

0813 3-Iodo- α -methyl-D-tyrosine の腫瘍診断用放射性薬剤としての有用性の評価

池端 秀美

(指導教員：川井恵一 教授 吉本光喜 助教)

要旨：ポスト FDG 腫瘍診断薬として、アミノ酸誘導体が有望視されている。正常組織はアミノ酸の L 体しか利用しないが、腫瘍細胞は D 体も取り込むことが知られており、D 体アミノ酸誘導体を用いることで腫瘍対周辺組織比が向上する可能性がある。アミノ酸トランスポーター(AAT)に高い親和性を示す 3-[¹²³I]iodo- α -methyl-L-tyrosine (L-IMT)が脳腫瘍診断薬としてすでに臨床使用されていることから、本研究ではその光学異性体 D-IMT に着目し、その腫瘍診断用放射性薬剤としての可能性について L 体と比較し検討した。

ヒト前立腺癌細胞 PC-3 への取り込み実験の結果、D-IMT が腫瘍細胞に集積することが確認された。正常マウス体内動態を観察したところ、L-IMT より D-IMT の腎クリアランスが速いことが示された。天然アミノ酸は腎尿細管で再吸収されるが、画像コントラストの向上には腎における薬剤の再吸収が少ない方が望ましい。ブタ近位尿細管由来細胞 LLC-PK₁を用いた経細胞輸送実験の結果、L 体は再吸収の割合が大きく、AAT 阻害剤負荷によって顕著な阻害効果がみられた。一方 D 体はほとんど再吸収されず、阻害効果も認められなかったことから、D 体は腎尿細管の AAT によって輸送されないと考えられ、マウス体内動態の結果が裏付けられた。

本研究により、D-IMT の腫瘍診断用放射性薬剤としての可能性が示された。

I. はじめに

現在腫瘍診断用 PET 製剤の主流である 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose(FDG)の欠点を補う新規薬剤、ポスト FDG 腫瘍診断薬として、アミノ酸誘導体が有望視されている¹⁾。正常組織に比べ、腫瘍では蛋白質合成が盛んでアミノ酸トランスポーター(AAT)が高発現している。よってアミノ酸誘導体の取り込みによるイメージングが可能となるが、そのためにはアミノ酸誘導体の AAT への親和性を考慮する必要がある。また、正常組織は蛋白質合成にアミノ酸の L 体しか利用しないが、腫瘍は D 体も取り込むことが知られている²⁾。以上より、D 体アミノ酸誘導体を用いることで腫瘍対周辺組織比が向上する可能性があると考えられる。

そこで、脳腫瘍診断薬としてすでに臨床使用されている 3-[¹²³I]iodo- α -methyl-L-tyrosine (¹²³I-L-IMT)³⁾の利用を計画した。これは L-tyrosine を原料としており、phenol 基をもつため簡便な放射性ヨウ素標識が可能となる。さらに α -methyl 基をもつため脱ヨウ素化反応への抵抗性を示すなどの構造上の特徴を持つ^{4,5)}。加えて AAT の中でも広い基質選択性を持ち、原料である tyrosine の輸送に関与している System L、特にそのアイソフォームの 1 つである hLAT1 に高い親和性を示すことが知られている⁶⁻⁷⁾。

本研究では、¹²³I-L-IMT の光学異性体である ¹²³I-D-IMT を新規に合成し、System L に関する親和性も加味した上で、その腫瘍診断用放射性薬剤としての可能性について L 体と比較し検討した。

II. ¹²⁵I-L-IMT, ¹²⁵I-D-IMT の標識

In vitro 実験のため、放射性ヨウ素は全て ¹²⁵I を用いた。

A) 実験材料と方法

¹²⁵I-L-IMT(L 体)の標識、精製は Kawai らの方法⁴⁾を参考にして最適化した結果、以下の条件で行った。標識原料 α -methyl-L-tyrosine (L-AMT, Sigma)を 0.4M リン酸緩衝液(pH6.2)に、chloramine-T

