

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461853

研究課題名(和文) マウス発がんモデルにおける抗腫瘍剤誘導アポトーシスと腫瘍糖代謝能のイメージング

研究課題名(英文) Imaging of anti-tumor agents induced apoptosis and tumor glucose metabolism in a mouse carcinogenesis model.

研究代表者

河相吉(KAWA, Soukichi)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30152896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍細胞株としてヒト非小細胞肺癌由来H1299を継代培養する技術確立した。誘発細胞障害モデルとして培養H1299細胞へ3 Gy, 6Gy, 9Gy, 12Gyの照射を行い、その後の細胞増殖率の変動を観察した。線外照射各細胞群に¹⁸F-FDGを投与し、120分後まで、細胞内へのFDG取り込み量(Cin)を経時的に測定し細胞内外比(Cin/Cout)を算出した。放射線照射後の細胞内へのFDG取り込みは各群いずれも経時的に増大していた。取り込み量は線量依存性に低下していた。

研究成果の概要(英文)：We have established a technology subculturing H1299 derived from the human non-small cell lung cancer as a tumor cell line. After γ -ray external irradiation, it was calculated FDG uptake into cells and measured over time to the inside(Cin) or outside of the cell ratio (Cin / Cout) until after 120 minutes. FDG uptake into cells after irradiation was increased any groups over time. Uptake was reduced to the dose-dependent.

研究分野：核医学

キーワード：アポトーシス アネキシンV FDG

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体内では、癌化した細胞のほとんどは、アポトーシスによって取り除かれており、これにより、ほとんどの腫瘍の成長は未然に防がれていることが知られている。アポトーシスが十分に起こらないと、細胞の異常増加を原因とする癌疾患が起こると考えられる。アポトーシスの初期段階にはフォスファチジルセリン (PS) の細胞表面への露出が観察される。PS はアネキシン と特異的に、かつ高親和性に ($K_d = 7 \text{ nM}$) 結合するため、アネキシン V の反応性を指標に細胞死を判定することができる。

(2) 腫瘍細胞の糖代謝を非侵襲的にモニターできる臨床検査法として ^{18}F -fluorodeoxyglucose (FDG) を用いた核医学検査がある。悪性腫瘍の病変部位、その悪性度の多寡判定に、疾患の初回診断時のみならず、治療中間時点での治療に対する反応性、治療終了後の効果判定にもさまざまな知見をもたらしつつあり、悪性腫瘍の診療において幅広く活用され、欠かせない評価法となっている。抗腫瘍剤や放射線治療による腫瘍細胞の糖利用能の変化とアポトーシスの関連についての基礎研究は乏しく、その知見は十分に明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1) アポトーシス誘導後の初期評価である細胞膜の変化を捉え、病態の把握、治療効果の判定などの臨床的有用性を見出しうるかを明らかにする。

(2) 放射線治療による腫瘍の糖代謝の変動とアポトーシスの発現がいかなる関係にあるかを明らかにすることを本研究の目的とした。

われわれのこれまでの研究¹⁾で明らかにした放射線による増殖能の変化ならびにアネキシン V で評価したアポトーシスの発現と本研究の目的とする放射線による増殖能の変化ならびに FDG で評価した腫瘍細胞活性の障害の関連をみることによって、腫瘍の治療後変動を解明する。

3. 研究の方法

使用細胞は GH1299/p53、使用培地は DMEM (high glucose) を用いた。線外照射はガンマセルを使用し、非照射群 (0Gy) 照射群 (3, 6, 9, 12Gy) に分類し、1 週間培養をした。Trypsine-DPBS を用いて細胞を single cell suspension の状態で回収した。

各細胞群に ^{18}F FDG ($4.5 \text{ MBq} / 100 \mu\text{l}$) ずつ投与したものから、サンプルを抽出した。1、15、30、45、60、90、120 分後に、ガンマカウンタを用いて細胞内への FDG 取り込み量 (Cin) を経時的に測定し細胞内外比 (Cin/Cout) を算出した。

4. 研究成果

(1) 非照射群 (0Gy) 照射群 (3, 6, 9, 12Gy) に分類し、1 週間培養をし細胞内への FDG 取り込み量 (Cin) を経時的に測定し細胞内外比 (Cin/Cout) を示す (図 1)。

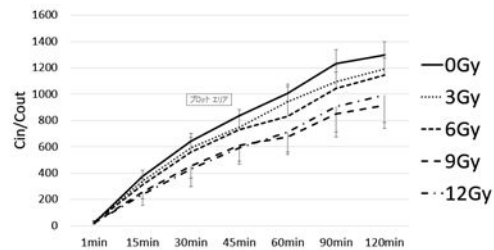


図 1 照射量と Cin/Cout の時間変化
非照射 Control に対して照射群ではほぼ線量依存性に Cin/Cout は低下を示した。

(2) 肺癌細胞の FDG の取り込みを上げるために、低グルコースの環境でどれほど生存できるかを観察した。6.20Mol glucose DMEM (市販高濃度) と 0.18mMol free glucose DMEM (論文より) を用いた。



