

## 1207 標識アミノ酸集積に関与するアミノ酸輸送系寄与率の細分化評価法

内山 知香

(指導教員：川井 恵一教授，小林 正和助教)

要旨：現在，アミノ酸輸送系として多数の輸送系が確認されているが，同一の細胞系において，特定のアミノ酸集積に対する各輸送系の寄与を評価しているものは少ない．これまで，主に腫瘍で発現が亢進する  $\text{Na}^+$ 依存性の system A に対する特異的阻害剤である  $\alpha$ -methylaminoisobutyric acid : MeAIB および  $\text{Na}^+$ 非依存性の system L に対する特異的阻害剤 2-amino-2-norbornane carboxylic acid : BCH を用いて，それぞれの輸送系を評価してきた．本研究では，近年腫瘍での高発現が報告されている system A, system L を含む癌関連輸送系の寄与を細分化して評価することを目的とした．初めに，4 種類の標識アミノ酸と 2 種類のヒト前立腺癌由来の腫瘍細胞を用いて経時的集積実験を行った．さらに，腫瘍細胞へ高集積を示した標識アミノ酸の集積に関与する輸送系寄与率を細分化して評価するため，数種の阻害剤による競合阻害効果， $\text{Na}^+$ 依存性および  $\text{Li}^+$ 依存性を検討し，標識アミノ酸の集積量の変化から各寄与率を算出した．その結果，従来の system A, system L に加え， $\text{Na}^+$ 依存性のアミノ酸輸送系では system  $\text{B}^0$  および system  $\text{B}^{0+}$  の和，system N および system  $\text{y}^+\text{L}$  の和， $\text{Na}^+$ 非依存性のアミノ酸輸送系では system PAT, system asc の各寄与率をそれぞれ算出できた．よって，従来の方法と比べて，より詳細にアミノ酸輸送系の寄与を定量評価でき，特に阻害剤による競合阻害実験のみで 6 つの癌関連輸送系を区別して評価することが可能となった．

### I. はじめに

現在， $^{18}\text{F}$ -FDG を用いた PET 検査は保険適用となって以来，検査数は急激に増加している．しかし， $^{18}\text{F}$ -FDG は D-グルコース誘導体であり，エネルギー産生の盛んな腫瘍組織が高集積を示すと同時に，脳や心臓などの代謝が活発な正常組織でも生理的に高集積を示す．また，高い尿排泄性による膀胱への集積もみられるため，これらの臓器やその周辺での診断が困難となる．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．一般に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．これはアミノ酸トランスポーターが高発現しているためであり，我々の研究グループはこれまでに，その中でも特に腫瘍で高発現しているといわれている system A, system L を中心とした評価を行ってきた (Table.1)．この Shikano らの方法では，天然の細胞への標識アミノ酸集積における  $\text{Na}^+$ 依存性，および system A, system L に対する特異的阻害剤を用いた競合阻害実験を行い，その実験結果から， $\text{Na}^+$ 依存性では「system A」および「その他の  $\text{Na}^+$ 依存性の輸送系」， $\text{Na}^+$ 非依存性では「system L」および「その他の  $\text{Na}^+$ 非依存性の輸送系」と区分した各輸送系の寄与率を比較的簡便に算出してきた<sup>1)</sup>．なお，System A 特異的阻害剤として  $\alpha$ -methylaminoisobutyric acid : MeAIB, system L 特異的阻害剤として 2-amino-2-norbornane carboxylic acid : BCH を用いている．近年では，特に腫瘍細胞で高発現する癌関連輸送系 (Table.1)として system A, system L 以外の輸送系にも注目が集まっている<sup>2)</sup>ことから，本研究では  $\text{Na}^+$ 依存性に加えて  $\text{Li}^+$ 依存性と各輸送系選択的阻害剤 (Table.2) を使用した競合阻害実験による集積量の変化を利用して，これまでではその他として算出していた輸送系の寄与率をさらに細分化して評価することを試みた．