(ch-T, Nacalai tesque)を 0.05M リン酸緩衝液(pH6.2)に溶かし、各々1.0mM となるよう調整した。ピロ亜硫酸ナトリウム(和光純薬工業)は飽和溶液を作成し、0.05M リン酸緩衝液で 10 倍に希釈した。3.7MBq の ^{125}I -NaI(Perkin Elmer)を L-AMT 溶液 20 μL 中に加え、更に ch-T 溶液 7 μL を加えて 28 分間反応させ、ピロ亜硫酸ナトリウム溶液 25 μL を加えて反応を停止した。分離および精製は、5C₁₈-MS-II カラム(4.6 \times 250mm, Nacalai tesque)を搭載した高速液体クロマトグラフィーを用いて行った。(溶媒；水:エタノール:酢酸=89:10:1(v/v/v), 流速；1.0mL/min, 検出；UV(280nm)および γ 線⁸⁾)

^{125}I -D-IMT(D 体)の標識、精製は標識原料 α -methyl-D-tyrosine(Nagase)を用いて、同様の条件にて行った。

B) 結果と考察

目的物質のピークと原料等の UV ピークは明確に分離しており、各トレーサーとも 70%以上の高い標識率で、かつ 98%以上の高い放射化学的高純度のものが得られた。なお、ヒト前立腺癌細胞 PC-3 への取り込み実験の結果、L 体、D 体ともに腫瘍に集積することを確認した。

III. マウスの体内分布実験

A) 実験材料と方法

II-A)に従って標識したトレーサーを 37kBq/100 μL , pH7.0 に調整し、投与量を 100 μL /匹としてマウス(Std:ddy, 5 週齢, オス) (n=4)に尾静脈投与した。投与後 2, 5, 10, 15, 30, 60 分に、エーテル麻酔下でヘパリン処理済み注射器を用いて心臓採血し、安楽死させた。直後に解剖して各臓器(血液, 脳, 甲状腺, 心臓, 肺, 胃, 腸, 肝, 腎, 脾, 膵, 筋)ごとの湿重量を秤量し、それぞれを RIA チューブに詰め放射能をオートウェルガンマカウンタ(Aloka : ARC-1000M)にて測定して組織集積率および重量集積率を算出した。

B) 結果と考察

血液における L 体および D 体の重量集積率を Fig.1 に示す。血液の経時変化から、L 体、D 体はほぼ同様の挙動を示しており、体内分布に大きく影響する血液のクリアランスにほとんど差がないことが確認できた。続いて各臓器における L 体および D 体の重量集積率を Fig.2 に示す。

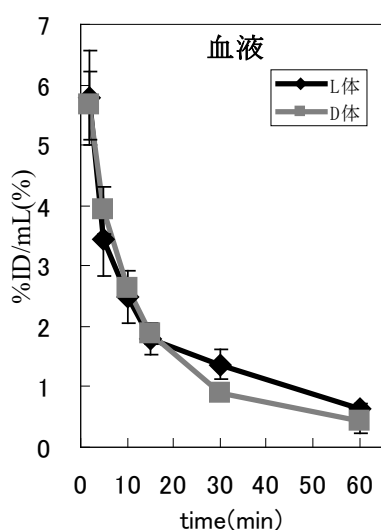


Fig.1 血液における L 体、D 体の重量集積率

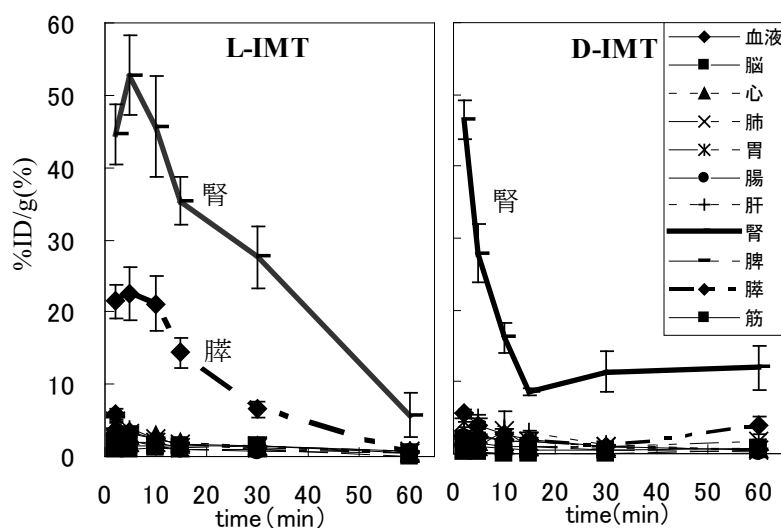


Fig.2 各臓器における L 体、D 体の重量集積率

正常組織では L 体はアミノ酸として認識されているため、早期の段階で膵に特異的な集積がみられる。一方 D 体は膵への特異的な集積がみられないことから、膵においては AAT への親和性を

