

機関番号：13401

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19689026

研究課題名（和文） オージェ電子放出ハロゲンを利用した治療・モニター同時進行型  
内用放射線治療法の開発研究課題名（英文） Development of a new therapeutid agent for internal radiation therapy  
and monitoring using Auger electron emitting radionuclides

研究代表者

清野 泰 (KIYONO YASUSHI)

福井大学・高エネルギー医学研究センター・准教授

研究者番号：50305603

研究成果の概要（和文）：医療超小型サイクロトロンを用いてオージェ電子を放出する臭素-77の製造法を確立した。さらに DNA に組み込まれる臭素-77 で標識されたチミジン誘導体を設計・合成した。このチミジン誘導体は設計通り DNA に組み込まれた後、オージェ電子により DNA に傷害を与え、アポトーシスを誘発し、細胞増殖を抑制することを明らかにした。以上の結果より、オージェ電子を利用した治療・モニター同時進行型内用放射線治療を開発するための基盤を確立できたと考える。

研究成果の概要（英文）：The production of Br-77 was achieved using small medical cyclotron. The thymidine derivative radiolabeled with Br-77 was designed and synthesized for internal radiation therapy using Auger electron. This compound was incorporated into DNA fraction. After incorporation, the effect of internal radiation with Auger electron was appeared as the suppression of cell proliferation. This cell proliferation was induced by the apoptosis in damage cells. Gathering these findings, the internal radiation therapy using Br-77 would be a new promising therapy for cancer treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
総計	20,800,000	6,240,000	27,040,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線治療学、内用放射線治療、オージェ電子、

## 1. 研究開始当初の背景

(1)  $\beta$ -線を放出する放射性同位元素を用いた癌の内用放射線治療は主に I-131 による甲状腺癌の治療で大きな成果を挙げている。一方、分子標的という概念のもとに、癌に特異的に発現する標的（DNA またはタンパク質）に対する内用放射線治療用分子が開発されはじめています。

(2) 申請者は、この分子標的という概念のもとに治療用分子を開発する場合、 $\beta$ -線（飛程：数 mm）よりも飛程の短いオージェ電子を利用することにより、標的分子のみを破壊する内用放射線治療法が可能になるのではないかと考えた。

(3) オージェ電子とは電子捕獲の後に放出される外郭電子であり、非常に飛程が短く（1

$\mu\text{m}$  未満)、単位長当たりを与えるエネルギー（線エネルギー付与：LET）の高い放射線である。このオージェ電子を内用放射線治療用分子に導入することにより、治療用分子と標的分子が強固に結合することによってのみ標的分子に効果を発揮可能となり、副作用の少ない内用放射線治療が可能となる。

(4) 内用放射線治療に用いる放射性核種の性質として、①患者の容態を観察しながら投与していく必要があるために半減期が長すぎないこと、②生体内で放射性核種が治療用分子より脱離しないこと、③体外より治療用分子の動態をトレースできることが必須であると考えられる。現在、オージェ電子を利用した研究では、I-125 が主に利用されている。I-125 はオージェ電子の標的分子への作用を研究するなどの基礎研究には、半減期が 60 日と長く取扱が容易であることや弱い $\gamma$ 線を放出するために測定しやすいなど非常に優れた性質を有している。しかし、臨床への応用を考えた時には、基礎研究をする上での利点が逆に欠点となってくる。これらの問題点を解決できるオージェ電子放出核種として、申請者はこれまでの放射性ハロゲン標識薬剤の開発を行ってきた経験をもとに、Br-77 が最適ではないかと考えた。Br-77 は、半減期が 57 時間、有機化合物中で安定に存在すること、I-125 と同様のオージェ電子のエネルギーを持つこと、オージェ電子以外にごく少量の $\beta$ +線を放出するために PET のモニターが可能であるという非常に優れた性質を有している。

## 2. 研究の目的

(1) オージェ電子放出ハロゲンの中で最終的に臨床応用可能な核種は Br-77 であると考えられる。この Br-77 を超小型サイクロトロンで製造することができれば、その臨床的利用価値は非常に高いと考えられる。そこで固体ターゲットを用いて超小型サイクロトロンによる Br-77 の製造法を確立することを第一の目標とする。

(2) オージェ電子が DNA と相互作用して、DNA に傷害を与えることは報告されている。そこで、DNA に組み込まれる Br-77 標識分子を開発することにより、増殖能の高い癌へ多くに取り込まれ、癌の DNA を傷害することにより治療効果を発揮するかを検討することを目的とする。

