

【要約】

JPH203, a newly developed anti-cancer drug, shows a preincubation inhibitory effect on L-type amino acid transporter 1 function

(新規抗がん剤の JPH203 は L 型アミノ酸トランスポーター1 に対して前曝露阻害効果を示す)

千葉大学大学院医学薬学府
先端医学薬学専攻
(主任: 下条 直樹教授)
奥主 健太郎

【背景】

哺乳類のアミノ酸輸送システムは、多種類のトランスポーターから構成され、その輸送基質選択性と Na⁺依存性により種々の輸送系に分類されている。L 型アミノ酸トランスポーター 1 (L-type amino acid transporter 1, LAT1) は、ロイシンを含む多くの必須アミノ酸を基質とし、それらの細胞内取り込みを担っている。LAT1 の発現は正常組織では限定的で、一部の癌細胞においては著しく発現していることが示されており、腫瘍の悪性度との関連も報告されている。必須アミノ酸はタンパク質合成の基質であると同時に、細胞増殖のシグナル分子としても機能しており、癌細胞にとりこまれたロイシンは哺乳類ラパマイシン標的タンパク質複合体 1 (mTORC1) を介して細胞の増殖、浸潤を促進することが報告されている。このため新たながん分子標的薬として LAT1 選択的阻害剤開発が進められており、その代表例である JPH203 はロイシンなどの基質と競合的に LAT1 を阻害することが示されている。この JPH203 は複数の癌細胞株、また担癌動物で抗増殖効果を発揮することが報告されたため、担癌患者を対象とした臨床試験による有効性、及び忍容性も近年になり報告された。このように JPH203 は LAT1 を標的とする新たな抗がん剤として大きな可能性を秘めている一方、JPH203 が LAT1 機能を阻害するメカニズムはまだ完全には解明されていない。

近年、薬物トランスポーター阻害メカニズムに関して、一時的な薬物曝露にもかかわらず、トランスポーター阻害効果が残存するという前曝露阻害効果が報告され注目を集めている。基質と阻害薬を同時に投与して効果を判定する従来の方法(共曝露)にこの前曝露を併用することで、2つの阻害効果が協調して機能することも示されている。

我々は JPH203 も LAT1 に対して前曝露阻害効果を発揮しうると考え LAT1 が過剰発現しているヒト大腸がん細胞を用いて実験を行った。

【目的】

JPH203 の LAT1 に対する前曝露阻害効果を明らかにする。

【方法】

<細胞培養>

LAT1 陽性ヒト大腸がん細胞 (HT-29) を Poly-D-Lysine でコートされた 24well plate に 1.0×10^5 個/well で播種し、10%FBS を混合したマッコイ 5A 培養液 (以下 medium) で 37°C CO₂ 5% 下で 48 時間培養した。

<共曝露阻害効果>

上記細胞の培地に 500 μM 非放射性標識ロイシンまたは 10 μM JPH203 とともに 1 μM ¹⁴C ロイシンを加え 1 分間曝露させた。曝露後、1 mM cold ロイシンを含む Na⁺フリー-HBSS にて 3 回洗浄し、0.1M NaOH で細胞を融解させ全量をシンチレーションカウンターにて計測した。

<前曝露阻害効果>

細胞を 500 μM 非放射性標識ロイシン、10 μM JPH203、溶媒であるジメチルスルホキシド (以下 DMSO) の入った medium、または通常の medium

に交換し、一定時間経過後 Na^+ 非含有のハンクス液(以下 Na^+ フリー-HBSS)で2回洗浄した後、 $1 \mu\text{M}$ の ^{14}C ロイシンを1分間曝露させた。曝露後、 1 mM cold ロイシンを含む Na^+ フリー-HBSS にて3回洗浄し、 0.1 M NaOHで細胞を融解させ全量をシンチレーションカウンターにて計測した。

<共曝露と前曝露の協調効果>

前述と同様に細胞を播種し、2時間多段階濃度の JPH203 または DMSO で培養後、同濃度の JPH203 を含む基質を使用して同様にロイシン取り込みアッセイを行った。

<定量的リアルタイム PCR>

JPH203 曝露の有無による HT-29 細胞の LAT1 mRNA 発現レベル変化を、 β アクトチンを内部標準として用い $\Delta \Delta \text{Ct}$ 法で計算した。

