

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659286

研究課題名（和文） ヒト培養細胞の機能性分子発現解析に基づくポストFDG腫瘍診断薬の設計戦略の構築

研究課題名（英文） The probe design strategy of post-FDG tumor diagnostic agents based on the functional biomolecule expression analysis of human cultured cells

研究代表者

川井 恵一（KAWAI KEIICHI）

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：30204663

研究成果の概要(和文):本研究では、薬剤評価に用いるヒト培養細胞の遺伝子発現レベルをデータベース化し、癌細胞に高発現している機能性分子を予め探索するとともに、特にポストFDG 製剤の中でも有力候補であるアミノ酸製剤を取り上げ、腫瘍で特異的に高発現が認められるアミノ酸トランスポータに高親和性を示す標識アミノ酸の集積機序を詳細に検討し、アミノ酸トランスポータ遺伝子発現と腫瘍集積性との相関からその設計戦略の妥当性を評価した。

研究成果の概要(英文):While searching this research for the functional biomolecule used by the database for the gene expression level of the human cultured cells for evaluation of imaging probes, and it has high-expressed to the tumor cell beforehand, the amino acid derivatives are especially taken up also in a post-FDG candidate probe, and the accumulation mechanism of the labeled amino acids which shows high affinity to the amino acid transporters to which high revelation is specifically accepted by a tumor was examined in detail, and the validity of the design strategy was evaluated from correlation with amino acid transporter gene expression and tumor accumulation of the probes.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	0	1,000,000
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	270,000	3,270,000

研究分野:放射性薬品学

科研費の分科・細目:内科系臨床医学・放射線科学

キーワード:ヒト培養細胞, 機能性分子発現解析, ポストFDG, 腫瘍診断薬, PET製剤, 腫瘍集積性, アミノ酸トランスポータ, 設計戦略

## 1. 研究開始当初の背景

癌は我が国の死因の第一位を占め、癌を早期に検出し得る診断法の確立が強く望まれている。本邦では FDG-PET 検査が保険適用となり PET 施設が急増しているが、一方で正常組織へ

の生理的集積などの問題点も指摘されており、アミノ酸のように糖とは異なる代謝亢進により腫瘍細胞へ特異的に高集積を示し、FDG-PET の問題点を克服するポスト FDG 腫瘍診断薬の探索が急務となっている。

申請者は、高い代謝安定性と速やかな尿中排泄性を示す一方で、腫瘍細胞で活性が亢進しているアミノ酸膜能動輸送機構に親和性を保持する種々の放射性ヨウ素標識アミノ酸誘導体を開発してきた[J Nucl Med 32: 819-824 (1991), J Cereb Blood Flow Metab 20: 207-212 (2000)]。加えて、標識アミノ酸の尿中排泄性に関連する腎尿細管におけるトランスポータの解析を進めてきた[J Nucl Med 44: 625-631 (2003), J Nucl Med 45: 80-85, Nucl Med Biol 31: 477-482 (2004)]。その結果、アミノ酸トランスポータに親和性を有する標識アミノ酸においても、輸送に寄与するアイソフォームに対する選択性の違いにより、体内動態に大きな変化が見られることから[J Nucl Med 44: 244-246 (2003)]、個々の腫瘍系に適した腫瘍診断薬剤開発の可能性を見出した[Nucl Med Biol 34: 1003-1008 (2007)]。そこで、腫瘍細胞と正常組織において発現するアミノ酸トランスポータのアイソフォームの相違を利用し、標識アミノ酸の腫瘍細胞への集積性と正常組織との集積比を向上させることに加え、腎尿細管における経細胞輸送機構の検討から速やかな尿中排泄性を併せ持つことで、FDG-PET では判定が困難な腫瘍の検出に有用なポスト FDG 腫瘍診断薬の設計戦略を構築する目的で挑戦的萌芽研究として申請した。

