

細胞分裂中におけるFDG集積とGa集積の変化

小豆島正典、高橋徳明、堤 玲子^{*1}、寺崎一典^{*2}
佐藤成大^{*1}、坂巻公男

岩手医科大学歯学部歯科放射線学講座

^{*1} 岩手医科大学医学部細菌学講座

^{*2} 岩手医科大学サイクロトンセンター

020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

1. はじめに

悪性腫瘍患者に対する放射線療法や化学療法の治療効果の判定は、主としてCT (computed tomography)やMRI (magnetic resonance imaging), US (ultrasonography)によって画像化される形態的变化に基づいて行われてきた。しかし治療後の腫瘍組織には、線維組織や壊死組織、障害を受けた癌細胞などが含まれ、残存する組織が常に増殖可能な癌細胞集団とは限らないという治療上の問題があった。それに対し、核医学診断法では、従来より腫瘍親和性薬剤として ^{67}Ga -citrate (Ga)が用いられ、SPECT (single photon emission tomography)を用いることにより腫瘍の機能的な断層画像診断が得られる。一方、最近、グルコース類似薬であるFDG (^{18}F -2-deoxy-2-fluoro-D-glucose)を用いたPET (positron emission tomography)が開発され、腫瘍診断に臨床応用されている。Minnら¹⁾は、頭頸部の扁平上皮癌で成長の早い腫瘍には遅い腫瘍よりも多くのFDGが取り込まれることを報告し、FDG集積が細胞周期依存性であることを示唆している。本研究では、これら腫瘍トレーサーの集積メカニズムをさらに詳細に検討するため、ヒト子宮頸癌由来のHeLa細胞を用い、Ga集積とFDG集積の細胞周期依存性を詳細に調べた。

2. 材料と方法

2.1 培養細胞と細胞同調法

培養癌細胞としてヒト子宮頸癌由来のHeLa S3 (RCB0191, 理化学研究所)を用いた。培養液は10% fetal calf serum (FCS)を添加したEagle's minimal essential medium (MEM)を用い、5%CO₂・37℃の条件下で培

養を行った。培養容器には Nunc (USA)社製組織培養フラスコ (容量 50 ml , 培養面積 25 cm²)を用いた。培養細胞数は細胞同調が完了した時点で 1×10^6 個となることを目標に調整した。細胞同調法は, Knehr ら²⁾の方法による高濃度 thymidine (TdR)によるダブルプロッキング法にて行った。同調処理が終了した直後を 0 時間として以後 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 時間経過後にそれぞれの培養フラスコを 4℃ に急冷保存し RI 投与実験にそなえた。

2.2 FDG と Ga の投与

Ga は第一ラジオアイソトープ研究所製を用い, 培地 1 ml あたり 74 kBq (2 μ Ci)目標に投与した。FDG は, 仁科記念サイクロトロンセンター (NMCC) で合成し, 各ステージに同調された細胞を含む培養フラスコに対し, 培地 1 ml あたり 370 kBq (10 μ Ci)を目標に投与した。また, 細胞は RI 存在下で 37℃ 30 分間の培養を行った後, trypsin で細胞を浮遊させ, 5% FCS 0.1% グルコース添加 PBS (phosphate buffered saline) で 3 回洗浄した。細胞内に取り込まれた FDG あるいは Ga の放射能は, ガンマーカウンターを使用して計測した。その後血球計測板で細胞数を測定し, 単位細胞数あたりに集積した RI 量を求めた。

2.3 FCM による DNA 量の測定

細胞同調の確認および相対的 DNA 量の測定と DNA 合成能の測定には, FCM を用いた。細胞核 DNA 量を測定するために 2% Triton X-100 に細胞を浮遊させ裸核した。その後 RNase (最終濃度 0.5%)を添加後 propidium iodide (PI) (最終濃度 50 μ g/ml)で DNA を染色, 細胞数を 1×10^6 個に調整し DNA 量を測定した。また TdR 類似体の BrdU (bromodeoxyuridine)を用いて, DNA 合成能を調べた。培養フラスコには BrdU (最終濃度 10 μ M) を投与し, 37℃ で 30 分細胞培養した。細胞を trypsin で浮遊させた後 70%冷エタノールにて 1 時間固定した。PBS にて洗浄後, 4N 塩酸にて 20 分間処理し二重鎖 DNA の単鎖化を行った。ホウ酸・ホウ砂緩衝液で塩酸を中和化し PBS で洗浄, 細胞数を 1×10^6 個に調整し anti BrdU-FITC を加えた。さらに PI (最終濃度 5 μ g/ml)にて細胞核 DNA を染色し, FCM にて測定した。

