

## 培養癌細胞 HeLa の細胞周期に対する $^{18}\text{F}$ -FDG と $^{11}\text{C}$ -choline 集積

小豆島正典<sup>1</sup>、六本木 基<sup>1</sup>、寺崎一典<sup>2</sup>

<sup>1</sup>岩手医科大学歯学部歯科放射線学分野

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

020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

### 1 はじめに

$^{18}\text{F}$ -FDG および  $^{11}\text{C}$ -choline は、癌の PET 用トレーサーとして口腔のみならず他領域でも用いられている。PET 用トレーサーの集積量は、SUV(standardized uptake value)として定量化され、腫瘍の存在や領域などの画像診断の他、予後の推測に非常に重要な数値である。しかしながら実際に頭頸部領域で  $^{18}\text{F}$ -FDG PET を行うと、腫瘍組織型が同一で、同様の進展度を持つ病巣にもかかわらず、SUV が大きく異なることがある。Minn ら<sup>1</sup> (1995)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  $^{18}\text{F}$ -FDG が取り込まれることを報告し、 $^{18}\text{F}$ -FDG 集積が細胞周期依存性であることを示唆している。しかしながら  $^{11}\text{C}$ -choline 集積の細胞周期依存性に関しては明らかになっていない。本研究では、培養癌細胞の HeLa を用い、細胞周期を連続的に変化させ  $^{18}\text{F}$ -FDG と  $^{11}\text{C}$ -choline 集積との関係を詳細に調べ、PET 用トレーサー集積に対する腫瘍細胞の生物学的特性を明らかにすることを目的として研究を行った。

### 2 方法

#### 2.1 細胞同調法

研究に用いた培養癌細胞は HeLa S3 で、細胞同調は、Knehr ら<sup>2</sup>による高濃度 thymidine (TdR)によるダブルブロッキング法にて行った。TdR の作用時間や、TdR-free の時間は、フローサイトメトリー (FCM) による細胞 DNA 量のヒストグラムを参考にした。各ステージにおける細胞同調の割合は、細胞周期解析ソフト ModFit にて行った。

#### 2.2 RI 投与

同調された HeLa S3 細胞に対し、 $^{18}\text{F}$ -FDG と  $^{11}\text{C}$ -choline を投与し、単位細胞数あたりの放射能を測定し、S 期から G2/M 期、G1 期にいたるそれぞれの集積量を比較した。 $^{18}\text{F}$  イオン自身の集積を明らかにするため、 $^{18}\text{F}$  で標識した NaF ( $^{18}\text{F}$ -NaF) でも同様の実験を行った。

### 2.3 トランスポータの活性

細胞膜表面に発現するグルコース輸送蛋白 Glut 1 と細胞周期との関係を調べるため、anti Glut 1-FITC を用い FCM にて Glut 1 の活性を解析した。同様にコリントランスポーターとの関係については、CTL1-FITC の活性を調べた。

## 3 成績

- ① TdR-free 直後、HeLa S3 は S 期前半に同調されていた。5 時間後には G2/M 期に、10 時間後には G1 期に移行することが ModFit で明らかになった。
- ②  $^{18}\text{F}$ -FDG は、S 期から G2/M 期に集積量が多く、G1 期には急激に低下した。 $^{11}\text{C}$ -choline は、S 期から G2/M 期にかけて集積が増大し、G2/M 期でピークとなり、G1 期には急激に低下した。
- ③  $^{18}\text{F}$ -NaF は、HeLa S3 にはほとんど取り込まれなかった。
- ④ Glut 1 の活性は、 $^{18}\text{F}$ -FDG と同様に S 期で増大し、G1 期では低下していた。CTL1 の活性は、G2/M 期で増大し G1 期では低下していた。

## 4 考察

ヒト正常細胞では、その多くが静止期(G0 期)にあって増殖を停止している。増殖刺激が加えられると細胞は増殖を開始し G0 期から G1 期(第 1 間期)、S 期(DNA 合成期)、G2 期(第 2 間期)、M 期(分裂期)と進み G1 期に戻る。本研究に用いた HeLa S3 細胞の細胞周期は広く知られており、S 期は 9 時間、G2 期と M 期を合わせた G2/M 期は 3 時間とされている<sup>3</sup>。細胞同調法には、TdR による S 期同調法や hydroxyurea による G1 期同調法、細胞付着性が M 期で低下することを利用した培養フラスコ振盪法が知られている。本研究では、均一な同調細胞を大量に得る必要性から、Knehr ら<sup>2</sup>による TdR ダブルブロッキング法を採用した。

