

02-148 菊原 智子

(指導教員：川井恵一 教授 吉本光喜 助手)

要旨：蛋白質合成の亢進により腫瘍に高く集積する標識アミノ酸誘導体が、新たな腫瘍診断薬として注目されている。標識アミノ酸誘導体の腫瘍への集積および対周辺組織比の向上には、腫瘍およびアミノ酸の主要排泄経路である腎におけるアミノ酸輸送機構の解明が重要である。アミノ酸トランスポーターは多彩なアミノ酸の分子構造を反映し多種多様であるが、その基質となるアミノ酸側鎖の電気的親和性と輸送の $\text{Na}^+$ 依存性の有無によって十数種類の輸送系に分類される。本研究では、近位尿細管由来細胞 LLC-PK<sub>1</sub>を用いた透過膜阻害実験およびマイクロアレイによる遺伝子解析を通して、腫瘍診断薬の開発に主眼をおいたアミノ酸トランスポーターの解析を行った。

アミノ酸輸送系の阻害剤を用いて、刷子縁膜と基底膜を有する極性細胞である LLC-PK<sub>1</sub>の単層膜でアミノ酸の競合阻害実験を行った結果、腎におけるアミノ酸の輸送には複数の輸送系が同時に関与していることが判明した。また、ヒト腫瘍細胞およびマウス正常組織細胞の遺伝子解析により、細胞に発現するアミノ酸トランスポーターの種類とその発現率が明らかになり、各細胞におけるアミノ酸輸送機構の特徴が示された。これらの結果より、腫瘍細胞における発現率が高い輸送系の基質となるアミノ酸誘導体を腫瘍診断薬として用いることで、腫瘍検出効率の向上が期待される。

## I. はじめに

現在、腫瘍診断用 PET 製剤として、ブドウ糖類似体である <sup>18</sup>F-FDG (2-fluoro-2-deoxy-D-glucose) が用いられている。これは腫瘍における糖代謝の亢進を集積機序とした診断薬であるが、欠点として脳などの糖代謝の盛んな正常組織にも高く集積すること、炎症にも集積すること、膀胱への排泄が高いことが挙げられ、脳や膀胱周辺の腫瘍の検出および腫瘍と炎症の鑑別に障害が伴う。そこで、腫瘍細胞では蛋白合成も亢進していることに着目し、その原料となるアミノ酸を腫瘍診断薬として応用する試みが注目され、一部の標識アミノ酸は FDG よりも脳への集積や腎排泄が低いことから脳腫瘍や前立腺癌の診断に有効であると期待されている。

近年、アミノ酸輸送機構の研究が進み、アミノ酸分子構造の多様性を反映した多くのアミノ酸トランスポーターの存在が明らかにされた。これらのトランスポーターは輸送されるアミノ酸分子の側鎖の電気的性状および輸送の $\text{Na}^+$ 依存性の有無によっていくつかの輸送系に分類される<sup>1,2)</sup>。本研究では、トランスポーター活性が最も高い中性アミノ酸トランスポーターの中から、 $\text{Na}^+$ 依存性の system A、 $\text{Na}^+$ 非依存性の system L を選択し、加えて基質特異性の低い有機酸輸送系 (organic anion transporter, OAT) および有機塩基輸送系 (organic cation transporter, OCT) に着目し、腫瘍診断用標識アミノ酸誘導体の開発を目的としたアミノ酸トランスポーターの解析を行った。

