

北里大学大学院医療系研究科博士課程 学位論文

**Unique and selective expression of L-amino acid
transporter 1 in human tissue as well as being an aspect of
oncofetal protein**

(L型アミノ酸トランスポーター1のヒト組織における発現の特徴について)

DM09021

仲田 典広

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
生体構造医科学群 細胞組織病理学
指導教授 大部 誠

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨(和文)

L型アミノ酸トランスポーター1 (LAT1)は大型の中性アミノ酸を細胞内に輸送し、脳血管内皮細胞や小腸上皮、腎尿細管、胎児肝細胞の他、様々な悪性腫瘍の細胞膜上に発現していることが知られている。L型アミノ酸トランスポーター2 (LAT2)は、正常人体組織において全身に広く分布していると報告されている。LAT1はその特性から、癌の診断マーカー、化学療法の標的分子など、様々な臨床応用が期待されているが、その発現の局在や意義に関してはまだ不明な部分が多く、LAT2とともに体系的な検索も十分になされていない。そこで我々は、正常の人体組織(成人3例・小児3例・胎児3例)におけるLAT1とLAT2の発現の局在を、免疫組織化学的手法を用いて検索した。結果、胎児において心筋細胞、肝細胞、胸腺上皮細胞、原始神経外胚葉細胞にLAT1が陽性であり、それぞれの成人の組織においてはLAT1の発現はみられなかった。

LAT1のoncofetal proteinとしての性質が示唆された。成人では、LAT1とKi-67の2重免疫染色では消化管粘膜の増殖帯近傍にLAT1の発現を認めた。精巣におけるSertoli細胞、卵巣における卵胞、睪ラ氏島細胞はLAT1強発現を示した。全身の血管内皮細胞はLAT1を発現せずLAT2を発現していたが、例外として血液脳関門、血液卵胞関門、血液網膜関門においてはLAT1の強い発現を認めた。結論として、LAT1は性腺組織や特別な機能を持ったいくつかの組織に発現しており、悪性腫瘍での高い発現性と合わせて考えると、oncofetal proteinとしての性質を持つと言える。さらに、全身の広範な組織におけるLAT2の発現が免疫組織化学的に確認された。

目次

	頁
1. 背景と目的 -----	1
2. 材料と方法	
2-1. 材料 -----	1
2-2. 方法	
2-2-1. 免疫組織化学 -----	2
2-2-2. 二重免疫組織化学 -----	2
2-2-3. 二重蛍光免疫組織化学 -----	3
3. 結果 -----	3
4. 考察 -----	5
5. 結語 -----	7
6. 謝辞 -----	7
7. 引用文献 -----	7
8. 業績目録 -----	14
9. 図表 -----	15

1. 背景と目的

L型システムは、細胞膜を介して大型のアミノ酸を細胞内に取り込む主要な栄養供給システムである。L型アミノ酸トランスポーター1 (LAT1) は大型の中性アミノ酸を輸送する12回膜貫通型の非糖タンパクであり、脳血管内皮や小腸上皮、腎尿細管、胎児肝の他、様々な悪性腫瘍の細胞膜上に発現していることが知られている (Kanai et al., 1998; Nakamura et al., 1999; Prasad et al., 1999; Yanagida et al., 2001; Chrostowski et al., 2009; Ohno et al., 2009)。北里大学をはじめとする研究により、これまでに前立腺癌 (Sakata et al., 2009)、胃癌 (Ichinoe et al., 2011)、肺癌、膵癌 (Nakanishi et al., 2006; Kaira et al., 2009a; Imai et al., 2009; Imai et al., 2010; Yanagisawa et al., 2012) においてLAT1の発現が独立した予後因子になりうること、特に前立腺癌と膵癌では、LAT1の発現は悪性度に関係していることが示された (Sakata et al., 2009; Yanagisawa et al., 2012)。L型アミノ酸トランスポーター2 (LAT2) は、LAT1よりも多彩なアミノ酸を輸送し、正常人体組織において全身に広く分布していると報告されている。LAT1はその特性から、癌の診断マーカー、化学療法の標的分子、選択的な薬物集積を利用した画像診断や放射線治療など、様々な臨床応用が期待されているが、その発現の局在や意義に関してはまだ不明な部分が多く、体系的な検索も十分になされていない (Nawashiro et al., 2006; Kim et al., 2008; Yamauchi et al., 2009; Kaira et al., 2009b; Oda et al., 2010; Wang et al., 2011)。そこで我々は、正常の人体組織(成人・小児・胎児)におけるLAT1の局在を、人体に広く分布するとされているLAT2の発現と合わせ、免疫組織化学的手法を用いて検索した。

2. 材料と方法

2-1. 材料

北里大学病院における過去の剖検症例の中から、多臓器不全や重症感染症、染色体異常のみられない成人と小児の症例をそれぞれ3例ずつ選択した(Table 1)。これらは全て死亡後12時間以内であり、全ての臓器はホルマリン固定後72時間以内に切り出され

た。剖検により得られなかった臓器については、同院の外科病理検体から年齢と性別を合わせて抽出し補完した。また、同院における稽留流産の外科病理検体の組織標本中の胎児のうち、変性や融解の少ないものを3例選択した。これら9症例分の全身諸臓器のホルマリン固定パラフィン包埋後の組織切片を作製した。

2-2. 方法

2-2-1. 免疫組織化学

パラフィン包埋された4 μ m厚の組織切片を脱パラフィンおよび脱水した後、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックするために0.3% H_2O_2 により15分間処理を行った。LAT1の免疫染色には、ここで抗原賦活のためクエン酸バッファ(pH6.0)中でmicrowave処理を15分間行った。Mouse monoclonal 抗LAT1抗体(2 μ g/ml; J-Pharma, Tokyo, Japan)とrabbit polyclonal 抗LAT2抗体(2 μ g/ml; Trans Genic, Kumamoto, Japan)を組織切片上に乗せ4 $^{\circ}$ C下で一晩反応させ、Tris bufferもしくはPBS bufferで5分間3回の洗浄をした後、peroxidase-labeled polymer (Envision, Dako Cytomation, Kyoto, Japan)を30分間反応させた。最後に、3-3'-diaminobenzidine (DAB; Dojindo, Matsushiro, Japan)を反応色素に用い、hematoxylinまたはmethyl-greenで核染色を行った。LAT1とLAT2の正常コントロールとしてそれぞれ正常腎尿細管と膝ラ氏島を用いた。LAT1の内部コントロールとして、活性化したT細胞はLAT1が陽性となるため(Nii et al., 2001; Hayashi et al., 2012)、組織上で浸潤するリンパ球を用いた。間質の線維芽細胞をLAT1とLAT2の陰性コントロールとした。免疫染色を評価するため、各臓器についてLAT1およびLAT2の染色強度を0-3にscore化し検討した。