(3) オージェ電子のタンパク質への傷害に関する報告はない。しかし、DNA への作用機序を考慮すればタンパク質への傷害作用を有している可能性がある。オージェ電子がタンパク質に傷害を与えることが明らかとな

れば、細胞の癌化や転移のトリガーとなっているタンパク質を特異的に破壊することが可能となる。そこで癌細胞に発現しているタンパク質をオージェ電子で破壊可能であるかを検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 固体ターゲットを用いた医療用超小型サイクロトロンによる Br-77 の製造方法の確立

① Br-77 の製造は Se-77 にプロトン照射する  $^{77}\text{Se}(p,n)^{77}\text{Br}$  反応により行うことを計画した。

②  $^{77}\text{Se}(p,n)^{77}\text{Br}$  反応を行うために必要なターゲットディスクの作製を最初に行った。 $^{63}\text{Cu}$  と  $^{77}\text{Se}$  を真空のガラス製アンプルに封入し、2 日間  $420^\circ\text{C}$  で加熱した。次いでアンプルより  $^{63}\text{Cu}_2^{77}\text{Se}$  を取り出し、乳棒と乳鉢を用いて  $^{63}\text{Cu}_2^{77}\text{Se}$  を均質にした。これを再度アンプルに真空で封入し、 $530^\circ\text{C}$  で 1 日加熱した。その後、温度を  $420^\circ\text{C}$  に下げ、4 日間連続加熱を行った。ついで再度、 $^{63}\text{Cu}_2^{77}\text{Se}$  を乳棒と乳鉢で均質な粉にし、バイアルへ移した。タングステンターゲットディスクに  $^{63}\text{Cu}_2^{77}\text{Se}$  を添加し、 $900^\circ\text{C}$  で 3 時間加熱し、 $^{63}\text{Cu}_2^{77}\text{Se}$  をターゲットディスクに溶着した。

③ 医療用小型サイクロトロンに作製した  $^{63}\text{Cu}_2^{77}\text{Se}$  ターゲットディスクを装着し、 $8\ \mu\text{A}$  で約 2 時間照射を行った。照射終了後、石英ガラス製の抽出装置にターゲットを静置し、Ar ガスを 45 分間流し、装置内を Ar ガスで充填した。ディスクを  $900^\circ\text{C}$  で 1 時間加熱し、ターゲットディスクより Br-77 を抽出した。抽出された Br-77 は装置先端部にトラップされるので、これを  $0.6\text{N}$  アンモニア水を用いて  $^{77}\text{BrNH}_4$  の化学形で回収した (図 1)。

④ この方法を用いることによりターゲットは反復使用可能になり、固体ターゲットの汎用性が高くなると考えられる。

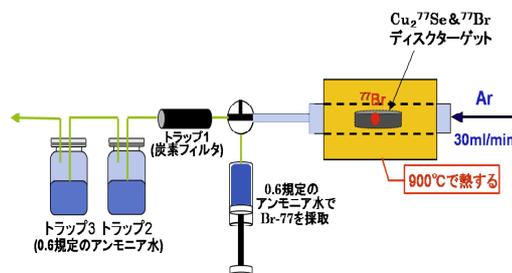


図 1. 抽出装置図

(2) DNA に作用する放射性ハロゲン標識分子の開発

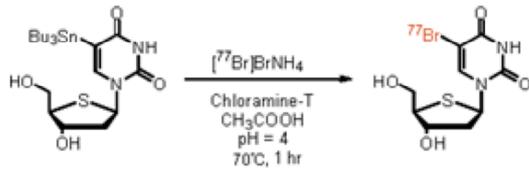


図 2. <sup>77</sup>Br-BTdU 合成経路

① 図 2 の反応機構を用いて Br-77 標識チミジン誘導体 (<sup>77</sup>Br-BTdU) を合成した。

② <sup>77</sup>Br-BTdU の腫瘍細胞への集積性を検討した。マウス肺癌細胞 LL/2 を 24 well Assay Plate に  $2 \times 10^5$  個播種し、24 時間培養した。その後 3.7 kBq/well の <sup>77</sup>Br-BTdU を含む培地に交換した。一定時間インキュベートした後、水酸化ナトリウムで細胞を溶解し、γカウンターを用いて放射能測定後、タンパク定量を行い、取り込み量を補正した。

③ 細胞内分布は、取り込み実験と同様に一定時間インキュベートしたのち、凍結融解法にてホモジネートを作成した。試薬を加え、遠心分離することにより、酸可溶性画分 (ASF)、RNA 画分、DNA 画分、タンパクと脂質画分を採取した。各画分の放射能をγカウンターを用いて測定し、タンパクと脂質画分のタンパク定量を行い、取り込み量を補正した。

