

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21621

研究課題名(和文) 前立腺癌を標的とした新規PETイメージング技術の開発

研究課題名(英文) Development of novel PET imaging technique for prostate cancer

研究代表者

野崎 聡 (Nozaki, Satoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：10419707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は悪性度の高い癌に発現するアミノ酸トランスポーターLAT1を標的とした新規PETトレーサー[18F]CTP0006を既に開発している。近年急増している前立腺癌での本化合物の有用性を評価するため基礎検討を行った。前立腺癌細胞株およびこれらの細胞株より作成した担癌マウス由来の腫瘍組織においては高いLAT1タンパク発現レベルを示すことを確認、さらに同所移植による腫瘍モデル動物の作成を試みた。しかしながら、原因は不明であるが、手術に伴う死亡率が高く、かつ生着率も10%未満であり、術式および細胞の注入に関して更なる詳細な検討が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have already developed novel PET tracer [18F]CTP0006 which targeted amino acid transporter LAT1 for detecting malignant cancer. We performed basic research to evaluate the usefulness of this compound for detecting prostate cancer. We firstly checked the protein expression level of LAT1 in prostate cancer cell lines and tumor tissues derived from tumor-bearing mice. At these experiments, high expression levels of LAT1 in these samples were confirmed. Moreover, we also performed the development of animal model for prostate cancer by orthotopic transplantation. However, these experiments were failed because survival rate and tumor implantation rate were too low. The cause for the failure requires further investigation.

研究分野：分子イメージング

キーワード：前立腺癌 PET LAT1

1. 研究開始当初の背景

本邦における前立腺癌の年齢調整罹患率 (10万人あたり)は2010年現在55.9と1990年の13.4と比較し4倍以上の急激な増加を示しており、高齢化および食生活の欧米化などに伴い今後も増加の一途であることが予測されている(図1)。

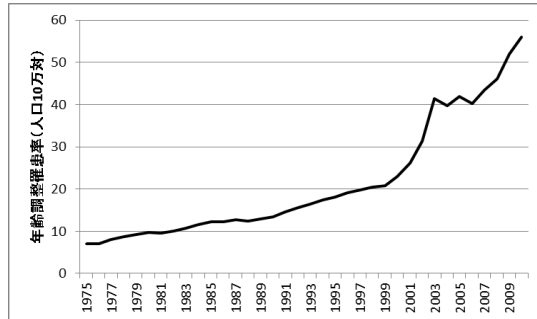


図1 日本の前立腺癌の罹患率 年次推移

前立腺癌の日常診療においては、直腸診・PSA (Prostate Specific Antigen) 検査でスクリーニングを行い、針生検で確定診断が行われているが、この針生検は最低12ヶ所からの採取が推奨・実施されているものの、それでも正診率は十分とはいえず、癌の確定診断までに複数回の生検を要することもしばしばである。

MRI (Magnetic Resonance Imaging: 磁気共鳴画像) は前立腺癌の画像診断の中で、現在、最も信頼のおける診断技術であるものの、汎用されている T2 強調画像では前立腺炎・出血・萎縮性変化・肥大症などとの鑑別が困難な例も多く、必ずしも特異性は高くない。また、他の画像診断技術として、生化学的な変化が観察可能な PET (Positron Emission Tomography: 陽電子放射断層撮影) での診断が期待されている。現在、がん検診に広く使われている $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ (Fluorodeoxyglucose) は前立腺癌への集積が低く、さらに、尿中に大量の排泄されるため膀胱や尿道内に残存するトレーサーと癌との鑑別が困難になり、病変検出能は著しく低下するため、前立腺癌での有用性は限られている。一方、尿中排泄が少なく、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ よりも前立腺癌へ集積する $[^{11}\text{C}]\text{choline}$ (Umbehrr MH, et al., Eur Urol. 2013) や $[^{11}\text{C}]\text{acetate}$ (Jadvar H, J Nucl Med. 2011) などを用いた PET イメージング技術が開発され、特に全身の転移巣や再発の診断、治療効果判定などに有用であると報告されている。特に、CT・MRI・骨シンチで明らかな再発所見を認めなかったにも関わらず、 $[^{11}\text{C}]\text{acetate}$ でのみトレーサー集積を認め局所再発が示唆された症例報告も存在し(大山ほか、PET journal、2013)、PET イメージング技術の前立腺癌での活用が期待されている。しかしながら、 ^{11}C 製剤は半減期が短い(約20分)こともあり、その普及がなかなか進まないという問題点も指摘されており、比較的半減期の長い(約109分) ^{18}F 製剤での前立腺癌を標的とした PET トレーサーの開発が期待さ

