

氏 名	梶 木 辰 子
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第710号
学位授与の日付	平成30年3月6日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (産科婦人科学)
学位論文題目	Physiological role of L-type amino acid transporter 1 in two lines of cultured choriocarcinoma cells, JAR and JEG-3 (2種の絨毛癌培養細胞株JAR細胞とJEG-3細胞におけるL型アミノ酸トランスポーター1の生理的役割の検討)
論文審査委員	(主査) 教授 千 田 雅 之 (副査) 教授 川 又 均 教授 杉 本 博 之

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

癌細胞などの細胞増殖が盛んな細胞では、必要な栄養の取り込みが増加するため、癌細胞において多くの栄養素トランスポーターの発現が亢進する。System Lはナトリウム非依存性のアミノ酸輸送体として主要な輸送体である。System Lは、4つのisoformを持ち、LAT1,2,3,4がある。絨毛癌培養細胞株でLAT1が発現していることが報告されている。しかしながら、絨毛癌におけるLAT1の役割は、十分に解明されていない。

【目 的】

本研究では、絨毛癌におけるLAT1の役割を検討する前段階の実験として、絨毛癌培養細胞株であるJAR細胞とJEG-3細胞におけるLAT1の役割を検討した。

【対象と方法】

JAR, JEG-3細胞のアミノ酸トランスポーターのmRNAの同定はreverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて調べた。LAT1タンパク質の発現は抗LAT1抗体を用いたウエスタンブロット法により調べた。

JAR, JEG-3細胞を、それぞれ10%FBSを含むRPMI1640とMEM培地を用いてpoly L-lysineでコートされた24ウェルプレートで37°C、5%CO₂環境下で培養した。培地を取り除いた後でHank's balanced salt solution (HBSS) で2回洗浄し、同じ溶液にて37°Cで10分培養した後、1 μM [¹⁴C]-ロイシン (Moravek, CA) 加HBSSを添加して、1分、2分、5分、10分、30分間インキュベーション

ンを行った。続いて冷たいHBSSで3回洗浄した後、細胞を0.1NのNaOHで可溶化し液体シンチレーションスペクトロメーターにより放射能を測定し、細胞溶解液中の放射能を測定した。

JPH203によるロイシン取り込み実験阻害の実験では、NaフリーHBSSを用い、 $1\ \mu\text{M}$ [^{14}C]-ロイシン溶液にJPH203 (0.001, 0.01, 0.1, 1, $10\ \mu\text{M}$) を添加して、1分間でのロイシン取り込みを検討した。コントロールには、0.1%DMSO/1%EtOHを添加した。

JPH203による増殖抑制効果を評価する為に、細胞数測定による継時的な細胞増殖評価を行った。またJPH203添加後の細胞活性を評価する為に、Alamar Blue (Bio-Rad Laboratories, CA) を用いた蛍光法で細胞活性を測定した。

定量的RT-PCRの解析は、JARの発現に対し、Student T検定を行った。細胞増殖試験と細胞活性測定結果の統計解析はSPSSソフトウェアを使用し、多群解析をanalysis of variance (ANOVA) による分散分析で評価し、それぞれの群間比較はBonferroni法を用いて検定した。データは平均値 \pm 標準誤差で表示した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結 果】

mRNAとタンパク質発現の検討からJAR細胞とJEG-3細胞共にLAT1を発現していることが確認できた。2細胞でLATsの基質であるロイシンの取り込みを検討した所、Na非依存的なロイシン輸送が確認できた。さらに、ロイシン輸送がLAT1を介するものなのか検討する為に、LAT1特異的な阻害剤であるJPH203を負荷してロイシン取り込み実験を実施した所、明らかな輸送阻害が見られた。LAT1によるアミノ酸輸送の阻害によりJAR細胞とJEG-3細胞において細胞増殖抑制効果が見られるか検討する為に、JPH203添加後の細胞数を測定した。JEG-3細胞では、投与4日の時点でJPH203の濃度依存的に細胞増殖の抑制が見られたが、JAR細胞の低濃度のJPH203添加群では細胞増殖抑制効果は見られなかった。高濃度JPH203添加群では細胞増殖の抑制が見られた。さらに、JPH203添加後の細胞活性を検討した所、JAR細胞では低濃度JPH203添加群の細胞活性が増加した。一方、JEG-3細胞では、JPH203の濃度依存的に細胞活性の低下が見られた。

【考 察】

多くの腫瘍細胞でJPH203負荷により増殖が抑制され、例えば、ヒト腸管癌培養細胞株 (HT-29) では、 $100\ \mu\text{M}$ JPH203投与4日後にコントロールに比して1割程度まで細胞数が減少し、ヒト口腔癌培養細胞株 (YD-38) では4割の細胞数まで減少することが報告されている。しかしながら、本実験の細胞増殖阻害実験ではJAR細胞とJEG-3細胞共にJPH203投与後4日の時点で $100\ \mu\text{M}$ 添加群でもコントロールの半数以上の細胞が生存しており、ヒト腸管癌培養細胞株 (HT-29) やヒト口腔癌培養細胞株 (YD-38) などで見られた強力なJPH203の増殖抑制効果は見られなかった。顕著な増殖抑制が見られる培養細胞株と絨毛癌培養細胞株ではLAT1の細胞増殖に対する役割が異なる可能性も考えられる。

ロイシン取り込み実験で算出されたJPH203の IC_{50} 値はJAR細胞とJEG-3細胞ではほぼ同じだが、JEG-3細胞ではJPH203濃度依存的に細胞増殖抑制効果が見られた。一方、JAR細胞では高濃度JPH203添加群でのみ細胞数の減少が見られた。JAR細胞の細胞増殖能はJEG-3細胞より高く、細胞増殖に必要な