図 2 Glucose free 培養下での細胞への影響

Glucose free 下において 50 時間で 12Gy 照射群は死滅した。0, 6, 12Gy 群ではいずれも 24 時間時点での生存を確認した。

(3) 照射量と細胞増殖曲線

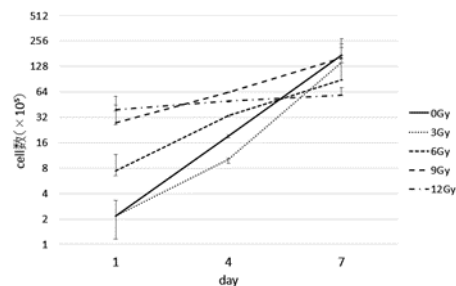


図 3 照射量と H1299 増殖曲線

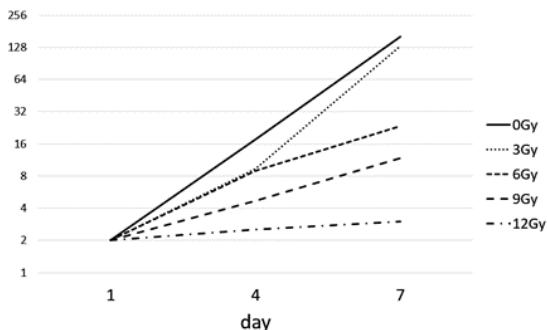


図4 照射量とH1299cell増殖能(Replication rate: RR)

(4) FDG投与24-48時間前に培地をDMEM (glucose free)へ交換
 0Gy(培地交換なし), 0Gy, 6Gy, 12Gy(24h前交換), 0Gy(48h前交換)の5群に分類。
 2mM EDTA-DPBSを用いて細胞をsingle cell suspensionの状態を回収し、各群 1×10^6 個/mlとなるよう細胞濃度を調整した。
 各細胞群に ^{18}F FDG (4.5MBq/100 μl)ずつ投与したのち、サンプルを抽出。1、15、30、45、60、90、120分後に、ガンマカウンタを用いて細胞内へのFDG取り込み量(Cin)を経時的に測定し細胞内外比(Cin/Cout)を算出した。

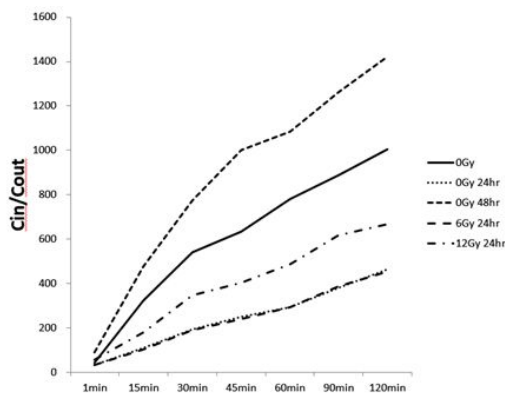


図5 照射量とH129

glucose free 培地での培養時間、照射量とは関係がないことが示された。

・6Gy照射群より12Gy照射群のほうがFDG取り込み量が多かった。

・glucose freeでの培養時間(絶食時間)はFDG取り込みに関係しなかった。

・細胞剥離時のEDTA-DPBSを用いる方法は、Trypsinを用いるよりも有用であると推察された。

細胞内へのFDG取り込みは各群いずれも経時的に増大していた。取り込み量は線量依存性に低下しているように見られた。

細胞の増殖速度についても同様に線量依存性に低下しているように見られ、12Gy照射

群に関してはほぼ曲線は横ばいとなっていた。

まとめ

細胞内へのFDG取り込みは各群いずれも経時的に増大していた。取り込み量は線量依存性に低下していた。

考察: これらの事件、事象の観察によって、放射線照射が腫瘍等代謝に及ぼす影響とアポトーシス発現の関連の複合的観察並びに評価を遂行しえた。

<引用文献>

1) Khoda ME, Utsunomiya K, Ha-Kawa S, Kanno S, Kono Y, Sawada S. An investigation of the early detection of radiation induced apoptosis by $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Annexin V and ^{201}Tl -Chloride in a lung cancer cell line. J Radiat Res 53:361-367, 2012.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Khoda ME, Utsunomiya K, Ha-Kawa S, Kanno S, Kono Y, Sawada S. An investigation of the early detection of radiation induced apoptosis by $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Annexin V and ^{201}Tl -Chloride in a lung cancer cell line. J Radiat Res 査読有、2012、53:361-367.

Ha-Kawa S, Ueno Y. Intussusception caused by an ileocecal lymphoma disclosed on ^{18}F -FDG-PET/CT. Intern Med. 2013、52:827-828.

河相吉, リンパ腫学 - 最新の研究動向 - VII. リンパ腫の検査・診断(分担)画像診断 FDG - PET 日本臨牀 73 巻増刊号 8、2015 年

河相吉, 最新放射線医学 第9巻「放射線医学 核医学・PET・SPECT」、編集 小須田茂 監修 榎林 勇・杉村和朗(分担)消化器核医学 p55-61, 金芳堂 2012 年 [学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権] 出願状況(計0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:
 国内外の別:

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河 相吉 (Ha-Kawa, Sangkil)

関西医科大学 医学部 准教授

研究者番号：

25461853

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：