④ <sup>77</sup>Br-BTdU の内照射効果の有無を、様々な放射エネルギーを細胞に投与することにより検討した。また、その内照射効果が放射線特異的かどうかを検討するために非放射性薬剤 BTdU を用い、さらに DNA への集積が必要であるかどうかを検討するために <sup>77</sup>Br<sup>-</sup>を用いて細胞の生死判定実験を行った。マウス肺癌細胞 LL/2 を 96 well Assay Plate に  $1 \times 10^4$  個播種し、24 時間培養した。その後、様々な放射エネルギーあるいは濃度の <sup>77</sup>Br-BTdU、BTdU、<sup>77</sup>Br<sup>-</sup>を含む培地で培養した。続いて、死細胞のみを染色するトリパンプルー染色液を用いて、生細胞と死細胞数の計測を行った。

⑤ <sup>77</sup>Br-BTdU が細胞増殖抑制効果を有することが確認できたので、その効果のメカニズムを検討した。マウス肺癌細胞 LL/2 を 96 well Assay Plate に  $1 \times 10^4$  個播種し、24 時間培養した。その後、様々な放射エネルギーの <sup>77</sup>Br-BTdU を含む培地で培養した。48 時間後に、細胞生存性、細胞毒性、アポトーシスの 3 種類の指標を測定可能な ApoTox-GloTM Triplex Assay を行った。

(3) 癌特異的なタンパク質に作用する放射

性ハロゲン標識分子の開発

① 神経内分泌腫瘍に発現しているノルエピネフリン・トランスポータを標的とする Br-77 標識化合物を合成し、PC-12 細胞を用いて (2) の細胞集積性および内照射治療効果判定の検討を同様に行った。

#### 4. 研究成果

(1) 固体ターゲットを用いた医療用超小型サイクロトロンによる Br-77 の製造方法の確立

① Br-77 の製造を 14 回行った結果を以下の表に示す。

表 1. Br-77 回収実験結果

サンプル	電流	照射時間	抽出前 ディスク	抽出後 ディスク	回収量	回収率
ID	(μA)	(min)	(MBq)	(MBq)	(MBq)	(%)
1	8	130	156.5	94.7	36.3	23.17
2	8	126	158.4	93.2	22.6	14.25
3	8	126	128.4	76.2	27.4	21.33
4	8	137	149.1	77.0	36.3	24.32
5	8	126	93.6	37.4	36.6	39.13
6	8	123	152.4	76.2	36.6	24.03
7	8	123	143.9	82.9	36.3	25.19
8	8	124	98.4	43.3	28.1	28.56
9	8	126	135.8	54.0	36.6	26.98
10	8	100	111.0	85.1	18.1	16.33
11	8	126	135.8	87.0	36.6	26.98
12	8	99	126.5	67.7	36.3	28.65
13	8	125	151.7	94.4	33.7	22.20
14	8	186	92.1	45.9	36.3	39.36

② 所属施設での Br-77 の 1 日最大使用数量が 37 MBq であるため、回収量は 37 MBq 以下になるように実験を行った。

③ Br-77 の確認はゲルマニウム検出器を用いたエネルギースペクトル解析により行った。その結果、239 keV と 521 keV に特異的なスペクトルを確認し、これらが Br-77 のスペクトルと一致することから回収した溶液中に Br-77 が含まれていることが確認できた。回収率は 16% から 39% の間であった。回収率に関しては、施設の 1 日最大使用数量を増加させれば、さらに高い回収率を実現できると考えられる。現段階では 37 MBq を上限とする回収量であるが、以下に報告する標識実験を行うには十分な量を製造出来ている。医療用超小型サイクロトロンを用いて、Br-77 の製造に成功したことは、今後の内照射治療への基盤技術が確立できたと考えられる。

(2) DNA に作用する放射性ハロゲン標識分子の開発

① <sup>77</sup>Br-BTdU の取り込み量は経時的に増加し(図 3)、投与から 180 分後には取り込まれた <sup>77</sup>Br-BTdU の 90% 以上が DNA 画分に集積することが確認できた。

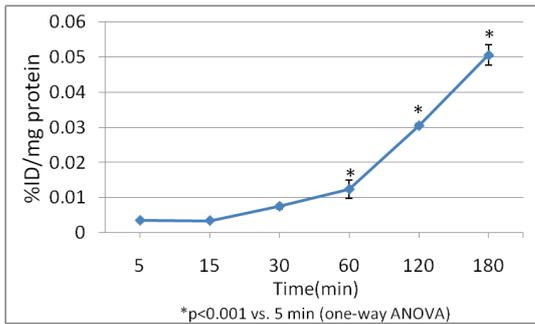


図3.  $^{77}\text{Br}$ -BTdU 取り込み

②  $^{77}\text{Br}$ -BTdU は放射能依存的に細胞増殖を抑制する効果があり、1850 Bq/well 以上の放射能で細胞数の有意な減少が認められた(図4)

