

## 0908 $^{11}\text{C}$ 標識 D-methionine の腫瘍イメージング薬剤としての評価

松本 瑛子

(指導教員:川井恵一教授、小林正和助教)

要旨:ポストFDG製剤として [*S*-methyl- $^{11}\text{C}$ ]-L-methionine ( $^{11}\text{C}$ -L-Met) が既に臨床応用されている。一方、腫瘍細胞は L-体アミノ酸のみならず、D-体アミノ酸も取り込むことが報告されていることから、本研究では、D-体アミノ酸の中でも標識が容易である [*S*-methyl- $^{11}\text{C}$ ]-D-methionine ( $^{11}\text{C}$ -D-Met) に着目し、その腫瘍イメージング薬剤としての可能性を評価するために、ヒト由来腫瘍細胞における集積性と集積機序について検討した。

5種類のヒト由来腫瘍細胞に  $^3\text{H}$ -L-Met、 $^3\text{H}$ -D-Met、2-([1- $^{14}\text{C}$ ]methylamino)isobutyric acid ( $^{14}\text{C}$ -MeAIB) をそれぞれ投与し、1分後および10分後に細胞に集積した放射能を測定した。また、標識アミノ酸の細胞集積に対する  $\text{Na}^+$  依存性および中性アミノ酸輸送系 system L、system A 阻害効果も検討した。

その結果、A431、H441、MDA-MB435 において、 $^3\text{H}$ -D-Met の集積は、 $^3\text{H}$ -L-Met よりは低いものの、 $^{14}\text{C}$ -MeAIB と比較して高く集積した。また、 $^3\text{H}$ -L-Met では  $\text{Na}^+$  非依存性 system L、 $^{14}\text{C}$ -MeAIB では  $\text{Na}^+$  依存性 system A が主な輸送系であった。それに対し、 $^3\text{H}$ -D-Met に関しては、投与1分後では system L または system A の関与が大きかったが、投与10分後では system A 以外の  $\text{Na}^+$  依存性輸送系の寄与が増加した。

このことから、 $^{11}\text{C}$  標識 D-Met は、system L と system A のみならず、system A 以外の  $\text{Na}^+$  依存性輸送系も関与した腫瘍イメージング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 製剤として 2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) が臨床応用されている。しかし、FDG は腫瘍における糖代謝の亢進を集積機序としているため、脳などの糖代謝が活発な正常組織や、排泄経路である腎や膀胱などに高く集積すること、腫瘍と炎症の鑑別が難しいことなどの欠点がある<sup>1)</sup>。これらの欠点を補う新規薬剤として、アミノ酸誘導体が有望視されている。腫瘍細胞は、正常組織に比べ、蛋白合成が盛んで、アミノ酸輸送系が高発現している。臨床で用いられているアミノ酸製剤として、[*S*-methyl- $^{11}\text{C}$ ]-L-methionine ( $^{11}\text{C}$ -L-Met) がある。また、 $^{11}\text{C}$ -L-Met と異なる輸送系で運ばれるアミノ酸製剤として、2-([*N*-methyl- $^{11}\text{C}$ ]methylamino)isobutyric acid ( $^{11}\text{C}$ -MeAIB) も臨床応用され始めている。一方、正常組織は L-体アミノ酸しか利用しないのに対して、腫瘍細胞は D-体アミノ酸も取り込むことが報告されている<sup>2)</sup>。また、D-体アミノ酸は天然アミノ酸とは異なり、生体内で代謝を受けにくいいため、薬剤そのものの動態を見ることができる<sup>3)</sup>。そこで、D-体アミノ酸の中でも  $^{11}\text{C}$  標識反応が容易で、光学異性体が選択的に得られるという利点を持ち、 $^{11}\text{C}$ -L-Met の光学異性体である [*S*-methyl- $^{11}\text{C}$ ]-D-methionine ( $^{11}\text{C}$ -D-Met) に着目した。