れている。

アミノ酸トランスポーター-LAT1 (L-type amino acid transporter 1) はロイシンなどをはじめとした多くの必須アミノ酸輸送に関与する膜タンパク質である。正常組織では、タンパク質としては胎盤関門と血液脳関門でその発現が報告されている。一方、癌では、非小細胞性肺癌、膵癌、脳腫瘍、前立腺癌、乳癌などにおいて高発現し、特に高発現群は予後不良であり、LAT1 発現が癌の悪性度と関連することが示唆され (Sakata T, et al, Pathol Int. 2009)、癌特異性の高いトランスポーターであると考えられている。そこで、この癌特異性を利用した診断技術、特に PET を用いた画像診断技術が開発されれば、前立腺癌、特に悪性度の高い癌の前立腺局所および全身での検出が可能になると考えている。現在、LAT1 を標的とした PET トレーサーは $[^{11}\text{C}]\text{methionine}$ などが臨床応用されているものの、癌だけでなく炎症組織への集積する症例が存在し、また、癌への集積レベル自体も高くないなどの問題があり臨床現場の期待に十分答えられるトレーサーは未だ開発されていない。しかしながら、我々は既に LAT1 特異的かつ炎症組織へ集積しない PET トレーサー $[^{18}\text{F}]\text{CTP0006}$ の開発に成功している。

LAT1 陽性ヒト脳腫瘍細胞株を皮下移植した担癌マウスでは腫瘍/筋肉比において $[^{11}\text{C}]\text{methionine}$ よりも 1.6 倍高い集積を示し、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ で問題となっている炎症部位への集積も認められず、この新規トレーサーを用いることで悪性度の高い前立腺癌の高精度・高精細な新たな診断技術が開発可能であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、臨床的意義の高い悪性度の高い前立腺癌を対象とした新たな診断技術を開発するため LAT1 陽性前立腺癌モデル動物を用いた PET イメージング研究を行い、 $[^{18}\text{F}]\text{CTP0006}$ の悪性度および治療効果判定に関する有用性を検討し、将来、前立腺癌を対象とした臨床研究を行うための基礎データを得ることを目的とする。

しかしながら、腫瘍内 LAT1 発現が確認されている前立腺癌モデル動物は報告されていない。一方、既に前立腺癌を 100% 発症するトランスジェニックラットが開発されている。本モデルは、非浸潤性アンドロゲン依存性腺癌を発症するが、薬剤処置を行うことで悪性度の高い浸潤性アンドロゲン非依存性腺癌をも発症することが報告されており、これら2つの病態での LAT1 発現を確認、または、LAT1 発現が確認されている同所移植モデル動物を新たに開発することで PET イメージング研究に用いるモデル動物を探索する。さらに、動物モデルが確立した際には LAT1 陽性前立腺癌モデルラットを用いて、 $[^{11}\text{C}]\text{methionine}$ および新たに開発した LAT1 特異的 PET トレーサー $[^{18}\text{F}]\text{CTP0006}$ の PET イ

メーキング研究を行い悪性度の高い前立腺癌に対する PET イメージングの可能性を検討する。

また、 $[^{18}\text{F}]$ CTP0006 によるイメージングが可能であれば、モデル動物へ抗癌剤治療を行い、その効果判定に本トレーサーが有用であるかの検討を行う。

最終的には、トレーサーの集積レベルと LAT1 発現および前立腺癌の病理学的分類法である Gleason スコアとの相関を検討し、悪性度と $[^{18}\text{F}]$ CTP0006 集積レベルとの相関を検討する。

これらの研究により、新規 LAT1 特異的 PET トレーサー $[^{18}\text{F}]$ CTP0006 の前立腺癌における有用性を明らかに臨床応用へ繋げる基礎データとする。

3. 研究の方法

(細胞培養)

ヒト前立腺癌細胞株 DU-145 および PC-3、正常 2 倍体線維芽細胞 WI-38 とともに理研セルバンクから入手した。DU-145 および PC-3 とともに 10%FBS、100units/mL ペニシリン G、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを含む RPMI1640 培地で培養、実験に供した。WI-38 は 10%FBS、100units/mL ペニシリン G、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを含む MEM 培地で培養、実験に供した。

