

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) がんのアミノ酸代謝特性を標的にした治療法の開発
(英語) Development of cancer therapeutics targeting amino acid metabolism
- 研究開発担当者
所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理学
教授 金井 好克
(英語) Osaka University Graduate School of Medicine,
Department of Bio-system Pharmacology
Professor Yoshikatsu Kanai
- 実施期間： 平成 28 年 9 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究
開発課題名： (日本語) がんのアミノ酸代謝特性を標的にした抗がん薬の作用機序解析
(英語) Analysis of the mechanisms of action of anti-tumor agents targeting
amino acid metabolism
- 研究開発代表者
所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理学
教授 金井 好克
(英語) Osaka University Graduate School of Medicine,
Department of Bio-system Pharmacology
Professor Yoshikatsu Kanai
- 分担研究
開発課題名： (日本語) LAT1 非競合阻害薬の作用のプロテオミクスによる検討
(英語) Analysis of the mechanisms of action of LAT1 non-competitive inhibitor
by means of proteomics
- 研究開発分担者
所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理学
准教授 永森 収志

(英 語) Osaka University Graduate School of Medicine,
Department of Bio-system Pharmacology
Associate Professor Shushi Nagamori

分担研究 (日本語) 発がんモデルマウスを用いた LAT1 阻害による抗腫瘍効果の解析
開発課題名: (英 語) Analysis of the anti-tumor effects of LAT1 inhibition using
carcinogenic model mice

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科
所属 役職 氏名: 助教 疋田 隼人
(英 語) Osaka University Graduate School of Medicine,
Department of Gastroenterology and Hepatology
Assistant Professor Hayato Hikita

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

新たに創製したがん細胞型アミノ酸トランスポーターLAT1 (L-type amino acid transporter 1) を非競合的に阻害する化合物の抗腫瘍作用の機序を明らかにすることを目的とし、腫瘍細胞増殖抑制効果、血管新生抑制効果、転移抑制効果、他の抗がん薬との併用効果、発がんモデルマウスを用いた抗腫瘍効果の解析を実施した。マイルストーンに従い、腫瘍細胞増殖抑制効果の検討のため、当該化合物により生じる変化をリン酸化プロテオミクスで網羅的に解析し、mTOR 系をはじめとする複数のシグナル経路が影響を受けることを明らかにした。LAT1 抑制による血管新生抑制効果の *in vitro* での検討においては、ヒト血管内皮モデルである HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) を用いて、当該化合物および LAT1 ノックダウンにより、チューブ形成と HUVEC の遊走能、浸潤能が抑制されることを明らかにした。さらに、血管新生増殖因子の刺激により LAT1 の発現が誘導されることを明らかにし、リン酸化プロテオミクスの結果から血管新生抑制の機序に関わる候補分子を得た。加えて、ヌードマウスに形成させたヒト腫瘍細胞株ゼノグラフトにおいて、腫瘍内血管に LAT1 が発現することを確認した。転移抑制効果の機序の解析においては、*in vitro* の解析を行い、wound healing assay およびボイデンチャンバーを用いた Migration assay により、LAT1 抑制によって腫瘍細胞株の遊走能、浸潤能が抑制されることを明らかにした。他の抗がん薬との併用効果の検討においては、今年度は *in vitro* の検討を行い、膵がん細胞株において、当該化合物とゲムシタビン併用により細胞増殖抑制作用の相乗効果が得られること、胃がん細胞株および大腸がん細胞株において、当該化合物と、5-フルオロウラシル、オキサリプラチンとの併用により細胞増殖抑制作用の相乗効果が得られることを明らかにした。発がんモデルマウスを用いた抗腫瘍効果の解析においては、膵がん発生モデルマウスを用い、当該化合物により、平均腫瘍個数、最大腫瘍径が減少し、かつ延命効果が得られることを示す結果を得た。

