

In vitro における HeLa S3 への Ga-67 集積に 対する FeCl₃ の役割

川崎医科大学 放射線医学教室

西下 創一, 村中 明
沢井 通彦, 斉藤 純一

(昭和57年8月20日受付)

Role of FeCl₃ in Ga-67 Uptake by HeLa S3 *in vitro*

Soichi Nishishita, Akira Muranaka
Michihiko Sawai and Junichi Saito

Department of Radiology, Kawasaki Medical School

(Accepted on August 20, 1982)

⁶⁷Ga の腫瘍集積における transferrin の役割を念頭において, *in vitro* における HeLa S3 の ⁶⁷Ga 摂取におよぼす FeCl₃ の影響を検討した. HeLa S3 ⁶⁷Ga の摂取は培地中の血清の濃度, 特に transferrin の濃度によって変化し, transferrin に仲介された ⁶⁷Ga の集積機序が存在するものと考えられた. しかし, これと同様な実験系において, 培地中に 10⁻²~10⁻¹mM の FeCl₃ を投与すると, ⁶⁷Ga の摂取が著明に増加した. 一方, 平衡透析により, FeCl₃ を投与すると ⁶⁷Ga と transferrin の結合は阻害されるが, cellulose 膜を通過しない ⁶⁷Ga-Fe complex の形成が認められた. この complex の形成と HeLa S3 における ⁶⁷Ga の摂取の増加には明らかな相関が認められた. これらの結果は, ⁶⁷Ga の腫瘍集積に transferrin に関係しない集積機序も存在する可能性を示すものと考えられる.

Keeping the role of transferrin in mind, the effect of FeCl₃ on Ga-67 uptake by HeLa S3 was studied *in vitro*. Ga-67 uptake by HeLa S3 was influenced by the concentration of serum in the medium and especially by that of transferrin added to the medium. Therefore, it is supposed that there exists the mechanism of Ga-67 uptake mediated by transferrin. However, when 10⁻²~10⁻¹mM of FeCl₃ was added to the medium in the same experimental system, a remarkable increase of Ga-67 uptake was noted. From the results of equilibrium dialysis, binding of Ga-67 to transferrin was inhibited by the administration of FeCl₃. Moreover, there was noted a formation of complex of Ga-67 and FeCl₃ which did not pass through the cellulose membrane. A correlation was noted between an increase in Ga-67 uptake by HeLa S3 and formation of the Ga-67-Fe complex. These results indicate that another mechanism of Ga-67 accumulation, namely the formation of Ga-67-Fe complex plays a role in the uptake of Ga-67 by tumor cells beside the mediation of transferrin.

緒 言

^{67}Ga -citrate を用いた imaging は、多くの臓器の悪性腫瘍および炎症巣の臨床的診断に広く利用されている。しかし、 ^{67}Ga の集積機序に関しては、多くの因子が報告されてきたにもかかわらず、未だ一貫した説明がなされていない。¹⁾ Larson ら²⁾ は、腫瘍細胞における transferrin receptor の存在と transferrin に仲介された ^{67}Ga の腫瘍集積機序を報告している。一方、Hayes ら³⁾ は動物実験の結果から、in vivo における ^{67}Ga の腫瘍組織への早期の集積は、主として血漿蛋白と結合しない ^{67}Ga またはゆるく結合している ^{67}Ga の型が関係していると報告している。また、 ^{67}Ga を用いた腫瘍 imaging において、鉄剤を投与することによって、腫瘍組織対非腫瘍組織比を増加させる試みが基礎的臨床的に行われているが、^{4)~6)} 一定した見解が得られていない。

この研究においては、 ^{67}Ga の腫瘍集積機序に関するこれらの矛盾する考えを念頭において、培養細胞を使用した in vitro の実験系を使用し、腫瘍細胞の ^{67}Ga 摂取におよぼす FeCl_3 の影響を検討した。

