

## 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31日受付)

### Role of Transferrin in vitro Accumulation of Ga-67 in Tumor Cells

Soichi Nishishita, Akira Muranaka  
Michihiko Sawai and Junichi Saito

Department of Radiology, Kawasaki Medical School

(Accepted on August 31, 1982)

腫瘍細胞 (HeLa S3, 吉田肉腫) における  $^{67}\text{Ga}$  の集積に対する transferrin (Tf) の役割を再評価するために,  $^{67}\text{Ga}$  と  $^{125}\text{I-Tf}$  の動態を比較検討した. 両細胞とも  $^{67}\text{Ga}$  の摂取は接触時間とともに増加したが,  $^{125}\text{I-Tf}$  の摂取は著明な増加を示さなかった.  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{125}\text{I-Tf}$  を細胞に取込ませた後, トリプシン処理を行い吉田肉腫細胞中の残存率を測定すると,  $^{67}\text{Ga}$  の残存率は接触時間とともに増加し 24 時間では約 80% であった. 一方,  $^{125}\text{I-Tf}$  の残存率は接触時間とは無関係に 20~30% であった. HeLa S3 からの  $^{67}\text{Ga}$  の排泄は 12 時間の間に約 10% であったが,  $^{125}\text{I-Tf}$  の排泄は非常に速く, MEM only 中では約 75%, 100  $\mu\text{g/ml}$  Tf を含む MEM 中では約 95% であった. 熱処理により nonviable になった吉田肉腫細胞では, 熱処理を加えない細胞より free  $^{67}\text{Ga}$  の摂取は大であった. しかし, Tf に仲介された  $^{67}\text{Ga}$  の摂取は,  $^{125}\text{I-Tf}$  の摂取が増加したにもかかわらず, 著明に減少した. これらの結果から,  $^{67}\text{Ga}$  の細胞内動態は  $^{125}\text{I-Tf}$  と異なっていることが示された. すなわち,  $^{67}\text{Ga}$  は細胞に経時的に摂取されほとんど排泄されないのに対し,  $^{125}\text{I-Tf}$  の多くは細胞膜と結合しており速く代謝されているものと考えられる. しだがつて, Tf は  $^{67}\text{Ga}$  を細胞膜まで輸送する carrier として働いており,  $^{67}\text{Ga}$  が腫瘍細胞内に集積するには Tf 以外の因子も考慮しなければならない.

In order to reevaluate the role of transferrin (Tf) on Ga-67 accumulation in tumor cells (HeLa S3, Yoshida sarcoma), the kinetics of Ga-67 and I-125-Tf were studied. Ga-67 uptake by both cells increased with contact time while I-125-Tf uptake showed no marked increase. The retention of Ga-67 in Yoshida sarcoma followed by trypsinization increased with contact time reaching 80% in 24 hours. Conversely, retentions of I-125-Tf were 20%~30% irrespective of contact time. Ga-67 excretion was about 10% from HeLa S3 during 12 hours, while that of I-125-Tf was very rapid: 75% in MEM only and 95% in MEM with 100  $\mu\text{g/ml}$  Tf. When

Yoshida sarcoma cells were rendered nonviable by heating, free Ga-67 uptake was higher than that of non-heated cells. However, Ga-Tf uptake decreased markedly despite an increase of I-125-Tf uptake. Results indicate that kinetics of Ga-67 is different from that of I-125-Tf: Ga-67 is gradually taken up by cells and is hardly excreted. On the other hand, I-125-Tf mainly binds to cell membranes and is rapidly turned over. Therefore, whereas it is recognizable that Tf acts as "carrier" in transport of Ga-67 to cell membranes, other factors besides Tf may be important in Ga-67 deposition in tumor cells.

