

1105 アミノ酸輸送系 system ASC 特異的阻害剤探索のためのスクリーニング系の開発

坂下 真俊

(指導教員：川井恵一教授，小林正和助教)

要旨： ^{18}F -FDG による PET 検査は悪性腫瘍の診断に有用であるが，FDG がグルコースの類似体であることから，エネルギー代謝の盛んな脳や心筋などの正常組織や急性期の炎症組織にも集積するため，腫瘍との鑑別が困難になる場合がある．そこで，FDG とは異なるメカニズムで腫瘍に集積するポスト FDG 腫瘍診断薬の開発において，アミノ酸トランスポーターに着目した．腫瘍で高い輸送活性を示す中性アミノ酸輸送系は，比較的短い側鎖のアミノ酸を輸送する Na^+ 依存性の system A，system ASC (alanine-serine-cysteine) と嵩高い側鎖のアミノ酸を輸送する Na^+ 非依存性の system L に大別される．輸送寄与を評価するためには特異的阻害剤が必要不可欠なことから，本研究では system ASC の特異的阻害剤探索のためのスクリーニング系の開発を目指した．FDG の集積により腫瘍の鑑別診断が難しいとされている前立腺癌由来の腫瘍細胞株であり，定量 PCR による解析で中性アミノ酸トランスポーター system ASC のサブタイプ遺伝子である ASCT2 の高発現が確認されている¹⁾ ヒト前立腺癌由来腫瘍細胞株 DU145 に 6 種類の ^{14}C 標識アミノ酸 (L-Ala, L-Thr, L-Cys, L-Ser, D-Ala, D-Ser) と主要な輸送系の特異的阻害剤を Na^+ 存在下及び非存在下で投与し，細胞に集積した放射能を測定した．その結果，L-Ala と L-Thr はそのほとんどが Na^+ 依存的な輸送系で運ばれるものの， Na^+ 依存性の system A，代表的な薬物トランスポーターである OAT，OCT のいずれの阻害剤の影響も認められなかったことから，この 2 種のアミノ酸は system ASC の特異的阻害剤として使用できる可能性が見い出された．

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，グルコースの類似体である ^{18}F -FDG は，エネルギー代謝の亢進を集積機序としているため，脳や心筋などの糖代謝が活発な正常組織や，排泄経路である膀胱，急性期の炎症組織にも集積することから，これらの集積部位周辺に存在する腫瘍の鑑別が難しいことなどの欠点がある．これらの欠点を補うために FDG に代わるポスト FDG 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薬剤の開発が期待されている．増殖の盛んな腫瘍細胞では，グルコース代謝のみならずアミノ酸代謝も亢進しており，アミノ酸は腫瘍に高集積を示す．これは，タンパク合成の原料であるアミノ酸を輸送するアミノ酸トランスポーターが，増殖の盛んな腫瘍細胞で高発現しているためである． ^{18}F -FDG による鑑別診断が困難とされている腫瘍の一つに前立腺癌があるが，その患者検体及びヒト前立腺癌由来腫瘍細胞株である DU145 では，定量 PCR により中性アミノ酸輸送系 system A のサブタイプ遺伝子である SNAT2，及び system ASC のサブタイプ遺伝子である ASCT2 の高発現が確認されている¹⁾．主要な輸送系と Na^+ 依存性及び対応する阻害剤を Table 1 に示す．これらの輸送系の中で，system ASC にのみ，輸送寄与評価に必要な不可欠な特異的阻害剤が存在しない．本研究では，様々なアミノ酸輸送系の中でも，特に高い輸送活性を示す中性アミノ酸輸送系の一種である system ASC¹⁾ に着目し，6 種類の ^{14}C 標識アミノ酸と主要な輸送系の特異的阻害剤を用いて，腫瘍細胞への集積性を検討することによって system ASC に特異的な阻害剤探索のためのスクリーニング系の開発を試みた．

