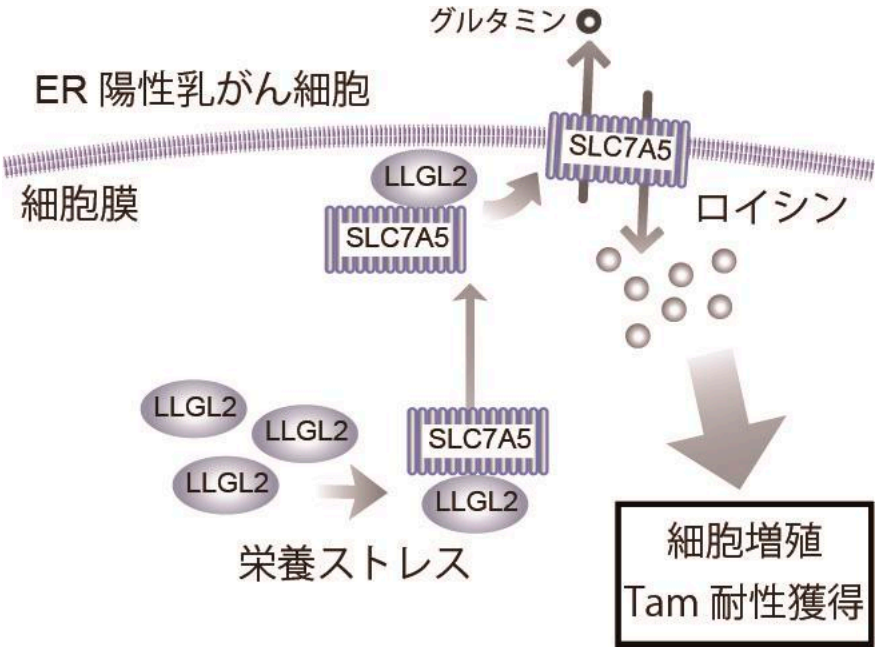
34　アミノ酸トランスポーターによる薬剤耐性獲得分子機序	齊藤　康弘

【目的】日本において乳がんは罹患率ならびに死亡率ともに非常に高い疾患である。乳がんは特徴的な遺伝子発現によりエストロジェン受容体（ER）陽性乳がん、HER2 陽性乳がん、Basal 型乳がんの大きく三つに分類される。中でも ER 陽性乳がん細胞は乳がん全体のおよそ 80%を占める。ER 陽性乳がん患者は治療の過程においてホルモン療法が適用されるが、ER 陽性乳がん患者の内およそ 20～30%の患者ではホルモン療法に対して耐性が認められる。ホルモン療法に用いられる ER を直接阻害するタモキシフェンは非常に有効な薬であるが、一部の乳がん患者では耐性が認められる。これまでに我々は ER 陽性乳がん細胞において細胞極性タンパク質 LLGL2 が過剰発現しており、アミノ酸トランスポーターである SLC7A5 の細胞膜局在を制御していることを明らかにした。また、SLC7A5 の過剰発現がタモキシフェン耐性獲得に関与していることから、本研究ではタモキシフェン耐性獲得における SLC7A5 の機能的役割ならびにその分子機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】SLC7A5 過剰発現によるタモキシフェン耐性獲得機序を明らかにするため、SLC7A5 過剰発現細胞における質量分析装置を用いたメタボローム解析を行った。SLC7A5 過剰発現により細胞内濃度の上昇が認められたアミノ酸に対してタモキシフェン耐性獲得の評価を行った。

【結果】メタボローム解析により SLC7A5 過剰発現は必須アミノ酸であるフェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、チロシン、バリン、ヒスチジン、メチオニン、イソロイシンの細胞内濃度を上昇させることが明らかとなった。タモキシフェン耐性獲得における八つのアミノ酸の機能を明らかにするため、それぞれのアミノ酸を過剰に添加し、タモキシフェン存在下の増殖能を検討したところ、単独のアミノ酸ではタモキシフェン耐性獲得は認められなかった。また、八つのアミノ酸をそれぞれ培地中から取り除き、同様にタモキシフェン存在下での増殖能を検討したところ、いずれのアミノ酸もタモキシフェン耐性獲得において重要であることが示唆された。