(細胞膜タンパク抽出)

LAT1 タンパク発現レベルの検討にはウエスタンブロッティング法を用いた。培養細胞株または腫瘍組織のホモジネートを調整、1000 $\times\text{g}$ 、4、5 分の遠心により沈殿 (デブリス) を除去後、上清を 430000 $\times\text{g}$ 、4、15 分の遠心により細胞膜画分を得た。さらに沈殿を iodixanol 密度勾配 (25%, 17.5%, 10%, 2.5%) に重層し、100000 $\times\text{g}$ 、4、16 時間の遠心により得られたいくつかのフラクションを Amicon Ultra-4 (10kDa) にて濃縮し SDS-PAGE のサンプルに供した。

(ウエスタンブロッティング)

ウエスタンブロッティングには一次抗体として anti-LAT1 (1/10000, Trans Genic Inc., KE026)、anti-CD98 (1/10000, SANTA CRUZ, H-300)、anti-Na⁺/K⁺-ATPase (1/100000, abcam, ab76020) を 4、オーバーナイトで反応させ、二次抗体として anti-Rabbit IgG (Fc), HRP Conjugate を室温 1 時間反応、ECL-Select で発色、LAS3000 (Fujifilm) で検出した。

(皮下移植モデルの作成)

8-10 週令のメス BALB/c ヌードマウス (日本クレア) を 1.5% イソフルレンで麻酔、右前肢付け根に 1×10^6 または 5×10^6 個のヒト前立腺癌細胞株 DU-145 または PC-3 を皮下投与し、麻酔からの覚醒を確認後、1 ヶ月間飼育・観察した。腫瘍の形成は目視およびノギスにより短径および長径を計測、腫瘍体積を算出した。

(同所移植モデルの作成)

8-10 週令のメス BALB/c ヌードマウス (日本クレア) を 1.5% イソフルレンで麻酔、腹部を切開し前立腺および周辺臓器を露出した。 1×10^6 または 5×10^6 個のヒト前立腺癌細胞株 DU-145 または PC-3 を前立腺内に 31G 針を用いて注入、腹部を再縫合し麻酔からの覚醒を確認後、1 ヶ月間飼育・観察した。1 ヶ月経過後、麻酔下で脱血を行い、前立腺を摘出、腫瘍の生着を肉眼および HE 染色により確認した。

4. 研究成果

ヒト前立腺癌細胞株 DU-145 および PC-3 について、培養細胞および BALB/c ヌードマウスに移植・作成した腫瘍組織をサンプルとして LAT1 発現レベルの検討を行った。その結果、両細胞株とも培養細胞および腫瘍組織において陰性コントロールである線維芽細胞株 WI-38 と比較し LAT1 タンパク (37kDa) の強い発現が認められ (図 2)、モデル動物作成に適している細胞株であることが判明した。

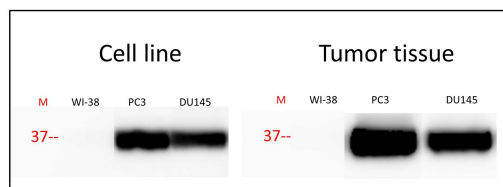


図 2 培養細胞株および腫瘍組織における LAT1 タンパク発現レベル

PET プローブの評価には皮下移植モデルでも可能であるが、臨床的有用性を高めるためには最終的には標的臓器内に存在する腫瘍をイメージング出来ることを証明することが重要である。そこで、同所移植モデルとしてヒト前立腺癌細胞株の前立腺内への移植を試みた。BALB/c ヌードマウスの前立腺へ細胞株をマイクロシリンジで注入、一定期間 (1 ヶ月) 経過後に腫瘍の形成を検討した。その結果、原因は不明であるが、手術に伴い死亡率が高く (50%)、かつ生着率も 10% 未満であり、術式および細胞の注入に関して更なる詳細な検討が必要であることが示唆された。

本研究費では当初の目的の前立腺癌モデル動物を用いた新規 LAT1 特異的 PET トレーサー $[^{18}\text{F}]$ CTP0006 の PET イメージングによる検討までは到達しなかった。今後、同所移植モデルの更なる条件検討および前立腺癌モデルラットを用いて $[^{18}\text{F}]$ CTP0006 の有用性について詳細に検討することが課題点として示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野崎 聡 (NOZAKI, Satoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：10419707

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし