

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15452

研究課題名(和文) 癌関連トランスポーター発現解析に基づく機能性分子発現系による腫瘍診断薬の開発戦略

研究課題名(英文) Development strategy of tumor diagnostic agent by system upregulated functional biomolecule based on expression analysis of tumor associated transporter

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

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、ヒト腫瘍培養細胞で高発現を確認した機能性分子安定発現系を画像診断薬のスクリーニングに利用して、ポストFDG 製剤の有力候補である標識アミノ酸製剤のアミノ酸トランスポーター及び薬物トランスポーターに対する親和性を詳細に検討し、アミノ酸トランスポーター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)：In this study, while searching this research for the functional biomolecule used by the database for the gene expression level in the human cultured cells for evaluation of imaging probes, as well as human tumor culturing cells in a stable functional molecule was confirmed with high expression by using the expression system for the screening of imaging agents, the labeled 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 imaging agents.

研究分野：放射性薬品学

キーワード：ヒト培養細胞 遺伝子発現解析 機能性分子安定発現系 画像診断薬 ポストFDG 製剤 アミノ酸トランスポーター 薬物トランスポーター 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 検査が保険適用され腫瘍診断の検査数が急増している一方で FDG の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特異的に高集積する 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、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有するとともに、高い代謝安定性と速やかな尿中排泄性を示す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ー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)]。標識アミノ酸の体内動態は、アミノ酸トランスポーターアイソフォームに対する選択性により変化する[J Nucl Med 44:244-246 (2003)]ため、腫瘍細胞での高発現を確認したアミノ酸トランスポーター system L に特異的親和性を示すヨウ素標識アミノ酸を提案した[Nucl Med Biol 34:1003-1008 (2007), 37:903-910 (2010)]。さらに、ポスト FDG 製剤の最有力候補である <sup>18</sup>F-FACBC の癌細胞集積に関与するアミノ酸トランスポーター発現との相関や炎症間の相異を比較検討した[前立腺癌: J Nucl Med 52:822-829 (2011), Nucl Med Biol 40:670-675 (2013), 脳腫瘍: Brain Res 1535:24-37 (2013), 炎症との比較: Mol Imaging Biol 16:322-329 (2014)]。これらの経験から実測に基づく腫瘍細胞における癌関連アミノ酸トランスポーター発現亢進を利用し、腫瘍細胞への高い集積性と速やかな尿中排泄性を併せ持つことで、FDG-PET では検出が困難な腫瘍の診断に有用なポスト FDG 腫瘍診断薬開発戦略の構築が可能であると考え挑戦的萌芽研究として申請した。

## 2. 研究の目的

本研究は、優れたポスト FDG 腫瘍診断薬開発を目指し、確かな根拠と系統的な診断薬開発戦略の構築を目的として、薬剤開発に用いられているヒト培養癌細胞で高発現を示すアミノ酸トランスポーターなどの癌関連トランスポーターの遺伝子発現レベルを解析し、予め癌細胞に高発現していることを確認した機能性分子安定発現系を分子プローブのスクリーニング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標識アミノ酸製剤に着目して、腫瘍で特異的に高発現が認められる癌関連アミノ酸トランスポーターや細胞外排出及び腎尿細管分泌に関与する薬物トランスポーターに対する親和性を、それらの機能性分子強制発現細胞への集積性及び集積機序から評価す

ることにより、腫瘍細胞集積性・滞留性と速やかな尿中排泄性を併せ持つ分子標的腫瘍診断薬開発を試みるとともに、その開発戦略の妥当性を検証する。

## 3. 研究の方法

本課題研究では、ポスト FDG の候補化合物として、腫瘍細胞で特異的に高発現している癌関連アミノ酸トランスポーターなどの腫瘍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、生体内代謝安定性を示す PET 用標識人工アミノ酸の開発を試みる。また、臨床応用性を考慮し、尿排泄性、代謝安定性などを具備する既に開発され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ーの発現量と各アイソフォームに対する親和性を安定発現系(細胞ノベシクル)を用いて解析し、新たな人工アミノ酸ドラッグデザインの基盤を構築する。