3 . 結 果

3.1 細胞周期と FCM

細胞核 DNA 量と S 期に取り込まれる BrdU 量を FCM によって分析し, 本実験で用いた TdR ダブルプロッキング法による細胞同調が, 正しく行われているか否かを確認するとともに, 同調処理終了後からの経過時間と細胞周期との関係を調べた。その結果、同調処理終了直後の 0 時間には, ヒストグラムのピークは 2N よりわずかに 4N よりに移動しており S 期前期に同調されていた。その後 2 時間 7 時間と経過するに従いそのピークは G2/M 期である 4N に移動, さらに 12 時間経過後には, G1 期である 2N に移動することが明らかになった。一方、anti BrdU-FITC と PI による BrdU/DNA 二重染色の FCM により、同調処理終了直後を 0 時間とすると、0 時間における BrdU を取り込んだ細胞は 10^6 個中 73%であった。さらに 2 時間後には 90%と最大の取り込みを示した。その後 BrdU 集積量は減少に転じ, 7 時間後は 9%, 12 時間後には 5%に低下した。

3.2 Ga 集積と細胞周期

Fig. 1 に Ga 集積と各細胞周期との関係を示す。横軸には同調処理が終了してからの経過時間、縦軸には Ga 集積量と細胞数を最大 100%とした相対値でプロットした。Ga 集積は 4 時間後から上昇に転じ、8 時間後には最大に達した。その後急峻に減少に転じ、10 時間後にはピーク時の約 40%まで低下した。FCM 所見および細胞数変化から Ga 集積のピークは、G2/M 期であり、S 期と G1 期では Ga 集積が低下することが示された。

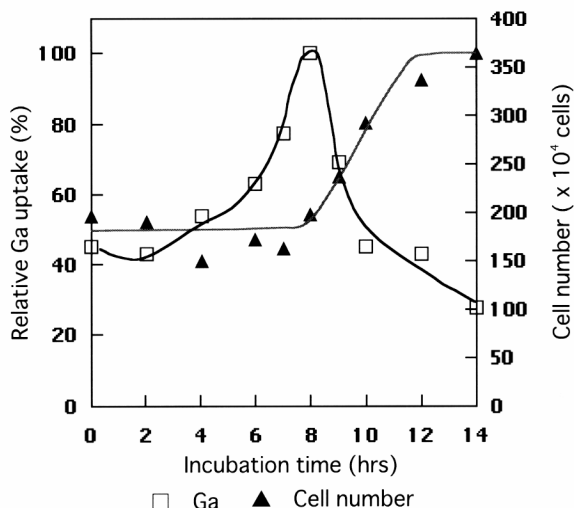


Fig. 1 培養時間とGa 集積・細胞数の変化

3.3 FDG 集積と細胞周期

FDG 集積は、同調処理終了直後と 7 時間後にピークを持ち、その後、次第に減少し、同調処理終了直後の約 40%まで減少した。DNA 合成の指標である BrdU 集積のピークは 2 時間後であり、その後急峻に低下し 8 時間後以降の集積は数%となった。このことから、細胞集団は同調処理直後にはすでに S 期に入っており、2 時間後にピークに達し約 6 時間後には S 期から G2 期へ移行することが示された。また 7 時間後の FDG 集積の 2 番目のピークは、BrdU 集積および FCM 所見より G2/M 期と思われた。細胞数は同調処理が終了してから一定であったが、9 時間経過後から上昇に転じ、12 時間後には細胞数が 2 倍になった。このことから、多くの細胞は 9 時間経過後から分裂を開始し、12 時間後には分裂が完了して G1 期に入ったことが示された。

4. 考 察

Ga は古くから腫瘍親和性薬剤として用いられてきた。Ga SPECT は PET と比較し空間分解能と感度という点で劣るが、多くの施設で簡便に行うことが可能で、腫瘍の治療効果判定や、再発巣の検出および悪性度の推定に用いられてきた。Ga 集積と FDG 集積の特性を知ることは、SPECT と PET を検査目的によって使い分ける際、極めて重要であろう。Ga は、FDG と同様に増殖の盛んな腫瘍細胞や、未分化な腫瘍細胞に多く集積するとされている³⁾。その際 Ga は、癌細胞の transferrin receptor (CD71) に結合し細胞内に取り込まれる⁴⁾。Chitambar ら⁵⁾は CD71 の発現が DNA 合成期の鉄イオン需要の増大によると報告している。また、Van Leeuwen-Stok ら⁶⁾は、リンパ腫細胞株 (U-937, U-715) を同調させ、Ga 集積と CD71 の発現との関係を調べた。その結果、両者は細胞周期に依存し S 期と G2/M 期で増大するが、特に G2/M 期で最大となることを示している。今回の研究では、CD71 の発現に関する実験を行わなかったが、Ga 集積については G2/M 期で最大となり S 期は G1 期と同程度に低かった。我々の成績は、Van Leeuwen-Stok らの成績と多少異なっていたが、G2/M 期で集積が最大となる点で一致している。

