

# 1505 [S-methyl-<sup>11</sup>C]-D-methionine のヒト由来脳腫瘍細胞への集積性とアミノ酸輸送系寄与率の評価

岡村 佳奈

(指導教員：川井 恵一 教授)

要旨：2-[<sup>18</sup>F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose (<sup>18</sup>F-FDG) は脳への生理的集積が高いことから、脳腫瘍の検出や診断には、アミノ酸 PET 製剤である[S-methyl-<sup>11</sup>C]-L-methionine が優れている。しかし、L-methionine (L-Met) は天然アミノ酸であることから体内でメチル基転移などの代謝を受けて化学構造が変化することにより、投与後早期からアミノ酸以外の代謝物の動態を反映している点を考慮する必要がある。本研究では、非天然アミノ酸で高い代謝安定性が期待される光学異性体 D-methionine (D-Met) の[S-methyl-<sup>3</sup>H] 標識体 <sup>3</sup>H-D-methionine (<sup>3</sup>H-D-Met) を選択し、悪性度の異なるヒト由来脳腫瘍細胞への集積性とアミノ酸輸送系の寄与率を、<sup>3</sup>H 標識体である <sup>3</sup>H-L-Met と比較した。ヒト由来脳腫瘍細胞の中から WHO の grade 分類に基づき高悪性度細胞 (A172, T98G) 及び低悪性度細胞 (SW1088, Hs683) を選択し、各標識 Met の経時的細胞内集積実験と、アミノ酸輸送系の特異的阻害剤を用いた集積阻害実験を行った。その結果、低悪性度細胞では <sup>3</sup>H-L-Met の集積が高くなったものの、高悪性度細胞においては <sup>3</sup>H-D-Met の集積が <sup>3</sup>H-L-Met より高くなった。また、腫瘍細胞集積に対するアミノ酸輸送系の寄与率を評価したところ、全ての脳腫瘍細胞において system L の寄与が大きかったが、<sup>3</sup>H-D-Met では全ての細胞で 10%以上の system B<sup>0+</sup>, B<sup>0</sup> の寄与が見られた。従って、D-Met はがん関連アミノ酸輸送系 system B<sup>0+</sup> の寄与により、高悪性度細胞において L-Met よりも腫瘍集積が増加したと考えられ、<sup>11</sup>C-D-Met が system L のみならず、system B<sup>0+</sup> をターゲットとした新しいタイプの脳腫瘍 PET 製剤になり得る可能性が示された。

## I. はじめに

現在、臨床画像検査では PET 腫瘍診断薬として <sup>18</sup>F-FDG が主に使用されているが、<sup>18</sup>F-FDG は、エネルギー代謝の盛んな脳への生理的集積が高いことから、脳腫瘍の検出や診断には、アミノ酸 PET 製剤である[S-methyl-<sup>11</sup>C]-L-methionine (<sup>11</sup>C-L-Met) が <sup>18</sup>F-FDG よりも優れている<sup>1,2)</sup>。しかし、L-Met は天然アミノ酸であることからアミノ酸トランスポーターにより細胞内に取り込まれた後、多様な酵素の基質となり数分レベルで代謝変化を受け、一部は蛋白質合成の原料として蛋白質に取り込まれる。更に、L-Met に特有の代謝経路としてメチル基転移があり、標識部位が転移される<sup>3)</sup>。従って、その結果の解析にはこれらの代謝の影響を考慮しなければならない。腫瘍はその増殖に必要な蛋白質合成が盛んであり、天然アミノ酸の利用率も高いが、蛋白質合成には利用されない非天然アミノ酸も同様に腫瘍に高集積を示す。これは、蛋白質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腫瘍では高発現している結果であり、このアミノ酸トランスポーター機能を診断指標とするならば、代謝の影響を受けない非天然アミノ酸が有用であると期待される。本研究は、高い代謝安定性が期待される非天然アミノ酸[S-methyl-<sup>3</sup>H]-D-methionine (<sup>3</sup>H-D-Met) を選択し、ヒト由来脳腫瘍細胞への集積性とアミノ酸輸送系寄与率を[S-methyl-<sup>3</sup>H]-L-methionine (<sup>3</sup>H-L-Met) と比較することを目的として、悪性度の異なるヒト由来脳腫瘍細胞への標識アミノ酸への集積量及びアミノ酸輸送系寄与率の評価を行った。