実験材料と方法

この研究に使用した細胞は人子宮頸癌由来の HeLa S3 である。この細胞は 10% fetal calf serum (FCS), 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシン, 0.29 mg/ml グルタミンを含んだ minimum essential medium (MEM) 中で培養維持されている。HeLa S3 は monolayer のかたちで、対数増殖期では約 19 時間の doubling time で増殖しており、実験はすべてこの対数増殖期で行った。また、0.5% trypan blue の排除試験によって求めた細胞の viability はすべての実験を通じて 95% 以上であった。

HeLa S3 における ^{67}Ga 摂取の測定においては、細胞を直径 35 mm のプラスチックシャーレにまき込み、2 ml の 10% FCS を含む MEM を加え、5% CO_2 incubator を用いて 37°C で 20~24 時間培養した。その後、PBS で 3 回洗

浄し、2 ml の血清を含まない MEM (MEM only) あるいは、FCS, 正常人血清 (HS) または 90% 以上 iron free である human apo-transferrin (Tf) を種々の濃度に含んだ MEM を加えた。さらに、 ^{67}Ga -citrate (第 1 ラジオアイソトープ研究所) を通常 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ -medium の濃度に、 FeCl_3 を 0~10⁻¹ mM の濃度に加え、37°C で 24 時間培養した。その後、細胞を cold PBS で 3 回洗浄し、0.2% trypsin 液 1 ml を加え 37°C で 15 分間 incubate し、細胞をシャーレからはがした。細胞をプラスチック試験管に移し、シャーレに付着していた ^{67}Ga の影響を除くために cold PBS 8 ml で遠心によって 2 回洗浄し、細胞に摂取された ^{67}Ga の放射能を測定した。一方、この時点における細胞数を計測し、細胞数は 60~100 $\times 10^4/\text{dish}$ であった。なお、FCS 10% を含んだ MEM から MEM only および HS, Tf を含む MEM に交換しても、さらに FeCl_3 を 10⁻⁴~10⁻¹ mM の濃度に投与しても、その後 48 時間までは細胞の増殖に大きな影響を与えなかった。HeLa S3 の ^{67}Ga 摂取は、シャーレに加えた ^{67}Ga の放射能に対する細胞数 10⁶ 個あたりの取込みの割合 (% dose/10⁶ cells) として表わした。

HeLa S3 からの ^{67}Ga の排泄を測定する場合には、 ^{67}Ga 摂取の測定の場合と同様に細胞を種々の培地中で ^{67}Ga とともに 24 時間培養した後、PBS で洗浄し 2 ml の新しい培地に交換した。一部のシャーレには、deferoxamine (Def) を 0.1 mg/ml の濃度で加えた。そして、 ^{67}Ga の排泄を促進し、再摂取を防ぐために 2, 4, 6, 8, 10 時間後に培地を交換しながら 12 時間 37°C で培養した。その後、 ^{67}Ga の摂取と同様な方法で、 ^{67}Ga の細胞中の残存放射能を測定し、 ^{67}Ga の 24 時間における取込みを 100% として残存率を計算した。

Cellulose 膜を用いた平衡透析によって、HS, FCS および Tf と ^{67}Ga の in vitro における結合、さらにそれに対する FeCl_3 の影響を検討した。Cellulose 膜の孔径は 24 Å であり、前処置として、50 mM EDTA を含む 5% 炭酸ナトリウム液中で 5 分間煮沸した。種々の濃度に

HS, FCS あるいは Tf を含む MEM 中に ⁶⁷Ga (通常 1 μCi/ml) と FeCl₃ (0~10⁻¹mM) を加え, 37°C で 24 時間 incubate した. その後, その試料 1 ml を cellulose bag の中に充填し, 回転させながら MEM (pH 7.2~7.4) 8 ml に対して 4°C で 24 時間透析を行った. そして, 透析 bag の中と外側の ⁶⁷Ga の放射能を測定した.

