

## 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 3 月 31 日現在

機関番号：22101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591372

研究課題名（和文） 放射性標識抗体によるチャンネル・トランスポーターインビボ画像診断薬の開発

研究課題名（英文）

Development of radiolabeled antibody for channel transporter imaging

研究代表者

島本 直人 (SHIMAMOTO NAOTO)

茨城県立医療大学・保健医療学部・講師

研究者番号：80295435

研究成果の概要（和文）：チャンネル・トランスポーター遺伝子は、数百あるといわれ、神経疾患やがんをはじめとする種々の疾患との関連性が指摘されているものも多い。近年、チャンネル・トランスポーターのポリクロナル抗体やモノクロナル抗体が多く開発されてきており、診断・治療に応用できる放射性標識抗体の開発が期待されている。多くの腫瘍細胞に発現するとされるアミノ酸トランスポーターLAT1 を標的にした中性アミノ酸トランスポーターイメージング剤の開発を検討した。放射性標識抗体の評価実験系として、ヒト大腸がん株化細胞DLD-1を移植した担癌マウス等とし、腫瘍組織への集積性を評価することとした。細胞については、リアルタイムPCRにより、注目する主なアミノ酸トランスポーター等およびその補助因子（4F2hc, LAT1, LAT2, LAT3, LAT4, ATA1, ATA2, ASCT1, ASCT2, MCT8, TAT1, B<sup>0</sup>AT1等）に対して既に確立した方法で発現を確認した。更に、放射性標識抗体の評価実験系として、これらDLD-1やAsPC-1を移植した担癌マウスでの蛋白レベルの発現を確認し、腫瘍組織への集積性を免疫組織化学的な解析に有用であることが確かめられているモノクロナル抗体を<sup>125</sup>I標識した放射性抗体とし評価した。用いたモノクロナル抗体は、ヒトのLAT1タンパク質のN末端近傍領域に特異的結合をする抗体であったためか、腫瘍組織切片で内在性レベルのLAT1タンパク質を検出が可能であったが、インビボでの腫瘍検出には適さなかった。

研究成果の概要（英文）：Several hundred human channel/transporter genes reportedly have connections with nervous diseases or other diseases, including cancer. In recent years, many kinds of polyclonal and/or monoclonal antibodies to channel/transporters have been developed. Using these antibodies, development of radiolabeled antibodies suitable for diagnosis and treatment has been anticipated. We planned to develop a neutral-amino-acid transporter imaging agent as a radiolabeled antibody targeting L-type amino acid transporter 1 (LAT1), which is expressed in many kinds of tumor. For the evaluation of this radiolabeled antibody, we used nude mice transplanted with cells from the DLD-1 human colorectal cancer cell line. Expressions of proteins, such as the amino acid transporter and its chaperone-like proteins (4F2hc, LAT1, LAT2, LAT3, LAT4, ATA1, ATA2, ASCT1, ASCT2, MCT8, TAT1, and B<sup>0</sup>AT1), were examined using an established method with real-time polymerase chain reaction. The new monoclonal antibody for immunohistochemical analysis was evaluated using the DLD-1 transplanted nude mice after <sup>125</sup>I-labeling. This antibody was able to detect the LAT1 protein of the internality level with tumor tissue sections in immunohistochemical analysis, but was not suitable for in vivo tumor detection, most likely because the antibody specifically associates with the N-end near-field region of the human LAT1 protein. We are planning in vivo imaging using antibody against human CD98 (4F2hc).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	36,000,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

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：放射性医薬品・造影剤

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノムの時代を迎えて、チャンネル・トランスポーターの核医学的研究領域においても分子生物学や臨床遺伝学等の分野で明らかにされつつある数々の興味深くかつ刺激的な研究結果を反映した成果が報告されるようになってきた。分子レベルでのこのような知見は、放射性医薬品と疾患との関連性について、より鮮明でかつ深いフェイズレベルでの理解を助けるものと考えられている。ところで、アミノ酸トランスポーターの特定のアイソフォームに高親和性を有する放射性医薬品は、そのアイソフォームの機能・役割を探る上で有力な探査子となる。アミノ酸輸送のうちL系は、血液脳関門や胎盤関門に関与する種々の細胞や、多くの腫瘍細胞において分岐・芳香族アミノ酸を選択的かつナトリウム非依存的に輸送する。研究協力者の金井らは、L系に属する human L-type amino acid transporter 1 (hLAT1)が血液脳関門を構成する脳の毛細血管内皮細胞に、機能発現のための補助因子 h4F2hc と共に存在することを示した。更に、リンパ球の活性化、ホルモンによる刺激などにより高度に発現が誘導され、さらに腫瘍細胞においても高発現があることから、細胞の需要に応じてアミノ酸を取り込むようにその発現が調節される誘導型のアイソフォームであることが示唆されている。

