

## 1504 メラノーマの画像診断と内用放射線治療を目指した 新規放射性薬剤の開発

島津 良紀

(指導教員：川井 恵一 教授)

要旨：メラノーマはメラニン生合成が異常に亢進している悪性腫瘍であり、がん化早期から転移する極めて予後不良の疾患であるため、その特異的診断法及び治療法の開発が望まれている。本研究では、メラノーマの早期診断と内用放射線治療薬の開発を目指し、メラノーマへの集積が報告されている acetaminophen (AAP) を母体構造として、放射性ヨウ素標識体  $^{125}\text{I}$ -2-iodoacetaminophen ( $^{125}\text{I}$ -IAP) を新たに合成し、そのメラノーマ細胞集積性と集積機序を AAP の  $^{14}\text{C}$  標識体である  $^{14}\text{C}$ -acetaminophen ( $^{14}\text{C}$ -AAP) と比較した。マウス由来メラノーマ細胞 B16 への集積実験の結果、 $^{14}\text{C}$ -AAP は投与早期に腫瘍に集積し、投与後 30 分で定常状態に達したのに対し、 $^{125}\text{I}$ -IAP は時間の経過に従って徐々に集積し、投与後 60 分以降で  $^{125}\text{I}$ -IAP の集積が  $^{14}\text{C}$ -AAP の集積を上回った。また、作用機序の異なる 4 種類の阻害剤を用いて各薬剤の集積機序を確認した結果、 $^{14}\text{C}$ -AAP の集積には、膜能動輸送系、DNA 合成およびメラニン生合成に必須のチロシナーゼ酵素が関与していた。一方、 $^{125}\text{I}$ -IAP は同じく DNA 合成およびメラニン生合成が関与していたが、能動輸送系ではなくアミノ酸輸送系が関与していた。以上より、 $^{125}\text{I}$ -IAP はメラノーマ細胞にアミノ酸輸送系を介して取り込まれ、その集積は  $^{14}\text{C}$ -AAP よりも高くなるなど細胞集積性・滞留性に優れることから、メラノーマの画像診断や内用放射線治療に効果的な薬剤である可能性が示された。

### I. はじめに

皮膚がんの一種であるメラノーマは、メラニン生合成が異常に亢進している状態であり、がん早期に転移する極めて予後不良の悪性腫瘍である。本研究ではメラノーマへの集積が報告されている acetaminophen (AAP)<sup>1,2)</sup> を母体構造として、そのヨウ素標識体  $^{125}\text{I}$ -IAP を新たに開発した。ヨウ素標識体の利用は、 $^{123}\text{I}$  を用いて画像診断に、エネルギーの高い  $^{131}\text{I}$  を用いて内用放射線治療への応用が期待できる。そこで、 $^{125}\text{I}$ -IAP のメラノーマへの集積性と集積機序の解明を行い、その結果を AAP の  $^{14}\text{C}$  標識体である  $^{14}\text{C}$ -AAP と比較した。細胞集積機序は、がん細胞で亢進される膜輸送系、DNA 合成およびメラニン生合成の阻害剤を用いて確認した。Ouabine と L-tyrosine は細胞膜輸送の阻害剤であり、前者は  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ポンプを阻害し、後者はアミノ酸輸送系を阻害する。Thymidine と N-phenylthiourea (PTU) は細胞内の合成系に作用する阻害剤であり、前者は細胞増殖に関与する DNA 合成期を阻害し、後者は生体内でメラニン合成に必須の酵素であるチロシナーゼを阻害する。この 4 つの阻害剤を用いて、 $^{125}\text{I}$ -IAP と  $^{14}\text{C}$ -AAP の集積機序の評価を行った。

## II. $^{125}\text{I}$ 標識と精製

### A) 実験材料と方法

AAP の  $^{125}\text{I}$  標識は、クロラミン-T 法を用いて無担体条件下で行った。AAP ( $1.0 \times 10^{-6}$  mol) をエタノール 100  $\mu\text{L}$  に溶かし、無担体  $^{125}\text{I}\text{-NaI}$  (1.5 MBq, American Radiolabeled Chemicals) は Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS, Sigma) で 10  $\mu\text{L}$  に希釈した。この  $^{125}\text{I}\text{-NaI}$  溶液 10  $\mu\text{L}$  に AAP 溶液 100  $\mu\text{L}$  とクロラミン-T ( $1 \times 10^{-7}$  mol) を溶解した精製水 (pH5.6) 25  $\mu\text{L}$  を加えることで標識を開始した。37 度で 30 分放置し、ピロ亜硫酸ナトリウム飽和溶液水 (pH 5.6) 25 ml を加えて反応を停止した。その後 PBS 40  $\mu\text{L}$  を加え、液量を 200  $\mu\text{L}$  とし、反応液を温浴しながら、窒素還流下でエタノールを飛ばし、液量を 100  $\mu\text{L}$  に減容した。AAP の  $^{125}\text{I}$  標識を Fig. 1 に示す。

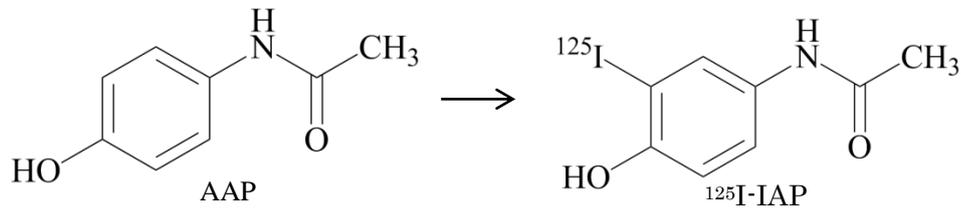


Fig. 1 AAP の  $^{125}\text{I}$  標識

$^{125}\text{I}\text{-AAP}$  の標識率は、展開溶媒にヘキサン：酢酸エチル：ジエチルエーテル=1：4：1 を用いたシリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC, Merck:Art.5554) にて確認した。

また、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、以下の条件で精製および放射化学的純度の評価を行った。

カラム 5C<sub>18</sub>-MS-II (4.6 ID×250 mm, Nacalai tesque)

溶媒 メタノール：50 mM リン酸二水素カリウム (pH 4.7)=50：50

流速 1.0 ml/min

溶出時間が約 7~8 分に検出される  $^{125}\text{I}\text{-IAP}$  を分取し、安定性を評価するために標識後 7 日目の純度検定も同様に行った。

### B) 結果と考察

$^{125}\text{I}$ -標識体は  $^{125}\text{I}\text{-IAP}$ ：84.0±9.9% と高い標識率で得られた。また、精製した結果、放射化学的純度 95% 以上の  $^{125}\text{I}\text{-IAP}$  を無担体状態で得られた。

### III. $^{125}\text{I}$ -IAP と $^{14}\text{C}$ -AAP のマウス由来メラノーマ細胞への集積の比較

#### A) 実験方法と材料

実験方法は、Shikano らの方法<sup>3)</sup>に従って行った。腫瘍細胞には B16 マウス由来メラノーマ細胞を Riken Cell Bank から購入して使用した。この細胞を 10 % になるようにウシ胎児血清(大日本製薬)を加えた Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) で 37 度, 5 %  $\text{CO}_2$  で培養し, 80 % コンフルエントな状態で培地を除去した。PBS 6  $\mu\text{L}$  で細胞表面を洗浄後, 0.25 % trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (trypsin-EDTA) 溶液 (Sigma) 3 mL で細胞を剥離した。24 ウェル細胞培養用マルチウェルプレート (Falcon) に, 1 ウェルあたり  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように培地で調整して播き, 播種からおおよそ 24 時間培養した後, 実験を行った。測定用培地は 0.5 M 4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid (HEPES) buffer (pH 7.4) を用いた。培養用の培地を除去し, 測定用の培地を 450  $\mu\text{L}$  加えて 37 度, 5 %  $\text{CO}_2$  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,  $^{125}\text{I}$ -IAP および  $^{14}\text{C}$ -AAP を 50  $\mu\text{L}$  (37 kBq) 投与してインキュベートした。投与後 5, 15, 30, 60, 120 分で測定用培地を取り除き, 細胞を 0.1 M NaOH で溶解し, 細胞に集積した放射能を  $^{125}\text{I}$ -IAP はオートウェルガンマカウンター (AccuFLEX $\gamma$ 7010, Aloka) で,  $^{14}\text{C}$ -AAP はシンチレーター (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) でそれぞれ測定した。

