

## 0715 ブタ近位尿管由来細胞 LLC-PK<sub>1</sub> による <sup>18</sup>F-FDG の経細胞輸送機序の解明

山口 祐衣

(指導教員：川井恵一 教授 吉本光喜 助教)

要旨：2-[<sup>18</sup>F]Fluoro-2-deoxy-D-glucose (<sup>18</sup>F-FDG)は PET 診断薬として臨床で広く使用されている。FDG は D-glucose の誘導体であり、腫瘍における糖代謝の亢進を集積機序としているが、尿排泄性が高いため膀胱やその周辺に存在する腫瘍の検出が難しく、この問題点を補うため、腎尿管における輸送機構の詳細な情報を得ることが重要である。そこで本研究では、刷子縁膜と基底膜を有し、分泌/再吸収経細胞輸送をそれぞれ観察できるブタ近位尿管由来細胞 LLC-PK<sub>1</sub> を transwell 上に培養して実験を行った。標識体には[U-<sup>14</sup>C]-D-glucose と <sup>18</sup>F-FDG の代わりに[U-<sup>14</sup>C]標識 FDG、自然透過率補正には[1-<sup>3</sup>H]-D-mannitol を用いた。主要な輸送系の関与を検討するため、4種類の阻害剤を用いた。

その結果、glucose は Na<sup>+</sup>存在下で顕著に再吸収されたが、Na<sup>+</sup>非存在下ではその輸送は大きく減少した。また glucose 再吸収は、Na<sup>+</sup>依存性トランスポーター阻害剤投与によって同様に大きく阻害された。一方、FDG の輸送は glucose に比べ再吸収の関与は少なく、Na<sup>+</sup>非存在下の場合もあまり変化はなかった。このことから、glucose は主に Na<sup>+</sup>依存性トランスポーターによって再吸収され、一方、FDG はこれを介していないと考えられた。

### I. はじめに

現在、PET 用放射性診断薬として広く臨床で使用されている 2-[<sup>18</sup>F]fluoro-2-deoxy-D-glucose (<sup>18</sup>F-FDG)は、腫瘍細胞が増殖のために glucose を多量に必要とすることに着目した glucose 誘導体である。FDG は glucose と同様にトランスポーターによって細胞内に運ばれ、6-リン酸化された形で留まる。腫瘍細胞には glucose を取り込むためのトランスポーターが多く発現しており(表 1)、FDG はこの過程を集積機序としていることがわかっている。しかし、正常でも糖利用の盛んな脳細胞や急性期の炎症にも集積するため、脳腫瘍の検出や腫瘍と炎症の鑑別が困難となる。また、膀胱への排泄が高く、前立腺癌などの膀胱周辺の腫瘍診断にも障害が生じる。

表 1 マイクロアレイによる遺伝子解析 [本研究室にて測定]

輸送系	Na <sup>+</sup> 依存性	アイソフォーム	ヒト腫瘍対正常膵臓					
			肺癌		大腸癌	直腸癌	前立腺癌	膵臓癌
			A431	H441	DLD1	LS180	PC3	ASPC1
GLUT	-	GLUT1	33.86	58.83	56.76	58.88	15.85	15.82
		GLUT4	2.94	3.64	3.62	2.79	3.50	1.51
		GLUT8	0.40	0.29	1.78	2.21	1.42	1.08
		GLUT9	0.48	0.34	2.73	1.79	1.14	1.08
		GLUT10	2.83	3.02	0.55	0.89	0.36	0.32
SGLT	+	SGLT1	0.36	0.44	0.38	0.29	0.43	0.41
		SGLT2	0.27		0.83	0.84	0.33	0.44

