

平井 有香

(指導教員：川井恵一教授、小林正和助教)

**要旨：**非天然型アミノ酸 *anti*-1-amino-3-[<sup>18</sup>F]fluorocyclobutane-1-carboxylic acid ([<sup>18</sup>F]FACBC) は、生体内で代謝されず腫瘍細胞に高親和性を示すことから、既に神経膠芽腫の臨床 PET 診断薬として有用性が認められている。本研究では、更なる有用性を評価するため、種々のヒト由来腫瘍細胞における [<sup>18</sup>F]FACBC の集積機序を検討した。

ヒト由来腫瘍細胞 (乳癌 MDA-MB435、結腸癌 LS180、肺腺癌 H441、PC14、表皮癌 A431) を培養し、[1-<sup>14</sup>C]FACBC ([<sup>14</sup>C]FACBC)、2-fluoro-2-deoxy-D-[U-<sup>14</sup>C]glucose ([<sup>14</sup>C]FDG)、3'-fluoro-3'-deoxy-[methyl-<sup>3</sup>H]thymidine (<sup>3</sup>H]FLT) を投与して、0.5、1、3、10 分後に細胞に集積した放射能を測定した。また、Na<sup>+</sup>依存性およびアミノ酸輸送系 system A と system L の特異的阻害剤の影響を検討した。

投与 1 分後の [<sup>14</sup>C]FACBC 集積は、いずれの腫瘍細胞でも [<sup>14</sup>C]FDG、<sup>3</sup>H]FLT より高かった。その経時的変化は、MDA-MB435、LS180、H441 では 3 分後にピークを示したのに対し、A431、PC14 では経時的に増加し続けた。 [<sup>14</sup>C]FACBC の集積には、すべての腫瘍細胞で Na<sup>+</sup>非依存性の system L の関与が認められた。また、Na<sup>+</sup>依存的な能動輸送の関与も認められたが、中でも A431 と PC14 では system A の関与が見出され、マイクロアレイ解析の結果からもその高発現が確認できた。したがって、 [<sup>18</sup>F]FACBC は system A が高発現している細胞では経時的な集積増加を示すと考えられた。一方、 [<sup>14</sup>C]FDG、<sup>3</sup>H]FLT では Na<sup>+</sup>依存性や阻害効果は認められなかった。

以上より、 [<sup>18</sup>F]FACBC は投与後早期に画像化し得る可能性を有するとともに、アミノ酸輸送系の発現レベルに依存した腫瘍の鑑別診断への応用性が期待される。

## I. はじめに

PET 製剤による悪性腫瘍の診断には、代謝機能亢進の観点から糖代謝、核酸代謝、アミノ酸代謝が関与していると言われている。糖代謝はブドウ糖誘導体の [<sup>18</sup>F]FDG、核酸代謝は核酸誘導体の [<sup>18</sup>F]FLT、アミノ酸代謝は天然アミノ酸の [*S*-methyl-<sup>11</sup>C]-L-methionine ([<sup>11</sup>C]Met) に代表される。アミノ酸は正常脳細胞や炎症部位での代謝が少なく、また腫瘍細胞にはアミノ酸輸送系が高発現しているため、現在ポスト FDG 腫瘍診断薬を求めてアミノ酸誘導体について数多く研究されている<sup>1)</sup>。

一方、FACBC は高い腫瘍親和性を示し、体内で代謝されない非天然型アミノ酸 (Fig.1) である。Goodman らによって、FACBC-PET 画像診断の臨床検討で脳腫瘍における有用性が報告されている<sup>2)</sup>が、腫瘍細胞集積に関与する詳細なアミノ酸輸送系については未だ不明である。

本研究では FACBC の有用性を評価するため、腫瘍細胞における FACBC の集積性と集積機序を、FDG、FLT 腫瘍診断薬と比較検討するとともに、特にアミノ酸輸送系発現レベルの観点から考察した。



