

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25年 6月19日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300334

 研究課題名（和文） アミノ酸トランスポーター標的がん治療へのF-18-FMT PETの
 応用に関する研究

 研究課題名（英文） Application of F-18-FMT PET for amino acid transporter targeted
 cancer therapy

研究代表者

織内 昇（ORIUCHI NOBORU）

群馬大学・大学院医学系研究科・客員教授

研究者番号：40292586

研究成果の概要（和文）：アミノ酸トランスポーターLAT1は、非小細胞肺癌や膵がんの悪
 性度や予後と相関した。PETで¹⁸F-FMTの集積は、治療効果と良く相関し予後因子であった。

LAT1阻害剤（BCH）は、*in vitro*でがん細胞のアミノ酸取り込み並びに細胞増殖を抑制し、動
 物モデルにおいても腫瘍増殖を抑制し、それとともに¹⁸F-FMTの集積も低下した。

LAT1阻害によるがん治療と、LAT1標的治療のマーカーとしての¹⁸F-FMT PETの有効性が示唆さ
 れた。

研究成果の概要（英文）：Expression of amino acid transporter LAT1 was correlated with
 pathological malignancy and prognosis of patients with non-small cell lung cancer and
 pancreas cancer. LAT1 specific ¹⁸F-FMT uptake in the tumor was correlated with therapeutic
 effect and was an independent prognostic marker.

LAT1 inhibitor suppressed both amino acid transport and proliferation of these cancer
 cells *in vitro*, and also suppressed tumor growth in animal models which was coincided
 with decreased ¹⁸F-FMT uptake.

These results indicated possible LAT1-targeted cancer therapy and use of ¹⁸F-FMT PET
 as a surrogate marker.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2012年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			

年度			
総計	11,700,000	3,510,000	15,210,000

研究分野：がん治療への PET の応用

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：LAT1、肺がん、¹⁸F-FAMT、PET、膵がん、アミノ酸トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

中性アミノ酸の輸送体である L 型アミノ酸トレンスポーターの中で、LAT1 は多くのがん細胞に発現しており、細胞増殖に不可欠な必須アミノ酸を細胞内に輸送すると同時に、がん細胞のシグナル伝達を制御し、腫瘍の増殖・転移に関与する。

非小細胞性肺がんにおいて LAT1 の発現は、臨床病理学的にはリンパ節転移、病期、細胞増殖ならびに血管内皮増殖因子の発現など、腫瘍の進展に関わる指標と相関する。これらのことから LAT1 は、腫瘍の臨床的な悪性度のマーカーとしての意義が示唆されている。また LAT1 を高発現する患者は生存率が有意に低く、予後評価にも有用である。このような LAT1 の機能的特徴から、LAT1 の阻害はがんの分子標的治療として有望と考えられる。

従来から固形がんの治療効果判定は、RECIST (Response evaluation criteria in solid tumor) を用いて行われている。しかし CT で測定した腫瘍の大きさは、生存する腫瘍細胞の数や viability を正確には反映しないため、評価法として客観的で容易であるが、腫瘍の縮小にはある程度の時間を要し、治療が奏効した後も壊死や瘢痕が残存するため、大きさによる効果判定は正確な評価とはいえない。細胞の代謝を画像化する PET は、CT よりも治療効果の判定に有用な可能性があり、¹⁸F-FDG PET の効果判定におけ

る有用性が、多くのがんで検討されている。¹⁸F-FDG はがん細胞に非特異的なため、がん細胞に特異性が高い PET 用トレーサーである核酸やアミノ酸のポジトロン核種標識体が試みられてきた。しかしこれまで報告されているトレーサーは、骨髄をはじめとする非特異的集積などのため、¹⁸F-FDG を凌駕するものではなく、一般化されていない。

アミノ酸の¹⁸F標識化合物である¹⁸F標識 α -methyltyrosine (¹⁸F-FMT) は、がん細胞特異的な LAT1 によって細胞内に輸送される。これまでの研究から、¹⁸F-FMT を用いたポジトロン CT (PET) は、がんの診断や治療効果の評価に有用であることが示唆されている。

