

2102 放射線照射後のがん細胞に対する L-methionine の集積と アミノ酸輸送体発現量の検討

佐藤 翔

(指導教員：川井 恵一 教授、水谷 明日香 助教)

要旨：がんに対する放射線治療効果は、がん細胞の輸送機構や代謝など様々な因子を考慮して判定する必要がある。そこで、がん細胞へのアミノ酸集積とがん関連アミノ酸輸送体の発現量に関連性があると考え、現在放射線治療効果判定に用いられている¹¹C-L-methionine (¹¹C-L-Met) とその輸送体 LAT1, ASCT2 の発現量に着目した。本研究では、上記の輸送体発現量が異なる 3 種類のがん細胞株 (肺腺がん：H441 と PC-14、子宮頸がん：HeLa) を用いて、放射線照射後の各輸送体発現量と ³H-L-Met の集積との相関性を検討した。各がん細胞において、放射線非照射の control と放射線照射後から ³H-L-Met 投与までを 4, 24 時間とした 3 群に対して、投与後 60 分までの経時的集積を測定し、各がん細胞 3 群の LAT1 と ASCT2 の遺伝子発現量を定量するために real-time PCR を行った。その結果、control において各輸送体の総発現量と ³H-L-Met 細胞集積に相関性が認められた。放射線照射後の PC-14 では照射後の各輸送体総発現量の変化と ³H-L-Met の集積に相関性が認められた。一方、照射後 4 時間の HeLa と H441 では、各輸送体総発現量は control と比べて低下したが、³H-L-Met の集積は control と比べて増加し、相関性が認められなかった。放射線照射後のがん細胞では、³H-L-Met の集積とアミノ酸輸送体 LAT1 と ASCT2 発現量に相関性がない場合があり、それ以外の輸送体の関与やタンパク合成などの代謝も考慮した上で、¹¹C-L-Met を用いたがんの放射線治療効果判定の有用性を評価する必要がある。

I. はじめに

我が国の死因第 1 位は悪性新生物 (がん) であり、全死因の約 27 % を占め、4 人に 1 人はがんで死亡している。がんの治療方法には、手術療法、化学療法、放射線療法の主に 3 つの手法があるが、その中でも放射線治療は身体的負担が比較的少なく、他の疾患を持つ患者や高齢者に対してもリスクが少ない治療法である。がんの放射線治療効果判定法の 1 つである核医学検査では、がんに対する放射性薬剤の集積の有無を画像化するとともに、病理学的検査によるがんの悪性度と関連付けて治療効果を判定している^{1,2)}。そこで、がん細胞の輸送機構や代謝などの様々な因子のうち、治療効果判定に重要な因子を見出すことで、より臨床有用性の高い治療効果判定法が確立できると考えた。本研究では、放射線治療効果判定法における重要な因子の解明を目指し、すでに放射線治療効果判定に利用されている[methyl-¹¹C]-L-methionine (¹¹C-L-Met) がアミノ酸輸送体 LAT1 および ASCT2 に高親和性を示す³⁾ことから、LAT1 や ASCT2 の遺伝子発現量と ¹¹C-L-Met 集積の相関性を検討した。

II. X線照射後のがん細胞におけるL-Met集積量に対する補正法の検討

A) 実験材料および実験方法

L-Met はがん細胞に集積した後、多くが細胞タンパクに組み込まれるため、がん細胞への集積量の補正を行う際にはタンパク量で補正することで、正確な補正を行うことができる。しかしながら、本研究ではX線照射後のがん細胞を用いるため、X線による死細胞のタンパク量も含めた補正となりL-Met集積の過小評価が危惧された。そこで、X線照射後がん細胞の生存率がどのように変化するかを確認した。ヒト由来肺腺がん細胞株H441において、過去の報告からX線1回照射の最大線量10 Gy⁴⁾を選択し、X線照射装置(MBR1520R-3, Hitachi)を用いて照射した。照射後4時間、24時間、48時間、72時間のH441の細胞数を全自動細胞測定装置(LUNA FX7, Logo biosystems)で測定し、生存率を算出した。

B) 結果と考察

X線照射後の細胞生存率の変化をtable 1に示した。照射後4時間ではX線照射の影響により、がん細胞H441における生存率の低下は見られなかったが、照射後24時間から生存率が低下し、経過時間とともに生存率が低下した。以上より、X線照射後24時間以降の検討を行う際に、細胞集積をタンパク量で補正すると死細胞数を含める可能性があるため、生細胞数を用いた補正が適していると考えられた。以降の検討項目においては細胞集積を生細胞数で補正することにした。