## II. 腎尿細管単層膜を用いた輸送阻害実験

標識アミノ酸誘導体の腫瘍対正常組織比の向上には、血液中からの速やかなクリアランスが重要である。腎におけるアミノ酸輸送機構の解明を目的とし、以下の実験を行った。

### A) 実験材料と方法

[1-<sup>14</sup>C]- $\alpha$ -(methylamino)-isobutyric acid (MeAIB, Sigma) および[S-methyl-<sup>3</sup>H]-L-methionine (L-Met, 室町薬品) を組み合わせたダブルトレーサー法で測定を行い、system A 阻害剤として L-alanine (L-Ala, 協和醗酵工業)、system L 阻害剤として L-leucine (L-Leu, 協和醗酵工業) および 2-amino-2-norbornane-carboxylic acid (BCH, Sigma)、OAT 阻害剤として probenecid (PBC, Sigma)、OCT 阻害剤として tetraethylammonium (TEA, Nacalai tesque) を用いた。腎におけるアミノ酸の光学異性体認証の有無の観点から、D-Ala および D-Leu (Nacalai tesque) も加え実験を行った。

ブタ近位尿細管由来細胞 LLC-PK<sub>1</sub> を用いる輸送・集積阻害実験は Shikano らの方法<sup>3)</sup>に準じて行った。LLC-PK<sub>1</sub> を多孔性フィルターに播種し、トランスウェルチャンバーの中で 10% fatal calf serum (FBS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を培養液として 5%CO<sub>2</sub>、37°C で培養し、単層膜を形成させた。培養液は外側 (基底膜側) に 1.5ml、内側 (刷子縁膜側) に 2.6ml 加えた。単層膜の両側の培養液を取り除き、pH7.4 に調整した取り込み液 (137mM NaCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5mM MgCl<sub>2</sub> を含む Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS)) 2ml で 37°C、10 分間インキュベートし、基底膜側または刷子縁膜側に阻害剤 100μl およびトレーサー 20μl を加えて 37°C、90 分間インキュベートした。トレーサーを添加していない側より 50μl ずつ分取し、放射能を液体シンチレーションカウンター (Aloka:LSC-5100) で計測して経細胞輸送を測定した。次に、残りの取り込み液を除き、PBS 500ml で両膜面を 2 回洗い、0.2M NaOH 1ml で溶かした細胞を 400μl 分取し、同様に細胞への集積を測定した。

## B) 結果と考察

Fig. 1 に MeAIB と L-Met の投与量に対する経細胞輸送および集積量を示す。基底膜側から刷子縁膜側への輸送を分泌、刷子縁膜側から基底膜側への輸送を再吸収とした。全般に経細胞輸送は再吸収側で、集積は分泌側で高い値となり、体内に必要なアミノ酸を管腔側から積極的に再吸収する腎尿細管のアミノ酸動態に特徴的な結果が得られたと考えられた。