2. 研究の目的

新たな分子標的治療として LAT1 阻害によるがん治療の基礎的検討を行い、¹⁸F-FMT PET による治療適応や効果判定の非侵襲的な評価法の開発を目的とする。この研究は、¹⁸F-FMT による、LAT1 を標的とするがん治療の有効性の評価法を研究し、がんの分子標的治療の PET による個別化を開発するものである。

3. 研究の方法

(1) LAT1 を分子標的とするがん治療のモデルとして LAT1 を高発現するヒト肺がんの動物モデルを作成し、LAT1 阻害剤である 2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptanes-2-carboxylic acid (BCH) によ

る腫瘍の増殖抑制効果を評価した。また、(2) 膵がんの動物モデルでも BCH による腫瘍の増殖抑制効果を明らかにするとともに、 ^{18}F -FMT PET による画像化で集積を定量評価して治療効果と ^{18}F -FMT 集積の変化を対比した。

(3) 臨床研究としては、膵がんの切除組織の LAT1 発現を免疫組織染色で評価し、腫瘍の増殖や転移のマーカーである Ki-67、血管内皮増殖因子 (VEGF)、CD34、p53 などの発現と対比して、LAT1 を病理学的な悪性度と比較した。

(4) 化学療法または分子標的治療を行う非小細胞肺癌患者に対して ^{18}F -FMT PET を行い、治療前後の ^{18}F -FMT の集積変化を治療効果と比較して、進行がん症例における薬物治療や放射線治療の効果判定における ^{18}F -FMT PET の有用性を評価した。

非小細胞肺癌んで切除された腫瘍の LAT1 の発現が亢進している患者の予後は不良であることが明らかにされている。 ^{18}F -FMT の集積と切除後の予後を比較し、予後評価における ^{18}F -FMT PET の有用性を検討した。

4. 研究成果

(1) LAT1 の阻害によるがんの分子標的治療の基礎的研究として、LAT1 を発現する非小細胞肺癌の cell line を LAT1 阻害剤である BCH を添加した培地を用いて培養を行い、細胞の MTT アッセイにより viability を評価したところ、細胞増殖は BCH を添加しない対照群と比較して濃度依存性に低下した。

LAT1 阻害による細胞増殖抑制の機序については、mTOR を介するシグナル伝達の抑制が示唆された。

したがって LAT1 阻害による非小細胞肺癌の治療の可能性がある。

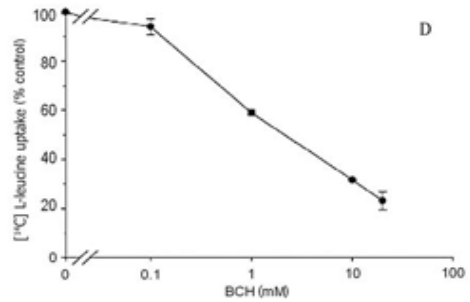


図1 BCHによる肺がん細胞の $[^{14}\text{C}]$ L-leucine の取り込み抑制

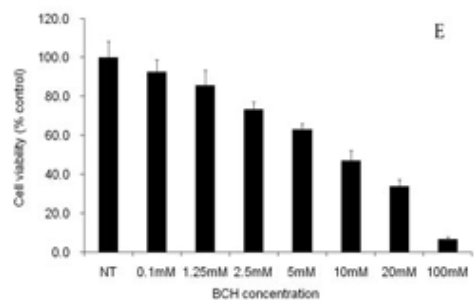


図2 BCHによる肺がん細胞の生存活性の低下

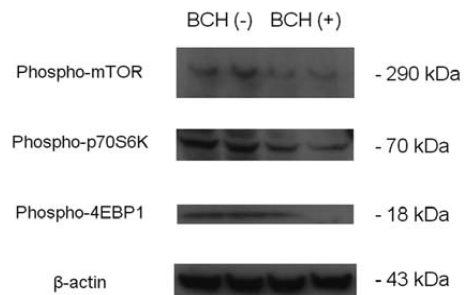


図3 BCHによる肺がん細胞のリン酸化 mTOR ならびにリン酸化 p70S6K および 4EBP1 の低下

(2) LAT1 を発現する膵がん細胞に in vitro で同様に BCH を投与し、細胞増殖に及ぼす影響を検討した。培養細胞は BCH の付加により、濃度依存的にアミノ酸の取り込みが抑制され、細胞増殖も抑制された。BCH は膵がんの標準治療薬である gemcitabine に耐性の細胞においても増殖を抑制し、感受性の細胞では gemcitabine による増殖抑制を増強した。次に膵がんを移植した動物モデルに BCH を投与した。BCH は LAT1 を高発現する腫

