

坂本 剛士

(指導教員：川井 恵一教授，小林 正和助教)

要旨：4-Hydroxyphenylglycine (HPG) はその側鎖構造でメチレンが1つ少ないことを除き天然アミノ酸 tyrosine と相同性を有しているため，体内動態においてもアミノ酸との類似性が期待される．本研究では，¹²⁵I 標識 HPG (¹²⁵I-HPG) を新たに開発し，アミノ酸イメージング薬剤としての可能性を検討した．脳への集積が期待できる L 体 (L-HPG) とその光学異性体である D 体 (D-HPG) をクロラミン-T 法を用いてヨウ素標識した結果，両標識体とも標識率約 70% と高収率で得られ，精製後の放射化学的純度も 99% 以上と高かった．腫瘍イメージング薬剤としての可能性を探るため，種々の中性アミノ酸輸送系の高発現が確認されているヒト由来腫瘍細胞 H441 を用いて *in-vitro* 細胞集積実験を行った．その結果，投与後早期から ¹²⁵I-L-HPG の腫瘍集積が ¹²⁵I-D-HPG より高く，また，その集積には Na⁺ 非依存性システム L と非特異的集積が関与していることが確認された．次に，正常マウスを用いた *in-vivo* 体内分布実験を行った結果，¹²⁵I-L-HPG では脳集積がほとんど観察されず，投与後早期から胃への集積が認められたことから体内で脱ヨウ素化されたと推測された．一方，¹²⁵I-D-HPG は脱ヨウ素化に対する高い代謝安定性を有し，投与後早期に血中と腎臓から速やかなクリアランスを示した．さらに H441 を移植した担癌マウスを用いて *in-vivo* 体内分布実験を行った結果，血液および筋肉に対する腫瘍の高い集積比が認められた．以上より，¹²⁵I-D-HPG は腫瘍イメージング薬剤としての可能性を有していることから，更に検討を進める意義があると考えられる．

I. はじめに

4-Hydroxyphenylglycine (HPG) (Fig.1) は天然アミノ酸である tyrosine と比較すると炭素鎖が1つ少ないだけであり，構造的に相同性を有している．そのため，生体内において tyrosine との類似性から，中性アミノ酸トランスポーターを発現している細胞内に高く集積する可能性があると考えた．また，HPG は細胞表面のグルタミン酸レセプターリガンドである 3-hydroxyphenylglycine と位置異性体の関係であり，構造的に類似していることから，HPG においても同様に機能する可能性も期待できる．

本研究では，新たに HPG をヨウ素標識し，その L 体および D 体の中性アミノ酸トランスポーターに対する親和性について検討を行った．

II. ¹²⁵I 標識と精製

A) 実験材料と方法

HPG の ¹²⁵I 標識は，クロラミン-T 法を用いて無担体条件下で行った．HPG 1.0 × 10⁻⁷ mol をリン酸緩衝液 (pH 6.2, 0.4M) 200 μl に溶かし，無担体 ¹²⁵I-NaI (18.5 MBq) を加えた．得られた混合液にクロラミン-T 1.0 × 10⁻⁸ mol/30 μl リン酸緩衝液 (pH 6.2, 0.05M) を加えることで標識を開始した．反

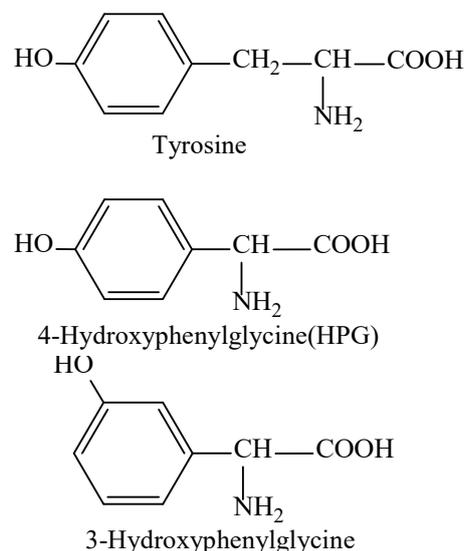


Fig.1. 各標識母体化合物の構造式

応開始後 20 分にピロ亜硫酸ナトリウム $1.0 \times 10^{-8} \text{mol}/20 \mu\text{l}$ リン酸緩衝液 (pH6.2, 0.05M) を加え、反応を停止した。

