

1406 標識 L-histidine のヒト由来脳腫瘍細胞への取込みと AAT 寄与率の評価

鈴木 修斗

(指導教員：川井 恵一教授)

要旨：現在，核医学画像検査の腫瘍診断に使用されている ^{18}F -2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (^{18}F -FDG)に続き，腫瘍細胞のアミノ酸輸送系発現亢進を利用した新たな post-FDG 腫瘍イメージング薬剤の開発が期待されている．本研究は，正常脳細胞にも生理的に高集積する ^{18}F -FDG では検出困難である脳腫瘍の診断を目的とし，悪性度の異なるヒト由来脳腫瘍細胞への標識アミノ酸の取込み及びアミノ酸輸送系寄与率を評価した．また今回，癌関連アミノ酸輸送系の中でも悪性度との相関性が報告されている system N に着目し， Li^+ 依存性と L-arginine(L-Arg)の競合阻害性を利用した system N のみの寄与を評価する手法を確立した．ヒト由来脳腫瘍細胞には，世界保健機関(WHO)の grade 分類に基づく高悪性度細胞(A172・T98G)及び低悪性度細胞(SW1088・Hs683)を用い，標識アミノ酸には，system N の基質と期待される ^3H -L-histidine(^3H -L-His)及びその比較対象としてすでに臨床核医学画像検査で使用されている ^{11}C -L-methionine(^{11}C -L-Met)の ^3H 標識体である ^3H -L-Met を選択した．経時的取込み量の比較から， ^3H -L-His は ^3H -L-Met より高い取込みを示し，さらにアミノ酸輸送系寄与率の評価より，低悪性度脳腫瘍細胞への ^3H -L-His の取込みには system N の関与があることが明らかとなった．以上のことより，L-His を基本骨格とする癌関連アミノ酸輸送系 system N をターゲットとした新たな腫瘍イメージング薬剤の開発の可能性が見出された．

I. はじめに

現在，臨床における PET 腫瘍診断薬として ^{18}F -FDG が主に使用されているが，D-グルコース誘導体である ^{18}F -FDG は，エネルギー代謝の盛んな脳や心筋の正常組織，排泄経路である膀胱，急性期の炎症組織などにも高集積するため，これらの臓器周辺の腫瘍が検出困難となる場合がある．これらの欠点を補うための FDG に代わる post-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だけでなくアミノ酸代謝も亢進しており，同時にアミノ酸輸送を担う特定のアミノ酸輸送系が腫瘍細胞で高発現している．我々は現在までに，腫瘍細胞で高発現している system L や system A などの癌関連アミノ酸輸送系を利用した post-FDG 腫瘍イメージング薬剤の開発に関連して，標識アミノ酸の腫瘍細胞取込みに対する癌関連アミノ酸輸送系の寄与率を評価してきた．アミノ酸輸送系は， Na^+ が存在すると輸送活性を示す Na^+ 依存性輸送系と， Na^+ が存在しない状態でも輸送活性を示す Na^+ 非依存性輸送系に大別され，その中でも Na^+ 依存性輸送系である system N・system y^+L は， Li^+ 存在下においても輸送活性を示す¹⁾．さらに，癌関連アミノ酸輸送系の1つである system N は glioma の悪性度との相関性が報告されている²⁾が，system N 単独での評価法は未だ確立されていない．そこで今回新たに， Li^+ 存在下における L-arginine(L-Arg)の system y^+L への高親和性を利用し，system N 単独での寄与を評価する手法を確立した．本研究は，正常脳細胞にも生理的に高集積する ^{18}F -FDG では検出困難である脳腫瘍の診断を目的とし，悪性度の異なるヒト由来脳腫瘍細胞への標識アミノ酸の取込み及びアミノ酸輸送系寄与率の評価を行った．

II. 標識アミノ酸のヒト由来脳腫瘍細胞への取込みの検討

A) 実験材料と方法

ヒト由来脳腫瘍細胞には、American Type Culture Collection より入手した高悪性度脳腫瘍細胞 A172・T98G, 低悪性度脳腫瘍細胞 SW1088・Hs683 の4種類を用いた^{3,4)}. 脳腫瘍細胞は37°C, 5%CO₂で培養し, 測定用培地としてNa⁺を含むPBS:Na⁺-PBS(pH 7.3)を作成した. トレーサーには[ring-2-5-³H]-L-histidine(³H-L-His)と, 実験の比較対象として[methy-³H]-L-methionine(³H-L-Met)を室町薬品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.