## 結 言

$^{67}\text{Ga}$ -citrate は腫瘍スキャン剤として広く用いられているが、一部の正常組織や炎症巣にも集積し、また、放出する  $\gamma$  線のエネルギーが単一でなく高エネルギー部分も含んでいるため分解能の良い画像が得られないことなど種々の問題点を持っている。 $^{67}\text{Ga}$  の腫瘍集積機序の解明は、正確な腫瘍診断のために必要であるのみならず、新しい優れた腫瘍スキャン剤の開発に役立つものと考えられる。

最近、 $^{67}\text{Ga}$  の腫瘍集積機序に関して、主として in vitro の実験結果から Tf の役割が強調されている。<sup>1)~3)</sup> しかし、in vivo においては、必ずしも Tf のみによって  $^{67}\text{Ga}$  の腫瘍集積が説明されるわけではない。<sup>4)</sup> また、我々も培養細胞を用いた in vitro の実験系で、Tf に関与した集積機序の他に  $^{67}\text{Ga}$  の complex の関与した機序も考えられることを報告した。<sup>5)</sup>

この研究では、少なくとも in vitro においては  $^{67}\text{Ga}$  の腫瘍細胞への集積に深く関係している Tf の役割をさらに明確にするために、培養細胞における  $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{125}\text{I}$ -Tf の動態を比較し、また、両者の集積に影響する因子を検討した。

## 実験材料と方法

使用した細胞は HeLa S3, 吉田肉腫細胞(YS) で、fetal calf serum (FCS) を 10% の濃度で含む minimum essential medium (MEM) 中で培養維持されている。実験はすべて、培地を FCS を除いた MEM only に変え、90% 以上 iron free である human transferrin (Tf)

を種々の濃度に加えて行った。

HeLa S3 における  $^{67}\text{Ga}$  の摂取と排泄の測定は先に報告した方法<sup>5)</sup> に従って行った。

浮遊細胞である YS における  $^{67}\text{Ga}$  摂取の測定では、直径 15 mm のプラスチック試験管に細胞をまき込み、種々の濃度に Tf を含んだ MEM 中で通常  $1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ -medium の  $^{67}\text{Ga}$  (第一ラジオアイソトープ研究所) とともに 0.5~24 時間培養した。その後、cold PBS 10 ml で  $4^\circ\text{C}$ , 1500 rpm 5 分の遠心で 2 回洗浄した。試験管へ附着した  $^{67}\text{Ga}$  の影響を除くために細胞を新しい試験管へ移し、さらに 2 回同様な洗浄をくり返した。そして、細胞中の  $^{67}\text{Ga}$  の放射能を測定するとともに細胞数を計測した。この時点における細胞数は  $50\sim 80 \times 10^4/\text{tube}$  であった。

$^{125}\text{I}$ -Tf はラクトペルオキシダーゼ法で標識し、製造時の比放射能は  $14 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  のものを用いた。使用時の標識率は展開溶媒として 75% メタノールを用いたペーパークロマトグラフィで 93~95% であった。また、吸着の防止や安定性を高めるために bovine serum albumin (BSA) を  $1 \text{ mg}/\text{ml}$  の濃度で加えた。HeLa S3, YS における  $^{125}\text{I}$ -Tf の摂取と排泄の測定は  $^{67}\text{Ga}$  の場合と同様な方法で行った。培地中の  $^{125}\text{I}$ -Tf の濃度は通常  $0.5 \mu\text{Ci}/\text{ml}$  (Tf の濃度は  $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$ , BSA の濃度は  $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を用いた。なお、 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  程度の BSA は腫瘍細胞の  $^{67}\text{Ga}$  摂取にほとんど影響を与えなかった。

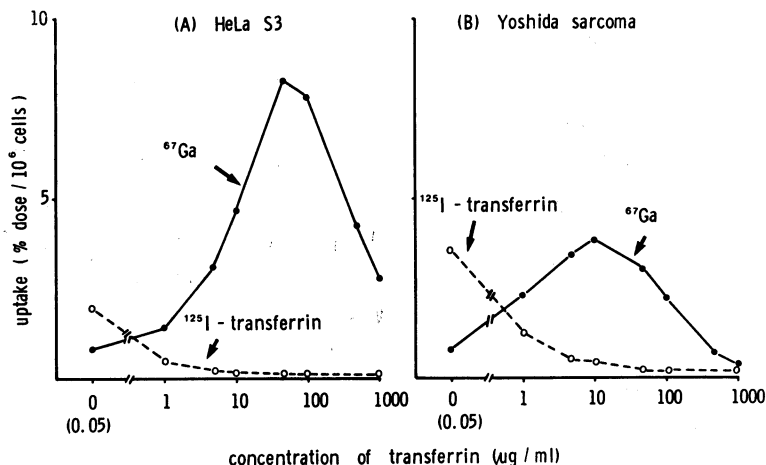
YS の  $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{125}\text{I}$ -Tf の摂取におよぼす trypsin 処理の影響を検討した実験において、tryp-

sin 処理は  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{125}\text{I}$ -Tf を細胞へ取込ませた後、細胞を 0.1% trypsin 溶液 2 ml 中で 15 分間、 $37^\circ\text{C}$  で incubate することにより行った。