^{125}I -HPG の標識率は、展開溶媒をメタノール：酢酸=100：1 (Rf 値 HPG=0.55, ^{125}I =0.85) を用いたシリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC, Merck:Art.5554) にて確認した。精製は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、以下の条件で標識体と free I, 非放射性夾雑物の分離、精製および放射化学的純度の評価を同時に行った。

カラム 5C18-MS-II (4.6ID×250mm, Nacalai tesque)

溶 媒 水：エタノール：酢酸=88：10：2

流 速 0.7ml/min

また、安定性を評価するための標識後 1 週間の純度検定も同様に行った。

B) 結果と考察

^{125}I -標識体は L-HPG：75.9±9.1, D-HPG：68.9±3.5%と高い標識率で得られた。HPLC の保持時間は ^{125}I :4 分, ^{125}I -HPG:5.7 分であり, ^{125}I -L-HPG, ^{125}I -D-HPG とともに完全にベースライン分離できた。分取した結果、両者とも放射化学的純度 99%以上の ^{125}I -HPG を無担体状態で得られた。

III. *in-vitro* 細胞集積実験

A) 実験材料と方法

Na^+ 依存性および輸送阻害実験は、Shikano/Nakajima らの方法^{1,2)}を参考にして行った。

腫瘍細胞は種々の中性アミノ酸輸送系の高発現が確認されているヒト肺腺癌細胞 H441 を用い、DMEM (10% Fatal Calf Serum), 37°C, 5%CO₂ 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 2×10^5 cells/ml になるように培地で調整して播き、播種からおおよそ 24 時間培養した後、実験を行った。測定用培地は Na^+ を含む PBS (Na^+ -PBS) と、 Na^+ を K^+ に置き換えた PBS (Na^+ free-PBS) を作成した。

Na^+ 依存性および輸送阻害実験は、 Na^+ -PBS と Na^+ free-PBS それぞれで行った。アミノ酸輸送系システム A の阻害剤として 2-(methylamino)isobutylic acid (MeAIB, Sigma) を、システム L の阻害剤として 2-amino-2-norbornanecarboxylic acid (BCH, Sigma) を用いた。培養用の培地を除去し、測定用の培地を 400 μl 加えて 37°C, 5%CO₂ 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、 ^{125}I -HPG および最終濃度が 1mM となるように混合した阻害剤を 100 μl 投与して、1 ウェルあたり 500 μl でインキュベートした。投与後 5, 10, 30, 60 分で測定用培地を取り除き、細胞を 1N NaOH で溶解し、細胞内の放射能をオートウェルガンマカウンター (AccuFLEX γ 7010, Aloka) にて測定した。

B) 結果と考察

ヒト肺腺癌細胞 H441 における ^{125}I -L-HPG および ^{125}I -D-HPG の細胞集積に対する集積率の経時的变化および Na^+ 依存性を Fig.2 に示す。 ^{125}I -L-HPG と ^{125}I -D-HPG を比較して Na^+ の有無に関わらず ^{125}I -L-HPG の方が腫瘍への集積性は高くなった。

