

## [<sup>11</sup>C]コリンの腫瘍集積機序に関する基礎的検討： ホスファチジルコリン生合成酵素の遺伝子発現

寺崎一典<sup>1)</sup>，岩田 錬<sup>2)</sup>，藤岡知昭<sup>3)</sup>，小豆島正典<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>岩手医科大学サイクロトロンセンター

〒020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

<sup>2)</sup>東北大学サイクロトロン RIセンター核薬学研究部

〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 01

<sup>3)</sup>岩手医科大学医学部泌尿器科学講座

〒020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

<sup>4)</sup>岩手医科大学歯科放射線学講座

〒020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

### 1 はじめに

[<sup>11</sup>C]コリンは PET 用腫瘍検出薬剤として開発されて以来，多くの臨床的有益性が示されてきた。例えば，FDG では識別が困難とされる脳腫瘍や骨盤部周辺の腫瘍等に対しても有効であるなど多岐の報告がある<sup>1)2)3)</sup>。

コリンは生体内で重要な役割を果たす生体内成分，ホスファチジルコリン(PC)などのリン脂質，メチル基給与体のベタイン，神経伝達物質のアセチルコリンなどの合成材料である。コリンから PC に至る経路(CDP-コリンまたは Kennedy 経路と呼ばれる)には，3つの合成酵素が関与する(Fig.1)。Choline kinase(CK)は CDP-コリン経路の最初のステップを触媒する酵素であり，リン酸化によってホスホコリンが生成する<sup>4)</sup>。CTP:phosphocholine cytidyltransferase(CCT)は CDP-コリン経路の律速酵素と考えられており，この酵素の活性調節に関して多くの研究がなされてきた<sup>5)</sup>。一方，Choline phosphotransferase(CPT)については酵素の精製も未だ成功していない<sup>6)</sup>。

[<sup>11</sup>C]コリンの腫瘍集積機序に関しては，細胞増殖が盛んな腫瘍の細胞膜リン脂質(主にホスファチジルコリン)の前駆物質として取り込まれると考えられているが，明確な結論を得るには至っていない。腫瘍におけるコリン集積と代謝物に関する報告としては，Magnetic Resonance Spectroscopy(MRS)および NMR によって，正常組織のコリン代謝物は低レベルであるのに対して，多くの腫瘍で高濃度のホスホコリンとして存在するのが示されている<sup>7)8)</sup>。また，腫瘍細胞や腫瘍組織の CK および CCT タンパク質，遺伝子レベルでの解析についての報告が散見するが<sup>9)10)</sup>，[<sup>11</sup>C]コリン集積との関連を考察する報告はほとんど見あたらない。しかし，PET 臨床利用における診断的意義，精度および効率を高めるためには，そのメカニズムを解明することは避けて通ることができない。本研究では，動物腫瘍モデルを作成して，腫瘍組織におけるホスファチジルコリン生合成酵素，特に，CK および CCT の遺伝子発現に焦点を絞り，[<sup>11</sup>C]コリン集積との関連性について検討した。