Fig.1  
[<sup>18</sup>F]FACBC

## II. トレーサーの細胞集積実験

### A) 実験材料と方法

Na<sup>+</sup>依存性および輸送阻害実験は、Shikano/Nakajima らの方法<sup>3)4)</sup>を参考にして行った。

トレーサーには *anti*-1-amino-3-[1-<sup>14</sup>C]-fluorocyclobutane-1-carboxylic acid ([<sup>14</sup>C]FACBC)、2-fluoro-2-deoxy-D-[U-<sup>14</sup>C]glucose ([<sup>14</sup>C]FDG)、3'-fluoro-3'-deoxy-[methyl-<sup>3</sup>H]thymidine ([<sup>3</sup>H]FLT) を用いた。

腫瘍細胞は細胞培養用インテグリッドディッシュ (Falcon) 上でそれぞれ専用の培地を用い、37°C、5%CO<sub>2</sub>で培養した。コンフルエントな状態で培地を除去し、Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS(-), Sigma) 6mL で細胞表面を洗浄後、0.25% Trypsine-EDTA 溶液 (Sigma) 3mL で細胞を剥離した。24 ウェル細胞培養用マルチウェルプレート (Falcon) に、1 ウェルあたり 2×10<sup>5</sup>cells/mL になるように培地で調整して播き、播種からおよそ 24 時間培養した後、実験を行った。測定用培地は Na<sup>+</sup>を含む PBS (Na<sup>+</sup>-PBS) と、Na<sup>+</sup>を K<sup>+</sup>に置き換えた PBS (Na<sup>+</sup> free-PBS) を作成した。

Na<sup>+</sup>依存性および輸送阻害実験は、Na<sup>+</sup>-PBS と Na<sup>+</sup> free-PBS それぞれで行った。System A の阻害剤として 2-(methylamino)isobutylic acid (MeAIB、Sigma) を、system L の阻害剤として 2-amino-2-norbornane-carboxylic acid (BCH、Sigma) を用いた。培養用の培地を除去し、測定用の培地を 400μL 加えて 37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件で約 10 分プレインキュベーションを行った。その後、それぞれ約 18.5kBq の [<sup>14</sup>C]FACBC、[<sup>14</sup>C]FDG、[<sup>3</sup>H]FLT、および最終濃度が 1mM となるように混合した阻害剤を 100μL 投与して、1 ウェルあたり 500μL でインキュベーションした。投与後 0.5、1、3、10 分で測定用培地を取り除き、PBS(-) 500μL で 2 回細胞膜とウェルを洗浄した後、細胞数を測定するとともに放射能を液体シンチレーションカウンタ (Aloka : LSC-5100) にて測定した。