LLGL2-SLC7A5 経路による ER 陽性乳がん細胞の増殖機構



34. アミノ酸トランスポーターによる薬剤耐性獲得分子機序

齊藤　康弘

慶應義塾大学 大学院政策・メディア研究科／先端生命科学研究所 メタボローム研究グループ

Key words：アミノ酸トランスポーター，ER 陽性乳がん，薬剤耐性，アミノ酸，細胞極性タンパク質

緒　言

日本において乳がんは罹患率ならびに死亡率ともに非常に高い疾患である。乳がんは特徴的な遺伝子発現によりエストロジェン受容体（ER）陽性乳がん、HER2 陽性乳がん、Basal 型乳がんの大きく 3 つに分類される。中でも ER 陽性乳がん細胞は乳がん全体のおよそ 80%を占める。ER 陽性乳がん患者は治療の過程においてホルモン療法が適用されるが、ER 陽性乳がん患者の内およそ 20～30%の患者ではホルモン療法に対して耐性が認められる。ホルモン療法に用いられる ER を直接阻害するタモキシフェンは非常に有効な薬であるが、一部の乳がん患者では耐性が認められる。

一方で、上皮細胞の頂端－基底の方向性を制御する細胞極性タンパク質として知られる LLGL2 はハエの遺伝学によって同定された遺伝子であり、そのハエにおける形質から LLGL2 はがん抑制遺伝子として機能すると考えられてきた。我々は乳がん細胞における LLGL2 の機能解析を行ったところ、LLGL2 はがん抑制遺伝子としてではなく、がん細胞の増殖において促進的に機能することを明らかにした。さらに、LLGL2 は ER 陽性乳がん細胞に特異的に高発現しており、ER 陽性乳がん患者ではその高発現が患者生存率の低下に関連することが明らかになった。一連の解析結果から、LLGL2 はアミノ酸トランスポーターである SLC7A5 と結合し、SLC7A5 の細胞膜局在を促進する結果、細胞内へのロイシン取り込みが促進され、細胞増殖が亢進することが明らかとなった。また、タモキシフェン耐性乳がん細胞においても LLGL2 ならびに SLC7A5 は細胞増殖に重要であることが示唆され、SLC7A5 の過剰発現がタモキシフェンに対する薬剤耐性獲得に重要であることが示された［1］。しかしながら、SLC7A5 を介したタモキシフェン耐性獲得の分子機序は不明である。したがって、本研究では ER 陽性乳がん細胞におけるタモキシフェン耐性獲得において SLC7A5 の機能的役割を明らかにすることを試みた。

方法および結果

1.　タモキシフェン耐性獲得に寄与する代謝物質の同定

本実験では ER 陽性乳がん細胞において SLC7A5 を過剰発現し、コントロール細胞と SLC7A5 過剰発現細胞を用いておよそ 500 の代謝物質を質量分析装置により網羅的に測定を行った。およそ 200 の代謝物質の検出が認められ、差が認められた上位 50 の代謝物質を明らかとした（図 1）。SLC7A5 は必須アミノ酸であるフェニルアラニン（Phe）、トリプトファン（Trp）、ロイシン（Leu）、チロシン（Tyr）、バリン（Val）、ヒスチジン（His）、メチオニン（Met）、イソロイシン（Ile）を細胞内に取り込むことが知られており、SLC7A5 過剰発現細胞ではいずれのアミノ酸も細胞内濃度の上昇が認められた。また、アミノ酸に加え gamma-butyrobetaine および Glycerophosphorylcholine の上昇が認められた（図 1）。

