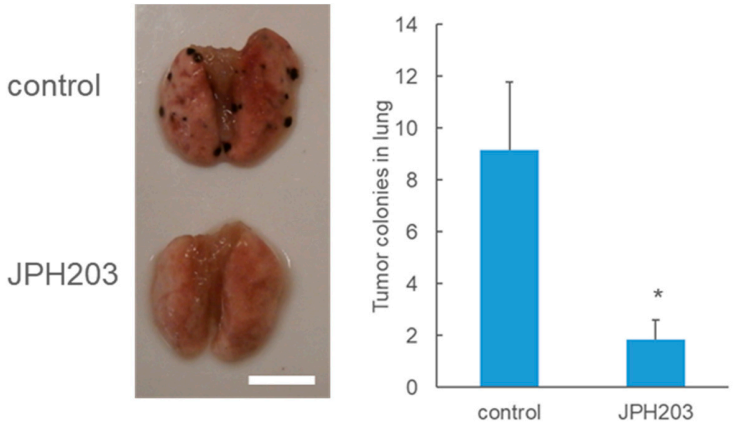
138　LAT1を介した内皮活性化機序の解明	末弘　淳一

【目的】LAT1 はがん微小環境でみられる低酸素、飢餓状態などのストレスによって誘導される中性アミノ酸トランスポーターであり、種々の必須アミノ酸を細胞内外へ輸送している。我々はこれまでの研究の中で炎症性因子にさらされた内皮細胞にて LAT1 が誘導されること、LAT1 阻害薬 JPH203 が炎症接着分子 VCAM-1 の誘導を転写レベルで阻害し、内皮活性化を抑制することを見出した。内皮活性化は多くの遺伝子発現変化をともなうが、そのなかの炎症性サイトカインによる炎症接着分子の誘導はがんの生着、浸潤に必須であることが知られている。以上の背景から、本研究では LAT1 を介した内皮活性化機序を分子レベルで検討し、LAT1 阻害ががん転移においてどのように寄与するかについて明らかにすることを目的とした。

【方法】LAT1 を介した内皮活性化機序を分子レベルで明らかにするため、LAT1 阻害薬を前処理した臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いて、① DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析、② シグナル伝達分子のリン酸化抗体を用いたウェスタンブロッティング、③ H3K4me3、H3K27ac 抗体を用いた ChIP-seq 解析を行った。LAT1 阻害ががん転移においてどのように寄与するかを明らかにするため、LAT1 阻害薬を前投与したマウスに B16F10 メラノーマを静脈投与し、血行性転移モデルを作成することで検討を行った。

【結果】HUVEC を用いた DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析、ChIP-seq によるヒストン修飾解析から、LAT1 阻害でストレス応答性の転写因子である ATF4、CHOP が誘導されること、また抗酸化因子である NQO1、SQSTM1、FTH1 誘導されることから、それら共通の発現調節因子である NRF2 の関与が示唆された。B16F10 メラノーマを用いた血行性がん転移モデルでは、LAT1 阻害により有意に肺へのがん転移が抑制されることが認められた。その抑制はがん転移初期段階での内皮活性化の抑制によると考えられた。

LAT1 阻害薬による B16F10 メラノーマ肺転移の抑制



138. LAT1 を介した内皮活性化機序の解明

末弘　淳一

杏林大学 医学部 薬理学教室

Key words：LAT1，内皮活性化，炎症，がん転移

緒　言

血管内膜を構成する内皮細胞は生理環境において血管安定化に寄与する一方、病的環境では機能不全となり、異常活性化を引き起こす。活性化した内皮細胞では多くの炎症性因子が誘導されることから、がんの発生・進展と密接に関わっている。なかでも、がんの転移過程において炎症性サイトカインによる内皮細胞での炎症接着分子の誘導はがんの生着、浸潤に必須である。これまで我々は内皮細胞での炎症接着分子の誘導に関わる因子を DNA マイクロアレイなど網羅的解析手法により検討してきた。そのなかから、炎症性因子にさらされた内皮細胞にてアミノ酸トランスポーターLAT1 が誘導されること、LAT1 阻害薬 JPH203 が腫瘍壊死因子（TNF）-αによる炎症接着分子 VCAM-1 の誘導を転写レベルで阻害し、内皮活性化を抑制することを見出した。

