

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月29日現在

機関番号：13401  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22659219  
 研究課題名（和文） 分子標的照射治療における戦略的治療薬剤創製基盤の開発  
 研究課題名（英文） Construction of the fundamental technology for development of strategic internal radiation therapy agents  
 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・教授  
 研究者番号：50305603

研究成果の概要（和文）：内照射治療とは、放射性同位元素（RI）を導入した薬剤を体内に投与し、その放射線により癌細胞を殺傷する治療法である。本研究では、飛程が10 nm程度のオージェ電子を放出する RI を導入した放射性薬剤を合成し、腫瘍細胞に対する内照射効果（殺細胞効果）を検討することを目的とする。核を標的とした内照射治療薬剤は、DNA に組み込まれオージェ電子を放出することにより細胞増殖を抑制することが明らかとなった。細胞膜を標的とした治療薬剤では、細胞増殖抑制では無く、細胞自体を殺傷していることが明らかとなり、新しいタイプの内照射治療薬剤開発の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Br-77 is one of Auger electron emitting radionuclide. Auger electron emitting radiopharmaceuticals are attractive for targeted nanoirradiation therapy. The DNA of malignant cells is particularly suitable target. The aim of this study is to evaluate 5-[<sup>77</sup>Br]bromo-4'-thio-2'-deoxyuridine (<sup>77</sup>Br-BTdU) as a radiopharmaceutical for DNA targeted nanoirradiation therapy and (2S, α S)-2-(α -(2-[<sup>77</sup>Br]bromophenoxy)benzyl)morpholine ((SS)-<sup>77</sup>Br-BPBM) as a radiopharmaceuticals for cell membrane targeted nanoirradiation therapy. <sup>77</sup>Br-BTdU is a potential radiopharmaceutical for DNA targeted nanoirradiation therapy and (SS)-<sup>77</sup>Br-BPBM is also a potential radiopharmaceuticals for cell membrane targeted nanoirradiation therapy..

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	0	1,800,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

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) β-線を放出する放射性核種を用いた癌の内照射療法は、主に I-131 による甲状腺癌や[<sup>131</sup>I]MIBG による神経内分泌腫瘍の治療で大きな成果を挙げている。

(2) しかし、内照射治療用薬剤が未だに数種

類しか開発されていないことが、内照射治療の普及が遅れている一因となっている。

(3) 内照射治療を考えたときには、放射線の中でも物質との相互作用の大きい荷電粒子線を利用するのが妥当である。荷電粒子線は、それを放出する RI によって様々な飛程（元

素から飛び出してきた電子などの粒子が物質中で到達できる距離)を持っており、その幅は数 nm から数 mm である。例えば、飛程が数 nm の RI を核酸誘導体に導入すれば、その核酸誘導体を取り込まれた細胞の DNA だけを破壊することが可能であり、増殖能の高いがん細胞を選択的に攻撃することが可能となる。また、飛程が数 mm の RI を導入した薬剤の標的を細胞実質のタンパクに設定すれば、そのタンパク自身と周囲の細胞も破壊することが可能となる。一方で、周囲に正常な細胞が存在すれば、正常細胞にも損傷を与えてしまい副作用という問題が発生する。このような標的と放射線との関係について総合的な研究は行われていない。

(4) 近年、癌特異的に発現するタンパク質を標的にした分子標的薬が抗癌剤として注目されている。申請者は、この分子標的という概念を内照射治療に導入した分子標的内照射治療を提案してきた。分子標的内照射治療を成功させるには、 $\beta$ -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が必須になってくる。オージェ電子とは、非常に飛程が短く(1  $\mu$ m 未満)、単位長当たりを与えるエネルギーの高い放射線である。このオージェ電子を内照射治療薬剤に導入することにより、分子標的内照射薬剤と標的分子が強固に結合した時のみ、標的分子に効果を発揮可能となり、副作用の少ない分子標的内照射治療が可能となる。

## 2. 研究の目的

(1) 分子標的内照射薬剤の開発には、統一された理論が構築されていない。そこで、申請者は治療標的部位を詳細に解析することにより、より治療効果の高い薬剤開発が可能ではないかと考えた。細胞機能を維持するためには、核酸、細胞実質中のタンパクそして細胞膜がそれぞれ機能することが重要である。そこで、腫瘍細胞において、核、細胞実質、そして細胞膜の3カ所を標的とする治療薬剤を作製し、最適な治療標的部位を探索することを計画した。

## 3. 研究の方法

(1) 核を標的とする薬剤としては、チミジン誘導体である 5-[ $^{77}\text{Br}$ ]bromo-4'-thio-2'-deoxyuridine ( $^{77}\text{Br}$ -BTdU) を設計した。細胞膜を標的とする薬剤としては、ノルエピネフリン・トランスポータ (NET) に結合する (2S,  $\alpha$  S)-2-( $\alpha$ -(2-[ $^{77}\text{Br}$ ]bromophenoxy)benzyl)morpholine ((SS)- $^{77}\text{Br}$ -BPBM) を設計した。