<ウエスタンブロット分析>

HT-29 細胞から抽出されたタンパク質を Laemmli バッファーに溶解し、ゲル電気泳動を行った。次にタンパク質をニトロセルロース膜上に泳動により転写し、その膜を5%脱脂粉乳で飽和させた。この膜を一次抗体(抗 LAT1 または抗 β アクトチン)と一晩インキュベートしその後、HRP 結合二次抗体と反応させた。

<トランスフェクションと発現解析>

HT-29 細胞をトランスフェクションの1日前に 35mm dish に播種し、pEGFP/LAT1 発現ベクターを用いてリポフェクタミン 3000 を含む無血清培地にトランスフェクトした。48時間後、細胞を4',6-ジアミン-2-フェニルインドール二塩酸塩 (DAPI) で染色し EGFP/LAT1 の発現を FV10i 蛍光顕微鏡で評価した。

【結果】

HT-29 細胞によるロイシン ($1 \mu\text{M}$) 取り込み活性は約1時間で観察され、 $800 \text{ pmol/min/mgprotein}$ 程度であった。この活性は、過剰量の未標識ロイシン ($500 \mu\text{M}$) または JPH203 ($10 \mu\text{M}$) の共曝露により有意に抑制された。これらの結果は、HT-29 細胞における LAT1 が Na^+ 非依存性ロイシン取り込み活性の大部分に関与していることを示している。

次に LAT1 機能に対する JPH203 前曝露阻害効果を評価するために、HT-29 細胞を取り込みアッセイの120分前に JPH203 (0.001 、 0.03 、 0.1 、 0.3 、および $30 \mu\text{M}$) または 0.5% DMSO (コントロール) に曝露した。結果は、 $0.001 \mu\text{M}$ の場合を除いて、取り込みレベルがそれぞれ対照の 63% 、 51% 、 42% 、 30% 、および 25% に著しく減少した。続いて JPH203 の前曝露阻害効果の時間依存性を明らかにするために、HT-29 細胞を JPH203 ($10 \mu\text{M}$) の存在下で 30 、 60 、 120 分間培養したところ、前曝露時間の延長とともに取り込みレベルが減少した(それぞれ対照の 43% 、 32% 、および 27%)。これらの結果は、JPH203 が HT-29 細胞の LAT1 機能に対して濃度および時間依存的に前曝露阻害効果を発揮することを示している。

さらに JPH203 の前曝露阻害効果の持続性評価のため細胞を JPH203 ($10 \mu\text{M}$) または 0.5% DMSO (コントロール) に120分間(この条件で阻害力がほぼプラトーに達したという観察に基づいて設定)培養し、その後、JPH203 を含まない培地で 0 、 30 、 60 、 120 、および 240 分間での基質取り込みレベルを測定した。120分の前曝露後 0 分での取り込み値はコントロールの 56% であったが、曝露後 30 分で早くも明確な回復を示し (86%)、この効果は前曝露後 120 分および 240 分でほぼ消失した(それぞれ 97% および 95%)。これらの結果は、HT-29 細胞の LAT1 機能に対する JPH203

の前曝露阻害効果が、比較的短期間で退行することを示唆している。

HT-29 細胞を使用して JPH203 前曝露および共曝露を組み合わせた阻害アッセイを実行し、共曝露阻害のみで得られた結果と比較した。共曝露阻害アッセイの IC_{50} 値は 99.2 ± 11.0 nM で、前曝露を加えるとその阻害効力が大幅に増加した ($IC_{50} = 34.2 \pm 3.6$ nM)。これらの結果は、JPH203 の前曝露効果が、HT-29 細胞の LAT1 機能を阻害するための共曝露効果と協調的に作用することを示している。

また LAT1 mRNA 発現は HT-29 細胞で観察されたが、JPH203 前曝露により発現レベルは減少せず、ウェスタンブロット分析による LAT1 タンパク質の発現もバンド強度は同等であった。前曝露による LAT1 の膜局在についても、GFP タンパク質を導入して蛍光顕微鏡で評価した LAT1 は主に HT-29 細胞の細胞膜に局在化しており、JPH203 前曝露は局在化プロファイルに影響を及ぼさないことを示した。

【考察】

今回の検討において我々は JPH203 が癌細胞の LAT1 機能に前曝露阻害効果を示すことを初めて報告した。この効果は共曝露阻害効果と協調して機能し、細胞が JPH203 に連続的に曝露されると、LAT1 機能は従来の報告からの予想よりも大幅に阻害できることを示している。