Table 1 本研究で対象とした輸送系, Na⁺依存性, 特異的阻害剤及び輸送基質³⁾

輸送系		Na ⁺ 依存性	阻害剤	基質
アミノ酸輸送系	system A	あり	MeAIB	広い基質選択性
	system B ⁰		BCH	中性アミノ酸
	system B ⁰⁺		BCH	中性・塩基性アミノ酸
	system ASC		(なし)	L-Ala, L-Thr, L-Cys, L-Ser など
	system L	なし	BCH	嵩高い側鎖のアミノ酸
	system PAT		MeAIB	Gly, L-Ala, L-Pro など
薬物輸送系	OAT	あり	PAH	有機アニオン
	OCT		TEA	有機カチオン

II. *In-vitro* 細胞集積実験

A) 実験方法と材料

Na⁺依存性実験及び輸送阻害実験は, Okudaira・Shikano らの方法^{1,2)}を参考にして行った. 本研究では, ヒト前立腺癌由来腫瘍細胞 DU145 を 37°C, 5% CO₂ 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. 集積阻害実験には, system A 及び PAT 特異的阻害剤である α -(methylamino)isobutyric acid (MeAIB) と system L 及び system B⁰, system B⁰⁺ の特異的阻害剤である 2-amino-2-norbornanecarboxylic acid (BCH), さらに代表的な薬物輸送系 organic anion transporter (OAT) 阻害剤である *p*-aminohippurate (PAH) と organic cation transporter (OCT) 阻害剤である tetraethylammonium chloride (TEA) を用いた (Table 1). これらの阻害剤はすべて Sigma 社製のものを使用した. トレーサーには 6 種類の ¹⁴C 標識アミノ酸 [¹⁴C]-L-alanine (¹⁴C-L-Ala), [¹⁴C]-L-threonine (¹⁴C-L-Thr), [¹⁴C]-L-cysteine (¹⁴C-L-Cys), [¹⁴C]-L-serine (¹⁴C-L-Ser), [¹⁴C]-D-alanine (¹⁴C-D-Ala), [¹⁴C]-D-serine (¹⁴C-D-Ser) を American Radiolabeled Chemicals から購入して使用した. 24 ウェル細胞培養用マルチウェルプレート (Falcon) に 1 ウェル辺り 1×10⁵ cells 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, 測定用培地を 200 μ L 加えて 37°C で約 10 分プレインキュベーションを行った. その後, 最終濃度が 1mM となるように調製した阻害剤を 200 μ L 及び最終濃度が 10 μ M となるように調製した ¹⁴C 標識アミノ酸 (トレーサー) を 100 μ L 投与して, 1 ウェル辺り 500 μ L でインキュベーションした. 投与後 10 分で測定用培地及び阻害剤を取り除き, 氷冷した PBS 500 μ L で 2 回ウェルを洗浄した. 0.1M NaOH 600 μ L で細胞を溶解し, そのうち, 500 μ L を分取し, Ultima Gold (PerkinElmer) 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

In-vitro 細胞集積実験結果

6 種類の ¹⁴C 標識アミノ酸の DU145 への集積率を Fig.1(A)~(F) に示す.

¹⁴C-L-Ala, ¹⁴C-L-Thr では, Na⁺存在下において, 阻害剤を投与しても集積率の低下がみられなかったことから, system A, system B⁰, system B⁰⁺ 及び OAT, OCT のいずれの輸送系でも輸送されないことが確認できた. ¹⁴C-L-Ala では Na⁺非存在下において MeAIB と BCH において集積率の低下がみられてはいるものの, Na⁺存在下と非存在下における control の集積率の差が大きいことから, ほとんどが Na⁺依存性のトランスポーターによって運ばれていると考えられる. また, ¹⁴C-L-Thr では Na⁺非存在下においても集積率の低下がみられなかったため, L-Ala と L-Thr は system ASC の特異的阻害剤として使用できる可能性があると考えられた (Fig.1A 及び B).