結 果

Fig. 1 に HeLa S3 の ⁶⁷Ga 摂取におよぼす HS, FCS および Tf の影響を検討した成績を

示した. HS を培地中に加えた場合, 1% の濃度のとき ⁶⁷Ga 摂取は MEM only の場合に比較し 3~4 倍大になった. しかし, さらに HS の濃度を増加すると ⁶⁷Ga 摂取は漸次減少した. FCS を添加した場合には, ⁶⁷Ga 摂取は増加する傾向を示さず, FCS の濃度とともに減少した. したがって, HeLa S3 の ⁶⁷Ga 摂取におよぼす血清の影響は, 血清の種による違いが認められた. Tf を培地中に添加した場合には, ⁶⁷Ga 摂取は Tf の濃度とともに著明に増加し, 50 μg/ml の濃度で peak に達した. この時,

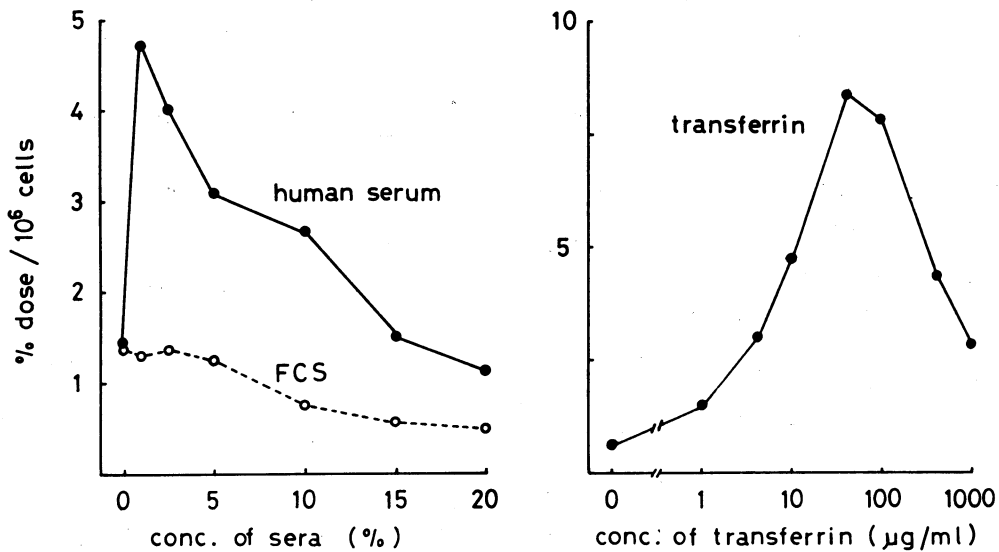


Fig. 1 Effect of various concentrations of human serum, fetal calf serum (FCS) or human transferrin on Ga-67 uptake by HeLa S3

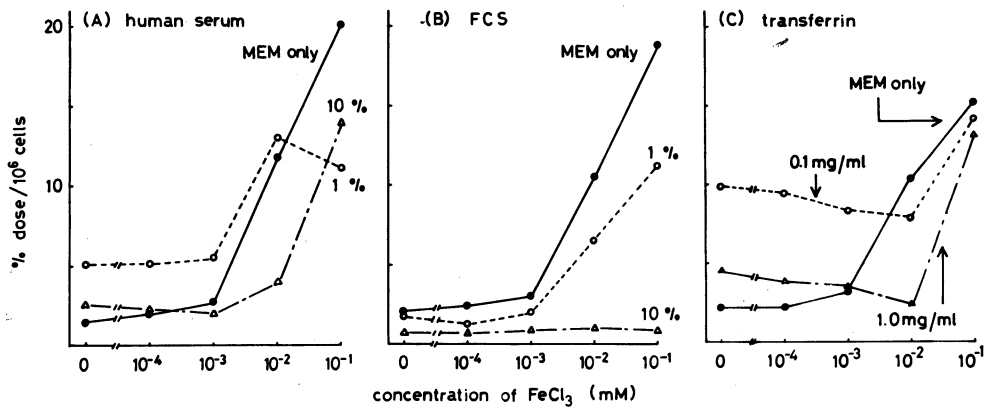


Fig. 2 Effect of various concentrations of FeCl₃ on Ga-67 uptake in MEM containing human serum (A), fetal calf serum (B) or human transferrin (C)

