

論文内容の要旨

^{18}F -FDG and ^{11}C -choline uptake in proliferating tumor cells is dependent on the cell cycle *in vitro*
—増殖している腫瘍細胞に対する ^{18}F -FDG および ^{11}C -choline の集積は、細胞周期に依存する—
(六本木基、泉澤充、寺崎一典、村木靖、小豆嶋正典)
(Annals of Nuclear Medicine、平成 31 年掲載予定)

ろっほんぎ もとい
六本木 基

I. 研究目的

PET 用癌トレーサーの集積量は、癌の staging や予後を推測する因子のみならず治療計画の立案、治療効果の判定としても重要な指標である。癌トレーサーである ^{18}F -FDG や ^{11}C -choline 集積は、Ki-67 免疫染色により得られる細胞増殖指数の高い癌組織で増大することが知られており、これらの集積は細胞周期に依存していることが推測される。しかしながら、G1 期、S 期、G2/M 期ごとの集積について、その詳細は不明である。本研究では、培養癌細胞を用い、細胞周期を連続的に変化させ ^{18}F -FDG と ^{11}C -choline 集積との関係を調べ、各トレーサーに対する癌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。

II. 研究方法

培養癌細胞として HeLa S3 を用い、高濃度 Thymidine (TdR) のダブルブロッキング法にて S 期に同調させた。TdR free 培地に交換後、12 時間まで培養し、各ステージに同調された細胞集団を得た。それぞれの細胞集団に ^{18}F -FDG もしくは ^{11}C -choline を投与し、30 分後 RI を washout した。S 期から G2/M 期、G1 期にいたる細胞集団の放射能を γ カウンターにて測定し半減期補正をした。さらに細胞数を測定し、単位細胞数あたりの放射能を求め、最大を 100% とする相対値として集積量を表した。propidium iodide で DNA を染色し、Flow cytometry (FCM) を用いて DNA 量に基づいた細胞周期のヒストグラムを得た。さらに ModFit LT 2.0 (Verity Software House, USA) を用い、各周期の細胞割合を計測した。細胞膜に発現する glucose 輸送蛋白 (GLUT1) あるいは choline 輸送蛋白 (CTL1) と細胞周期との関係を調べるため、それぞれの蛍光抗体 (anti-GLUT1-FITC あるいは anti-CTL1-FITC) で標識し FCM にて解析した。

III. 研究成績

1. S 期、G2/M 期、G1 期の細胞割合が最大になるのは、それぞれ TdR free にした直後 (S 期 99.7%)、5H 後 (G2/M 期 82.3%)、10H 後 (G1 期 77.6%) であった。
2. ^{18}F -FDG は、S 期から G2/M 期に集積量が最大となったが、G1 期には約 50% まで急激に低下した。
3. ^{11}C -Choline は S 期で約 75% の集積を示し、G2/M 期でピークとなった。しかし G1 期には約 60% まで急激に低下した。
4. 各細胞周期における GLUT1 発現量と CTL1 発現量は、それぞれ ^{18}F -FDG 集積あるいは ^{11}C -Choline 集積の変化と類似する動態を示した。

IV. 考察及び結論

1. 本研究で用いた TdR ダブルブロッキング法により、良好に細胞同調された細胞集団が得られることが DNA ヒストグラムと ModFit で確認された。

2. ^{18}F -FDG と ^{11}C -choline は、それぞれ S 期～G₂/M 期と G₂/M 期で高集積するが、両者とも G₁期で低下することが *in vitro* で示された。
3. GLUT1 と CTL1 の発現量は、細胞周期に依存しており、GLUT1 は ^{18}F -FDG 集積と、CTL1 は ^{11}C -choline 集積変化と類似する動態を示した。
4. ^{18}F -FDG と ^{11}C -choline 集積の細胞周期依存性は、それぞれの輸送タンパク発現の細胞周期依存性によって生じていることが推測された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 田中 良一（口腔顎顔面再建学講座 歯科放射線学分野）
副査 教授 山田 浩之（口腔顎顔面再建学講座 口腔外科学分野）
副査 教授 石崎 明（生化学講座 細胞情報科学分野）

PET 用癌トレーサーの集積量は癌のステージングや治療計画の立案・治療効果の判定、予後予測因子として重要である。代表的なトレーサーとして ^{18}F -FDG や ^{11}C -choline があり、これらの集積は細胞増殖指数の高いがん組織で増大することが知られており、トレーサーの細胞内への取り込みは細胞周期に依存していることが示唆されている。しかし、*in vitro* においてこの現象を確認した報告は無く、トレーサーの取り込みが細胞周期に真に依存しているか否かの証明はなされていない。よって、本研究では、癌細胞における PET 用癌トレーサーの細胞周期依存性を明らかにすることを目的とし、培養癌細胞を用い、細胞周期を連続的に変化させ、 ^{18}F -FDG および ^{11}C -choline の集積との関係を調べた。

培養癌細胞として HeLa S3 を用い、高濃度チミジンを用いたダブルブロッキング法にて S 期に細胞を同期させた。培地をチミジンフリーに交換後、培養時間および 4°C 冷却時間をコントロールすることで、S 期、G₂/M 期、G₁ 期の各ステージに同調された細胞集団を作成した。同期された細胞の割合についての検証は、フローサイトメトリーを用いて行い、染色した DNA 量から細胞周期のヒストグラムを取得し、ModFit LT2.0 (Verity Software House, USA)にて算出した。それぞれの、細胞集団に ^{18}F -FDG もしくは ^{11}C -choline を投与し、30 分の培養時間を置き、再び 4°C に冷却して細胞を不活化させ、細胞外のトレーサーを wash out した。その後、其々の細胞集団の放射能を γ カウンターにて測定し、半減期補正を行った。さらに細胞数を測定し、単位細胞数当たりの放射能を求め、得られたカウントの最大値を 100%とした相対値とし、細胞周期による変動を検討した。また、細胞膜に発現するグルコース輸送蛋白 (GLUT1) あるいはコリン輸送蛋白 (CTL1) と細胞周期との関係を調べるため、それぞれの蛍光抗体で標識を行い、フローサイトメトリーで解析した。

