

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21603

研究課題名(和文) At-211標識アミノ酸誘導体によるLAT1を標的とした新規RI内用療法の開発

研究課題名(英文) Development of 211At-labeled amino acid derivative targeting LAT1 as a novel alpha-emitting radiopharmaceutical

研究代表者

大島 康宏 (Ohshima, Yasuhiro)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応用研究部・主任研究員(定常)

研究者番号：00588676

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)：本研究では、L型アミノ酸トランスポーター1(LAT1)を狙ったがんのRI内用療法薬として、2-[211At]astato-⁻-methyl-L-phenylalanine (2-AAMP)を合成し、その有用性を検討した。酸化剤存在下、前駆体と211Atを反応させることで高収率、高純度の2-AAMPを得た。2-AAMPはがん細胞に対し、LAT1を介して取り込まれ、DNA二重鎖切断を誘導し、細胞死を誘導した。2-AAMPは生体内で安定に存在し、腫瘍集積性、滞留性を示した。一方、2-AAMPは正常臓器から速やかに消失した。これらの結果より、2-AAMPのがん治療薬として有用である可能性が見出された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we synthesized 2-[211At]astato-⁻-methyl-L-phenylalanine (2-AAMP) and evaluated its usefulness as a novel radiopharmaceutical targeting L-type amino acid transporter 1 (LAT1). 2-AAMP was successfully synthesized with high yield and purity by labelling the precursor with 211At in the presence of oxidant. 2-AAMP was taken up to tumor cells via LAT1, and induced DNA double strand break, growth inhibition and cell death. 2-AAMP was stable in vivo, and further accumulated and retained in tumor. On the other hand, 2-AAMP was rapidly cleared from normal organs in mice. These results suggest that 2-AAMP might be useful as a novel ⁻-emitting radiopharmaceutical.

研究分野：放射線生物学、放射性医薬品

キーワード：線放出核種 211At 2-AAMP L型アミノ酸トランスポーター1(LAT1) がん

1. 研究開始当初の背景

L型アミノ酸トランスポーター1 (LAT1) はがん特異的に高発現するアミノ酸トランスポーターであり、必須アミノ酸の細胞内取込みや mTOR シグナルを介して、がんの増殖、生存に深く関わっている。最近の臨床研究では、LAT1 発現が様々な種類のがんで独立した予後不良因子であることが明らかとなっている。一方、基礎研究では、LAT1 の機能阻害によって、がんの増殖を抑制可能であることが明らかにされており、LAT1 を狙った分子標的治療の有効性が示されている。しかし、研究代表者らがこれまでに実施した胆管がんにおける検討では、LAT1 阻害による抗がん作用は細胞増殖抑制性であるため、LAT1 阻害によるがんの縮小、消失は難しいと予測される (引用文献)。

放射性同位元素 (RI) をがん選択的に輸送し、がん細胞のすぐそばから放射線を照射することでがんを破壊する治療は、RI 内用療法と呼ばれる。特に、 α 核種から放出される α 線は、短飛程 (60~80 μm)、高線エネルギー付与 (50~100 keV/ μm) の特徴を有するため、細胞致死効果が高く、標的周囲の正常組織への影響を最小限に抑えることができる。そのため、近年、 α 核種の利用が注目されている。研究代表者らは、放射性ハロゲンのひとつである ^{76}Br を利用したがんの陽電子断層撮影 (PET) 診断用アミノ酸誘導体の研究に取り組み、これまでに LAT1 を標的とした ^{76}Br 標識アミノ酸誘導体 2-[^{76}Br]bromo- α -methyl-L-phenylalanine (2-BAMP) を開発した (引用文献)。2-BAMP は、生体内安定性が高く、がん組織集積性及び滞留性を有する一方で、正常組織から速やかにクリアランスされた。これら 2-BAMP の特徴から、研究代表者は ^{76}Br の代わりに α 核種のひとつである ^{211}At (ハロゲン、半減期 7.2 時間) を標識することで、LAT1 発現細胞に対して α 核種を効果的に輸送でき、LAT1 発現がん細胞を効果的に殺滅できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、LAT1 発現がん細胞を効果的に殺滅可能ながん治療薬の創出を目的とし、 ^{211}At 標識 2-[^{211}At]astato- α -methyl-L-phenylalanine (2-AAMP) を新たに合成し、がん治療薬としての有用性について、細胞及び実験動物を用いて検討した。