MEM only の場合の ^{67}Ga 摂取に比し約8倍大であった。さらに Tf 濃度を増すと漸次減少し、HS の場合と同様な傾向を示した。

Fig. 2 に HS, FCS あるいは Tf を種々の濃度に含んだ MEM 中における HeLa S3 の ^{67}Ga 摂取におよぼす FeCl_3 の影響を示した。MEM only 中における ^{67}Ga 摂取は FeCl_3 の濃度が 10^{-2}mM 以上で著明な増加を示した。HS あるいは FCS を含んだ MEM 中における ^{67}Ga 摂取は、 $10^{-4}\sim 10^{-3}\text{mM}$ の FeCl_3 の投与によりほとんど変化を示さなかった。しかし、 $10^{-2}\text{mM}\sim 10^{-1}\text{mM}$ の FeCl_3 を投与したとき、10% FCS の場合を除き、 ^{67}Ga 摂取は著明に増加した。Tf を含んだ MEM 中における ^{67}Ga 摂取は、 $10^{-4}\sim 10^{-2}\text{mM}$ の投与により、やや抑制される傾向を示した。しかし、 10^{-1}mM の FeCl_3 の投与により、MEM only の場合と同様、 ^{67}Ga 摂取は著明に増加した。

一方、平衡透析によって in vitro における HS, FCS および Tf に対する ^{67}Ga の結合におよぼす FeCl_3 の影響を検討した (**Table 1**)。HS, FCS および Tf の MEM 中の濃度が大になるにつれて、これらと ^{67}Ga の著明な結合が認められた。 ^{67}Ga の HS に対する結合親和性

Table 1 Effect of FeCl_3 on Ga-67 binding to human serum, FCS or human transferrin measured by equilibrium dialysis^a

concentration of sera or transferrin		^{67}Ga binding	
		FeCl_3 (-)	FeCl_3 (0.1 mM)
MEM only	0	0.9±0.3	39.9±8.8
human serum	1%	9.9±1.7	40.5±4.3
	10%	60.3±6.7	37.5±5.4
	100%	94.1±1.6	—
FCS	1%	2.2±0.5	39.1±5.8
	10%	23.2±4.6	42.6±9.4
	100%	89.7±1.1	—
transferrin	0.1mg/ml	48.5±4.2	35.6±5.2
	1 mg/ml	93.8±1.0	30.2±1.3

^a The values are expressed as mean±standard deviation for 4-8 experiments.

は、1~10%の濃度において FCS に対する結合親和性より明らかに大であった。また、MEM only において、 ^{67}Ga が透析されずに cellulose bag 内にとどまるものの割合は約1%であった。しかし、 10^{-1}mM の FeCl_3 を投与すると、bag 内にとどまる ^{67}Ga の量は、MEM 中の血清および Tf の濃度とは無関係に 30~40% とほぼ一定値を示した。これは、 FeCl_3 の投与により、 ^{67}Ga と HS, FCS および Tf との結合が阻害されるが、それと同時に free の ^{67}Ga と FeCl_3 が MEM 中で cellulose 膜を通過しない polymer 状の complex を形成するためと考えられる。

Table 2 に MEM only 中における HeLa S3 の ^{67}Ga 摂取と ^{67}Ga -Fe complex の形成との関係を示した。 FeCl_3 の濃度が 10^{-2}mM 以上

Table 2 Comparison of Ga-67 uptake by HeLa S3 with formation of Ga-67-Fe complex in various concentrations of FeCl_3 ^a

FeCl_3 (mM)	Ga-67 uptake (% dose/ 10^6 cells)	Ga-67-Fe complex (%)
0	1.7±0.5 (4)	0.8±0.2 (6)
10^{-4}	2.3±0.2 (4)	0.9±0.2 (4)
10^{-3}	2.9±0.5 (4)	1.0±0.2 (4)
10^{-2}	11.2±1.1 (4)	6.5±1.0 (4)
10^{-1}	19.6±5.8 (4)	35.2±5.5 (8)

^a Experiments were performed in serum-free MEM. The values are expressed as mean±standard deviation. Parentheses indicate the numbers of experiments.