Glucose 関連のトランスポーターは、細胞内外の glucose 濃度差に基づく促進拡散型の glucose transporter (GLUT) と、エネルギー依存性である能動輸送型の sodium-dependent glucose transporter (SGLT) の 2 種類に分けられる。GLUT と SGLT はさらにいくつかのアイソフォームに分類され、腫瘍細胞の種類や正常組織の部位によって発現量が異なる。腎尿細管においては、GLUT は血管側の基底膜、SGLT は管腔側の刷子縁膜に多く発現し、glucose の輸送にそれぞれ主要に関与している。また、GLUT は Na<sup>+</sup>非依存性だが、SGLT での輸送には Na<sup>+</sup>が欠かせないことも両者の特徴的な違いである<sup>2)</sup>。さらに、腎尿細管に発現しているトランスポーターとして OAT 及び OCT が確認されており、glucose 及び FDG 輸送に関与している可能性がある<sup>3)</sup>。

本研究では Na<sup>+</sup>依存性の有無と glucose 関連トランスポーター阻害実験、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) の阻害実験を行うことにより、腎尿細管における glucose 及び FDG の輸送に関与する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経細胞輸送実験

### A) 実験材料と方法

[U-<sup>14</sup>C]標識 FDG (FDG) および[U-<sup>14</sup>C]-D-glucose (glucose) に単層膜の自然透過率を補正する [1-<sup>3</sup>H]-D-mannitol (いずれも American Radiolabeled Chemicals) を組み合わせたダブルトレーサー法で測定を行った。Na<sup>+</sup>依存性をみるために、通常の 137mM NaCl, 3mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5mM CaCl<sub>2</sub> および 0.5mM MgCl<sub>2</sub> を含む Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS, pH7.4) と Na<sup>+</sup>free の PBS (NaCl に代わり choline-Cl を等モル含む) の 2 種類を用意した。SGLT 阻害剤として phlorizin (PHZ, Sigma), SGLT および GLUT の両輸送系を阻害すると言われている phloretin (PHT, Sigma), OAT 阻害剤の probenecid (PBC, Sigma), OCT 阻害剤の tetraethylammonium bromide (TEA, Nacal tesque) を選択した。

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>1)</sup>を一部改変して行った。LLC-PK<sub>1</sub> を多孔性フィルターに播種し、transwell チャンバー (Corning) の中で 10% fetal bovine serum を含む Dulbecco's modified Eagle's medium を培養液として 5%CO<sub>2</sub>, 37°C で 4 日間インキュベートし、単層膜を形成させた状態で実験を行った。培養液は血管側に 1.5mL, 管腔側に 2.6mL 加えた。単層膜の両側の培養液を除いた後、2.0mL の PBS を両側に入れ、5%CO<sub>2</sub>, 37°C, 10 分間プレインキュベートした。次に FDG または glucose に [1-<sup>3</sup>H]-D-mannitol をそれぞれ加えたトレーサーと各阻害剤の最終濃度が 1.0mM になるように管腔側または血管側に添加し、5%CO<sub>2</sub>, 37°C, 90 分間インキュベートした。トレーサー投与後 10, 30, 60, 90 分にトレーサー添加側の反対側より PBS を 50μL 採取して、液体シンチレーションカウンタ (Aloka : LSC-5100) で放射能を計測し、経細胞輸送を測定した。測定後、残りの PBS を除去し、PBS 500μL で両膜面を 3 回洗った。細胞への集積として 0.2M NaOH 1mL で細胞を剥離して 400μL 分取し、輸送と同様に測定した。

### B) 結果と考察

経細胞輸送量を経時的にみるとほぼ直線的に増加していた。よって、もっとも差の大きかった投与後 90 分における、glucose と FDG の経細胞輸送を比較して図 1 及び図 2 に示す。血管側から管腔側への輸送を分泌、管腔側から血管側への輸送を再吸収とした。Glucose の control における

輸送は再吸収側で顕著に高い値となり，体内に必要な glucose を積極的に再吸収する腎尿細管の glucose 動態に特徴的な結果が得られた．これは FDG 再吸収輸送量の約 3 倍であった．また Na<sup>+</sup>free の場合，glucose の再吸収輸送量は FDG の control レベルにまで阻害された．さらに，いずれの阻害剤負荷時においても同時に Na<sup>+</sup>free にした場合，control の Na<sup>+</sup>free と同程度まで阻害された．このことから，glucose の再吸収輸送では Na<sup>+</sup>依存性トランスポーターが支配的であり，FDG の再吸収輸送には Na<sup>+</sup>依存性トランスポーターの関与が低いのではないかと考えられた．