本研究課題の基盤となる標的機能性分子の遺伝子発現レベル解析に関しては、既に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及びリアルタイム PCR (qPCR)による中性アミノ酸トランスポーター遺伝子の定量解析を実施してきた。本研究では、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解析し、癌細胞での高発現を確認したトランスポーターの安定発現系(強制発現細胞ノベシクル)を分子プローブのスクリーニングに応用し、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ーに親和性を示す標識アミノ酸をポスト FDG 製剤の有力候補として選択する。

一方、申請者は放射性フッ素標識に関して、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、各培養癌細胞に特異的に発現が亢進している癌関連トランスポーター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、リアルタイム PCR (qPCR)による標的分子に関する特定遺伝子発現量の定量解析も実施し、腫瘍細胞集積性との相関から、その診断薬開発戦略の妥当性を検証する。

## 4. 研究成果

ヒト腫瘍細胞におけるトランスポーターなどの機能性分子の発現を網羅的に観察するため、アジレント社製 DNA チップを用いて細胞集積実験に用いられる 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、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。また、リファレンス RNA の遺伝子発現量を用いて標準化し、これまでのヒト腫瘍細胞における遺伝子発現解析結果のデータベースを構築することにより、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。さらに、癌で高発現すると報告されている主要な癌関連アミノ酸トランスポーター発現量に関しては、リアルタイム PCR (qPCR)による絶対定量系を確立した。これらのトランスポーター遺伝子発現量と細胞集積性との比較検討のモデルとして、このデータベースを利用してアミノ酸トランスポーターの発現レベルと悪性度が異なるヒト腫瘍培養細胞を選択し、既に臨床使用されている  $^{11}\text{C}$ -L-Met とその光学異性体  $^{11}\text{C}$ -D-Met の細胞集積機序を検討した結果、L-体はアミノ酸輸送系 system L、D-体では system ASC の寄与も大きく、qPCR により絶対定量したアミノ酸トランスポーター発現量は細胞集積率と良い相関を示した(雑誌論文: 3))。

また、ポスト FDG 製剤の最有力候補である  $^{18}\text{F}$ -FACBC の前立腺癌細胞への集積に關与を確認したアミノ酸トランスポーターについて、単一発現細胞を作成し集積阻害を実施してきた。その結果、前立腺癌細胞で高発現を示した  $\text{Na}^+$ 依存性アミノ酸トランスポーターである ASCT2 と SNAT2 の中でも、FACBC は ASCT2 に高い親和性を示した。また  $\text{Na}^+$ 非依存性アミノ酸トランスポーターである LAT1 も取込みに一部寄与することが判明した(*Nucl. Med. Biol.*, **40**: 670-675 (2013))。加えて  $^{18}\text{F}$ -FACBC の癌細胞への集積に關与するアミノ酸トランスポーターの薬剤誘導発現量との相関や細胞・炎症間の相異を報告した(脳腫瘍: *Brain Res.*, **1535**: 24-37 (2013), 炎症との比較: *Mol. Imaging Biol.*, **16**: 322-329 (2014), アンドロゲン誘導前立腺癌: 雑誌論文: 7))。さらに、新たに臨床使用が開始された  $\alpha$ -[N-methyl- $^{11}\text{C}$ ]-methyl-aminoisobutyric acid ( $^{11}\text{C}$ -MeAIB) の腫瘍細胞集積機序とアミノ酸トランスポーター発現量との相関を報告した(雑誌論文: 1))。

一方、薬剤の胆汁排泄に關与する排泄型薬物トランスポーターによる排泄機序解明のモデル化合物として、肝胆道系診断薬として臨床使用されている  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PMT の胆汁排泄に關与する薬物トランスポーターを特定するために、ABC トランスポーターの単一発現ベシクルを用いて親和性を評価した結果、P-glycoprotein (P-gp:MDR1)及び MRP2 の關与による輸送が明らかとなった(*Nucl. Med. Biol.*, **41**: 338-342 (2014))。加えて、上記アミノ酸 PET 製剤  $^{18}\text{F}$ -FACBC の腎排泄に關与するアミノ酸トランスポーター及び薬物トランスポーターへの親和性を報告した(雑誌論文: 4))。