で ^{67}Ga -Fe complex の形成が明らかに認められ、 ^{67}Ga 摂取も著明に増加した。

Table 3 に MEM only 中における HeLa S3 の ^{67}Ga 摂取におよぼす FeCl_3 の影響を種々の条件で検討した成績を示した。 ^{67}Ga と FeCl_3 を同時に加えた場合(A)と ^{67}Ga と FeCl_3 をあらかじめ incubate したものを加えた場合(B)では、 ^{67}Ga -Fe complex は約35%形成されており、 ^{67}Ga の摂取は ^{67}Ga only の場合に比べて著明に増加した。dialysis bag 中の ^{67}Ga -Fe

Table 3 Effect of FeCl₃ on Ga-67 uptake by HeLa S3 in serum-free MEM^a

	n	Ga-67 uptake (% dose/10 ⁶ cells)
Ga-67 only	4	1.1±0.1
Ga-67+FeCl ₃ (0.1 mM)		
(A) simultaneously administered	4	15.5±2.7
(B) 48 hr-preincubation	4	17.2±2.4
(C) Ga-Fe complex (retained in the dialysis bag)	4	33.5±2.0
(D) sample outside the dialysis bag	4	0.7±0.3

^a Cells were incubated for 24 hr at 37°C with 1 μCi/ml Ga-67 only, (A) 1 μCi/ml Ga-67 and 0.1 mM FeCl₃, (B) MEM which was preincubated with 1.5 μCi/ml Ga-67 and 0.1 mM FeCl₃ for 48 hr, (C) sample retained in the dialysis bag after 24 hr-dialysis bag after 24 hr-preincubation of (B), or (D) sample outside the dialysis bag after 24 hr-dialysis. The values are expressed as mean±standard deviation.

complex (⁶⁷Ga-Fe complex の濃度は約 80%) を加えると(C), HeLa S3 の ⁶⁷Ga 摂取はさらに増加し, (A)(B) の場合の約 2 倍に達した. また, 透析された ⁶⁷Ga (⁶⁷Ga-Fe complex を含まない) を加えた場合(D)は, ⁶⁷Ga の摂取は ⁶⁷Ga only の場合と同程度であった. これらの結果は, FeCl₃ の投与による HeLa S3 の ⁶⁷Ga 摂取の著明な増加は, ⁶⁷Ga-Fe complex の形成と関連していることを明らかに示すものと考えられる.

Table 4 に ⁶⁷Ga-Fe complex として集積した ⁶⁷Ga と transferrin に仲介されて集積した ⁶⁷Ga の HeLa S3 からの排泄を比較した成績を示した. Def を投与しないとき, ⁶⁷Ga の細胞中の残存率はいずれの場合も 85% 以上を示し, 大差は認められなかった. Def 0.1 mg/ml

を投与すると, ⁶⁷Ga の細胞中の残存率はいずれの場合も減少した. しかし, 10% FCS あるいは 0.1 mg/ml の Tf を加えた場合の ⁶⁷Ga の残存率は, MEM only(control) あるいは 0.1 mM の FeCl₃ を加えた場合の ⁶⁷Ga 残存率よりも統計的に有意に大になった. このことは, ⁶⁷Ga-Fe complex と Tf の仲介によって集積した ⁶⁷Ga では, その集積機序が異なっており, 腫瘍細胞内分布も異なることを示すものと考えられる.