## 2 材料および方法

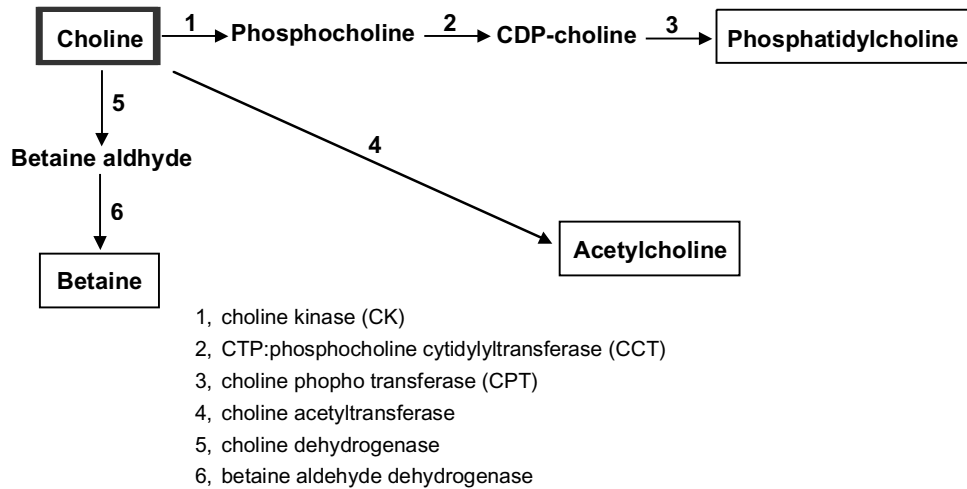


Fig.1 The three major metabolic pathways of choline

### 2.1 動物および腫瘍の作成

実験動物は10-12週齢、体重20g前後の雌性BALB/cマウス（日本クレア）を用いた。腫瘍細胞はBALB/cマウス腎被膜下で継代維持しているマウス腎腺癌株Renca（Dr. R.H. Wiltroutより恵与）を使用し、ネブタール麻酔下で左側腹部を切開し、腎被膜下にRenca細胞を $5 \times 10^5$ 細胞/0.04mlを移植し、腫瘍モデルを作成した。移植後14および25日目に腫瘍（Renca腫瘍）を摘出し、以下の実験に使用した。

### 2.2 Total RNAの調製

Renca腫瘍およびRenca細胞を移植したマウスの腎臓と肝臓、未処理の腎臓および肝臓80-100mgに対してtotal RNA抽出キット（RNeasy, Qiagen）を用いてtotal RNAを得た。

### 2.3 RT-PCR

PCRのプライマーは、Choline Kinase (CK)では内田ら<sup>11)</sup>の報告により、5'-ACTGGAGCAGTTTATCCC-3（センス）および5'-ACCAAGCTTCTCTTCTG-3（アンチセンス）を用いた。CTP:phosphocholine cytidyltransferase (CCT)のプライマーは、Rat liver mRNA CCTのposition 125-829に一致する領域、5'-AGCGGCCTGTGAGAGTTTAT-3（センス）5'-ACCTTTCCCTCTTTCAGCA-3（アンチセンス）を用いた。CKおよびCCTの想定されるPCR産物はそれぞれ757bpと704bpである。PCRのコントロールとして用いたGlyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)のプライマーは、5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3（センス）と5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3（アンチセンス）とした。これによって得られるPCR産物は450bpである。Reverse transcriptase (RT)反応は1gのtotal RNA, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (SuperScript・RT, GIBCO/BRL)を含む28μlの反応液中で、42°C、50分間反応を行った。PCRはcDNA (RT反応液)を1μlと0.2Mのプライマー、200μMのdeoxynucleotides-5-triphosphate、および1.5mM MgCl<sub>2</sub>を含む25μlの反応液で行った。サーマルサイクラー (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems)の条件は、95°C、5分間熱変性した後、95°Cを30秒間、55°Cを30秒間、および72°C、1分間を1サイクルとして、30サイクル試行し、最後に72°Cの追加伸長反応を行った。得られたPCR産物1μlを1%アガロースゲルにて電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色して解析を行った。

## 2.4 cDNA プローブの作成と Northern blot 法

各組織から抽出した 10 g の total RNA を 2.2M ホルムアルデヒド/MOPS PH7.0 を含む 1% アガロースゲルで電気泳動した後、ナイロンフィルター (Hybond-N+ , Amersham) にトランスファーし、UV クロスリンクをした。CK および CCT cDNA プローブは、得られた RT-PCR 産物を pGEM-T Easy Vector (Promega) に挿入し、サブクローニングした後、BigDye Terminator (Applied Biosystems) で蛍光標識によって塩基配列を決定し (ABI PRISM 377 DNA Sequencer) , DNA 断片を得た。次に、[<sup>32</sup>P]deoxycytidine-5 -triphosphate (Redivue, Amersham) を用い、ランダムプライム法 (Rediprime DNA Labelling System, Amersham) によって標識した後、Sephadex G-50 スピカラム (Pharmacia) で精製し、RI 標識プローブとした。

ハイブリダイゼーションは、プレミックスハイブリダイゼーション液 (ExpressHyb , Clontech) 中に cDNA 標識プローブを 10<sup>5</sup>cpm/ml になるように加え、68°C で 1 時間、振とうさせた。その後 2×SSC にてリンスし、最終的に 0.1×SSC (1% SDS を含む) 中 68°C のストリジェンシーで洗浄を行った。オートラジオグラフィは X 線フィルム (Hyperfilm MP, Amersham) にコンタクトし、-80°C で 2 日間露光させた。mRNA 発現量の解析は Image Gauge (Fujifilm) を用いて行った。

