

二口 亮

(指導教員:川井 恵一教授, 小林 正和助教)

要旨:アミノ酸輸送系 system A の特異的基質である[N-methyl- ^{11}C]- α -(methylamino)-isobutyric acid (^{11}C -MeAIB)が,ポスト FDG 腫瘍イメージング薬剤として本邦でも臨床利用され始めた.本研究では,ヒト由来腫瘍細胞における ^{11}C -MeAIB の集積性について検討した. 6 種類のヒト由来腫瘍細胞 (前立腺癌:PC3, 結腸癌:LS180, 乳癌:MDA-MB435, 表皮癌:A431, 肺腺癌:H441, PC14)に ^{14}C -MeAIB を投与し, 0.5, 1, 3, 10 分後に細胞に集積した放射能を測定した. 全腫瘍細胞において ^{14}C -MeAIB は経時的集積性を示し,特に PC3 においては,投与後早期に顕著な高集積が認められた. また,輸送阻害実験の結果から, ^{14}C -MeAIB がアミノ酸輸送系の中では system A の寄与が高いことも確認した. さらに, PC3 を大腿皮下に移植した担癌ヌードマウスを使用し ^3H -MeAIB と ^{14}C -FDG の腫瘍集積性をダブルトレーサー法で検討した. ^3H -MeAIB の腫瘍対筋肉比は ^{14}C -FDG と比べて投与後 30 分以降で 1.6 倍高くなった. また, ^3H -MeAIB の正常組織への集積は,脳,心筋,肺などで ^{14}C -FDG より低いことから,画像診断において,より広範な領域において腫瘍の検出が容易になると考えられた. したがって, ^{11}C -MeAIB の高い腫瘍集積性が確認されたとともに, ^{18}F -FDG では検出が困難な前立腺癌イメージング薬剤として ^{11}C -MeAIB の有用性が示された.

I. はじめに

現在,腫瘍診断用 PET 製剤として 2-[^{18}F]fluoro-2-deoxy-D-glucose (^{18}F -FDG)が広く臨床で用いられている.しかし, ^{18}F -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ため, ^{18}F -FDG に代わる腫瘍診断薬として,腫瘍細胞のアミノ酸代謝機能亢進を利用したイメージング剤が有望視されている¹⁾.アミノ酸製剤の 1 つとして,既に臨床利用されている [S-methyl- ^{11}C]-L-methyonine (^{11}C -L-Met)は主にアミノ酸輸送系 system L により細胞に集積する.一方, MeAIB は,アミノ酸輸送系 system A により特異的に輸送されることから,アミノ酸輸送系 system A を標的とした新規放射性アミノ酸製剤として, [N-methyl- ^{11}C]- α -(methylamino)isobutyric acid (^{11}C -MeAIB)が臨床応用され始めた.そこで,本研究では様々なヒト由来腫瘍細胞を用いて,腫瘍診断薬 ^{11}C -MeAIB の集積性を検討した.

II. In-vitro 細胞集積実験

A) 実験方法と材料

Na^+ 依存性実験および輸送阻害実験は,Shikano・Nakajima らの方法^{2,3)}を参考にして行った. 6 種類のヒト由来腫瘍細胞 (前立腺癌:PC3, 結腸癌:LS180, 乳癌:MDA-MB435, 表皮癌:A431, 肺腺癌:H441, PC14)を 37°C , 5% CO_2 で培養した. PC3 は RPMI-1640 Medium with HEPES (Nacalai tesque)と Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco)10%で培養した. LS180 は, FBS 10%, および sodium pyruvate (Sigma)を 1%混合した Minimum Essential Medium Eagle (Sigma)で培養した. MDA-MB435 および PC14 は, FBS 10%を混合した Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma)で培養した.