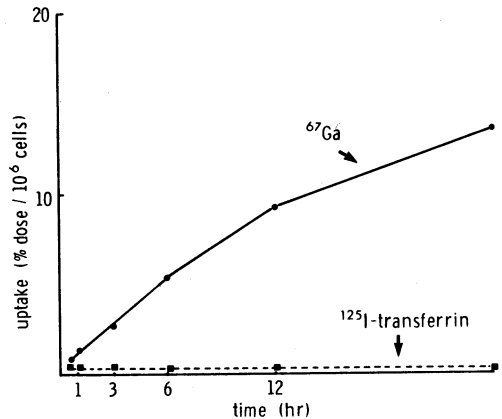
YS の nonviable な細胞を得るための熱処理は、YS をプラスチック試験管へまき込んだ後、 $56^\circ\text{C}$  の water bath 中で 30 分間 incubate することにより行った。細胞の viability は 0.5% の trypan blue の排除試験によって測定した。

### 結 果

**Fig. 1** に HeLa S3 (A) および YS (B) における  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{125}\text{I}$ -Tf の摂取におよぼす Tf の濃度の影響を検討した成績を示した。HeLa S3 の  $^{67}\text{Ga}$  摂取は Tf の濃度とともに増加し、 $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で peak に達したが、さらに Tf の濃度を増すと漸次減少した。 $^{125}\text{I}$ -Tf の摂取は Tf の濃度が大になるにしたがって著明に減少し、細胞の Tf receptor と特異的に結合しているものと考えられた。一方、YS における  $^{67}\text{Ga}$  の摂取は培地中の Tf の濃度の変化にしたがって HeLa S3 の場合とほぼ同様に増加したが、ピークに達する Tf 濃度は  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$  であった。また、YS の  $^{67}\text{Ga}$  摂取は HeLa S3



**Fig. 1** Effect of various concentrations of human transferrin on Ga-67 and I-125-transferrin uptake by HeLa S3 (A) and Yoshida sarcoma (B). Cells were incubated with  $1\ \mu\text{Ci}/\text{ml}$  Ga-67 or  $0.5\ \mu\text{Ci}/\text{ml}$  I-125-transferrin for 24 hr at  $37^\circ\text{C}$ .

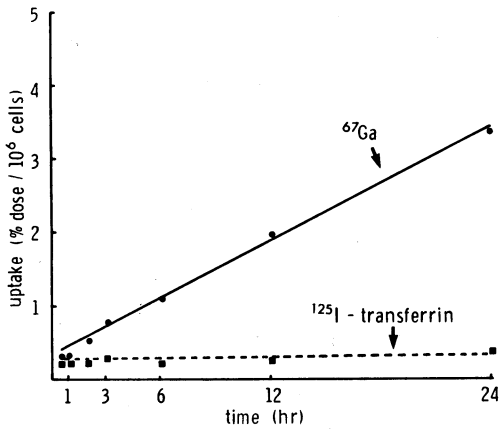


**Fig. 2** Time course of Ga-67 and I-125-transferrin uptake by HeLa S3 in MEM containing  $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$  of human transferrin. Cells were incubated with  $1\ \mu\text{Ci}/\text{ml}$  Ga-67 or  $0.5\ \mu\text{Ci}/\text{ml}$  I-125-transferrin for various intervals at  $37^\circ\text{C}$ .