## 2. 研究の目的

本研究は、ポスト FDG 腫瘍診断薬の開発において、確かな根拠と系統的な設計戦略を構築することを目的として、薬剤評価に用いられているヒト培養細胞の遺伝子発現レベルをデータベース化し、癌細胞に高発現している機能性分子を予め探索するとともに、尿中排泄に関連する腎尿細管における分泌・再吸収機構を併せて分析することにより、ポスト FDG 製剤に相応しい速やかな尿中排泄性を有する分子標的腫瘍診断薬開発に利用する世界でも初めての試みである。中でも本研究ではポスト FDG 製剤の有力候補であるアミノ酸製剤を取り上げ、アミノ酸トランスポータ発現量の比較から、腫瘍で特異的に高発現が認められるトランスポータに親和性を示す標識アミノ酸を選択し、その腫瘍集積性及び集積機序を解析するとともに、腎尿細管トランスポータの遺伝子発現量も解析して、腫瘍集積性ととの相関から、その設計戦略の妥当性を評価する。

## 3. 研究の方法

本課題研究では、ポスト FDG 製剤の候補化合物として、高い尿排泄性、生体内代謝安定性を有するとともに、腫瘍細胞で特異的に高発現しているアミノ酸トランスポータなどの細胞集積に関係する機能性分子に高い親和性を有し、腫瘍組織への高い集積・滞留性と正常組織からの速やかな排泄性を示す PET 用標識人工アミノ酸を開発する。また、当面の臨床応用性を考慮し、この尿排泄性、代謝安定性などを具備する既に

開発してきた放射性人工アミノ酸に関して、ヒト培養癌細胞への集積性・代謝親和性を検討し、それらの腫瘍診断薬としての可能性を評価すると共に、個々の癌細胞系におけるアミノ酸トランスポータの発現量と各アイソフォームに対する親和性を解析し、新たな人工アミノ酸ドラッグデザインの基盤となる知見を得る。

本研究課題の基盤となる遺伝子発現レベルの解析に関しては、既に数種のヒト培養癌細胞を対象として、DNA チップを用いた発現レベル解析とリアルタイム PCR による数種のトランスポータ遺伝子に関する定量解析を実施してきた。加えて、発現蛋白に対する抗体が入手可能な場合には、ウェスタンブロッティングにより蛋白発現量そのものを定量解析してきた実績を有する。本研究では、実験対象として診断薬開発・評価に使用しているヒト培養癌細胞のマイクロアレイ解析を網羅的に検討すると共に、得られたデータベースを基盤としてアミノ酸トランスポータ発現量の比較から、ポスト FDG 製剤の有力候補である、ヒト癌細胞で特異的に高発現が認められるトランスポータに親和性を示す標識母体アミノ酸を選択する。

一方、申請者は種々の生理活性物質合成前駆体である放射性ヨウ素アミノ酸を用いた動物実験を検討してきた。加えて、放射性フッ素標識に関しても、米国国立衛生研究所 PET 部門との共同研究で、部位選択的固相標識法を確立した実績を有する[Nucl Med Biol 22: 37-43 (1995), Appl Radiat Isot 47: 37-44 (1996)]。本研究では、ヒト癌細胞に対する親和性を検討するとともに、有用な結果が得られたものに関しては、各培養癌細胞に特異的に発現しているトランスポータに高い親和性を示す PET 用腫瘍診断薬の分子設計を行う。加えて、その標識体の腫瘍集積性及び集積機序の解析とともに、標的分子に関するリアルタイム PCR などによる特定遺伝子発現量の定量解析も実施し、腫瘍集積性とトランスポータ発現量との相関から、その設計戦略の妥当性を評価する。

## 4. 研究成果

ヒト腫瘍細胞におけるトランスポータなどの機能性分子の発現を網羅的に観察するため、リファレンス RNA により標準化したデータベースを構築し、その信頼性を確認した。アジレント社製 DNA チップを用いて 16 種類のヒト培養腫瘍細胞における 4 万配列以上の遺伝子発現レベルを測定した。加えて、これまでの遺伝子発現解析結果の信頼性を確認するために、新たなヒト培養細胞試料の解析にあたり、委託業者にも同一試料の解析を依頼し、両解析結果の近似曲線の相関係数を求めて比較した。リファレンス RNA を用いて標準化するこの解析方法を適用してこれまでのヒト腫瘍細胞における遺伝子発現解析結果をデータベース化することにより、直接比較可能な特定機能分子