### B) 結果と考察

各トレーサーの投与後 1 分における腫瘍細胞 10<sup>5</sup>cells あたりの集積率を Fig.2 に示す。

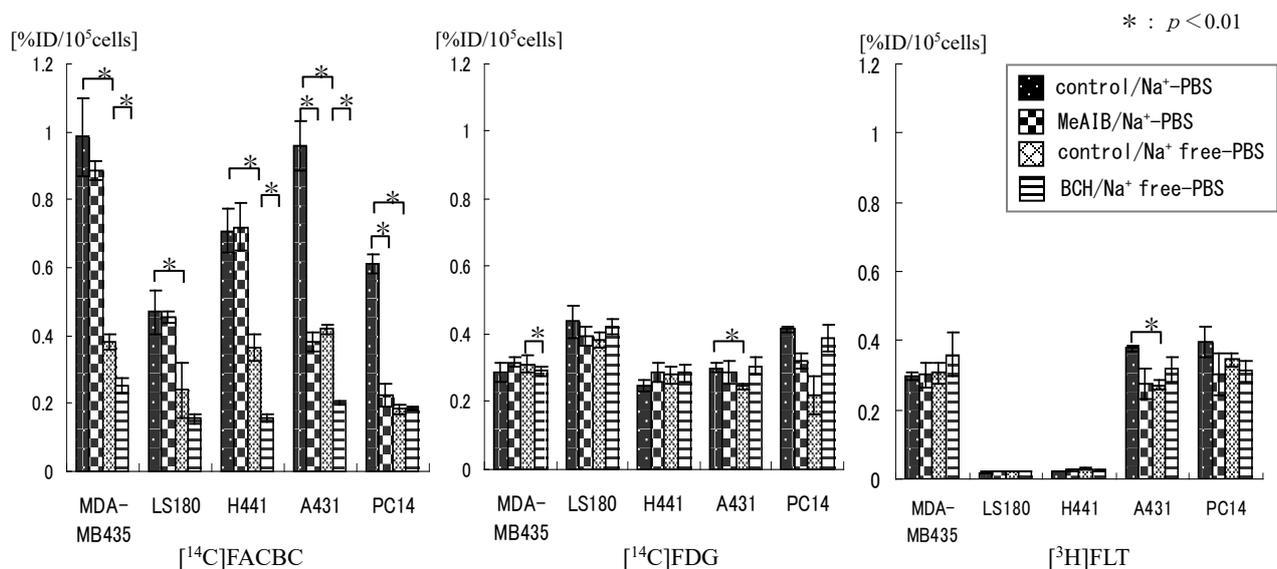


Fig.2 各トレーサーの腫瘍細胞集積に対する Na<sup>+</sup>依存性と集積阻害

阻害剤を添加しない control/Na<sup>+</sup>-PBS での [<sup>14</sup>C]FACBC 集積は、いずれの腫瘍細胞でも [<sup>14</sup>C]FDG、[<sup>3</sup>H]FLT より高くなった。その集積経路はすべての腫瘍細胞で程度の差はあるが、Na<sup>+</sup>非依存性の

system L の関与が認められた。また、どの細胞でも  $\text{Na}^+$  依存的な能動輸送の寄与があったが、中でも A431 と PC14 には system A による輸送も確認できた。 $[^{14}\text{C}]\text{FDG}$  や  $[^3\text{H}]\text{FLT}$  では、いずれの細胞においても control/ $\text{Na}^+$ -PBS との差はあまり見られず、有意な  $\text{Na}^+$  依存性や集積阻害は認められなかった。

また、control/ $\text{Na}^+$ -PBS の経時的集積曲線を Fig.3 に示す。阻害剤を添加しない control の経時的集積変化は、 $\text{Na}^+$ -PBS と  $\text{Na}^+$  free-PBS では同様な傾向を示した。

