

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860189

研究課題名(和文) アミノ酸シグナルを担うトランスポーター依存性mTOR活性化機構の解明

研究課題名(英文) mTOR signaling mechanisms dependent on amino acid transporter

研究代表者

忠垣 憲次郎 (TADAGAKI, KENJIRO)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30416268

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)：アミノ酸トランスポーターLAT1の阻害薬と網羅的リン酸化プロテオミクスを駆使して、LAT1からmTORに至るシグナル経路を解明し、LAT1を介して引き起こされる細胞応答の全貌を明らかにすること、癌治療の分子指標としてのLAT1の可能性を検討することを目的として研究を行った。その結果、LAT1を介したロイシンの取り込みは、翻訳調節に関連するリン酸化タンパク質を制御するだけでなく、転写、細胞周期調節及び細胞構造など様々な細胞応答を担うタンパク質のリン酸化を誘導することが明らかになった。LAT1阻害薬と既知の抗癌薬の併用が有用である可能性があることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We performed this study to elucidate the signaling mechanisms leading to mTOR via L-type amino acid transporter (LAT1) by means of comprehensive phosphoproteomics and LAT1 inhibitors, revealing the overview of cellular responses mediated by LAT1 and to examine the possibilities of LAT1 as a molecular marker for cancer therapy. We found that the leucine uptake by LAT1 not only controls the phosphorylated proteins related to the translation regulations but induces the protein phosphorylations responsible for various cellular responses such as transcription, cell cycle regulation and cell structures. Our results indicated that co-administration of known anti-cancer agents with LAT1 inhibitors may be useful for cancer therapy.

研究分野：薬理学

キーワード：薬理学 シグナル伝達 アミノ酸トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸は、生体にとって重要な栄養素でありタンパク質生合成など多くの生化学反応の基質として使われている。またシグナル分子としての機能もあり、細胞の多様な代謝応答に関与している。細胞へのアミノ酸の取り込みは、膜タンパク質であるアミノ酸トランスポーターによって担われるが、その1つであるLAT1(L-type amino acid transporter 1)は、ロイシン等の多くの必須アミノ酸を含む大型中性アミノ酸を細胞内に輸送するものである。LAT1は、正常細胞における発現は血液脳関門や胎盤関門などに限られ、その発現レベルは低い、多くの悪性腫瘍細胞で発現が亢進し、腫瘍細胞の成長・増殖に重要な輸送体であると考えられている。実際、肺癌などで、LAT1の高発現群は予後不良となる。さらにその阻害薬には抗腫瘍効果があるため、LAT1は癌治療の新たな分子標的として提唱されている(Int J Cancer 119,484-92, 2006;Cancer Sci 101,173-9,2010)。

LAT1阻害薬の作用機序を理解するためには、LAT1下流のシグナル経路を解明することが必要であるが、現状ではLAT1阻害薬BCH(2-Aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid)によってmTOR(mammalian target of rapamycin)とその下流のp70S6K(p70S6 kinase)及び4E-BP1のリン酸化が抑制されることがわかっているのみであり、全体像は明らかにされていない。mTORは、アミノ酸に対する細胞の代謝応答を媒介するセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞成長や増殖を制御する(Acta Biochim Biophys Sin 43,671-9,2011)。最近の国内外の研究により、mTOR系に関わるシグナル分子が数多く同定されているが、特に上流因子に関しては十分なデータの蓄積がない。mTORは細胞内で2つの異なるタンパク質複合体(mTORC1およびmTORC2)を形成するが、そのうち特にmTORC1がアミノ酸応答を担う。mTORC1は、アミノ酸のうち特にロイシンにより強く活性化される(FEBS Lett 447,303-6,1999)。

mTOR系を活性化するロイシンの細胞への取り込みは細胞にとって重要な機構であると示唆されながら、LAT1を介したロイシンの取り込みで活性化されるシグナル経路は、前述のようにmTOR系のみが検討されただけでその全体像は捉えられておらず、またロイシンからmTORに至るシグナル経路は不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1)アミノ酸トランスポーターLAT1の阻害薬BCHと高感度化網羅的リン酸化プロテオミクスを駆使して、LAT1からmTORに至るシグナル経路を網羅的に解析することで、アミノ酸を感知する分子機構を含むmTOR上流のシグナル系を明らかにすることを目的とし

て行われた。

(2)この研究は、LAT1阻害薬により腫瘍細胞に生じる変化を把握し、LAT1阻害薬の薬効とその作用機序を明示することで、癌治療の分子標的としてのLAT1の意義を検討するものである。

3. 研究の方法

(1)リン酸化プロテオミクス解析

LAT1を介したロイシンの取り込みにより生じるタンパク質リン酸化を、網羅的比較定量リン酸化プロテオミクスにより解析した。

(2)細胞増殖抑制効果の検討

LAT1競合阻害薬であるBCHと既知の抗癌薬4種(ゲムシタビン、5-フルオロウラシル、エルロチニブ、シスプラチン)との存在下でMIA PaCa-2細胞の細胞生存率を測定し、細胞増殖抑制効果及びLAT1阻害薬の相加効果について検討した。