の遺伝子発現プロファイリングがすべての試料に対して可能となった。

また、このデータベースを用いてアミノ酸トランスポータの発現レベルを比較検討した結果、高発現を確認したアミノ酸トランスポータシステム L に特異的親和性を示すヨウ素標識アミノ酸を見出した[⑧ *Nucl Med Biol*, **37**: 903-910 (2010)]。並行して、FDG の尿細管再吸収トランスポータへの親和性を検討し、尿排泄機序を解明した[⑨ *Nucl Med Commun*, **31**: 141-146 (2010)]。さらに、ポスト FDG 製剤として期待されている<sup>18</sup>F-FACBCの前立腺癌細胞への集積に関与するアミノ酸トランスポータを明らかにし、分子標的とするアミノ酸トランスポータの発現との相関を検討するとともに[⑤ *J Nucl Med*, **52**: 822-829 (2011)]、既に臨床使用されている<sup>11</sup>C-Met および新たに臨床使用が開始された<sup>11</sup>C-MeAIB の集積機序と比較検討した。

#### 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 20 件)

- ① Shima T., Mizokami A., Miyagi T., Kawai K., Izumi K., Kumaki M., Ofude M., Zhang J., Keller E.T. and Namiki M.: Down-regulation of Calcium/calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase 2 by Androgen Deprivation Induces Castration-resistant Prostate Cancer. *Prostate*, in press, 2012 (reviewed).
- ② Kobayashi M., Mori T., Kiyono Y., Tiwari V., Maruyama R., Kawai K., Okazawa H.: Cerebral Oxygen Metabolism of Rats using Injectible <sup>15</sup>O-Oxygen with a Steady-state Method. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **32**: 33-40, 2012 (reviewed).
- ③ Kobayashi M., Mori T., Kiyono Y., Tsujikawa T., Maruyama R., Higaki Y., Shikano N., Nishii R., Kawai K., Kudo T., Okazawa H.: Appropriate Parameters of Ordered-Subset Expectation Maximization Algorithm on Measurement of Myocardial Blood Flow and Oxygen Consumption with <sup>11</sup>C-Acetate PET. *Nucl. Med. Commun.*, **33**: 130-138, 2012 (reviewed).
- ④ Nakanishi T., Fukushi A., Sato M., Yoshifuji M., Gose T., Shirasaka Y., Ohe K., Kobayashi M., Kawai K., Tamai I.: Functional Characterization of Apical Transporters Expressed in Rat Proximal Tubular Cells (PTCs) in Primary Culture. *Mol. Pharm.*, **8**: 2142-2150, 2011 (reviewed).
- ⑤ 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 Anti-<sup>18</sup>F-FACBC (Trans-1-amino-3-<sup>18</sup>F-fluorocyclobutanecarboxylic Acid) in Human Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.*, **52**: 822-829, 2011 (reviewed).
- ⑥ Ebihara K., Ishida Y., Takeda R., Abe H., Matsuo H., Kawai K., Magata Y., Nishimori T.: Differential Expression of FosB, c-Fos, and Zif268 in Forebrain Regions after Acute or Chronic L-DOPA Treatment in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Neurosci. Lett.*, **496**: 90-94, 2011 (reviewed).
- ⑦ Kobayashi M., Kiyono Y., Maruyama R., Mori T., Kawai K., Okazawa H.: Development of an H<sub>2</sub><sup>15</sup>O Steady-state Method Combining a Bolus and Slow Increasing Injection with a Multiprogramming Syringe Pump. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **31**: 527-534, 2011 (reviewed).
- ⑧ Shikano N., Kotani T., Nakajima S., Ogura M., Nakazawa S., Sagara J., Kobayashi M., Nakazawa S., Baba T., Yamaguchi N., Kubota N., Iwamura Y., 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-K<sub>1</sub> Cells). *Nucl. Med. Biol.*, **37**: 903-910, 2010 (reviewed).
- ⑨ Kobayashi M., Shikano N., Nishii R., Kiyono Y., Araki H., Nishi K., Oh M., Okudaira H., Ogura M., Yoshimoto M., Okazawa H., Fujibayashi Y., Kawai K.: Comparison of the Transcellular Transport of FDG and D-Glucose by the Kidney Epithelial Cell Line LLC-PK<sub>1</sub>. *Nucl. Med. Commun.*, **31**: 141-146, 2010 (reviewed).
- ⑩ Shikano N., Ogura M., Okudaira H., Nakajima S., Kotani T., Kobayashi M., Nakazawa S., Baba T., Yamaguchi N., Kubota N., Iwamura Y., Kawai K.: Uptake of 3-[<sup>125</sup>I]Iodo- $\alpha$ -methyl-L-tyrosine into Colon Cancer DLD-1 Cells: Characterization and Inhibitory Effect of Natural Amino Acids and Amino Acid-like Drugs. *Nucl. Med. Biol.*, **37**: 197-204, 2010 (reviewed).
- ⑪ Shikano N., Ogura M., Sagara J., Nakajima S., Kobayashi M., Baba T., Yamaguchi N., Iwamura Y., Kubota N., Kawai K.: Stimulation of <sup>125</sup>I-3-Iodo- $\alpha$ -methyl-L-tyrosine in Chinese Hamster Ovary (CHO-K<sub>1</sub>) Cells by Tyrosine Esters. *Nucl. Med. Biol.*, **37**: 189-196, 2010 (reviewed).

