

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591781

研究課題名(和文)腫瘍におけるFDG取り込みレベルとp53ステータスとの相関性に関する生物学的検討

研究課題名(英文)Biological analysis of the relationship between FDG uptake and p53 status

研究代表者

森 宣(Hiromu, Mori)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：20128226

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)：近年、多くの癌細胞に共通した性質の一つである「p53機能低下」が癌細胞の糖代謝亢進に影響することが示唆されている。本研究では、p53ステータスの異なる各種がん細胞株を用いて、p53ステータスとFDGの細胞内取り込みの関連性について調べた。ヒト正常線維芽細胞BJ/hTERT細胞のp53をノックダウンした細胞においては、対照ノックダウン細胞と比べて、FDG取り込み能が変化することはなかった。一方、p53を欠失しているヒト肺がん由来H1299細胞に正常p53を導入した細胞において、H1299親株とFDGの取り込みを比較したところ、ほとんど変化はなかった。

研究成果の概要(英文)：FDG PET has been widely used in tumor diagnosis. In FDG PET, incorporations of FDG drug in tumor cells are more than normal tissue. It is suggested that deficiency of p53 function are related in FDG incorporation. However the details are unknown. Here we examined the relationship between p53 status and the levels of FDG incorporation into cells. In normal human fibroblast cells and breast cancer cell line MCF7, they contain wild type p53, and the expression of p53 was suppressed by knockdown method. The results showed that the knockdown of p53 gene was not affected in incorporation of FDG in these cells. In H1299 cells, which delete p53 expression, expression vector of wild type p53 was introduced and FDG incorporation was examined. However the levels of FDG incorporations in the cells are not different from that in parent H1299 cells. These results suggest that it is difficult to predict the p53 status by the incorporation levels of FDG.

研究分野：放射線医学

キーワード：PET FDG ワーブルゲ効果

1. 研究開始当初の背景

¹⁸F-フルオロデオキシグルコース (FDG)-PET(positron emission tomography) は、糖代謝亢進を利用した画像から腫瘍サイズを判別する方法である。¹⁸F-FDG-PET を利用することにより、腫瘍部位を同定でき、さらには腫瘍サイズを測定することにより治療効果を判定することもできる。大分大学医学部附属病院では「がんの治療効果」を判別する目的で¹⁸F-FDG-PETを利用している。

悪性化した癌細胞の特徴として、低酸素環境に適応していることがあげられる。これは古くから「ワーブルグ効果」として知られるが、糖代謝が活発であり、嫌氣的なエネルギー産生を主流としている。それに伴い、ミトコンドリアを介した好機的なエネルギー産生は減少する。近年の分子生物学的アプローチにより、「正常 p53 の発現低下がワーブルグ効果を促す」ということが示唆されている (Zhang et al 2011 PNAS, Jiang et al 2011 Nat Cell Biol)。

¹⁸F-FDG-PET 画像の SUV 値からワーブルグ効果が推測できるならば、「低酸素環境に適応したがん細胞」に対処し得る治療法の選択 (治療効果の予測) が PET 撮像時点で可能となり、極めて効果的である。これを実現するためには、図 1 に示すように、摘出腫瘍における p53 発現と ¹⁸F-FDG-PET 画像の SUV 値との間に高い相関性があるか否かを調べることが必要となる。また、SUV 値が高かった腫瘍において、「糖代謝亢進」及び「ミトコンドリア機能の低下」というワーブルグ効果の特徴が本当にみられるのか否かを検証することも必要となる。さらに、低酸素環境下にある腫瘍の特徴として、HIF-1(hypoxia inducible factor 1)が発現しており、そのターゲット遺伝子の発現も亢進している。そこで、¹⁸F-FDG-PET で SUV 値の高い腫瘍では、HIF-1 関連遺伝子の発現も高いのか否かについても調べる必要性は高い。これらの関連性を明らかにできれば、幅広く利用されている ¹⁸F-FDG-PET 診断により、効果的な癌治療法の選択が可能となる。