JPH203 の共曝露と前曝露の組み合わせによる阻害効果により、LAT1 機能に対して 3 倍低い IC_{50} 値が得られたが、報告ではシクロスポリンによる OATP1B1 阻害効果が、同様の前曝露組み合わせで 5~20 倍低い IC_{50} 値が得られることが示されている。シメプレビルと OATP1B3 でも同様な報告がある一方で、タクロリムスの場合、その前曝露阻害効果はごくわずかであり、前曝露阻害効果の特性は、阻害剤とトランスポーターの組み合わせに固有のものと考えられる。

JPH203 前曝露阻害効果のもう 1 つの特徴はその持続性にあり、我々の結果は、細胞外 JPH203 が除去された後 (1 時間以内)、JPH203 の効果が急速に消失することを示した。これは、OATP1B1 でのシクロスポリンの前曝露阻害効果と OATP1B3 でのシメプレビルの前曝露阻害効果が少なくとも 3 時間続くという報告とは明確に対照的であった。したがって、前述のように前曝露阻害効果の持続時間も、阻害剤とトランスポーターの組み合わせに依存しているようにも見える。したがって、共曝露阻害効果と比較的短い持続時間に対する中程度の協調効果が、JPH203-LAT1 の組み合わせにおける前曝露阻害効果の独特の特性を描写していると言える。

JPH203 の前曝露阻害効果が明らかになったことにより、JPH203 がどのように LAT1 機能を阻害するかという疑問が生じる。前曝露により JPH203 が癌細胞に侵入できることを考慮すると、1) LAT1 遺伝子発現レベルの低下、2) 細胞膜局在の変化、3) LAT1 機能のトランス阻害の 3 つの可能性を考えた。しかし、JPH203 の前曝露は LAT1 mRNA またはタンパク質レベルのいずれも低下させないため、この可能性は低い。2 番目の可能性に関して、阻害剤によるトランスポーターの内在化が OATP2B1 とリンゴジュースの組み合わせで報告されているが JPH203 の前曝露は LAT1 の内在化を誘導しなかった。

JPH203 の共曝露は、LAT1 を介したロイシン取り込みの競合的阻害を引き起こすと考えられているため、JPH203 は細胞膜の内側にある基質結合部位での LAT1 機能も競合的に阻害すると推測した (トランス阻害)。

OATP1B1 機能に対するシクロスポリンの前曝露阻害効果の機序としてトランス阻害が関与しているという報告がある。LAT1 はアミノ酸交換体でアンチポーターとして機能することも考慮すると JPH203 と LAT1 の組み合わせでトランス阻害は起こりうると考えられるが、前曝露阻害効果の詳細な機序を明らかにすることはできず、さらなる研究が必要とされている。

共曝露と前曝露が協調的に阻害効果を示すという我々の発見は、癌細胞が *in vivo* で JPH203 に長時間曝露されるという事を考慮すると、薬剤投与中に前曝露阻害が発生する可能性が高いため、この曝露方法から得られた IC₅₀ 値は従来法（共曝露のみ）に比較してより臨床的な JPH203 有効性の評価につながる可能性がある。また、どのタイプの癌が JPH203 前曝露阻害効果の影響を受けやすいかを明らかにすることで、将来的に JPH203 を使用する患者選択に役立つ可能性もある。

LAT 阻害剤の開発という点においても前曝露阻害効果は重要性がある。LAT1 は癌治療の有望な分子標的であるため、より強力で選択的な LAT1 阻害剤の探索は、今後の抗癌剤開発のための大きな研究分野になるだろう。このような研究において、トランスポーター阻害剤スクリーニングに使用される標準的な方法は、長い間共曝露阻害アッセイのみだったが、今回の結果からも前曝露阻害効果を考慮する必要があると考える。これまで述べたように、前曝露は共曝露効果にさらに阻害効力を追加する可能性があり、これは生体内の状況をより反映した結果になる可能性が高い。したがって、共曝露阻害スクリーニングの結果だけでは、候補薬の生体内阻害プロファイルを過小評価するリスクが生じる可能性があり、我々のような組み合わせ効果の検討は、より適切な LAT1 阻害剤の選択に役立つと考える。

【結語】 JPH203 はその前曝露効果により LAT1 機能を阻害する能力があることを明らかにした。前曝露効果の根底にあるメカニズムは明らかにされていないが、前曝露効果は共曝露と組み合わせることで阻害効果が増強することも示した。JPH203 の共曝露共と前曝露は薬剤を投与した人体で起こっていると考えられるため、我々の結果は JPH203 のさらなる臨床開発に重要な情報を提供した。