ヒト由来脳腫瘍細胞に対する各標識体の経時的細胞内取込み実験方法は, Oka らの方法⁵⁾に従った. はじめに, 培養用の培地を除去し, 測定用培地を500 μL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, ³H標識アミノ酸(18.5 kBq/well)を投与し, そこから2, 5, 10, 15, 30, 60分後に測定用培地を取り除き, 氷冷したPBS 600 μLでウェルを2回洗浄した. 0.1M NaOH 500 μLで細胞を溶解し, そのうち300 μLを分取して, 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

4種類のヒト由来脳腫瘍細胞への経時的取込み量をそれぞれFig.1 (A)~(D)に示す. いずれの細胞においても³H-L-Metと比較して³H-L-Hisが速やかで高い取込みを示したことから, 新規アミノ酸イメージング薬剤としての有用性が期待された.

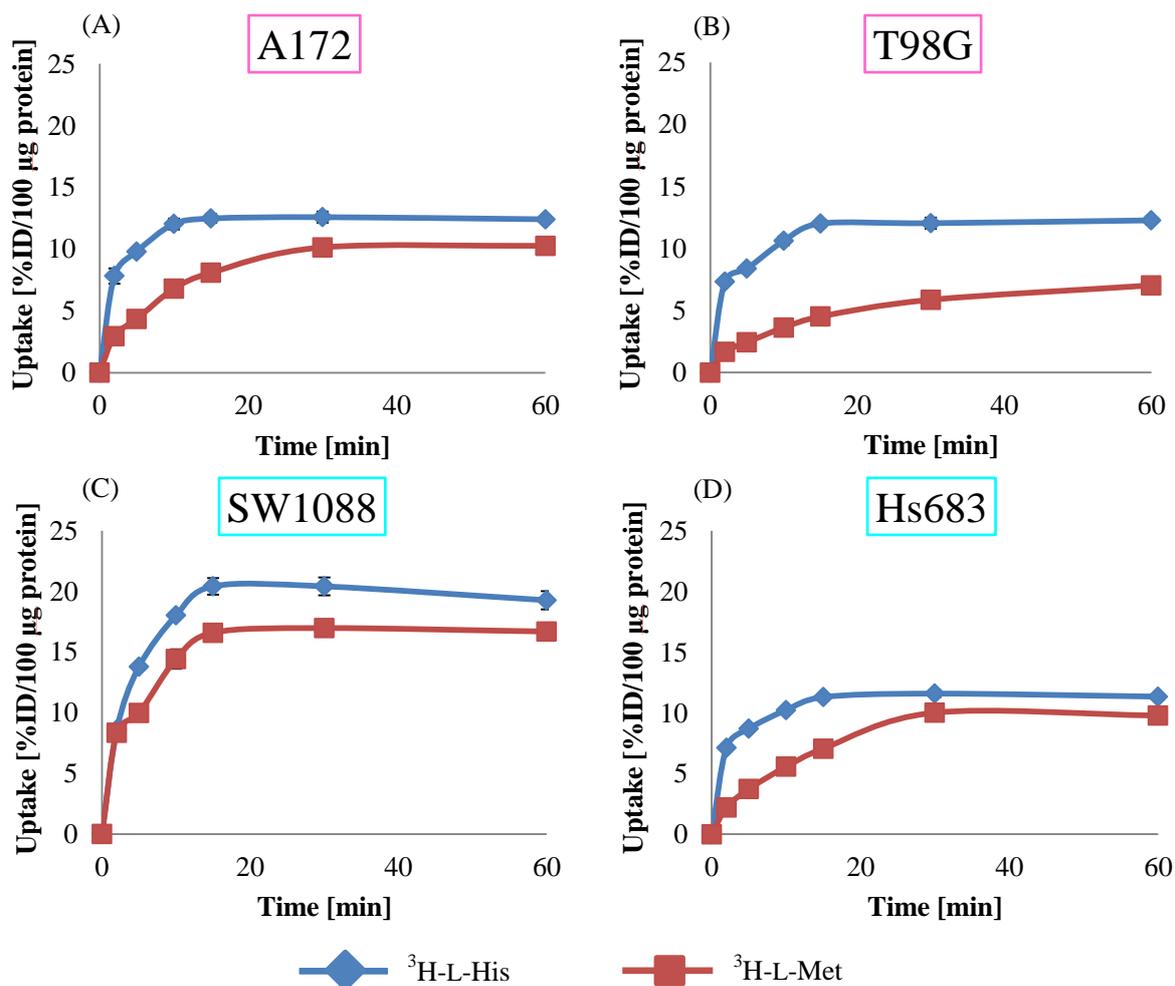


Fig.1 脳腫瘍細胞における標識アミノ酸の取込み

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

WHO の grade 分類に基づく高悪性度脳腫瘍細胞 A172・T98G, 低悪性度脳腫瘍細胞 SW1088・Hs683 を用いて, アミノ酸輸送系寄与率の評価を行った. ヒト由来脳腫瘍細胞は 37°C, 5%CO₂ で培養し, 測定用培地として Na⁺を含む PBS : Na⁺-PBS(pH 7.3), Li⁺を含む PBS : Li⁺-PBS(pH 7.3), Choline(Ch)を含む PBS : Ch-PBS(pH 7.3)を作成した. System A・IMINO 及び PAT 特異的阻害剤の α -methylaminoisobutyric acid(MeAIB), system B⁰・B⁰⁺ 及び L 特異的阻害剤の 2-amino-2-norbornanecarboxylic acid(BCH), system L 及び asc 特異的阻害剤の 2-aminoisobutyric acid(AIB), system L 及び y⁺特異的阻害剤の N-ethylmaleimide(NEM), さらに, system N 単独評価に際しては, system y⁺L 高親和性基質の L-Arg を用いた. これらの阻害剤及び高親和性基質は Sigma 社製のものを使用した. トレーサーには ³H-L-His と, 実験の比較対象として ³H-L-Met を使用した. 