一般に、アミノ酸はアミノ酸輸送系によって細胞内に取り込まれる。アミノ酸輸送系は、輸送するアミノ酸の種類によって、中性・塩基性・酸性に分類され、さらに、 $\text{Na}^+$  依存性の有無と、側鎖の形状によって分類される<sup>4)</sup>。中性アミノ酸輸送系の  $\text{Na}^+$  依存性輸送系には system A、GLY、B<sup>0</sup>、ASC、N、y<sup>+</sup>L などがあり、 $\text{Na}^+$  非依存性輸送系には system L、T、b<sup>0+</sup> などがある。本研究では、 $^{11}\text{C}$ -D-Met の腫瘍イメージング薬剤としての可能性を評価するために、ヒト由来腫瘍細胞を用いて、集積性と集積機序について検討した。

## II. 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>5),6)</sup>を参考にして行った。

5 種類のヒト由来腫瘍細胞 (表皮癌:A431、肺腺癌:PC14、H441、乳癌:MDA-MB435、結腸癌:LS180) をディッシュ上でそれぞれ以下に記載する専用の培地を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養した。A431 は、NaHCO<sub>3</sub> (Nacalai tesque) 3.7g/L と Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco) を 10% 混合した Delbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) 13.4g/L で培養した。PC14 および MDA-MB435 は、NaHCO<sub>3</sub> 1.2g/L と FBS 10% を混合した DMEM / Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma) 15.6g/L で培養した。H441 の培地には、NaHCO<sub>3</sub> 2g/L、FBS 10%、sodium pyruvate 1% を混合した RPMI-1640 Medium (Sigma) 10.4g/L を用いた。LS180 は、NaHCO<sub>3</sub> 2.2g/L、FBS 10%、sodium pyruvate (Sigma) を 1% 混合した Minimum Essential Medium Eagle (Sigma) 9.6g/L で培養した。各腫瘍細胞数を 1 ウェルあたり 2×10<sup>5</sup> cells/mL になるように 24 ウェルプレートに播き、24 時間インキュベートして細胞を生着させた。

測定用培地として、Na<sup>+</sup> を含む phosphate-buffered saline (Na<sup>+</sup>-PBS) と、Na<sup>+</sup> を K<sup>+</sup> に置き換えた PBS (Na<sup>+</sup> free -PBS) を使用した。阻害実験には、system L の特異的阻害剤である 2-amino-2-norbornane-carboxylic acid (BCH, Sigma) と、system A 阻害剤である 2-(methylamino)isobutyric acid (MeAIB, Sigma) を用いた。トレーサーには [<sup>3</sup>H-methyl-<sup>3</sup>H]-L-methionine (<sup>3</sup>H-L-Met)、[<sup>3</sup>H-methyl-<sup>3</sup>H]-D-methionine (<sup>3</sup>H-D-Met)、2-([<sup>14</sup>C]methylamino)isobutyric acid (<sup>14</sup>C-MeAIB) を使用し、ダブルトレーサー法により行った。

培養用培地を測定用培地に置換して、10 分間プレインキュベートした。トレーサーをそれぞれ 18.5kBq、および最終濃度が 1mM となるように混合した阻害剤を 100μL 加えてインキュベートした。1 分後および 10 分後、培地を除去し、PBS 500μL で細胞を 2 回洗った。洗浄した細胞をトリプシンで剥離し、細胞数を測定した。測定後、NaOH で細胞を溶解し、液体シンチレーションカウンタ (Aloka:LSC-5100) で細胞に集積した放射能を測定した。

## III. 結果と考察

### A) 腫瘍細胞への集積性

トレーサー投与 10 分後の各標識アミノ酸の集積率を Fig.1 に示す。集積率(%ID/10<sup>5</sup>cells)は、細胞集積放射能(cpm)を投与放射能(cpm)で割り、細胞数 10<sup>5</sup>cells あたりの集積率で表した。