3. 研究の方法

本研究では、まず 2-AAMP の合成手法について検討し、最適な標識及び精製条件を決定した。次に、2-AAMP の血漿中安定性及び LAT1 発現がん細胞株を用いた 2-AAMP のがん細胞内取込み活性、細胞傷害活性、DNA 損傷について検討した。さらに、担がんモデルマウスを用いて 2-AAMP の生体内安定性及び体内分布について検討した。

(1) ^{211}At 製造及び 2-AAMP 合成

高崎量子応用研究所イオン照射研究施設における AVF サイクロトロンを用いて加速した $^4\text{He}^{2+}$ ビームを Bi ターゲットに照射し、 $^{209}\text{Bi}(\alpha, 2n)^{211}\text{At}$ 反応によって ^{211}At を製造した。Bi 中に生成した ^{211}At は、乾式蒸留法によって水中に分離した。予め合成した標識前駆体 (N-trifluoroacetyl-2-trimethylstannyl- α -methyl-L-phenylalanine methyl ester) と ^{211}At を N-chlorosuccinimide 存在下において室温 15 分間反応させた。Na₂S₂O₅ 水溶液により反応停止後、6N NaOH を添加し、70 度で 1 時間反応させ、脱保護を行った (図 1)。中和後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析を行い、2-AAMP 画分を分取した。分取した溶液に 0.1 M アスコルビン酸を添加し、溶媒を減圧留去後 Sep-Pak 精製を行った。

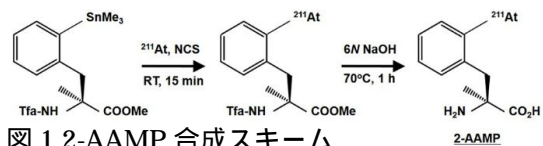


図 1 2-AAMP 合成スキーム

(2) 2-AAMP の血漿中安定性

2-AAMP をヒト血漿に加え、37 度で 1、3、6 時間培養した。その後、薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析を行い、未変化体の割合を算出した。(展開溶媒 1-BuOH : AcOH : H₂O = 4 : 1 : 1)

(3) 2-AAMP 細胞内取込み

ヒト乳がん細胞株 SKOV3 における LAT1 及び CD98 発現をウエスタンブロット法により確認後、2-AAMP の細胞内取込み及び細胞内保持性を検討した。細胞内取込みについては、2-AAMP と SKOV3 を緩衝液中で一定時間培養後、細胞を洗浄し、細胞内に残存する放射能を測定した。細胞内保持性については、2-AAMP を一度細胞内へ取り込ませた後、培養上清を新しい緩衝液に置き換えて一定時間培養し、上清中に放出された放射能を測定した。さらに各種 L 体アミノ酸及び LAT1 選択的阻害薬を用いた取込み阻害実験により、2-AAMP が LAT1 を介して取り込まれているか検討した。

(4) 2-AAMP による細胞傷害活性

2-AAMP による細胞増殖抑制活性をコロニー形成法、細胞死誘導活性を乳酸脱水素酵素 (LDH) 法により検討した。また、2-AAMP による DNA 二重鎖切断をコメットアッセイ法により検討した。

(5) 2-AAMP 体内分布

SKOV3 をヌードマウス皮下に移植し、固形がんモデルを作製した。2-AAMP を尾静脈注射し、一定時間経過後に血液及び臓器を摘出し、臓器重量及び放射能を測定して、体内分布を検討した。

4. 研究成果

(1) ^{211}At 製造及び 2-AAMP 合成

Bi ターゲットに対して 28 MeV の $^4\text{He}^{2+}$ ビームを 3.5 μA で 3 時間照射した結果、約 160 MBq の ^{211}At (照射直後) を製造することができた。

得られた ^{211}At を用いて、2-AAMP の合成を行った結果、放射化学的収率 90.4%、放射化学的純度 90% 以上で合成が可能であった。 ^{211}At には安定同位体が存在しないため、HPLC 分析における 2-AAMP の保持時間を非放射性的の 2-BAMP と比較した。その結果、2-BAMP の保持時間 15 分に対し、2-AAMP の保持時間は 15.5 分であった (図 2)。ほぼ同じ保持時間であることから、2-AAMP が合成できていることが示唆された。