Table 1 X線照射後の細胞生存率の変化

	4時間	24時間	48時間	72時間
Control	88.0	94.4	91.2	93.7
After X-ray	90.2	87.2	74.1	68.7

III. ³H-L-Met細胞集積とアミノ酸輸送体LAT1, ASCT2総発現量の相関性

A) 実験材料および実験方法

(i) ³H-L-Metを用いた細胞集積実験

本研究室で過去に行った16種類のヒトがん細胞株を対象としたマイクロアレイのデータベースから得たLAT1, ASCT2の遺伝子発現量の違いに本邦のがん罹患率と死亡率を加味し、ヒト由来肺腺がん細胞株H441とPC-14、子宮頸がんHeLaを選択した。X線非照射のがん細胞をcontrolとし、X線照射後4時間、24時間の細胞の3つの群に分け、¹⁴C-L-Metと標識部位が同じである³H-L-Metを投与した。³H-L-Met投与後5分、10分、30分、60分の各がん細胞を0.1N NaOH水溶液450 μLで溶解し、液体シンチレーションカウンタ(LSC-5100, Aloka medical)でがん細胞内の³H-L-Metの集積を測定した。測定結果は、全自動細胞計測装置で測定した生細胞数1個当たりに取り込まれた³H-L-Metの集積量で表記した。

(ii) 定量 PCR によるアミノ酸輸送系遺伝子発現量測定実験

Control、照射後 4 時間と 24 時間それぞれのがん細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成した後、定量 PCR で LAT1, ASCT2 の遺伝子発現量を測定した。定量 PCR に使用した各遺伝子のプライマー配列およびその濃度を table 2 に示した。

Table 2 各遺伝子のプライマー配列およびその濃度

アミノ酸輸送体	primer sequence	濃度 (nM)
LAT1	Forward <u>gtggaaaaacaagccaagt</u>	100
	Reverse <u>gcatgagcttctgacacagg</u>	
ASCT2	Forward <u>gaggaatatcaccggaacca</u>	
	Reverse <u>aggatgttcaccctcca</u>	

B) 結果と考察

Fig. 1 に H441, PC-14 および HeLa の $^3\text{H-L-Met}$ 細胞集積を示した。Control、照射後 4 時間、照射後 24 時間の各がん細胞において、 $^3\text{H-L-Met}$ 投与後の時間を変化させても $^3\text{H-L-Met}$ 細胞集積に大きな変化はなかった。投与後早期からアミノ酸輸送体を介した $^3\text{H-L-Met}$ の集積が認められるため、輸送体との相関性の検討は投与後早期の方が適していると考え、 $^3\text{H-L-Met}$ 集積と LAT1, ASCT2 総遺伝子発現量との比較は $^3\text{H-L-Met}$ 投与後 5 分の集積結果を用いた。