2-2-2. 二重免疫組織化学

食道、大腸についてLAT1とKi-67との二重免疫染色を行った。上記免疫組織化学同様、組織切片を抗LAT1抗体と二次抗体を用い、DABで反応させた後、切片はKi-67抗原

賦活の目的と交叉反応を防ぐためmicrowaveで5分間処理を行った。さらに、Mouse monoclonal anti-Ki-67抗体(MIB-1, x100 diluted, DAKO Cytomation)を1晩反応させた後、labeled polymerと反応させ、0.07%NiCl₂で発色、methyl greenで核染色を行った。

2-2-3. 二重蛍光免疫組織化学

脳、脾、腎について、LAT1とLAT2との二重蛍光免疫染色を行った。LAT1の賦活のため、0.01MのpH6クエン酸バッファ内で5分間microwave処理を行い、組織切片を抗LAT1抗体と4°C下で1晩反応させた後、Alexa Fluor 488F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG(H+L) (x1,000)と室温下で30分反応させた。PBSで洗浄した後、抗LAT2抗体を乗せ4°Cで1晩置き、rhodamine-conjugated goat anti-rabbit IgG (x200)と室温で30分反応させた。PBS洗浄の後、切片を蛍光顕微鏡(Olympus BX61 + UCB + DP71, Tokyo, Japan)で観察した。

3. 結果

LAT1とLAT2はいずれも細胞膜上に発現を示し、LAT2は主に全身に広く発現を示していたが、LAT1はいくつかの臓器において特殊な局在を示した。検索した全臓器ごとのLAT1とLAT2の染色scoreをTable 2に示した。主要な臓器での局在を以下に示す。

(1) 消化管粘膜：成人、小児、胎児いずれもLAT1およびLAT2の発現を認めた。LAT1は胃、小腸、大腸粘膜の深層または陰窩部に発現がみられたのに対して、LAT2は粘膜表層に発現を認めた。胃粘膜では、胃底腺もまたLAT1とLAT2をともに発現していた(Fig. 1A-a,b)。食道重層扁平上皮粘膜はLAT1、LAT2両者とも基底側に発現を認めた(Fig. 1B-a,b)。食道・大腸ともKi-67とLAT1との二重免疫染色では、LAT1陽性細胞とKi-67陽性細胞は一致しなかった。(Fig. 1B-c, Fig. 1C-c)

(2) 胎児組織：いくつかの胎児組織で、LATの特徴的な発現がみられた。胎児肝細胞にはLAT1が発現していたが(Fig. 2a)、小児・成人の肝細胞では発現を示さなかった。肝の髄外造血巣にもLAT1の強い発現を認めた。また肝細胞にはLAT2の弱い発現もみられた(Fig. 2b)。成人と小児のneuronとgliaにはLAT1の発現を認めなかったが、胎児脳の原始神経外胚葉細胞はLAT1の弱い発現を示した。胎児の心筋細胞はLAT1の発現を示したが(Fig. 2c)、小児ではLAT1の染色スコアは0-1であり、成人では染色スコアは0であった。胎児胸腺におけるLAT1の染色スコアは1-3であった。胎盤では、syncytiotrophoblastはLAT1に強い染色性を示したが、cytotrophoblastはやや弱い染色性を示した。

(3) 血管：脳実質内(Fig. 3b)、網膜(Fig. 3c)、卵巣(Fig. 3a)では毛細血管内皮にLAT1の発現を認めたが、しかしその他の臓器の血管内皮にLAT1の発現は認めなかった。LAT2は全身諸臓器の血管内皮に弱く発現していた。また、二重蛍光免疫染色では脳血管にLAT1とLAT2が共発現していることが示された(Fig. 4a-c)。

(4) 精巣と卵巣：精巣ではLAT1は精祖細胞と精母細胞およびSertoli細胞に発現し、精子にはみられなかった(Fig. 3d)。胎児精細管もまたLAT1に強い染色性を示した(Fig. 2e)。卵巣では、原始卵胞を含む卵胞上皮にLAT1の発現を認めた。

(5) 腎：遠位尿細管にLAT1の強い発現を認め、それに対して近位尿細管にはLAT2の強い発現を認めた。二重蛍光免疫染色でもLAT1とLAT2は相補的な発現を示した(Fig. 4d-f)。

(6) その他の臓器：LAT1とLAT2は、成人・小児・胎児の膝ラ氏島に発現を認めた。ラ氏島の二重蛍光免疫染色ではLAT1とLAT2の共発現を示す細胞、一方のみ発現する細胞がともに観察された(Fig. 4g-i)。下垂体と副腎にLAT1の弱い発現を認めたが、甲

状腺には発現は見られなかった。膵管・膵腺房・下垂体・副腎にLAT1の軽度の発現を認めた。

増殖期子宮内膜の腺上皮にはLAT1の強い発現を認めた。分泌期早期の子宮内膜には弱い発現が観察された。内膜間質にはLAT1発現はみられなかった。

乳腺乳管はLAT1の染色性は0-1のスコアであったが、LAT2の染色スコアは1-2であった。乳腺筋上皮にはLAT1の中等度の発現がみられた。

4. 考察

LAT1とLAT2が細胞膜に発現を示していたことは、アミノ酸を輸送する膜タンパクとしての機能を反映していると考えられる。消化管粘膜でのLAT1発現は増殖帯近傍にみられ、増殖に必要なアミノ酸を取り込む機能を反映し、表層のLAT2は分泌のため多彩なアミノ酸の供給が必要となることに対応している可能性が考えられた。しかしながら食道などの重層扁平上皮粘膜では、細胞の表層分化後のアミノ酸供給は重要でないと考えられる。また、粘膜基底側の増殖帯近傍でのLAT1発現とKi67 labelingとの不一致から、未分化な細胞におけるアミノ酸供給は増殖のためだけでなく他の機能にも関与していることが示唆された。また、胃粘膜においては胃底腺の壁細胞にLAT2が陽性となったが、LAT2は胃粘液の分泌に関与しているとの報告があり(Kirchhoff et al., 2005)、これらの所見は機能的発現として合致する。腎尿細管においては、LAT1およびLAT2はアミノ酸の再吸収に関与していることが報告されており(Rossier et al., 1999; Fernandez et al., 2003)、今回の結果ではその局在が明らかとなった。

血管におけるLAT1の発現は、脳、網膜、卵巣に限られ、それぞれ血液脳関門、血液網膜関門、血液卵胞関門を構成する血管であることから、血管内皮細胞のbarrierとしての働きを維持する重要な役割を担っていることが示唆される(Boado et al., 1999; Kageyama et al., 2000; Matsuo et al., 2000; Mann et al., 2003; Tomi et al., 2005; Makrides et al., 2007; Zhou et al., 2007)。さらに精巣においては血液精巣関門

