

## HeLa 細胞に対する $^{18}\text{F}$ -Choline 集積の 細胞周期依存性

小豆島正典、山本純子、原 康文<sup>1)</sup>、寺崎一典<sup>2)</sup>、後藤祥子<sup>3)</sup>、岩田 錬<sup>4)</sup>

岩手医科大学歯学部歯科放射線学講座

020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

<sup>1)</sup>岩手医科大学歯学部口腔外科学第2講座

020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

<sup>2)</sup>岩手医科大学サイクロロンセンター

020-0173 岩手県岩手郡滝沢村留が森 348-58

<sup>3)</sup>日本アイソトープ協会仁科記念サイクロロンセンター

020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

<sup>3)</sup>東北大学サイクロロン RI センター

980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 01

### 1. はじめに

グルコース類似薬の Fluorine 18-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose ( $^{18}\text{F}$ FDG)は、脳や心臓の疾患のみならず悪性腫瘍診断においても重要な RI トレーサーとして知られている<sup>1)</sup>。特に  $^{18}\text{F}$ FDG の腫瘍組織への集積は、腫瘍細胞の糖代謝亢進を反映したものであり、この生化学的特性が Positron Emission Tomography (PET) による癌の診断で利用されている。筆者らは、 $^{18}\text{F}$ FDG に替わる新しい PET 用 RI トレーサーの  $^{11}\text{C}$ -Choline の合成法の確立とその臨床応用の可能性について研究を行ってきた。その結果、収集量の良い  $^{11}\text{C}$ -Choline の合成法が確立され、口腔癌に対し  $^{18}\text{F}$ FDG よりも強い集積を示すと同時に、投与後、短時間(10分:  $^{18}\text{F}$ FDG の 1/6)で PET スキャンが可能など、将来的に  $^{18}\text{F}$ FDG に替わる PET 用トレーサーになる可能性が示された。しかしながら  $^{11}\text{C}$  は半減期が 20 分と短く、デリバティブと

して供給できないという制限があった。本研究では、新たに<sup>18</sup>FでCholineを標識した<sup>18</sup>F-Cholineを合成し、その細胞レベルにおける集積特性を目標とした。

## 2. 対象および方法

### 2.1 細胞培養

培養癌細胞にはヒト子宮頸癌由来の HeLa S3 (RCB0191、理化学研究所) を用い、Eagle's minimal essential medium (MEM) に 10% fetal calf serum (FCS) と penicillin、streptomycin を加え 5% CO<sub>2</sub>・37℃で培養を行った。この培養条件での細胞倍加時間は約 23 時間であった。培養容器は容量 50 ml、培養面積 25 cm<sup>2</sup>の組織培養フラスコ (Nunc, USA) を用いた。培養細胞数は細胞同調完了時 1x10<sup>6</sup>~3x10<sup>6</sup>個になることを目標に調整した。

### 2.2 細胞同調法と RI 投与

細胞の同調は、TdR によるダブルブロッキング法により行った。2 mM TdR を含む培地にて 24 時間培養後、TdR-free 培地で 11 時間培養、さらに 2 mM TdR を含む培地で 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経過後 4℃の氷水中に入れ、10 分経過後 4℃冷蔵庫にて保管し NMCC に運んだ。<sup>18</sup>F-Choline は NMCC にて合成され、培地 1 ml あたり 0.5 mCi を目標に投与し、37℃・5%CO<sub>2</sub> のインキュベーターで 20 分間培養した。培養終了後、グルコース添加 Ca/Mg free phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄後トリプシン処理し細胞を浮遊させ、さらにグルコース添加 PBS で洗浄し、ガンマカウンタで細胞に取り込まれた <sup>18</sup>F-Choline の放射能を測定した。その後、細胞数を測定し、単位細胞数あたりの <sup>18</sup>F-Choline 放射能を求めた。

### 2.3 Flow cytometry (FCM)による DNA 量の測定

各 phase に同調された細胞の一部は、flow cytometry (FCM)分析のために使われ、細胞同調の確認および DNA 合成能の分析が行われた。相対的 DNA 量の変化を分析するため、2 % Triton X-100 に細胞を浮遊させ、裸核後、RNase (最終濃度 0.5 %)を添加し、propidium iodide (PI) (最終濃度 50 μg/ml) で DNA を蛍光染色した。細胞数を 1 x 10<sup>6</sup>個に調整後、FCM にて 1 x 10<sup>4</sup>個の細胞を分析した。

## 3. 成績

HeLa S3 細胞の同調処理終了後から 14 時間経過までの cytogram を分析した。その結果、同調処理終了直後には細胞集団は S 期に、続いて 5 時間後には、G2/M 期に、10 時間後には大部分の細胞が G1 期にシフトすることから、同調が良好に行われていることが確認された。