瘍の増殖を対照群と比較して有意に抑制した。さらに動物モデルのPETで¹⁸F-FMTの腫瘍集積と抗腫瘍効果との関連を検討したところ、治療効果による腫瘍の増殖抑制とともに、腫瘍の¹⁸F-FMT集積の低下が認められ、¹⁸F-FMTの腫瘍集積と治療効果との関連が示唆された。

(3) 膵がん患者の手術組織のLAT1発現を免疫組織染色で評価した。LAT1の発現は膵がんにおいて、病理学的には細胞増殖や血管新生と相関し、臨床的には術後の患者の予後と相関した。

Table 3 Correlation between LAT1 and other biomarkers in pancreatic cancer

Biomarkers	Spearman γ (95% CI)	P-value
CD98	0.433 (0.251-0.586)	<0.001
Ki-67	0.498 (0.326-0.638)	<0.001
VEGF	0.538 (0.374-0.669)	<0.001
CD34	0.357 (0.162-0.524)	<0.001
Tumour size	0.248 (0.045-0.431)	0.014
CEA	0.020 (-0.185 to 0.224)	0.845
CA19-9	-0.038 (-0.241 to 0.168)	0.708

Abbreviations: LAT1 = L-type amino-acid transporter 1; CEA = carcinoembryonic antigen; CA19-9 = carbohydrate antigen 19-9; VEGF = vascular endothelial growth factor; 95 CI = 95% confidence interval. Bold values indicate a statistically significant difference.

表1 膵がん組織のLAT1発現と病理学的悪性度マーカーとの相関

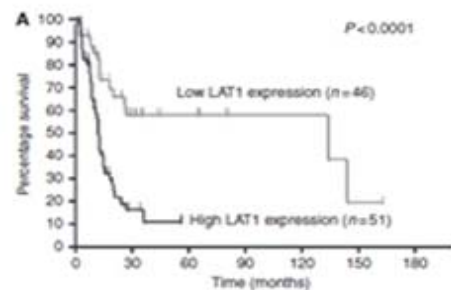


図4 膵がん患者のLAT1発現と全生存割合

(4) 化学療法あるいは化学放射線療法が行われた肺がん患者の治療前後に、¹⁸F-FMT PETを行った。治療前に対する治療後の¹⁸F-FMT集積の減少を治療効果の指標とし、実際の治療効果と比較したところ、¹⁸F-FMTの集積変化による治療効果判定は¹⁸F-FDGの集積変化による効果判定よりも実際の治療効果と良く相関し、¹⁸F-FMT PETは肺がんの治療効果判定に有用であることが示唆された。また¹⁸F-FMT