を構成するSertoli細胞にLAT1が発現しており(Pelletier and Byers, 1992)、これら血液関門において神経伝達物質の供給(Boado et al., 1999; Kageyama et al., 2000; Matsuo et al., 2000; Tomi et al., 2005)や卵胞形成(Lui et al., 2003; Zhou et al., 2007)、精子形成(Yazama et al., 2008)など機能的な役割を担っていることが示唆された。臍ラ氏島と胎盤でのsyncytiotrophoblastにおけるLAT1発現も、LAT1の機能的な役割を反映していると考えられた。

LAT1とLAT2の発現は、成人と小児では類似した結果となったが、心筋、肝細胞、胸腺上皮、原始神経外胚葉細胞においてLAT1の発現は胎児にのみ確認された。一方、LAT1はproto-oncogeneである*C-Myc*との関与が報告されており(Hayashi et al., 2012)、様々な悪性腫瘍においてLAT1が強発現していることから、LAT1はoncofetal proteinとしての性質を有していると考えられた。

LAT1の機能的発現には4F2 heavy chain(4F2hc, CD98)を要する。4F2hcはNorthern blot解析によると全身の組織に広範に発現していること(Yanagida et al., 2001)、LAT1発現と4F2hcには癌組織において密接な関係がある(Kaira et al., 2008)ため、正常組織での4F2hcの検索は行わなかった。胎盤、腎、精巣でのLAT1の強い発現とそれらの組織での4F2hcの高レベルの発現はこれまでに報告されている(Yanagida et al., 2001)。

LAT1を阻害することによる抗腫瘍効果は細胞株や動物実験で報告されており、臨床応用が期待されている。今回の結果により、LAT1を阻害した際に考えられる副作用として、消化管粘膜障害、腎機能障害、骨髄抑制、免疫抑制、性腺機能低下、不妊、視覚障害、神経症状などが挙げられる。さらにLAT1はアミノ酸と構造的に類似したL-DOPA、gabapentin、 α -methyl-DOPA、甲状腺ホルモンなども輸送するため(Kageyama et al., 2000; Gomes and Soares-da-Silva, 2002; Uchino et al., 2002; Kuhne et al., 2007)、これら薬剤との関与も考慮しなければならない。しかし今回、LAT2が全身諸臓器にubiquitousに発現していることが免疫組織化学的に確認され、LAT1を阻害してもLAT2によるアミノ酸供給により正常組織は生存できる可能性が

示唆された。加えて、我々の行ったNorthern blot analysisでは、全身の多くの組織においてLAT2のsignalが検出された(unpublished data)。さらに、*in vivo*のmouseの実験では、LAT1阻害薬の連続投与により副作用なく腫瘍の発育が抑制されたと報告されている(Oda et al., 2010)。LAT1が阻害された際には、LAT2が代わって細胞の栄養を担うと考えられる。LAT1関連の薬剤を臨床応用する際にはいくつかの点を考慮する必要があるが、我々の今回の研究結果が各重要臓器における指針を提供できると考える。

5. 結語

成人、小児、胎児の全身諸臓器についてLAT1とLAT2の発現を免疫組織化学的に検討し、LAT1が独特で選択的な発現を示すことが明らかとなった。大型アミノ酸供給は増殖のためだけでなく機能的にも利用されていることが示唆された。さらに、胎児にのみ見られたいくつかの臓器における強いLAT1発現は、悪性腫瘍での強い発現を合わせて考慮すると、oncofetal proteinとしての性質を反映しているものと推測される。

6. 謝辞

社会人特別枠という限られた時間の中、病理学の基礎となる解剖、診断、研究をさせて頂きましたが、皆様の懇切丁寧なご指導のおかげで、様々な診断技術や研究技術を習得することが出来ました。退官されてからも終始御指導下さった岡安名誉教授、快く後任を引き受けて下さった大部教授、研究手法など直接指導下さった三上准教授並びに諸先生方、また単位変遷の中病理学研究室内で多大なるご配慮を下さった三枝教授、村雲教授に対して心より御礼申し上げます。

7. 引用文献

Babu E., Kanai Y., Chairoungdua A., Kim D.K., Iribe Y., Tangtrongsup S., Jutabha P.,

- Li Y., Ahmed N., Sakamoto S., Anzai N., Nagamori S. and Endou H. (2003). Identification of a novel system L amino acid transporter structurally distinct from heterodimeric amino acid transporters. *J. Biol. Chem.* 278, 43838–43845.
- Blando J., Portis M., Benavides F., Alexander A., Mills G., Dave B., Conti C.J., Kim J. and Walker C.L. (2009). PTEN deficiency is fully penetrant for prostate adenocarcinoma in C57BL/6 mice via mTOR-dependent growth. *Am. J. Pathol.* 174, 1869–1879.
- Boado R.J., Li J.Y., Nagaya M., Zhang C. and Pardridge W.M. (1999). Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96, 12079–12084.
- Chrostowski M.K., McGonnigal B.G., Stabila J.P. and Padbury J.F. (2009). LAT-1 expression in pre- and post-implantation embryos and placenta. *Placenta* 30, 270–276.
- Detta A. and Cruickshank G.S. (2009). L-amino acid transporter-1 and boronophenylalanine-based boron neutron capture therapy of human brain tumors. *Cancer Res.* 69, 2126–2132.
- Fernández E., Torrents D., Chillarón J., Martín Del Río R., Zorzano A. and Palacín M. (2003). Basolateral LAT-2 has a major role in the transepithelial flux of L-cystine in the renal proximal tubule cell line OK. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 837–47.
- Fraga S., Pinho M.J. and Soares-da-Silva P. (2005). Expression of LAT1 and LAT2 amino acid transporters in human and rat intestinal epithelial cells. *Amino Acids* 29, 229–233.
- Gomes P. and Soares-da-Silva P. (2002). Na⁺-independent transporters, LAT-2 and b⁰,⁺, exchange L-DOPA with neutral and basic amino acids in two clonal renal cell lines. *J. Membr. Biol.* 186, 63–80.
- Guertin D.A. and Sabatini D.M. (2007). Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer*

Cell 12, 9–22.

Hayashi K., Jutabha P., Endou H., Anzai N. (2012). c-Myc is crucial for the expression of LAT1 in MIA Paca-2 human pancreatic cancer cells. *Oncol Rep.* 28, 862-866.

Ichinoe M., Mikami T., Yoshida T., Igawa I., Tsuruta T., Nakada N., Anzai N., Suzuki Y., Endou H. and Okayasu I. (2011). High expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in gastric carcinomas: comparison with non-cancerous lesions. *Pathol. Int.* 61, 281–289.

Imai H., Kaira K., Oriuchi N., Shimizu K., Tominaga H., Yanagiotani N., Sunaga N., Ishizuka T., Nagamori S., Promchan K., Nakajima T., Yamamoto N., Mori M. and Kanai Y. (2010). Inhibition of L-type amino acid transporter 1 has antitumor activity in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 30, 4819–4828.