A431 は FBS 10%を混合した Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (Sigma)で培養した. H441 は, FBS 10%, sodium pyruvate 1%を混合した RPMI-1640 Medium (Sigma)で培養した. 測定用培地として 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. 阻害実験には, system A 阻害剤である α -(methylamino)isobutyric acid (MeAIB, Sigma)と system L の特異的阻害剤である 2-amino-2-norbornanecarboxylic acid (BCH, Sigma)を用いた. トレーサーには [*N*-methyl- ^{14}C]- α -(methylamino)isobutyric acid (^{14}C -MeAIB, American Radiolabeled Chemicals)を使用した. 24well 細胞培養用マルチウェルプレート (Falcon)に1ウェル辺り 2×10^5 cells/mL になるように播き, およそ 24 時間培養した後, 実験を行った. 培養用の培地を除去し, 測定用培地および最終濃度が 1mM となるように混合した阻害剤を 450 μL 加えて 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 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 3.7 kBq の ^{14}C -MeAIB を 50 μL 投与して, 1 ウェル辺り 500 μL でインキュベーションした. 投与後 0.5, 1, 3, 10 分で測定用培地および阻害剤を取り除き, PBS (-) 500 μL で 2 回細胞膜とウェルを洗浄した. 1M NaOH 500 μL で細胞を溶解し, そのうち, 400 μL を ASC-II Scintillation Cocktail (Amersham)と混合し, 液体シンチレーションカウンター (LSC-5100, Aloka)で測定した.

B) 結果と考察

1) ヒト由来腫瘍細胞への集積性

^{14}C -MeAIB のヒト由来腫瘍細胞への集積率を Fig.1 に示す. 細胞集積放射能 [cpm] を投与放射能 [cpm] で割り, 細胞数 10^5 cells あたりの集積率 [%ID/ 10^5 cells] で表した.

全腫瘍細胞において, ^{14}C -MeAIB の経時的集積性が確認された. 中でも, PC3, H441, PC14 では投与後 10 分で集積が高くなった. 一方, LS180, MDA-MB435 は投与後 1 分以降, 緩やかな増加を示した. PC3 は他の腫瘍細胞と比較すると, 投与後 1 分で, 2 倍以上の高い集積となった.

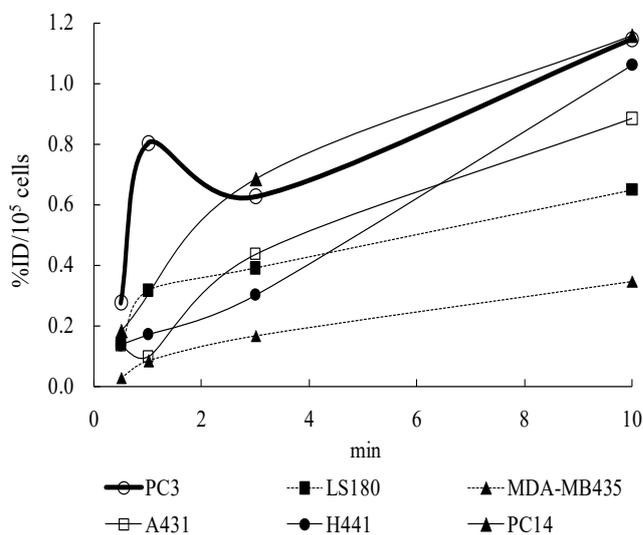


Fig.1 腫瘍細胞への集積性

2) ヒト由来腫瘍細胞への集積性における各輸送系の寄与

Shikano らが考案した方法³⁾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を求めた. 培地に Na^+ を加えた control (Na^+ -PBS) の集積率を 100%とした場合, control (Na^+ -PBS) と control (Na^+ free-PBS) の差が Na^+ 依存性輸送系の寄与を表す. Control (Na^+ -PBS) の値から阻害剤として非放射性 MeAIB 添加時 (Na^+ -PBS) の集積率を差し引くことで system A の寄与を算出した. Na^+ 依存性輸送系への寄与から system A の寄与を差し引いた残りは system A 以外の Na^+ 依存性輸送系の寄与を示す. また, control (Na^+ free-PBS) の値から BCH 添加時 (Na^+ free-PBS) の集積率を引くことで system L の寄与を算出した.