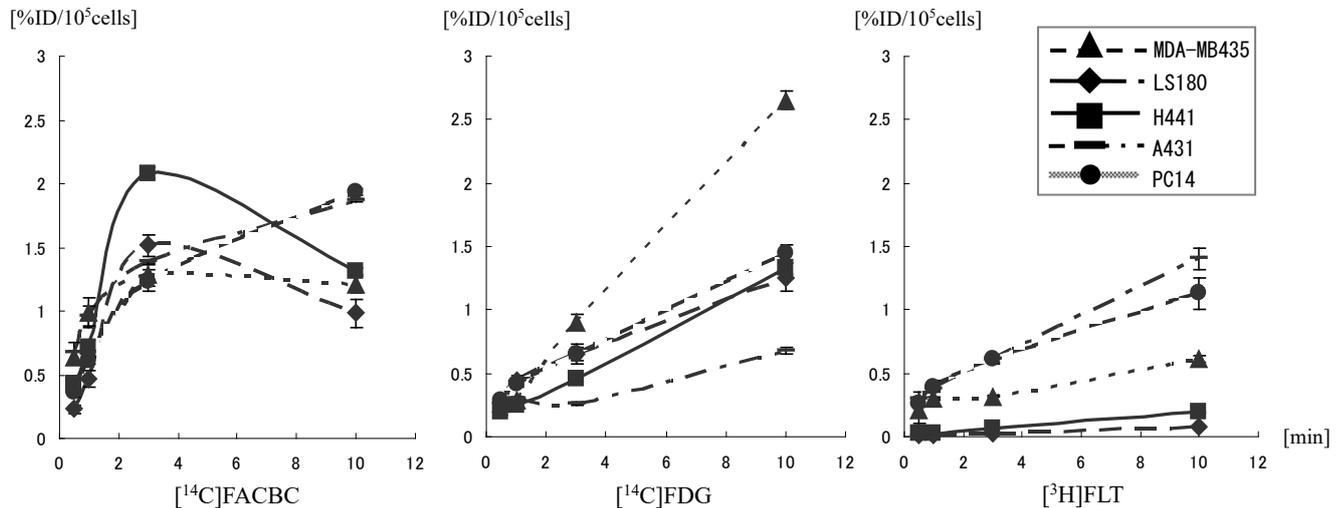


Fig.3 各トレーサーの control/ $\text{Na}^+$ -PBS における腫瘍細胞への経時的集積曲線

$[^{14}\text{C}]\text{FACBC}$  は H441、MDA-MB435、LS180 では投与後 3 分に集積のピークを示し、A431 と PC14 では経時的に増加した。一方、 $[^{14}\text{C}]\text{FDG}$  と  $[^3\text{H}]\text{FLT}$  は、どちらもすべての腫瘍細胞で経時的に増加し続けた。ここで、 $[^{14}\text{C}]\text{FACBC}$  において、同じ肺腺癌でありながら system A が関与していない H441 と system L のみならず system A の寄与も認められた PC14 では、異なる経時的集積パターンを示したことから、 $[^{18}\text{F}]\text{FACBC}$  はアミノ酸輸送系の発現パターンを反映する腫瘍の鑑別診断薬として用いることができると考えられる。

### III. マイクロアレイとの相関

本研究室の遺伝子解析結果から抽出したアミノ酸輸送系発現データを用いて、実験の裏づけを試みた。Table.1 にマイクロアレイ遺伝子発現解析によるアミノ酸輸送系を示す。リファレンス RNA により標準化した値で、黒に近いほど遺伝子発現量が高いことを意味している。

$[^{14}\text{C}]\text{FACBC}$  は、集積実験において A431 と PC14 で system A の有意な寄与が認められたのに対し、マイクロアレイでも system A に属する NAT1 が 2 つの腫瘍細胞では高発現していた。また集積実験で MDA-MB435、H441、A431 は system L の有意な寄与が認められたが、マイクロアレイでも system L に属する LAT1 の高発現が確認できた。このことにより、細胞集積機序と遺伝子発現量に相関性が認められた。

Table.1 マイクロアレイ遺伝子発現解析によるアミノ酸輸送系

Transport system	Gene aliases	MDA-MB435	LS180	H441	A431	PC14
A	ATA/ NAT2	1.76	0.38	0.94	1.23	0.69
		1.49	1.02	1.13	1.15	0.55
	ATA2	0.91	0.19	0.32	0.45	0.83
		1.31	0.38	0.65	1.02	1.74
	ATA3/ NAT3	0.76	0.49	0.30	0.15	0.14
		0.33	0.39	0.59	0.29	0.27
NAT1	2.64	0.25	1.41	3.86	2.32	
L	LAT1	2.07	1.20	7.33	2.70	0.24
		2.63	1.69	11.43	4.98	0.17
	LAT2	0.02	1.31	2.50	0.54	0.01
	LAT3	2.67	5.43	0.67	0.19	0.75
	LAT4	0.17	0.57	0.18	0.11	0.06

#### IV. 結語

[<sup>18</sup>F]FACBC は投与後早期に画像化し得る可能性を有するとともに、同じ肺腺癌でも system A 発現レベルの異なる腫瘍細胞において、system A が関与していない H441 と、system A の寄与が認められた PC14 で経時的集積パターンに違いが示されたことから、[<sup>18</sup>F]FACBC はアミノ酸輸送系の発現レベルに依存した腫瘍の鑑別診断への応用性が期待される。

#### V. 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、小林正和助教、ならびにご協力いただきました滋賀県立成人病センター研究所 西井龍一先生、加川信也先生、本研究室の方々に心より御礼申し上げます。

#### VI. 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. 日本放射線技術会雑誌, 2006; 62: 764-770.
- 2) Shoup TM, Olson J, Hoffman JM, Votaw J, Eshima D, Eshima L, Camp VM, Stabin M, Votaw D, Goodman MM. Synthesis and evaluation of [<sup>18</sup>F]-1-amino-3-fluorocyclobutane-1-carboxylic acid to image brain tumors. *J Nucl Med*, 1999; 40: 331-338.
- 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*, 2004; 18: 227-234.
- 4) Nakajima S, Shikano N, Kotani T, Ogura M, Nishii R, Yoshimoto M, Yamaguchi N, Iwamura Y, Kubota N, Ishikawa N, Kawai K. Pharmacokinetics of 3-[<sup>125</sup>I]iodo- $\alpha$ -methyl-L-tyrosine, a tumor imaging agent, after probenecid loading in mice implanted with colon cancer DLD-1 cells. *Nucl Med Biol*, 2007; 34: 1003-1008.