Imai H., Kaira K., Oriuchi N., Yanagitani N., Sunaga N., Ishizuka T., Kanai Y., Endou H., Nakajima T. and Mori M. (2009). L-type amino acid transporter 1 expression is a prognostic marker in patients with surgically resected stage I non-small cell lung cancer. *Histopathology.* 54, 804–813.

Kaira K., Oriuchi N., Imai H., Shimizu K., Yanagitani N., Sunaga N., Hisada T., Ishizuka T., Kanai Y., Nakajima T. and Mori M. (2009a). Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (CD98) expression in stage I pulmonary adenocarcinoma. *Lung Cancer* 66, 120–126.

Kaira K., Oriuchi N., Imai H., Shimizu K., Yanagitani N., Sunaga N., Hisada T., Tanaka S., Ishizuka T., Kanai Y., Endou H., Nakajima T., and Mori M. (2008). L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression in primary and metastatic sites of human neoplasms. *Cancer Sci.* 99, 2380-2386.

Kaira K., Oriuchi N., Shimizu K., Ishikita T., Higuchi T., Imai H., Yanagitani H.,

Sunaga N., Hisada T., Ishizuka T., Kanai Y., Endou H., Nakajima T., Endou K. and Mori M. (2009b). Evaluation of thoracic tumors with ^{18}F -FMT and ^{18}F -FDG PET-CT: a clinicopathological study. *Int. J. Cancer* 124, 1152–1160.

Kageyama T., Nakamura M., Matsuo A., Yamasaki Y., Takakura Y., Hashida M., Kanai Y., Naito M., Tsuruo T., Minato N. and Shimohama S. (2000). The 4F2hc/LAT1 complex transports L-DOPA across the blood-brain barrier. *Brain Res.* 879, 115–121.

Kanai Y., Segawa H., Miyamoto K., Uchino H., Takeda E. and Endou H. (1998). Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J. Biol. Chem.* 273, 23629–23632.

Kim C.S., Cho S.H., Chun H.S., Lee S.Y., Endou H, Kanai Y. and Kim K.D. (2008). BCH, an inhibitor of system L amino acid transporters, induces apoptosis in cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1096–1100.

Kirchhoff P., Dave M.H., Remy C., Kosiek O., Busque S.M., Dufner M., Geibel J.P., Verrey F. and Wagner C.A. (2006). An amino acid transporter involved in gastric acid secretion. *Pflugers Arch.* 451, 738-748.

Kühne A., Kaiser R., Schirmer M., Heider U., Muhlke S., Niere W., Overbeck T., Hohloch K., Trumper L., Sezer O. and Brockmoller J. (2007). Genetic polymorphisms in the amino acid transporters LAT1 and LAT2 in relation to the pharmacokinetics and side effects of melphalan. *Pharmacogenet. Genomics* 17, 505–517.

Lan H.Y., Mu W., Nikolic-Paterson D.J. and Atkins R.C. (1995). A novel, simple, reliable, and sensitive method for multiple immunoenzyme staining: use of microwave oven heating to block antibody crossreactivity and retrieve antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 43, 97-102.

Lui W.Y., Mruk D., Lee W.M. and Cheng C.Y. (2003). Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 68, 1087–1097.

Maehama T. and Dixon J.E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate. *J. Biol. Chem.* 273, 13375–13378.

Makrides V, Bauer R., Weber W., Wester H.J., Fischer S., Hinz R., Hunggel K., Opfermann B.T., Herzau M., Ganapathy V., Verrey F. and Brust P. (2007). Preferred transport of O-(2-[18F]fluoroethyl)-D-tyrosine (D-FET) into the porcine brain. *Brain Res.* 1147, 25–33.

Mann G.E., Yudilevich D.L. and Sobrevia L. (2003). Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* 83, 183–252.

Matsuo H., Tsukada S., Nakata T., Chairoungdua A., Kim D.K., Cha S.H, Inatomi J., Yorifuji H., Fukuda J., Endou H. and Kanai Y. (2000) Expression of a system L neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Neuroreport* 11, 3507–3511.

Nakamura E., Sato M., Yang H., Miyagawa F., Harasaki M., Tomita K., Matsuoka S., Noma A., Iwai K. and Minato N. (1999). 4F2(CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer, *J. Biol. Chem.* 274, 3009–3016.

Nakanishi K., Matsuo H., Kanai Y., Endou H., Hiroi S., Tominaga S., Mukai M., Ikeda E., Ozeki Y., Aida S. and Kawai T. (2006). LAT1 expression in normal lung and in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *Virchows Arch.* 448, 142–50.

Nawashiro H., Otani N., Shinomiya N., Fukui S., Ooigawa H., Shima K., Matsuo H., Kanai Y. and Endou H. (2006). L-type amino acid transporter 1 as a potential molecular target in human astrocytic tumors. *Int. J. Cancer* 119, 484–492.

Nii T., Segawa H., Taketani Y., Tani Y., Ohkido M., Kishida S., Ito M., Endou H., Kanai Y., Takeda E. and Miyamoto K. (2001). Molecular events involved in

up-regulating human Na⁺-independent neutral amino acid transporter LAT1 during T-cell activation. *Biochem. J.* 358, 693-704.

Oda K., Hosoda N., Endo H., Saito K., Tsujihara K., Yamamura M., Sakata T., Anzai N., Wempe N.F., Kanai Y. and Endou H. (2010). L-type amino acid transporter 1 inhibitors inhibit tumor cell growth. *Cancer Sci.* 101, 173–179.

Ohno C., Nakanishi Y., Honma T., Henmi A., Sugitani M., Kanai Y. and Nemoto N. (2009) Significance of system L amino acid transporter 1 (LAT-1) and 4F2 heavy chain (4F2hc) expression in human developing intestine. *Acta. Histochem. Cytochem.* 42, 73–81.

Pelletier R.M. and Byers S.W. (1992). The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc. Res. Tech.* 20, 3–33.

Pineda M, Fernández E., Torrents D., Estevez R., Lopez C., Camps M., Lloberas J., Zorzano A. and Palacin M. (1999). Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J. Biol. Chem.* 274, 19738–19744.

Prasad P.D., Wang H., Huang W., Kekuda R., Rajan D.P., Leibach F.H. and Ganapathy V. (1999). Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: molecular cloning and transport function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 283–288.

Rossier G., Meier C., Bauch C., Summa V., Sordat B., Verrey F. and Kuhn L.C. (1999). LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J. Biol. Chem.* 274, 34948–34954.

Sakata T., Ferdous G., Tsuruta T., Satoh T., Baba S., Muto T., Ueno A., Kanai Y., Endou H. and Okayasu I. (2009). L-type amino-acid transporter 1 as a novel biomarker for high-grade malignancy in prostate cancer. *Pathol. Int.* 59, 7–18.

Segawa H., Fukasawa Y., Miyamoto K., Takeda E., Endou H. and Kanai Y. (1999) Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J. Biol. Chem.* 274, 19745–19751.