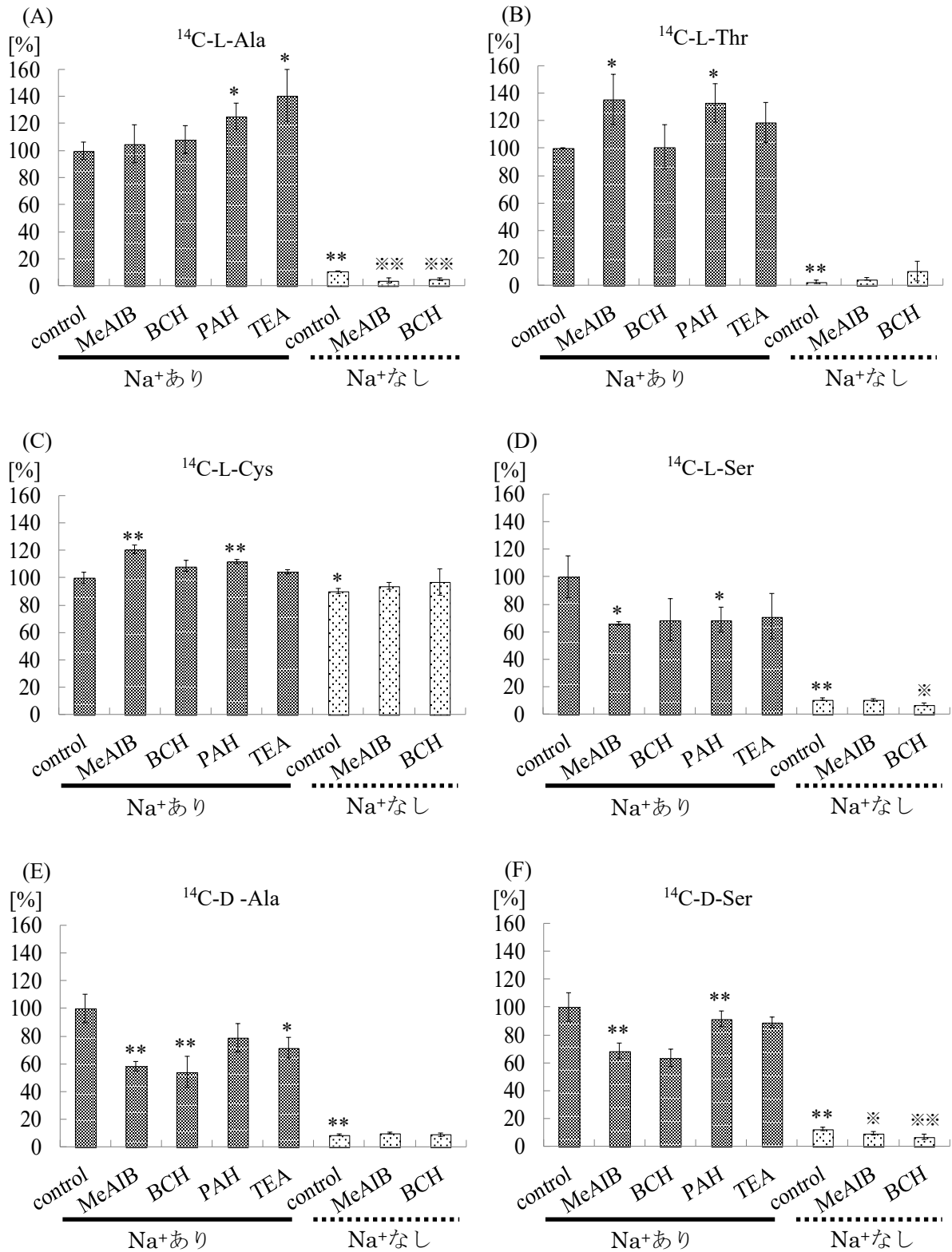


Fig.1 ヒト前立腺癌由来腫瘍細胞 DU145 における ^{14}C 標識アミノ酸の集積率

Na^+ 存在下の control における集積率を 100% とした時の、各々の阻害剤存在下での比率をグラフで示した。(A)~(F)はそれぞれ、(A) ^{14}C -L-Ala, (B) ^{14}C -L-Thr, (C) ^{14}C -L-Cys, (D) ^{14}C -L-Ser, (E) ^{14}C -D-Ala, (F) ^{14}C -D-Ser の集積阻害実験の結果を示す。

*: $p < 0.05$ vs 「 Na^+ 存在下の control」, **: $p < 0.01$ vs 「 Na^+ 存在下の control」.