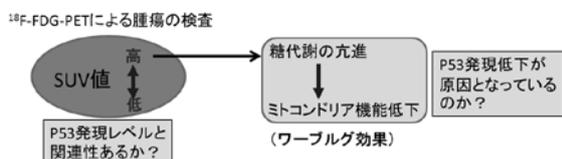


図1 FDG-PETにおけるSUV値がp53発現レベルと関連するかを明確にすることで、「がん細胞」の性質を推測できる。ワーブルグ効果により糖代謝は活性化し、ミトコンドリア機能は低下すると予想される。

2. 研究の目的

近年、多くの癌細胞に共通した性質の一つである「p53 機能低下」が癌細胞の糖代謝亢進に影響することが示唆されている。本研究では、p53 ステータスの異なる各種がん細胞株を用いて、p53 ステータスと

FDG の細胞内取り込みの関連性について調べることを目的とした。

3. 研究の方法

1. 細胞培養

本研究では、p53 ステータスの異なる各種がん細胞株および正常細胞を用いて、p53 ステータスと FDG の細胞内取り込みの関連性について調べた。p53 が正常な細胞として、ヒト正常線維芽細胞の BJ/hTERT 細胞、NB1RGB 細胞、HFL-III 細胞、ヒト乳がん由来 MCF7 細胞、ヒトアストロサイトーマ由来 Becker 細胞、ヒトアストロサイトーマ由来 Marcus 細胞、ヒトメデュロblastoma ONC-76 細胞、ヒトメラノーマ由来 C32 細胞を用いた。p53 を欠失した細胞として、ヒト肺がん由来 H1299 細胞、ヒトサルコーマ由来 Saos-2 細胞を用いた。p53 を欠失した H1299 細胞へ野生型 p53 発現ベクターを導入した細胞 (H1299wtp53)、および変異型 p53 (123A、175H、273H) 発現ベクターを導入した細胞も使用した。いずれの細胞の培養には、DMEM 培地 (和光純薬工業、大阪) に 10%牛胎児血清(FBS)を添加したものを使用し、37°C、5% CO₂ のインキュベーター下で培養した。

2. 細胞内 FDG 取り込み量の測定

大分大学医学部附属先端分子イメージングセンターに設置されているサイクロトロン加速器 HM-20S (住友重機械工業、東京) にて水素イオン加速により ¹⁸O の核反応により ¹⁸F を生成後、FDG 自動合成装置 F-300 (住友重機械工業) を利用してフルオロデオキシグルコース (¹⁸F-FDG 水溶液) を合成した。DMEM 培地にて終濃度 24~25MBq/ml となるよう調整し、各細胞へ処理した。細胞は 35mm ディッシュへ前日に植え込み、FDG 添加後は通常のインキュベーターで静置した。処理開始から 0.5、1、2 時間後において、細胞を PBS にて 2 回洗浄し、細胞が付着したディッシュごとドーズメーター (アクロバイオ社、東京) にて放射能を測定した。測定後、細胞をトリプシンにてはがし、PBS で懸濁液とし、細胞数を血球計数盤にてカウントした。細胞数 100000 個あたりの放射能を算出し評価を行った。

4. 研究成果

ヒト正常線維芽細胞 BJ/hTERT 細胞の p53 をノックダウンした細胞において、対照ノックダウン細胞と FDG 取り込みレベルを比較検討した。ウェスタンブロットにより p53 発現レベルがノックダウン処理 3 日後において顕著に減少することを確認した。ノックダウン処理 3 日後において、p53 ノックダウンにより FDG 取り込み能が亢進することはない、

むしろ取り込み量が減少することが確認された(図2)。一方、p53が正常であるヒト乳がん由来MCF7細胞においても、p53ノックダウンによるFDG取り込み能は減少する傾向が