LAT1 はがん微小環境でみられる低酸素、飢餓状態などのストレスによって誘導される中性アミノ酸トランスポーターであり、種々の必須アミノ酸を細胞内外へ輸送している。その役割は mTORC1 をはじめとするアミノ酸を介した細胞生存シグナルの調整である。mTOR 阻害による内皮活性化を抑制する試みとしては、その特異的阻害薬であるラパマイシンを用いた研究が古くから進められてきた。それらの研究から、ラパマイシンによる VCAM1 誘導抑制は mTORC2-Akt 経路の阻害がメインとされている［1］。一方、LAT1 阻害によるアミノ酸取り込み抑制においては mTORC1 のみが阻害され、mTORC2-Akt 経路に直接影響しない。すなわち、ラパマイシンとは異なる機序で VCAM-1 誘導を抑制していると考えられた。

本研究では、LAT1 を介した内皮活性化調節機序に焦点を当て、LAT1 阻害時の遺伝子発現、シグナル伝達、ヒストン修飾の変化を検討し、LAT1 阻害による VCAM-1 の誘導抑制をどのシグナル経路、転写因子が担っているかを明らかにした。また、LAT1 選択的阻害薬を用いた内皮活性化の抑制が血行性がん転移マウスモデルにおいてどのように寄与するかを検討した。

DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析、ChIP-seq によるヒストン修飾解析から、LAT1 阻害でストレス応答性の転写因子である ATF4、CHOP が誘導されること、また抗酸化因子である NQO1、SQSTM1、FTH1 誘導されることから、それら共通の発現調節因子である NRF2 の関与が示唆された。B16F10 メラノーマを用いた血行性がん転移モデルでは、LAT1 阻害により有意に肺へのがん転移が抑制されることが認められた。その抑制はがん転移初期段階での内皮活性化の抑制によると考えられた。

方法および結果

1. LAT1 阻害時の遺伝子発現の解析

これまでの解析から、各種炎症性サイトカインにより臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）でアミノ酸トランスポーターLAT1 が誘導されること、LAT1 選択的阻害薬 JPH203 を前処理することで TNF-α による炎症接着分子 VCAM1 が抑制され、白血球接着が阻害できることを確認していた。そこで、LAT1 を介したアミノ酸取り込みを遮断すると転写レベルでどのように遺伝子発現が変化するかを検討するため、JPH203 を処理した HUVEC に TNF-α を経時的に作用させ、DNA マイクロアレイによる包括的な遺伝子発現の解析を行った。

その結果、JPH203 を処理することで栄養枯渇時に誘導される ATF4、CHOP や細胞周期の中の G1 期で発現する

Cyclin D1 の発現上昇が顕著であることが見出だされた（図 1a）。栄養枯渇時にはストレス応答により eIF2α がリン酸化され、ATF4 の発現が亢進することが知られている。CHOP は ATF4 の制御下にある転写因子で細胞周期 G1 から S 期への移行を阻害する。このように ATF4、CHOP の発現は、JPH203 処理が HUVEC にて栄養枯渇ストレスを誘導し、G1 アレストを引き起こすことを示唆するものである。また、抗酸化因子として知られる NQO1、SQSTM1、FTH1 が誘導されていた（図 1a）。NQO1、SQSTM1、FTH1 はともに NRF2 制御下にある遺伝子として知られている［2］。NRF2 はストレス防御の中心にある転写因子であり、細胞内酸化還元状態を保つことで酸化ストレスや炎症から細胞を保護する役割を担う。以上で示したいずれの遺伝子も LAT1 の基質とされているアミノ酸を除いた培養液下でも同様に発現が誘導されていた。また、ラパマイシン処理で発現変化がみられなかったことから、mTOR 活性によらないことが認められた（図 1b）。