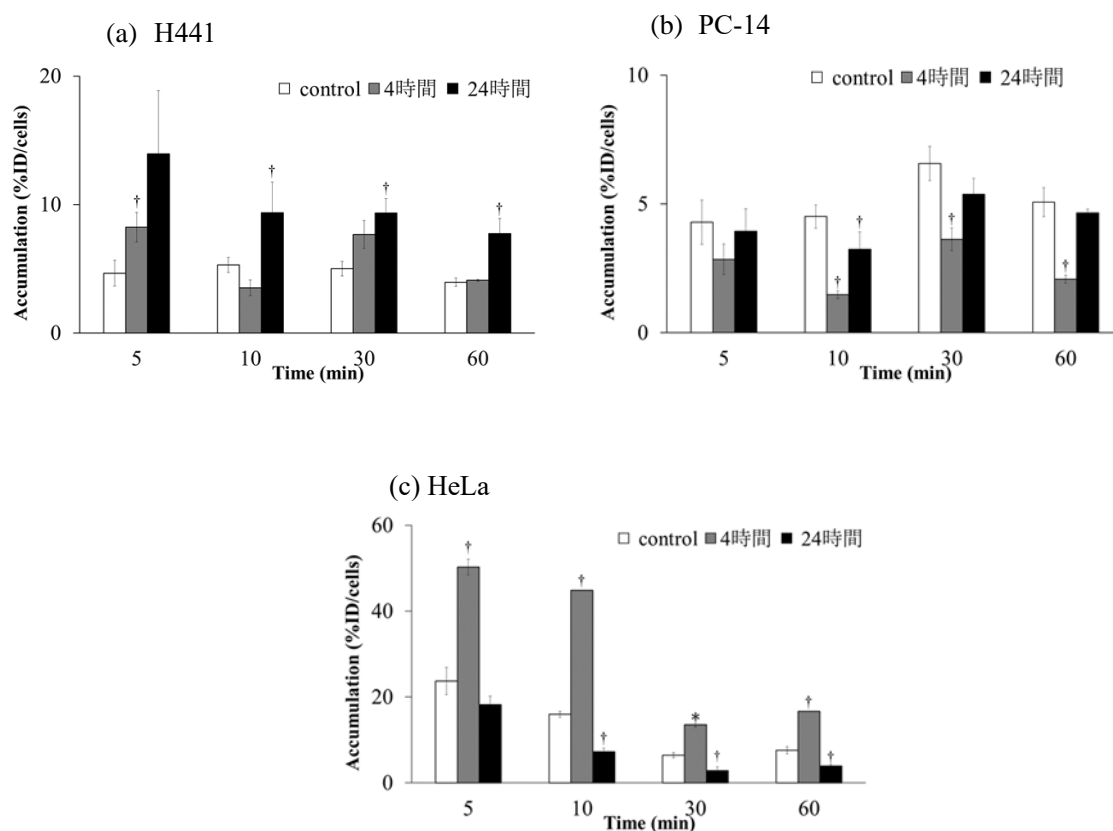


Fig. 1 各がん細胞における $^3\text{H-L-Met}$ 細胞集積

$p < 0.01^\dagger$ $p < 0.05^*$ compared with control

Table 3 に各がん細胞の LAT1, ASCT2 遺伝子発現量を示した。HeLa と H441 では LAT1 遺伝子発現量が ASCT2 遺伝子発現量よりも高発現していた。一方、PC-14 では、LAT1 遺伝子発現量と ASCT2 遺伝子発現量はほぼ同等であった。

Table 3 各がん細胞の LAT1 と ASCT2 遺伝子発現量

	LAT1の遺伝子発現量 (μg)			ASCT2の遺伝子発現量 (μg)		
	control	4h	24h	control	4h	24h
HeLa	167.3	59.0	257.0	4.8	3.6	6.6
H441	38.6	9.4	22.2	3.5	0.8	1.5
PC-14	4.9	0.9	2.7	3.2	1.1	2.2

Table 4 に LAT1, ASCT2 総遺伝子発現量をまとめた。また、Fig. 2 には control 細胞での $^3\text{H-L-Met}$ 投与後 5 分の集積と LAT1, ASCT2 総遺伝子発現量の比較を示した。棒グラフが $^3\text{H-L-Met}$ 集積を、赤丸プロットが総遺伝子発現量を示している。総遺伝子発現量は HeLa, H441, PC-14 の順で低下し、 $^3\text{H-L-Met}$ 投与後 5 分の集積も同様に HeLa, H441, PC-14 の順で集積が低下した。したがって、control 細胞では、 $^3\text{H-L-Met}$ 投与後早期の集積と総遺伝子発現量に相関性が認められた。

Fig. 3 に各がん細胞における $^3\text{H-L-Met}$ 投与後 5 分の集積変化と総遺伝子発現量の比較を示した。総遺伝子発現量は 3 細胞の全てで照射後 4 時間で低下し、照射後 24 時間には再び増加した。 $^3\text{H-L-Met}$ の細胞集積は、PC-14 では照射後 4 時間で集積が低下し、照射後 24 時間には再び増加しており、 $^3\text{H-L-Met}$ の集積と総遺伝子発現量に相関性が認められた。一方、HeLa では照射後 4 時間で集積が増加したが、照射後 24 時間には低下し、H441 では照射後 4 時間で集積が増加し、照射後 24 時間には集積がさらに増加したため、HeLa, H441 では $^3\text{H-L-Met}$ の集積と総遺伝子発現量に相関性が認められなかった。HeLa と H441 においては、放射線照射後にアミノ酸輸送体以外の輸送体も含めた種々の輸送体発現量が複雑に変化し、 $^3\text{H-L-Met}$ が LAT1, ASCT2 以外の輸送体を介してがん細胞に集積した可能性があると考えられる。

Table 4 LAT1, ASCT2 総遺伝子発現量

	総遺伝子発現量 (μg)		
	control	4h	24h
HeLa	172.1	62.6	263.6
H441	42.1	10.1	23.7
PC-14	8.1	1.9	4.9

