

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860988

研究課題名(和文) 癌関連アミノ酸トランスポーターsystem ASC・N特異的腫瘍診断用薬剤の開発

研究課題名(英文) Development of new radiopharmaceuticals targeting amino acid transporter system ASC, and system N

研究代表者

西 弘大(NISHI, Kodai)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：10719496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：System ASC、system Nに親和性を示すアミノ酸を探索し、輸送体の寄与を簡便な計算で算出するスクリーニング系を開発し、system NがL-ヒスチジンの輸送に関与することを発見した。L-ヒスチジンはsystem Nを標的とした腫瘍診断用放射性薬剤の母体化合物として有望であると判断し、L-ヒスチジン誘導体に放射性ヨウ素を標識した化合物の精製を試みた。その結果、高純度の¹²⁵I-iodo-L-Histidine(125I-IH)の精製に成功した。125I-IHはその大部分がsystem Lによって細胞内に輸送されるものの、腫瘍細胞の種類によっては15%程度の寄与が確認された。

研究成果の概要(英文)：The aim of study is development of new radiopharmaceutical targeting amino acid transporter system ASC, and system N. Our research group discovered that system N transports the L-histidine(L-His) using our original screening system. We tried iodine labeling for L-His because L-His was evaluated with promising results as base compound of new radiopharmaceutical targeting system N. As a result, high purity ¹²⁵I-iodo-L-His(125I-IH) was defecated. According to experiment results, most of 125I-IH was transported into the cells by system L, however system N contributed 15% to transportation of 125I-IH in several tumor cell lines.

研究分野：放射性医薬品学

キーワード：アミノ酸トランスポーター System N ヒスチジン ヨウ素標識

1. 研究開始当初の背景

^{18}F -FDG による positron emission tomography (PET)検査は、悪性腫瘍をはじめ、虚血性心疾患やてんかんなどの疾患の診断に有用であるが、腫瘍診断薬としてのいくつかの問題点も指摘されている。

FDG は D-グルコース誘導体としてエネルギー生産の盛んな腫瘍に高集積を示すものの、同様にエネルギー代謝活性の高い脳や心臓などの正常組織にも生理的に集積する。また、腎尿管管腔側の再吸収トランスポーターに対する親和性が失われているために尿排泄性が高く投与後早期から膀胱に移行するため、これらの正常集積を示す組織やその周辺に存在する腫瘍の画像化に支障を来すことが報告されている。

さらに FDG は炎症組織にも集積があり、癌診断において腫瘍と炎症集積との鑑別が困難になる場合がある。

しかしながら、医療用院内サイクロトロンを有する一部の診療施設を除けば、診療に使用できる PET 用放射性医薬品は、現状では唯一 ^{18}F -FDG のみである。したがって、PET 検査のさらなる充実には、上記の ^{18}F -FDG の問題点を補う PET 製剤、あるいは ^{18}F -FDG とは異なった集積機序を有し、新たな診断情報をもたらすポスト FDG 腫瘍診断薬の開発は極めて重要である。

腫瘍組織ではグルコース代謝のみならずアミノ酸代謝も亢進しており、天然のアミノ酸の利用率も高いことが古くから知られていたが、タンパク合成には利用されない人工アミノ酸も同様に腫瘍に高集積を示す。これはタンパク合成の原料であるアミノ酸を輸送するアミノ酸トランスポーターが、増殖の盛んな腫瘍細胞で高発現しているためである。

上記の理由から、ポスト FDG 腫瘍診断薬の開発においてアミノ酸トランスポーター機能を診断指標とすることが有効であること、そしてそのポスト FDG 腫瘍診断薬として、代謝の影響を受けない人工アミノ酸の応用が有望であることが考えられる。

2. 研究の目的

腫瘍細胞に高発現する癌関連トランスポーターである system ASC および中でも近年注目され始めた system N には特異的な阻害剤が開発されていないため、その正確な輸送寄与などが評価困難であり、アミノ酸を母体化合物とする新規腫瘍診断薬を開発する上でこれらの評価は必須となる。

本研究では system ASC および system N に着目し、これらの輸送系の特異的な阻害剤および評価方法の探索のための系統的なスクリーニング系を作成する。またこのスクリーニング系を評価法として応用し、特異的な阻害剤を探索すると同時に、既存・新規薬剤の system ASC と system N の輸送寄与率を評価する。さらに、阻害剤の構造・骨格を基に、