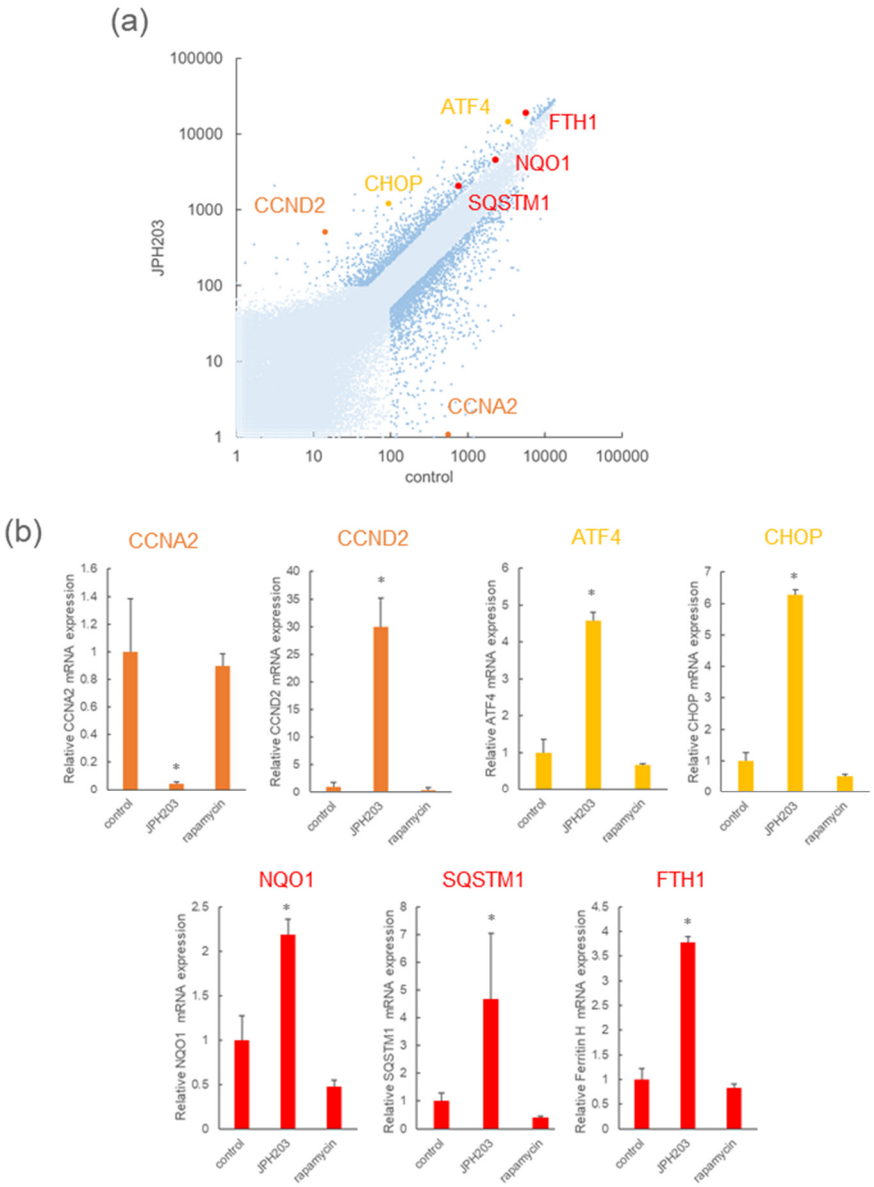


図 1. LAT1 阻害時の内皮活性化抑制と遺伝子発現変化

a）TNF-α による内皮活性化時での白血球細胞の接着と JPH203 による効果、b）JPH203 による遺伝子発現変化の網羅的解析、c）JPH203 とラパマイシンによる遺伝子発現変化の比較（*$p < 0.01$、t 検定）。