Table.1 に ^{14}C -MeAIB の各腫瘍細胞における輸送系の寄与を示す. 全ての腫瘍細胞で ^{14}C -MeAIB はアミノ酸輸送系 system A の寄与が高く, Na^+ 依存性輸送系の寄与率は全体の 8 割以上を占めた. また, アミノ酸輸送系 system L の寄与が低いことは MeAIB の特徴であると考えられる.

Table.1 各輸送系への寄与(投与後 10 分)

| | Na ⁺ 依存性 | | Na ⁺ 非依存性 |
|-----------|---------------------|------------|----------------------|
| | system A | system A以外 | system L |
| PC3 | 68.1% | 22.1% | 0.2% |
| LS180 | 75.0% | 15.6% | 2.2% |
| MDA-MB435 | 74.1% | 19.8% | 1.1% |
| A431 | 72.7% | 20.7% | 1.3% |
| H441 | 74.7% | 19.3% | 1.2% |
| PC14 | 73.8% | 12.1% | 0.0% |

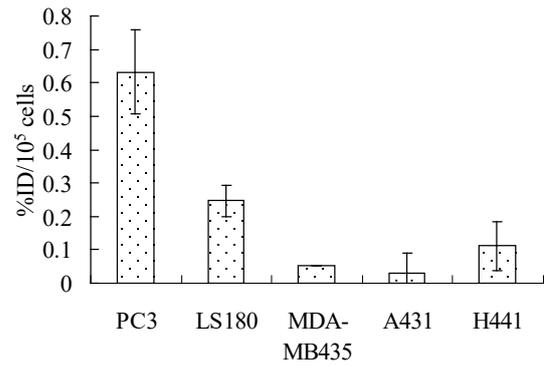


Fig.2 アミノ酸輸送系 system A の寄与(投与後 1 分)

Fig.2 に、投与後 1 分における放射能集積率[%ID/10⁵cells]で表したアミノ酸輸送系 system A の寄与を示す。PC3 は他の腫瘍細胞より、特に system A の寄与が顕著に高く、これが、PC3 が投与後早期で高い集積率を示した原因であると考えられた。また、system A 以外の Na⁺依存性輸送系、system L の寄与はともに 0.05 %ID/10⁵ cells 以下と僅かであった。

III. *In-vivo* 体内分布実験

II の検討より、前立腺癌(PC3)は投与後早期で、MeAIB が標的とするアミノ酸輸送系 system A により、高く集積することが特徴的であったため、移植癌には前立腺癌(PC3)を用いることにした。

A) 実験方法と材料

前立腺癌(PC3)をヌードマウス左大腿部皮下に2×10⁶ cells ずつ移植し、一定期間(7~8日)経過したものをを用いた。[N-methyl-³H]-α-(methylamino) isobutyric (³H-MeAIB, American Radiolabeled Chemicals)と 2-fluoro-2-deoxy-D- [U-¹⁴C]-glucose(¹⁴C-FDG, American Radiolabeled Chemicals)をヌードマウス(KSN雄6週齢)に尾静脈注射し、ダブルトレーサー法により検討した。一定時間(2, 5, 10, 30, 60分)後、エーテル麻酔下にてヘパリン処理済注射器で 100μL を心臓採血した。その後、臓器を摘出し湿重量を100±5g になるよう秤量した。液体シンチレーションカウンター(LSC-5100, Aloka)で血液及び臓器の放射能を計測した。次に、重量集積率を次式にて算出した。

$$\text{重量集積率}[\%ID/g \text{ tissue}] = \frac{\text{組織放射能}[cpm]}{\text{投与放射能}[cpm]} / \text{組織重量}[g] \times 100$$

B) 結果と考察

1) 前立腺癌における腫瘍対筋肉比

Fig. 3 に前立腺癌におけるヌードマウスの腫瘍対筋肉比を示す。投与後 30, 60 分で ³H-MeAIB は ¹⁴C-FDG と比較し、約 1.6 倍高い値を示した。臨床で多用されている FDG と同等、あるいは高い周辺組織比が得られたことから、¹¹C-MeAIB は前立腺癌イメージング薬剤としての有用性があると考えられる。

