

0714 腎尿細管細胞 LLC-PK₁における中性アミノ酸トランスポーターのアミノ酸認識特性

竹内 佐織

(指導教員：川井恵一 教授 吉本光喜 助教)

要旨：腫瘍細胞ではトランスポーターの発現量および輸送活性が上昇し、アミノ酸の細胞への取り込みが亢進していることが確認されている。一方、標識アミノ酸誘導体は尿中排泄が早く、下腹部の腫瘍への集積および対周辺組織比の向上には、主要排泄経路である腎臓におけるアミノ酸輸送機構の解明が重要である。しかしながら、組織切片などを用いる細胞集積性の検討では、腎尿細管における分泌・再吸収輸送機構を評価することは難しい。そこで、本研究では、腎尿細管の極性を有するブタ近位尿細管由来細胞 LLC-PK₁を用い、アミノ酸輸送メカニズムの特定を試みた。

LLC-PK₁を用いた輸送阻害実験の結果、3-[¹²⁵I]iodo- α -methyl-L-tyrosine (¹²⁵I-IMT) の経細胞輸送では system L 阻害剤で阻害効果が大いことが確認された。さらに L 型および D 型アミノ酸負荷による輸送阻害効果より system L の光学異性体認識特性を検討した。IMT の再吸収と分泌において、L-tyrosine は顕著な阻害を示したが、D-tyrosine では阻害が認められなかった。[S-methyl-¹⁴C]-L-methionine (¹⁴C-Met) の再吸収では L-leucine は D-leucine より阻害効果が大きかったが、分泌では両者の阻害効果は小さかった。以上より、system L には光学異性体を認識する特性があり、特に再吸収において L 型アミノ酸を特異的に輸送していることが確認された。

I. はじめに

腫瘍細胞にアミノ酸を供給するアミノ酸トランスポーターは、腫瘍細胞増殖の律速段階のひとつであると考えられている。腫瘍細胞ではトランスポーターの発現量および輸送活性が上昇し、アミノ酸の細胞への取り込みが亢進している。新規腫瘍診断用標識アミノ酸誘導体の開発には、アミノ酸輸送経路の特定や光学異性体認識の有無が重要である。一般に標識アミノ酸誘導体は、尿中排泄が早いことから投与後早期よりコントラストのついた画像を得やすい利点を有するが、下腹部の診断に影響をおよぼす場合がある。よって新規標識アミノ酸誘導体の腫瘍への集積、対周辺組織比の向上には、腫瘍のみならずアミノ酸の主な排泄経路である腎臓のアミノ酸輸送機構の解明が必要となる。一方、近年アミノ酸輸送機構の解明に向けたアプローチが進行し、多くのアミノ酸トランスポーターファミリーが存在することが明らかにされた。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氣的性状と輸送の Na⁺依存性の有無によって様々な輸送系に分類されている^{1,2)}。近位尿細管細胞では管腔側の刷子縁膜と血管側の基底膜に異なった性質を持つトランスポーターが多種類発現しており、方向性を持った経細胞輸送が行われている。

マイクロアレイによりヒト腫瘍細胞におけるアミノ酸トランスポーターの遺伝子解析を行った結果、正常細胞と比較して腫瘍細胞では特に system L の発現率が高いことが確認されている。また、腫瘍細胞では中性アミノ酸に属する必須アミノ酸の多くは system L を介して細胞へ供給されると言われている³⁾。そこで本研究では腫瘍診断用標識アミノ酸誘導体の開発を目指し、アミノ酸輸送メカニズムの解明を試みるため、アミノ酸トランスポーターの中でも system L に着目して、ラット腎臓組織切片および LLC-PK₁を用いた輸送・集積阻害実験を行い、中性アミノ酸トランスポーターのアミノ酸認識特性を検討した。

II. ラットの腎臓組織切片集積実験

A) 実験材料と方法

ラットの腎臓組織切片集積実験は、川井らの方法に準じて行った⁴⁾。標識アミノ酸には [1-¹⁴C]- α -(methylamino)-isobutyric acid (¹⁴C-MeAIB, American Radiolabeled Chemicals) を選択し、system L 阻害剤として 2-amino-2-norbornane-carboxylic acid (BCH, Sigma), L-leucine (L-Leu, 協和醗酵工業), D-leucine (D-Leu, Nacalai tesque), system A 阻害剤として α -(methylamino)-isobutyric acid (MeAIB, Sigma), organic anion transporter (OAT) 阻害剤として probenecid (PBC, Sigma), organic cation transporter (OCT) 阻害剤として tetraethyl ammonium (TEA, Nacalai tesque) を用いて実験した。