Table.1 本研究の対象としたアミノ酸輸送系

Na <sup>+</sup> 依存性輸送系	癌関連トランスポーター	従来の評価	Na <sup>+</sup> 非依存性輸送系	癌関連トランスポーター	従来の評価	
A	ATA1	A	L	LAT1	L	
B <sup>0</sup>		その他	asc		その他	
B <sup>0,+</sup>	ATB <sup>0,+</sup>		PAT			
Li <sup>+</sup> 依存性	N <sup>*</sup>		SN1,2	y <sup>+</sup>		
	y <sup>+</sup> L <sup>*</sup>			b <sup>0+</sup>		
ASC 他	ASCT2		x <sup>-</sup> c 他	xCT		

Table.2 使用した選択的阻害剤

選択的阻害剤	Na <sup>+</sup> 依存性		Na <sup>+</sup> 非依存性
		Li <sup>+</sup> 依存性	
MeAIB	A		PAT
BCH	B <sup>0</sup> , B <sup>0,+</sup>		L
AIB <sup>4),5)</sup>	—		L, asc
NEM <sup>3)</sup>	—		L, y <sup>+</sup>
Li <sup>+</sup> 依存性		N, y <sup>+</sup> L <sup>*</sup>	

\*Li<sup>+</sup>依存性の system N 及び y<sup>+</sup>L<sup>\*</sup> <sup>6),7)</sup>については、Li<sup>+</sup>存在下、非存在下での集積率の差から寄与率を算出した。

## II. 標識アミノ酸のヒト由来腫瘍細胞への経時的集積実験

### A) 実験材料と方法

この実験はIII. 競合阻害実験で用いる標識アミノ酸選択のため、Shikano らの方法 <sup>1)</sup>および Oka らの方法 <sup>3)</sup>を参考にして行った。腫瘍細胞には、<sup>18</sup>F-FDG による鑑別診断が困難とされている腫瘍の一つであるヒト前立腺癌由来の 2 種類の培養細胞 PC-3, DU145 を用い、Fetal Bovine Serum (Gibco) 10%, sodium pyruvate (Sigma) 1%を混合した RPMI-1640 Medium (Sigma)で、37°C, 5% CO<sub>2</sub>にて培養した。測定用培地として Na<sup>+</sup>を含むリン酸生理緩衝液 (Na-PBS) を作製した。137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6 mM D-glucose, 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>となるように調製した。トレーサーには 4 種類の標識アミノ酸 [<sup>14</sup>C(U)]-L-alanine : <sup>14</sup>C-L-Ala, [<sup>14</sup>C(U)]-L-serine : <sup>14</sup>C-L-Ser (共に PerkinElmer Life & Analytical Sciences), [N-methyl-<sup>3</sup>H]-methylaminoisobutyric acid : <sup>3</sup>H-MeAIB, [S-methyl-<sup>3</sup>H]-L-methionine : <sup>3</sup>H-L-Met (共に American Radiolabeled Chemicals) を使用した。細胞を 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 1×10<sup>5</sup> cells となるように播き、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 300μL 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、標識アミノ酸 (<sup>3</sup>H 体 : 約 18.5 kBq, <sup>14</sup>C 体 : 約 9.25 kBq) を 200μL 投与して 1 ウェルあたり 500μL でインキュベーションした。各インキュベーション時間 (1, 3, 5, 10, 15, 30, 60 分) 経過後、ウェル内の溶液を急速に取り除き、氷冷した PBS 500μL で 2 回細胞膜とウェルを洗浄した。0.1M NaOH 500μL で細胞を溶解し、そのうち 400μL をバイアルに移した。シンチレーター (Ultima Gold, Perkin-Elmer) 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

4 種類の標識アミノ酸の PC-3, DU145 への経時的集積率をそれぞれ Fig.1, Fig.2 に示す。PC-3, DU145 のどちらの細胞においても <sup>14</sup>C-L-Ala, <sup>14</sup>C-L-Ser の集積率が高いことから、III. 競合阻害実験では、この 2 種類の標識アミノ酸を用いることとした。インキュベーション時間が長くなるに従ってアミノ酸集積率は大幅に増加している。インキュベーション時間は、短すぎると適当なカウントが得られず、長すぎると目的としていない輸送系からの取り込みや輸送系を介さない取り込みによる集積が増加するため、選択的阻害剤の効果が十分に実験結果に反映されない。よって、III. 競合阻害実験におけるインキュベーション時間は 5 分が適切であると考えた。