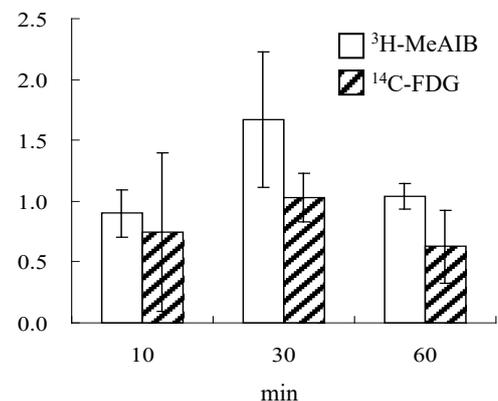


Fig.3 腫瘍対筋肉比

2) 正常組織への集積性

マウスの正常組織への重量集積率を Fig.4 に示す. ^{14}C -FDG は脳や心筋, 肺に高い集積を示したが, ^3H -MeAIB はいずれも低い集積となった.

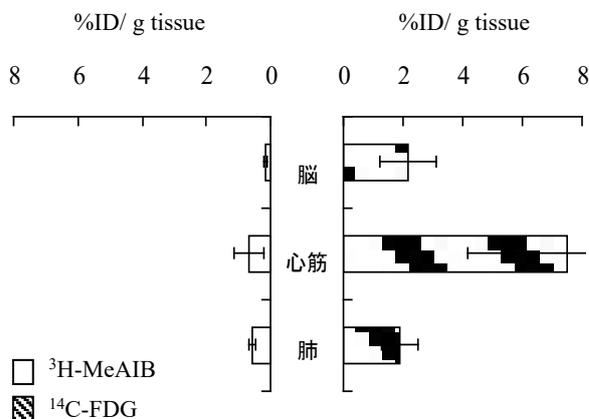


Fig.4 正常組織への集積性

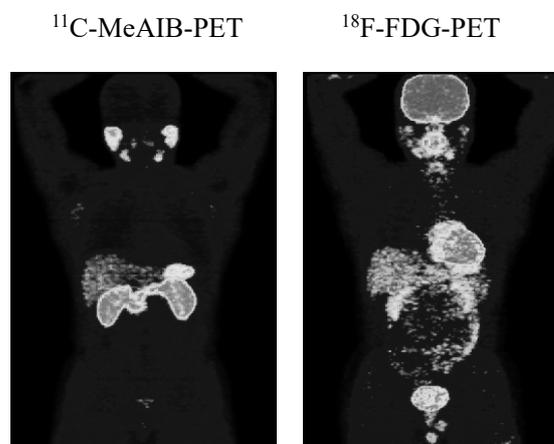


Fig.5 正常ボランティア臨床画像
(提供: 滋賀県立成人病センター研究所)

Fig.5 に正常ボランティアにおける ^{11}C -MeAIB-PET と ^{18}F -FDG-PET の画像を示す. ^{18}F -FDG は糖代謝が活発な脳や排泄による尿路系への集積が高いことがわかる. それに対し, ^{11}C -MeAIB は脳, 胸部, 下腹部への生理的集積が低いことがわかった. 前立腺部に注目すると, ^{11}C -MeAIB は生理的集積が少ないことから, 前立腺癌を明瞭に検出できるのではないかと考えられた.

IV. 結語

$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -MeAIB は前立腺癌細胞への投与後早期の高い集積性があり, 腫瘍対筋肉比が FDG と比較し, 高い値を示した. また, 臨床画像においては, 膀胱など下腹部の集積が低いことがわかった. 以上のことから, 腫瘍診断薬 ^{11}C -MeAIB の前立腺癌イメージング薬剤としての有用性が示された.

V. 謝辞

本稿を終えるにあたり, ご指導くださいました川井恵一教授, 小林正和助教, 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) 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(3): 227-234.
- 3) 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(8): 1003-1008.