FDG では判定が困難な腫瘍の検出を可能とする system ASC および system N 特異的な腫瘍診断薬の開発を目的とする。

3. 研究の方法

多種類の腫瘍細胞株とマイクロアレイを用いて行ってきた網羅的な遺伝子発現解析より、腫瘍細胞で高発現が認められた癌関連アミノ酸トランスポーターである system ASC と system N に着目し研究を進めた。System ASC および system N の輸送機構および寄与解明に必要な不可欠である特異的な阻害剤を探索するためのスクリーニング系を作成し、探索された阻害剤を用いて system ASC・system N の輸送・制御機構の詳細な解析を行った。

また system ASC・system N に親和性を示す標識母体アミノ酸を探索し、ポスト FDG 製剤の候補として細胞集積や代謝安定性・集積量とトランスポーター発現量の相関関係など、臨床応用も考慮に入れた詳細な検討や評価を行った。さらに、阻害剤の構造や骨格を基に、放射性ヨウ素標識などの技術を応用しながら system N に特異的な癌分子標的診断薬の開発を目指した。

4. 研究成果

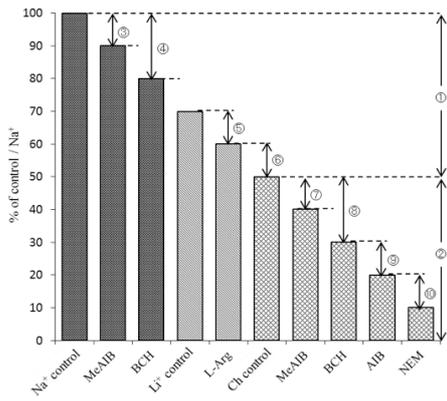
(1) アミノ酸輸送系の新規寄与評価法の考案

トランスポーターの輸送機構および寄与率を調べるためのスクリーニング系を開発した。従来までは、 Na^+ 依存性輸送系であるとともに Li^+ 依存性輸送系である system N・system y^+L を区別して評価することができず、 Li^+ control の値から Ch control の値を差し引くことで system N・system y^+L を評価していた。

本法では、新たに system N と system y^+L を区別して評価を行うため system y^+L の高親和性基質である L-Arginine (L-Arg)を使用した。L-Arg は、system $\text{B}^{0,+}$ ・system y^+L ・system $\text{b}^{0,+}$ ・system y^+ を阻害し、 Li^+ 存在下では system y^+L のみ阻害される。system N と system y^+L を区別した評価を行うため、まず Li^+ control の値から L-Arg 負荷時の集積率を差し引くことで system y^+L が算出できる。次に L-Arg (Li^+ 存在下)負荷時の集積率の値から Ch control の値を差し引くことで system N 単独での算出が可能となる (Fig.1)。

(2) ^{125}I -iodo-L-Histidine(^{125}I -L-IH)の標識

^{125}I -L-IH は Fig.2 に示す反応経路により調整した。L-His の ^{125}I 標識は chloramine-T を酸化剤として用いる直接酸化法により行った。 ^{125}I 標識した ^{125}I -L-IH の分析は、シリカゲル薄層クロマトグラフィーで行い、オートウェル γ カウンタを用いて ^{125}I -L-IH の標識率を評価した。



輸送系	算出方法(式)
Na ⁺ 依存性輸送系	①
A	③-⑦
IMINO	③-⑦
B ^{0,+}	④-⑧
B ⁰	④-⑧
y ⁺ L	⑤
N	⑥
ASC	① - ((③-⑦) + (④-⑧) + ⑤ + ⑥)
GLY, β, X _{CG}	① - ((③-⑦) + (④-⑧) + ⑤ + ⑥)
Na ⁺ 非依存性輸送系	②
PAT	⑦
L	⑧
asc	⑨
y ⁺	⑩
X _c	② - (⑦+⑧+⑨+⑩)
T, y ⁺ L, b ^{0,+}	② - (⑦+⑧+⑨+⑩)

Fig.1 特異的阻害剤を用いたアミノ酸輸送系寄与評価法

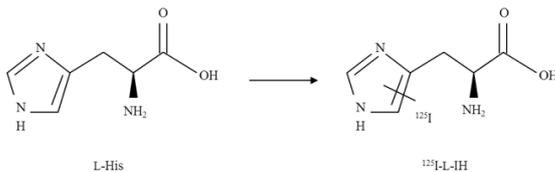


Fig. 2 ¹²⁵I-L-IH の反応経路

TLCにより分析したRf値は¹²⁵I-L-IH:0.5~0.6、¹²⁵I:0.9~1.0であった。また、Fig.2より標識反応時間を变化させたところ15分で定常状態に達した。その際の標識率は、約80%であった。

