

HeLa S3細胞における ^{125}I -transferrin と ^{67}Ga -citrate の動態の比較

川崎医療短期大学 放射線技術科 川崎医科大学 核医学教室*

村中 明 *大塚 信昭 *福永 仁夫 西村 明久 西下 創一

(平成元年 8 月 28 日受理)

Comparison of Kinetics of ^{125}I -transferrin and ^{67}Ga -citrate in HeLa S3 Cells

Akira MURANAKA, Nobuaki OTSUKA*, Masao FUKUNAGA*,
Akihisa NISHIMURA and Soichi NISHISHITA

Department of Radiological Technology, Kawasaki College of Allied Health Professions

*Department of Nuclear Medicine, Kawasaki Medical School

Kurashiki, Okayama 701-01, Japan

(Received on Aug. 28, 1989)

Key words: ^{67}Ga -citrate, ^{125}I -transferrin, 集積機序, 培養細胞

概 要

腫瘍細胞における ^{67}Ga -citrate (^{67}Ga) の集積機序を明らかにするために、培養細胞を用いて ^{125}I -transferrin (Tf) と ^{67}Ga の動態を種々の条件で検討し、すでに知られている鉄の細胞内集積過程と比較した。HeLa S3 における ^{67}Ga の摂取は培地中の Tf 濃度によって変化し、また経時的に増加した。 ^{67}Ga は細胞内に蓄積されており、ほとんど排泄されなかった。細胞膜運動が抑制されている 4°C では、 ^{67}Ga は摂取されなかった。 ^{125}I -Tf は細胞表面の Tf receptor と特異的に結合して細胞内に摂取されており、 37°C では著明に排泄されるが 4°C では排泄が少なかった。したがって、少なくとも *in vitro* においては Tf の関与した ^{67}Ga の腫瘍細胞集積機序が存在し、 ^{67}Ga は鉄の receptor-mediated endocytosis の過程と同様な機序によって腫瘍細胞へ取込まれると考えられた。

1. はじめに

核医学における腫瘍イメージングでは、 ^{67}Ga -citrate (^{67}Ga) が日常臨床に広く用いられている。 ^{67}Ga は悪性腫瘍のみならず炎症巣にも集積し必ずしも腫瘍特異性がないこと、また腸管への排泄があり消化器癌の検出能力が低い等の欠点が指摘されてきたにもかかわらず、現在でもその使用量は年々増加する傾向がある¹⁾。最近、より特異性の高い腫瘍イメージングを目指して、放射性同位元素標識モノクローナル抗体を用いた免疫シンチグラフィが精力的に研究され、その臨床応用が期待されている²⁾。しかし、 ^{67}Ga に代って日常臨床に広く用いられるようになるには、解決しなければならない多くの問題が残

されている。

^{67}Ga の腫瘍集積機序に関しては、多くの研究報告があるにもかかわらず、不明な点が多い³⁾。Larson ら⁴⁾ は、 ^{67}Ga の腫瘍細胞への集積は transferrin (Tf) と結合した ^{67}Ga が細胞の Tf receptor を介して取込まれることを報告している。我々も培養細胞を用いた *in vitro* の実験から、腫瘍細胞への ^{67}Ga の集積に影響する種々の因子を検討し報告してきた^{5,6,7)}。

一方、Tf とその receptor 系は生体における鉄の輸送に重要な役割を果していることが知られている。さらに、近年、この系は細胞の増殖や分化および免疫系においても機能している可能性を示唆する結果が報告され、注目されている⁸⁾。また、細胞へ鉄を供給する Tf-Tf receptor

系は, receptor-mediated endocytosis の格好のモデルとして, 種々の細胞でその機能の解析が進んでいる⁹⁾。

今回我々は, 培養細胞における ^{125}I -Tf および ^{67}Ga の動態を種々の条件で検討し, すでに報告されている鉄の receptor-mediated endocytosis による細胞内集積の機序と ^{67}Ga の腫瘍細胞内集積機序との比較を試みた。

2. 実験の材料と方法

2.1 培養細胞

使用した細胞は HeLa S3 で, 10% fetal calf serum, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシン, 0.3mg/ml グルタミンを含んだ minimum essential medium (MEM) 中で monolayer のかたちで培養維持されているものを用いた。