## II. 標識アミノ酸を用いたヒト由来脳腫瘍細胞への集積の検討

### A) 実験材料, 方法

ヒト由来脳腫瘍細胞には, American Type Culture Collection から購入した高悪性度脳腫瘍細胞株 A172, T98G と低悪性度脳腫瘍細胞株 SW1088, Hs683<sup>4,5)</sup>の計 4 種類を用いた. ヒト由来脳腫瘍細胞は 37 度, 5 % CO<sub>2</sub> で培養し, 測定用培地として Na<sup>+</sup>を含むクエン酸緩衝液 (Na<sup>+</sup>-PBS) (pH 7.3) を作成した. 放射性薬剤には <sup>3</sup>H-D-Met (室町薬品) と, 比較対象として <sup>3</sup>H-L-Met (室町薬品) 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 1×10<sup>5</sup> 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集積実験は, Oka らの方法<sup>6)</sup>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 度で約 10 分プレインキュベーションを行った. その後, <sup>3</sup>H-D-Met と <sup>3</sup>H-L-Met (18.5 kBq/well) をそれぞれ投与し, 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 Na<sup>+</sup>-PBS 500 μL でウェルを 2 回洗浄した. 0.1 M 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集積量を Fig.1 に示す. 高悪性度細胞 A172, T98G においては <sup>3</sup>H-D-Met の集積が <sup>3</sup>H-L-Met よりも高くなった. 一方, 低悪性度細胞 SW1088 では投与後早期から <sup>3</sup>H-L-Met の集積が高く, Hs683 では投与後 30 分で <sup>3</sup>H-L-Met の集積が高くなった.