4. 研究成果

(1)リン酸化プロテオミクス解析

LAT1の高発現が確認されているHeLa S3細胞をLAT1阻害薬存在下と非存在下でロイシンで刺激した。LAT1阻害薬としては、データの蓄積のある汎用非選択的阻害薬BCHを用いた。HeLa S3細胞を破碎後、還元・アルキル化し、トリプシンによるペプチド化を行った。ペプチド化したサンプルからIMAC法によりリン酸化ペプチドを選択的に回収し、SDB-StageTipで4分画(Fraction 1-4)した後、LC-MS/MS解析を行った。分析時間は130分間、分析メソッドは100分間の直線グラジエント(5%から40%アセトニトリル)を用いた。サンプルはサンプルループに注入し、分析カラムはC18キャピラリーカラムを使用した。クロマトグラムは保持時間に対する総イオン強度を相対値で表し、シグナル上のラベルは保持時間(上段)とm/z(下段)を表す(図1)。

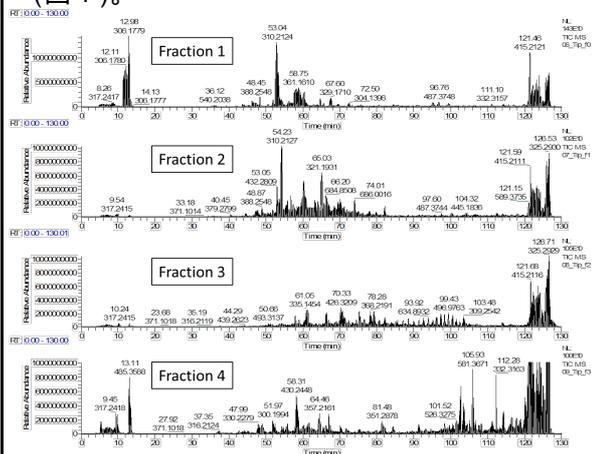


図1. HeLa S3細胞由来のリン酸化ペプチドのイオンクロマトグラム

その結果、HeLa S3 細胞においてロイシンによりリン酸化が促進されたタンパク質を 520 個同定し、そのうち BCH 感受性のタンパク質は 364 個、BCH 非感受性のタンパク質は 156 個であった。BCH 感受性のタンパク質リン酸化は LAT1 を介したロイシンの取り込みにより引き起こされたものであり、この測定系により、LAT1 を介したロイシンの取り込みによって活性化されるシグナル経路を推定できることが示唆された。得られたデータを遺伝子ネットワーク/パスウェイ解析ソフト IPA (Ingenuity 社) を用いて解析した (図 2、3)。

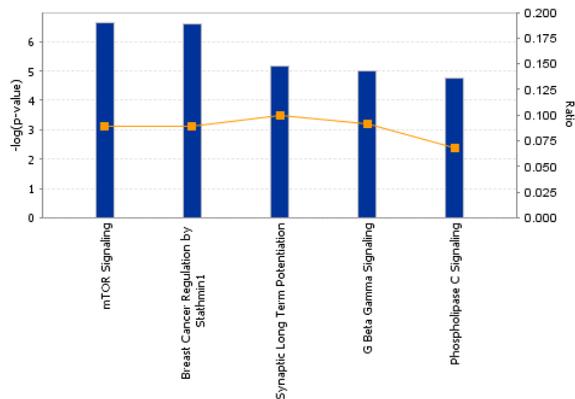


図 2. IPA によるパスウェイ解析の結果 (Top 5)。HeLa S3 細胞においてロイシンによりリン酸化が促進されたタンパク質と関連性が高い 5 つの既知パスウェイを示す。関連性の評価には Fisher's Exact Test を用い、得られた p 値を棒グラフで示した。ロイシンによりリン酸化が促進されたタンパク質数が既知パスウェイに含まれる割合 (Ratio) を折れ線グラフで示す。

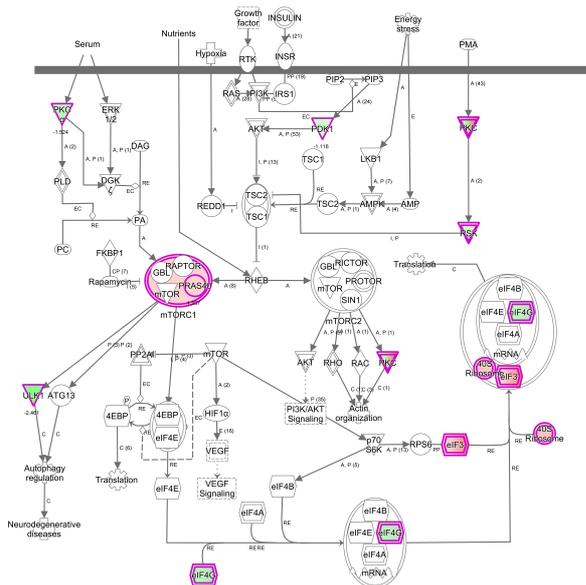


図 3. IPA 解析によって得られた関連性の高い既知のパスウェイ (mTOR Signaling)。パスウェイ中の色はロイシンによりリン酸化が促進されたタンパク質に由来する遺伝子を示し、赤色は BCH によってリン酸化が促進