2.　タモキシフェン耐性獲得に関与するアミノ酸のスクリーニング

SLC7A5 はアミノ酸トランスポーターであり、その基質アミノ酸全てが細胞内において上昇していることが明らかとなったことから、次に我々はタモキシフェン耐性獲得に関与するアミノ酸のスクリーニングを試みた。タモキシフェン感受性のある MCF7 細胞においてタモキシフェンを 100 nM 添加し、さらに培地組成の 10 倍量のアミノ酸と 10 倍量のグルタミン（Gln）を添加し、その細胞増殖能を検討した。タモキシフェンを添加することにより細胞増殖が抑制

されることを確認したが、グルタミンとともに Trp、Leu、Val、His、Ile、Tyr、Phe、Met を 1 つずつ過剰に添加してもタモキシフェンによる細胞増殖の抑制をレスキューすることができなかった（図 2）。

次に、我々は SLC7A5 過剰発現細胞を用いて培養液中のアミノ酸を 1 つずつ取り除き、その細胞増殖能を 100 nM タモキシフェン存在下で検討した。SLC7A5 過剰発現細胞ではタモキシフェン存在下において増殖に変化は認められなかったのに対し、Trp、Leu、Val、His、Ile、Tyr、Phe、Met をそれぞれ培地中から取り除くといずれもタモキシフェン存在下で増殖能が低下した（図 3）。

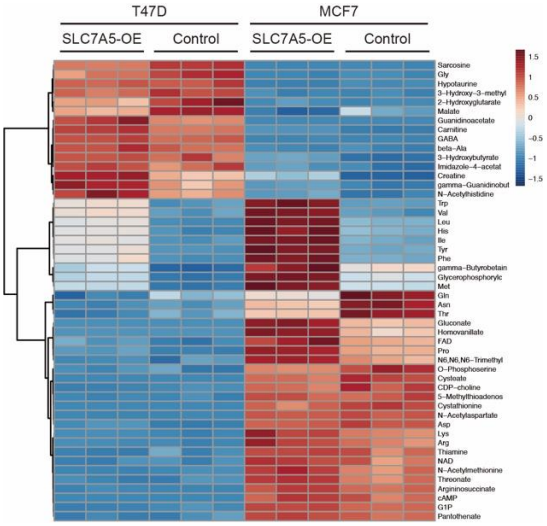


図1. SLC7A5過剰発現MCF7細胞におけるメタボローム解析
ER 陽性乳がん細胞（T47D 細胞）に SLC7A5 を過剰発現した細胞のメタボローム解析を行い、差のある Top50 の代謝物質をヒートマップにて表した。

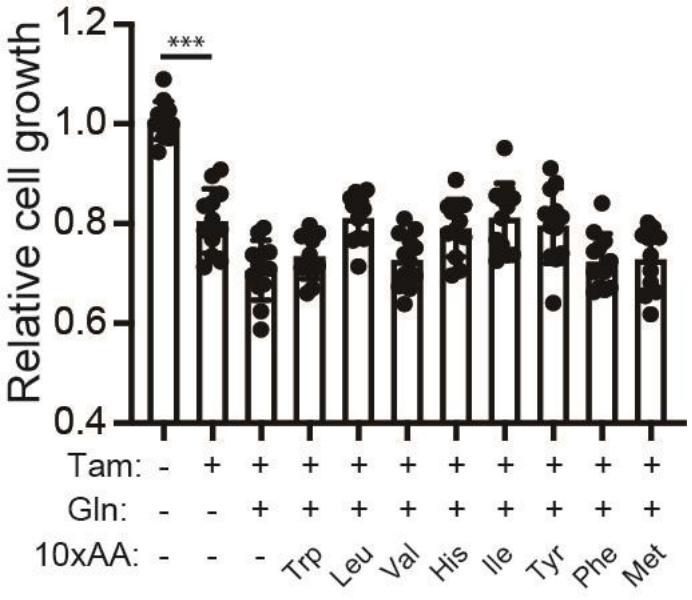


図2. タモキシフェン耐性獲得に関与するアミノ酸のスクリーニング
MCF7細胞においてタモキシフェンとともに過剰量のアミノ酸を1つずつ添加し細胞増殖能を検討した。n＝9、One-way ANOVA ならびに Tukey's multiple comparisons test により有意差を検討した。***P＜0.0001。