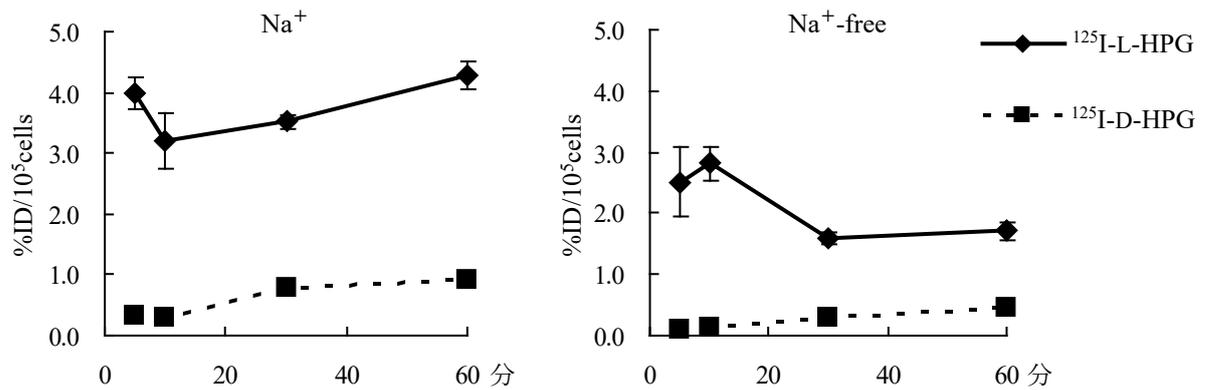


Fig.2. ^{125}I -L-HPGおよび ^{125}I -D-HPGの細胞集積性および Na^+ 依存性

次に、腫瘍細胞における ^{125}I -L-HPG および ^{125}I -D-HPG の集積機序を Fig.3 に示す。 ^{125}I -L-HPG, ^{125}I -D-HPG とともに Na^+ 依存性の輸送系であるシステム A およびシステム A 以外の集積は低く, Na^+ 非依存性の輸送系であるシステム L およびシステム L 以外の非特異的集積が高く関与していることが確認された。

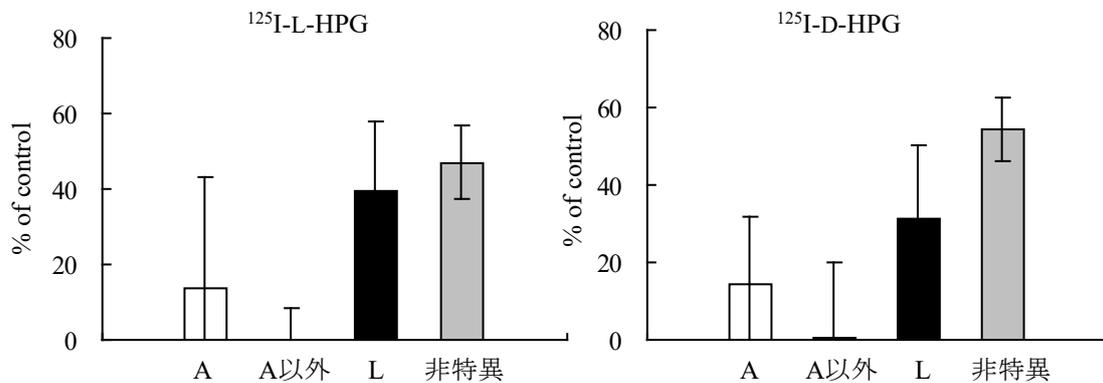


Fig.3. ^{125}I -L-HPG および ^{125}I -D-HPG の集積機序

IV. *in-vivo* 体内分布実験

A) 正常マウス

a) 実験材料と方法

^{125}I -L-HPG および ^{125}I -D-HPG を $37\text{kBq}/100\mu\text{l}$, $\text{pH}7.0$ に調整し, 投与量を $100\mu\text{l}/\text{匹}$ としてマウス (ddY 雄 5 週齢) に尾静脈投与した. 投与後 2, 5, 10, 20, 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, 屠殺した. 速やかに各臓器 (腎臓, 血液, 脾臓, 筋肉, 胃, 脳) を摘出し, 湿重量を秤量した後, 血液及び各臓器の放射能をオートウェルガンマカウンター (AccuFLEX γ 7010, Aloka) にて測定した.

b) 結果と考察

各臓器における ^{125}I -L-HPG および ^{125}I -D-HPG の重量集積率の経時的变化を Fig.4 に示す. ^{125}I -L-HPG, ^{125}I -D-HPG とともに脳への集積はほとんど認められなかった. 胃への集積は, ^{125}I -L-HPG では早期から経時的に増加したが, ^{125}I -D-HPG では経時的集積性は認められなかった. また, ^{125}I -D-HPG は投与後早期に血中と腎臓の放射能が高く, その後速やかなクリアランスを示した.