GLUT 及び SGLT の阻害剤である PHZ 及び PHT 負荷時において，glucose は control と比較して Na<sup>+</sup>free と同様に再吸収阻害されたが，FDG に有意な阻害効果はみられなかった．また両者とも，分泌においては阻害効果は観察されなかった．このことから，腎臓において glucose 再吸収は SGLT を介していることが示された．また，FDG は SGLT 親和性が低いことが Na<sup>+</sup>依存性の比較から推測されたが，この結果からも FDG の輸送には SGLT が関与していないことが確認された．

OAT と OCT に対する阻害剤 PBC 及び TEA 負荷では，分泌，再吸収ともに有意な阻害効果は認められなかった．このことから，glucose 及び FDG の腎尿細管における経細胞輸送には OAT, OCT 両輸送系の関与が低いことが示された．

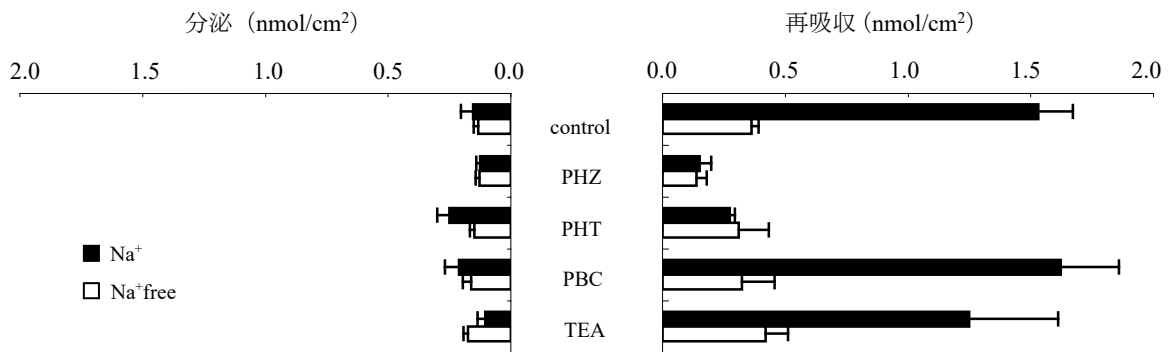


図1 Glucose の阻害剤負荷時の経細胞輸送

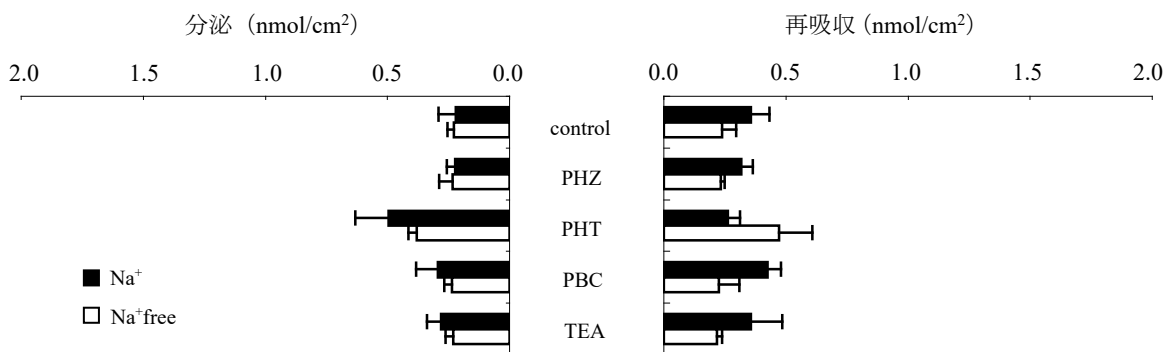


図2 FDG の阻害剤負荷時の経細胞輸送

Glucose と FDG の投与後 90 分における細胞集積を図 3 に示す．管腔側からの集積を分泌方向，血管側からの集積を再吸収方向とした．Glucose は再吸収方向の OAT 及び OCT 阻害剤負荷時を除き，経細胞輸送と似た傾向を示しており，輸送の一過程を反映しているものと考えられた．それに対して FDG は，分泌，再吸収方向ともに経細胞輸送と異なる傾向を示した．図 2 の経細胞輸送実験から，FDG 輸送には SGLT の関与が低いことが確認された．しかし glucose の分泌方向の集積量が本実験のバックグラウンドレベルであると考ええると，glucose, FDG ともに有意な輸送が