2.2 放射性同位元素

^{67}Ga -citrate (^{67}Ga) は第一ラジオアイソトープ研究所製のものを生理食塩水で希釈して用いた。

^{125}I -transferrin (^{125}I -Tf) は人 apo Tf (90% 以上 iron free) に ^{125}I をラクトペルオキシダーゼ法で標識した。製造時の比放射能は 14~16 μCi (518~592 kBq)/ μg であり, 標識率はペーパークロマトグラフィ (展開溶媒: 75% MeOH) で 94% 以上であった。吸着の防止と安定性を高めるために bovine serum albumin (BSA) を 1mg/ml の濃度に加えた。 ^{125}I -Tf は凍結保存しておき, 実験時に溶解し phosphate buffer で希釈して用いた。

2.3 ^{67}Ga の摂取と排泄の測定

HeLa S3 における ^{67}Ga の摂取と排泄の測定は, 先に報告した方法⁵⁾ にしたがって行った。略記すると, 細胞をプラスチックシャーレにまき込み, 37°C で 20~24 時間培養した後, 培地を人 apo Tf を 0~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に含んだ MEM に交換した。さらに, ^{67}Ga を 1 μCi (37 kBq)/ml の濃度に加え, 4°C または 37°C で 0.5~24 時間培養して ^{67}Ga を細胞に取込ませた。その後, cold PBS で細胞を洗浄し, シャーレから細胞をはがしてプラスチック試験へ移した。さらに, 細胞を cold PBS で遠心により洗浄して, 細胞に取込まれた ^{67}Ga の放射能および細胞数を測定した。そして, 培地中に加えた ^{67}Ga の全放射能に

対する細胞数 10^6 個あたり摂取率 (%dose/ 10^6 cells) を求めた。

今回の実験ではシャーレの表面から細胞を剝離するのに 2 つの方法を用いた。ひとつはラバー・ポリースメンを用いて物理的にかき取る方法, 他のひとつは 0.2% trypsin 液を用い 37°C で 15 分間の処理で細胞をはがす方法であり, 両者による ^{67}Ga の摂取への影響を検討した。

細胞から ^{67}Ga の排泄の測定では, ^{67}Ga を細胞とともに 3 または 24 時間培養して取込ませた後, cold PBS で洗浄し, ^{67}Ga を含んでいない新しい培地 (Tf を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に含む) に交換した。さらに, 4°C または 37°C で 6~24 時間培養し, ^{67}Ga の摂取の測定の場合と同様の方法で細胞中の ^{67}Ga の残存放射能を測定した。そして, 3 または 24 時間の ^{67}Ga の摂取量を 100% として残存率 (%) を計算した。

2.4 ^{125}I -Tf の摂取と排泄の測定

HeLa S3 における摂取と排泄の測定は, ^{67}Ga の場合と同様の方法で行った。ただし, ^{125}I -Tf の培地中の濃度は 0.5 μCi (19 kBq)/ml (Tf の濃度は約 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$, BSA の濃度は約 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を用いた。また, ^{125}I -Tf の容器への吸着を防止するために, 細胞洗浄に用いた cold PBS には 0.5% BSA を添加した。

3. 結 果

Fig. 1 に HeLa S3 における ^{125}I -Tf と ^{67}Ga の摂取におよぼす MEM 中の Tf 濃度および trypsin 処理の影響を検討した結果を示した。この実験では, 細胞を ^{125}I -Tf または ^{67}Ga とともに 37°C で 6 時間培養を行い, 摂取率を求めた。 ^{125}I -Tf の摂取率は MEM 中の Tf 濃度が高くなるにつれて著明に減少した。また, ラバー・ポリースメンを使用 (trypsin 処理なし) して細胞を剝離した場合と trypsin 処理を行った場合を比較すると, ^{125}I -Tf の摂取率は trypsin 処理によって著明に減少し, trypsin 処理をしない場合の 10~30% であった。一方, ^{67}Ga の摂取率は培地中の Tf 濃度とともに増加し, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でピークに達したが, さらに Tf 濃度が増すと漸次減少した。また, trypsin 処理の影響は少なく, trypsin 処理をしない場合の 70~96% にとどまった。

Fig. 2 に HeLa S3 における ^{125}I -Tf と ^{67}Ga の摂取の経時的変化を 4°C と 37°C で検討した結果を示した。 ^{125}I -Tf の摂取は MEM only (Tf の添加はなし) の培地中で、 ^{67}Ga の摂取は MEM に $100\mu\text{g/ml}$ の Tf を添加した培地中で測定し、また両者の測定ともラバー・ポリスメンを使用した。 ^{67}Ga の摂取率は、 37°C では培養時間に比

例して直線的に増加した。しかし、 4°C では培養時間に無関係に低値を示し、ほとんど摂取されなかった。一方、 ^{125}I -Tf の摂取率は、 37°C では培地中へ ^{125}I -Tf 投与後急速に増加し、3 時間で平衡に達した。 4°C では平衡に達する時間が 37°C の場合よりも遅れたが、6 時間で 37°C の場合と同程度の摂取率を示した。

