

細胞分裂過程におけるFDGと¹⁴C-methionineの集積特性

小豆島 正典、守口 斉、堤 玲子¹⁾、寺崎 一典²⁾、泉澤 充³⁾
佐藤 成大¹⁾、坂巻 公男¹⁾

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ロンセンター

020-8505 岩手県盛岡市内丸19-1

1. はじめに

グルコース類似薬である¹⁸F-fluorodeoxyglucose(FDG)は、腫瘍のPET診断に広く用いられている。FDGは、グルコースの代わりに腫瘍細胞に取り込まれ、HexokinaseによりFDG-6-P₀となるが、それ以上代謝されず細胞内に蓄積する¹⁾。FDGは種々の悪性組織型に集積するが、PETを利用することにより腫瘍の局在の精査や、ステージング、腫瘍の残存の診断に利用されている。扁平上皮癌を主体とする頭頸部癌においても、FDG-PETの有用性が報告²⁾されているが、特に再発症例においては、CT/MRIよりも診断能力が高いとされている。しかしながら実際に口腔領域でFDG PETを行うと、同じ扁平上皮癌でもRI集積量の示標であるSUV (standardized uptake value)が大きく異なることを経験する。以前、我々は、腫瘍組織の中の腫瘍細胞密度が、SUVに大きく反映されていることを報告した。それに対しHaberkornら³⁾は頭頸部癌において、細胞分裂頻度の高い腫瘍ではFDG集積が増大することを報告しており、腫瘍細胞自身の分裂特性もSUVに反映されていることが示唆されている。

本研究では、細胞分裂過程におけるFDG集積特性を調べることを目的に、単純な系である培養細胞を同調させてFDG集積を調べた他、従来からPET用腫瘍トレーサーとして使用されてきた¹⁴C-methionineとを比較検討した。

2. 材料および方法

2.1 細胞同調法

ヒト子宮頸部癌由来の培養細胞HeLa S3 (RCB0191, 理化学研究所)を用い、細胞同調を行った。培養容器は容量50 ml, 培養面積25 cm²の組織培養フラスコ (Nunc, USA)を用いた。同調は高濃度 thymidine (TdR)によるダブルブロッキング法によって行った。2 mM TdR を含むMEM培地にて24時間培養後、TdR-free培地にて11時間培養、さらに2 mM TdR を含む培地にて14時間培養し、2回目のブロッキングを行った。その後TdR-free培地に交換した。それぞれの培養細胞は決められた時間培養した後、4℃にて保管した。

2.2 RI投与と放射能測定

FDGと¹⁴C-methionine (Met)はNMCC(仁科記念サイクロトロンセンター)で合成し、培地1 mlあたり0.01 mCiを目標に投与し、37℃の温水中で30分間インキュベーションした。その後トリプシンにて細胞を浮遊させ、2%FCS添加PBSで2回洗浄し、ガンマカウンターで細胞に取り込まれたRI量を測定した。その後細胞数

を計測し単位細胞数あたりに取り込まれるRI量を求めた。

2.3 DNA量の測定

細胞周期の同調確認および DNA 合成能の分析のために、フローサイトメトリー (FCM)、(FACS Calibur, Becton Dickinson, USA) を用いた。DNA 染色には Cycle TEST PLUS DNA Reagent kit (フジサワ、東京) を用い Propidium Iodide (PI) にて核染色体を染色した。FCM で測定する細胞数は、 0.5×10^6 /ml とした。FCM から得られたデータはシステムに付属の Cell Quest にて分析し、DNA ヒストグラムを得た。

2.4 グルコース輸送蛋白の標識

細胞膜表面に発現するグルコース輸送蛋白(glucose transporter: Glut)と細胞周期との関連を調べるため、Glut 1の蛍光色素抗体 anti Glut 1-FITCを用いた。G1期とS期にある同調細胞を10%ホルマリンで15分間固定後、anti Glut 1-FITCを4 で40分間作用させた。3%FCS添加PBSで2回洗浄後、FCMにてGlut 1の発現を解析した。