英文

In order to reveal the mechanisms of action of a newly developed non-competitive inhibitor targeting a cancer-type amino acid transporter LAT1 (L-type amino acid transporter 1), we have examined its effects on the tumor cell growth, tumor angiogenesis, and metastasis. We have also examined additive and synergic effects of the LAT1 inhibitor with other anti-tumor agents. Additionally, we have examined its anti-tumor effects by means of carcinogenic model mice. Following the development milestones, to examine the mechanisms of tumor-cell growth suppression, we have performed comprehensive phospho-proteomic analysis on the tumor cells treated with the LAT1 inhibitor and found that not only mTOR pathway but also other signaling pathways are affected by the LAT1 inhibitor. In the analysis of anti-angiogenic effects of LAT1 inhibition *in vitro*, we have used HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) as a model of human vascular endothelial cells and revealed that the LAT1 inhibitor as well as LAT1-knockdown suppresses the tube formation, migration potency and invasion ability of HUVEC. Furthermore, we have shown that the treatment of HUVEC with angiogenic growth factors induces the mRNA expression of LAT1. By means of comprehensive phospho-proteomic analysis, we have also obtained candidate molecules involved in the anti-angiogenic action of LAT1 inhibitor. In addition, we have examined the Xenograft tumors formed in nude mice and confirmed that the endothelial cells of vessels in the tumors express LAT1. In the analysis of the effects on metastasis, we have performed *in vitro* studies such as wound-healing assay and Boyden chamber migration assay, and revealed that LAT1 inhibition suppresses migration potency and invasion ability of tumor cells. We have also examined whether additive or synergic effects are obtained by co-treatment of tumor cells with the LAT1 inhibitor and other anti-tumor agents. In *in vitro* studies, we have shown that the combination of the LAT1 inhibitor and gemcitabine exhibits synergic effects on the growth of a pancreatic cancer cell line. The combination of LAT1 inhibitor and 5-fluorouracil or oxaliplatin also exerted synergic growth inhibitory effects when applied to gastric cancer and colon cancer cell lines. Furthermore, in the analysis of anti-tumor action of the LAT1 inhibitor on carcinogenic model mice, we have used a pancreatic cancer mouse model and shown that the oral administration of the LAT1 inhibitor reduces the number and the size of tumors and prolongs the survival of the mice.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 10 件）

1. Tanaka S, Hikita H, Tatsumi T, Sakamori R, Nozaki Y, Sakane S, Shiode Y, Nakabori T, Saito Y, Hiramatsu N, Tabata K, Kawabata T, Hamasaki M, Eguchi H, Nagano H, Yoshimori T, Takehara T. Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2016, 64, 1994-2014.
2. Hayashi Y, Tsujii M, Kodama T, Akasaka T, Kondo J, Hikita H, Inoue T, Tsujii Y, Maekawa A, Yoshii S, Shinzaki S, Watabe K, Tomita Y, Inoue M, Tatsumi T, Iijima H, Takehara T. p53 functional deficiency in human colon cancer cells promotes fibroblast-mediated angiogenesis and tumor growth. *Carcinogenesis*. 2016, 37, 972-984.
3. Watabe T, Ikeda H, Nagamori S, Wiriyasermkul P, Tanaka Y, Naka S, Kanai Y, Hagiwara K, Aoki M, Shimosegawa E, Kanai Y, Hatazawa J. ^{18}F -FBPA as a tumor-specific probe of L-type amino acid transporter 1 (LAT1): a comparison study with ^{18}F -FDG and ^{11}C -Methionine PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2017, 44, 321-31.
4. Ohshima Y, Kaira K, Yamaguchi A, Oriuchi N, Tominaga H, Nagamori S, Kanai Y, Yokobori T, Miyazaki T, Asao T, Tsushima Y, Kuwano H, Ishioka NS. Efficacy of system l amino acid transporter 1 inhibition as a therapeutic target in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2016, 107, 1499-505.
5. Tarlungeanu DC, Deliu E, Dotter CP, Kara M, Janiesch PC, Scalise M, Galluccio M, Tesulov M, Morelli E, Sonmez FM, Bilguvar K, Ohgaki R, Kanai Y, Johansen A, Esharif S, Ben-Omran T, Topcu M, Schlessinger A, Indiveri C, Duncan KE, Caglayan AO, Gunel M, Gleeson JG, Novarino G. Impaired amino acid transport at the blood brain barrier is a cause of autism spectrum disorder. *Cell*. 2016, 167, 1481-1494.
6. Satoh T, Kaira K, Takahashi K, Takahashi N, Kanai Y, Asao T, Horiguchi J, Oyama T. Prognostic significance of the expression of CD98 (4F2hc) in gastric cancer. *Anticancer Res*. 2017, 37, 631-6.
7. Kongpracha P, Nagamori S, Wiriyasermkul P, Tanaka Y, Kaneda K, Okuda S, Ohgaki R, Kanai Y. Structure-activity relationship of a novel series of inhibitors for cancer type transporter L-type amino acid transporter 1 (LAT1). *J Pharmacol Sci*. 2017, 133, 96-102.
8. Ohgaki R, Ohmori T, Hara S, Nakagomi S, Kanai-Azuma M, Kaneda-Nakashima K, Okuda S, Nagamori S, Kanai Y. Essential roles of L-type amino acid transporter 1 in syncytiotrophoblast development by presenting fusogenic 4F2hc. *Mol Cell Biol*. 2017, 37, e00427-16.
9. Kume E, Mutou T, Kansaku N, Takahashi H, Wempe MF, Ikegami M, Kanai Y, Endou H, Wakui S. Ultrastructural immunohistochemical study of L-type amino acid transporter 1-4F2 heavy chain in tumor microvasculatures of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) induced rat bladder carcinoma. *Microscopy (Oxf)*. 2017, 24, 1-6.
10. Ohshima K, Nojima S, Tahara S, Kurashige M, Hori Y, Hagiwara K, Okuzaki D, Oki S, Wada N, Ikeda JI, Kanai Y, Morii E. Argininosuccinate synthase 1-deficiency enhances the