Minn ら⁷⁾は頭頸部癌の FDG-PET において、FDG 集積が組織学的悪性度に依存せず、腫瘍の分裂能に依存しており、腫瘍細胞が S 期と G2/M 期にある割合が多い組織では FDG の強い集積として描出されることを報告し

ている。これらの所見は G0 期あるいは G1 期にある細胞には、FDG が集積しにくいことを示すものである。本研究では、培養細胞を G1 期から M 期まで連続的に細胞を同調させ FDG 集積との関係を調べた。その結果、FDG は、S 期前半と G2/M 期によく集積するが、G1 期では急激に集積低下がおこることがわかり、Minn らの成績を *in vitro* で証明する結果となった。腫瘍の増殖速度と FDG 集積に関し、いくつかの報告⁸⁻¹⁰⁾がある。それらによると、FDG 集積は、増殖速度が低い腫瘍より高い腫瘍で高値を示し、腫瘍悪性度の良い指標になるということが示されている。今回の成績から、これは腫瘍組織中の S 期前半と G2/M 期にある細胞の割合が反映したものと推測される。

Ga や FDG を用いて得られる核医学画像には、これら腫瘍トレーサーの細胞周期依存性が反映されているほかに、腫瘍組織中の腫瘍実質/間質比も反映されていると推測される。両者のうち、どちらの影響が大きいかわかり不明であり、今後の検討課題である。

5 . 文 献

- 1) Minn, H., Clavo, A. C., Grenman, R. and Wahl, R. L. : In vitro comparison of cell proliferation kinetics and uptake of tritiated fluorodeoxyglucose and L-methionine in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *J. Nucl. Med.* 36 : 252-258, 1995.
- 2) Knehr, M., Poppe, M., Enulescu, M., Eickelbaum, W., Stoehr, M., Schroeter, D. and Paweletz, N. : A critical appraisal of synchronization methods applied to achieve maximal enrichment of HeLa cells in specific cell cycle phases. *Exp. Cell Res.* 217 : 546-553, 1995.
- 3) Bichel, P. and Hansen, H. H. : The incorporation of ⁶⁷Ga in normal and malignant cells and its dependence on growth rate. *Br. J. Radiol.* 45 : 182-184, 1972.
- 4) Harris, A. W. and Sephton, R. G. : Transferrin promotion of ⁶⁷Ga and ⁵⁹Fe uptake by cultured mouse myeloma cells. *Cancer Res.* 37 : 3634-3638, 1977.
- 5) Chitambar, C. R., Matthaeus, W. G., Antholine, W. E., Graff, K. and O'Brien, W. J. : Inhibition of leukemic HL60 cell growth by transferrin-gallium: effects on ribonucleotide reductase and demonstration of drug synergy with hydroxyurea. *Blood.* 72 : 1930-1936, 1988.
- 6) Van Leeuwen-Stok, E. A., Jonkhoff, A. R., Visser-Platier, A. W., Drager, L. M., Teule, G. J., Huijgens, P. C. and Schuurhuis, G. J. : Cell cycle dependency of ⁶⁷gallium uptake and cytotoxicity in human cell lines of hematological malignancies. *Leuke. Lymphoma.* 31 : 533-544, 1998.
- 7) Minn, H., Joensuu, H., Ahonen, A. and Klemi, P. : Fluorodeoxyglucose imaging: a method to assess the proliferative activity of human cancer in vivo. Comparison with DNA flow cytometry in head and neck tumors. *Cancer.* 61 : 1776-1781, 1988.
- 8) Kubota, R., Kubota, K., Yamada, S., Tada, M., Takahashi, T., Iwata, R. and Tamahashi N. : Methionine uptake by

tumor tissue: a microautoradiographic comparison with FDG. *J. Nucl. Med.* 36 : 484-492, 1995.

9) Kubota, R., Kubota, K., Yamada, S., Tada, M., Ido, T. and Tamahashi, N. : Microautoradiographic study for the differentiation of intratumoral macrophages, granulation tissues and cancer cells by the dynamics of fluorine-18-fluorodeoxyglucose uptake. *J. Nucl. Med.* 35 : 104-112, 1994.

10) Ohira, H., Kubota, K., Ohuchi, N., Harada, Y., Fukuda, H. and Satomi, S. : Comparison of intratumoral distribution of ^{99m}Tc-MIBI and deoxyglucose in mouse breast cancer models. *J. Nucl. Med.* 41 : 1561-1568, 2000.