3. 結果

3.1 同調Hela細胞に対するFDGとMetの集積

各細胞周期に対するFDGとMetの集積、および細胞数の変化をFig.1に示す。横軸は培養経過時間を示して

おり、同調処理が終了し培養液をTdR free MEMに戻した時を0時間とした。左縦軸は単位細胞数あたりのRIカウント数の相対値を示し、RIが最大に取り込まれたカウント数を100%としている。右縦軸は細胞数を示す。FCMによる分析と細胞数の変化から、同調処理が終了した時点で細胞はすでにS期初期に入っており、7時間後にはG2/M期となり10時間後にはG1に入って細胞数が2倍になることがわかった。Fig.1に示すように、FDG集積は0時間と7時間経過後にピークをもち、G1期になると急激に集積量が30%まで低下することがわかった。それに対し、Met集積は6時間後にピークに達しG1期になると約40%まで低下することがわかった。Fig.2には、FDG集積の2つのピーク時におけるDNAヒストグラム(Fig.2a,b)、及びMet集積のピーク時におけるDNAヒストグラム(Fig.2c)を示した。横軸はDNA量、縦軸は細胞数を示しており、2NはG1期 4NはG2/M期、その間はS期の細胞集団であることを表わす。これらのFCM像から、FDG集積の2つのピークはS期初期とG2/M期であることがわかった。またMetのピークはG2/M期であることが確認された。

3.2 細胞周期とGlut 1の発現

一般にグルコースが細胞内に入る時には、膜表面にグルコース輸送蛋白(Glut)が発現していると言われてる。Glutにはいくつかのサブタイプがあるが、本研究では一番良く発現するとされているGlut 1について調べた。Fig.3はanti Glut 1-FITCで標識したFCM像である。横軸には anti Glut 1-FITCの発現量を対数でプロットし、縦軸には細胞数を示した。S期とG1期とを比較したところ、Glut 1の発現はG1期よりS期の方が高いこと

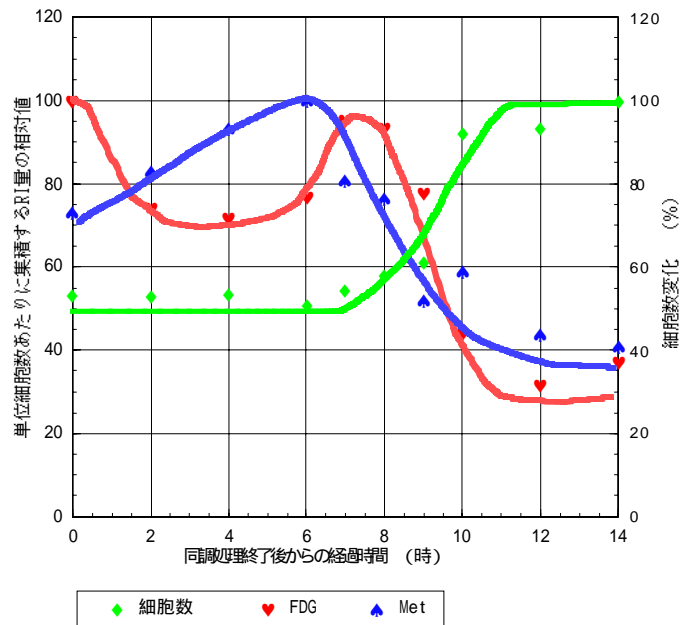


Fig. 1 同調細胞におけるFDGとMet、細胞数変化

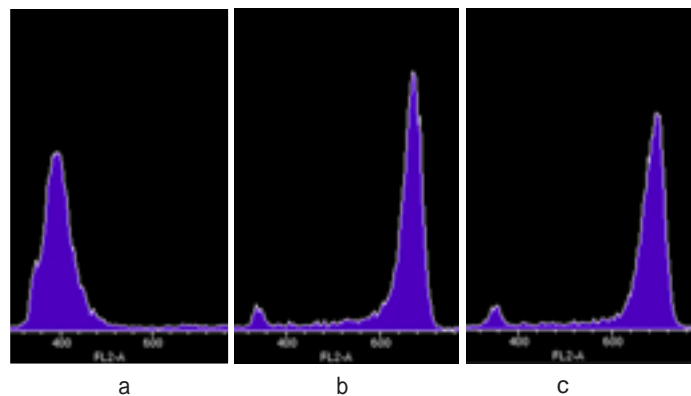


Fig. 2 R 集積のピーク時におけるFCM
aは同調処理後0時間、bは7時間後、cは6時間後を示す。

がわかり、FDG集積が上昇するS期にはGlut 1の発現も上昇することがわかった。

4. 考 察

PET用腫瘍トレーサーとして、FDGとMetは良く知られた放射性薬剤であるが、臨床的には化学的半減期の長さから、FDGの使用頻度が高い。しかしながら、FDGはmacrophageやgranulation tissueに集積しやすいことから、Metよりfalse positive rateが大きいという報告²⁰⁾もある。これらの放射性薬剤が腫瘍トレーサーとして用いられる理由は、腫瘍細胞自体の特性によるものである。固形腫瘍組織では、細胞の急速な発育や新陳代謝の亢進により低酸素状態にある細胞が多い。これらの細胞では、無酸素的におこる解糖系によって、エネルギー源としてのATPが産生されており、グルコースのアナログであるFDGが細胞内にトラップされる²¹⁾。これに対し、ヒトの必須アミノ酸であるMetは、腫瘍細胞での急速な蛋白合成やRNA合成のため、L-amino acid transporterを介して細胞内に入り、トラップされる²²⁾。したがってこれらの腫瘍トレーサーの集積には、無秩序に分裂を繰り返す腫瘍細胞自体の特性が反映されていると思われる。