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 500 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 1 mM となるように調製した阻害剤及び ³H 標識アミノ酸(18.5 kBq/well)を投与し, そこから 5 分後に測定用培地及び阻害剤を取り除き, 氷冷した PBS 600 μ L で 2 回ウェルを洗浄した. 0.1M NaOH 500 μ L で細胞を溶解し, そのうち 300 μ L を分取して, 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) アミノ酸輸送系寄与率の算出法

アミノ酸輸送系寄与率の算出は, Ono らの方法⁶⁾を参考に行った. 我々の研究グループでは, 6 種類の癌関連アミノ酸輸送系(system A・B⁰⁺・N・ASC・L・X_c)を区別して評価することが可能であるが, さらに, 本検討において, 従来までは困難とされてきた system N 単独での評価を試みた. 本法では, system y⁺L の高親和性基質である L-Arg を使用した. L-Arg は, system B⁰⁺・system y⁺L・system b⁰⁺・system y⁺を阻害し, Li⁺存在下では system y⁺L のみを阻害する⁶⁾. 従って, system N と system y⁺L を区別した評価を行うために, まず Li⁺存在下の control の寄与率(system N+system y⁺L+Na⁺非依存性輸送系の全取込み)から Li⁺存在下の L-Arg 投与時の寄与率(system N+Na⁺非依存性輸送系の全取込み)を差し引くことで, system y⁺L の取込みが算出できる. そして, Li⁺存在下の L-Arg 投与時の寄与率から Ch 存在下の control の寄与率(Na⁺非依存性輸送系の全取込み)を差し引くことで, 癌関連アミノ酸輸送系 system N 単独での算出が可能となる.

C) 結果と考察

4 種類の脳腫瘍細胞の, 標識アミノ酸の取込みに対する各輸送系の寄与率をそれぞれ Table.1, Table.2 に示す. ³H-L-His は主に system L により取込まれ, 特に低悪性度細胞の取込みに関してのみ system N の関与が明らかとなった. ³H-L-Met では system N の関与が見られず, 主に system L によって取込まれた. 一般に, 本研究において注目した癌関連アミノ酸輸送系 system N は, 酸性条件下ではその活性が低下することが報告されており⁶⁾, また, 高悪性度の腫瘍であるほど腫瘍内は酸性に傾くと報告されている^{7,8)}. つまり, 高悪性度腫瘍において system N の寄与は極めて少ないと考えられる. 本検討において, system N の寄与は ³H-L-His の取込みに関して低悪性度脳腫瘍細胞でのみ明らかとなり, この結果は, 酸性条件下で活性が低下すると報告されている system N の特性と合致した.