(2) モデルとして用いる神経内分泌腫瘍細胞としては、褐色細胞腫である PC-12 細胞を

選択した。これらの細胞に上記の内照射薬剤を取り込ませる。一定時間経過後、トリパンブルー染色により細胞の生死判定及び障害度の測定を行った。またアポトーシスの有無を検討するために、アポトーシスの検出も行った。

(3) ノドマウスの肩に  $1 \times 10^6$  個の腫瘍細胞を移植し、腫瘍径が 1 cm 以上になった時点で様々な放射エネルギーの内照射薬剤を尾静脈より投与した。毎日腫瘍径を測定し、腫瘍退縮効果のある薬剤と放射エネルギーを探索した。

## 4. 研究成果

(1)  $^{77}\text{Br}$ -BTdU の標識合成は、スズ前駆体を合成し、クロラミンT法により行った(図1)。HPLCによる精製を行い、放射化学的純度  $42 \pm 7\%$ 、放射化学的収率 99%以上(n = 12)で  $^{77}\text{Br}$ -BTdU を得た。

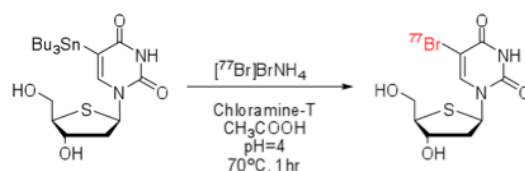


図1.  $^{77}\text{Br}$ -BTdU の標識合成

(2) (SS)- $^{77}\text{Br}$ -BPBM の標識合成は、ヨウ素前駆体である(SS)-IPBM を用いたヨウ素-放射性臭素交換反応にて達成した(図4)。HPLCによる精製を行い、放射化学的純度  $45 \pm 5\%$ 、放射化学的収率 99%以上(n = 6)で (SS)- $^{77}\text{Br}$ -BPBM を得た。

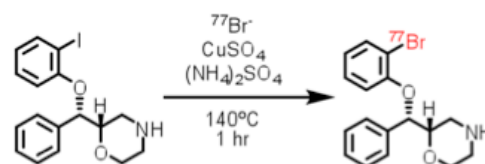


図2. (SS)- $^{77}\text{Br}$ -BPBM の標識合成

(3) LL/2 細胞用いて  $^{77}\text{Br}$ -BTdU の細胞取込実験を行い、 $^{77}\text{Br}$ -BTdU の集積部位の確認を行った。まず  $^{77}\text{Br}$ -BTdU の内照射効果の有無を、様々な放射エネルギーの  $^{77}\text{Br}$ -BTdU および  $^{77}\text{Br}$ 、非放射性の BTdU を LL/2 細胞に添加し、細胞の生死判定実験を行うことにより検討した。 $^{77}\text{Br}$ -BTdU は細胞の DNA 画分に、添加 15 分後で 70%以上、60 分後で 80%以上集積し、Auger 電子を利用した内照射治療薬剤として適した集積特性を示した。

(4)  $^{77}\text{Br}$ -BTdU は放射エネルギー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3)。

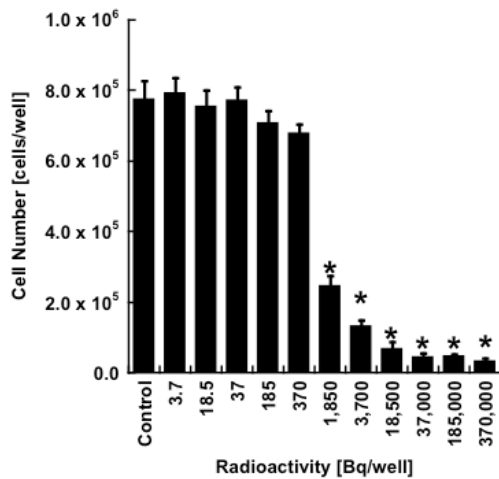


図3. 様々な放射能の  $^{77}\text{Br}$ -BTdU を添加した時の細胞数の変化

(5) 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 (図4)。非放射性BTdU 添加でも、細胞増殖抑制は観察されたが、 $^{77}\text{Br}$ -BTdU の方が約1000倍低い物質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、DNA に取り込まれた  $^{77}\text{Br}$ -BTdU から放出される Auger 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。