## 3 結果

### 3.1 Renca 腫瘍

腎被膜下移植後 14 日、24 日目の腫瘍重量は、それぞれ平均 4.2g と 5.3g だった。肉眼的には腫瘍周辺部に転移を認めなかった。

### 3.2 PCR 法による CK および CCT mRNA の発現の解析

total RNA (1 μg) に対して RT-PCR を行った結果 (Fig.2) , 腫瘍を含む検索したすべての組織において、想定される領域の増幅が確認された (CK: 757 bp および CCT: 704 bp) 。腫瘍と他の組織との間に明らかな差違を認めることはできなかったが、腫瘍組織において、CK および CCT のいずれも発現が高い傾向を示し、また、未処理の腎臓においても同程度だった。コントロールとして用いた G3PDH はすべての組織で一定の発現を示した。

### 3.3 Northern blot法による CK および CCT mRNA の発現の解析

RT-PCR 産物のサブクローニングから得られた断片の塩基配列を決定した。マウス正常腎臓の

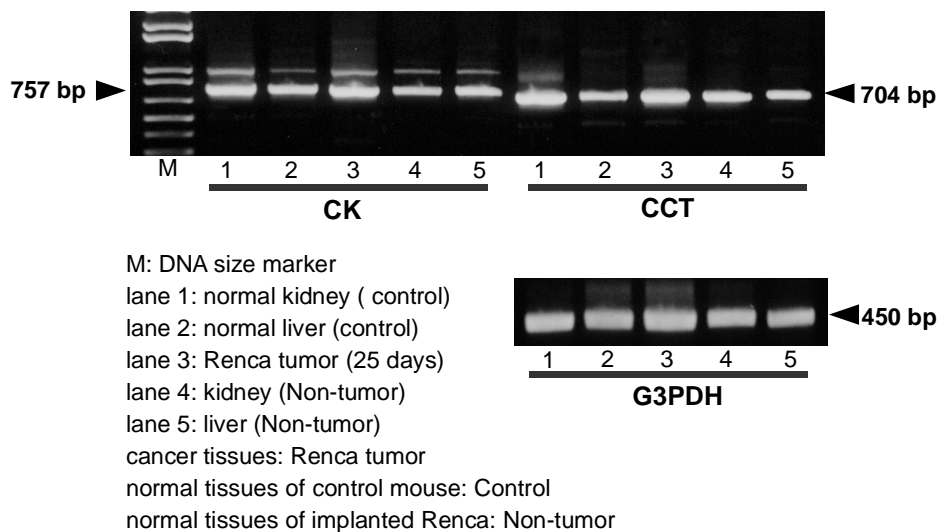


Fig.2 Expression of CK and CCTmRNA by RT-PCR

CK および CCT cDNA の塩基配列はラット肝臓 CK mRNA で 98% , ラット肝臓 CCTmRNA で 99% と , 高い相同性を有していた。 Fig.3 および Fig.4 に northern blot 解析の結果を示した。腫瘍移植後 14 日目, 25 日目の腫瘍組織および正常腎臓から抽出した total RNA それぞれ 10 $\mu$ g について検索した結果, Renca 腫瘍(25 日目)において CK mRNA の発現量は正常腎臓と比べて, 約 3 倍の亢進が認められた (Fig.3)。しかし, 14 日目の腫瘍では約 1.4 倍の増加だった。一方, CCT では腫瘍組織と正常腎臓の間で発現量の差は認められなかった (Fig.4)。ハウスキーピング遺伝子の G3PDH は組織間の差はなく一定の発現を示した。