アミノ酸量はJAR細胞の方が多いたことが想像されるが、細胞内に取り込まれるアミノ酸量はJEG-3細胞の方が多いたことから、JAR細胞とJEG-3細胞においてアミノ酸に対する要求性が異なることが示唆される。JEG-3細胞のLAT2の発現がJAR細胞に比べ高いことも、JEG-3細胞のアミノ酸要求性が高いことを支持する。

【結 論】

本研究から、2種類の異なる絨毛癌培養細胞株でLAT1によるアミノ酸輸送が行われていることが見出され、さらにLAT1のアミノ酸輸送阻害による細胞増殖抑制と細胞活性変化に2細胞間で異なる応答を示した。これらのことから、絨毛癌におけるLAT1のアミノ酸輸送が複雑かつ、様々な役割を持つことが明らかとなった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

癌細胞などの細胞増殖が盛んな細胞では、必要な栄養の取り込みが増加するため、癌細胞において多くの栄養素トランスポーターの発現が亢進する。System Lはナトリウム非依存性のアミノ酸輸送体として主要な輸送体である。System Lは、4つのisoformを持ちL-type amino acid transporter (LAT) LAT1, 2, 3, 4がある。LAT1とLAT2は、細胞膜上でアミノ酸輸送を行うに当たり4F2hc (CD98) とヘテロダイマーを形成し、アミノ酸輸送を行う。一方、LAT3とLAT4は単独でアミノ酸輸送を行うことが出来るが、輸送能はLAT1及びLAT2の方が高い。JPH203 (KYT0353) は、LAT1によるアミノ酸輸送を選択的に阻害するチロシアナログである。LAT1特異的な阻害剤は*in vitro*と*in vivo*の両方において、ヒト腸管細胞をはじめさまざまな癌細胞培養細胞株に対し強力な増殖抑制効果を示すことが報告されている。また絨毛癌培養細胞株はLAT1が発現していることが報告されている。しかしながら、絨毛癌におけるLAT1の役割は、十分に解明されていない。申請論文では、絨毛癌におけるLAT1の役割を検討する前段階の実験として、絨毛癌培養細胞株であるJAR細胞とJEG-3細胞におけるLAT1の役割を検討した。

申請者はJAR細胞とJEG-3細胞がLAT1を発現しているかどうかをmRNAとタンパク質発現より検討したところ、両細胞ともにLAT1を発現していることを同定した。2種細胞でLATsの基質であるロイシンの取り込みを検討したところ、Na非依存的なロイシン輸送を確認した。さらに、ロイシン輸送がLAT1を介するかどうかを検討する為に、LAT1特異的な阻害剤であるJPH203を負荷してロイシン取り込み実験を実施したところ、明らかな輸送阻害が見られた。また、LAT1によるアミノ酸輸送の阻害によりJAR細胞とJEG-3細胞において細胞増殖抑制効果が見られるかどうかを検討する為にJPH203添加後の細胞数を測定した。JEG-3細胞では、投与4日の時点でJPH203の濃度依存的に細胞増殖の抑制が見られたが、JAR細胞の低濃度のJPH203添加群では細胞増殖抑制効果は見られなかったが、高濃度JPH203添加群では細胞増殖の抑制が見られた。さらに、JPH203添加後の細胞活性を検討したところ、JAR細胞では低濃度JPH203添加群の細胞活性が増加した。一方、JEG-3細胞では、JPH203の濃度依存的に細胞活性の低下が見られた。以上より2種類の異なる絨毛癌培養細胞株で

LAT1によるアミノ酸輸送が行われていることが見出され、さらにLAT1のアミノ酸輸送阻害による細胞増殖抑制と細胞活性変化に2細胞間で異なる応答を示す結果となった。以上のことから、絨毛癌の細胞増殖においてLAT1によるアミノ酸輸送が重要な役割を持つことが明らかとなった。

【研究方法の妥当性】

申請論文ではトランスポーターの標準的な実験方法であるreverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) や定量的RT-PCRでトランスポーターを同定。また¹⁴C標識ロイシンを用いて核種の放射エネルギーを4～5回測定し得られたデータを客観的な統計解析を用いて解析している。また、LAT1の特異的阻害剤であるJPH203を用いロイシンの取り込み阻害を確認しており本研究方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

既存の研究でヒト絨毛癌細胞株のひとつであるBeWo細胞におけるLAT1のアミノ酸輸送、その古典的抑制薬BCH (2-aminobicyclo- (2,2,1) -heptane-2-carboxylic acid)、新規LAT1特異的阻害薬JPH203の輸送活性阻害作用により腫瘍細胞増殖が抑えられることがわかっている。しかし、本研究では他のヒト絨毛癌細胞株であるJAR細胞、JEG-3細胞の2種細胞を用いLAT1の発現やJPH203による細胞増殖抑制効果などを確認していることから、新奇性・独創性のある研究報告である。

【結論の妥当性】

申請論文では適切な実験手順を用いており、導かれた結果から新規の知見となり、既存の研究も踏まえて結論として妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文はヒト絨毛癌細胞株のJAR細胞、JEG-3細胞においてLATsの発現があることとLAT1の特異的阻害剤であるJPH203によりアミノ酸輸送が阻害されることを証明した。これは、絨毛癌における化学療法抵抗性などの治療抵抗性症例において、JPH203がアミノ酸輸送阻害により癌細胞増殖抑制効果を見出す可能性があることを支持する結果となり、今後の前臨床試験への展開が期待される。

【申請者の研究能力】

申請者は産科婦人科学と薬理学の理論を学び実践したうえで作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し貴重な知見を得ている。この研究結果は本学の医学雑誌に掲載予定であり、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Dokkyo Journal of Medical Sciences

45 : 17-26, 2018