## 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 13 件)

- 1) Kagawa S., Nishii R., Higashi T., Yamauchi H., Ogawa E., Okudaira H., Kobayashi M., Yoshimoto M., Shikano N., Kawai K.: Relationship between [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB Uptake and Amino Acid Transporter Family Gene Expression Levels or Proliferative Activity in a Pilot Study in Human Carcinoma Cells: Comparison with [ $^3\text{H}$ ]Methionine Uptake. *Nucl. Med. Biol.*, **49**: 8-15, 2017 (reviewed).
- 2) Matsuura Y., Yamashita A., Zhao Y., Iwakiri T., Yamasaki K., Sugita C., Koshimoto C., Kitamura K., Kawai K., Tamaki N., Zhao S., Kuge Y., Asada Y.: Altered Glucose Metabolism and Hypoxic Response in Alloxan-induced Diabetic Atherosclerosis in Rabbits. *PLoS One*, **12**: e0175976, DOI: 10.1371/journal.pone.0175976, 2017 (reviewed).
- 3) 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.*, **44**: 78-82, 2017 (reviewed).
- 4) Ono M., Baden A., Okudaira H., Kobayashi M., Kawai K., Oka S., Yoshimura H.: Assessment of Amino Acid/Drug Transporters for Renal Transport of [ $^{18}\text{F}$ ]Fluciclovine (*anti*-[ $^{18}\text{F}$ ]FACBC) *in vitro*. *Int. J. Mol. Sci.*, **17**: 1730, 2016 (reviewed).
- 5) Kobayashi M., Matsunari I., Nishi K., Mizutani A., Miyazaki Y., Ogai K., Sugama J., Shiba K., Kawai K., Kinuya S.: Simultaneous Acquisition of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - and  $^{123}\text{I}$ -labeled Radiotracers using a Preclinical SPECT Scanner with CZT Detectors. *Ann. Nucl. Med.*, **30**: 263-271, 2016 (reviewed).
- 6) Ogata K., Takamura N., Tokunaga J., Ikeda T., Setoguchi N., Tada K., Yamasaki T., Nishio T., Kawai K.: A Novel Injection Strategy of Flurbiprofen-axetil by Inhibiting Protein Binding with 6-Methoxy-2-naphthylacetic Acid. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacok.*, **41**: 179-186, 2016 (reviewed).
- 7) Ono M., Oka S., Okudaira H., Nakanishi T., Mizokami A., Kobayashi M., Schuster D.M., Goodman M.M., Shirakami Y., Kawai K.: [ $^{14}\text{C}$ ]Fluciclovine (alias *anti*-[ $^{14}\text{C}$ ]FACBC) Uptake and ASCT2 Expression in Castration-resistant Prostate Cancer Cells. *Nucl. Med. Biol.*, **42**: 887-892, 2015 (reviewed).
- 8) Kobayashi M., Mori T., Tsujikawa T., Ogai K., Sugama J., Kiyono Y., Kawai K., Okazawa H.: Comparison of Image Quality with  $^{62}\text{Cu}$  and  $^{64}\text{Cu}$ -labeled Radiotracers in Positron Emission Tomography Whole-body Phantom Imaging. *Hell. J. Nucl. Med.*, **18**: 103-107, 2015 (reviewed).
- 9) Kobayashi M., Nishii R., Shikano N., Flores II L.G., Mizutani A., Ogai K., Sugama J., Nagamachi