ラット (Hos:donryu, 日本 SLC) をエーテル麻酔死させ、即座に腎臓組織を取り出した。腎臓を氷冷 HEPES 緩衝生理食塩溶液 (HBS, pH7.4) で洗浄した後、Stadie-Riggs スライサーにより組織切片を作成し、その 100 \pm 5mg を秤量後、1.9 mL HBS を入れたバイアルに移した。標識アミノ酸の HBS 溶液 0.1mL を加え、37 $^{\circ}$ C にて 1 時間振盪した。液を除去した後、HBS 1.5mL にて組織切片を 2 回洗浄した。組織は NCS 組織溶解剤 (Amersham) 1mL を加え、50 $^{\circ}$ C で 3 時間振盪して溶解した後、シンチレーターを 8mL 加え、液体シンチレーションカウンター (Aloka : LSC-5100) にて組織切片に集積した放射能を測定した。

B) 結果と考察

Table 1 に ¹⁴C-MeAIB のコントロールに対する集積量を示す。System L 阻害剤である L-Leu, D-Leu, さらに system A 阻害剤である MeAIB 負荷により集積が低下する傾向が見られた。一方、OAT 阻害剤である PBC, OCT 阻害剤である TEA 負荷では集積の低下は少なかった。

しかし、腎臓は皮質や髄質などから構成されており、¹⁴C-MeAIB のどの部位への集積に対する阻害であるのか判断できない。さらに、尿細管における分泌・再吸収輸送機構である経細胞輸送を評価することは難しく、細胞集積実験だけでは限界があると考えた。そこで、経細胞輸送を測定できる LLC-PK₁ を用いた実験を行い、アミノ酸輸送メカニズムの特定を試みることにした。

Table 1 ¹⁴C-MeAIB の細胞集積における control に対する阻害率

	BCH	L-Leu	D-Leu	MeAIB	PBC	TEA
% of control (SD)	91.35 (43.74)	73.20 (24.41)	77.94 (28.43)	72.22 (28.60)	89.47 (42.99)	87.85 (39.61)

III. LLC-PK₁ を用いた輸送阻害および集積阻害実験

A) 実験材料と方法

本研究では、海外で既に臨床利用されている中性アミノ酸輸送機能診断薬である ¹²³I-IMT⁴⁾ と、腫瘍診断用 PET 製剤として臨床利用されている標識天然アミノ酸である ¹¹C-Met に着目し、検討には実験効率を考え、¹²⁵I-IMT および ¹⁴C-Met を用いた。

¹²⁵I-IMT の標識・精製は次の方法で行った。標識原料 α -methyl-L-tyrosine (IMT, Sigma), クロラミン T (Nacalai tesque), ピロ亜硫酸ナトリウム (和光純薬工業) を 0.05M 磷酸緩衝液 (pH6.2) に 1mM となるよう調整した。3.7MBq の ¹²⁵I-NaI 溶液を IMT 溶液 100 μ L 中に加え、更にクロラミン T 溶液 10 μ L を加えて 15 分間反応させ、ピロ亜硫酸ナトリウム溶液 10 μ を加えて反応を停止した。精製は、ODS カラム (4.6 \times 250 mm, Nacalai tesque) を搭載した高速液体クロマトグラフで行った。

まず、¹²⁵I-IMT の輸送・集積に関しては、system L 阻害剤として BCH, L-Leu, 腎臓におけるアミノ酸の光学異性体認識の有無の観点から L-tyrosine (L-Tyr, Peptide 研究所), D-tyrosine (D-Tyr, Peptide 研究所) を加え実験を行った。次に ¹⁴C-Met (Amersham) の輸送・集積に関しては、system L 阻害剤として L-Leu, 光学異性体認識の有無の観点から D-Leu を加え実験を行った。LLC-PK₁ を用いる輸送・集積阻害実験は Shikano らの方法に準じて行った⁵⁾。LLC-PK₁ 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 (Corning) の中で 10% fetal bovine serum を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を培養液として 5%CO₂, 37°C で培養し、単層膜を形成させて細胞播種 7 日後に実験を行った。培養液は外側 (血管側) に 2.6ml, 内側 (管腔側) に 1.5ml 加えた。単層膜の両側の培養液を除いた後、137mM NaCl, 3mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 0.5mM CaCl₂ および 0.5mM MgCl₂ を含む Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS, pH7.4) 2.0mL を両側に入れ、37°C で 10 分間プレインキュベートした。次にトレーサーと、最終濃度を 1.0mM とした各阻害剤を管腔側または血管側に添加し、10, 30, 60, 90 分後にトレーサー添加側の反対側より PBS を 50μL 採取した後、液体シンチレーションカウンタで放射能計測して経細胞輸送を測定した。測定後、残りの PBS を除去し、PBS 500μL で 2 回両膜面を洗い、5M NaOH 2mL で溶かした細胞を 400μL 分取した後、液体シンチレーションカウンタで放射能計測して細胞への集積を測定した。