されたもの、緑色はリン酸化が抑制されたものを示す。

その結果、LAT1 を介したロイシンの取り込みは、翻訳プロセスに関連するリン酸化タンパク質を制御するだけでなく、転写、細胞周期調節及び細胞構造など様々な細胞応答を担うタンパク質のリン酸化を誘導することが明らかになった。(図 3)

(2) 細胞増殖抑制効果の検討

癌治療の分子指標としての LAT1 の可能性を検討するため、LAT1 競合阻害薬である BCH と既知の抗癌薬 4 種 (ゲムシタピン、5-フルオロウラシル、エルロチニブ、シスプラチン) との存在下で MIA PaCa-2 細胞の細胞生存率を測定した。ここで BCH は 0mM、5mM、10mM、ゲムシタピンは 0nM、5nM、10nM、5-フルオロウラシルは 0µM、1µM、2µM、エルロチニブは 0µM、2.5µM、5µM、シスプラチンは 0µg/ml、0.25µg/ml、0.5µg/ml で使用した。その結果、細胞生存率は BCH と既知の抗癌薬 4 種で濃度依存的に低くなった。また BCH 及び既知の抗癌薬単独と比較し、BCH とそれぞれ既知の抗癌薬との併用の方が低かった。さらに、一定濃度の既知の抗癌薬に対して BCH 濃度依存的に MIA PaCa-2 細胞の細胞生存率は低くなり、LAT1 阻害薬による相加効果が認められた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

1) Ling Wei、富永 英之、Pattama Wiriyasermkul、大垣 隆一、忠垣 憲次郎、永森 収志、金井 好克。

3- Fluoro- L- - methyltyrosine (FAMT), a positron emission tomography probe for cancer diagnosis, is a selective substrate of cancer- specific amino acid transporter L- type amino acid transporter 1 (LAT1). 第 123 回日本薬理学会近畿部会. 2013 年 7 月 12 日、ウインクあいち (名古屋市)

2) Printip Wongthai, Kohei Hagiwara, Yurika Miyoshi, Pattama Wiriyasermkul, Ryuichi Ohgaki, Kenjiro Tadagaki, Kenji Hamase, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai.

Transport of 4- borono- L- phenylalanine, a ¹⁰B carrier of boron neutron capture therapy, by system L amino acid transporters.

第 124 回日本薬理学会近畿部会. 2013 年 11 月 1 日、京都ガーデンパレス (京都市)

3)Printip Wongthai, Kohei Hagiwara, Yurika Miyoshi, Pattama Wiriyasermkul, Pornparn Kongpracha, Isozumi Noriyoshi1, Ryuichi Ohgaki, Kenjiro Tadagaki, Kenji Hamase, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai.

Transport mechanisms of 4 - borono - phenylalanine as a ¹⁰B carrier of boron neutron capture therapy for cancers.

第81回日本薬理学会年会. 2014年3月19日、東北大学(仙台市)

4)Pornparn Kongprach, Pattama Wiriyasermkul, Noriyoshi Isozumi, Printip Wongthai, Suguru Okuda, Kenjiro Tadagaki, Ryuichi Ohgaki, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai.

Study of a cellular signaling network stimulated with leucine transported by a cancer-type amino acid transporter LAT1. The 61th Japanese Biochemical Society Kinki Branch. 2014年5月17日、京都産業大学(京都市)

5)Printip Wongthai, Kohei Hagiwara, Yurika Miyoshi, Pattama Wiriyasermkul, Pornparn Kongpracha, Noriyoshi Isozumi, Ryuichi Ohgaki, Kenjiro Tadagaki, Kenji Hamase, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai.

Transport mechanisms of 4 - borono - phenylalanine as a ¹⁰B carrier of boron neutron capture therapy for cancers.

The 61th Japanese Biochemical Society Kinki Branch. 2014年5月17日、京都産業大学(京都市)

6)Pornparn Kongprach, Pattama Wiriyasermkul, Noriyoshi Isozumi, Printip Wongthai, Suguru Okuda, Kenjiro Tadagaki, Ryuichi Ohgaki, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai.

Inhibition of cancer-type amino acid transporter LAT1 affects multiple cellular events in pancreatic cancer cells.

The 126th Meeting of Japanese Pharmacological Society Kinki Branch.

2014年10月24日、和歌山県JAビル(和歌山市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

忠垣 憲次郎(TADAGAKI KENJIRO)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・

助教

研究者番号: 30416268