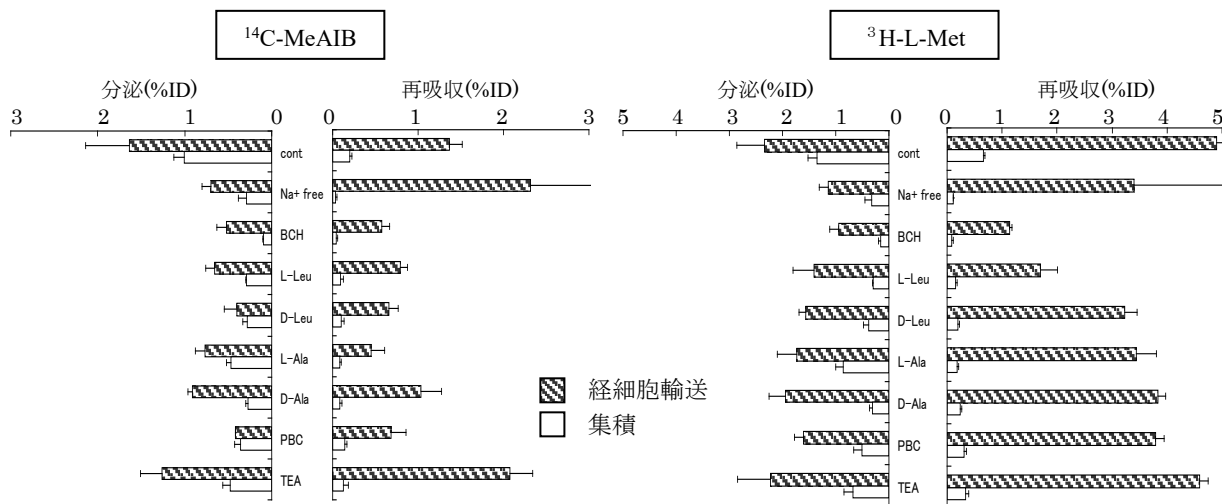


Fig. 1 投与量に対する経細胞輸送・集積量

Fig. 2 に各阻害剤負荷時の control に対する阻害率を示す。MeAIB の経細胞輸送において BCH、L-Leu、D-Leu、L-Ala、および PBC で高い阻害効果が認められ、いくつかの輸送系の寄与が確認された。L-Met の経細胞輸送も多くの阻害剤により阻害されているが、中でも BCH と L-Leu で阻害効果が高く、system L の関与が強いことが示唆された。集積においても同様に複数の阻害剤で高い阻害効果が認められた。これらの結果より、腎におけるアミノ酸輸送が他の正常組織とは異なり様々な輸送系を介して行われていることが示された。腎における MeAIB および L-Met の輸送が複数の輸送系を介している事実は、阻害剤に用いたアミノ酸が他の輸送系も阻害する可能性を示している。例えば L-Ala による阻害結果には system A 以外の輸送系をも阻害した結果が含まれていることになる。腎におけるアミノ酸トランスポーターは、L-体選択性を有するという考えに基づき、system A は L-Ala 特異的に輸送を行うものと仮定すると、L-Ala による阻害率から D-Ala による阻害率を差し引くことで L-Ala 特異的な輸送、つまり system A の寄与の程度が得られる。この考え方を MeAIB の再吸収側における経細胞輸送に適用した場合、L-Ala 阻害率と D-Ala 阻害率の差として得られる約 40% が、少なくとも system A を介する輸送であることが示された。一方、D-Leu の阻害率は L-Leu を上回っており、system L の関与はないものと考えられた。したがって、腎における MeAIB の輸送には中性アミノ酸トランスポーターの system A が強く寄与していることが判明した。同様に計算すると、L-Met では system L および system A を介した輸送がそれぞれ 30%、8% となり、その双方で輸送はされているものの system L の関与が高いことが確認された。

一部のアミノ酸の腎尿細管輸送には OAT の関与が報告されている<sup>4)</sup>が、PBC による阻害効果から MeAIB と L-Met も OAT を介して輸送されていることが確認された。また、TEA による阻害の程度は PBC に比べると低く、OCT の寄与はないか僅かであった。