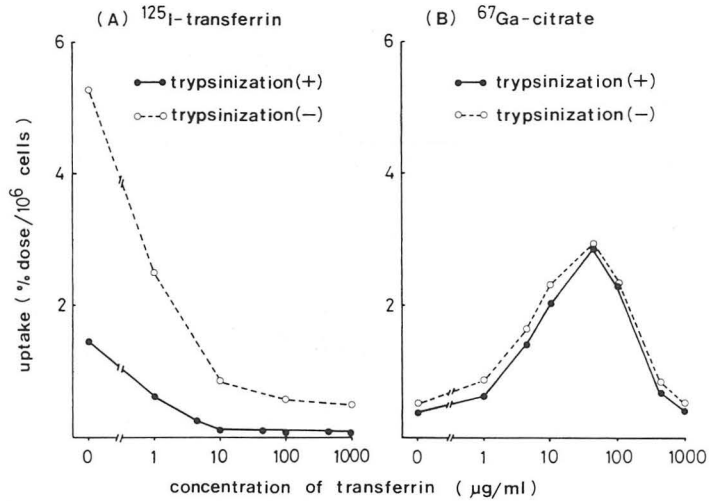


Fig. 1 Effect of various concentrations of human transferrin and trypsinization on ^{125}I -transferrin (A) and ^{67}Ga -citrate (B) uptake by HeLa S3. Cells were incubated with $0.5\mu\text{Ci/ml}$ ^{125}I -transferrin or $1\mu\text{Ci/ml}$ ^{67}Ga -citrate for 6 hours at 37°C .

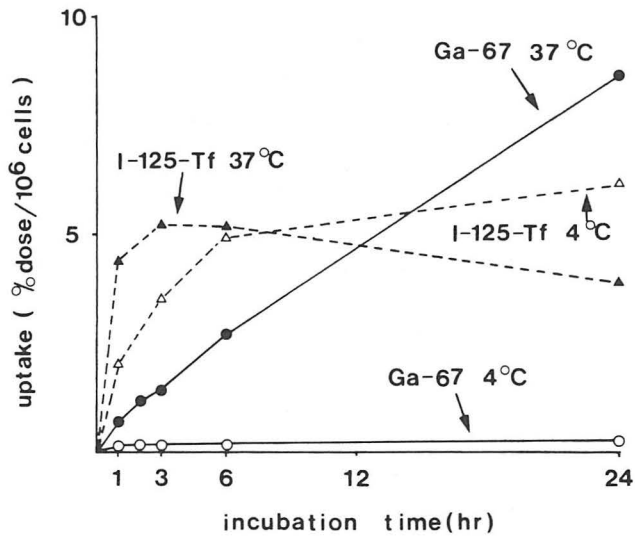


Fig. 2 Time course of ^{125}I -transferrin and ^{67}Ga -citrate uptake by HeLa S3 at 4°C or 37°C

Table 1 に HeLa S3 における ^{125}I -Tf と ^{67}Ga の摂取およびその排泄を 4°C と 37°C で検討した結果を示した。 ^{125}I -Tf と ^{67}Ga の摂取の測定は Fig. 2 の場合と同様の条件で行い、排泄の測定は両者とも MEM に 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Tf を加えた培地中で行った。37°C で摂取された ^{67}Ga の細胞中の残存率は、4°C および 37°C のいずれにおい

ても 90% 程度であり、 ^{67}Ga の細胞からの排泄は少なかった。一方、37°C で摂取された ^{125}I -Tf の細胞中の残存率は、37°C では 5~15% と低値で、著明な排泄が認められた。しかし、4°C では残存率が 83% であり、排泄が抑制された。4°C で摂取された ^{125}I -Tf の細胞中の残存率は、4°C でも 25% 程度と小さく、排泄が多くなった。

Table 1 Comparison of uptake and excretion of ^{125}I -transferrin(Tf) and ^{67}Ga -citrate in HeLa S3

	uptake(% dose/ 10^6 cells) ^a	retention(%)	
		4 C°	37 C°
	<u>3 hr-uptake</u>	<u>6 hr-retention</u>	
^{125}I -Tf	2.8 ± 0.9(4°C)	25.2	—
	4.3 ± 0.7(37°C)	83.1	14.8
^{67}Ga	1.5 ± 0.3(37°C)	87.7	88.1
	<u>24 hr-uptake</u>	<u>12 hr-retention</u>	
^{125}I -Tf	2.6 ± 0.6(37°C)	—	5.4
^{67}Ga	10.5 ± 2.6(37°C)	—	90.1

a. Cells were incubated with 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^{125}I -Tf in MEM only or 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^{67}Ga in MEM containing 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tf.