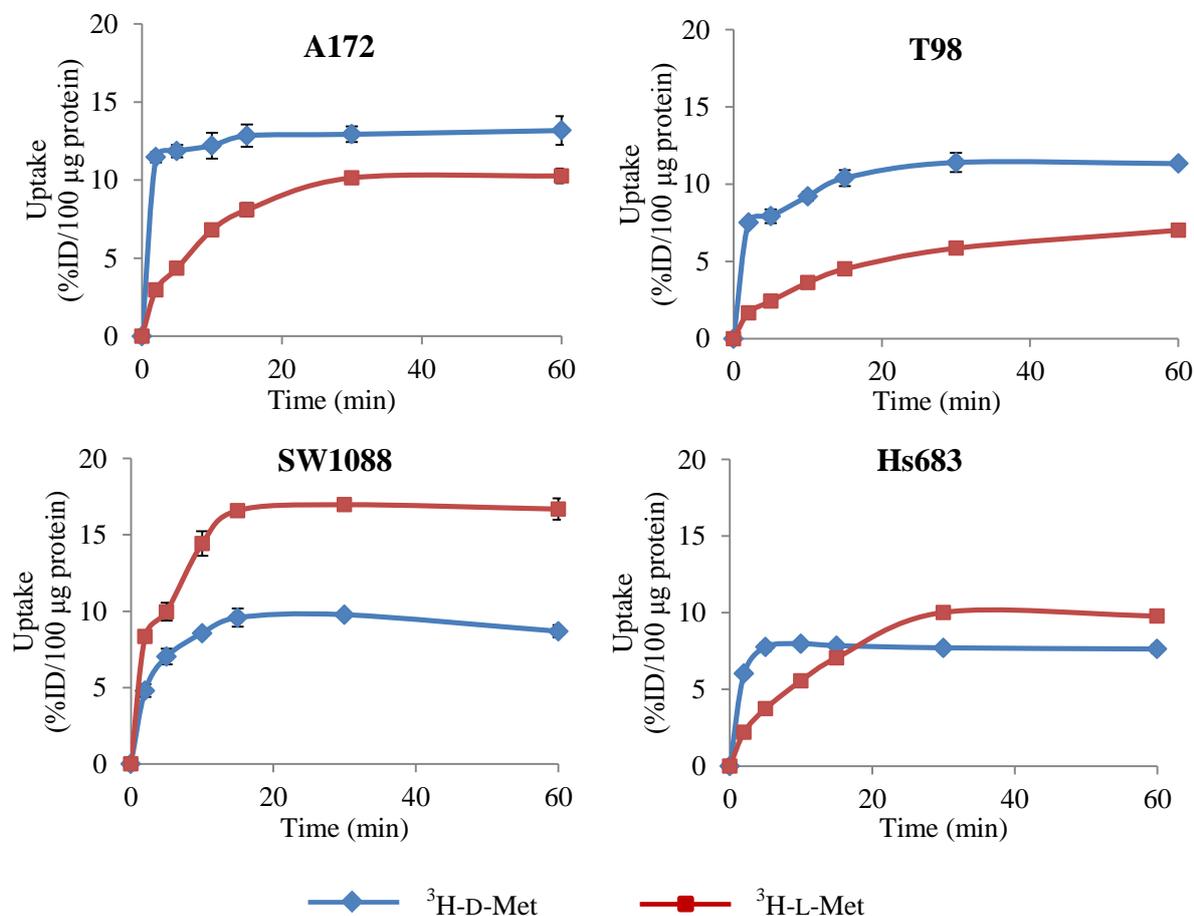


Fig.1 ヒト由来脳腫瘍細胞における標識アミノ酸の集積量

### III. 標識アミノ酸を用いたアミノ酸輸送系の寄与に関する検討

#### A) 実験材料, 方法

IIと同じヒト由来脳腫瘍細胞株を用いて, 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度, 5% CO<sub>2</sub>で培養し, 測定用培地としてNa<sup>+</sup>を含むPBS: Na<sup>+</sup>-PBS (pH 7.3), Li<sup>+</sup>を含むPBS: Li<sup>+</sup>-PBS (pH 7.3), Ch<sup>+</sup>を含むPBS: Ch<sup>+</sup>-PBS (pH 7.3)を作成した. 特異的阻害剤は, system B<sup>0+</sup>, B<sup>0</sup>及びL特異的阻害剤の2-amino-2-norbornanecarboxylic acid (BCH) (Sigma), system A, IMINO及びPAT特異的阻害剤の $\alpha$ -methylaminoisobutyric acid (MeAIB) (Sigma), system L及びasc特異的阻害剤の2-aminoisobutyric acid (AIB) (Sigma), system L及びy<sup>+</sup>特異的阻害剤のN-ethylmaleimide (NEM) (Sigma)を用いた. 放射性薬剤には<sup>3</sup>H-D-Met (室町薬品)と, 比較対象として<sup>3</sup>H-L-Met (室町薬品)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1×10<sup>5</sup> 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  $\mu$ L加えて37度で約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<sup>3</sup>H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, 氷冷した各PBS 500  $\mu$ Lで2回ウェルを洗浄した. 0.1 M NaOH 500  $\mu$ Lで細胞を溶解し, そのうち300  $\mu$ 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) 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 らの方法を参考に行った<sup>7)</sup>。本算出法では、 $\text{Na}^+$ 存在下、 $\text{Li}^+$ 存在下、 $\text{Ch}^+$ 存在下において阻害剤を加えない場合の集積をそれぞれ  $\text{Na}^+$  control,  $\text{Li}^+$  control,  $\text{Ch}^+$  control とした。更に、 $\text{Na}^+$  control の値を 100% とし、阻害剤負荷時の集積率を % of control /  $\text{Na}^+$  として表した。MeAIB は、 $\text{Na}^+$ 存在下では  $\text{Na}^+$ 依存性の system A, IMINO 及び  $\text{Na}^+$ 非依存性の system PAT の全てを阻害し、 $\text{Ch}^+$ 存在下では  $\text{Na}^+$ 非依存性の system PAT のみを阻害する。従って、 $\text{Na}^+$  control の値から MeAIB 負荷時の集積率を差し引くことで system A, system IMINO, system PAT が算出でき (Fig.2 の③), 更に  $\text{Ch}^+$  control の値から MeAIB 負荷時の集積率を差し引くことで system PAT が算出できる (Fig.2 の⑥)。 $\text{Na}^+$ 存在下で求めた system A, system IMINO, system PAT から  $\text{Ch}^+$ 存在下で求めた system PAT を引くことで、system A, system IMINO の算出が可能となる。同様に、BCH は、 $\text{Na}^+$ 存在下では  $\text{Na}^+$ 依存性の system  $\text{B}^{0+}$ ,  $\text{B}^0$  及び  $\text{Na}^+$ 非依存性の system L を阻害し、 $\text{Ch}^+$ 存在下では  $\text{Na}^+$ 非依存性の system L のみを阻害する。これを利用し、 $\text{Na}^+$  control の値から BCH 負荷時の集積率を差し引くことで system  $\text{B}^{0+}$ ,  $\text{B}^0$ , system L が算出でき (Fig.2 の④), 更に  $\text{Ch}^+$  control の値から BCH 負荷時の集積率を差し引くことで system L のみが算出できる (Fig.2 の⑦)。 $\text{Na}^+$ 存在下で求めた system  $\text{B}^{0+}$ ,  $\text{B}^0$ ・system L から  $\text{Ch}^+$ 存在下で求めた system L を引くことで、system  $\text{B}^{0+}$ ,  $\text{B}^0$  が算出できる。また先に示した輸送系以外にも、 $\text{Na}^+$ 非依存性輸送系である system asc 及び  $\text{y}^+$ の寄与も特異的阻害剤によって算出することができる。AIB は  $\text{Ch}^+$ 存在下において system asc を NEM は system  $\text{y}^+$ を評価することができる (Fig.2 の⑧及び⑨)<sup>7-9)</sup>。以上のように、本研究では、9 種類のがん関連アミノ酸輸送系を阻害剤負荷により区別して評価することができた (Fig.2)。

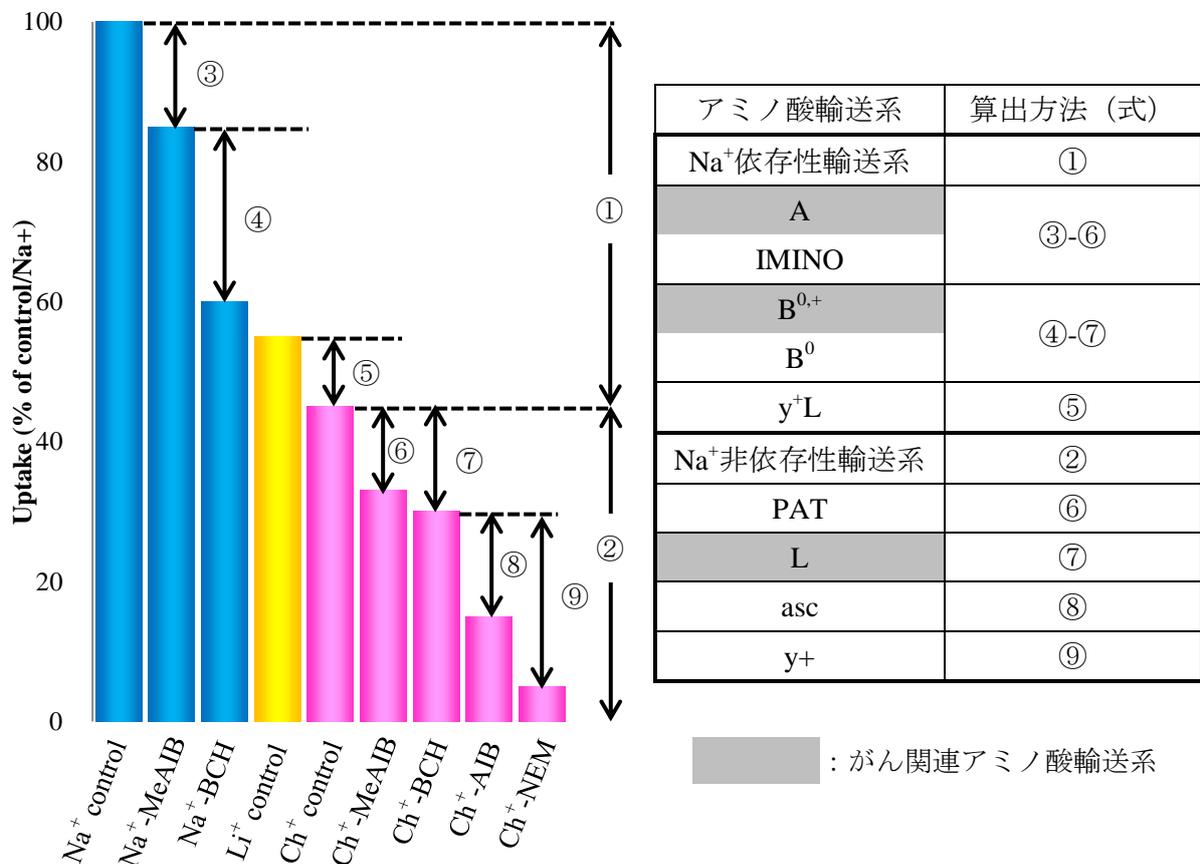
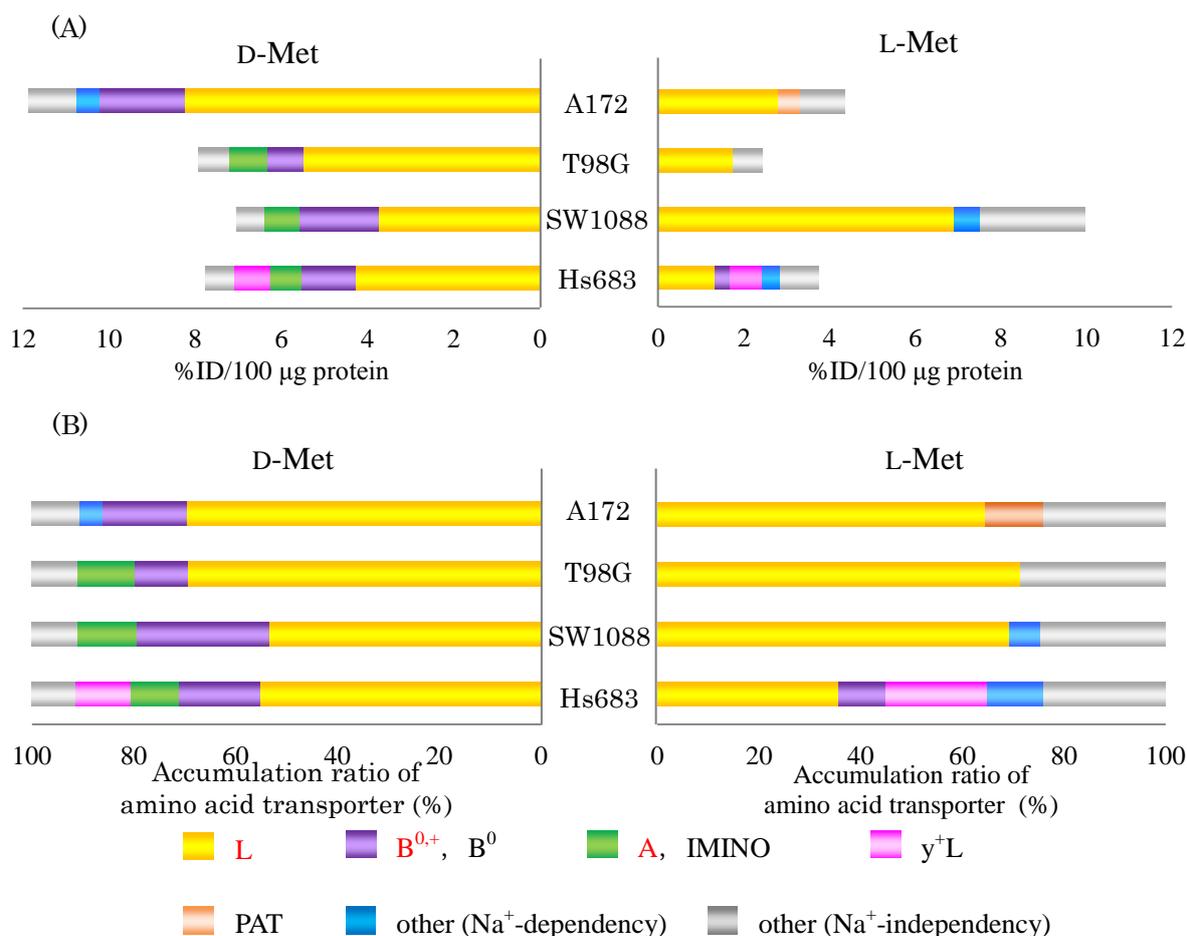


