

がん細胞型アミノ酸トランスポーター LAT1 のエクソソームにおける発現：新規膵臓がんバイオマーカーとしての潜在的価値

大阪大学大学院 医学系研究科 生体システム薬理学

大 垣 隆 一

I 要 旨

膵臓がんは、予後不良の難治性がんである。特に、手術による切除が不能な患者に対する化学療法には、未だにごく限られた選択肢しか存在せず、しかもその治療効果は限定的である。そのため、新たな早期診断技術および治療戦略の開発が強く望まれている。がん細胞が分泌する脂質二重膜小胞「エクソソーム」は、細胞の状態を反映した多くの分子を内包しており、バイオマーカーのリソースとして注目を集めている。アミノ酸トランスポーター LAT1 (SLC7A5) は、がん細胞型アミノ酸トランスポーターとして知られ、その選択的阻害薬は抗がん薬として開発が進められている。本研究は、膵臓がん細胞由来エクソソーム上に、LAT1 が含まれていることを *in vitro* および *in vivo* の実験系で明らかにした。LAT1 の発現レベルが異なる複数の膵臓がん細胞を用いた比較解析から、細胞内の LAT1 発現量が、エクソソーム上の LAT1 存在量に反映されることが強く示唆された。以上の結果は、膵臓がん細胞由来エクソソーム上の LAT1 が、新規バイオマーカーとしての潜在的価値を有することを示すものである。

II 背景と目的

アミノ酸トランスポーター LAT1 (SLC7A5) は、大型中性アミノ酸を選択的に輸送する膜輸送体 (トランスポーター) であり、様々な臓器

由来のがん組織で顕著に高発現する。申請者らはこれまでに、膵臓がん細胞において、LAT1 が必須アミノ酸取り込みの中心的な役割を担い、がん細胞の活発な増殖や成長の促進に寄与することを報告した¹⁾。実際に、膵臓がん患者では、LAT1 の高発現が独立した予後不良因子となることも報告されている²⁾。また、申請者の所属研究室を含め国内外の複数の研究グループが、新規抗がん薬としての LAT1 選択的阻害薬の開発研究を進めている。申請者らは、膵臓がん細胞に対する LAT1 阻害薬とゲムシタピンの併用効果についても報告してきた³⁾。したがって、がん組織内の LAT1 の発現量を非侵襲的に評価できる手法の確立は、膵臓がんの早期診断法や予後予測法の開発に繋がりうる重要な意義を有する。また将来的には、LAT1 阻害薬による膵臓がん治療の奏効を予測するコンパニオン診断への応用も期待できる。

近年、がん細胞が分泌する直径数十～百数十 nm の脂質二重膜小胞「エクソソーム」上に存在する分子がバイオマーカーのリソースとして注目されている。本研究は、膵臓がん細胞由来エクソソーム上に、LAT1 が含まれているか否かを検証することを第一の目的として実施した。さらに、膵臓がん細胞における LAT1 の発現量と、エクソソーム上の LAT1 の存在量との間の相関関係を定量的に検討し、診断・予後予測あるいは薬効バイオマーカーとしての潜在的価値を、基礎研究レベルで確立することを試みた。

III 方 法

1) 膀胱がん細胞由来エクソソーム上におけるLAT1の発現の実証

LAT1の発現量が高い膀胱がん細胞株 T3M4を用いて、その培養上清から超遠心法によりエクソソーム画分を調製した。得られたエクソソーム画分中にLAT1が存在するかどうか、抗LAT1抗体を用いたウエスタンブロット法により検証した。細胞内のLAT1発現量は粗膜画分を用いて検討した。また、同エクソソーム画分を用いて、急速凍結法による免疫電顕解析をおこない、エクソソーム上のLAT1の局在を確認した。

2) ELISAによるエクソソームLAT1の検出法の確立

将来的な臨床応用を目指すうえで、検出感度、定量性、スループットに優れたELISAによって、エクソソーム上のLAT1を検出する系の確立が極めて重要になると考えられる。そこで、PS（ホスファチジルセリン）アフィニティー法によるエクソソームの単離と、抗LAT1抗体による検出を組み合わせたELISA法の確立を試みた。

3) エクソソームと由来する膀胱がん細胞間でのLAT1発現量の相関解析

LAT1の発現レベルが異なる複数の膀胱がん細胞株の培養上清から、エクソソームを回収した。上記2)で確立したELISA法により、エクソソーム上のLAT1量を定量した。膀胱がん細胞の細胞内におけるLAT1の発現量は、粗膜画分を対象としたウエスタンブロット法により定量し、得られた結果をもとに両者の間の相関関係の有無を検証した。