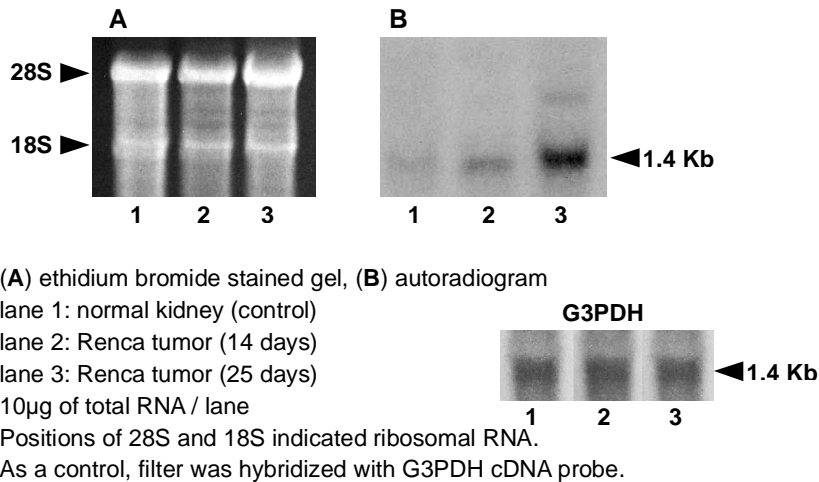


Fig.3 Northern blot analysis of CK mRNA in renal cancer

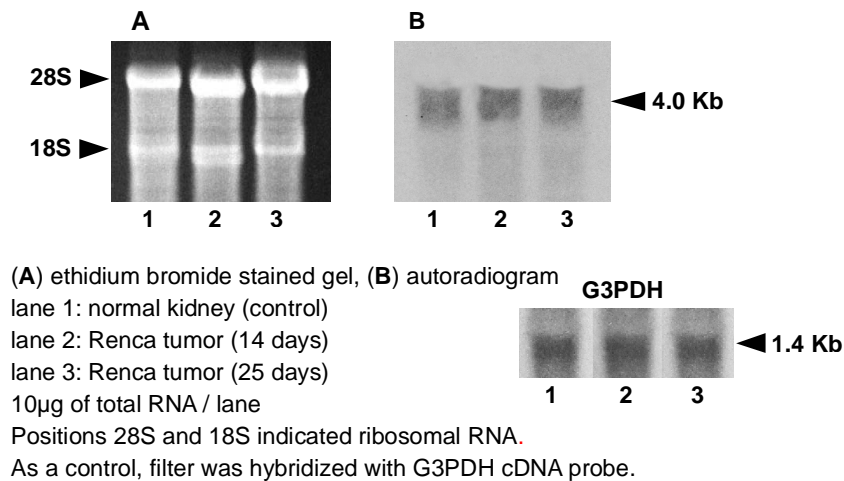


Fig.4 Northern blot analysis of CCT mRNA in renal cancer

#### 4 考 察

Renca 腫瘍は, BALB/c マウス腎皮質由来の自然発生腺癌で, その細胞形態は未分化で悪性度の高い像を呈し, ヒト腎癌の granular cell subtype に分類される<sup>12)13)</sup>。本研究では, [<sup>11</sup>C]コリンが腫瘍へ集積する機序を明らかにする目的で, マウス腎被膜下に腎腺癌株 Renca 細胞を移植し, 一定期間経過後に腫瘍を摘出し, これを実験モデルとして使用し, ホスファチジルコリ

ン生合成酵素である CK および CCT の mRNA 遺伝子発現について検索した。コリン供給は PC 合成を左右する主要な要因の一つになるが、PET 臨床において、 $[^{11}\text{C}]$ コリンは投与後、速やかな組織分布を示し、約 5-10 分で PET データ収集が可能になる。このことから、その腫瘍集積はホスファチジルコリン生合成の亢進に起因しているというより、コリンの up take が促進することによって、コリン代謝の初期ステップの亢進が推測される（あるいは、コリン代謝の促進によって取り込みが増える）。

RT-PCR によって、腫瘍組織を含む、検索したすべての組織において、CK および CCTmRNA の発現を認めたと、発現量の差違を正確に評価するには至らなかった。一方、Northern blot 解析の結果から、Renca 腫瘍の CK mRNA の発現が正常腎臓に比べて約 3 倍の増大を認めた。（腫瘍移植 16 日目と 25 日目の CK 発現量の違いについては詳細な検討を要するが。）それに対して、CCT mRNA の発現量は、腫瘍間および他の組織で差違が認められなかった。これらの結果は、CK mRNA 発現の亢進に伴い CK のタンパク質の量あるいは活性が増加することによって、コリンからホスホコリンへの代謝を促し、コリンをより安定な中性化合物として多量に蓄積する。その結果、腫瘍細胞内へのコリン取り込み率の増大につながるという可能性を示唆するものである。この仮定を証明するためには、今後、さらに、CK および CCT タンパク質の量と活性、コリン輸送担体およびコリン代謝物についても解析し、総合的に評価する必要があると思われる。