Stambolic V., Suzuki A., de la Pompa J.L., Brothers G.M., Mirtsos C., Sasaki T., Ruland J., Penninger J.M., Siderovski D.P. and Mak T.W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95, 29–39.

Tomi M., Mori M., Tachikawa M., Katayama K, Terasaki T. and Hosoya K. (2005). L-type amino acid transporter 1-mediated L-leucine transport at the inner blood-retinal barrier. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 2522–2530.

Uchino H., Kanai Y., Kim D.K., Wempe M.F., Chairoungdua A., Morimoto E., Anders M.W. and Endou H. (2002). Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition. *Mol. Pharmacol.* 61, 729–737.

Wang Q., Bailey C.G., Ng C., Tiffen J., Thoeng A., Minhas V., Lehman M.L., Hendy S.G., Buchanan G., Nelson C.G., Rasko J.E. and Holst J. (2011). Androgen receptor and nutrient signaling pathways coordinate the demand for increased amino acid transport during prostate cancer progression. *Cancer Res.* 71, 7525–7536.

Yamauchi K., Sakurai H., Kimura T., Wiriyasermkul P., Nagamori S., Kanai Y. and Kohno N. (2009). System L amino acid transporter inhibitor enhances anti-tumor activity of cisplatin in a head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Cancer Lett.* 276, 95–101.

Yanagida O., Kanai Y., Chairoungdua A., Kim D.K., Segawa H., Nii T., Cha S.H., Matsuo H., Fukushima J., Fukasawa Y., Tani Y., Taketani Y, Uchino H, Kim J.Y., Inatomi J, Okayasu I., Miyamoto K., Takeda E., Goya T. and Endou H. (2001). Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim. Biophys. Acta.* 1514, 291–302.

Yanagisawa N., Ichinoe M., Mikami T., Nakada N., Hana K., Koizumi W., Endou H., Okayasu I. (2012). High expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) predicts poor prognosis in pancreatic ductal carcinomas. J Clin Pathol. In print.

Yazama F. (2008) Continual maintenance of the blood-testis barrier during spermatogenesis: the intermediate compartment theory revisited. J. Reprod. Dev. 54. 299–305.

Zhou H., Ohno N., Terada N., Saitoh S., Fujii Y. and Ohno S. (2007). Involvement of follicular basement membrane and vascular endothelium in blood follicle barrier formation of mice revealed by 'in vivo cryotechnique.' Reproduction 134, 307–317.

8. 業績目録

1. Nakada N, Mikami T, Hana K, Ichinoe M, Yanagisawa N, Yoshida T, Endou H and Okayasu I : Unique and selective expression of L-amino acid transporter 1 in human tissue as well as being an aspect of oncofetal protein. Histol Histopathol. in press.

2. Xu CJ, Mikami T, Nakamura T, Tsuruta T, Nakada N, Yanagisawa N, Jiang SX and Okayasu I : Tumor budding, myofibroblast proliferation, and fibrosis in obstructing colon carcinoma: The roles of Hsp47 and basic fibroblast growth factor. Pathol Res Pract. in press.

3. Yanagisawa N, Ichinoe M, Mikami T, Nakada N, Hana K, Koizumi W, Endou H and Okayasu I : High expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinomas. J Clin Pathol. 2012, 65:1019-23.

4. Ichinoe M, Mikami T, Yoshida T, Igawa I, Tsuruta T, Nakada N, Anzai N, Suzuki Y, Endou H and Okayasu I : High expression of L-type amino-acid transporter 1 (LAT1) in gastric carcinomas: comparison with non-cancerous lesions. Pathol Int. 2011, 61:281-9.

5. Mikami T, Yoshida T, Numata Y, Kikuchi M, Araki K, Nakada N and Okayasu I : Invasive behavior of ulcerative colitis-associated carcinoma is related to reduced expression of CD44 extracellular domain: comparison with sporadic colon carcinoma. Diagn Pathol. 2011, 7;6:30.

9. 図表

Table 1. Clinicopathological information for six autopsy cases and three fetuses.

Patient	Age	Gender	Autopsy diagnosis
Adult	18 years	M	Acute myeloid leukemia
	69 years	F	Idiopathic interstitial pneumonia
	71 years	M	Mediastinal carcinoid and squamous cell carcinoma
Child	2 days	F	Intracranial hemorrhage
	1 month	M	Disseminated intravascular coagulation
	1 month	M	Respiratory distress syndrome
Fetus	11 weeks	M	Missed abortion
	12 weeks	U	Missed abortion
	20 weeks	U	Missed abortion

M, male; F, female; U, unknown

In two fetal cases, sex organs were undefinable.

Table 2. LAT1 and LAT2 immunoreactive intensity scores for fetuses, children, and adults.

