

細胞周期に対する ^{18}F -Choline と ^{18}F FDG 集積の比較

小豆島正典、山本純子、原 康文¹、寺崎一典²、後藤祥子³、岩田 錬⁴

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

¹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

²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留が森 348-58

³日本アイソトープ協会仁科記念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

⁴東北大学サイクロトロン 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}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^{1,2)}。筆者らは、 ^{18}F FDG に替わる新しい PET 用 RI トレーサーの ^{11}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}C -Choline の合成法が確立され、口腔癌に対し ^{18}F FDG と同様に強い集積を示すと同時に、投与後、短時間(10分： ^{18}F FDG の 1/6)で PET スキャンが可能など、将来的に ^{18}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}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 ^{18}F で Choline を標識した ^{18}F -Choline を合成し、細胞周期に対する集積特性について ^{18}F FDG と比較検討した。

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% CO₂・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 cm² 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 1x10⁶~3x10⁶ 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。¹⁸F-Choline および ¹⁸FDG は NMCC にて合成され、培地 1 ml あたり 0.5 mCi 投与し、37℃・5% CO₂ 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、ガンマーカウンタで細胞に取り込まれた ¹⁸F-Choline あるいは ¹⁸FDG の放射能を測定した。その後、細胞数を測定し、単位細胞数あたりに取り込まれたそれぞれの放射能を求めた。

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 10⁶ 個に調整後、FCM にて 1 x 10⁴ 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 期の前半に、続いて 4~7 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 ¹⁸F-Choline 集積と細胞数変化を観察したところ、¹⁸F-Choline 集積は、同調処理終了直後はピーク時の 77% 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。それに対し、¹⁸FDG は S 期の前半である同調直後にピークに達し、その後次第に取り込みが低下し、10 時間以降では、ピーク時の約 50% まで減少した。

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 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³⁾。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、細胞附着性が 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⁴⁾による TdR ダブルブロッキング法を採用した。1 回目の TdR ブロッキング終了時から 2 回目の TdR ブロッキング開始までの時間は、均一な同調細胞を得る上で非常に大切であり、本研究では、実際に FCM を観察することによりこの時間を決定した。その結果、良好な同調細胞が得られていることが FCM の観察から証明された。細胞をプレートから剥離させるためにトリプシン処理し細胞を浮遊させた。しかしながらトリプシンという酵素処理が細胞膜にある様々な糖鎖や蛋白に非生理的な影響を及ぼす可能性がある。そこで本研究では実験の前段階として、培地の温度を一時的に 20°C にすることにより細胞がプレートから剥離する性質を持つ温度応答性細胞培養プレート (UpCell, CellSeed 社) を用いて細胞を浮遊させ、¹⁸F-Choline と ¹⁸FDG の取り込み実験を行った。その結果、トリプシン処理を行った同調細胞に対する取り込み実験と同様の成績が得られることから、トリプシン処理の影響は無視できることを確認している。

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⁵⁾。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 ¹⁸F-Choline 集積を観察したところ、¹⁸F-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。それに対し、¹⁸FDG 集積は S 期で最大になり、G1 期には約 50 % 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) × 100 (%) で表される。すなわち ¹⁸F-Choline 集積と ¹⁸FDG 集積は、それぞれ G2/M 期と S 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 ¹⁸F で標識した ¹⁸F-Choline の有用性が証明されれば、放射能の半減期が ¹⁸FDG 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。

文 献

- 1) Shinoura N., Nishijima M., Hara T. Haisa T., Yamamoto H., Fujii K., Mitsui I., Kosaka N., Kondo T., Hara T.: Brain tumors: detection with C-11 choline PET. *Radiology*. 202;497-503, 1997
- 2) Torizuka T., Kanno T., Futatsubashi M., Okada H., Yoshikawa E., Nakamura F., Takekuma M., Maeda M., Ouchi Y.: Imaging of gynecologic tumors: comparison of (11)C-choline PET with (18)F-FDG PET. *Journal of Nuclear*

Medicine. 44:1051-1056, 2003

- 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) 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.
- 5) 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

Cell cycle dependency of ^{18}F -Choline and ^{18}F FDG uptake during proliferation of cultured human cancer cells

M. Shozushima, J. Yamamoto, Y. Hara¹, K. Terasaki², S. Goto³ and R. Iwata⁴

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

¹Department of Oral Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University
19-1 Uchimaru, Morioka 020-8505, Japan

²Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

³Nishina Memorial Cyclotron Center, Takizawa Institute, Japan Radioisotope Association
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

⁴CYRIC Tohoku University
Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

Abstract

In this study, the relationship between ^{18}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}F FDG with PET was assessed.

Flow cytometry findings confirmed that the cells were well synchronized. ^{18}F -Choline uptake was 77% of the peak level in the early S-phase immediately after release, gradually increased, and peaked in the early G2/M phase. Subsequently, ^{18}F -Choline uptake steeply declined over the late G2/M phase to 58% in the G1 phase. However, ^{18}F FDG was significantly higher in the early S phase compared to the G1 phase.

The results suggest that the uptake of ^{18}F -Choline and ^{18}F FDG are cell cycle dependent, are associated with the proliferative activity of the tumor seen during PET imaging.