B) 結果と考察

Fig.1 に ¹²⁵I-IMT および ¹⁴C-Met における control の経細胞輸送を示す。¹²⁵I-IMT では再吸収は分泌の 2.4 倍、¹⁴C-Met においては再吸収は分泌の 3.3 倍と、分泌に比べ再吸収輸送活性が高いことが確認された。

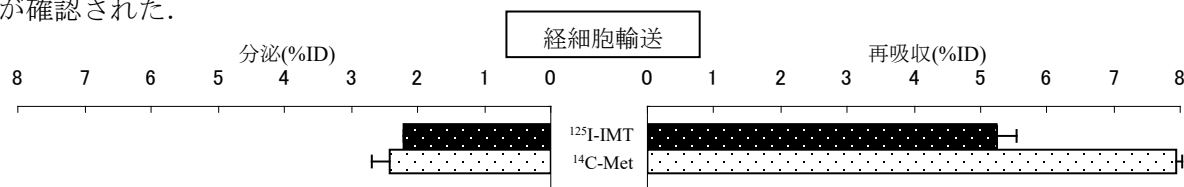


Fig.1 ¹²⁵I-IMT および ¹⁴C-Met における control の経細胞輸送

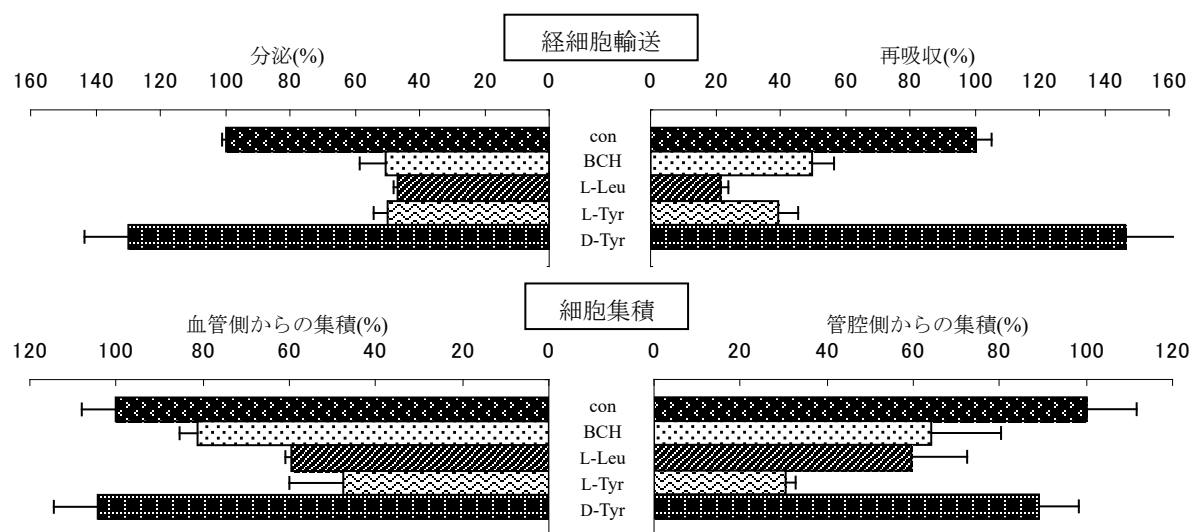


Fig.2 ¹²⁵I-IMT の経細胞輸送および細胞集積における control に対する阻害率

Fig.2 に ¹²⁵I-IMT の経細胞輸送および細胞集積における control に対する阻害率を示す。System L 阻害剤である BCH および L-Leu により大きく阻害されることから、¹²⁵I-IMT は大部分が system L で輸送されることが示された。経細胞輸送では再吸収と分泌において L-Tyr は顕著な阻害を示したが、D-Tyr では阻害が認められなかった。これより、¹²⁵I-IMT の経細胞輸送に大きく関与している system L は、D-Tyr よりも L-Tyr を特異的に輸送することが示された。細胞集積でも経細胞輸送とほぼ同じ結果が得られた。