各細胞周期における <sup>18</sup>F-Choline 集積と細胞数変化を観察したところ、<sup>18</sup>F-Choline 集積は、同調処理終了直後はピーク時の 87%あり、5 時間後にピークに達した。その後、次第に減少に転じ、10 時間以降では、ピーク時の約 58 %まで減少した。細胞数は、同調処理終了後 5 時間までは一定であったが、その後上昇に転じ、10 時間後には細胞数がほぼ 2 倍になった。

#### 4. 考 察

Choline は細胞内に輸送され、リン酸化されたのち細胞内にトラップされる他、膜の構成要素であるリン脂質の合成にも利用される。悪性細胞では Choline の細胞内濃度が上昇していること、および Choline kinase 活性の増大が生じていることが明らかになっている<sup>2)</sup>。これらのことから、Choline は細胞の Choline 代謝亢進が反映されることが予想される。培養癌細胞 HeLa に対する <sup>18</sup>F-Choline 集積を観察したところ、<sup>18</sup>F-Choline 集積は、S 期から G2/M 期にかけ上昇し、G2/M 期で最大となり、G1 期には約 58% まで低下することが示された。細胞分裂指数は、(S 期 + G2/M 期) / (G0G1 期 + S 期 + G2/M 期) x 100 (%) で表される。すなわち <sup>18</sup>F-Choline を腫瘍トレーサーとして用いた PET では、細胞分裂指数が反映された画像が得られていると推測される。Choline は、投与から腫瘍細胞に蓄積するまでの時間が 10 分以内と極めて短く、患者の時間的負担の大幅な軽減が期待されるほか、脳腫瘍と前立腺癌の診断や糖尿病患者にも使用できるという長所をもつ。特に <sup>18</sup>F で標識した <sup>18</sup>F-Choline の有用性が証明されれば、放射能の半減期が <sup>18</sup>FDG と同じ 110 分であることから、自施設にサイクロトロンを持たずにデリバティブとして購入することが可能となる。将来的にそれぞれの病態に合わせて腫瘍トレーサーを選択し PET を行うことができるようになり、正診率の向上が図られるであろう。

#### 5. 文 献

- 1) Fischbein NJ, AAssar OS, Caputo GR, Kaplan MJ, Singer MI, Price DC et al. Clinical utility of positron emission tomography with 18F-fluorodeoxyglucose in detecting residual/recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am J Neuroradiol*; 19:1189-96, 1998
- 2) Macara IG, Elevated phosphocholine concentration in rastransformed NIH3T3 cells arises from inbreased choline kinase actvity, not from phosphatidylcholine breakdown. *Mol Cell Biol*;9:325-328, 1999

## Cell cycle dependency of $^{18}\text{F}$ -Choline uptake during proliferation of cultured human cancer cells

M. Shozushima, J. Yamamoto, Y. Hara<sup>\*1</sup>, K. Terasaki<sup>\*2</sup>, S. Goto<sup>\*3</sup> and R. Iwata<sup>\*4</sup>

Department of Dental Radiology, School of Dentistry, Iwate Medical University  
19-1 Uchimaru, Morioka, 020-8505

<sup>\*1</sup> Department of Oral Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University  
19-1 Uchimaru, Morioka, 020-8505

<sup>\*2</sup> Cyclotron Research Center, Iwate Medical University  
19-1 Uchimaru, Morioka, 020-8505

<sup>\*3</sup> Nishina Memorial Cyclotron Center, Takizawa Institute, Japan Radioisotope Association  
348-58 Tomegamori, Takizawa, 020-0173 Japan

<sup>\*4</sup> CYRIC Tohoku University  
Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

### Abstract

Recently [ $^{18}\text{F}$ ] labeled choline ([ $^{18}\text{F}$ ] Choline) has been developed as a promising tracer for cancer detection; including ones found in the lung, prostate gland, head and neck regions. The experimental study demonstrated [ $^{18}\text{F}$ ] Choline uptake was higher in faster-growing rather than in slower-growing tumors. However, the precise mechanism remains to be elucidated. In this study, the relationship between [ $^{18}\text{F}$ ] Choline uptake and the cell cycle phase in cultured human cancer cells (HeLa S3), as well as how they compare to the conventional tracer [ $^{18}\text{F}$ ] FDG with PET was assessed. Synchronization of HeLa S3 cells was accomplished via a double thymidine block. Flow cytometry (FCM) was used to determine the relative DNA contents of cells to check the degree of cell synchronization. The uptake of [ $^{18}\text{F}$ ] Choline and [ $^{18}\text{F}$ ] FDG was determined after cell cycle synchronization. FCM findings confirmed that the cells were well synchronized. [ $^{18}\text{F}$ ] Choline uptake was 87% of the peak level in the early S-phase immediately after release, gradually increased, and peaked in the G2/M phase. Subsequently, [ $^{18}\text{F}$ ] Choline uptake steeply declined over the late G2/M phase to 58% in the G1 phase. The results suggest that the uptake of [ $^{18}\text{F}$ ] Choline is cell cycle dependent, is associated with the proliferative activity of the tumor seen during PET imaging.