細胞同期はチミジンフリーにした直後で S 期に 99.7%、5 時間後に G₂/M 期に 82.3%、10 時間後で G₁ 期に 77.6% とそれぞれ最大の細胞割合が得られることを確認し、これらの時間を元にそれぞれの細胞周期の細胞集団を作成した。

^{18}F -FDG では集積は S 期から G₂/M 期で高集積を示し、G₁ 期には 50% の集積に低下し、細胞数は G₁ 期になると 2 倍に増加した。 ^{11}C -choline でも同様の傾向で、G₂/M 期で集積はピークとなり、G₁ 期では集積が 60% まで減少するとともに、細胞数は 2 倍に増加した。

各細胞周期における GLUT1 および CTL1 の発現量は、それぞれ ^{18}F -FDG あるいは ^{11}C -choline 集積の変化と類似する動態を示した。

以上より、 ^{18}F -FDG もしくは ^{11}C -choline の集積には細胞周期依存性があることが確認され、増殖期の細胞により多く集積することた。また、これらの集積は GLUT1 もしくは CTL1 の発現に依存しておこることが

推察された。

本研究の成果はこれまで臨床研究から推察されていた経験則を、*in vitro* で科学的に証明したものであり、さらには細胞膜に発現する輸送蛋白との関連をも新たに示しており、学位論文に値すると評価した。

試験・試問結果の要旨

審査にあたっては、まず、本研究・論文の概要について説明があり、目的・方法・結果・考察・結論についての発表がなされた。次いで、研究内容およびその意義、今後の研究展開について諮問が行われ、いずれも適切かつ明瞭な回答が得られた。また、今後の研究およびさらなる知識の取得に意欲的に取り組む姿勢が見られ、学位に値する学識と研究能力を備えているものと判定した。

主査・副査から多くの質問があり、下記の質疑応答が行われた。

問：口腔がんの細胞を用いず、子宮頸がんの細胞である HeLa S3 を用いた理由は？

答：本研究では同一条件下で細胞周期を同調させた多量の細胞を使用する必要があり、安定的に多量の細胞培養が行える HeLa S3 を選択した。口腔がんの細胞も検討したが、安定的に細胞数を確保することが難しいと考えられたため、今回の研究では選択しなかった。

問：グルコーストランスポータには Glut1, 2, 3, 4 と多くの種類があるが、Glut1 を選択した理由は何か？

答：複数のトランスポータが存在するが、悪性腫瘍において Glut1 の発現が多いと報告されており、今回の研究では悪性腫瘍の増殖に関連する事象を検証する研究であるため Glut1 を関心対象とし検討した。コリントランスポータにおいて CTL1 を選択した理由も同様である。

問：Glut1 は腫瘍細胞での発現は判ったが、ずっと発現しているものなのか？通常はどうか？

答：今回の結果からはどの細胞周期にも存在することが確認されているが、細胞周期に依存して発現量が変化していることが判っている。活性については今回の検討では不明である。

問：チミジンブロックについて、シングルブロックとダブルブロックがあるが、ダブルブロックの利点は何か？

答：シングルブロックでは S 期同調が不完全であることが多く、ダブルブロックを行うことでより安定的に S 期に同調させることが可能である。

(石崎副査から補足説明があり、シングルブロックにおいては S 期の中でも様々な時期にある細胞が存在し G1/S 境界から G2 期に近いものまで存在すること、そのためシングルブロックでブロックを解除すると異なる細胞周期の細胞が多く発現してしまうが、ダブルブロックでこれらの周期が微妙に異なる細胞も再度同期させることで G1/S 境界で同期するとの説明をいただいた。また、チミジン投与により DNA 合成が阻害されるメカニズムについても解説いただいた。)

問：悪性度の低いがんや正常細胞でも同様に細胞周期は存在するため、同様に PET は取り込まれると思われる。本研究の結果から細胞周期依存性については判定できるが、悪性度の高いがんで強く集積するとは言えないのではないか。

答：悪性度の高いがんで細胞分裂が活発である。今回の結果で S 期から G2/M 期で PET 核種の取り込みが増大することが示されており、悪性度の高いがんではこの時期の細胞が多く存在するので強い集積となると推察した。

(石崎副査より、今回の研究ではあくまでも PET 核種の細胞周期依存性について検証したのみであるため、

悪性度との関連については悪性度の異なる細胞を用い、さらなる検討を重ねる必要があるとの示唆をいただいた。)

問：本研究の臨床応用についての意義は何か？

答：多くの臨床研究により腫瘍の悪性度と PET の集積に相関があることが示されており、FDG 等が細胞分裂におけるエネルギー代謝に消費される特性から、PET 核種の取り込みに細胞周期依存性が示唆されていた。しかし、*in vitro* でこれを検証した報告は無く、本研究において PET 核種の取り込みに細胞周期依存性があることを証明したこと、およびトランスポータ発現と同様の変化を示すことを証明したことは、過去の経験則に基づく報告に科学的な裏付けを行ったという点で、意義は大きいと考える。

参考論文 なし