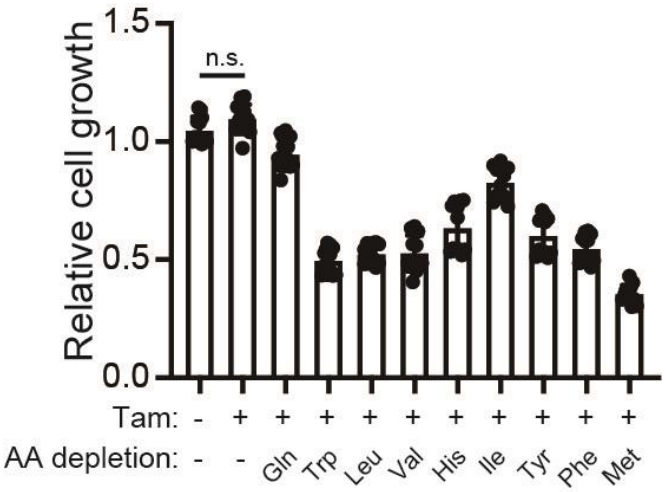


図3. タモキシフェン耐性獲得に関与するアミノ酸のスクリーニング
SLC7A5を過剰発現させたMCF7細胞においてアミノ酸を1つずつ培地中から取り除き、100 nMタモキシフェンを添加し細胞増殖能を検討した。n＝9、One-way ANOVAならびにTukey's multiple comparisons testにより有意差を検討した。n.s.：P＞0.05。

考　察

我々は ER 陽性乳がん細胞におけるホルモン治療薬タモキシフェンに対する耐性獲得機序の一端としてアミノ酸トランスポーターである SLC7A5 の過剰発現が重要であることを見出している。本研究では SLC7A5 過剰発現によるタモキシフェン耐性獲得の分子機序を解明することを試みた。メタボローム解析により SLC7A5 を過剰発現する細胞では SLC7A5 の基質となる Trp、Leu、Val、His、Ile、Tyr、Phe、Met の細胞内での上昇が認められた。したがって、8 つのアミノ酸の細胞内濃度の上昇がタモキシフェン耐性獲得に関与することが推察された。

ところが、8 つのアミノ酸を 1 つずつ過剰に添加してもタモキシフェン耐性獲得が認められなかったことに加え、8 つのアミノ酸を 1 つずつ培地中から取り除くと細胞増殖能が低下したことから、いずれのアミノ酸もタモキシフェン耐性獲得に重要であることが示唆されたが、現在のところ詳細は不明である。今後は SLC7A5 過剰発現によって細胞内で上昇が認められたアミノ酸を一度に大量添加することによりタモキシフェン耐性獲得が認められるかを確認し、また、アイソトープを使ったアミノ酸代謝物質の追跡を行うことで、タモキシフェン耐性獲得に関与する代謝物質の同定を試みる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、慶應義塾大学先端生命科学研究所メタボローム研究グループの曽我朋義教授、松田詩織技術員、遠藤慶子技術員、芦谷早苗技術員、大石麻希技術員、上野綾乃技術員である。この場を借りて深謝申し上げます。

文　献

1) Saito Y, Li L, Cyaud E, Luna A, Sander C, Raught B, Asara JM, Brown M, Muthuswamy SK. LLGL2 rescues nutrient stress by promoting leucine uptake in ER + breast cancer. Nature. 2019 May; 569(7755):275-279. Epub 2019 Apr 17. PMID: 30996345 DOI: 10.1038/s41586-019-1126-2