考 察

⁶⁷Ga-citrate が生体に静注されると, その多くは血漿蛋白特に transferrin と結合し,⁷⁾ 各組織へ輸送されることが知られている. しかし, 腫瘍組織周囲に運ばれた後, どのような機序で腫瘍細胞へ集積するかは矛盾する報告があり, 統一されていない. 培養細胞を用いた in vitro の実験²⁾ からは, 腫瘍細胞に transferrin receptor が存在し, transferrin と結合した ⁶⁷Ga がこの receptor を介して取込まれるという説が有力である. しかし, in vivo においては, スカンジウムや鉄を投与した場合には, ⁶⁷Ga と transferrin の結合が減少し, 正常軟部組織の ⁶⁷Ga 摂取も減少するにもかかわらず, 腫瘍の ⁶⁷Ga 摂取も減少しないという報

Table 4 Effect of deferoxamine on Ga-67 excretion from HeLa S3^a

	24 hr-uptake (% dose/10 ⁶ cells)	12 hr-retention (%)	
		def (-)	def (0.1 mg/ml)
MEM only (control)	1.7±0.4	85.8±3.5	42.6± 8.3
+ FeCl ₃ 0.1 mM	18.5±3.8*	88.3±9.0	29.9± 9.3
+ FCS 10%	1.0±0.1**	85.3±5.1	66.7± 4.5*
+ transferrin 0.1 mg/ml	9.8±2.0*	90.1±2.7	71.5±12.4*

^a The values are expressed as mean±standard deviation for 4-5 experiments.

* Significantly different from control ($p < 0.01$)

** Significantly different from control ($p < 0.05$)

告⁸⁾や ^{67}Ga と ^{59}Fe の生体内分布が異なっているという報告⁹⁾があり、必ずしも transferrin receptor の関与した集積機序のみで ^{67}Ga の腫瘍集積を説明できない。

我々の *in vitro* の実験系においても、HeLa S3 の ^{67}Ga 摂取は培地中の血清の濃度、特に transferrin の濃度によって影響をうけることが見出された。HeLa S3 における transferrin の濃度と ^{67}Ga 摂取の関係は、Larson らの EMT-6 sarcoma の実験結果²⁾と同様な傾向を示した。このことから、HeLa S3 には transferrin receptor が存在し、transferrin の仲介によって ^{67}Ga が集積しているものと推定される。この実験においては free ^{67}Ga の腫瘍細胞への集積は非常に少なかった。

このような *in vitro* の実験系において、 FeCl_3 の効果を検討した。 Fe^{2+} の transferrin に対する親和性は Ga^{2+} よりも大であるので、 FeCl_3 の培地中への投与は、 ^{67}Ga と transferrin の結合を阻害するはずである。しかし、HeLa S3 の ^{67}Ga 摂取におよぼす FeCl_3 の影響を検討したところ、 FeCl_3 の濃度が $10^{-2} \sim 10^{-1} \text{mM}$ では著明に ^{67}Ga 摂取が増加した。一方、cellulose 膜を用いた平衡透析によって、 FeCl_3 の投与により ^{67}Ga と血清あるいは transferrin との結合は阻害されるが、それと同時に ^{67}Ga と FeCl_3 が cellulose 膜を通過しない complex を形成することが認められた。さらに FeCl_3 の投与による腫瘍細胞の ^{67}Ga 摂取の著明な増加と、この $^{67}\text{Ga}\text{-Fe}$ complex の形成との関連が明らかに認められた。これは、*in vitro* においても、 ^{67}Ga の腫瘍細胞集積に transferrin に仲介されない機序も存在することを示すものと考えられる。

ここで注意しなければならないのは、培地中に含まれる血清の種類の違いによって、 ^{67}Ga の腫瘍細胞への集積、あるいはそれに対する FeCl_3 の影響が異なることである。平衡透析によって、FCS は人血清よりも ^{67}Ga との結合親和性が低いことが示された。しかし、FCS のいずれの濃度でも HeLa S3 の ^{67}Ga 摂取が増加しない事実、また、FCS 10% を含む MEM

中では FeCl_3 (0.1 mM) の投与により $^{67}\text{Ga}\text{-Fe}$ complex の形成は認められるものの HeLa S3 の ^{67}Ga 摂取は増加しない事実は、結合親和性の程度の違いのみによって説明できない。Gams ら⁹⁾ は血清中に種々の ^{67}Ga 摂取抑制因子があることを報告しており、そのような明確に知られていない因子が FCS 中に存在する可能性もある。したがって、生体内では、*in vitro* で ^{67}Ga uptake が最大になる濃度よりも transferrin 濃度がかなり高いということとともに血清内の種々の因子によって ^{67}Ga uptake が修飾されている可能性がある。