すべての腫瘍細胞において、<sup>3</sup>H-L-Met の集積が <sup>14</sup>C-MeAIB や <sup>3</sup>H-D-Met より高かった。また、A431、H441、MDA-MB435 において、<sup>3</sup>H-D-Met の集積率は、<sup>3</sup>H-L-Met より低いものの、<sup>14</sup>C-MeAIB よりも約 2 倍高く集積した。<sup>11</sup>C-MeAIB はすでに臨床応用されていることから、<sup>11</sup>C-D-Met も腫瘍イメージング薬剤としての十分な集積性があることが示された。

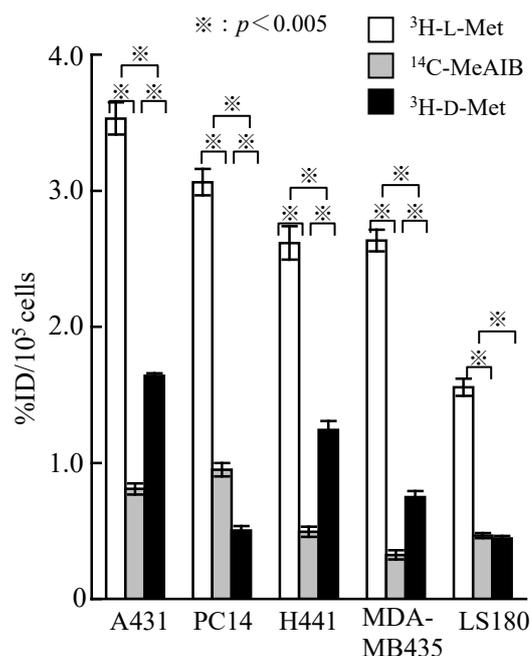


Fig.1 各標識アミノ酸の集積率

## B) 腫瘍細胞への集積機序

Shikano らが考案した方法<sup>5)</sup>を参考にして、腫瘍細胞における各アミノ酸輸送系の寄与率を求めた。培地にNa<sup>+</sup>を加えたcontrol(Na<sup>+</sup>-PBS)の集積率を100%とした場合、control(Na<sup>+</sup>-PBS)とcontrol(Na<sup>+</sup>free-PBS)の差がNa<sup>+</sup>依存性輸送系の寄与を表す。Control(Na<sup>+</sup>-PBS)の値からMeAIB添加時(Na<sup>+</sup>-PBS)の集積率を差し引くことでsystem Aの寄与率を算出した。Na<sup>+</sup>依存性輸送系への寄与率からsystem Aの寄与率を差し引いた残りはsystem A以外のNa<sup>+</sup>依存性輸送系の寄与率を示す。また、control(Na<sup>+</sup>free-PBS)の値からBCH添加時(Na<sup>+</sup>free-PBS)の集積率を引くことで、system Lの寄与率を算出した。

