

1608 がん関連アミノ酸輸送系 system Xc⁻を対象とした in vitro 評価系の確立

脇田 幸延

(指導教員：川井 恵一 教授)

要旨：近年、post-FDG 薬剤として、がん関連アミノ酸輸送系を標的とした画像診断薬開発が進められており、中でも治療抵抗性との相関が報告されている Na⁺非依存性アミノ酸輸送系 system Xc⁻イメージングの重要性が高まっている。本研究では、アミノ酸画像診断薬の細胞集積における system Xc⁻の寄与を測定するために、system Xc⁻と同じ Na⁺非依存性のがん関連輸送系 system L との寄与を区別する in vitro 評価系の確立を目指した。標識アミノ酸薬剤として、system L の寄与が大きい 3-[¹²⁵I]-L-tyrosine (L-MIT)と、その光学異性体 D-MIT を選択し、ヒト由来腫瘍細胞への経時的集積実験及び system Xc⁻の基質である sulfasalazine (SSZ), L-cystine (CySS), L-glutamic acid (Glu) を用いた競合阻害実験を行い、system L 特異的阻害剤である BCH の阻害効果と比較した。その結果、system Xc⁻ 高発現腫瘍細胞への両アミノ酸薬剤の集積は、system Xc⁻ 低発現腫瘍細胞よりも高い傾向を示した。また、競合阻害実験の結果、両アミノ酸薬剤の細胞集積において、BCH による顕著な阻害効果が確認され、所期の通り system L の関与が示された。さらに、Glu による阻害効果は BCH と同程度であったのに対し、SSZ, CySS による阻害効果は僅かであったことより、SSZ, CySS は system L 阻害への関与が少ないとともに、system Xc⁻ の寄与を評価できると考えられた。以上の結果より、各 Na⁺非依存性がん関連アミノ酸輸送系の寄与測定における阻害剤として BCH と SSZ あるいは CySS を組み合わせる in vitro 評価系が有用である可能性が示された。

I. はじめに

現在、臨床における PET 腫瘍診断薬として ¹⁸F-FDG が主に使用されている。しかし、D-グルコース誘導体である ¹⁸F-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。このような欠点を補うため、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のみならずアミノ酸代謝も亢進しているとともに、アミノ酸の細胞集積を担う特定のアミノ酸輸送系が高発現している。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、がん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内への取込みにおける、がん関連アミノ酸輸送系の寄与率を評価してきた¹⁻³⁾。アミノ酸輸送系は、Na⁺が存在する場合に限り輸送活性を示す 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 (Table.1)、Na⁺非依存性がん関連アミノ酸輸送系 system L と system Xc⁻ のうち、system L の評価法がすでに確立されている¹⁾。一方、腫瘍細胞において発現量と治療抵抗性との相関⁴⁻⁶⁾が報告されている、がん関連アミノ酸輸送系 system Xc⁻ に関しては、特定のアミノ酸の細胞集積における system Xc⁻ と system L の寄与を区別して評価する方法は未だ確立されていない。そこで本研究では、主に

system L を介して腫瘍細胞内に取り込まれるとされるアミノ酸薬剤 3-[¹²⁵I]-L-tyrosine (L-MIT)¹⁾ と、その光学異性体である 3-[¹²⁵I]-D-tyrosine (D-MIT) を用いた細胞集積実験及び競合阻害実験を行い、system Xc⁻ の輸送基質、延いては競合阻害剤として期待される sulfasalazine (SSZ), L-cystine (CySS), L-glutamic acid (Glu) の阻害効果を、system L に特異的な阻害剤である 2-amino-2-norbornane-carboxylic acid (BCH)¹⁾ と比較した上で、system Xc⁻ の in vitro 評価系における SSZ, CySS, Glu の有用性を検討した。