の場合より低値であった。 $^{125}\text{I}$ -Tf の摂取も HeLa S3 の場合と同様な傾向を示したが、YS の摂取の方が大であった。しかし、HeLa S3 と YS の摂取率の比較には、HeLa S3 では細胞をシャーレからはがすために trypsin を使用するが、YS は浮遊細胞であるため trypsin を使用していないなどの実験の条件の違いを考慮する必要がある。

**Fig. 2** に  $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度に Tf を含んだ MEM における HeLa S3 の  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{125}\text{I}$ -Tf の経時的取込みを比較した成績を示した。 $^{67}\text{Ga}$  の摂取は経時的に著明に増加するのに対し、 $^{125}\text{I}$ -Tf の摂取は 0.5 から 24 時間まではほぼ一定値を示した。

**Fig. 3** は同様な条件で YS における  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{125}\text{I}$ -Tf の経時的取込みを比較した成績であるが、両者とも HeLa S3 の場合と同様な傾向を示した。



**Fig. 3** Time course Ga-67 and I-125-transferrin uptake by Yoshida sarcoma in MEM containing 100 µg/ml of human transferrin. Cells were incubated with 1 µCi/ml Ga-67 or 0.5 µCi/ml I-125-transferrin for various intervals at 37°C.

**Table 1** に YS の <sup>67</sup>Ga, <sup>125</sup>I-Tf の摂取におよぼす trypsin 処理の影響を検討した成績を示した。<sup>67</sup>Ga の trypsin 処理による残存率(処理後の摂取量/処理前の摂取量)は、細胞と<sup>67</sup>Ga の接触時間が2時間では約50%, 24時間では約80%であった。一方、<sup>125</sup>I-Tf の残存率は接触時間と無関係にいずれの場合も20~30%であった。これは、<sup>67</sup>Ga は接触時間とともに細胞内に取込まれるのに対し、<sup>125</sup>I-Tf の多くは細胞の表面に留まっているものと考えられる。

**Table 2** に HeLa S3 における <sup>67</sup>Ga, <sup>125</sup>I-Tf の排泄を比較した成績を示した。<sup>67</sup>Ga では Tf を 100 µg/ml の濃度を含んだ MEM 中で、<sup>125</sup>I-Tf では MEM only 中で、それぞれ24時

**Table 2** Comparison of excretion of Ga-67 and I-125-transferrin (Tf) from HeLa S3

|          | 24 hr-uptake<br>(% dose/10 <sup>6</sup> cells) | 12 hr-retention(%) |                  |
|----------|--|--------------------|------------------|
|          |  | Tf<br>(0)          | Tf<br>(100 µ/ml) |
| Ga-67    | 10.5 ± 2.6 <sup>a</sup>                        | 92.7               | 90.1             |
| I-125-Tf | 1.4 ± 0.4 <sup>b</sup>                         | 25.6               | 5.1              |

<sup>a</sup> in MEM containing of 100 µg/ml Tf

<sup>b</sup> in MEM only:

間細胞に取込ませた後、PBS で洗浄し、新しい培地を加えて12時間後における細胞内残存率を比較した。<sup>67</sup>Ga の残存率は24時間の摂取量に対して約90%, すなわち排泄は10%程度であった。<sup>125</sup>I-Tf の残存率はMEM only 中で約25% (排泄は約75%), 100 µg/ml Tf を含むMEM 中では約5% (排泄は約95%)であった。したがって、細胞内に摂取された<sup>67</sup>Ga はほとんど排泄されないのに対し、<sup>125</sup>I-Tf は非常に速く代謝されていると考えられる。

**Table 3** に nonviable YS における <sup>67</sup>Ga, <sup>125</sup>I-Tf の摂取を比較した成績を示した。熱処理を加えない細胞(control)では nonviable な細胞は4%程度しか含まれていないのに対し、56°C で30分間の熱処理を加えた細胞では95%以上が nonviable であった。Tf を含まないMEM only 中における<sup>67</sup>Ga はほとんど free の状態で存在すると考えられるが、この状態での nonviable YS への取込みは control の細胞より増加した。100 µg/ml の Tf を含むMEM 中では<sup>67</sup>Ga の nonviable YS への取込みは control に比し著明に減少した! 一方、