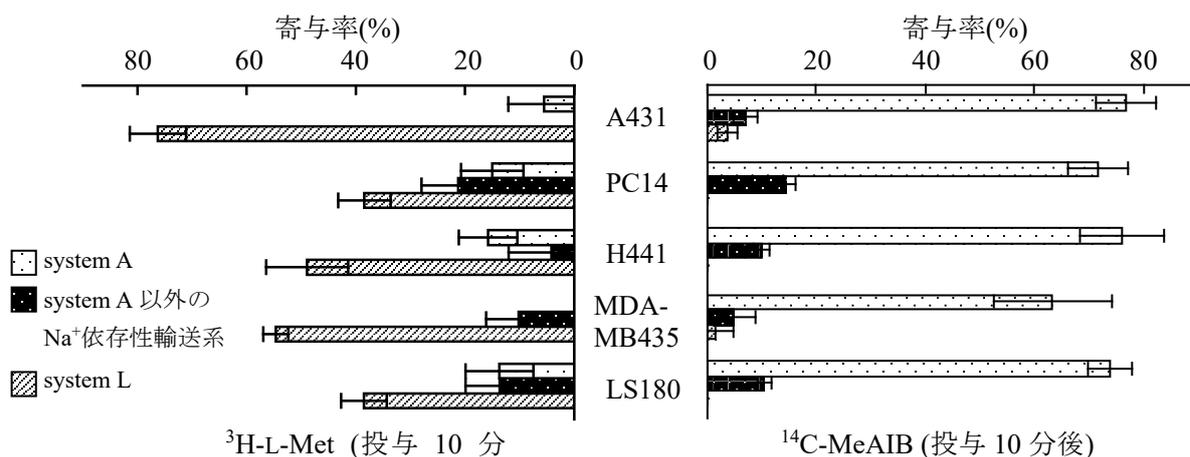


Fig.2 <sup>3</sup>H-L-Met、<sup>14</sup>C-MeAIBの細胞集積に対する輸送系の寄与率

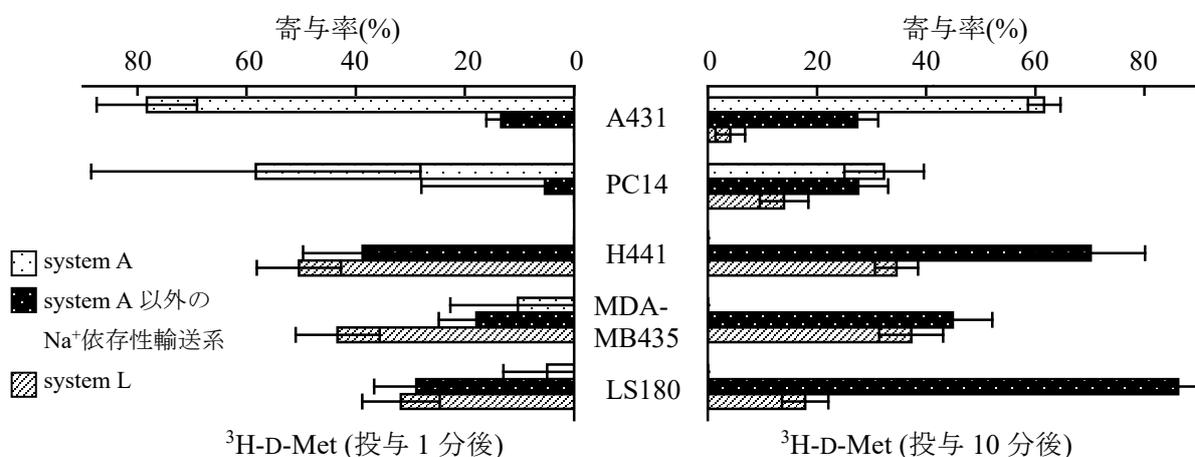


Fig.3 <sup>3</sup>H-D-Metの細胞集積に対する輸送系の寄与率

<sup>3</sup>H-L-Met、<sup>14</sup>C-MeAIBの集積阻害結果は投与1分後と10分後で同様な傾向を示した。<sup>3</sup>H-L-Metはsystem Aを含むNa<sup>+</sup>依存性輸送系の関与も認められたものの、主にsystem Lで輸送されていた。また、<sup>14</sup>C-MeAIBはすべての細胞で6割以上がsystem Aで輸送されることが確認された(Fig.2)。一方、<sup>3</sup>H-D-Metは、投与1分後と10分後で輸送系の寄与率が変化し、腫瘍細胞によっても違いがみられた(Fig.3)。A431、PC14では、投与1分後ではsystem Aにより輸送されたが、投与10分後ではそれ以外のNa<sup>+</sup>依存性輸送系の関与も認められた。H441、MDA-MB435、LS180では、投与1分後と10分後で共にsystem A以外のNa<sup>+</sup>依存性輸送系およびsystem Lが関与しており、1分後にはsystem Lが多いが、10分後ではsystem A以外のNa<sup>+</sup>依存性輸送系の寄与が大きくなった。このように、すべての細胞で、system A以外のNa<sup>+</sup>依存性輸送系への寄与が経時的に増加した。