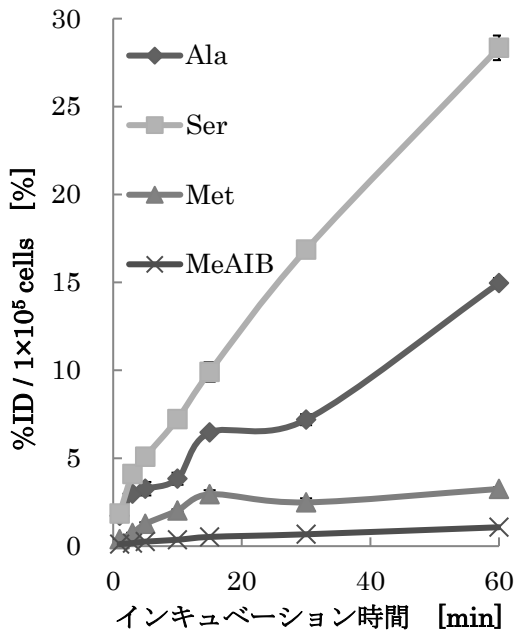


Fig.1 PC-3における標識アミノ酸集積率

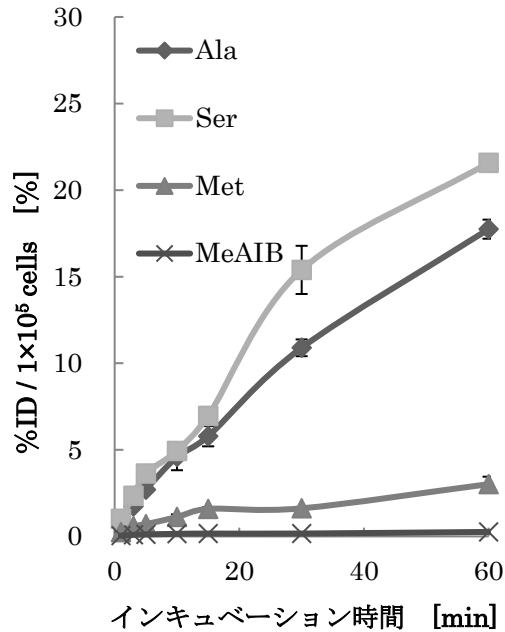


Fig.2 DU145における標識アミノ酸集積率

### III. 標識アミノ酸を用いた各輸送系の寄与に関する検討

#### A) 実験材料と方法

II. の方法と同様に培養したヒト前立腺癌由来細胞 PC-3, DU145 を 24 ウェル細胞培養用マルチウェルプレートに播き, 競合阻害実験を行った. 測定用培地として  $\text{Na}^+$ を含む PBS (Na-PBS) と,  $\text{NaCl}$  と  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  をそれぞれ同濃度の  $\text{LiCl}$  及び  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  で置換した PBS (Li-PBS) または choline-Cl 及び  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  で置換した PBS (Ch-PBS) を作製した. 選択的阻害剤として MeAIB (Sigma), BCH (Sigma), 2-aminoisobutyric acid : AIB (Sigma), *N*-ethylmaleimide : NEM (Nacalai tesque)<sup>4)</sup>を用いた (Table.2). トレーサーには 2 種類の  $^{14}\text{C}$  標識アミノ酸  $^{14}\text{C}$ -L-Ala,  $^{14}\text{C}$ -L-Ser を使用した. 培養用の培地を除去し, 測定用培地を 300  $\mu\text{L}$  加えて  $37^\circ\text{C}$  で 10 分間プレインキュベーションを行った. その後, 阻害剤 100 $\mu\text{L}$  及び  $^{14}\text{C}$ -L-Ala または  $^{14}\text{C}$ -L-Ser 100  $\mu\text{L}$  (約 9.25kBq) を同時投与して 1 ウェル辺り 500 $\mu\text{L}$  でインキュベーションした. 投与後 5 分でウェル内の溶液を急速に取り除き, 氷冷した PBS 500 $\mu\text{L}$  で 2 回細胞膜とウェルを洗浄した. 0.1M NaOH 500 $\mu\text{L}$  で細胞を溶解し, そのうち 400 $\mu\text{L}$  をバイアルに移した. シンチレーター (Ultima Gold) と混合し, 液体シンチレーションカウンターで測定した.