ヒト正常細胞は、ほとんどが静止期(G0期)にあって増殖を停止しているが、増殖刺激が加えられると増殖を開始する。この時、細胞はG0期から細胞分裂周期に入りG1期(間期1)、S期(DNA合成期)、G2(間期2)、M期(分裂期)と進みG1期に戻る。今回研究に用いたHeLa細胞の細胞周期は広く知られており、S期9時間、G2とM期を合わせた(G2/M期)期間は3時間²³⁾とされている。Minnら²⁴⁾は頭頸部癌において、FDG集積は腫瘍の分裂能に依存しており、細胞がS期あるいはG2/M期にある割合が多い程、PET像から得られるSUVも高値を示すことを報告している。このことは、G0期とG1期の細胞にはFDGが集積しにくいことを示唆するものである。本研究では、培養細胞の細胞周期をS期からG1期まで連続的に変化させ、FDG集積量との関係を分析した。その結果、FDG集積量はS期初期とG2/M期に多く、G1期には低下することがわかり、Minnらの報告をin vitroで実証する結果となった。Metに関して、Kubotaら²⁵⁾は、腫瘍細胞の分裂能が高いとMet集積も高いことをin vitroで調べている。われわれの研究では、MetはG2/M期で取り込まれやすいことがわかった。細胞分裂指数は、(S期+G2期+M期)/(G0期+G1期+S期+G2期+M期)×100%で表される。FDGとMetは、S期からM期にある細胞に集積し、G1期では集積量が低下することから、これらの腫瘍トレーサーを使用したPETでは、細胞分裂指数が反映されたSUVが得られていると推測される。

グルコースが細胞内に入る時には、細胞膜の表面にグルコース輸送蛋白(Glut)が発現するとされている。膜表面におけるGlut発現が、細胞周期によって変化するかどうかということは、非常に興味深い。今回の研究ではGlut 1の発現について調べた。その結果、FDGが集積しやすいS期には、膜表面上にGlut 1が発現し、G1期に至ると低下することがわかった。したがって、FDGは細胞周期に依存したGlut 1の活性化により細胞内に移行することが示唆される。

Inoueら²⁶⁾は、腫瘍組織に対するMetとFDG集積とを比較した。それによるとMet集積量とFDGのそれとは良く相関しており、画像診断上のsensitivityもほぼ同一であった。本研究では各細胞周期における最大集積量と最小集積量の比は、両腫瘍トレーサーとも類似しており、細胞周期依存性は同程度と思われた。これらの集積特性が、sensitivityの類似性に反映されたと思われる。したがってDNA合成期であるS期に選択的に集積と言われている¹⁴⁾C-thymidineであれば、さらに強い細胞周期依存性を示すだろう。肺癌では化学療法に対する腫瘍反応は、FDGよりも¹⁴⁾C-thymidineを用いたPETの方が早期に描出できることが報告²⁷⁾されている。これは¹⁴⁾C-thymidine集積の細胞周期依存性がFDGより強いことが反映されたものと思われる。