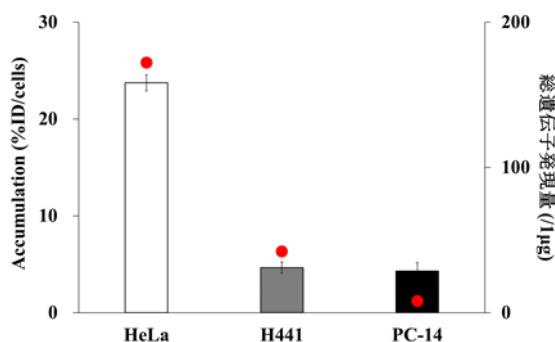


Fig. 2 Control 細胞での $^3\text{H-L-Met}$ 投与後 5 分の集積と LAT1, ASCT2 総遺伝子発現量

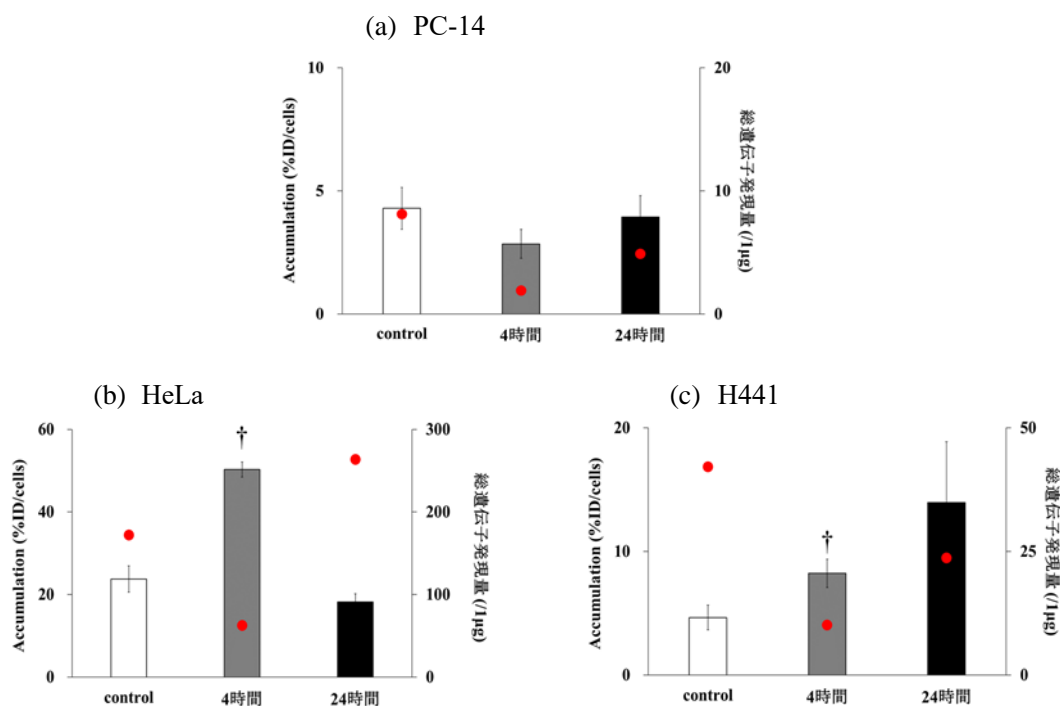


Fig. 3 各がん細胞における ³H-L-Met 投与後 5 分の集積変化と LAT1, ASCT2 総遺伝子発現量
 $p < 0.01^{\dagger}$ compared with control

IV. 結語

放射線照射後のがん細胞では、³H-L-Met の集積とアミノ酸輸送体 LAT1 および ASCT2 発現量に相関性がない場合があり、それ以外の輸送体の関与やタンパク合成などの代謝も考慮した上で、¹¹C-L-Met を用いたがんの放射線治療効果判定の有用性を評価する必要がある。

V. 謝辞

本研究を終えるにあたりご指導くださいました川井恵一教授、小林正和准教授、水谷明日香助教、ご協力いただきました大滝幹恵技術補佐員と本研究室の方々に心より御礼申し上げます。

VI. 参考文献

- 1) Kato T, Shinoda J, Nakayama N, et.al. Metabolic assessment of gliomas using ¹¹C-methionine, [¹⁸F]fluorodeoxyglucose, and ¹¹C-choline positron-emission tomography. *Am J Neuroradiol.* 29(6): 1176-1186; 2008.
- 2) Kracht LW, Miletic H, Busch S, et.al. Delineation of brain tumor extent with [¹¹C] L-methionine positron emission tomography. *Clin Cancer Res.* 10(21): 7163-7170; 2004.
- 3) Lieu EL, Nguyen T, Rhyne S, et.al. Amino acid in cancer. *Exp Mol Med.* 52(1): 384-395; 2020.
- 4) Shibata Y, Yasui H, Higashikawa K, et.al. Erastin, a ferroptosis-inducing agent, sensitized cancer cells to X-ray irradiation via glutathione starvation in vitro and in vivo. *PLoS One.* 14(12): e0225931; 2019.