標識反応により得られた¹²⁵I-L-IHはHPLCにより精製・分取した。保持時間は¹²⁵Iは3~4分、¹²⁵I-L-IHは8~10分であった。¹²⁵I-L-IHの放射化学的純度は98.6%以上と高い値であった。また、精製した画分にアミノ酸が含有していることを確認するためninhydrin反応により検討したところ青紫色に変化した。

(3) ¹²⁵I-L-IHのがん細胞集積と輸送機序

本検討では、標識アミノ酸(³H-L-His、³H-L-Met、¹²⁵I-L-IH)を用いて脳腫瘍細胞(T98G・A172・Hs683・SW1088)における細胞内集積実験を行った。

Fig.3には、各標識アミノ酸の各脳腫瘍細胞における集積量の経時変化を細胞ごとに示した。4種類の細胞における標識アミノ酸の集積量を比較すると¹²⁵I-L-IHが投与後早期に最も集積量が最も大きく、³H-L-His、³H-L-Metの順となった。¹²⁵I-L-IHは、集積

量が時間経過に伴い急激に上昇し、T98GとA172は投与後2分でHs683は5分、SW1088は10分でほぼ最大値を示し、その後速やかに排泄された。³H-L-Hisと³H-L-Metは、集積量が時間経過に伴い緩やかに上昇し、³H-L-Hisは投与後15分、³H-L-Metは投与後30分で最大値となり、その後ほぼ一定となった。

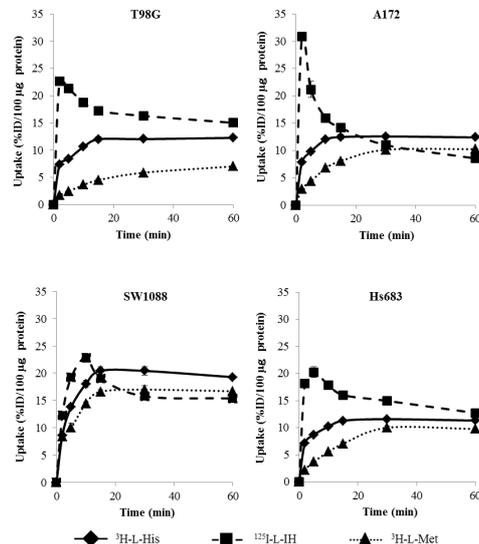


Fig. 3 腫瘍細胞における標識アミノ酸集積量の経時変化

Fig.4~6には脳腫瘍細胞における³H-L-His、³H-L-Met、¹²⁵I-L-IHの競合阻害実験の阻害効果を示し、いずれもNa⁺存在下におけるcontrolの集積率を100%として表した。