失っていると考えられる。体内に投与された IMT は腎から尿中へ排泄されるため⁹⁾、特に投与直後での腎の重量集積率は約 50%前後と非常に高い値であった。腎における L 体および D 体の経時変化を比較すると、L 体がゆるやかに減少したのに対して、特に投与後約 15 分までの間に D 体は急速に排泄されていた。よって、L 体より D 体の方が腎クリアランスが速いことが示された。

IV. LLC-PK₁における経細胞輸送実験

尿中に排泄されたアミノ酸は腎尿細管にて再吸収されるため、腎クリアランスの速度に加え、尿細管における再吸収が少ないことも画像コントラスト向上には有益であると考えられる。そこで、ブタ近位尿細管由来細胞 LLC-PK₁を用いて尿細管を想定した経細胞輸送を観察し、それぞれの分泌・再吸収動態を比較検討した。

A) 実験材料と方法

実験は Shikano らの方法¹⁰⁾に準じて行った。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% fatal bovine serum(FBS, Gibco)を含む Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Sigma)を培養液として 5%CO₂, 37°Cで培養し、単層膜を形成させた。培養液は上層の刷子縁膜側に 0.8mL, 下層の基底膜側に 1.8mL 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 phosphate-buffered saline(PBS)(137mM NaCl, 8mM Na₂HPO₄, 1mM CaCl₂, 0.5mM MgCl₂を含む)0.9mL で 37°C, 10 分間インキュベートした。さらに刷子縁膜側または基底膜側にトレーサーを 18.5kBq, 阻害剤を最終濃度 1mM になるように加えて 37°C, 90 分間インキュベートした。この時、刷子縁膜側から基底膜側への輸送を再吸収、逆方向への輸送を分泌とした。阻害剤は System L を選択的に阻害する 2-amino-2-norbornane-carboxylic acid(BCH, Sigma)を用いた。

トレーサーを添加した反対側より 900μL ずつ分取し、放射能をオートウェルガンマカウンタ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 1mL で膜両面を 2 回洗い、1.0N NaOH 800μL で溶かした細胞を全量分取し、同様に細胞への集積を測定した。

B) 結果と考察

L 体の経細胞輸送および細胞集積における Control(%ID)に対する割合を、最大値を示した再吸収輸送の Control を 100%として Fig.3 に示す。再吸収は分泌の約 2.4 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。System L 阻害剤である BCH により大きく阻害されることから、L 体は大部分が System L で輸送されることが示された。しかし細胞集積では分泌のみ阻害効果が若干小さいことが認められ、System L 以外の何らかの AAT が関与していると考えられる。今回は BCH 以外の阻害剤を用いた実験を行わなかったため、今後阻害剤の種類を増やして検討を重ねることが望ましい。