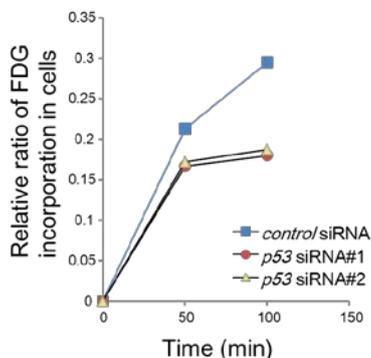


図2 正常線維芽細胞(BJ/hTERT)においてsiRNA処理3日後にFDGを処理し、細胞内取り込み量を測定した結果。P53のsiRNAは2種類用いた。

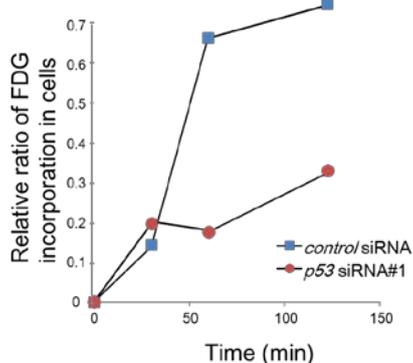


図3 ヒト乳がん由来細胞(MCF-7)においてsiRNA処理3日後にFDGを処理し、細胞内取り込み量を測定した結果。

見られた(図3)。

次に、p53を欠失しているヒト肺がん由来H1299細胞に正常p53を導入した細胞において、H1299親株とFDGの取り込みを比較した。その結果、FDG取り込み能にはほとんど変化は見られなかった。H1299細胞へ変異型p53を導入した細胞においても同様にFDG取り込み能を調べた。変異の種類は123アラニン変異、175ヒスチジン変異、273ヒスチジン変異の3種類の変異をそれぞれ導入したp53を発現させた細胞で調べた。その結果、H1299親株細胞と比べ、FDG取り込みに変化が見られた細胞はなかった。Saos-2細胞においても同様の変異型p53発現細胞でFDG取り込みを調べたが、Saos-2親株細胞と比べてFDG取り込み能が変化することはなかった。

以上の結果より、培養細胞においてp53の発現を調節することにより、FDG取り込み能が変化することはないということが分かった。

一方、p53が正常である細胞株6種において、FDGの取り込みを経時的に調べたところ、細胞株によりその取り込み能は大きく異なることがあることが分かった(図5)。このこ

とは、FDGの取り込み能はp53のステータス以外の要因で大きく変わることを示唆して

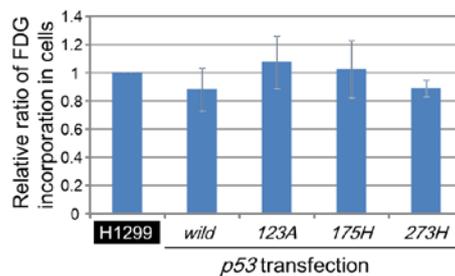


図4 ヒト肺がん由来H1299細胞(p53欠失)へ各種p53を導入した細胞におけるFDG取り込み能の比較検討結果。

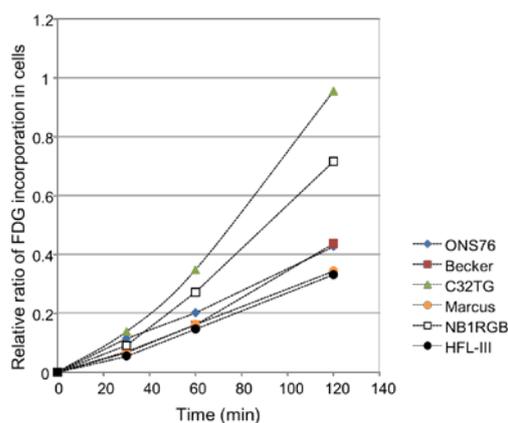


図5 正常p53遺伝子を持つ細胞株6種における細胞内FDG取り込み能の比較検討結果。

いる。

本研究の結果より、腫瘍における¹⁸F-FDG-PETのSUV値と摘出腫瘍におけるp53発現低下との間の相関性は低いと推測され、FDG-PET診断時点でのp53のステータス、または治療効果の予測を行うのは困難であると示唆される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

1. Kobashigawa S, Kashino G, Mori H, Watanabe M. Relief of delayed oxidative stress by ascorbic acid can suppress radiation-induced cellular senescence in mammalian fibroblast cells. Mech Ageing Dev. in press, DOI: 10.1016/j.mad.2015.05.002. 2015 (査読有)