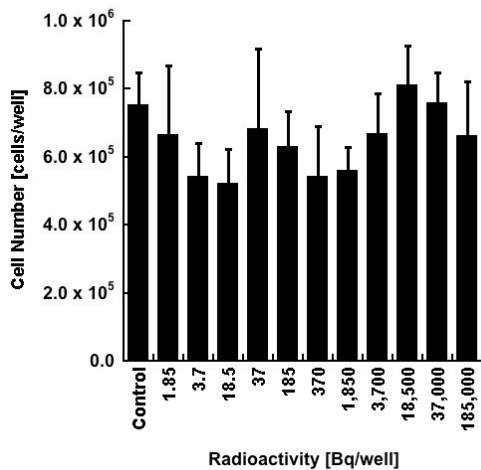


図4. 様々な放射能の  $^{77}\text{Br}$ -BTdU を添加した時の細胞数の変化

(6) ノードマウスの右肩に LL/2 細胞を移植

し10日間飼育した後内照射治療実験を行った。治療群には  $^{77}\text{Br}$ -BTdU (370 kBq と 3700 kBq) を尾静脈より1回投与し、腫瘍体積の変化を観察した。その結果、3700 kBq 投与群では4日後にコントロールの61.2%まで、370 kBq 投与群では3日後にコントロール群の64.1%まで、増殖を抑制していることが示された。これらの結果より、 $^{77}\text{Br}$ -BTdU が増殖能の高い腫瘍を標的とする内照射治療用薬剤としての可能性を十分有していることが示された。

(7) (SS)- $^{77}\text{Br}$ -BPBM の NET に対する結合能力を検討するために、ラット脳シナプス膜画分を用いた結合阻害実験を行った。その結果、(SS)-BPBM は NET に対して高い親和性および選択性を示した (図5)。

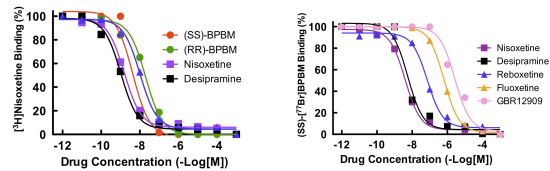


図5. 親和性および選択性の検討結果

(8) 3次元培養を行った PC-12 細胞に、(SS)- $^{77}\text{Br}$ -BPBM を添加したところ、185 Bq/well からコントロール群に比べて有意な生細胞数の減少が観察された。また、死細胞数は、18,500 および 37,000 Bq/well で有意に増加していた (図5)。この結果は、核酸標的の内照射治療薬剤の増殖抑制作用とは異なるメカニズムで、細胞死を誘導していることを示唆しており、新しいタイプの内照射治療薬剤の開発の可能性を示している。

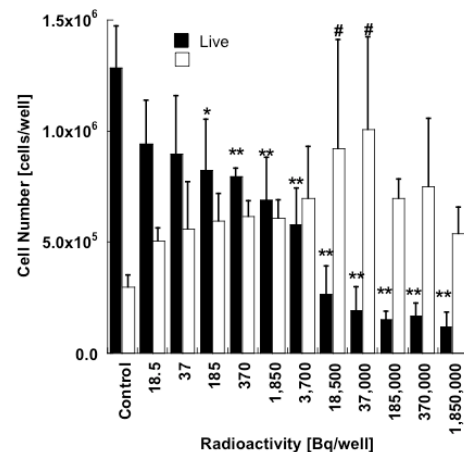


図6. 様々な放射能の (SS)- $^{77}\text{Br}$ -BPBM を添加した時の細胞数の変化

(9) 以上の検討により、オージェ電子を利用した内照射治療では、治療標的によって異なるメカニズムで腫瘍を治療できる可能性が確認され、今後の薬剤開発に有用な知見を得ることができた。

#### 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 1 件)

- ① Yoshii Y., Furukawa T., Kiyono Y., Watanabe R., Mori T., Yoshii H., Asai T., Okazawa H., Welch MJ., Fujibayashi Y. Copper-64-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone) accumulates in rich regions of CD133+ highly tumorigenic cells in mouse colon carcinoma. Nuclear Medicine & Biology 査読有、37、2010、395-404  
DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2009.12.011

[学会発表] (計 18 件)

① 清野 泰、放射性臭素標識プローブの開発：診断から治療へ、震災復興分子イメージング化学シンポジウム (招待講演) 2012 年 3 月 6 日、東北大学 (仙台市)

② Kiyono Y. et al. Evaluation of radiobrominated (2S,  $\alpha$  S)-2-( $\alpha$ -(2-bromophenoxy)benzyl)morpholine as an imaging probe for brain norepinephrine transporter. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine (EANM2011)、2011 年 10 月 16 日~19 日、Birmingham Convention Center (Birmingham, UK)

③ Kiyono Y. et al. In vivo evaluation of radiobromine-labeled 5-bromo-4-thio-2'-deoxyuridine as an imaging agent for tumor proliferation. Society of Nuclear Medicine, the 58th Annual Meeting 2011 年 6 月 4 日~8 日、San Antonio Convention Center (San Antonio, USA)

④ 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)

⑤ Kiyono Y. et al. Development of radiobromine-labeled thymidine analogue as a tumor proliferation imaging agent. 2010 World Molecular Imaging Congress、2010 年 9 月 8 日~11 日、Kyoto International Conference Center (Kyoto, Japan)

⑥ 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)

⑦ Kiyono Y. et al. Development and Evaluation of Radiobromine Labeled Thymidine Derivative for Proliferative Tumor Imaging. CIS Workshop2010、2010 年 5 月 28 日、Hokkaido University (Sapporo, Japan)

[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：平成 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・教授

研究者番号：50305603