の高集積は予後不良であり、独立した予後因子であった。

これらの結果から、LAT1阻害によるがん治療の可能性と、LAT1標的治療のマーカーとしての¹⁸F-FMT PETの有効性が示唆された。

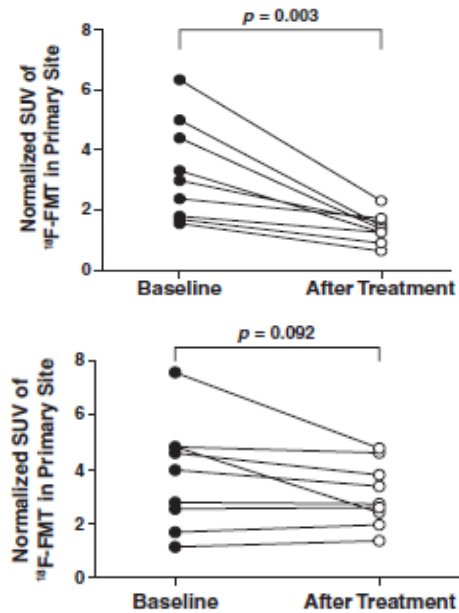


図5 肺がんの化学(放射線)療法奏効例(上段)と非奏効例(下段)における治療前後の¹⁸F-FMT集積の変化

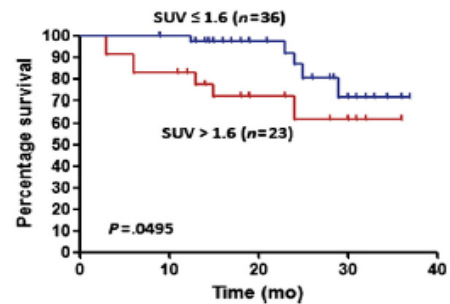


図6 非小細胞肺がんの¹⁸F-FMT集積と切除後の全生存割合

Table 2 Univariate and multivariate analysis of prognostic factors (log-rank test)

Prognostic factor	Univariate analysis (P value)	Multivariate analysis (P value)
Age ($\leq 65 / > 65$)	.609	.397
Gender (male/female)	.084	.458
Stage (I-II/III)	.047	.141
LAT1 (positive/negative)	.027	.035
Histology (AC/non-AC)	.831	.319
SUV _{max} of FAMT PET ($> 1.6 / \leq 1.6$)	.049	.298

表2 非小細胞肺がんの予後因子

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 33 件)

- ① Ohshima Y, Hanaoka H, Tominaga H, Kanai Y, Kaira K, Yamaguchi A, Nagamori S, Oriuchi N, Tsushima Y, Endo K, Ishioka NS. Biological evaluation of 3-^[18F]fluoro- α -methyl-D-tyrosine (D-^[18F]FAMT) as a novel amino acid tracer for positron emission tomography. *Ann Nucl Med* 27:314-324, 2013.
- ② Kaira K, Sunose Y, Arakawa K, Ogawa T, Sunaga N, Shimizu K, Tominaga H, Oriuchi N, Itoh H, Nagamori S, Kanai Y, Segawa A, Furuya M, Mori M, Oyama T, Takeyoshi I. Prognostic significance of L-type amino-acid transporter 1 expression in surgically resected pancreatic cancer. *Br J Cancer* 107: 632-638, 2012.
- ③ Wiriyasermkul P, Nagamori S, Tominaga H, Oriuchi N, Kaira K, Nakao H, Kitashoji T, Ohgaki R, Tanaka H, Endou H, Endo K, Sakurai H, Kanai Y. Transport of 3-Fluoro-L- α -Methyl-Tyrosine by Tumor-Upregulated L-Type Amino Acid Transporter 1: A Cause of the Tumor Uptake in PET. *J Nucl Med* 53:1253-1261. 2012.
- ④ Kaira K, Oriuchi N, Takahashi T, Nakagawa K, Ohde Y, Okumura T, Murakami H, Shukuya T, Kenmotsu H, Naito T, Kanai Y, Endo M, Kondo H, Nakajima T, Yamamoto N. L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in malignant pleural mesothelioma. *Anticancer Res* 31: 4075-82. 2011.
- ⑤ Kaira K, Takahashi T, Murakami H, Shukuya T, Kenmotsu H, Naito T, Oriuchi N, Kanai Y, Endo M, Kondo H, Nakajima T, Yamamoto N. Relationship between LAT1 Expression and Response to Platinum-based Chemotherapy in Non-small Cell Lung Cancer Patients with Postoperative Recurrence. *Anticancer Res* 31: 3775-3782, 2011.
- ⑥ Kaira K, Oriuchi N, Takahashi T, Nakagawa K, Ohde Y, Okumura T, Murakami H, Shukuya T, Kenmotsu H, Naito T, Kanai Y, Endo M, Kondo H, Nakajima T, Yamamoto N. LAT1 expression is closely associated with hypoxic markers and mTOR in resected non-small cell lung cancer. *Am J Transl Res* 3: 468-478, 2011.
- ⑦ Ohshima Y, Hanaoka H, Watanabe S, Sugo Y, Watanabe S, Tominaga H, Oriuchi N, Endo K, Ishioka NS. Preparation and biological evaluation of 3-^[76Br]bromo- α -methyl-L-tyrosine, a novel tyrosine analog for positron emission tomography imaging of tumors. *Nucl Med Biol* 38: 857-865, 2011.
- ⑧ Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, Hisada T, Kawashima O, Kameda Y, Ishizuka T, Kanai Y, Nakajima T, Mori M. Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (CD98) expression in surgically resectable stage III non-small cell lung cancer. *Exp Ther Med* 1: 799-808, 2010.
- ⑨ Sohda M, Kato H, Suzuki S, Tanaka N, Sano A, Sakai M, Inose T, Nakajima M, Miyazaki T, Fukuchi M, Oriuchi N, Endo K, Kuwano H. ^{18F}-FAMT-PET is useful for the diagnosis of lymph node metastasis in operable esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 17: 3181-3186, 2010.