4) 膀胱がん腫瘍モデルマウスにおける検討

膀胱がん細胞株 T3M4を皮下移植あるいは

腹腔内移植した担がんマウスモデルを作製し、その血清あるいは腹水からのエクソソームを超遠心法により回収した。上記2)で確立したELISA法によりエクソソーム上のLAT1の検出を試みた。

IV 結 果

膀胱がん細胞株 T3M4の培養上清から、超遠心法によってエクソソーム画分を調製し、ウエスタンブロット法による解析を実施した。エクソソーム画分には、エクソソームマーカーであるCD81およびCD9が含まれていた。一方で、GM130（ゴルジ体）やCalnexin（小胞体）といった細胞内小器官マーカーは同画分には検出されず、エクソソームの単離に成功していることが確認できた。LAT1は、エクソソーム画分にも明瞭に検出され、細胞膜だけではなくエクソソーム上にも存在していることが強く示唆された（図1）。このエクソソーム画分に対して、抗LAT1抗体を用いた免疫電顕解析を実施したところ、エクソソーム様の膜小胞において染色シグナルが検出された（図2）。

PS（ホスファチジルセリン）アフィニティー法によりエクソソームを捕捉し、ビオチン標識した抗LAT1抗体と、HRP標識したストレプトアビジンで検出するELISA法の系を構築した。膀胱がん細胞株 T3M4の培養上清から単離したエクソソームを段階的に希釈し、量依存性を検討したところ、エクソソーム量と発色値の間には10の3乗オーダーで明瞭な直線性が確認された（図3）。

次に、LAT1の発現レベルが異なる4種類の膀胱がん細胞株からエクソソームを調製し、このELISA法を用いてLAT1の定量をおこなった。その結果、細胞内のLAT1の発現量（粗膜画分を用いたウエスタンブロット法により解析）と、エクソソーム上のLAT1存在量が、非常に良く一致した傾向を示すことが確認で

きた (図 4)。

最後に、in vivo における検討として、膵臓がん細胞株 T3M-4 を皮下移植した、担がんマウスモデルを作製し、その血清から超遠心法で回収したエクソソーム上の LAT1 の検出を ELISA 法により試みた。しかし、検出された LAT1 のシグナルは、陰性対照として用いた非担がんマウスの血清から回収したエクソソーム

のものとはほぼ同程度であり、有意な増加は認められなかった。代替的手法として、同膵臓がん細胞株を腹腔内移植した担がんマウスモデルを作製し、その腹水からエクソソームを超遠心法により回収した。ELISA 法で検出された LAT1 のシグナルは、陰性対照として用いた非担がんマウスの腹水から回収したエクソソームに比べて有意且つ顕著に増加していた (図 5)。