Table.1 アミノ酸輸送系と対応基質, 及び共役因子⁷⁾

	アミノ酸輸送系 (system)	輸送基質	共役因子
Na ⁺ 依 存 性	A	比較的広い基質選択性, N-メチルアミノ酸	-
	GLY	Gly, Sar	-
	IMINO	Pro, Phe, Val	-
	B ^{0,+}	中性, 塩基性アミノ酸	-
	B ⁰	広い基質選択性	-
	ASC	分岐側鎖の無いもの, Thr, Gln	-
	β	β-Ala, Tau	-
	N	Asn, Gln, His	-
	y ⁺ L	中性アミノ酸	4F2hc
	X _{AG} ⁻	Glu, Asp	-
Na ⁺ 非 依 存 性	PAT	Gly, Pro	-
	L	広い基質選択性	4F2hc
	T	芳香族アミノ酸	-
	asc	分岐側鎖の無いもの	4F2hc
	y ⁺ L	塩基性アミノ酸	4F2hc
	y ⁺	塩基性アミノ酸	-
	b ^{0,+}	中性, 塩基性アミノ酸	4F2hc, rBAT
	Xc ⁻	Asp, Glu, Cystine	4F2hc, rBAT

※癌関連アミノ酸輸送系を灰色で示す

I. L-MIT, D-MIT の放射性ヨウ素標識

標識原料には、L-tyrosine (L-Tyr) (nacalai tesque) 及び D-tyrosine (D-Tyr) (nacalai tesque) を用いた。その他の試薬は全て特級品を用いた。Tyrosine の ¹²⁵I 標識は chloramine-T (nacalai tesque) を酸化剤として用いる直接酸化法により行った^{8,9)}。原料の L-Tyr, D-Tyr 及び chloramine-T を各々 1.0×10⁻⁷ mol/100 μL, 1.0×10⁻⁸ mol/25 μL に調整し、それぞれを 0.4 M 及び 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.2) に溶解した。調整した L-Tyr, D-Tyr 溶液 100 μL に無担体 ¹²⁵I-NaI (10 MBq : 室町薬品) を加えた後、chloramine-T 溶液を 25 μL 加えて標識反応を開始した。15 分後、ピロ亜硫酸ナトリウム 7.0×10⁻⁶ mol/0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 25 μL を加えて反応を停止させた。¹²⁵I 標識した L-MIT,

D-MIT の分析は、シリカゲル薄層クロマトグラフィ (thin layer chromatography : TLC) (Merck)で行い、オートウェルγカウンタ (AccuFLEXγ7000, Aloka) を用いて標識率を評価した。TLC の展開溶媒には、メタノール : 酢酸 = 100 : 1 を用いた。精製には、高速液体クロマトグラフィ (high-performance liquid chromatography : HPLC) を使用した。HPLC の分離条件は、流速を 1.0 mL/min, 吸光度 (UV) の測定波長を 254 nm、移動相を citric acid buffer (pH 7.0) : acetonitrile = 30 : 70 とした。順相カラムは、親水性相互作用クロマトグラフィ (Hydrophilic Interaction Chromatography) (Cosmosil, Nacalai) を使用した。¹²⁵I 標識アミノ酸の retention time は 6~7 分、放射化学的純度は 95%以上であった。

III. 標識アミノ酸を用いたヒト由来腫瘍細胞における経時的細胞集積実験

A) 実験材料、方法

ヒト由来腫瘍細胞には、system Xc⁻ 高発現腫瘍細胞として肺胞基底上皮腺癌細胞 (A549) 及び system Xc⁻ 低発現細胞には皮膚癌細胞 (SK-MEL-28)¹⁰⁾ を用いた。上記のヒト由来腫瘍細胞を 37 度, 5 % CO₂ で培養し、測定用培地として Na⁺-PBS (pH 7.3) を作成した。標識アミノ酸には、放射性ヨウ素標識した L-MIT、D-MIT を用いた。24 well 細胞培養用マルチウェルプレート (Falcon) に細胞を播き、およそ 24 時間培養した後、実験を行った。ヒト由来腫瘍細胞に対する各標識体の経時的細胞集積実験は、Oka らの方法¹¹⁾ に従った。はじめに、培養用の培地を除去し、測定用培地を 300 μL 加えて 37 度で約 10 分プレインキュベーションした。その後、L-MIT, D-MIT をそれぞれ (18.5 kBq/well) 投与し、そこから 5, 15, 30, 60 分後に測定用培地を取り除き、氷冷した Na⁺-PBS 500 μL で well を 2 回洗浄した。0.1 M NaOH 500 μL で細胞を溶解し、全量を分取してオートウェルγカウンタ で放射能を測定した。

B) 結果と考察

2 種類のヒト由来腫瘍細胞への経時的集積量を Fig.1 に示す。MIT の投与放射能を 100% とし、測定放射能をタンパク量で補正したものを、細胞集積量として表した。L-MIT, D-MIT 両薬剤において、投与後 15 分以降は、system Xc⁻ 高発現腫瘍細胞 A549 の集積が system Xc⁻ 低発現腫瘍細胞 SK-MEL-28 に比べて高い傾向を示した。