我々は、hLAT1 に特異的な放射性人工アミノ酸を応用した SPECT 用診断薬を開発することを計画し、これまで、アミノ酸輸送蛋白の当該アイソフォームに特異的な放射性人工アミノ酸を検索するために母体化合物  $^{14}\text{C}(\text{U})\text{-L-tyrosine}$  のほかに  $^{125}\text{I}\text{-4-iodo-L-meta-tyrosine}$  ( $4\text{-}^{125}\text{I}\text{-mTyr}$ ),  $^{125}\text{I}\text{-6-iodo-L-meta-tyrosine}$ ,  $^{125}\text{I}\text{-3-iodo-}\alpha\text{-methyl-L-tyrosine}$  ( $^{125}\text{I}\text{-IMT}$ ) と  $^{125}\text{I}\text{-3-iodo-L-tyrosine}$  ( $3\text{-}^{125}\text{I}\text{-Tyr}$ ) 等をデザイン・合成した。In vivo における放射性人工アミノ酸の体内動態の画像化を正常マウスと担癌マウスで行なった結果、腎臓での臓器内分布を除き  $4\text{-}^{125}\text{I}\text{-mTyr}$  が  $^{125}\text{I}\text{-IMT}$  と

類似の体内分布を示し膜輸送診断薬としての諸条件を満たしていたことから、本化合物のアミノ酸輸送系L選択性とアイソフォーム選択性について詳しく検討した。チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-K1)での集積機序と輸送系選択性を検討した結果、 $4\text{-}^{125}\text{I}\text{-mTyr}$  が特にL系への高い輸送系選択性を示した。また、天然アミノ酸L-Tyrを母体構造に持つ化合物のうち  $^{125}\text{I}\text{-IMT}$  及び  $3\text{-}^{125}\text{I}\text{-Tyr}$  に加え  $4\text{-}^{125}\text{I}\text{-mTyr}$  が腎等に発現するアイソフォームである hLAT2 よりも hLAT1 に高い選択性を有することをアフリカツメガエル卵母細胞にトランスポーターを発現させた実験系により明らかにした。一方、IMT は  $4\text{-I-mTyr}$  と異なり、マウスの腎に probenecid 感受性の高い集積性があるほか、他の有機アニオン輸送系への親和性も指摘されている。分子レベルでの基質・輸送機能相関を基礎にした放射性人工アミノ酸の開発は、我々の報告が初となった。

ヒトゲノムの検索によればチャンネル・トランスポーター遺伝子は、数百あるといわれ、神経疾患やがんをはじめとする種々の疾患との関連性が指摘されているものも多い。近年、チャンネル・トランスポーターのポリクリロナル抗体やモノクロナル抗体が多く開発されてきており、診断・治療に応用できる放射性標識抗体の開発が期待される。

2. 研究の目的

チャンネル・トランスポーターのモノクロナル抗体として、血液脳関門や胎盤関門に関与する種々の細胞や、多くの腫瘍細胞に発現するとされるアミノ酸トランスポーターをとりあげ、インビボ画像診断薬に用いる標識抗体として利用することを最終目的として担癌マウス等により評価し、放射性標識抗体を基礎的に開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)まず、リアルタイムPCRによる mRNA レベルの絶対測定で 4F2hc, LAT1, ATA1, ATA2, ASCT2 が高発現していたヒト大腸が

ん株化細胞 DLD-1 およびヒト膵臓腺癌由来細胞 AsPC-1 において、蛋白レベルの発現を確認することを目的とし、一次抗体として anti-LAT1 抗体, anti-4F2hc 抗体などによるウエスタンブロット法の確立を行った。

(2) 次に LAT1 を標的にした中性アミノ酸トランスポーターイメージング剤の開発を検討した。放射性標識抗体の評価実験系として、ヒト大腸がん株化細胞 DLD-1 を移植した担癌マウス等とし、腫瘍組織への集積性を評価することとした。細胞については、リアルタイム PCR により、注目する主なアミノ酸トランスポーター等およびその補助因子

