックスに

Bubble chart based on KEGG pathway enrichment analysis

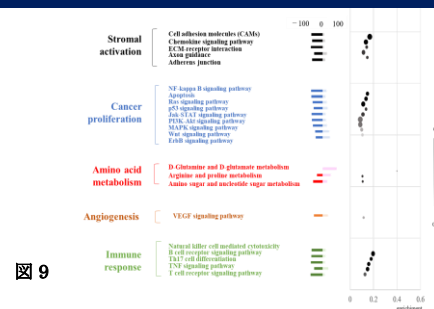


図 9

関連する遺伝子の発現が減少していた。同様に GSEA では、間質応答に関連する遺伝子セットが減少した。増殖関連遺伝子セットも抑制され、以前の報告と一致した。アミノ酸関連遺伝子セットも抑制されたが、間質応答の抑制がより顕著であった。

【結果(6) RNA シークエンスで得られた JPH203 の腫瘍間質抑制作用に関する validation study】

RNA シークエンスの結果に関して、ヒト検体、マウス腫瘍組織、*in vitro* 実験による validation study を行った。

マウス腫瘍での解析に関して Control 群 (SBECD 投与群) の摘出マウス腫瘍の H&E 染色による評価では、腫瘍は infiltrative な浸潤と豊富な間質反応を示した。CT26 と MSC の共移植により、予想通り間質に富む腫瘍が生じた。組織構造は、上皮表現型領域と紡錘形態を呈する間葉表現型の領域の混合成分から構成されていた (図 10)。JPH203 投与群では、腫瘍は間質に乏しく expanding な浸潤パターンを示した。Control 群とは対照的に上皮性表現型を示し、不均一性の乏しい均質な組織構造を示した (図 10)。

また、Control 群では、マウス腫瘍の蛍光二重免疫染色において、代表的な間質マーカーであるビメンチン染色の陽性領域が豊富に認められた。上皮間葉転換 (EMT) を示す E-カドヘリンとビメンチンが共発現する領域が広く観察された。一方、JPH203 投与群では間質反応が乏しく、腫瘍の大部分は E-カドヘリン発現が優位な上皮性表現型であった (図 11)。ビメンチン/DPAI 陽性面積率は JPH203 投与群で治療群より有意に低かった。ビメンチン/E-カドヘリン陽性面積率は JPH203 群で治療群より有意に低かった。

続いて、154 個のヒト大腸癌組織標本で検証のためにビメンチンの免疫染色を行い、間質領域を評価し、図 12 の左パネルに示すように占有面積を定量化した。LAT1 スコアとビメンチン面積 (面積、%) の散布図を図 12 の右パネルに示す。LAT1 スコアは、方法セクションに記載した定義に従って、免疫染色により 0 から 3+まで評価した。LAT1 スコアとビメンチン面積の間に相関が観察され、LAT1 発現スコアが高いほどビメンチン発現が高いことを示した。相関係数は 0.714 であり、強い正の相関が認められた。*in vitro* では、JPH203 は CT26 の増殖だけでなく、癌細胞 (CT26) と MSC を共培養したアッセイにおいて MSC の増殖も阻害した (図 13)。

【まとめ】

本研究では、LAT1 発現と腫瘍進行の関係を明らかにし、大腸癌における LAT1 阻害の抗腫瘍効果と機序を検討することを目的とした。

LAT1 の発現は正常組織よりも大腸組織で高かった。

LAT1 発現は腫瘍の進行とともに増加し、LAT1 発現が豊富な患者は予後不良である。大腸癌検体の免疫染色では、68.8%の症例で LAT1 陽性発現が認められ、腫瘍部位で優位であった。大腸癌細胞株においても、ほとんどの細胞株で LAT1 が正常粘膜と比較して高発現していた。JPH203 は大腸癌細胞株の増殖を効果的に抑制し、マウスモデルで腫瘍の増殖と転移を抑制した。網羅的解析により、LAT1 阻害剤の投与により、増殖経路やアミノ酸代謝経路だけでなく、腫瘍間質関連経路も抑制されることが明らかになった。