最近になって、 $^{18}\text{F}$  標識コリンの画像診断への応用に関する報告がなされ<sup>16)17)</sup>、また、高反応性のフッ素メチル化剤である fluoromethyl triflate を用いた簡便な合成法が開発された<sup>15)</sup>。このことは $[^{11}\text{C}]$ コリンの腫瘍診断薬剤としての有用性を裏付けているとともに、 $^{11}\text{C}$ (20 分)より半減期が長い  $^{18}\text{F}$ (108 分)の標識を施すことで FDG に変わりうる、いわゆる、クリニカル PET 薬剤としての可能性を模索している表れと考える。 $^{18}\text{F}$  標識体と  $^{11}\text{C}$  標識コリンとでは、その代謝動態は多少異なってくると予想されるが、いずれにしても、PET 標識薬剤コリンの診断精度および効率を高めるためには、 $[^{11}\text{C}]$ コリンの腫瘍集積のメカニズムを早急に解明する必要がある。

## 文 献

- 1) Hara T, Kosaka N, Kishi H. PET imaging of prostate cancer using carbon-11-choline. *J Nucl Med.* 1998; 39(6): 990-995.
- 2) Hara T, Kosaka N, Shinoura N, et al. PET imaging of brain tumor with [methyl-11C]choline. *J Nucl Med* 1997 Jun; 38(6): 842-847.
- 3) Shinoura N, Nishijima M, Hara T, et al. Brain tumors detection with C-11 choline PET. *Radiology.* 1997; 202(2): 497-503.
- 4) Ishidate K. Choline/ethanolamine kinase from mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1348: 70-78.
- 5) Kent C. CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1348: 100-110.
- 6) McMahster CR, Bell RM. CDP-choline:1,2-diacylglycerol cholinephosphotransferase. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1348: 142-150.
- 7) Katz-Brull R, Degani H. Differential routing of choline in implanted breast cancer and organs. *Magn Reson Med.* 2001; 46: 31-38.
- 8) Tedeschi G, Luundbom N, Raman R, et al. Increase choline signal coinciding with malignant degeneration of cerebral gliomas: a serial proton magnetic resonance spectroscopy imaging study. *J Neurosurg.* 1997; 87: 516-524.

- 9) Gimenez R, Soler S, Auguilar J. Cytidine diphosphate choline administration activates brain cytidine triphosphate: phosphocholine cytidylyltransferase in aged rats. *Neurosci Lett*. 1999; 273: 163-166.
- 10) Nakagami K, Uchida T, Ohwada S. Increase choline kinase activity and elevated phosphocholine levels in human colon cancer. *Jpn J Cancer Res*. 1999; 90: 419-424.
- 11) Uchida T, Yamashita S. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of a cDNA encoding mammalian choline kinase. *J Biol Chem*. 1992; 267:10156-10162.
- 12) Nakagami K, Uchida T, et al. Increase choline kinase activity in 1,2-Dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. *Jpn J Cancer Res*. 1999; 90: 1212-1217.
- 13) 丹治 進. BALB/c マウス自然発生腎細胞癌に対する BRMs (Biological Response Modifiers)の抗腫瘍効果. *日泌尿会誌*. 1991; 82: 716-725.
- 14) 長谷川道彦. 藤岡知昭. マウス腎癌に対するビタミン D<sub>3</sub> 誘導体による抗腫瘍効果と血管新生阻害作用. *岩手医誌*. 1996; 48: 133-147.
- 15) Iwata R, Pascali C, K Terasaki. et al. [<sup>18</sup>F]Fluoromethyl triflate, a novel and reactive [<sup>18</sup>F] Fluoromethylating agent: preparation and application to the on-column preparation of [<sup>18</sup>F]fluorocholine. *Appl Radiat Isot*. 2002; 57: 347-352.
- 16) Price DT, Coleman RE, Liao RP, et al. Comparison of [<sup>18</sup>F]fluorocholine and [<sup>18</sup>F]fluorodeoxyglucose for positron emission tomography of androgen dependent and androgen independent prostate cancer. *J Urol*. 2002 Jul; 168(1): 273-280.
- 17) Hara T. <sup>18</sup>F-fluorocholine: a new oncologic PET tracer. *J Nucl Med*. 2001 Dec; 42(12): 1815-1817.