Organ		LAT1 score			LAT2 score		
		Adult	Child	Fetus	Adult	Child	Fetus
Heart	Cardiac muscle	0	0	1-2	1	1	0-1
Lung	Alveolar epithelium	0	0	NA	2	1	0-1
	Bronchiolar epithelium	0	1	1-2	1-2	1	1
Esophagus	Epithelium	3*	3*	2 (n = 1)*	2-3*	1-2*	0 (n = 1)*
Stomach	Epithelium	2-3†	3†	1-2†	2-3†	2†	0-1†
	Fundic gland	1-2†	2†	NA	1†	1-2†	NA
Small intestine	Epithelium	2†	2-3†	2-3†	1-3†	2-3†	1-3†
Colon	Epithelium	2-3†	2†	1-2†	1-3†	2-3†	1-3†
Liver	Hepatocyte	0	0	1-2	1	1-2	0-1
	Bile duct epithelium	0	0	0	1	1	0
	Extramedullary hematopoiesis	NA	NA	2-3	NA	NA	0-1
Gallbladder	Epithelium	0	0	NA	1-2	1	NA
Pancreas	Exocrine acini	0	0	0	1-2	0-1	1
	Islet cell	2-3	2-3	1 (n = 2)	1-2	1	1-2 (n = 2)
Pituitary	Anterior lobe	1	NA	1	1	NA	1-2
	Posterior lobe	1	NA	1 (n = 1)	1	NA	1 (n = 1)
Thyroid	Follicular epithelium	0	0	NA	1-2	0-1	NA
Adrenal gland	Cortex	1-2	1-2	0-1 (n = 2)	1-2	1-2	1 (n = 2)
	Medulla	0	1-2	2 (n = 1)	1	1	1-2 (n = 1)
Bone marrow	Hematopoietic cell	1	2-3**	2-3**	1-2	1**	1**
Spleen	Lymphocyte	2	2	2-3	0	0	0
Thymus	Thymic epithelial cell	0	0-1	2	1	1-2	0-1
	Lymphocyte	2	1-2	1-2	1	0	0-1
Kidney	Proximal tubule	0	0	0 (n = 2)	3	2-3	1-2 (n = 2)
	Distal tubule	3	2	2 (n = 2)	0-1	1	1 (n = 2)
	Glomerulus	0	0	0 (n = 2)	0-1	0	0 (n = 2)
Urinary bladder	Urothelial epithelium	0-1	0-1	NA	1-2	1	NA
Testis	Spermatogonia	2	2-3	NA	1-2	1	NA
	Spermatid	2	2	NA	1-2	1	NA
	Sperm	0	0	NA	0	0	NA
	Sertoli cell	2-3	3	3 (n = 1)	1	1	1 (n = 1)
	Leydig cell	0	0	0 (n = 1)	0	0	0 (n = 1)
	Epigenital tubule (primitive)	NA	NA	3	NA	NA	1
Prostate	Prostatic gland	0-1	NA	NA	1-2	NA	NA
Breast	Ductal epithelium	0-1	NA	NA	1-2	NA	NA
Ovary	Ovum	0	NA	NA	0	NA	NA
	Theca cell	0	NA	NA	1	NA	NA
Endometrium	Follicular epithelium	2	NA	NA	0-2	NA	NA
	Epithelium	2-3	NA	NA	1-2	NA	NA
Endometrium proliferative phase	Stroma	0	NA	NA	1	NA	NA
Endometrium secretory phase	Epithelium	0-1	NA	NA	2	NA	NA
Placenta	Stroma	0	NA	NA	1	NA	NA
	Syncytiotrophoblast	3	NA	NA	1	NA	NA
Brain	Cytotrophoblast	2	NA	NA	1-2	NA	NA
	Glial cell	0	0	NA	0	0	NA
	Neuron	0	0	NA	0	0	NA
	Ependymal cell	2-3	0 (n = 1)	0-1	1-2	1 (n = 1)	0-1
	Primitive neuroectodermal cells	NA	NA	1	NA	NA	0
Capillary	Brain	3	3	3	1	1-2	0-1
	Ovary	2	1 (n = 1)	NA	1	1 (n = 1)	NA
	Choroid plexus	0	0	NA	1	1	NA
	Retina	2	2	NA	1-2	1	NA
	Others	0	0	0	1	1	1
Skin	Epidermis	2-3	NA	NA	1	NA	NA
	Sebaceous gland	2-3	NA	NA	1	NA	NA
	Sweat gland	0	NA	NA	1	NA	NA

NA, not available. *In esophageal mucosa, both LAT1 and LAT2 were located in the lower zone. †In gastric mucosa, small intestine, and colonic mucosa, LAT1 was located in lower zones, while LAT2 was found on mucosal surfaces. **In fetus and child cases, the intensity score for hematopoietic cells was evaluated in liver as extramedullary hematopoiesis.

Figure legends

Fig. 1. (A) LAT1 staining (a) of adult gastric mucosa, with LAT2 staining (b). Note that parietal cells are positive for LAT2 (arrows). **(B)** Serial sections of an adult esophageal mucosa, stained for LAT1 (a; arrow, intensity score 3) and LAT2 (b; arrow, intensity score 2). Both LAT1 and LAT2 are clearly positive in the basal layer. Double immunohistochemistry stained for LAT1 and Ki-67 (c). Although LAT1 positive cells (brown color-cell membrane) are located at the basal layer, Ki-67 positive cells (blue nickel color-nucleus) are distributed at the parabasal layer, different from LAT1-positive cells. **(C)** Serial sections of an adult colonic mucosa, stained for LAT1 (a) and LAT2 (b; arrow, intensity score 1). The cell membrane at the crypt base is positive with brown color. Double immunohistochemistry for LAT1 and Ki-67 (c) shows that LAT1 positive cells (brown color-cell membrane) and Ki-67 positive cells (blue nickel color-nucleus) are clearly separated at the crypt base. Bars: (A) 200 μ m, (B, C) 50 μ m.

Fig. 2. Fetal hepatocytes (arrows) are strongly immunoreactive for LAT1 (a) but weakly for LAT2 (b). Cardiac muscle cells of a fetus show weak expression of LAT1 (c). Thymic epithelial cell of a fetus showed moderate expression of LAT1 (d). Seminiferous tubules of a fetus showed strong expression of LAT1 (e). Trophoblasts showing strong LAT1 expression (f). Bars: (a, d) 25 μ m, (b, c, e, f) 50 μ m.

Fig. 3. LAT1 staining of an adult ovary (a). Note the immunoreactions in the endothelium. Ovarian stromal cells are negative for LAT1. An LAT1 stained adult brain is shown (b). While the endothelium of small vessels in the subarachnoid space is negative (arrowhead), the endothelium of capillaries in the brain parenchyma is positive (arrows). LAT1 staining of an adult retina (c). The endothelium of capillaries

shows moderate LAT1 expression (arrows), while the endothelium of capillaries in choroid does not show LAT1 expression (arrowhead). Spermatogonia, spermatids, and Sertoli cells of an adult showing strong LAT1 expression, although Leydig cells are negative (d, intensity score 0). Bars: (a, b, d) 100 μ m, (c) 200 μ m.

Fig. 4. Double immunofluorescence-stained images showing LAT1 (a, d, g; FITC, green) and LAT2 (b, e, h; rhodamine, red) (c, f, i; merged). Brain vessels (arrows) strongly express LAT1 and partially co-express both LAT1 and LAT2 (a, b, c). Note that LAT1 and LAT2 expression is complementary between the distal and proximal tubules (d, e, f). Pancreatic islet cells partially co-express both LAT1 and LAT2 (g, h, i). Bars: (a, b, c) 50 μ m, (d, e, f, g, h, i) 100 μ m.