Fig.3 に ¹⁴C-Met の経細胞輸送および細胞集積における control に対する阻害率を示す。経細胞輸送では再吸収において system L 阻害剤である L-Leu により大きく阻害されることから、¹⁴C-Met は再吸収では大部分が system L で輸送されることが示された。再吸収における L-Leu 負荷の阻害率

の結果から、経細胞輸送の 1/4 程度は system L 以外のトランスポーターで輸送されており、この輸送量は分泌の輸送量に匹敵するものであった。すなわち管腔側、血管側両側の L-Leu 非感受性トランスポーターの活性は同程度であることが示された。

一方、光学異性体認識特性に関しては、再吸収において L-Leu の阻害効果は D-Leu より大きかったが、分泌では阻害効果が小さく、さらに両者で阻害効果の差は認められなかった。これは、再吸収と分泌で $^{14}\text{C-Met}$ が輸送されるトランスポーターが異なるからではないかと考えられる。これより、 $^{14}\text{C-Met}$ の経細胞輸送の再吸収において大きく関与している system L は、L 体の特異的に輸送することが示された。細胞集積では管腔側からの集積と血管側からの集積において L-Leu では阻害効果がわずかであったのに対し、D-Leu は顕著な阻害を示した。これらは、トランスポーターの競合阻害作用のみでは想定し難く、今後の課題である。

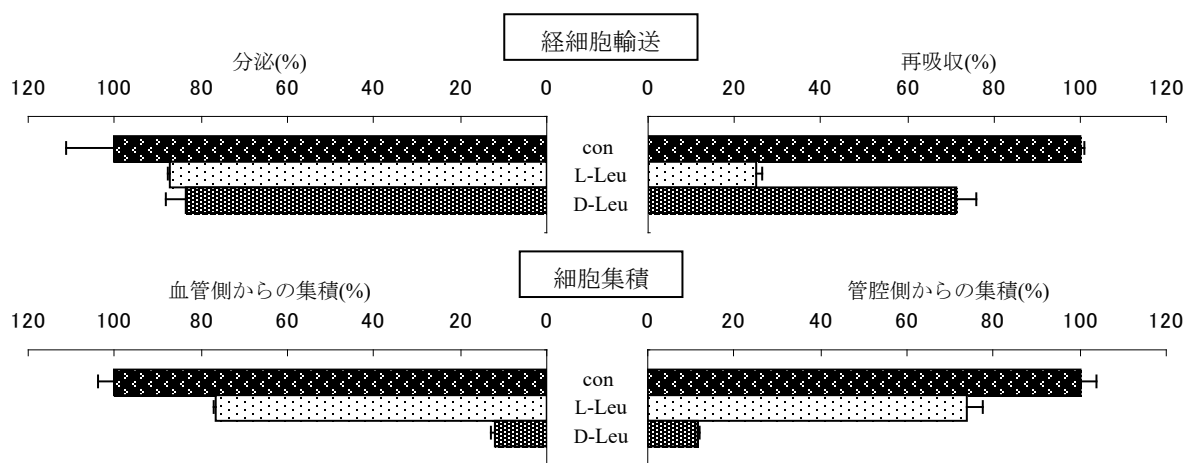


Fig.3 $^{14}\text{C-Met}$ の経細胞輸送および細胞集積における control に対する阻害率

以上より、L 体と D 体のアミノ酸で阻害効果に顕著な差があったことから、 $^{125}\text{I-IMT}$ および $^{14}\text{C-Met}$ の輸送に重要な役割を果たしている system L は光学異性体認識特性があり、特に再吸収において L 型アミノ酸を特異的に輸送していることが示された。

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、吉本光喜助教、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) 金井好克, 遠藤仁：腫瘍細胞アミノ酸トランスポーターを標的とした抗腫瘍薬の開発。Pharma Vision News, No.4: 14-17, 2004.
- 4) Kawai K, Fujibayashi Y, Saji H, Yonekura Y, Konishi J, Kubodera A, Yokoyama A: A strategy for the study of cerebral amino acid transport using iodine-123-labeled amino acid radiopharmaceutical: 3-iodo- α -methyl-L-tyrosine. *J.Nucl.Med.*, 32: 819-824, 1991.
- 5) Shikano N, Kawai K, Nakajima S, Kubodera A, Kubota N, Ishikawa N, Saji H: Transcellular transport of radioiodinated 3-iodo- α -methyl-L-tyrosine across monolayers of kidney epithelial cell line LLC-PK₁. *Ann.Nucl.Med.*, 18: 227-234, 2004.