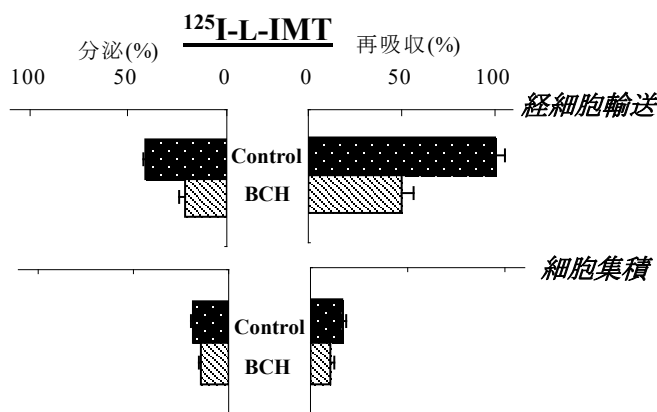


Fig.3 ¹²⁵I-L-IMT の経細胞輸送および細胞集積

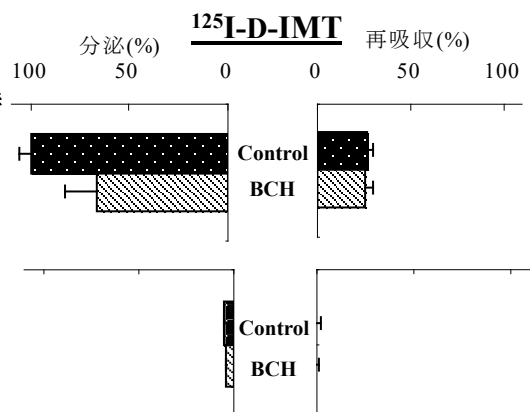


Fig.4 ¹²⁵I-D-IMT の経細胞輸送および細胞集積

D体の経細胞輸送および細胞集積における Control(%ID)に対する割合を Fig.4 に示す. このグラフでは最大値である分泌輸送の Control を 100%とした. 分泌は再吸収の約 3.7 倍と, 再吸収に比べ分泌輸送活性が高いことが確認された. また細胞集積では, 輸送に比べて値がごくわずかであり, III で示された腎からの速やかなクリアランスが支持された. BCH による阻害効果はみられなかったため, ^{125}I -D-IMT は腎尿細管の AAT によって再吸収輸送されないことが示された.

V. 結語

III より, D 体は腎からのクリアランスが L 体より速いことが示された. また IV より, D 体は腎尿細管の AAT によって再吸収輸送されないことが確認され, 結果的に D 体の方が再吸収されないため, III の結果が裏付けられた.

加えて, D 体は腫瘍に集積することが確認されていることから, 腫瘍診断用放射性薬剤として L 体よりも画像コントラストが向上する可能性があると考えられる.

VI. 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.

VII. 参考文献

- 1) 川井恵一, 吉本光喜. Post-FDG を目指した新規腫瘍診断用 PET 製剤の開発動向. 日本放射線技術学会雑誌. 2006; 62: 764-770.
- 2) Makrides V, Bauer R, Weber W, Wester HJ, Fischer S, Hinz R, Huggel K, Opfermann T, Herzau M, Ganapathy V, Verrey F, Brust P. Preferred transport of O-(2-[^{18}F]fluoroethyl)-D-tyrosine (D-FET) into the porcine brain. *Brain Res.* 2007; 1147: 25-33.
- 3) Langen KJ, Pauleit D, Coenen HH. 3-[^{123}I]Iodo- α -methyl-L-tyrosine: uptake mechanisms and clinical applications. *Nucl Med Biol.* 2002; 29: 625-631.
- 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.* 1991; 32: 819-824.
- 5) Kawai K, Fujibayashi Y, Yonekura Y, Tanaka K, Saji H, Konishi J, Kubodera A, Yokoyama A. Canine SPECT studies for cerebral amino acid transport by means of ^{123}I -3-iodo- α -methyl-L-tyrosine and preliminary kinetic analysis. *Ann Nucl Med.* 1995; 9: 47-50.
- 6) Shikano N, Kanai Y, Kawai K, Ishikawa N, Endou H. Characterization of 3-[^{125}I]iodo- α -methyl-L-tyrosine transport via human L-type amino acid transporter 1. *Nucl Med Biol.* 2003; 30: 31-37.
- 7) Shikano N, Kanai Y, Kawai K, Inatomi J, Kim DK, Ishikawa N, Endou H. Isoform selectivity of 3- ^{125}I -iodo- α -methyl-L-tyrosine membrane transport in human L-type amino acid transporters. *J Nucl Med.* 2003; 44: 244-246.
- 8) Samnick S, Schaefer A, Siebert S, Richter S, Vollmar B, Kirsch CM. Preparation and investigation of tumor affinity, uptake kinetic and transport mechanism of iodine-123-labelled amino acid derivatives in human pancreatic carcinoma and glioblastoma cells. *Nucl Med Biol.* 2001; 28: 13-23.
- 9) Shikano N, Kawai K, Nakajima S, Nishi R, Flores LG, Kubodera A, Kubota N, Ishikawa N, Saji H. Renal accumulation and excretion of radioiodinated 3-iodo- α -methyl-L-tyrosine. *Ann Nucl Med.* 2004; 18: 263-270.
- 10) 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.* 2004; 18: 227-234.