2. LAT1 阻害時のシグナル伝達経路の解析

以上の遺伝子発現解析から見出された遺伝子がどのような経路で発現変化しているかを分子レベルで見出す手がかりとして、シグナル伝達分子のリン酸化抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。JPH203 を前処理した HUVEC に TNF-α を作用させたところ、TNF-α による p70S6K（T389）、AKT（S473）、p38（T180/Y182）リン酸化が減少した一方、ERK1/2（T202/Y204）リン酸化が亢進していた（図 2a）。

転写因子結合時に変化するメチル化、アセチル化ヒストンをとらえるため、クロマチン免疫沈降法を行った。ここで用いたヒストン修飾抗体は H3K4me3、H3K27ac である。いずれもオープンクロマチンのマーカーとして知られており、H3K4me3 はプロモータ領域を含む転写開始点に、H3K27ac はエンハンサーも含む遺伝子制御領域に局在する傾向にある。JPH203 を処理した HUVEC にて次世代高速シーケンサーを用いてゲノムワイドに解析したところ、JPH203 処理下で H3K4me3、H3K27ac が濃縮された領域では ATF4、CHOP、NRF2 の結合塩基配列モチーフが存在することが見いだされた。個々の遺伝子座での解析では、VCAM1 遺伝子のプロモータ領域で H3K4me3 が増加し、プロモータ、および-16kb 領域で H3K27ac が減少していた（図 2b）。H3K4me3 の増加はクロマチン構造がオープンとなり、何らかの因子がその領域に結合したことを意味する。また、H3K27ac が減少していた-16kb は VCAM1 誘導に必須なエンハンサー領域であり [3]、それらの変化を介して誘導が抑制されたと考えられた。先の遺伝子発現解析から見出された NQO1、FTH1、SQSTM1 のプロモータ領域では H3K4me3，H3K27ac がともに増加していた。

各種シグナル伝達阻害薬を作用させ、内皮活性化抑制の機序を検討したところ、MEK1/2 阻害薬 PD0325901 を作用させることで JPH203 処理による VCAM1 誘導抑制が回復することが認められた（図 2c）。