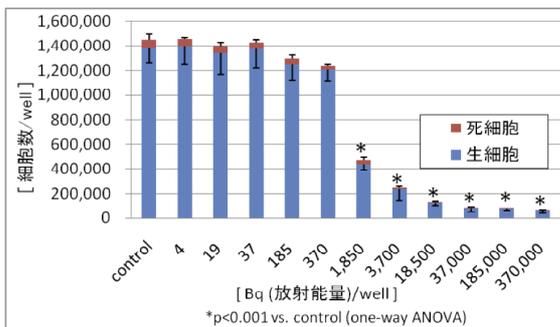


図4.  $^{77}\text{Br}$ -BTdU 生死判定

③ DNA に組み込まれない  $^{77}\text{Br}^-$  では、用量依存的な効果は観察されず、 $^{77}\text{Br}$ -BTdU はDNA に組み込まれることにより効果が出ていることを確認できた。

④ 非放射性 BTdU では 1 nmol/well から細胞増殖が抑制され、非放射性 BTdU でも効果があることを確認した。そこで、 $^{77}\text{Br}$ -BTdU に含まれる BTdU のモル濃度を算出することで、 $^{77}\text{Br}$ -BTdU の放射能からその濃度を求めた。その結果  $^{77}\text{Br}$ -BTdU が有意な減少をみせた 1850 Bq は 1.37 pmol に相当し、 $^{77}\text{Br}$ -BTdU の方が約 1000 倍低いモル濃度から効果が出ていることが確認できた。以上の検討により、 $^{77}\text{Br}$ -BTdU の細胞増殖抑制効果は、非放射性 BTdU の持つ薬理効果ではなく、DNA に取り込まれた  $^{77}\text{Br}$ -BTdU から放出されるオージェ電子による内照射効果が主作用であることが示唆された。

⑤ 放射能増加とともに細胞生存性が減少し、細胞毒性とアポトーシスの増加がみられた。アポトーシスの指標を図5示す。これにより  $^{77}\text{Br}$ -BTdU はアポトーシスを誘発していることが確認できた。

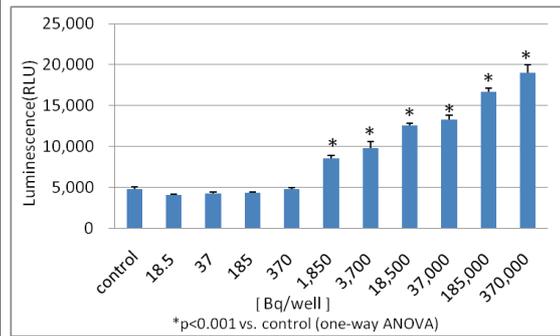


図5. アポトーシスの指標

(3) 癌特異的なタンパク質に作用する放射性ハロゲン標識分子の開発

① ノルエピネフリン・トランスポーターへの標識化合物の結合は確認されたが、内照射効果は今回の検討では認められなかった。放射能を増やすことで、内照射効果が発現する可能性はあると考える。

## 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0件)

〔学会発表〕 (計7件)

① 佐野圭祐、清野泰、他、腫瘍の増殖能イメージングを目的とする放射性臭素標識ヌクレオシド誘導体の開発、第5回日本分子イメージング学会学術集会、2010年5月22日～23日、ピアザ淡海(大津市)

② Kiyono Y et al. Evaluation of radiobromine-labeled 5-bromo-4'-thio-2'-deoxyuridine as a tumor proliferation imaging agent. Society of Nuclear Medicine, the 57th Annual Meeting 2010年6月5日～9日 Salt Palace Convention Center (Salt Lake City, USA)

③ Kiyono Y et al. Development of radiobromine-labeled 5-bromo-4'-thio-2'-deoxyuridine as a tumor proliferation imaging agent. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine (EANM2010) 2010年10月9日～13日 Austria Center Vienna (Vienna, Austria)

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：アポトーシス誘導剤

発明者：清野泰

権利者：国立大学法人福井大学

種類：特許

番号：特願2011-073353

出願年月日：23年3月29日

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清野 泰 (KIYONO YASUSHI)

福井大学・高エネルギー医学研究センター

・准教授

研究者番号：50305603