$^3\text{H-D-Met}$  の細胞集積に関与していることが認められた system A 以外の  $\text{Na}^+$  依存性輸送系に関しては、実験に用い得る特異的な阻害剤がなく、輸送阻害実験によって輸送系を確認することができないため、マイクロアレイのデータを用いて考察した。中性アミノ酸輸送系のうち  $\text{Na}^+$  依存性輸送系の遺伝子発現量を検討した結果、system A 以外に system  $y^+L$  と system ASC が高発現していることが確認された(Fig.4)。System  $y^+L$  のアイソフォームのうち  $y^+LAT1$  では、PC14、LS180 において顕著な高発現が認められた。 $y^+LAT2$  や system ASC に属する ASCT1 でも、ほとんどの腫瘍細胞で有意な高発現が認められた。以上の結果より、 $^3\text{H-D-Met}$  の輸送には、system A 以外の  $\text{Na}^+$  依存性輸送系である system  $y^+L$  や system ASC が関与していることが推察された。

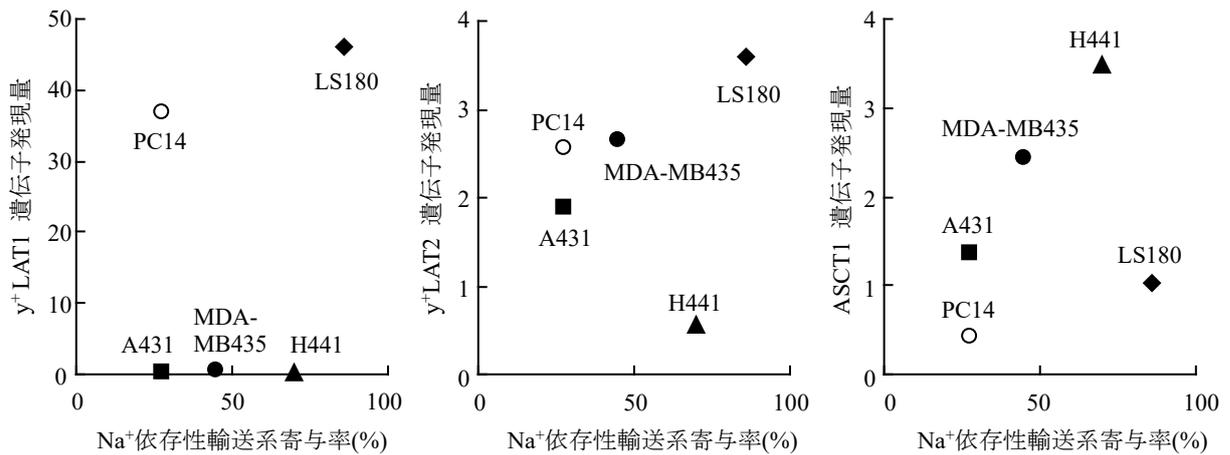


Fig.4 遺伝子発現量との比較

#### IV. 結語

$^{11}\text{C-D-Met}$  は、system L と system A のみならず、system A 以外の  $\text{Na}^+$  依存性輸送系も関与した腫瘍イメージング薬剤としての可能性が示された。

#### 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、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。

#### 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. 日本放射線技術学会雑誌. 2006; 62(6): 764-770.
- 2) Kersemans V, Cornelissen B, Kersemans K, Bauwens M, Dierckx RA, De Spiegeleer B, Mertens J, Slegers G.  $^{123/125}\text{I}$ -labelled 2-iodo-L-phenylalanine and 2-iodo-D-phenylalanine: comparative uptake in various tumour types and biodistribution in mice. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2006; 33(8): 919-927.
- 3) Kawai K, Fujibayashi Y, Saji H, Konishi J, Kubodera A, Yokoyama A. Monoiodo-D-tyrosine, an artificial amino acid radiopharmaceutical for selective measurement of membrane amino acid transport in the pancreas. Int J Rad Appl Instrum B. 1990; 17(4): 369-76.
- 4) 金井好克. アミノ酸輸送体の多様性. Mol Med. 2003; 40(7): 782-790.
- 5) 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(3): 227-234.
- 6) 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- $^{125}\text{I}$ 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(8): 1003-1008.