- ⑩ Imai H, Kaira K, Oriuchi N, Shimizu K, Tominaga H, Yanagitani N, Sunaga N, Ishizuka T, Nagamori S, Promchan K, Nakajima T, Yamamoto N, Mori M, Kanai Y. Inhibition of L-type amino acid transporter 1 has antitumor activity in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 30: 4819-4828, 2010.
- ⑪ Kaira K, Oriuchi N, Shimizu K, Imai H, Tominaga H, Yanagitani N, Sunaga N, Hisada T, Ishizuka T, Kanai Y, Oyama T, Mori M, Endo K. Comparison of L-type amino acid transporter 1 expression and L-[3-¹⁸F]- α -methyl tyrosine uptake in outcome of non-small cell lung cancer. *Nucl Med Biol* 37: 911-916, 2010.
- ⑫ Kaira K, Oriuchi N, Yanagitani N, Sunaga N, Ishizuka T, Mori M, Endo K. Assessment of Therapy Response in Lung Cancer with Fluorine-18- α -Methyltyrosine Positron Emission Tomography. *AJR* 195: 1204-1211, 2010.
- ⑬ Miyashita G, Higuchi T, Oriuchi N, Arisaka Y, Hanaoka H, Tominaga H, Morita S, Miyakubo M, Ishikita T, Nakasone Y, Negishi A, Yokoo S, Endo K. ¹⁸F-FAMT uptake correlates with tumor proliferative activity in oral squamous cell carcinoma: comparative study with ¹⁸F-FDG PET and immunohistochemistry. *Ann Nucl Med* 24: 579-584, 2010.

[学会発表] (計1件)

- ① Oriuchi N, Kaira K, Shimizu K, et al. Clinical significance of [¹⁸F]- α -methyl tyrosine PET as a potential

surrogate marker of LAT1 expression for predicting prognosis of non-small cell lung cancer. *American Society of Clinical Oncology*. 2010.6.5., Chicago, USA

[図書] (計2件)

- ① 織内 昇. ¹⁸F-FDG、¹⁸F-FAMT PET : グルコーストランスポーター・アミノ酸トランスポーターを標的とした癌診断. 金井好克 編. トランスポートソーム - 生体膜輸送機構の全体像に迫る. 遺伝子医学 MOOK19. 株式会社 メディカルドゥ, 大阪: pp104-108, 2011.
- ② 織内 昇. 2. アミノ酸および誘導体分子プローブとそのイメージング. 米倉義春、伊藤正敏、他 編. 臨床医とコメディカルのための最新クリニカルPET. 先端医療技術研究所, 東京: pp266-269, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

織内 昇 (ORIUCHI NOBORU)

群馬大学・大学院医学系研究科・客員教授
研究者番号 : 40292586

(2) 研究分担者

富永 英之 (TOMINAGA HIDEYUKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・寄附講座
教員
研究者番号 : 393348

(3) 連携研究者

金井 好克 (KANAI YOSHIKATSU)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 60204533