頭頸部癌におけるFDG-PET像と組織像とを比較した我々の研究では、SUVが腫瘍組織の細胞間質比に依存

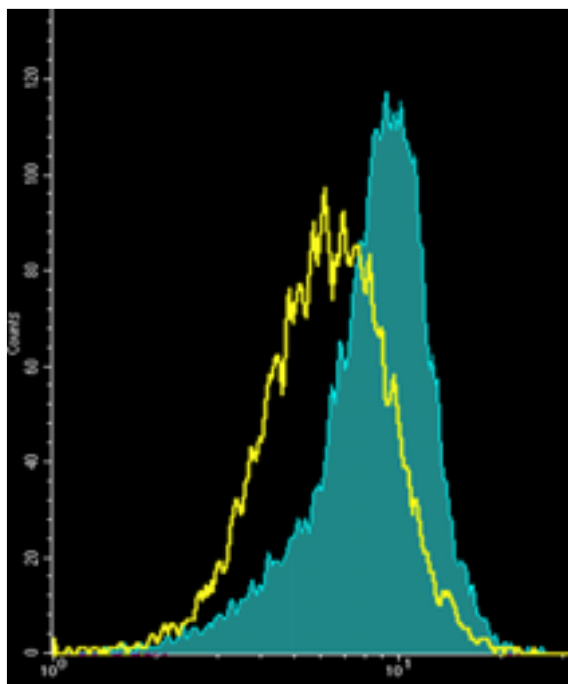


Fig. 3 S期とG期でのGlut 1の発現
横軸はGlut 1の発現量、縦軸は細胞数を示す。青のラインはS期、黄のラインはG期

し、細胞成分の少ない組織ではSUVも低値を示すことがわかっている。今回の研究から、FDGあるいはMetを使用して得られたPET像では、腫瘍細胞の分裂指数と腫瘍組織の細胞間質比の両者が反映された像が得られていると推測される。今後新しい腫瘍トレーサーの開発が予想されるが、PETの画像診断には、腫瘍細胞の集積特性の十分なる理解が必要と思われる。

5 文 献

- 1) Gallagher BM. Fowler JS. Gutterson NI. MacGregor RR. Wan CN. Wolf AP., Metabolic trapping as a principle of radiopharmaceutical design: some factors responsible for the biodistribution of ^{18}F -2-deoxy-2-fluoro-D-glucose; [18F] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose., *Journal of Nuclear Medicine*. 19(10):1154-61, 1978
- 2) Lonneux M. Lavson G. Ide C. Bausart R. Remacle M. Pauwels S., Positron emission tomography with fluorodeoxyglucose for suspected head and neck tumor recurrence in the symptomatic patient, *Laryngoscope*. 110(9):1493-7, 2000
- 3) Jungehulsing M. Scheidhauer K. Damm M. Pietrzyk U. Eckel H. Schicha H. Stennert E., ^{18}F -fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography is a sensitive tool for the detection of occult primary cancer (carcinoma of unknown primary syndrome) with head and neck lymph node manifestation, *Otolaryngology - Head & Neck Surgery*. 123(3):294-301, 2000
- 4) Love VJ. Boyd JH. Dunphy FR. Kim H. Dunleavy T. Collins BT. Martin D. Stack BC Jr. Hollenbeak C. Fletcher JW., Surveillance for recurrent head and neck cancer using positron emission tomography, *Journal of Clinical Oncology*. 18(3):651-8, 2000
- 5) Haberkorn U. Strauss LG. Reisser C. Haag D. Dimitrakopoulou A. Ziegler S. Oberdorfer F. Rudat V. van Kaick G., Glucose uptake, perfusion, and cell proliferation in head and neck tumors: relation of positron emission tomography to flowcytometry, *Journal of Nuclear Medicine*. 32(8):1548-55, 1991
- 6) Lindholm P. Leskinen S. Lapela M., Carbon-11-methionine uptake in squamous cell head and neck cancer, *Journal of Nuclear Medicine*. 39(8):1393-7, 1998
- 7) Brown RS. Leung JY. Kison PV. Zasadny KR. Flint A. Wahl RL., Glucose transporters and FDG uptake in untreated primary human non-small cell lung cancer, *Journal of Nuclear Medicine*. 40(4):556-65, 1999
- 8) Hoffman RM., Unbalanced transmethylation and the perturbation of the differentiated state leading to cancer, *Bioessays*. 12(4):163-6, 1990
- 9) Cao G. Liu LM. Cleary SF., Modified method of mammalian cell synchronization improves yield and degree of synchronization, *Experimental Cell Research*. 193(2):405-10, 1991
- 10) Minn H. Joensuu H. Ahonen A. Klemi P., Fluorodeoxyglucose imaging: a method to assess the proliferative activity of human cancer in vivo. Comparison with DNA flowcytometry in head and neck tumors, *Cancer*. 61(9):1776-81, 1988
- 11) Kubota R. Kubota K. Yamada S. Tada M. Takahashi T. Ivata R. Tamahashi N., Methionine uptake

by tumor tissue: a microautoradiographic comparison with FDG, Journal of Nuclear Medicine. 36(3):484-92, 1995

12) Inoue T. Kim EE. Wong FC. Yang DJ. Bassa P. Wong WH. Korkmaz M. Tansey W. Hicks K. Podoloff DA., Comparison of fluorine-18-fluorodeoxyglucose and carbon-11-methionine PET in detection of malignant tumors, Journal of Nuclear Medicine. 37(9):1472-6, 1996

13) Shields AF. Mankoff DA. Link JM. Graham MM. Eary JF. Kozava SM. Zheng M. Leveilen B. Leveilen TK. Grierson JR. Krohn KA., Carbon-11-thymidine and FDG to measure therapy response, Journal of Nuclear Medicine. 39(10):1757-62, 1998