- ⑫ Ogawa K., Shiba K., Akhter N., Yoshimoto M., Washiyama K., Kinuya S., Kawai K., Mori H.: Evaluation of Radioiodinated Vesamicol Analogs for Sigma Receptor Imaging in Tumor and Radionuclide Receptor Therapy. *Cancer Sci.*, **100**: 2188-2192, 2009 (reviewed).
- ⑬ Kuga N., Shikano N., Takamura N., Nishii R., Yamasaki K., Kobayashi M., Nagamachi S., Tamura S., Kawai K.: Improvement of *N*-isopropyl-*p*-<sup>[123I]</sup>iodoamphetamine Cerebral Accumulation by Competitive Displacement of Serum Protein Binding with Amino-Acid Infusion. *J. Nucl. Med.*, **50**: 1378-1383, 2009 (reviewed).
- ⑭ Uehara T., Nakagawa M., Takai N., Koike S., Furusawa Y., Ando K., Kawai K., Akizawa H., Irie T., Arano Y.: Intracellular Reactions Affecting 2-Amino-4-(<sup>[11C]</sup>methylthio)butyric acid (<sup>[11C]</sup>Methionine) Response to Carbon Ion Radiotherapy in C10 Glioma Cells. *Nucl. Med. Biol.*, **36**: 985-991, 2009 (reviewed).
- [学会発表] (国際学会 計 24 件)
- ① Okudaira H., Shikano N., Nishii R., Miyagi T., Yoshimoto M., Kobayashi M., Ohe K., Nakanishi T., Namiki M., Tamai I., Kawai K.: Transport Mechanism of *Trans*-1-amino-3-<sup>18</sup>F-fluorocyclobutanecarboxylic Acid (<sup>18</sup>F-FACBC) in Human Prostate Cancer. International Symposium on Past, Present and Future of Molecular Pharmacokinetics, Jan. 16, 2012, University of Tokyo (Japan)..
- ② 川井恵一: 放射性医薬品の開発・体内動態制御と個別化医療. バイオセミナー“未来へのバイオ技術”月例会特別講演, 2011年12月5日, バイオインダストリー協会 (東京都).
- ③ Higashi T., Nishii R., Kagawa S., Kishibe Y., Takahashi M., Kobayashi M., Kawai K.: Usefulness of Double Tracer PET Study using [<sup>18</sup>F]FDG and Amino Acid Radiotracer, [<sup>11</sup>C]MeAIB, in the Diagnosis of Mediastinal Diseases. The Society of Nuclear Medicine 58th Annual Meeting, Jun. 4, 2011, San Antonio Convention Center (U.S.A.).
- ④ Kobayashi M., Kagawa S., Nishii R., Takahashi F., Ohe K., Yoshimoto M., Shikano N., Higashi T., Nagamachi S., Kawai K.: Accumulation and Transport Mechanism of *Anti*-1-Amino-3-<sup>[18F]</sup>fluorocyclobutane-1-carboxylic Acid in Representative Human Carcinomas. The Society of Nuclear Medicine 57th Annual Meeting, Jun. 5, 2010, Salt Palace Convention Center (U.S.A.).
- ⑤ Nishii R., Higashi T., Kagawa S., Kishibe Y., Takahashi M., Kobayashi M., Kawai K., Nagamachi S.: Assessment of Efficacy of [<sup>11</sup>C]-MeAIB PET as a Biomarker of the System A Amino Acid Transport: Comparison with [<sup>11</sup>C]-MET PET and [<sup>18</sup>F]-FDG PET in the Patients with Glioblastoma Multiforme. The Society of Nuclear Medicine 57th Annual Meeting, Jun. 5, 2010, Salt Palace Convention Center (U.S.A.).
- ⑥ Yoshimoto M., Kinuya S., Kawai K.: Effects of Antiangiogenic Drugs on FDG, FLT and Methionine Uptake in LS180 and HUVEC. The Society of Nuclear Medicine 57th Annual Meeting, Jun. 5, 2010, Salt Palace Convention Center (U.S.A.).
- ⑦ 川井恵一: 放射性医薬品の体内動態制御とターゲティングコンファーマティブ個別化医療. 第66回日本放射線技術学会総会学術大会教育講演, 2010年4月9日, パシフィコ横浜会議センター (神奈川県).
- ⑧ Kobayashi M., Araki H., Nishi K., Shikano N., Kiyono Y., Nishii R., Fujibayashi Y., Okazawa H., Kawai K.: Mechanism of Renal FDG Transcellular Transport and Cellular Accumulation using LLC-PK<sub>1</sub> Cells. The Society of Nuclear Medicine 56th Annual Meeting, Jun. 13, 2009, Metro Toronto Convention Center (U.S.A.).
- ⑨ Shikano N., Ogura M., Nakajima S., Yamaguchi N., Kubota N., Iwamura Y., Kawai K.: Trans-stimulation of 3-I-125-Iodo-alpha-methyl-L-tyrosine Uptake into Chinese Hamster Ovary Cell by Amino Acid Esters. 18th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences, Jul. 12, 2009, Edmonton's Shaw Conference Centre (Canada).
- ⑩ Ogura M., Shikano N., Nakajima S., Yamaguchi N., Kubota N., Iwamura Y., Kawai K.: Uptake Inhibition of 3-I-125-Iodo-alpha-methyl-L-tyrosine into Colon Cancer DLD-1 Cell by Amino Acid Like Drugs. 18th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences, Jul. 12, 2009, Edmonton's Shaw Conference Centre (Canada).
- ⑪ Kobayashi M., Araki H., Nishi K., Shikano N., Kiyono Y., Nishii R., Fujibayashi Y., Okazawa H., Kawai K.: Mechanism of Renal FDG Transcellular Transport and Cellular Accumulation using LLC-PK<sub>1</sub> Cells. The Society of Nuclear Medicine 56th Annual Meeting, Jun. 13, 2009, Metro Toronto