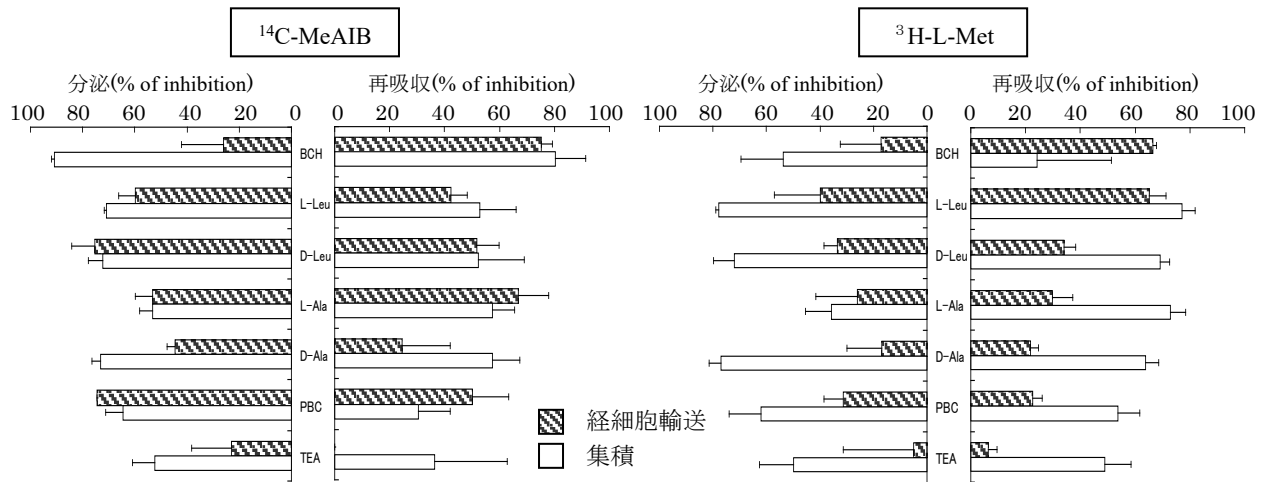


Fig. 2 各阻害剤における阻害率

### III. 遺伝子解析

次に、標識アミノ酸誘導体のターゲットとなる腫瘍細胞と正常組織との輸送機構の違いを解明し、腫瘍細胞への特異的集積を向上させるために、ヒト腫瘍細胞とマウス正常組織を用いて以下に示す方法によりトランスポーターに主眼をおいた遺伝子発現の解析を行った。

#### A) 実験材料と方法

マイクロアレイ (Ace Gene, DNA チップ研究所) を用いて、ヒト前立腺癌 Du145、PC3、ヒト大腸癌 DLD1、ヒト肺癌 SQ5、H1650、H441、マウス正常細胞である脳、肝臓、腎臓、膵臓の遺伝子解析を行った。マイクロアレイとはガラスなどの基板上に数万種の DNA 断片を貼り付けたものであり、本実験では 3 万種類の遺伝子発現の解析が可能なマイクロアレイを用いた。

2 種類の細胞より抽出した RNA それぞれに異なった蛍光色素 Cy3 および Cy5 (Amersham Bioscience) を標識し、マイクロアレイに接触させハイブリッドさせた。ハイブリッドしなかった RNA を洗い落とし、残った蛍光色素をスキャナーで画像として読み取り、遺伝子の種類や発現量を数値化して比較した。

#### B) 結果と考察

1 回膜貫通型蛋白質は、トランスポーターの本体である 12 回膜貫通型蛋白質とジスルフィド結合によりヘテロ二量体アミノ酸トランスポーターを形成し、トランスポーターの活性化因子として働く。1 回膜貫通型蛋白質の中で、4F2hc (4F2 抗原重鎖) は中性アミノ酸輸送系である system L (LAT1, LAT2)、system y<sup>+</sup>L (y<sup>+</sup>LAT1, y<sup>+</sup>LAT2)、system asc (Asc-1) 並びに酸性アミノ酸輸送系の system x<sup>-</sup>c (cCT) とヘテロ二量体を形成して機能する<sup>2)</sup>ことが知られている。

遺伝子解析の結果より、着目する輸送系および中性アミノ酸輸送系の活性化因子である 4F2hc に相当する遺伝子を抜粋し、遺伝子発現率を Cy3 と Cy5 の蛍光強度比で表したのが Table 1 である。4F2hc が活性化因子として結合するトランスポーターに\*を付した。

マイクロアレイを用いることで、一度に非常に多くの遺伝子の発現の有無を知ることができた。また、2 種類の細胞の遺伝子発現率の比較により各細胞におけるアミノ酸輸送機構の特徴が示され、腫瘍細胞と正常組織の両者において、細胞ごとにトランスポーターの発現率に大きな差異があることがわかった。Table 1 において中性アミノ酸輸送系の system L に着目すると、LAT1 は Du145 では PC3 の 1.43 倍、H1650 では H441 の 2.21 倍の発現率を示している。このように同じ前立腺癌同士、あるいは肺癌同士でも、発現率に大きな差が見られたことは注目すべき点である。