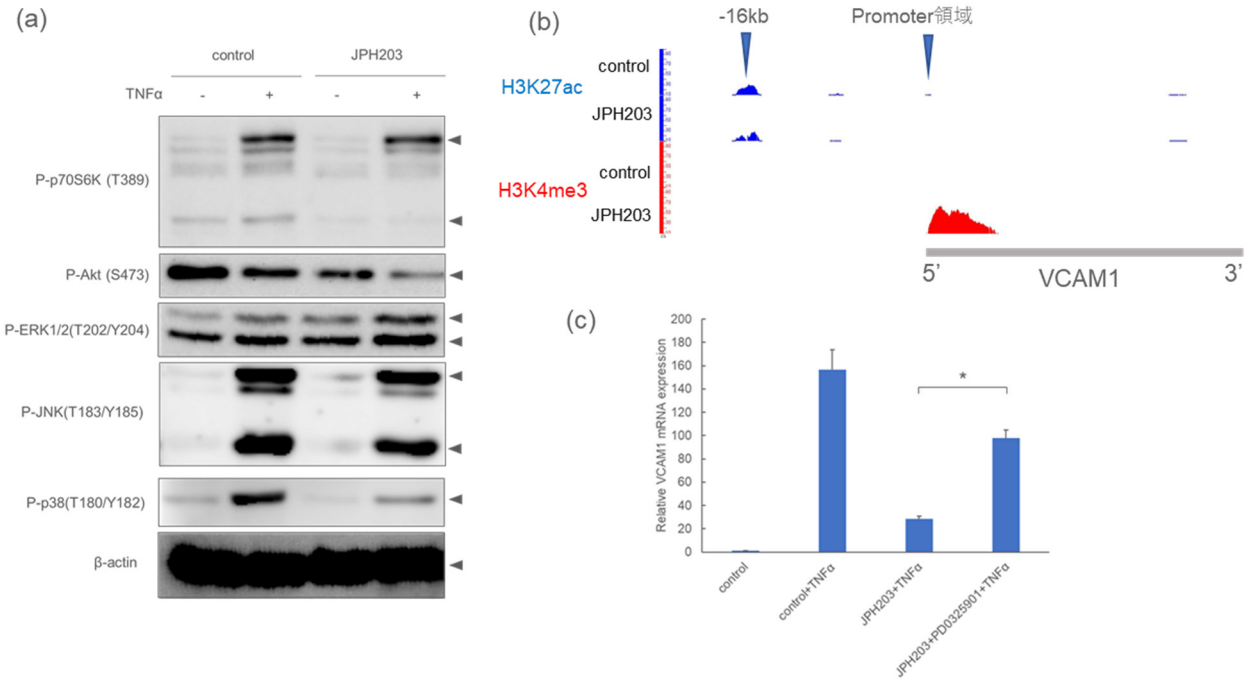


図 2. LAT1 阻害時のシグナル伝達経路とヒストン修飾の変化

a）TNFαにより活性化されるシグナル伝達分子と JPH203 処理による変化。b）VCAM1、NQO1、SQSTM1、FTH1 遺伝子座における JPH203 による H3K4me3、H3K27ac ヒストン修飾の変化。c）MEK1/2 阻害薬 PD0325901 による JPH203 作用時 VCAM1 誘導抑制からの回復（*$p < 0.01$、t 検定）。

3. がん転移モデルにおける LAT1 の機能解析

LAT1 阻害による内皮活性化の抑制が血行性がん転移マウスモデルにおいてどのように寄与するかを検討するため、C57BL/6 マウス眼窩から B16F10 メラノーマ細胞を静脈投与する方法を用いて、血行性がん転移モデルを作製した。JPH203（50 mg/kg）を前投与した群で肺への転移を検討したところ、非投与群と比較して有意に B16F10 メラノーマの生着が抑制されていた（図 3）。同様の傾向は、血管内皮特異的 Lat1 ノックアウトマウスでも認められた。一方、エンドポイントでの免疫組織化学による活性化内皮細胞、白血球細胞の局在には明確な差異が認められなかった。

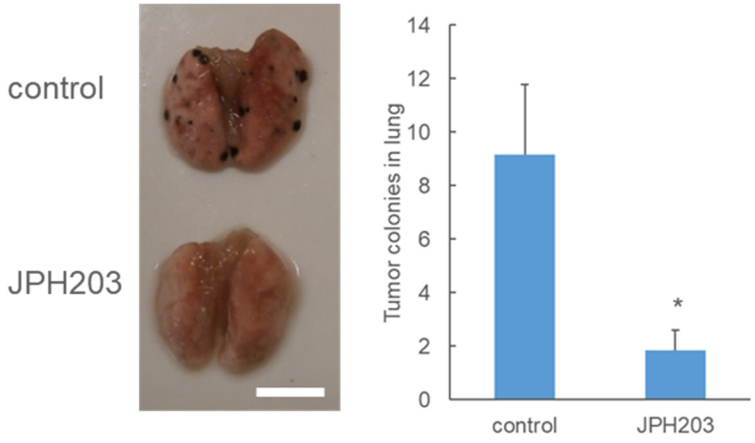


図 3. LAT1 阻害時の B16F10 メラノーマがん転移
B16F10 メラノーマ細胞を静脈投与して 14 日後の肺への転移とコロニー数による定量
（*$p < 0.03$、t 検定、スケールバーは 5 mm）