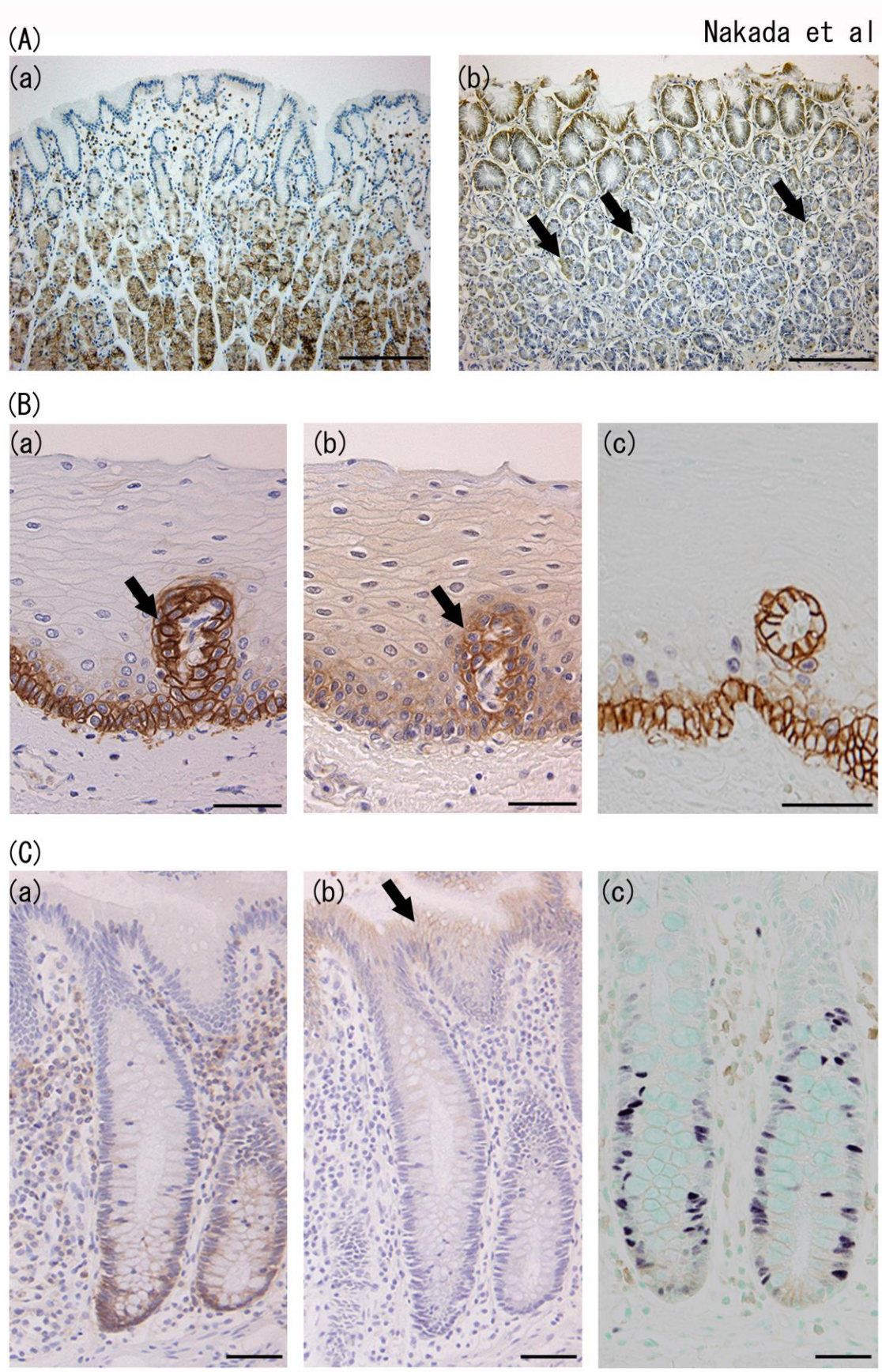


Figure 1

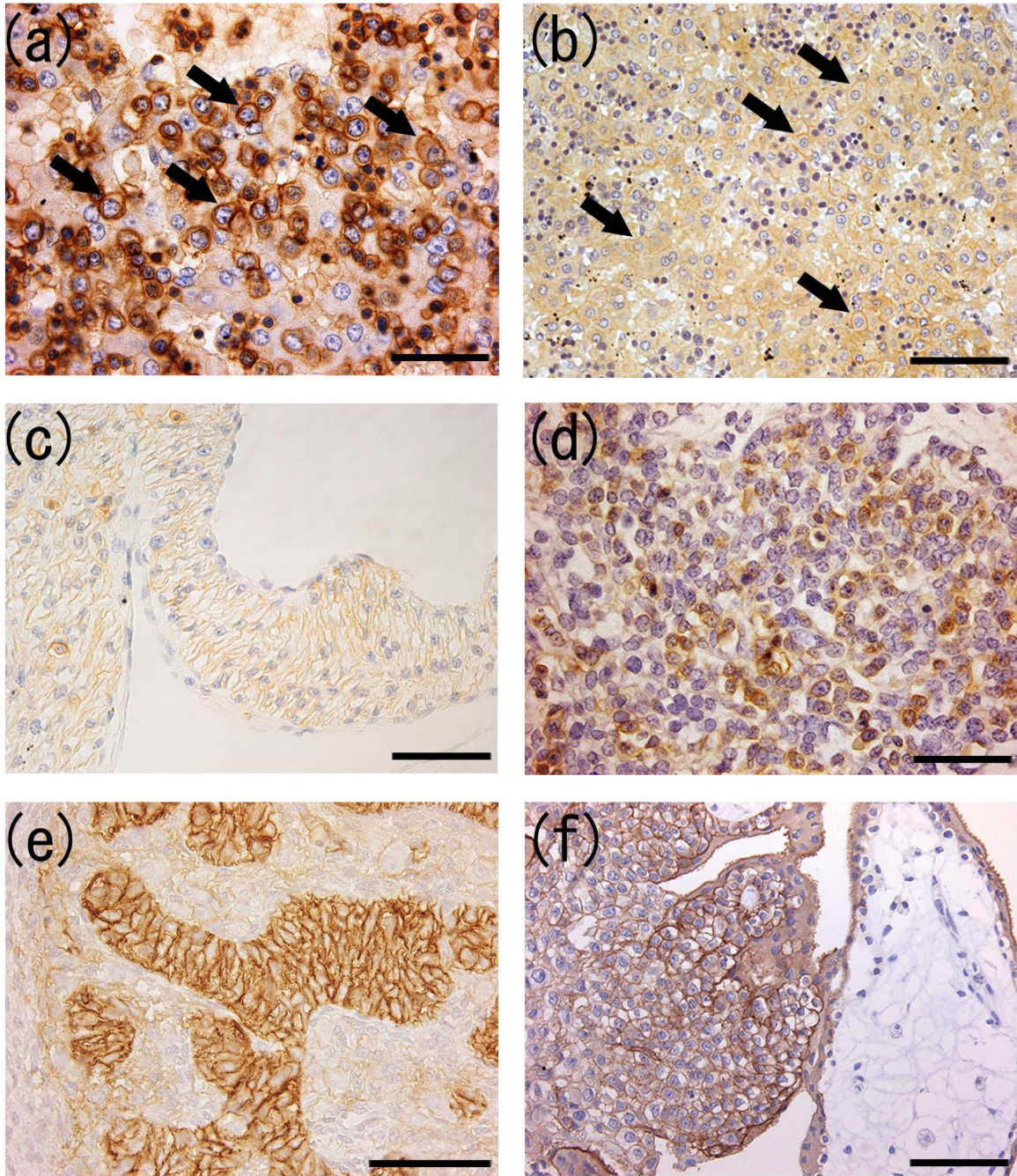


Figure 2