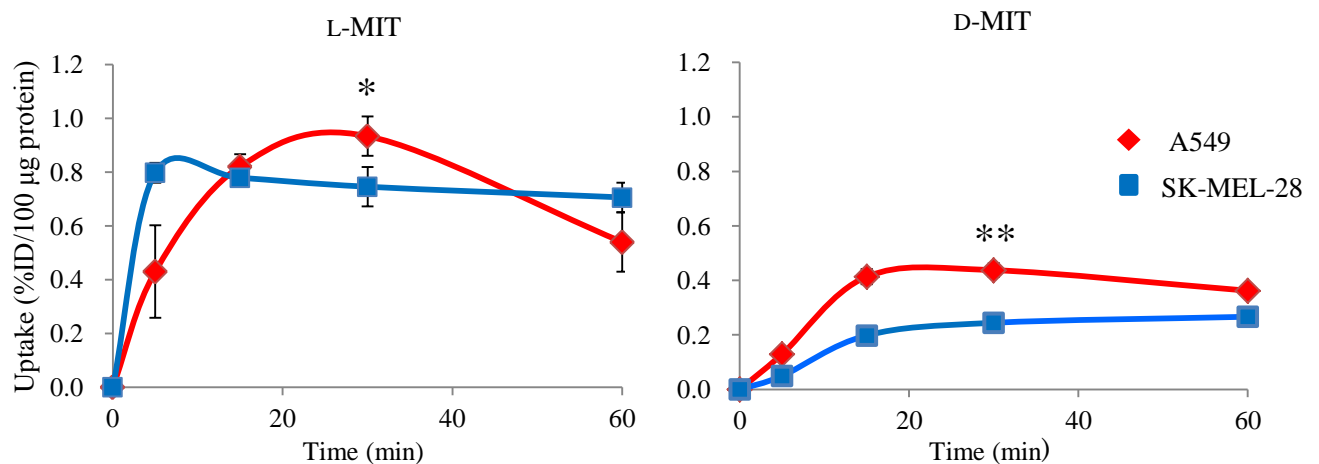


Fig.1 ヒト由来脳腫瘍細胞における標識アミノ酸の集積量

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. SK-MEL28

IV. 阻害剤を用いた競合阻害実験

A) 実験材料、方法

ヒト由来腫瘍細胞、標識アミノ酸は、III. 経時的細胞集積実験と同様のものを用いた。System L の特異的阻害剤として BCH を、system Xc⁻ の輸送基質として SSZ, CySS, Glu を用いた。測定用培地は Na⁺-PBS (pH 7.3) に加え、Na⁺-PBS (pH 7.3) 中の NaCl, Na₂HPO₄ を同濃度の choline-Cl 及び K₂HPO₄ に置換した choline-PBS (Ch-PBS) (pH 7.3) を incubation medium として用いた。24well 細胞培養用マルチウェルプレートに細胞を播き、およそ 24 時間培養した後、実験に使用した。はじめに、培養用の培地を除去し、測定用培地を 200 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。続いて、標識アミノ酸 L-MIT, D-MIT (18.5 kBq/well)、及び阻害剤、輸送基質 (最終濃度 1 mM) を投与し 5 分間インキュベーションした。その後、測定用培地を取り除き、氷冷した Na⁺-PBS または Ch-PBS で速やかに 2 回、細胞表面と well を洗浄した。0.1 M NaOH 500 μL で細胞を溶解し、全量を分取してオートウェルカウンタ で放射能を測定した。

B) 結果と考察

2 種類の腫瘍細胞における、L-MIT, D-MIT を用いた競合阻害実験の結果を Fig.2, 3 に示す。いずれも Na⁺存在下における control の集積率を 100% として表した。前述のとおり、BCH は Na⁺非存在下において system L を阻害する。両腫瘍細胞ともに、L-MIT, D-MIT を用いて BCH を負荷した場合、Na⁺存在、非存在に関わらず control に比べて集積量が低下し、その寄与は system L によるものと考えられた。また、Na⁺非存在下における system Xc⁻ の輸送基質として SSZ, CySS, Glu を負荷した。Glu 負荷時には、Ch control に対して BCH と同程度の集積阻害が、両標識アミノ酸、腫瘍細胞の実験結果で見られた。このことより、Glu は system L 阻害への関与が BCH と同程度である可能性が示された。また、主に system L を介して腫瘍細胞内に取り込まれる、L-MIT の腫瘍細胞集積における SSZ, CySS 負荷の影響は、Ch control に対して有意な集積阻害を示さなかった。従って、SSZ, CySS は system L 阻害への関与が僅かである可能性が見いだされた。