2-AAMP の濃縮・溶媒置換時に予期せぬ 2-AAMP の分解が認められたため、2-AAMP の濃縮・溶媒置換法について検討した。2-AAMP 分取時の溶媒減圧留去における放射線分解を考慮し、抗酸化・ラジカル除去活性を有するアスコルビン酸を添加することによって改善を図った。その結果、濃縮・溶媒置換における 2-AAMP の分解は顕著に抑制された。試料に残存するアスコルビン酸は、Sep-Pak 精製により除去可能であり、これらの結果から、アスコルビン酸追加及び Sep-Pak 精製による 2-AAMP の濃縮・溶媒置換方法を確立した。

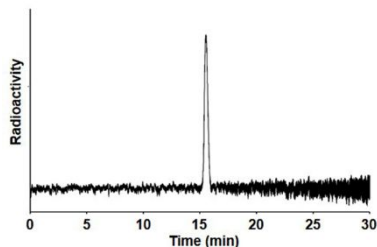


図 2 Sep-Pak 精製後 2-AAMP の HPLC 分析

(2) 2-AAMP 安定性

得られた 2-AAMP をヒト血漿中において培養した結果、2-AAMP の Rf 値に時間依存的な変化は認められなかった (図 3)。そのため、2-AAMP はヒト血漿中で殆ど分解せず血中で安定に存在すると推察された。

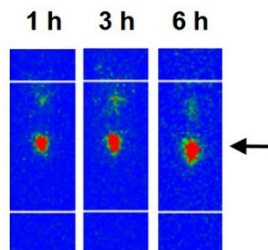


図 3 2-AAMP の TLC 分析結果 (矢印は 2-AAMP のスポットを示す。)

(3) 2-AAMP の細胞内取込み及び細胞内保持性

2-AAMP は SKOV3 に対し、添加直後から急

激に取り込まれ、添加 10 分後には取込みが飽和した (図 4A)。一方、2-AAMP の細胞内保持性について、2-AAMP は時間経過と共に細胞外へ放出され、60 分後には、2-AAMP の殆どが細胞外へ放出された (図 4B)。

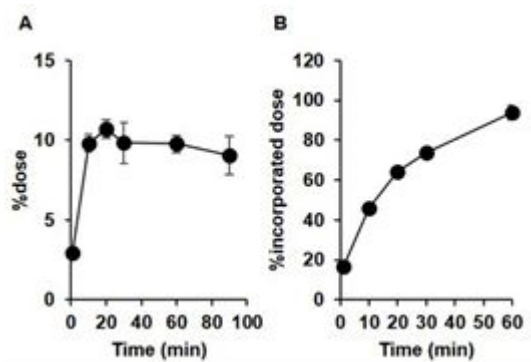


図 4 2-AAMP の細胞内取込み (A) 及び細胞外放出 (B) (N=4)

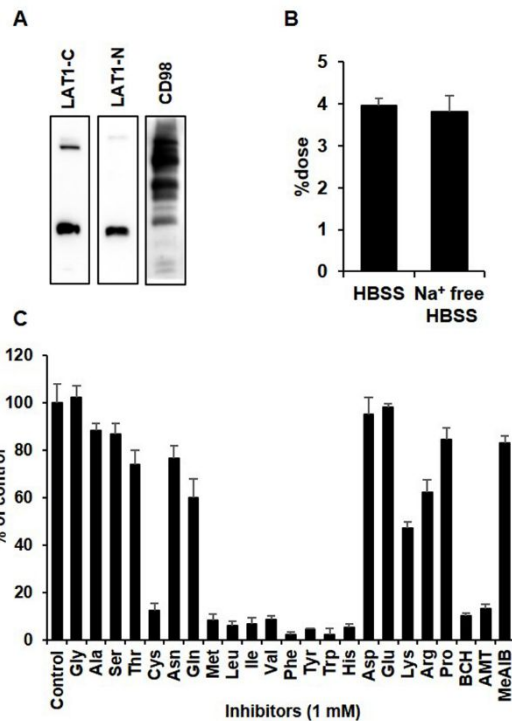


図 5 SKOV3 における LAT1 及び CD98 発現 (A) Na^+ 含/不含緩衝液中における 2-AAMP の細胞内取込み (B) 各種阻害薬処置下における 2-AAMP の細胞内取込み (C)