- S., Kawai K.: Development of Radioiodine-labeled 4-Hydroxyphenylcysteamine for Specific Diagnosis of Malignant Melanoma. *Nucl. Med. Biol.*, **42**: 536-540, 2015 (reviewed).
- 10) Mizutani A., Matsunari I., Kobayashi M., Nishi K., Fujita W., Miyazaki Y., Nekolla S.G., Kawai K.: Impact of Injection Dose, Post-reconstruction Filtering, and Collimator Choice on Image Quality of Myocardial Perfusion SPECT using Cadmium-zinc Telluride Detectors in the Rat. *EJNMMI Physics*, **2**: 7, DOI: 10.1186/s40658-015-0111-6, 2015 (reviewed).
  - 11) Ogura M., Shikano N., Nakajima S., Sagara J., Yamaguchi N., Kusanagi K., Okui Y., Mizutani A., Kobayashi M., Kawai K.: A Strategy for Improving FDG Accumulation for Early Detection of Metastasis from Primary Pancreatic Cancer: Stimulation of the Warburg Effect in AsPC-1 Cells. *Nucl. Med. Biol.*, **42**: 475-481, 2015 (reviewed).
  - 12) Taguchi K., Chuang V.T., Yamasaki K., Urata Y., Tanaka R., Anraku M., Seo H., Kawai K., Maruyama T., Komatsu T., Otagiri M.: Cross-linked Human Serum Albumin Dimer has the Potential for Use as a Plasma-retaining Agent for the Fatty Acid-conjugated Antidiabetic Drugs. *J. Pharm. Pharmacol.*, **67**: 255-263, 2015 (reviewed).
  - 13) Nishi K., Mizutani A., Shikano N., Fujita K., Kobayashi M., Ono M., Nishii R., Sasaki Y., Kinuya S., Kawai K.: In Vivo Radioactive Metabolite Analysis for Individualized Medicine: A Basic Study of a New Method of CYP Activity Assay using  $^{123}\text{I}$ -IMP. *Nucl. Med. Biol.*, **42**: 171-176, 2015 (reviewed).
- [学会発表] (国際学会 計 10 件)
- 1) Kobayashi M., Ohe K., Nadamura T., Nishi K., Higashi T., Okudaira H., Shikano N., Nishii R., Kawai K.: Accumulation difference and transport mechanism of  $^{11}\text{C}$ -labeled L- and D-methionine in low and high grade tumor cells. The Society of Nuclear Medicine 63th Annual Meeting, Jun. 11-15, 2016, San Diego (U.S.A.).
  - 2) Yamasaki K., Yamashita A., Zhao Y., Shimizu Y., Kawai K., Tamaki N., Zhao S., Asada Y., Kuge Y.: Metabolic aspects of  $^{14}\text{C}$ acetate in rabbit atherosclerotic arteries at different feeding conditions: In vitro evaluation for atherosclerosis imaging with  $^{11}\text{C}$ acetate. The Society of Nuclear Medicine 63th Annual Meeting, Jun. 11-15, 2016, San Diego (U.S.A.).
  - 3) Ono M., Okudaira H., Oka S., Nakanishi T., Mizokami A., Kobayashi M., Yoshimura H., Kawai K.: Transport mechanism and androgen-stimulated uptake of the amino acid PET tracer  $^{18}\text{F}$ fluciclovine (*anti*- $^{18}\text{F}$  FACBC) in primary and castration-resistant prostate cancer cells. 9th Japan-China Joint Seminar on Radiopharmaceutical Chemistry, Nov. 8, 2015, Chiba (Japan).
  - 4) Mizutani A., Matsunari I., Kobayashi M., Nishi K., Fujita W., Nekolla S.G., Kawai K., Fukuchi K.: Phase analysis using ECG-gated myocardial FDG PET in the rat in comparison with speckle tracking echocardiography. 28th Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, Oct. 10-14, 2015, Hamburg (Germany).
  - 5) Kagawa S., Mizuma H., Nishii R., Higashi T., Yamauchi H., Ono M., Tateishi H., Takahashi K., Onoe H., Kawai K.: Development of benzyl  $^{18}\text{F}$ fluoroacetate radiosynthesis for PET imaging of ischemic brain injury. World Molecular Imaging Congress 2015, Sep. 2, 2015, Honolulu (U.S.A.).
  - 6) Kobayashi M., Mori T., Tsujikawa T., Mizutani A., Kiyono Y., Okazawa H., Kawai K.: Comparison of image quality with  $^{62}\text{Cu}$  and  $^{64}\text{Cu}$ -radiotracers in whole body tumor imaging. World Molecular Imaging Congress 2015, Sep. 5, 2015, Honolulu (U.S.A.).
  - 7) Mizutani A., Kobayashi M., Matsunari I., Nishi K., Miyazaki Y., Kawai K.: Quantitative simultaneous acquisition of dual tracer using  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  and  $^{123}\text{I}$ -labeled radiotracers in preclinical SPECT scanner with CZT detector. World Molecular Imaging Congress 2015, Sep. 5, 2015, Honolulu (U.S.A.).
  - 8) Ono M., Okudaira H., Oka S., Nakanishi T., Mizokami A., Kobayashi M., Schuster D.M., Goodman M.M., Yoshimura H., Kawai K.: Transport mechanism and androgen-stimulated uptake of amino acid PET tracer  $^{18}\text{F}$ fluciclovine (*anti*- $^{18}\text{F}$  FACBC) in primary and castration-resistant prostate cancer cells. 9th International BioMedical Transporters Conference, Aug. 10, 2015, Lugano (Switzerland).
  - 9) Nishii R., Kagawa S., Higashi T., Yamauchi H., Kimura H., Kawai K., Nagamachi S., Ono M., Sugiyama Y., Saji H.:  $^{18}\text{F}$ PTV-F1 PET for OATP transporter imaging of the liver. -Preclinical and phase I clinical study. The Society of Nuclear Medicine 62th Annual Meeting, Jun. 6-10, 2015, Baltimore (U.S.A.).
  - 10) Kagawa S., Nishii R., Higashi T., Yamauchi H., Kawai K., Kimura H., Ono M., Sugiyama Y., Saji H.: Radiosynthesis of  $^{18}\text{F}$ PTV-F1, pitavastatin (HMG-CoA reductase inhibitor) derivative for organic anion transporter imaging of liver. The Society of Nuclear Medicine 62th Annual Meeting, Jun. 6-10, 2015, Baltimore (U.S.A.).
- [図書] (計 3 件)
- 1) 川井恵一: 通商産業研究社, 「放射線関係法規概説 -医療分野も含めて-」 (第7版). 2017, 全 242 頁.
  - 2) 川井恵一, 松原孝祐: 通商産業研究社, 放射線双書「放射線安全管理学」(改々題第2版). 2017, 全 222 頁.