4. 考 察

^{67}Ga -citrate を生体に静注すると、血液中ではそのほとんどが血漿中において transferrin (Tf) と結合していることが知られており¹⁰⁾、 ^{67}Ga -Tf として各組織へ輸送される。腫瘍組織では、新生血管の増成、血管壁の膜透過性の亢進、extracellular space の増加が認められ¹¹⁾、これらの性状が血液中の ^{67}Ga が正常組織よりも腫瘍組織により多く集積する因子として考えられている。腫瘍細胞表面付近に運ばれた ^{67}Ga が細胞内に摂取される機序に関して、Larson ら⁴⁾は、培養細胞を用いた in vitro の実験から、鉄の場合と同様に ^{67}Ga -Tf は腫瘍細胞表面の Tf receptor を介して endocytosis によって摂取されるという説を報告した。この報告以来、 ^{67}Ga の腫瘍集積と鉄代謝との関連が増々重要視され、研究が進められている。

一方、近年 Tf receptor は種々の腫瘍細胞でも存在することが見出され、その関与による鉄の細胞内摂取の過程が詳細に研究されている。その概要は⁹⁾、鉄 2 原子と結合した di-ferric Tf は細胞表面の Tf receptor と結合し、そのまま細胞内へ endocytosis によって取込まれる。その後、小胞内の pH の変化によって鉄のみを放

出し、apo Tf と Tf receptor は細胞表面へリサイクルされ、再利用される。このサイクルはかなり速く、4~14 分で細胞内に取込まれた Tf の半分が apo Tf として細胞外へ出てくると言われている⁸⁾。今回我々は、このような鉄における receptor-mediated endocytosis の過程が ^{67}Ga の場合にも成立するかどうかの検討を、培養細胞を用いた in vitro の実験系で行った。

HeLa S3 の ^{125}I -Tf の摂取率は、培地中の Tf 濃度の増加に伴って著明に減少した。この結果は、HeLa S3 の細胞表面に Tf receptor が存在し、 ^{125}I -Tf は培地中の Tf と競合しながら特異的に Tf receptor と結合することを示している。また、 ^{125}I -Tf の摂取率は trypsin 処理によって著明に減少した。trypsin はタンパク分解酵素であり、この処理によって細胞表面の Tf receptor と結合した ^{125}I -Tf が分解除去されるものと考えられる。また、Tf とその receptor の細胞内から細胞外へリサイクルされる時間を考慮すると、trypsin 処理の 15 分の間に細胞内に摂取された一部の ^{125}I -Tf が細胞外へ放出されていることも予想される。したがって、 ^{125}I -Tf の摂取率を評価する場合には、trypsin 処理を用いるのは不適当と考えられる。

培地中の Tf 濃度の変化に伴う HeLa S3 の

^{67}Ga の摂取率の変化は、Larson ら⁴⁾ の EMT-6 sarcoma を用いた実験結果と同様の傾向を示した。以前に報告⁶⁾ したとおり、 ^{67}Ga は培地中で高率に Tf と結合しており、Tf と結合した ^{67}Ga は細胞表面の Tf receptor を介して細胞内に取込まれていると推定できる。また、 ^{67}Ga の摂取率は trypsin 処理の影響をほとんど受けなかった。これは、 ^{67}Ga は ^{125}I -Tf とは異なり、そのほとんどが細胞内へ摂取されていて簡単に細胞外へ放出されないことを示している。

^{125}I -Tf と ^{67}Ga の摂取を経時的に検討した結果では、37°C における ^{125}I -Tf の摂取率は培養時間 3 時間で平衡に達したが、 ^{67}Ga の摂取率は 24 時間まで直線的に増加した。この結果は、 ^{67}Ga が Tf と結合して細胞内に endocytosis によって取込まれても細胞内での両者の動態は異なり、 ^{67}Ga だけが細胞内に蓄積されていると考えられる。また、4°C で細胞膜の運動が抑制されていると考えられる状態では、 ^{125}I -Tf の摂取率は 37°C の場合とあまり変化しないのに対し、 ^{67}Ga はほとんど摂取されなかった。37°C の培養では細胞は増殖し細胞数が増加するが 4°C では細胞数の増加がないこと、37°C と 4°C では ^{125}I -Tf の標識の安定性に違いがある可能性があること等から、37°C と 4°C における長時間の摂取率を絶対値として比較するのは問題があるかもしれない。しかし、この結果から、 ^{125}I -Tf と細胞表面の Tf receptor との結合は低温でも著明に変化しないが、Tf を介した ^{67}Ga の集積には細胞膜運動が必要であることが推定できる。