培養細胞を G1 期から M 期まで連続的に細胞を同調させたところ、 $^{18}\text{F}$ -FDG と  $^{11}\text{C}$ -choline は、S 期から G2/M 期に良く集積するが、G1 期では急激に集積低下が明らかになり、Minn ら<sup>1</sup>の成績を *in vitro* で証明する結果となった。 $^{18}\text{F}$ -FDG は、細胞膜にある Glut を介し細胞内に入り、Hexokinase と ATP によってリン酸化され  $^{18}\text{F}$ -FDG-6-phosphate となる。 $^{18}\text{F}$ -FDG-6-phosphate は、その後解糖系として代謝されず、細胞内にトラップされる。ヒト癌細胞では、 $^{18}\text{F}$ -FDG 集積と Glut の発現に強い相関があるが、Hexokinase 発現には関連性がないことが報告されている<sup>4,5</sup>。本研究では、細胞周期と Glut 1 発現との関係について実験したところ、Glut 1 は  $^{18}\text{F}$ -FDG が最大に取り込まれる S 期前半で発現量が多く、 $^{18}\text{F}$ -FDG 集積が最小となる G1 期で発現量が低下することが示された。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>6</sup>。Glut 1 と CTL1 の活性は、 $^{18}\text{F}$ -FDG あるいは  $^{11}\text{C}$ -choline 集積の time course と類似していた。このことから、Glut 1 と CTL1 の活性の細胞周期依存性が、 $^{18}\text{F}$ -FDG と  $^{11}\text{C}$ -choline 集積に反映していると推測された。

細胞分裂指数は、(S 期 + G2/M 期) / (G0G1 期 + S 期 + G2/M 期) × 100 (%) で表される。すなわち  $^{18}\text{F}$ -FDG 集積 と  $^{11}\text{C}$ -choline 集積は、それぞれ S 期と G2/M 期にピークを持つが、どちらのトレーサーを用いても PET 上では、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た。

参考文献

- 1) 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 flow cytometry in head and neck tumors. *Cancer* 1988; 61:1776-81.
- 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) Cao, G., Liu, L. M. and Cleary, S. F. : Modified method of mammalian cell synchronization improves yield and degree of synchronization. *Exp. Cell. Res.* 193 : 405-410, 1991.
- 4) Waki, A., Fujibayashi, Y. and Yokoyama, A., : Recent advances in the analyses of the characteristics of tumors on FDG uptake. *Nucl. Med. Biol.* 25 : 589-592, 1998.
- 5) Waki, A., Kato, H., Yano, R., Sadato, N., Yokoyama, A., Ishii, Y., Yonekura, Y. and Fujibayashi, Y. : The importance of glucose transport activity as the rate-limiting step of 2-deoxyglucose uptake in tumor cells in vitro. *Nucl. Med. Biol.* 25 : 593-597, 1998.
- 6) Macara IG, : Elevated phosphocholine concentration in rastransformed NIH3T3 cells arises from inbreased choline kinase activity, not from phosphatidylcholine breakdown. *Mol Cell Biol*, 9:325-328, 1999

## The characteristics of $^{18}\text{F}$ -FDG and $^{11}\text{C}$ -choline uptake by proliferating tumor cells in vitro

M.Shozushima<sup>1</sup>, M.Roppongi<sup>1</sup> and K.Terasaki<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Dental Radiology, School of Dentistry, Iwate Medical University

19-1 Uchimaru, Morioka 020-8505

<sup>2</sup>Cyclotron Research Center, Iwate Medical University

348-58 Tomegamori, Takizawa 020-0603

### Abstract

Positron emission tomography using fluorine-18 fluoro-deoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) and  $^{11}\text{C}$ -choline are useful for the detection of malignant tumor recurrences and for the evaluation of a therapeutic response to these; including ones found in the lung, colon, head and neck regions. The experimental study demonstrated  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake was higher in faster-growing rather than in slower-growing tumors. These findings show  $^{18}\text{F}$ -FDG accumulation exhibits cell cycle dependency. However, the precise mechanism remains to be elucidated. In this study, the relationship between  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake and the cell cycle phase in HeLa S3 cells, as well as how they compare to the other tracer  $^{11}\text{C}$ -choline was assessed.

Synchronization of HeLa S3 cells was accomplished via a double thymidine block. The uptake of  $^{18}\text{F}$ -FDG and  $^{11}\text{C}$ -choline was determined after cell cycle synchronization. The glucose transporter or choline transporter was independently evaluated for the level of its Glut 1 or CTL1.

Flow cytometry findings confirmed that the cells were well synchronized.  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake in HeLa S3 cells was significantly higher in the early S phase compared to the G1 phase. In addition,  $^{11}\text{C}$ -choline uptake was higher in the G2/M phase. Immunochemical assays for the Glut 1 and CTL1 showed an increase in membrane expression within S phase and G2/M phase respectively.

It has been concluded cell cycle dependency is reflected in the uptake of  $^{18}\text{F}$ -FDG and  $^{11}\text{C}$ -choline, seen during PET imaging of tumor tissue. These results reveal tumor proliferative activity, and can assist in evaluating a therapeutic response.