次に SKOV3 における LAT1 及び CD98 (LAT1 機能発現に必要なタンパク質) 発現を検討した結果、いずれのタンパク質も SKOV3 に存在することが分かった (図 5A)。LAT1 は基質を Na^+ 非依存的に細胞内へ輸送する。そこで、2-AAMP 取込みに対する Na^+ の有無の影響を検討したところ、2-AAMP 取込みに変化は認められなかった (図 5B)。さらに、2-AAMP 取込みに対する各種アミノ酸及び LAT1 選択的阻害薬の影響を検討したと

ころ、LAT1 の基質アミノ酸である分枝鎖アミノ酸、芳香族アミノ酸及び LAT1 選択的阻害薬である α -methyltyrosine (AMT) によって 2-AAMP の取込みは顕著に抑制された (図 5C)。以上の結果から、2-AAMP は LAT1 を介して SKOV3 へ取り込まれていることが示された。

(4) 2-AAMP 細胞傷害活性

2-AAMP による抗がん作用を検証するため、SKOV3 に対し、2-AAMP で 24 時間処置した後の細胞増殖抑制活性、細胞死誘導活性、DNA 二重鎖切断について検討した。細胞増殖抑制活性及び細胞死誘導活性は、2-AAMP の放射能濃度上昇と共に高まり、50 kBq/ml を投与した場合に、細胞増殖活性をコントロールの 10% にまで低下させ、細胞死を誘導した。また、50 kBq/ml の 2-AAMP を処置した場合に、SKOV3 において DNA 二重鎖切断が誘導されていることを確認した。これらの結果から、2-AAMP は LAT1 依存的にがん細胞内へ取り込まれ、DNA 損傷を誘導し、細胞傷害効果を誘導したことが示唆された。

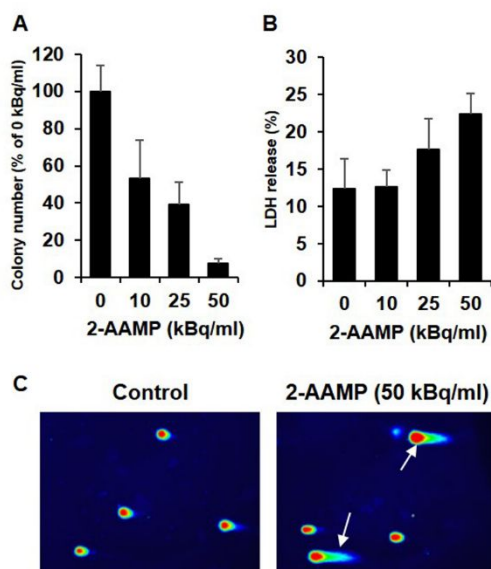


図6 2-AAMPを24時間暴露した後のコロニー増殖活性(A) 細胞死(B)、DNA二重鎖切断(C) 矢印はDNA二重鎖切断が起こった細胞を示す。

(5) 2-AAMP 体内分布

2-AAMP の体内分布について、正常臓器を見ると、各臓器に分布した放射能は添加 10 分後から時間経過と共に速やかに消失した。これに対し、腫瘍では 2-AAMP の添加 30 分後に集積がピークに達し、その後 1 時間後まで滞留し、3 時間後にはほぼ消失した(表)。2-BAMP と比較すると、移植したがん細胞が異なるため、腫瘍集積性に関する比較は難しいが、正常組織に対する分布及びクリアランスは似た変化を示した。