認められ、これらの輸送は他のトランスポーターによるものであると考えられた。管腔側に投与された阻害剤が基底膜に到達し、輸送系を阻害したことを差し引いても、FDGの再吸収方向の集積のばらつきは大きいと考えられる。この理由として、今回用いた阻害剤が、想定外のトランスポーターをも阻害し、その結果としてFDGが細胞内に留まったためではないかと推測された。いずれにせよ、glucoseの再吸収方向でOAT及びOCT阻害剤負荷において集積量が低減したこと、FDGの再吸収方向ではNa<sup>+</sup>freeにおける集積が最も多くなったこと等、集積は経細胞輸送とは異なる阻害パターンを示すことがあり、経細胞輸送の結果と関連させることで、細胞内への取り込み、細胞外への排出など両側膜の方向性をもった速度情報を解析し得ると考えられる。

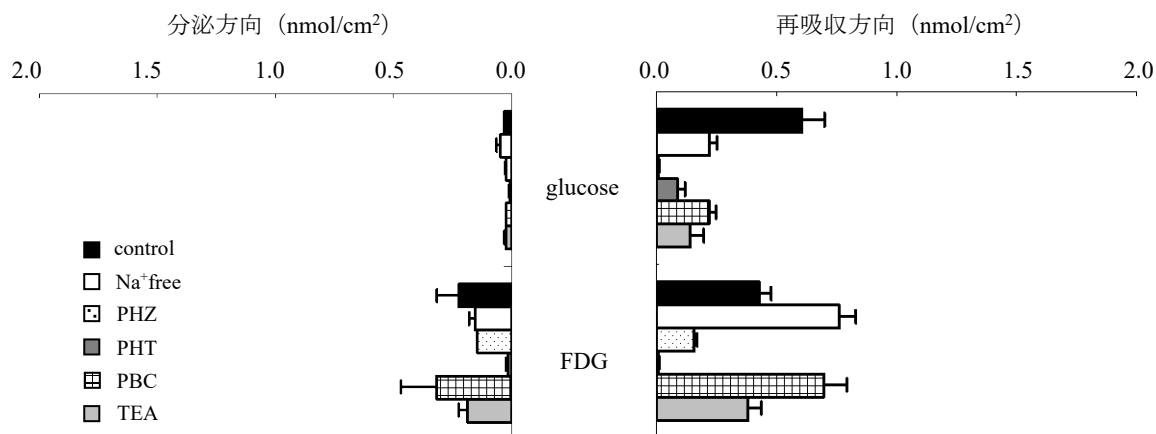


図3 Glucose, FDGの細胞集積

### III. まとめ

FDGは腎尿細管においてはNa<sup>+</sup>依存的な輸送はほとんど見出せず、glucoseとは異なりSGLTに対する親和性が低いことが解明できた。さらに集積と関連させることによって、方向性をもった速度情報など、別視点からのFDGの経細胞輸送機序解明の方法が示された。今回の結果をふまえて、glucose及びFDG輸送機構の特徴の解明がさらに進むことが期待される。

### 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、福井大学高エネルギー医学研究センター 小林正和助教、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。

### IV. 参考文献

- 1) 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. 2004; 18: 227-234.
- 2) 祐田泰延: 電解質及び糖質の輸送と代謝に関する基礎並びに応用研究——分子生物学との接点を求めて, 薬学雑誌. 2002; 122: 507-525.
- 3) 楠原洋之: 医薬品体内動態支配要因としての薬物トランスポーターの重要性へ. Pharma Vision News. 2006; 8: 2-6.