#### B) 結果と考察

B16 における  $^{125}\text{I}$ -IAP および  $^{14}\text{C}$ -AAP の細胞集積率の経時的変化を Fig. 1 に示す。 $^{14}\text{C}$ -AAP は投与早期に腫瘍に取り込まれ, 投与後 30 分で定常状態に達した。それに対し,  $^{125}\text{I}$ -IAP は時間の経過に従って徐々に取り込まれ, 投与後 60 分以降で  $^{125}\text{I}$ -IAP の集積が  $^{14}\text{C}$ -AAP の集積を上回った。この集積性の違いを評価するため, 作用機序の異なる 4 種類の阻害剤を用いて両標識体の集積機序を検討した。

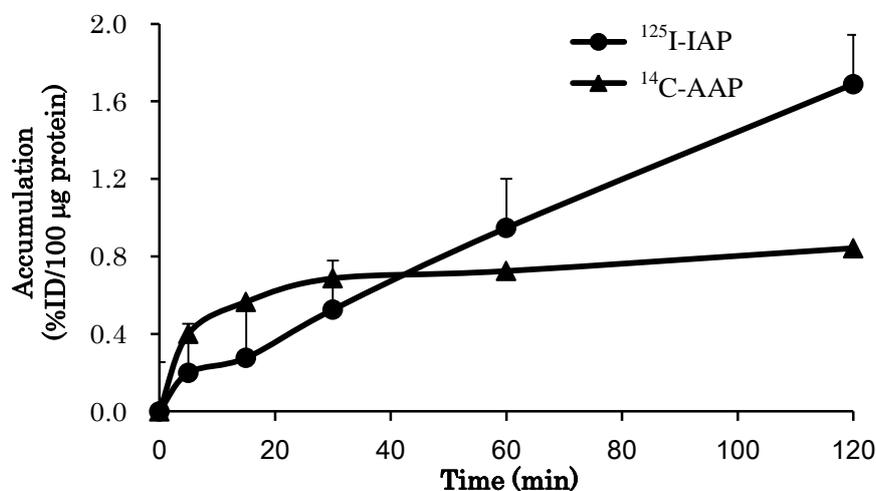


Fig. 2  $^{125}\text{I}$ -IAP および  $^{14}\text{C}$ -AAP の細胞集積率

#### IV. 阻害剤を用いた $^{125}\text{I}$ -IAP と $^{14}\text{C}$ -AAP の集積機序の検討

##### A) 実験方法と材料

使用した腫瘍細胞および細胞培養の条件はⅢ-(A)と同様とした。集積機序の検討では、培養用の培地を除去し、測定用の培地 PBS を 400  $\mu\text{L}$  加えて 37 度、5 %  $\text{CO}_2$  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、 $^{125}\text{I}$ -IAP 及び  $^{14}\text{C}$ -AAP と阻害剤 (ouabain, L-tyrosine, thymidine 及び PTU) を混合した液体 100  $\mu\text{L}$  を細胞に注入して、インキュベートした。投与後 30 分で測定用培地を取り除き、Ⅲ-(A)と同条件で細胞を溶解し、細胞に集積した放射能を測定した。

##### B) 結果と考察

$^{125}\text{I}$ -IAP と  $^{14}\text{C}$ -AAP の阻害実験結果をそれぞれ Fig. 3 と Fig. 4 に示す。 $^{14}\text{C}$ -AAP はメラノーマに集積すると既に報告されている<sup>1,2)</sup>ものの、その集積機序は未だに解明されていなかった。本結果より  $^{14}\text{C}$ -AAP の細胞集積阻害には、Ouabain, Thymidine, PTU で有意差が認められたことから、その集積には、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ポンプ、DNA 合成およびメラニン生合成の関与が考えられた。一方、 $^{125}\text{I}$ -IAP の細胞集積は L-tyrosine, Thymidine, PTU により有意に阻害されたため、その集積にアミノ酸輸送系、DNA 合成およびメラニン生合成の関与が認められた。このように、 $^{125}\text{I}$ -IAP の細胞内滞留機序には、標識母体化合物の  $^{14}\text{C}$ -AAP と同様に DNA 合成およびメラニン生合成が関与していたが、放射性ヨウ素標識の影響により、アミノ酸輸送系の関与が認められ、Fig. 1 のように  $^{125}\text{I}$ -IAP の集積性が  $^{14}\text{C}$ -AAP よりも向上したものと思われた。