体内で 2-AAMP が分解した場合、胃、脾臓、肺において放射能の蓄積、滞留が認められるが、いずれの臓器からも時間経過と共に放射

能は消失した。このことから、2-AAMP は生体内で分解することなく、安定に存在したことが示唆された。

	10 min	30 min	60 min
Blood	2.63 ± 0.33	1.68 ± 0.23	0.66 ± 0.17
Liver	3.00 ± 0.43	1.65 ± 0.30	0.65 ± 0.21
Kidney	8.19 ± 1.05	5.63 ± 0.74	1.95 ± 0.41
Intestine	3.47 ± 1.17	2.14 ± 0.16	0.77 ± 0.20
Spleen	3.13 ± 0.80	2.11 ± 0.40	0.58 ± 0.07
Pancreas	25.66 ± 8.88	9.21 ± 7.96	3.75 ± 1.35
Stomach	2.99 ± 1.93	1.62 ± 0.47	0.97 ± 0.16
Heart	2.75 ± 0.40	1.33 ± 0.28	0.62 ± 0.19
Lung	2.43 ± 0.55	1.72 ± 0.30	0.72 ± 0.12
Neck	2.24 ± 0.26	1.28 ± 0.36	0.60 ± 0.20
Muscle	2.11 ± 0.46	1.60 ± 0.34	0.67 ± 0.21
Bone	1.61 ± 0.79	1.17 ± 0.21	0.34 ± 0.11
Brain	1.01 ± 0.64	0.52 ± 0.14	0.16 ± 0.06
Tumor	3.03 ± 0.48	4.34 ± 1.63	2.44 ± 0.83

	180 min	360 min
Blood	0.07 ± 0.02	0.03 ± 0.01
Liver	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Kidney	0.10 ± 0.06	0.05 ± 0.01
Intestine	0.15 ± 0.04	0.09 ± 0.08
Spleen	0.12 ± 0.07	0.09 ± 0.05
Pancreas	0.06 ± 0.03	0.03 ± 0.04
Stomach	0.60 ± 0.12	0.70 ± 0.47
Heart	0.06 ± 0.04	0.03 ± 0.05
Lung	0.15 ± 0.03	0.12 ± 0.07
Neck	0.11 ± 0.05	0.05 ± 0.05
Muscle	0.02 ± 0.04	0.01 ± 0.02
Bone	0.03 ± 0.03	0.02 ± 0.05
Brain	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.01
Tumor	0.05 ± 0.03	0.02 ± 0.04

表 担がんマウスにおける 2-AAMP の体内分布

【まとめ】

本研究において、研究代表者らは LAT1 を標的とした RI 内用療法薬として、新たに 2-AAMP を開発し、治療薬としての有用性を検討した。研究代表者らは 2-AAMP 合成法を新たに樹立し、2-AAMP が LAT1 を介して腫瘍に集積し、腫瘍集積性・滞留性を示すことを明らかにした。また、2-AAMP はがん細胞に対し、DNA 二重鎖切断を誘導し、細胞増殖抑制活性だけでなく、細胞死誘導活性を有することを明らかにした。これらの結果から、2-AAMP は LAT1 発現がんに対して、有効な治療薬となる可能性が示唆された。一方で、既報の ^{211}At 標識抗体等に比べ 2-AAMP の腫瘍に対する総集積量は低かったため、治療に用いるためには大量合成及び投与が今後必要である。また、十分な治療効果と副作用の軽減を考慮すると、2-AAMP の腫瘍滞留性の改善や脾臓集積性の軽減が今後の課題であると考えられる。

^{211}At 標識体は、生体内で脱ハロゲン化が起こりやすく、 ^{211}At 標識体の合成では、如何に生体内安定性の高い ^{211}At 標識体を合成するかが大きな課題となっている。2-AAMP は、生体内で安定に存在したことから、ペプチドや抗体等に対して ^{211}At を標識する場合に、2-AAMP を利用することでより安定な ^{211}At 標識体とすることが可能となることが期待される。

<引用文献>

K. Kaira, Y. Ohshima, Y. Sunose, et al., Clinical significance of L-type amino acid transporter 1 expression as a prognostic marker and potential of new targeting therapy in biliary tract cancer, BMC Cancer, vol.13, 2013, 482.

H. Hanaoka, Y. Ohshima, Y. Suzuki, et al., Development of a Widely Usable Amino Acid Tracer: ^{76}Br - α -Methyl-Phenylalanine for Tumor PET Imaging, J. Nucl. Med., vol.56, 2015, 791-797.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Y. Ohshima, K. Kaira, A. Yamaguchi, et al., Efficacy of LAT1 inhibition as a therapeutic target in esophageal squamous cell carcinoma, Cancer Science, vol.107, 2016, 1499-1505.

DOI: 10.1111/cas.13021

査読有

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大島 康宏 (OHSHIMA, Yasuhiro)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子ビーム科学研究部門・高崎量子応用研究所・放射線生物応用研究部・主任研究員

研究者番号：00588676

(2)研究協力者

渡辺 智 (WATANABE, Satoshi)

鈴木 博元 (SUZUKI, Hiroyuki)

坂下 哲哉 (SAKASHITA, Tetsuya)