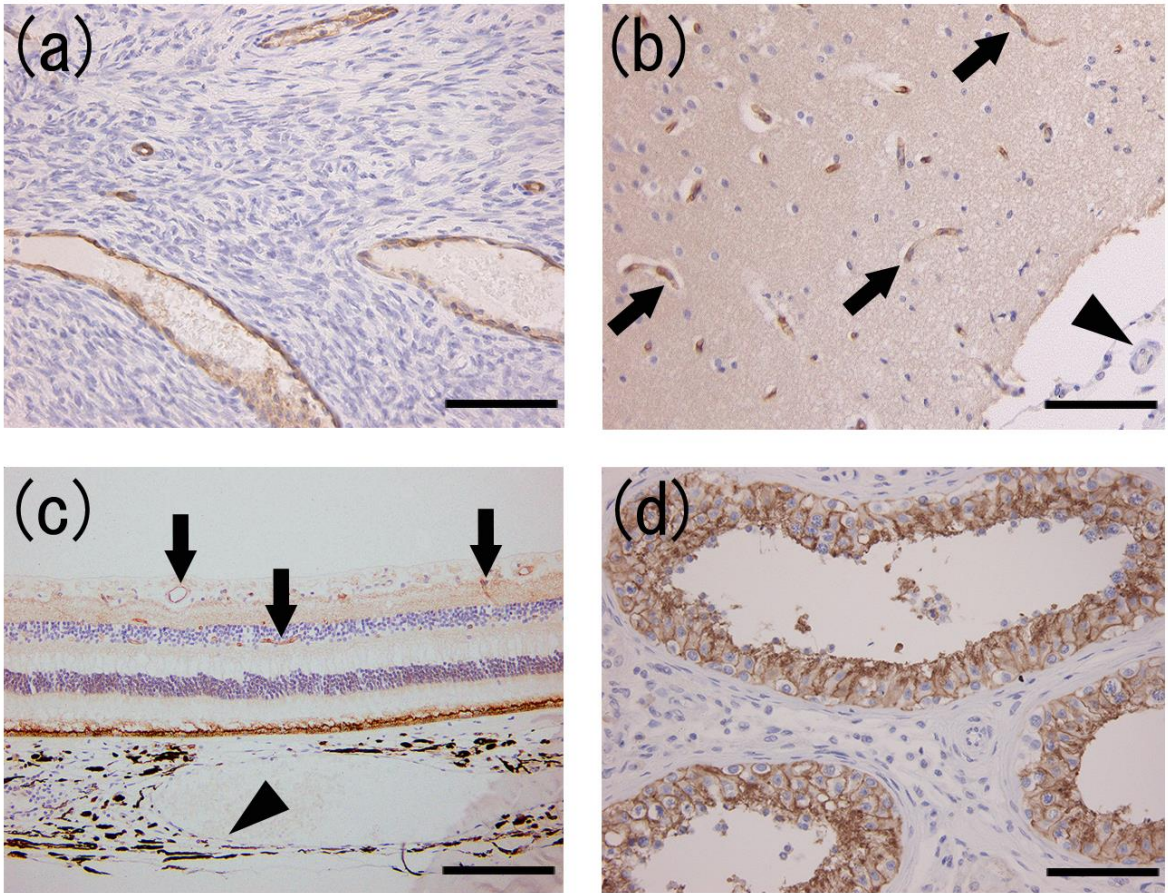


Figure 3

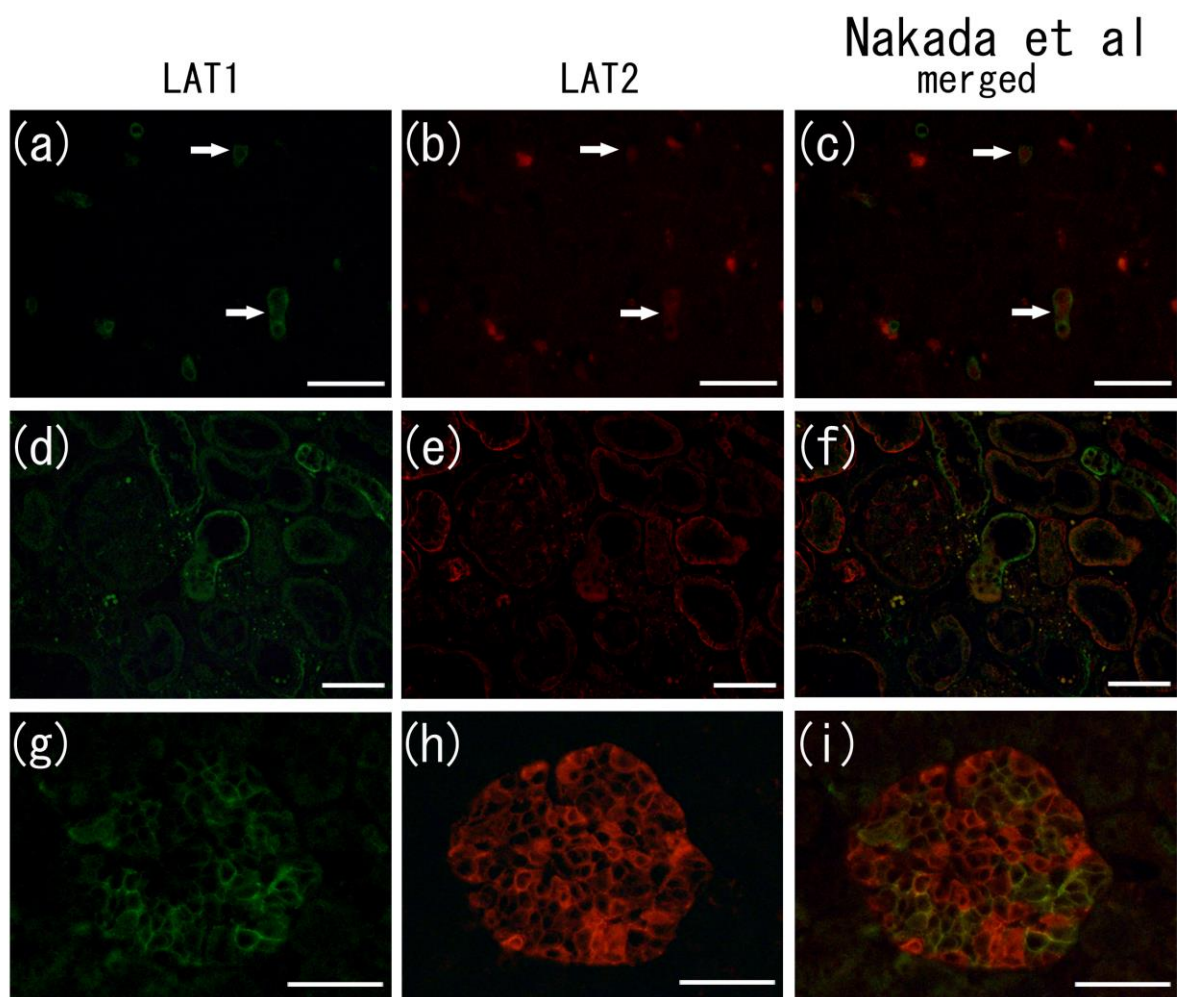


figure 4