cell sensitivity to arginine through decreased DEPTOR expression in endometrial cancer. Sci. Rep. 2017, 7, 45504.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. がん細胞アミノ酸トランスポーターを標的としたがんの検出と細胞活性制御. 口頭, 金井 好克, 日本農芸化学会平成 28 年度関西支部大会シンポジウム「アミノ酸研究の最前線」, 2016/9/16, 国内.
2. アミノ酸トランスポーターを標的とした創薬研究. 口頭, 永森 收志, 第一回名古屋大学医薬系 3 部局交流シンポジウム, 2016/11/7, 国内.
3. アミノ酸トランスポーターLAT1 による基質認識と mTORC1 シグナル活性化に必要なロイシンの構造部位の決定. 口頭, 奥田 傑, Pattama Wiriyasermkul, 大垣 隆一, 永森 收志, 金井 好克, 第 130 回 日本薬理学会近畿部会, 2016/11/16, 国内.
4. アミノ酸トランスポーターLAT1 阻害によるがん転移抑制効果の検討. 口頭, 兼田 加珠子, 魏玲, Pornparn Kongpracha, 大垣 隆一, 永森 收志, 金井 好克, 第 130 回 日本薬理学会近畿部会, 2016/11/16, 国内.
5. アミノ酸トランスポーターLAT1 は胎盤合体性栄養膜の形成に必須である: 膜融合関連因子 4F2hc の細胞膜提示による細胞融合への寄与. ポスター, 大垣 隆一, 大森 崇弘, 原 早織, 中込 咲綾, 金井 正美, 兼田 加珠子, 奥田 傑, 永森 收志, 金井 好克, 第 39 回 日本分子生物学会年会, 2016/12/1, 国内.
6. がん細胞型アミノ酸トランスポーターを標的とした新規作用機序の抗悪性腫瘍薬と汎用性の高いがん特異的 PET プローブの開発. 口頭, 金井 好克, 平成 28 年度創薬シーズ事業化コンペティション, 2017/2/13, 国内.
7. Pharmacology to innovative drug development: cancer therapeutics and diagnosis targeting amino acid transporters. 口頭, 金井 好克, Campus Asia International Symposium (II), 2017/2/16, 国内.
8. Amino acid transporter LAT1 as a novel molecular target for cancer diagnosis and therapeutics. 口頭, 金井 好克, AMED-ALBERTA Workshop For Medical Innovation, 2017/2/24, 国外.
9. アミノ酸トランスポーターLAT1 によるロイシン誘導体の認識と mTORC1 シグナル活性化の関係. ポスター, 奥田 傑, Pattama Wiriyasermkul, 大垣 隆一, 永森 收志, 金井 好克, 第 90 回 日本薬理学会年会. 2017/3/15, 国内.
10. 有機アニオントランスポーターOAT1 に対する芳香族アミノ酸誘導体の構造活性相関: イメージングプローブの腎臓におけるバックグラウンド集積を誘起する分子内構造の同定. 口頭, 魏玲, 大垣 隆一, 富永 英之, 兼田 加珠子, 奥田 傑, 永森 收志, 金井 好克, 第 90 回 日本薬理学会年会. 2017/3/15, 国内.
11. 腫瘍細胞型アミノ酸トランスポーターリガンドの構造活性相関から見えてくる創薬標的としての意義. 口頭, 金井 好克, 第 90 回日本薬理学会年会シンポジウム「トランスポーターの分子同定から展開する創薬研究」, 2017/3/16, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし。

(4) 特許出願
該当なし。