考　察

本研究から、LAT1 阻害により ATF4、CHOP、NRF2 といったストレス応答性転写因子が活性化されること、その VCAM1 誘導の抑制には ERK1/2 シグナル経路が中心的役割を果たすことが示された。それらのなかでも、NRF2 は ERK1/2 経路で活性化され［4］、p38 MAPK シグナル抑制により VCAM1 の発現抑制をもたらす［5］と報告されていることから、内皮活性化の抑制の一因と考えられた。一方、LAT1 阻害で H3K27ac 減少が認められた VCAM1 遺伝子-16kb 領域での NRF2 の関与は現段階で不明であり、今後の検討課題としたい。

血行性がん転移モデルでは LAT1 阻害薬により顕著にがん転移が抑制された。本研究で用いた B16F10 メラノーマは LAT1 阻害薬による直接的な増殖抑制を認めていない細胞株である。また、血管内皮特異的 Lat1 ノックアウトマウスでも同様の傾向が得られていることから、本研究で認めたがん転移抑制は内皮活性化抑制が主因と考えられた。一方、エンドポイントの解析では活性化内皮細胞、白血球細胞の局在には明確な差異が認められなかった。内皮活性化はがん転移を促す骨髄系細胞のリクルートメントとがん細胞の生着・浸潤といった 2 つの過程に関与すると考えられているが[6]、がん転移過程の時系列のなかで今回のエンドポイントにおける解析ではそれらが反映されていないことが考えられた。今後は免疫組織化学や生化学の経時的な検討を行うことにより、それらの機序を明らかにしたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学アイソトープ総合センターの和田洋一郎、杏林大学医学部薬理学教室の櫻井裕之、木村徹である。最後に、本研究を支援いただきました上原記念生命科学財団には深く感謝申し上げます。

文 献

1) Wang C, Qin L, Manes TD, Kirkiles-Smith NC, Tellides G, Pober JS.Rapamycin antagonizes TNF induction of VCAM-1 on endothelial cells by inhibiting mTORC2. J Exp Med. 2014 Mar 10;211(3):395-404. doi: 10.1084/jem.20131125. Epub 2014 Feb 10.

2) Kansanen E1, Jyrkkänen HK, Volger OL, Leinonen H, Kivelä AM, Häkkinen SK, Woodcock SR, Schopfer FJ, Horrevoets AJ, Ylä-Herttuala S, Freeman BA, Levonen AL. Nrf2-dependent and -independent responses to nitro-fatty acids in human endothelial cells: identification of heat shock response as the major pathway activated by nitro-oleic acid. J Biol Chem. 2009 Nov 27;284(48):33233-41. doi: 10.1074/jbc.M109.064873. Epub 2009 Oct 5.

3) Tozawa H1, Kanki Y, Suehiro J, Tsutsumi S, Kohro T, Wada Y, Aburatani H, Aird WC, Kodama T, Minami T. Genome-wide approaches reveal functional interleukin-4-inducible STAT6 binding to the vascular cell adhesion molecule 1 promoter. Mol Cell Biol. 2011 Jun;31(11):2196-209. doi: 10.1128/MCB.01430-10. Epub 2011 Apr 4.

4) Papaiahgari S, Kleeberger SR, Cho HY, Kalvakolanu DV, Reddy SP. NADPH oxidase and ERK signaling regulates hyperoxia-induced Nrf2-ARE transcriptional response in pulmonary epithelial cells. J Biol Chem. 2004 Oct 1;279(40):42302-12. Epub 2004 Jul 29.

5) Chen XL, Dodd G, Thomas S, Zhang X, Wasserman MA, Rovin BH, Kunsch C.Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006 May;290(5):H1862-70. Epub 2005 Dec 9. DOI: 10.1152/ajpheart.00651.2005.

6) Špela Ferjančič, Ana M. Gil-Bernabé, Sally A. Hill, Philip D. Allen, Peter Richardson, Tim Sparey, Edward Savory, Jane McGuffog and Ruth J. Muschel VCAM-1 and VAP-1 recruit myeloid cells that promote pulmonary metastasis in mice. Blood 2013 121:3289-3297; doi: https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-449819