2. Kobashigawa S, Kashino G, Suzuki K, Yamashita S, Mori H. Ionizing radiation-induced cell death is partly caused by increase of mitochondrial reactive oxygen species in normal human fibroblast cells. Radiat Res. 183 : 455 - 464, 2015 (査読有)

3. Kashino G, Hayashi K, Douhara K, Kobashigawa S, Mori H. Comparison of the

biological effects of (18)F at different intracellular levels. *Biochem Biophys Res Commun.* 454 : 7 – 11, 2014 (査読有)

4. Hayashi K, Douhara K, Kashino G. Evaluation of the bubble point test of a 0.22- μ m membrane filter used for the sterilizing filtration of PET radiopharmaceuticals. *Ann Nucl Med.* 28 : 586-592, 2014 (査読有)

5. Kashino G, Suzuki K, Kodama S, Watanabe M, Prise KM. Increased susceptibility to delayed genetic effects of low dose X-irradiation in DNA repair deficient cells. *Int J Radiat Biol.* 89 : 295-300, 2013 (査読有)

6. Kashino G, Tamari Y, Kumagai J, Tano K, Watanabe M. Suppressive effect of ascorbic acid on the mutagenesis induced by the bystander effect through mitochondrial function. *Free Radic Res.* 47 : 474 – 479, 2013 (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

1. Genro Kashino, Kazutaka Hayashi, Kazumasa Douhara, Shinko Kobashigawa, Hiromu Mori. Analysis of the biological effects of 18F at different intracellular levels. 15th International Congress of Radiation Research, 2015 年 5 月 25 日～26 日、国立京都国際会館、京都市

2. Genro Kashino, Kazutaka Hayashi, Hiromu Mori. The relationship between p53 status and FDG accumulation in tumor cells 第 54 回日本核医学学会学術総会、2014 年 11 月 6 日、大阪国際会議場、大阪市

3. 菓子野元郎、林和孝、堂原一将、小橋川新子、森宣 PET 薬剤による被ばくの影響、第 51 回放射線影響懇話会、2014 年 6 月 14 日、長崎大学、長崎市

4. 菓子野元郎、林和孝、堂原一将、小橋川新子、森宣 PET 薬剤の細胞内取り込みレベルと被ばく影響の解析、第 53 回日本核医学学会学術総会、2013 年 11 月 8 日、福岡・福岡国際会議場

5. 菓子野元郎、林和孝、堂原一将、小橋川新子、森宣 フッ素 18 の細胞内取り込みレベルと被ばく影響の評価、日本放射線影響学会第 56 回大会、2013 年 10 月 18 日、青森・ホテルクラウンパレス青森

6. Genro Kashino, Keiko Morikawa, Hiromu Mori Mechanism of the radiosensitization induced by gemcitabine in pancreatic cancer cells, 第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 4 日、横浜・パシフィコ横浜

7. 菓子野元郎、堂原一将、森宣 ¹⁸F-フルオロデオキシグルコース (¹⁸F-FDG) 処理細胞における生物学的影響評価、第 5 2 回日本核医学会学術総会、2012 年 10 月 12 日、札幌・ホテルロイトン札幌

8. Genro Kashino, Jun Kumagai, Hiromu Mori Mitochondrial modulation in radiation induced bystander effect in human cells, 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、札幌・ホテルロイトン札幌

9. 菓子野元郎、堂原一将、森宣 ¹⁸F-フルオロデオキシグルコース処理細胞における放射線影響評価、日本放射線影響学会第 55 回大会、2012 年 9 月 8 日、仙台・東北大学川内北キャンパス

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.oita-u.ac.jp/imaging/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 宣 (Mori, Hiromu)
大分大学・医学部・教授
研究者番号 : 20128226

(2) 研究分担者

菓子野 元郎 (KASHINO, Genro)
大分大学・医学部・准教授
研究者番号 : 00437287

松本俊郎 (MATSUMOTO, Shunoro)
大分大学・医学部・准教授
研究者番号 : 80219500

山田康成 (YAMADA, Yasunari)
大分大学・医学部・講師
研究者番号 : 60244183