※: $p < 0.05$ vs 「 Na^+ 非存在下の control」, ※※: $p < 0.01$ vs 「 Na^+ 非存在下の control」.

一方, $^{14}\text{C-L-Cys}$ は, Na^+ 存在下の control に対して Na^+ 非存在下における control の集積率に大きな減少がみられなかった. Cysteine は中性・塩基性条件下では微量の重金属イオンにより容易に空気酸化され二量体の cystine となり⁴⁾, cystine は Na^+ 非依存的な xCT という輸送系によって細胞内へ取り込まれる³⁾ことから, この実験結果は cysteine ではなく cystine の集積を見ている可能性も否定できないと考えられた (Fig.1 C).

さらに, $^{14}\text{C-L-Ser}$ はその大部分が Na^+ 依存性のトランスポーターにより輸送されることが確認できた. しかし, Na^+ 存在下でアミノ酸輸送系 system A の特異的阻害剤である MeAIB, 薬物輸送系 OAT の特異的阻害剤である PAH 及び, Na^+ 非存在下で system L の特異的阻害剤である BCH を投与したときに集積率が低下した. このことは, $^{14}\text{C-L-Ser}$ が, アミノ酸輸送系 system A, system L 及び薬物輸送系 OAT の基質となることを示しており, $^{14}\text{C-L-Ser}$ は system ASC の特異的阻害剤としては使用しにくいと考えられた (Fig. 1D). また, 生体内での代謝を受けにくい薬剤開発に応用しやすいと考え, $^{14}\text{C-L-Ala}$, $^{14}\text{C-L-Ser}$ の光学異性体である $^{14}\text{C-D-Ala}$, $^{14}\text{C-D-Ser}$ による検討も行ったが, $^{14}\text{C-L-Ser}$ と同様の結果を示したため system ASC の特異的阻害剤としては使用しにくいと考えられた (Fig.1 E 及び F).

III. 結語

本研究により, L-Ala または L-Thr において今回使用した各輸送系の特異的阻害剤の投与による集積率の低下が見られなかったことから, ASCT2 の高発現が確認されているヒト前立腺癌由来腫瘍細胞株 DU145 においては, 中性アミノ酸輸送系 system ASC の特異的阻害剤として, L-Ala または L-Thr が使用できることが確認された. また, 本研究で用いた特異的阻害剤及び Na^+ 有無の測定用培地を組み合わせることで, system ASC に特異的な阻害剤探索のためのスクリーニング系として応用できる可能性が見い出された.

IV. 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, 大江和代博士, 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.

V. 参考文献

- 1) Okudaira H, Shikano N, Nishii R, Miyagi T, Yoshimoto M, Kobayashi M, Ohe K, Nakanishi T, Tamai I, Namiki M, Kawai K. Putative transport mechanism and intracellular fate of *anti*- ^{18}F -FACBC (*Trans*-1-amino-3- ^{18}F -fluorocyclobutanecarboxylic acid) in human prostate cancer. *J. Nucl. Med.* 2011; **52**(5): 822-829.
- 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) 乾 賢一 編『薬物トランスポーター 活用ライブラリー —機能・輸送基質から創薬・臨床応用まで—』 羊土社: pp.216-236 (2009).
- 4) 村松正実, 清水孝雄, 広川信隆, 柳田充弘, 岩渕雅樹, 谷口維紹, 御子柴克彦, 矢原一郎『分子生物学辞典』 東京化学同人: pp.370 (1997).