(4F2hc, LAT1, LAT2, LAT3, LAT4, ATA1, ATA2, ASCT1, ASCT2, MCT8, TAT1, B<sup>0</sup>AT1 等) に対して既に確立した方法で発現を確認した。また、同じ実験系を用いて、いくつかのチロシン誘導体人工アミノ酸の <sup>125</sup>I-標識体との集積性の比較を行うこととした。

(3) 更に標識抗体について検討した。ヒト由来株化がん細胞 DLD-1 および AsPC-1 とも蛋白レベルの発現を培養細胞として確認したうえで、更に、放射性標識抗体の評価実験系として、これら DLD-1 や AsPC-1 を移植した担癌マウスでの蛋白レベルの発現を確認し、腫瘍組織への集積性を免疫組織化学的な解析に有用であることが確かめられているモノクロナル抗体を <sup>125</sup>I 標識した放射性抗体とし評価した。

#### 4. 研究成果

(1) DLD-1 および AsPC-1 とも蛋白レベルの発現を培養細胞として確認した。更に、放射性標識抗体の評価実験系として、これら DLD-1 や AsPC-1 を移植した担癌マウスでの蛋白レベルの発現を確認し、腫瘍組織への集積性を評価する目的に使用できることを確認した。

(2) リアルタイム PCR による絶対測定では、DLD-1 においては、4F2hc, LAT1, ATA1, ATA2, ASCT2 が高発現していた。また、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO-K1 によるアミノ酸輸送系解析から検討した数種類のチロシン誘導体人工アミノ酸のうち <sup>125</sup>I-4-iodo-meta-tyrosine がアミノ酸輸送系 L に対して高い選択性があることが明らかになった。

(3) 用いたモノクロナル抗体は、ヒトの LAT1 タンパク質の N 末端近傍領域に特異的結合をする抗体であったためか、腫瘍組織切片で内在性レベルの LAT1 タンパク質を検出が可能であったが、インビボでの腫瘍検出には適さなかった。今後、ヘテロ 2 量体のタンパク質の LAT1 と結合した CD98 (4F2) に対する抗体でのインビボイメージングの検討が期待される。

#### 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 8 件)

- ① M Kobayashi, N Shikano, R Nishii, Y Kiyono, H Araki, K Nishi, M Oh, H Okudaira, M Ogura, M Yoshimoto, H Okazawa, Y Fujibayashi, K Kawai. Comparison of the transcellular transport of FDG and D-glucose by the Kidney epithelial cell line LLC-PK1. Nucl Med Commun 31, 141-146. (2010).
- ② N Shikano, M Ogura, J Sagara, S Nakajima, M Kobayashi, T Baba, N Yamaguchi, Y Iwamura, N Kubota, K Kawai. Stimulation of <sup>125</sup>I-3-iodo-alpha-methyl-L-tyrosine uptake in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells by tyrosine esters. Nucl Med Biol 37, 189-196. (2010)
- ③ N Shikano, M Ogura, H Okudaira, S Nakajima, T Kotani, M Kobayashi, S Nakazawa, T Baba, N Yamaguchi, N Kubota, Y Iwamura, K Kawai 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)
- ④ N Shikano, T Kotani, S Nakajima, M Ogura, S Nakazawa, J Sagara, M Kobayashi, T Baba, N Yamaguchi, N Kubota, K Kawai. 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.
- ⑤ H Okudaira, N Shikano, R Nishii, T Miyagi, M Yoshimoto, M Kobayashi, K Ohe, T Nakanishi, I Tamai, M Namiki, K Kawai. Putative transport mechanism and intracellular fate of anti-18F-FACBC (trans-1-amino-3-<sup>18</sup>F-fluorocyclobutanecarboxylic acid) in human prostate cancer. J Nucl Med 2011;5, 2822-2829.
- ⑥ M Kobayashi, T Mori, Y Kiyono, T Tsujikawa, R Maruyama, Y Higaki, N Shikano, R Nishii, K Kawai, T Kudo, H Okazawa. Appropriate parameters of the ordered-subset expectation maximization algorithm on measurement of myocardial blood flow and oxygen

consumption with  $^{11}\text{C}$ -acetate PET. Nucl Med Commun 2012;33,130-138.

- ⑦ K Nishi, M Kobayashi, R Nishii, N Shikano, N Takamura, N Kuga, K Yamasaki, S Nagamachi, S Tamura, M Otagiri, K Kawai Pharmacokinetic Alteration of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3 using Serum Protein Binding Displacement Method Nucl Med Biol 40, 366-370.
- ⑧ M Kobayashi, F Hashimoto, K Ohe, T Nadamura, K Nishi, N Shikano, R Nishii, R Higashi R, H Okazawa, K Kawai Transport mechanism of  $^{11}\text{C}$ -labeled L- and D-methionine in human-derived tumor cells. Nucl Med Biol 39, 1213-1218.