v. 結語

2 種類のヒト由来腫瘍細胞における L-MIT, D-MIT 両薬剤の経時的細胞集積は、system Xc⁻ 高発現腫瘍細胞 A549 が、system Xc⁻ 低発現腫瘍細胞 SK-MEL-28 に比べて高い傾向にあった。また、競合阻害実験の結果より、SSZ, CySS は Glu に比べて system L 阻害への関与が僅かであると考えられた。従って、各 Na⁺非依存性がん関連アミノ酸輸送系の寄与測定には、阻害剤として BCH と SSZ あるいは CySS を組み合わせる in vitro 評価系が有用である可能性が示された。

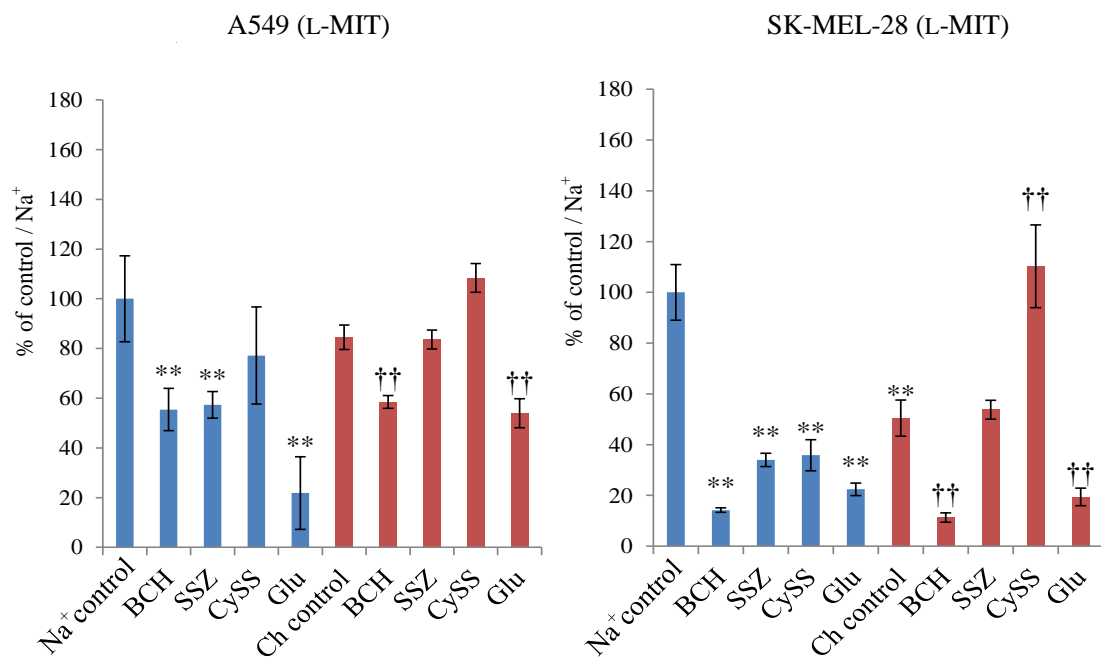


Fig.2 各阻害剤による L-MIT の集積阻害効果

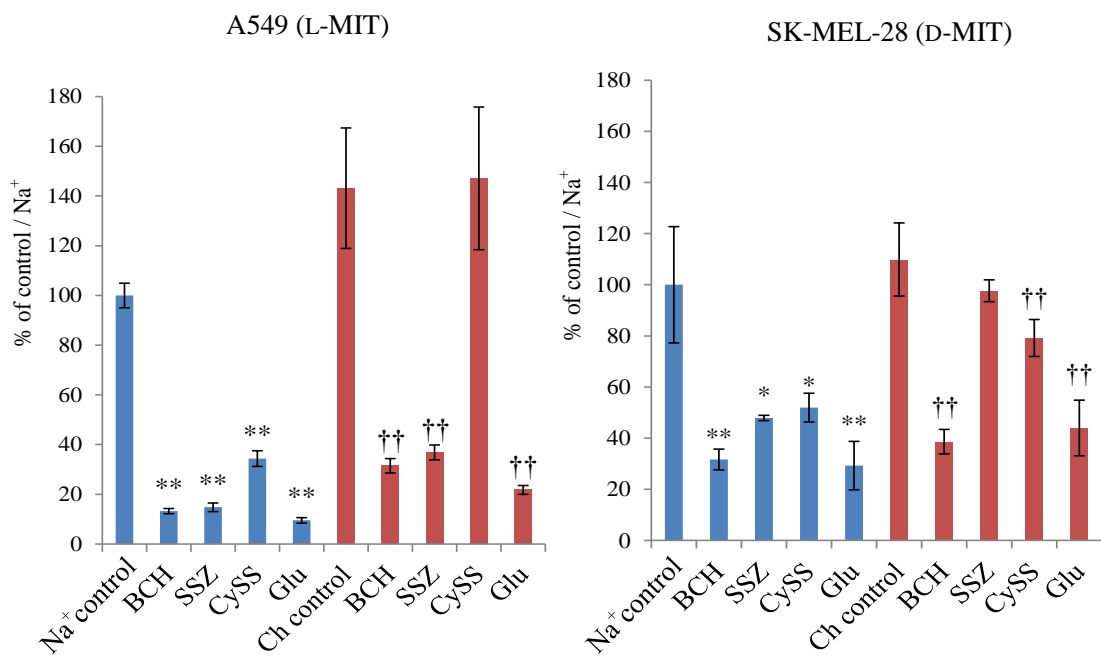


Fig.3 各阻害剤による D-MIT の集積阻害効果

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control / Na⁺

† $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ vs. control / Ch

VI. 謝辞

本研究を終えるにあたり、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、ご協力いただきました稲川耕平さん、当研究室の方々に心より感謝申し上げます。

VII. 参考文献

- 1) Shikano N., Kotani T., Ogura M., Nakazawa S., Sagara J., Kobayashi M., Baba T., Yamaguchi N., Kubota N., Kawai K.: 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.*, 37: 903-910 (2010).
- 2) 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.*, 1535: 24-37 (2013).
- 3) 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 trans-1-amino-3-¹⁸F-fluorocyclobutanecarboxylic acid in human prostate cancer. *J. Nucl. Med.*, 52: 822-829 (2011).
- 4) Ishimoto T., Nagano O., Yae T., Tamada M., Motohara T., Oshima H., Oshima M., Ikeda T., Asaba R., Yagi H., Masuko T., Shimizu T., Ishikawa T., Kai K., Takahashi E., Imamura Y., Baba Y., Ohmura M., Suematsu M., Baba H., Saya H.: CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system Xc⁻ and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell.*, 19: 387-400 (2011).