**Table 1** Effect of trypsinization on Ga-67 and I-125-transferrin (Tf) by Yoshida sarcoma<sup>a</sup>

| contact time (hr) | concentration of Tf (µg/ml) | Ga-67 uptake (% dose/10 <sup>6</sup> cells) |             | I-125-Tf uptake (% dose/10 <sup>6</sup> cells) |             |
|-------------------|-----------------------------|---|-------------|--|-------------|
|                   |                             | trypsinization (-)                          | (+)         | (-)  | (+)         |
| 2                 | 100                         | 0.44  | 0.23 (0.53) | 0.31   | 0.10 (0.32) |
| 24                | 0.05                        | —   | —           | 3.51   | 0.81 (0.23) |
| 24                | 100                         | 3.35  | 2.68 (0.80) | 0.37   | 0.095(0.26) |

<sup>a</sup> Cells were trypsinized with 0.1% trypsin solution for 15 min after taking up of Ga-67 or I-125-Tf.

**Table 3** Comparison of Ga-67 and I-125-transferrin (Tf) uptake by nonviable Yoshida sarcoma cells<sup>a</sup>

|                              | nonviable cells (%) | concentration of Tf ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 2 hr-uptake (cpm/10 <sup>6</sup> cells) |                  |
|------------------------------|---------------------|--|---|------------------|
|                              |                     |  | Ga-67                                   | I-125-Tf         |
| control                      | 3.7                 | { 0                                      | 1820 $\pm$ 60                           | 16310 $\pm$ 1565 |
|                              |                     | { 100                                    | 7472 $\pm$ 603                          | —                |
| incubated for 30 min at 56°C | 95.7                | { 0                                      | 3883 $\pm$ 1245                         | 21285 $\pm$ 991  |
|                              |                     | { 100                                    | 1924 $\pm$ 573                          | —                |

<sup>a</sup> Nonviable Yoshida sarcoma cells were obtained by heating in a water bath for 30 min at 56°C. The viability of these cells was determined by their ability to exclude 0.5% trypan blue.

nonviable YS の <sup>125</sup>I-Tf の摂取は control の細胞と比較しむしろ増加する傾向が認められた。

### 考 察

<sup>67</sup>Ga の腫瘍集積機序に関して、多くの因子が報告されてきたにもかかわらず、一般に認められた定説は得られていない。<sup>6)</sup> 培養細胞を用いた in vitro の実験からは、腫瘍細胞に transferrin receptor が存在し、transferrin と結合した <sup>67</sup>Ga がこの receptor を通じて細胞内に取込まれるという説<sup>2)</sup> が有力である。この仮説について次のような問題点が考えられる。

(1) in vitro の実験条件は単純化された特殊なものであり、生体における <sup>67</sup>Ga の分布と transferrin の濃度や組織の transferrin receptor との直接的な関連がまだ十分証明されていないこと。(2) 本来、transferrin は鉄結合蛋白質であり、鉄の方がガリウムよりも transferrin に対する親和性が大である。<sup>7)</sup> ところが、生体における <sup>67</sup>Ga と <sup>59</sup>Fe の分布は異なっており、<sup>59</sup>Fe の腫瘍への取込みは <sup>67</sup>Ga より少ない。<sup>8)</sup> この仮説では <sup>67</sup>Ga と <sup>59</sup>Fe のこのような動態のちがいがどこかで起るのが明確でない。(3) 組織の癌化にともなって transferrin receptor も変化するか否か。(4) in vitro においても transferrin とは無関係な <sup>67</sup>Ga の complex に関連した集積機序も考えられる<sup>5)</sup> こと等。

しかし、種々の問題はあるにせよ、少なくと

も in vitro においては腫瘍細胞の <sup>67</sup>Ga の摂取に transferrin が何らかの重要な役割を果たしているものと考えられる。この研究においても、HeLa S3 と YS の両腫瘍細胞とも <sup>67</sup>Ga の取込みは培地中の transferrin の濃度によって変化し、また、<sup>125</sup>I-Tf の摂取は培地中の transferrin の濃度が大きくなるに伴って著明に減少した。これらの結果は、両細胞とも transferrin receptor を有しており、培地中で transferrin と結合した <sup>67</sup>Ga が細胞膜の receptor へ運ばれ、細胞内へ取込まれているものと考えられる。