#### B) 結果と考察

PC-3, DU145 における 2 種類の標識アミノ酸集積に対する各輸送系への寄与率をそれぞれ Table.2, Table.3 に示す. 従来法と今回の方法とを比較すると, PC-3, DU145 のどちらの細胞においても, その他とされていた部分の寄与率が減少し,  $\text{Na}^+$ 依存性では system  $\text{B}^0$  および system  $\text{B}^{0+}$ , system N および system  $\text{y}^+\text{L}$ ,  $\text{Na}^+$ 非依存性では system PAT, system asc の寄与率をそれぞれ算出することができた.

また,  $^{14}\text{C}$ -L-Ala の system A 以外の  $\text{Na}^+$ 依存性輸送系の寄与率を PC-3, DU145 とで比較してみると, PC-3 ではその他の寄与率 (42%) が system  $\text{B}^0$  および system  $\text{B}^{0+}$  (36%) と system N および system  $\text{y}^+\text{L}$  (6%) として輸送系が特定されたのに対し, DU145 では全体の寄与率 (73%) のうち, わずかに system N および system  $\text{y}^+\text{L}$  の寄与率 (8%) しか特定できず, 大部分は system ASC を含む他の輸送系の寄与 (65%) であることが確認された. このように, 同一のアミノ酸でも腫瘍細胞の種類によって集積に寄与する輸送系が大きく異なることがわかった.

Table.3 PC-3 における各輸送系の寄与率

標識アミノ酸		Na <sup>+</sup> 依存性輸送系					Na <sup>+</sup> 非依存性輸送系					
		計	A	B <sup>0</sup> ,B <sup>0+</sup>	N,y <sup>+</sup> L	ASC他	計	L	PAT	asc	y <sup>+</sup>	X <sub>c</sub> 他
<sup>14</sup> C-L-Ala	従来	87	45	42			13	3	10			
	今回	87	45	36	6	0	13	3	4	0	0	6
<sup>14</sup> C-L-Ser	従来	86	21	65			14	3	11			
	今回	86	21	16	6	43	14	3	3	3	0	5

Table.4 DU145 における各輸送系の寄与率

標識アミノ酸		Na <sup>+</sup> 依存性輸送系					Na <sup>+</sup> 非依存性輸送系					
		計	A	B <sup>0</sup> ,B <sup>0+</sup>	N,y <sup>+</sup> L	ASC他	計	L	PAT	asc	y <sup>+</sup>	X <sub>c</sub> 他
<sup>14</sup> C-L-Ala	従来	93	20	73			7	0	7			
	今回	93	20	0	8	65	7	0	0	0	0	7
<sup>14</sup> C-L-Ser	従来	91	23	68			9	2	7			
	今回	91	23	24	1	43	9	2	1	0	0	6

※癌関連輸送系には□を附した

#### IV. 結語

本研究を行うことにより、標識アミノ酸集積に関与するアミノ酸輸送系の寄与率を従来法と比べて、細分化して評価することができた。また、すべての輸送系を個々には評価できなかったものの、近年注目を集めている癌関連輸送系に着目すると、system A, system Lに加え、6つの癌関連輸送系の寄与を区別して評価することが可能となった。

#### 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

- Shikano N, Kawai K, Nakajima S, et al. 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.
- Nakanishi T, Tamai I. Solute carrier transporters as targets for drug delivery and pharmacological intervention for chemotherapy. *J. Pharm. Sci.*, 2011; 100: 3731-3750.
- Oka S, Okudaira H, Yoshida Y, et al. Transport mechanism of *trans*-1-amino-3-fluoro-[1-<sup>14</sup>C]cyclobutanecarboxylic acid in prostate cancer cells. *Nucl. Med. Biol.*, 2012; 39: 109-119.
- D.B. Shennan, J. Thomson, M.C. Barber, et al. Functional and molecular characteristics of system L in human breast cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2003; 1611: 81-90.
- Fukasawa Y, Segawa H, Ju Young Kim, et al. Identification and characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral Amino acid Transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 9690-9698.
- Nakanishi T, Sugawara M, Huang W, et al. Structure, function, and tissue expression pattern of human SN2, a Subtype of the amino acid transport system N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001; 281: 1343-1348.
- R. Deves, S. Angelo and A.M. Rojas. System y<sup>+</sup>L: the broad scope and cation modulated amino acid transporter. *Exp. Physiol.*, 1998; 83: 211-220.