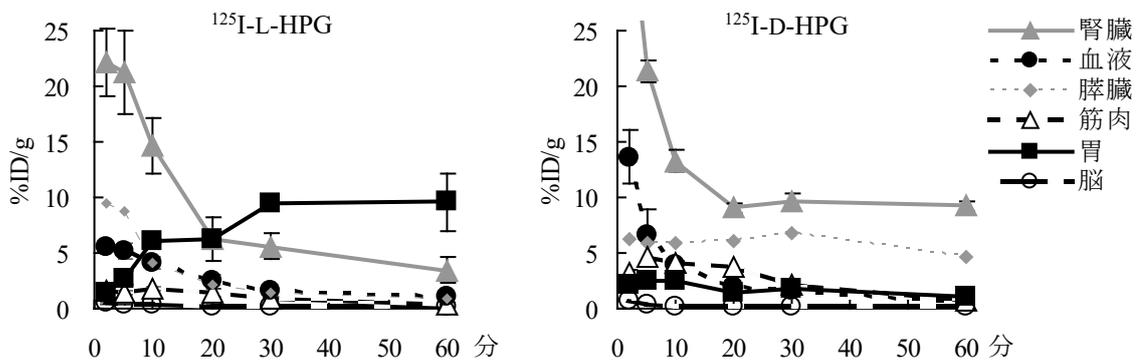


Fig.4. $^{125}\text{I-L-HPG}$ および $^{125}\text{I-D-HPG}$ の各臓器における集積性

B) 担癌マウス

a) 実験材料と方法

3×10^6 cells/0.1ml DMEM (10% Fatal Calf Serum) に培養して増殖させたヒト肺腺癌細胞 H441 をマウス (KSN 雄 6 週齢) の左大腿皮下に移植し, 約 10 日後, 腫瘍径が 1cm 程度になったものを実験に使用した. 本実験では, 脱ヨウ素化への安定性を示した $^{125}\text{I-D-HPG}$ のみを投与し, 方法はIV-A-a と同様に行った.

b) 結果と考察

$^{125}\text{I-D-HPG}$ 投与後 10, 60 分の腫瘍への集積率と血液および筋肉への集積率との比を Fig.5 に示す. 腫瘍対血液比, 腫瘍対筋肉比ともに投与後 60 分の値は 10 分と比較して非常に高値を示した.

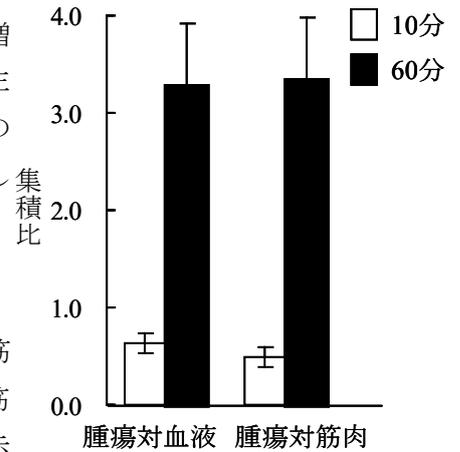


Fig.5. H441担癌マウスにおける $^{125}\text{I-D-HPG}$ の集積比

V. 結語

$^{125}\text{I-L-HPG}$ は $^{125}\text{I-D-HPG}$ と比較して高い腫瘍集積性を示したが, 投与後早期から胃への集積が観察されたため生体内で脱ヨウ素化されたと推測された. これに対し, $^{125}\text{I-D-HPG}$ は $^{125}\text{I-L-HPG}$ よりも腫瘍集積性は低かったが, 生体内で脱ヨウ素化に対する抵抗性と速やかなクリアランスが観察された. さらに, 生体内において腫瘍への集積率が他の部位と比較して高かった. 以上より, $^{125}\text{I-D-HPG}$ は腫瘍イメージング薬剤としての可能性を有していることから, 更に検討を進めることが望まれる.

VI. 謝辞

本研究にあたり, ご指導くださいました川井恵一教授, 小林正和助教, ならびにご協力いただきました本研究室の方々に心より御礼申し上げます.

VII. 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- α -methyl-L-tyrosine across monolayers of kidney epithelial cell line LLC-PK₁. *Ann Nucl Med*, 2004; 18: 227-234.
- 2) 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}I iodo- α -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.