さらに、トランスポーター活性の観点から、活性化因子発現率の同時解析が重要であると考えられる。Du145 では LAT1 と同時にその活性化因子である 4F2hc の発現率も高いのに対し、H441 において LAT2 は H1650 の 1.54 倍の発現率であるが、4F2hc は H1650 のおよそ 1/2 (≒1/1.9) しか発現しておらず、4F2hc の発現量が十分でない場合には、H441 での LAT2 の高発現が必ずしもトランスポーター活性を意味しない可能性が示唆された。今回行った遺伝子解析の応用として、比較細胞の組み合わせを変化させたり標準細胞を設定して比較したりすることで、各細胞におけるアミノ酸輸送機構の特徴の解明がさらに進むことが期待される。

Table 1 各トランスポーターの遺伝子発現率比

輸送系	system	トランスポーター	ヒト腫瘍細胞						マウス正常組織					
			Du145/ PC3	PC3/ Du145	SQ5/ DLD1	DLD1/ SQ5	H1650/ H441	H441/ H1650	Brain / Liver	Liver/ Brain	Kidney/ Pancreas	Pancreas/ Kidney		
中性アミノ酸輸送系	Na <sup>+</sup> 依存性	A	ATA1	1.15										
			ATA2	1.04			1.18	1.14						
			ATA3	1.11			1.02		1.04		2.89			1.30
		ASC	ASCT1							1.32				
			ASCT2		1.85			1.06						
		y <sup>+</sup> L	y <sup>+</sup> LAT1*		2.78					1.16		1.02		
			y <sup>+</sup> LAT2*	1.07			1.14	1.34					1.12	
	Na <sup>+</sup> 非依存性	L	LAT1*	1.43			1.04	2.21			1.04			
			LAT2*	1.00	1.00		1.14		1.54		1.07		1.60	
		T	TAT1											
asc		Asc-1*								1.15		1.14		
活性化因子 4F2hc			1.65		1.07		1.90		1.35				5.56	
有機酸輸送系	E	OAT1	2.15							1.39		6.02		
		OAT2		1.17		1.56		2.08		1.27		4.11		
		OAT3		1.10		1.01	2.18		1.04			3.19		
有機塩基輸送系	F	OCT1	1.43			1.18	1.10			13.41		9.87		
		OCT2		1.04		1.49			1.18				1.10	
		OCT3	1.19						1.20				1.47	
	F or E	OCTN1				1.22								
C	OCTN2								1.24			2.27		

■ : ≧1.25

#### IV. 謝辞

本研究を終えるにあたり、ご指導いただいた川井恵一教授、吉本光喜助手、茨城県立医療大学鹿野直人助手、ご協力いただいた本研究室の方々に心より感謝申し上げます。

#### V. 参考文献

- 1) Kanai Y. Diversity of amino acid transporters: Molecular basis of disorder of amino acid metabolism. *Mol.Med.*, 40: 782-790, 2003.
- 2) 金井好克. 多選択性アミノ酸トランスポーターファミリー: LAT ファミリー. 蛋白質核酸酵素, 46: 629-637, 2001.
- 3) Shikano N, Kawai K, Nakajima S, Kubodera A, Kubota N, Ishikawa N, Saji H. Transcellular transport of radioiodinated 3-iodo- $\alpha$ -methyl-L-tyrosine across monolayers of kidney epithelial cell line LLC-PK<sub>1</sub>. *Ann.Nucl.Med.*, 18: 227-234, 2004.
- 4) Shikano N, Kawai K, Nakajima S, Nishi R, Flores II L G, Kubodera A, Kubota N, Ishikawa N, Saji H. Renal accumulation and excretion of radioiodinated 3-iodo- $\alpha$ -methyl-L-tyrosine. *Ann.Nucl.Med.*, 18: 263-270, 2004.