大腸癌における LAT1 の発現は、腫瘍の進行に重要な役割を果たしており、LAT1 阻害剤 JPH203 は、増殖経路やアミノ酸代謝だけでなく、腫瘍間質反応も阻害することから、有効な新規治療薬となる可能性がある。

Histological analysis of CT26+MSC mouse cecal orthotopic tumor

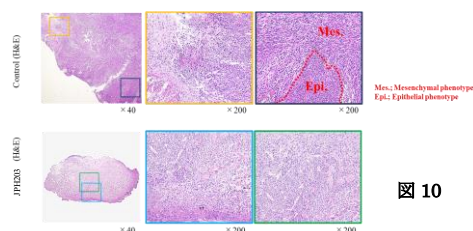


図 10

Double fluorescence staining using tissue obtained from mouse orthotopic colon tumors

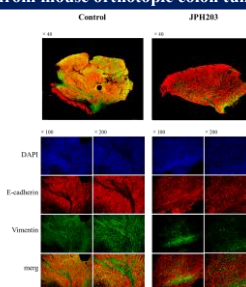


図 11

Relationship between LAT1 expression and vimentin expression in clinical specimens

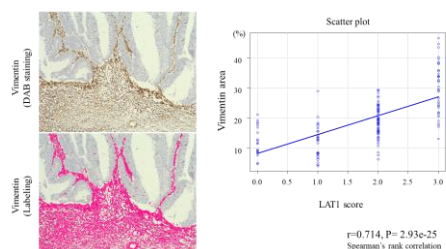


図 12

Inhibitory effect on cell proliferation by LAT1 inhibitor JPH203 in co-culture assay *in vitro*

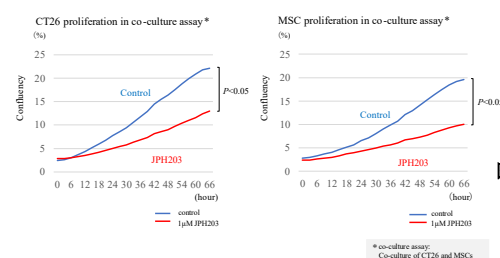


図 13

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Otani Rina, Takigawa Hidehiko, Yuge Ryo, Shimizu Daisuke, Ariyoshi Misa, Miyamoto Ryo, Kadota Hiroki, Hiyama Yuichi, Hayashi Ryohei, Urabe Yuji, Ishikawa Akira, Oue Naohide, Kitadai Yasuhiko, Oka Shiro, Tanaka Shinji	4. 巻 15
2. 論文標題 The Anti-Tumor Effect of the Newly Developed LAT1 Inhibitor JPH203 in Colorectal Carcinoma, According to a Comprehensive Analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1383 ~ 1383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers15051383	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大谷里奈, 瀧川英彦, 弓削 亮, 宮本 亮, 門田紘樹, 北台靖彦, 田中信治
2. 発表標題 大腸癌における新規アミノ酸トランスポーター阻害薬JPH203の抗腫瘍効果に関する検討
3. 学会等名 第31回 日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大谷里奈, 瀧川英彦, 弓削亮, 大西佳菜, 門田紘樹, 北台靖彦, 田中信治
2. 発表標題 大腸癌における新規アミノ酸トランスポーター阻害薬JPH203の有用性に関する報告
3. 学会等名 第30回 日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rina Otani, Hidehiko Takigawa, Misa Ariyoshi, Daisuke Shimizu, Ryo Miyamoto, Yuichi Hiyama, Ryo Yuge, Yuji Urabe, Akira Ishikawa, Yasuhiko Kitadai, Shiro Oka
2. 発表標題 Effects of the newly developed large neutral amino acid transporter1 inhibitor, JPH203 on tumor microenvironment in colorectal cancer
3. 学会等名 The 32st United European Gastroenterology Week (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------