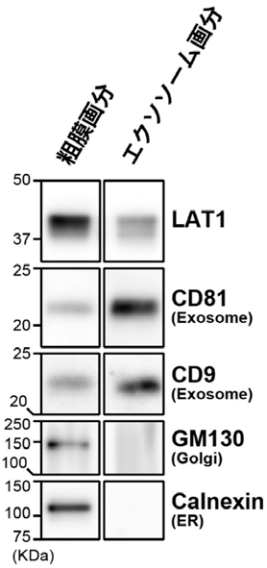


図 1

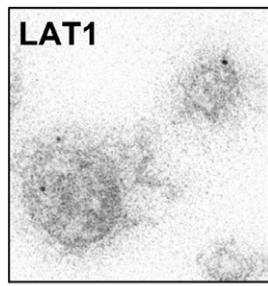


図 2

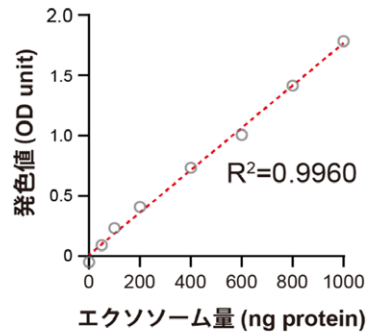


図 3

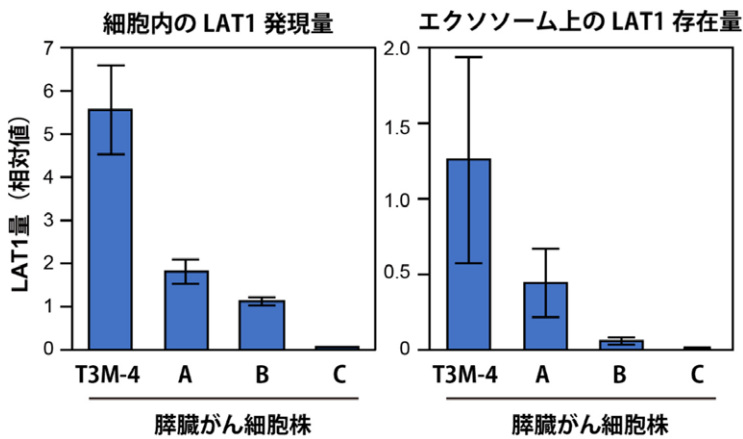


図 4

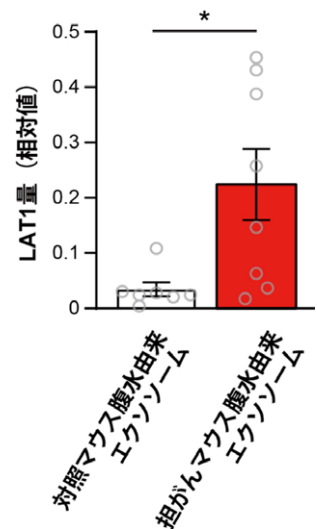


図 5

V 考 査

以上の結果から、膵臓がん細胞由来のエクソソーム上には、LAT1が存在していることが初めて明らかになった。複数の膵臓がん細胞株の培養上清を用いた検討の結果として、細胞内のLAT1発現量と、エクソソーム上のLAT1存在量の多寡には、明確な関連性があることも強く示唆された。今後、より詳細な相関解析の実施に向けて、検討する細胞株の種類をさらに増やしていく予定である。さらに、膵臓がん細胞株T3M-4を腹腔内移植した、担がんマウスの腹水由来エクソソーム上でもLAT1が検出された。この結果はin vivoにおいても、膵臓がん細胞由来のエクソソームにLAT1が存在していることを示すものである。しかしながら、腹腔内移植モデルは、腹膜播種が起きて腹水を生じた末期膵臓がん患者の状態に相当する。早期の診断・予後予測あるいは薬効バイオマーカーとしての有用性を確立していくためには、やはり血清を検体とした解析でLAT1を検出できることが望ましい。今回の検討では、膵臓がん細胞株を皮下移植した担がんマウスの血清由来エクソソーム上のLAT1は検出することができなかった。これは回収されたエクソソーム上のLAT1の存在量が、ELISA法の検出限界以下であったことに起因すると考えられる。今後、より感度の高い検出系の構築を目指して、高親和性のLAT1抗体の取得や、エクソソーム単離法およびELISA法の最適化を進めていく必要があると考えている。

VI 結 語

本研究により、膵臓がん細胞由来エクソソーム上に、がん細胞型アミノ酸トランスポーターとして知られるLAT1が存在していることが明らかになった。膵臓がん細胞におけるLAT1の発現量は、エクソソーム上のLAT1の存在量に

反映されるという傾向が明瞭に認められ、膵臓がんの新たな診断・予後予測あるいは薬効バイオマーカーとしての潜在的な価値を有することが示された。

参考文献

- 1) Nishikubo K, Ohgaki R#, Okanishi H, Okuda S, Xu M, Endou H, Kanai Y#. (# Co-corresponding author) Pharmacologic inhibition of LAT1 predominantly suppresses transport of large neutral amino acids and downregulates global translation in cancer cells. *J Cell Mol Med.* 2022; 26(20): 5246-5256.
- 2) K Kaira, Y Sunose, K Arakawa, T Ogawa, N Sunaga, K Shimizu, H Tominaga, N Oriuchi, H Itoh, S Nagamori, Y Kanai, A Segawa, M Furuya, M Mori, T Oyama, I Takeyoshi. Prognostic significance of L-type amino-acid transporter 1 expression in surgically resected pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2012; 107(4): 632-8.
- 3) Nishikubo K, Ohgaki R#, Liu X, Okanishi H, Xu M, Endou H, Kanai Y#. (# Co-corresponding author) Combination effects of amino acid transporter LAT1 inhibitor nanvuranlat and cytotoxic anticancer drug gemcitabine on pancreatic and biliary tract cancer cells. *Cancer Cell Int.* 2023; 23(1): 116.