Table.1 $^3\text{H-L-His}$ の取込みに対する各アミノ酸輸送系寄与率

		脳腫瘍細胞			
		A172	T98G	SW1088	Hs683
寄与率[%]	Na ⁺ 依存性	21.7	14.1	45.2	46.5
	system A・IMINO	10.8	8.0	11.3	10.7
	system B ⁰ , B ^{0,+}	10.9	6.1	19.1	23.3
	system N	-	-	14.8	12.5
	system y ⁺ L	-	-	-	-
	system ASC 他	-	-	-	-
	Na非依存性	78.3	85.9	54.8	53.5
	system PAT	-	-	-	-
	system L	65.9	74.4	45.4	43.8
	system asc	-	-	-	-
	system y ⁺	-	-	-	-
	system X _c 他	12.4	11.5	9.4	9.7

Table.2 $^3\text{H-L-Met}$ の取込に対する各アミノ酸輸送系寄与率

		脳腫瘍細胞			
		A172	T98G	SW1088	Hs683
寄与率[%]	Na ⁺ 依存性	-	-	6.0	40.4
	system A・IMINO	-	-	-	-
	system B ⁰ , B ^{0,+}	-	-	-	9.4
	system N	-	-	-	-
	system y ⁺ L	-	-	-	19.9
	system ASC 他	-	-	6.0	11.1
	Na非依存性	93.0	100	94.0	59.6
	system PAT	11.5	-	-	-
	system L	64.6	71.6	69.3	35.7
	system asc	-	-	-	-
	system y ⁺	-	-	-	-
	system X _c 他	23.9	28.4	24.7	23.9

※癌関連アミノ酸輸送系は赤字で示した。

IV. 結語

$^3\text{H-L-His}$ は、 $^3\text{H-L-Met}$ より高い取込みを示した。また、本研究では従来までは成し得なかった癌関連アミノ酸輸送系 system N 単独での寄与率の算出法を新たに確立し、両標識アミノ酸におけるアミノ酸輸送系寄与率の検討を行った。その結果、 $^3\text{H-L-His}$ の低悪性度脳腫瘍細胞への取込みにおいてのみ、system N の関与が明らかとなった。このことから、L-His を基本骨格とする癌関連アミノ酸輸送系 system N をターゲットとした新たな腫瘍イメージング薬剤の開発の可能性が見い出された。

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、丹羽隆博さん及び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) Nakanishi T, Kekuda R, Fei YJ, Hatanaka T, Sugawara M, Martindale RG, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V: Cloning and functional characterization of a new subtype of the amino acid transport system N. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001, 281:C1757-1768.
- 2) Sidoryk M, Matyja E, Dybel A, Zielinska M, Bogucki J, Jaskolski DJ, Liberski PP, Kowalczyk P, Albrecht J: Increased expression of a glutamine transporter SNAT3 is a marker of malignant gliomas. *Neuroreport* 2004, 15:575-578.
- 3) Kadowaki M, Yoshioka H, Kamitani H, Watanabe T, Wade PA, Eling TE: DNA methylation-mediated silencing of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1/GDF15) in glioma cell lines. *Int J Cancer* 2012, 130:267-277.
- 4) Le Mercier M, Fortin S, Mathieu V, Roland I, Spiegl-Kreinecker S, Haibe-Kains B, Bontempi G, Decaestecker C, Berger W, Lefranc F, Kiss R: Galectin 1 proangiogenic and promigratory effects in the Hs683 oligodendroglioma model are partly mediated through the control of BEX2 expression. *Neoplasia* 2009, 11:485-496.
- 5) Oka S, Okudaira H, Yoshida Y, Schuster DM, Goodman MM, Shirakami Y: Transport mechanisms of trans-1-amino-3-fluoro[1-¹⁴C]cyclobutanecarboxylic acid in prostate cancer cells. *Nucl Med Biol* 2012, 39:109-119.
- 6) Ono M, Oka S, Okudaira H, Schuster DM, Goodman MM, Kawai K, Shirakami Y: Comparative evaluation of transport mechanisms of trans-1-amino-3-[¹⁸F]fluorocyclobutanecarboxylic acid and L-[methyl-¹¹C]methionine in human glioma cell lines. *Brain Res* 2013, 1535:24-37.
- 7) Kato Y, Lambert CA, Colige AC, Mineur P, Noel A, Frankenne F, Foidart JM, Baba M, Hata R, Miyazaki K, Tsukuda M: Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 2005, 280:10938-10944.
- 8) Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, Maehata Y, Suzuki A, Maeda T, Baba Y: Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int* 2013, 13:89.