細胞へ摂取された ^{125}I -Tf と ^{67}Ga の動態の差異をさらに明らかにするために、両者の細胞からの排泄を検討した。HeLa S3 に摂取された ^{67}Ga はいずれの条件でもほとんど排泄されず、細胞内物質と強く結合しているものと考えられる。一方、37°C で摂取された ^{125}I -Tf は、37°C では著明に排泄されるが、4°C では排泄が少なかった。この結果は、37°C で摂取された ^{125}I -Tf は細胞表面の Tf receptor に結合しているだけでなく、その多くは細胞内に取込まれており、37°C では細胞内の ^{125}I -Tf はリサイクルされて細胞外へ排泄されるが、4°C では細胞膜運動が抑制されているため細胞内に残存していると推定される。4°C で摂取された ^{125}I -Tf は細胞表面

の Tf receptor と結合しているだけと考えられ、4°C においても排泄が多かった。

以上の今回の我々の実験結果から、 ^{67}Ga は鉄の receptor-mediated endocytosis の過程と同様な機序によって腫瘍細胞内へ取込まれていると結論づけられる。すなわち、 ^{67}Ga -Tf として腫瘍細胞表面の Tf receptor と結合し、そのまま endocytosis によって細胞内に取込まれる。その後、細胞内で ^{67}Ga は Tf から離れて他の細胞内物質と結合して蓄積され、Tf およびその receptor は細胞表面および細胞外へリサイクルされているものと推定できる。しかし、今回の実験は in vitro のものであり、生体における ^{67}Ga の腫瘍組織への集積が Tf の関与のみで説明できるかは即断できない。生体において、Tf の関与した ^{67}Ga の腫瘍集積の直接的な証明は未だなされていない。また、Hays ら¹²⁾ は、担癌ラットの ^{67}Ga の分布におよぼすスカンジウムや鉄等の影響を検討した結果から、正常軟部組織の ^{67}Ga の集積は Tf との結合によって増加するが、腫瘍組織では free ^{67}Ga がタンパク質との loosely bound form の ^{67}Ga が集積すると報告している。生体では多くの因子が複雑に影響しあい解析は困難であるが、 ^{67}Ga による腫瘍シンチグラフィの有用性を高めるために、生体における ^{67}Ga の集積機序をさらに解明する必要があると考えられる。

文 献

- 1) 日本アイソトープ協会編：核医学利用統計（昭和 63 年度），ISOTOPE NEWS, No. 421, 37~44 (1989)
- 2) 井上登美夫，他：ラジオアイソトープ標識抗体による免疫シンチグラフィ，ISOTOPE NEWS, No. 413, 27~31 (1988)
- 3) Hoffer P. : Gallium : Mechanisms. J. Nucl. Med., 21, 282~285 (1980)
- 4) Larson S. M., et al : Common pathway for tumor cell uptake of gallium-67 and iron-59 via a transferrin receptor. J. Natl. Cancer Ins., 64, 41~53 (1980)
- 5) Muranaka A., et al : Role of FeCl_3 in ^{67}Ga uptake by HeLa S3 cells in vitro. Eur. J. Nucl. Med., 8, 408~411 (1983)
- 6) 村中明，他： ^{67}Ga の腫瘍集積におよぼす FeCl_3 , ScCl_3 , stable Ga の影響の比較，川崎医療短期

- 大学紀要, 2, 51~58 (1982)
- 7) 西下創一, 他: In vitro における腫瘍細胞への Ga-67 集積に対する transferrin の役割, 川崎医学会誌, 8, 316~321 (1982)
- 8) 吉森保: トランスフェリンとトランスフェリンレセプター, 細胞工学, 2, 1361~1364 (1983)
- 9) Dautry-Varsat A., et al : pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 2258~2263 (1983)
- 10) Gunasekera S. W., et al : The behavior of tracer gallium-67 towards serum proteins. Clin. Chim. Chim. Acta, 39, 401~406 (1972)
- 11) Tsan M. F., et al : Mechanism of gallium-67 accumulation in tumors. J. Nucl. Med., 27, 1215~1219 (1986)
- 12) Hayes R. L., et al : Studies of the in vivo entry of Ga-67 into normal and malignant tissue. J. Nucl. Med., 22, 325~332 (1981)