3) 川井恵一, 他 15 名: 南江堂, 「新放射化学・放射性医薬品学」(改訂第 4 版). 佐治英郎・前田 稔・小島周二編集, 2016, 全 335 頁, 担当 pp.152-158, 291-299.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 心臓疾患診断剤、心臓疾患診断用組合せ医薬及び心臓疾患診断用キット

発明者: 川井恵一, 小林正和, 加奈川 優

権利者: 金沢大学・日本メジフィジックス株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2016-7541

出願年月日: 平成 28 年 1 月 19 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 2 件)

名称: 薬物代謝機能測定方法

発明者: 川井恵一, 藤田健一

権利者: 金沢大学

種類: 特許

番号: 特許第 6024939 号

取得年月日: 平成 28 年 10 月 21 日

国内外の別: 国内

名称: 分子イメージングにより代謝機能を測定するための検査薬

発明者: 川井恵一, 玉井郁巳, 国嶋崇隆, 中西猛夫, 小林正和

権利者: 金沢大学

種類: 特許

番号: 特許第 6124273 号

取得年月日: 平成 29 年 4 月 14 日

国内外の別: 国内

〔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://ridb.kanazawa-u.ac.jp/public/detail.php?id=2789&page=1&search=1&keyword=%E5%B7%9D%E4%BA%95&andor=AND&tgt1=1&tgt2=&tgt3=&tgt4=>

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

中西 猛夫 (NAKANISHI, Takeo)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号: 30541742

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

### (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

岡沢 秀彦 (OKAZAWA, Hidehiko)

福井大学・高エネルギー医学研究センター・

教授

研究者番号: 50360813