次に、経時的取込み、排泄、trypsin 処理の影響等の検討から、<sup>67</sup>Ga と <sup>125</sup>I-Tf の腫瘍細胞における動態が異なることが示された。すなわち、<sup>67</sup>Ga の摂取は経時的に増加し、排泄は少なく trypsin 処理の影響を受けにくいのに対し、<sup>125</sup>I-Tf の摂取は経時的にほとんど変化せず、排泄は速く trypsin 処理の影響を受けやすかった。これは、<sup>67</sup>Ga は経時的に細胞の中へ取込まれ細胞内の結合物質と強く結びついていますが、<sup>125</sup>I-Tf は細胞膜表面に留まっており培地中の transferrin との間で代謝回転しているためと考えられる。したがって、transferrin は <sup>67</sup>Ga を細胞膜まで輸送する carrier として働いており、<sup>67</sup>Ga-transferrin の形で transferrin receptor に結合した後おそらく <sup>67</sup>Ga のみは何らかの機序により細胞の中へ取込まれるものと考えられる。この結果は <sup>67</sup>Ga-transferrin-<sup>125</sup>I を用いた Noujaim ら<sup>3)</sup> の報

告と一致する。

しかし, Larson ら<sup>2)</sup> は  $^{67}\text{Ga}$ -transferrin 全体が endocytosis によって細胞内へ取込まれると仮説を立てている。これは, 血液系の細胞が Fe-transferrin complex を取込む過程を引用したものだが, 赤芽球などの正常な細胞に存在している transferrin receptor と腫瘍細胞に存在するものが同一のものを今後さらに検討をする必要がある。

$^{67}\text{Ga}$  が transferrin と結合して細胞膜へ運ばれた後, 細胞の中へ取込まれる過程に影響する1つの因子として nonviable な YS に対する取込みを検討した。MEM only 中では  $^{67}\text{Ga}$  (free  $^{67}\text{Ga}$ ),  $^{125}\text{I}$ -Tf の nonviable YS への取込

みは control の細胞に比し増加した。100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  の transferrin を含む MEM では  $^{67}\text{Ga}$  (約50% は  $^{67}\text{Ga}$ -transferrin として存在する<sup>5)</sup>) の nonviable YS への取込みは著明に減少した。これらの結果は, 熱処理を加えられた nonviable YS では細胞膜の透過性は亢進しているが, 少なくとも transferrin receptor は破壊されおらず,  $^{67}\text{Ga}$ -transferrin は細胞膜へ運ばれるけれどもその後の  $^{67}\text{Ga}$  が細胞膜を通過する過程が障害を受けているものと推定できる。したがって,  $^{67}\text{Ga}$ -transferrin として細胞の transferrin receptor へ結合することのみならず, 細胞膜の機能状態によって  $^{67}\text{Ga}$  の腫瘍細胞内集積は影響を受けているものと考えられる。

#### 文 献

- 1) Harris, A. W. and Sephton, R. G.: Transferrin promotion of  $^{67}\text{Ga}$  and  $^{59}\text{Fe}$  uptake by cultured mouse myeloma cells. *Cancer Res.* 37: 3634—3638, 1977
- 2) Larson, S. M., Rasey, J. S., Allen, D. R., Nelson, N. J., Grunbaum, Z., Harp, G. D. and Williams, D. J.: 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) Noujaim, A. A., Lentle, B. C., Hill, J. R., Terner, U. K. and Wong, H.: On the role of transferrin in uptake of gallium by tumor cells. *Int. J. nucl. Med. Biol.* 6: 193—199, 1979
- 4) 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
- 5) 西下創一, 村中 明, 沢井通彦, 斉藤純一: In vitro における HeLa S3 への Ga-67 集積に対する  $\text{FeCl}_3$  の役割. *川崎医学会誌* 8: 309—315, 1982
- 6) Hoffer, P.: Gallium: Mechanisms. *J. nucl. Med.* 21: 282—285, 1980
- 7) Hara, T.: On the binding of gallium to transferrin. *Int. J. nucl. Med. Biol.* 1: 152—154, 1974
- 8) Sephton, R. G., Hodgson, G. S., De Abrew, S. and Harris, A. W.:  $^{67}\text{Ga}$  and  $^{59}\text{Fe}$  distribution in mice. *J. nucl. Med.* 19: 930—935, 1978