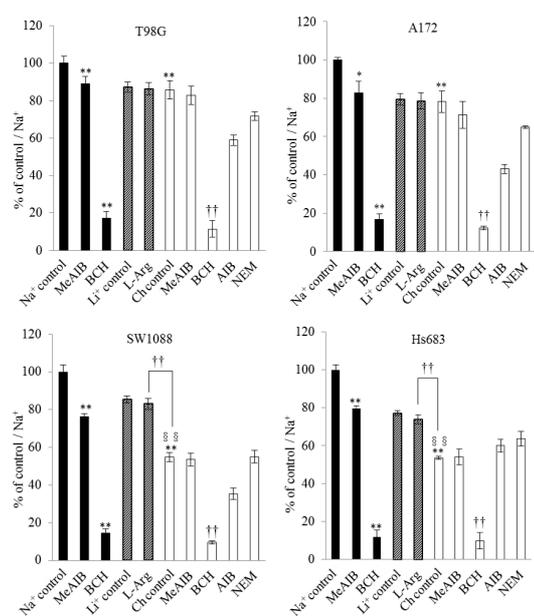


Fig.4 ³H-L-Hisの集積阻害効果

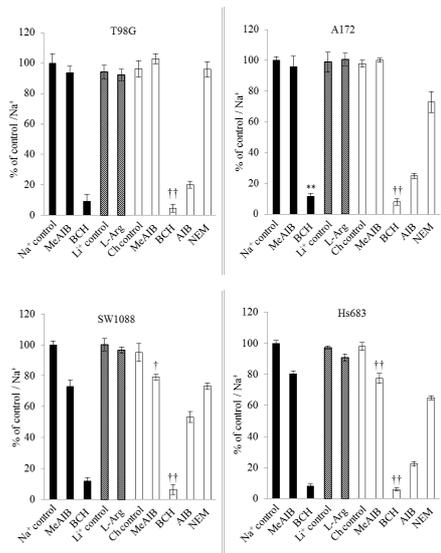


Fig.5 ¹²⁵I-L-IH の集積阻害効果

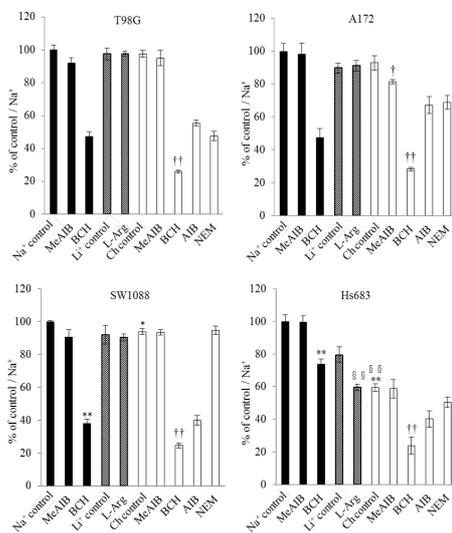


Fig.5 ³H-L-Met の集積阻害効果

標識アミノ酸の輸送系寄与に関して、³H-L-His は、高悪性度脳腫瘍細胞では認められない system N の寄与が低悪性度脳腫瘍細胞において認められた。一方、¹²⁵I-L-IH と ³H-L-Met の腫瘍内への集積には、system N の寄与は見られなかった。

さらに ³H-L-Met は、system L に高い親和性を示すことが既に報告されており、今回の結果からも system L の寄与率は 35~75% と高い値であった。しかし、¹²⁵I-L-IH の system L の寄与率は、72~91% と ³H-L-Met よりも高かったことから、¹²⁵I-L-IH は system L に特異的な腫瘍イメージング薬剤としての可能性が示された。

また、¹²⁵I-L-IH が system L に特異的になった理由として、L-His をヨウ素標識した結果、嵩高い側鎖のアミノ酸を輸送する system L が優位になったためであると考えられた。

以上より、³H-L-His では、高悪性度脳腫瘍細胞では見出されなかった system N の寄与

が低悪性度脳腫瘍細胞において明らかとなったことから L-His を基本骨格とした癌関連アミノ酸輸送系 system N をターゲットとする新たな腫瘍イメージング薬剤の開発の可能性が見出された。

また、高い代謝安定性を有することによって膜輸送機構のみを反映する ¹²⁵I-L-IH に関しては、system L に特異的であり、投与後早期において高悪性度脳腫瘍細胞の方が低悪性度脳腫瘍細胞よりも集積量が多く、悪性度の違いによる細胞内への集積量が異なったことから、¹²⁵I-L-IH は悪性度判定が可能な新規アミノ酸腫瘍イメージング薬剤であることが示された。

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 1 件)

- ① Kobayashi M, Mizutani A, Nishi K, Nakajima S, Shikano N, Nishii R, Fukuchi K, Kawai K. Difference in accumulation and the transport mechanism of L- and D-methionine in high- and low-grade human glioma cells. Nucl Med Biol, 14(44):78-82; 2016
査読あり

[学会発表] (計 3 件)

- ① 稲川耕平、丹羽隆博、西 弘大、小林正和、川井 恵一：脳腫瘍細胞における D-methionine の集積生と集積機序の検討。2016 年 11 月 5 日 第 56 回日本核医学会学術総会、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
- ② 丹羽隆博、坂下真俊、西 弘大、小林正和、鹿野直人、川井 恵一：L-Histidine 誘導体の癌関連アミノ酸トランスポーターを標的とする脳腫瘍診断薬としての評価。2014 年 11 月 8 日 第 54 回日本核医学学術総会、大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)
- ③ 丹羽隆博、坂下真俊、西 弘大、鈴木修斗、小林正和、鹿野直人、川井 恵一：標識 L-Histidine の癌関連アミノ酸トランスポーターを標的とする脳腫瘍イメージング薬剤としての評価。2014 年 9 月 21 日 第 13 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォラム 2014 富山国際会議場 (富山県・富山市)

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況（計 0 件）
なし

〔その他〕
ホームページ公開準備中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 弘大 (NISHI, Kodai)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教
研究者番号：10719496

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小林 正和 (KOBAYASHI, Masato)
金沢大学・健康増進科学センター・助教
研究者番号：30444235

(4) 研究協力者

丹羽 隆博 (NIWA, Takahiro)
稲川 耕平 (INAGAWA, Kohei)