Fig.2 特異的阻害剤を用いたアミノ酸輸送系寄与率評価法

### C) 結果と考察

4種類の脳腫瘍細胞の各標識 Met におけるアミノ酸輸送系別の集積率をそれぞれ Fig.3 (A) に示す. また, 各標識 Met の投与後 5 分の集積に対するアミノ酸輸送系の寄与率をそれぞれ Fig.3 (B) に示す. 全ての脳腫瘍細胞において  $^3\text{H-D-Met}$ ,  $^3\text{H-L-Met}$  とともに system L の寄与が大きかったが,  $^3\text{H-D-Met}$  では全ての細胞で 10%以上の system  $\text{B}^{0+}$ ,  $\text{B}^0$  の寄与が見られた. Fig.1, 3 の高悪性度脳腫瘍細胞 A172, T98G と低悪性度脳腫瘍細胞 SW1088, Hs683 への集積率の経時的変化及びアミノ酸輸送系 system L は高悪性度脳腫瘍細胞の方が低悪性度脳腫瘍細胞よりも寄与率が高く, 逆に, system  $\text{B}^{0+}$ ,  $\text{B}^0$  は低悪性度脳腫瘍細胞の方が高悪性度脳腫瘍細胞よりも寄与率が高いという違いから, 高悪性度脳腫瘍細胞では,  $^3\text{H-D-Met}$  は system  $\text{B}^{0+}$ ,  $\text{B}^0$  の関与により, 投与後早期に急峻な高い集積が観察されたと考えられる. 一方,  $^3\text{H-L-Met}$  は system L の関与により緩やかに集積していったと考えられる. 低悪性度脳腫瘍細胞 SW1088 に着目した場合, Fig.1 では他の細胞と異なり, 投与後早期から  $^3\text{H-D-Met}$  よりも  $^3\text{H-L-Met}$  の方が高い集積を示した. これは, Fig.3 (A) より SW1088 への投与後 5 分の集積率が L-Met の方が D-Met よりも高かったことが原因であると考えられた. 次に, Hs683 の場合には, Fig.1 において  $^3\text{H-D-Met}$  の集積は高悪性度脳腫瘍細胞と同様に, 投与後早期に急峻な高い集積が見られた. また,  $^3\text{H-L-Met}$  は緩やかに集積が高くなったが, 30 分後に  $^3\text{H-D-Met}$  よりも高い集積を示した. これは,  $^3\text{H-L-Met}$  の寄与率において, Hs683 だけ system  $\text{B}^{0+}$ ,  $\text{B}^0$  が関与しているためではないかと考えられた.



※がん関連アミノ酸輸送系は赤字で示す.

Fig.3 (A)各標識 Met におけるアミノ酸輸送系別の集積率

(B)各標識 Met の集積に対するアミノ酸輸送系寄与率

#### IV. 結語

D-Met はがん関連アミノ酸輸送系 system B<sup>0+</sup>の寄与により, 高悪性度細胞において L-Met よりも腫瘍集積が増加したと考えられ, <sup>11</sup>C-D-Met が system L のみならず, system B<sup>0+</sup>をターゲットとした新しいタイプの脳腫瘍 PET 製剤になり得る可能性が示された。

#### 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, 健康増進科学センター小林正和助教, 川井研究室院生稲川耕平さん及びご協力いただいた当研究室の方々に心より感謝申し上げます。

#### VI. 参考文献

- 1) Higashi T, Saga T, Nakamoto Y, Ishimori T, Fujimoto K, Doi R, Imamura M, Konishi J: Diagnosis of pancreatic cancer using fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG PET)—usefulness and limitations in “clinical reality” *Ann Nucl Med.* 2003; 17: 261–279.
- 2) Shreve PD, Anzai Y, Wahl RL. Pitfalls in oncologic diagnosis with FDG PET imaging: physiologic and benign variants. *Radiographics.* 1999; 19: 61–77.
- 3) Fujibayashi Y, Kawai K, Yonekura Y, Matsumoto K, Konishi J, Yokoyama A: Problems of [S-methyl-<sup>11</sup>C]-L-methionine as a protein synthesis marker in the pancreas. *Ann Nucl Med.* 1990; 4: 29-33.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Oka S, Okudaira H, Yoshida Y, Schuster DM, Goodman MM, Shirakami Y : Transport mechanisms of trans-1-amino- 3-fluoro[1-<sup>14</sup>C]cyclobutanecarboxylic acid in prostate cancer cells. *Nucl Med Biol.* 2012; 39: 109-119.
- 7) Ono M, Oka S, Okudaira H, Schuster DM, Goodman MM, Kawai K, Shirakami Y : Comparative evaluation of transport mechanisms of trans-1-amino-3-[<sup>18</sup>F]fluorocyclobutanecarboxylic acid and L-[methyl-<sup>11</sup>C]methionine in human glioma cell lines. *Brain Res.* 2013; 1535: 24-37.
- 8) Shennan DB, Thomson J, Barber MC, Travers MT : Functional and molecular characteristics of system L in human breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1611: 81-90.
- 9) Fukasawa Y, Segawa H, Kim JY, Chairoungdua A, Kim DK, Matsuo H, Cha SH, Endou H, Kanai Y : 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.