$^{67}\text{Ga}\text{-Fe}$ complex の性状や腫瘍細胞へ取込まれる機序の詳細は不明である。Glickson ら¹⁰⁾ は、polymer 状の $^{67}\text{Ga}\text{-citrate}$ が pinocytosis によって腫瘍細胞に取込まれるという集積機序を報告しているが、この説と polymer の形成条件は異なるけれども共通するかもしれない。一方、 $^{67}\text{Ga}\text{-Fe}$ complex として腫瘍細胞に取込まれた ^{67}Ga は、deferoxamin によって約 60% が排泄されることから、その多くは細胞の表面と結合している可能性も考えられる。 $^{67}\text{Ga}\text{-Fe}$ complex は pH が低いほど形成されやすく、 $^{67}\text{Ga}\text{-Fe}$ complex を直接 担癌動物に静注すると肝、脾に大量に取込まれ Colloid 状の性質を示した。

^{67}Ga の腫瘍集積に関する“transferrin receptor 仮説”²⁾は主として *in vitro* の実験によって打ち立てられた仮説である。それと同様な実験系において、transferrin に仲介されない colloid 状の $^{67}\text{Ga}\text{-Fe}$ complex としての ^{67}Ga の集積機序も存在することを示した。 FeCl_3 によって得られた結果とほぼ同様の結果が ScCl_3 によっても得られている (Muranaka and Ito, 未発表データ)。これらの結果は transferrin に仲介された ^{67}Ga の腫瘍集積機序を否定するものではない。しかし、その集積機序と同時に、Fe や Sc が carrier として生体に加えられた場合や low pH などの条件のもとでは、このような ^{67}Ga の complex の状態での集積の可能性もあることを示唆するものである。

文 献

- 1) Hoffer, P.: Gallium: Mechanisms. *J. nucl. Med.* 21: 282—285, 1980
- 2) Larson, S. M., Rasey, J. S., Allen, D. R., Nelson, N. J., Grunbaum, Z., Harp, G. D. and Williams, D. L.: Common pathway for tumor cell uptake of gallium-67 and iron-59 via a transferrin receptor. *J. Natl. Cancer. Inst.* 64: 41—53, 1980
- 3) Hayes, R. L., Rafter, J. J., Byrd, B. L. and Carlton, J. E.: Studies of the in vivo entry of Ga-67 into normal and malignant tissue. *J. nucl. Med.* 22: 325—332, 1981
- 4) Hammersley, P. A. G. and Taylor, D. M.: The effect of the administration of iron on gallium 67 citrate uptake in tumors. *Br. J. Radiology* 53: 563—571, 1980
- 5) Sephton, R. G. and Martin, J. J.: Modification of distribution of gallium 67 in man by administration of iron. *Br. J. Radiology* 53: 572—575, 1980
- 6) Smith, F. W. and Dendy, P. P.: Modification of gallium-67 citrate distribution in man following the administration of iron. *Br. J. Radiology* 54: 398—402, 1981
- 7) Gunasekera, S. W., King, L. J. and Lavender, J. P.: The behaviour of tracer gallium-67 towards serum proteins. *Clinica Chimica Acta* 39: 401—406, 1972
- 8) Sephton, R. G., Hodgson, G. S., De Abrew, S. and Harris, A. W.: ⁶⁷Ga and ⁵⁹Fe distribution in mice. *J. nucl. Med.* 19, 930—935, 1978
- 9) Gams, R. A., Webb, J. and Glickson, J. D.: Serum inhibition of in vitro ⁶⁷Ga binding by L1210 leukemic cells. *Cancer Res.* 35: 1422—1426, 1975
- 10) Glickson, J. D., Pitner, T. P., Webb, J. and Gams, R. A.: Hydrogen-1 and gallium-71 nuclear magnetic resonance study of gallium citrate in aqueous solution. *J. Am. chem. Soc.* 97: 1679—1683, 1975