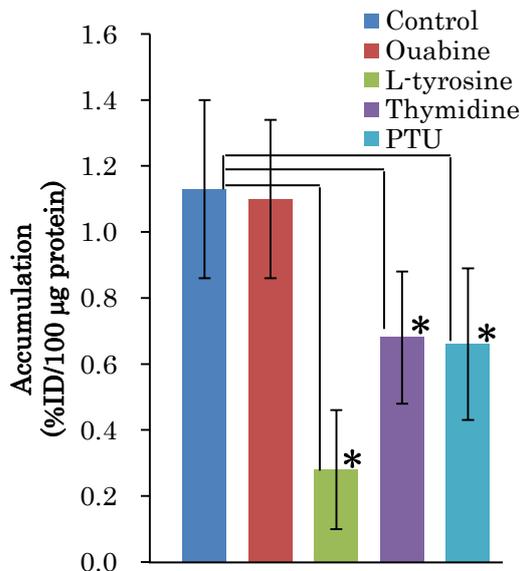


Fig. 3  $^{125}\text{I}$ -IAP の集積機序

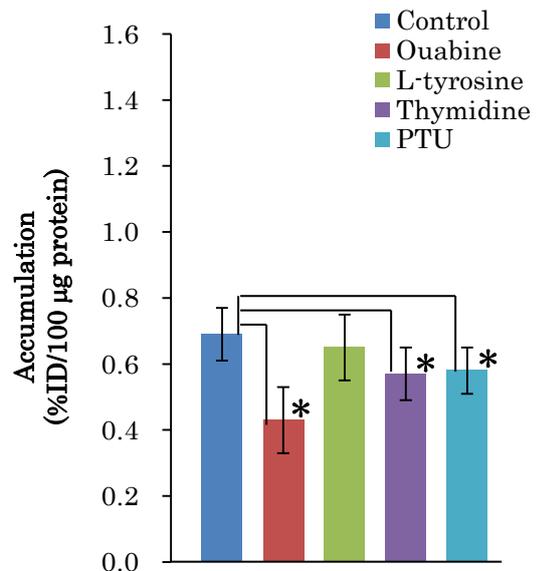


Fig. 4  $^{14}\text{C}$ -AAP の集積機序

\*  $p < 0.05$  compared with control

## V. 結語

<sup>125</sup>I-IAP はメラノーマ細胞にアミノ酸輸送系を介して取り込まれることで、その集積は経時的に高くなり、<sup>14</sup>C-AAP の集積を上回ることから、メラノーマの画像診断や内用放射線治療に効果的な薬剤である可能性が示された。

## VI. 謝辞

本研究にあたり、ご指導くださいました川井恵一教授、金沢大学医薬保健研究域附属健康増進科学センターの小林正和助教、ならびにご協力いただきました本研究室の方々に心より御礼申し上げます。

## VII. 参考文献

- 1) Nikhil M. Vad, Shashi K. Kudugunti, Daniel Graber, Nathan Bailey, Kalkunte Srivenugopal, and Majid Y. Moridani: Efficacy of acetaminophen in skin B16-F0 melanoma tumor-bearing C57BL/6 mice. *Int J Oncol*, 2009; 35: 193-204.
- 2) Nikhil M. Vad, Garret Yount, Dan Moore, Jon Weidanz, and Majid Y. Moridani: Biochemical mechanism of Acetaminophen (APAP) induced toxicity in melanoma cell lines, *J Pharm Sci*. 2009; 98 (4): 1409-1425.
- 3) Shikano, N., T. Kotani, S. Nakajima, M. Ogura, S. Nakazawa, J. Sagara, M. Kobayashi, T. Baba, N. Yamaguchi, N. Kubota, and K. Kawai: Radioiodinated 4-iodo-L-meta-tyrosine, a system L selective artificial amino acid: molecular design and transport characterization in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1 cells), *Nucl Med Biol*. 2010; 37 (8): 903-910.