Convention Center (U.S.A.).

- ⑫ Nishii R., Kagawa S., Higashi T., Kishibe Y., Iwasaki T., Uehara T., Kobayashi M., Nagamachi S., Arano Y., Kawai K.: Comparison of System A and System L Amino Acid Transports in Human Pancreas with C-11 MeAIB and C-11 MET PET Study. The Society of Nuclear Medicine 56th Annual Meeting, Jun. 13, 2009, Metro Toronto Convention Center (U.S.A.).
- ⑬ Yoshimoto M., Hirata M., Kawai K., Ohmomo Y.: Estimation of Sensitivity to Gefitinib with Radioiodinated IPHY in Lung Cancer. The Society of Nuclear Medicine 56th Annual Meeting, Jun. 13, 2009, Metro Toronto Convention Center (U.S.A.).

[その他]

ホームページ等

金沢大学 研究紹介データベース:

[http://kurt.kanazawa-u.ac.jp/souran\\_ku/info.php?teacher\\_id=488](http://kurt.kanazawa-u.ac.jp/souran_ku/info.php?teacher_id=488)

金沢大学医薬保健研究域保健学系 量子医療技術学講座 川井研究室:

<http://kawai.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

川井 恵一 (KAWAI KEIICHI)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号:30204663

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

玉井 郁巳 (TAMAI IKUMI)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号:20155237

藤林 康久 (FUJIBAYASHI YASUHISA)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子

イメージング研究センター・センター長

研究者番号:50165411