- 5) Lyons SA., Chung WJ., Weaver AK., Ogunrinu T., Sontheimer H.: Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion. *Cancer Res.*, 67: 9463-71 (2007).
- 6) Savaskan NE., Heckel A., Hahnen E., Engelhorn T., Doerfler A., Ganslandt O., Nimsky C., Buchfelder M., Eyüpoglu IY.: Small interfering RNA-mediated xCT silencing in gliomas inhibits neurodegeneration and alleviates brain edema. *Nature Med.*, 14: 629 -632 (2008).
- 7) 乾 賢一: 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., : 216-236 (2009).
- 8) Kawai K., Fujibayashi Y., Saji H., Konishi J., Kubodera A., Yokoyama A.: Monoiodo-D-tyrosine, an artificial amino acid radiopharmaceutical for selective measurement of membrane amino acid transport in the pancreas. *Nucl. Med. Biol.*, 17: 369-376 (1990).
- 9) Kawai K., Fujibayashi Y., Saji H., Yonekura Y., Konishi J., Kubodera A., Yokoyama A.: A strategy for the study of cerebral amino acid transport using iodine-123-labeled amino acid radiopharmaceutical: 3-iodo-alpha-methyl-L-tyrosine. *J. Nucl. Med.*, 32: 819-824 (1991).
- 10) Huang Y., Dai Z., Barbacioru C., Sadée W.: Cystine-glutamate transporter SLC7A11 in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res.*, 65: 7446-54 (2005).
- 11) 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.*, 39: 109-119 (2012).