[学会発表] (計 9 件)

- ① M Ogura, S Nakajima, S Nakazawa, M Kobayashi, N Shikano, K Kawai. Amino acid esters could increase the transport of artificial amino acids into cells by trans-stimulation. 2010 World Molecular Imaging Congress (京都) 2010 年 9 月
- ② T Nadamura, N Shikano, M Ogura, F Takahashi, K Ohe, M Kobayashi, K Kawai. Accumulation mechanism of 3- $^{123}\text{I}$ iodo-alpha-methyl-L-tyrosine using human colon cancer DLD-1 cells. 2010 World Molecular Imaging Congress (京都) 2010 年 9 月
- ③ K Ohe, F Takahashi, H Okudaira, S Kagawa, R Nishi, N Shikano, M Kobayashi, K Kawai. The accumulation mechanisms of *anti*-1-amino-3- $^{18}\text{F}$ fluorocyclobutane-1-carboxylic acid and gene expression patterns of amino acid transporters in human derived tumor cell lines. 2010 World Molecular Imaging Congress (京都) 2010 年 9 月
- ④ 中澤伸也 鹿野直人 小倉正人 中島修一 島山六郎 山口直人 川井恵一 ヒト由来株化肺がん細胞 SQ-5 における 3- $^{125}\text{I}$ -D-tyrosine の集積性に関する基礎的検討 第 50 回核医学会秋季大会 (大宮) 2010 年 11 月
- ⑤ 根本広文 島山六郎 鹿野直人 山口直人  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ECD を用いた脳血流量 SPECT 測定の臨床指標との関連性及び臨床の有用性について 第 50 回日本核医学会学術総会 (大宮) 2010 年 11 月
- ⑥ 小倉正人, 鹿野直人, 中島修一, 山口直人, 對間博之, 津田啓介, 小林正和, 川井恵一  
[ $^{125}\text{I}$ ]IMT 集積増大を示すチロシンエステ

ル曝露の細胞内誘導経路に関する検討  
第 51 回日本核医学学術総会 つくば  
国際会議場(つくば市) 2011 年 10 月

- ⑦ 津田啓介, 對間博之, 鹿野直人, 小倉正人, 鈴木天之, 戸矢和仁, 平山昭, 福士政広, 藤井博史: FDG PET 検査における短時間収集での至適画像再構成法の検討, 第 51 回日本核医学学術総会 つくば国際会議場(つくば市) 2011 年 10 月
- ⑧ H Okudaira, N Shikano, R Nishii, T Miyagi, M Yoshimoto, M Kobayashi, K Ohe, T Nakanishi, M Namiki, I Tamai, K Kawai Transport mechanism of trans-1-amino-3- $^{18}\text{F}$ -fluorocyclobutane carboxylic acid ( $^{18}\text{F}$ -FACBC) in human prostate cancer. International Symposium on Past, Present and Future of Molecular Pharmacokinetics (東京) 2012 年 1 月 17 日
- ⑨ E Sato, T Yamamoto, N Shikano, M Ogura, K Nakai, F Yoshida, Y Uemae, T Takada, T Isobe, A Matsumura. Intracellular boron accumulation in CHO-K1 cells using amino acid transport control, 15th International Congress on Neutron Capture Therapy, 10 to 14 September 2012 at the Tsukuba International Congress Center

[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]

ホームページ等

[http://www.ccr.gunma-u.ac.jp/4u/Seeds/2012/Ibaraki/Vol105\\_P007\\_008\\_I\\_Life\\_Shikano.pdf#search=%E9%B9%BF%E9%87%8E%E7%9B%B4%E4%BA%BA+%E3%82%A4%E3%83%A1%E3%83%BC%E3%82%B8%E3%83%B3%E3%82%B0](http://www.ccr.gunma-u.ac.jp/4u/Seeds/2012/Ibaraki/Vol105_P007_008_I_Life_Shikano.pdf#search=%E9%B9%BF%E9%87%8E%E7%9B%B4%E4%BA%BA+%E3%82%A4%E3%83%A1%E3%83%BC%E3%82%B8%E3%83%B3%E3%82%B0)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鹿野(島本) 直人 (茨城県立医療大学・保健医療学部・講師)

研究者番号 : 80295435

(2) 連携研究者

上原知也 (千葉大学・薬学研究院・准教授)

研究者番号 : 10323403