

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670552

研究課題名(和文) グアニン四重鎖構造を標的とするテロメラーゼ活性測定プローブの開発

研究課題名(英文) Development of ^{64}Cu labeled phthalocyanine derivative for imaging of telomerase activity.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞では、テロメラーゼの活性が上昇しているために、細胞の不死化に繋がっている。テロメラーゼ活性をイメージングできれば、がん患者の治療効果や予後の予測に非常に有益な情報を提供できる。そこで、テロメラーゼ活性イメージングを目的とした ^{64}Cu]PcTSを合成し、細胞取り込み実験により ^{64}Cu]PcTSを評価した。実験に用いたがん細胞では ^{64}Cu]PcTS の取り込みが経時的に増加したことより、 ^{64}Cu]PcTSはテロメラーゼ活性イメージング用PET薬剤として使用できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells are immortal because the activity of telomerase is increased. The imaging of telomerase activity would provide the useful information about the therapeutic effect and prediction of cancer treatment. Therefore, we designed the imaging probe for measuring telomerase activity and synthesized ^{64}Cu]PcTS and then investigated this as a telomerase activity imaging probe. In cell uptake study, the uptake of ^{64}Cu]PcTS was increased with time. This result suggests that ^{64}Cu]PcTS has a potential as an imaging probe for measuring telomerase activity.

研究分野：分子イメージング

キーワード：放射性医薬品 テロメラーゼ活性 放射性銅 PET

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) テロメアは、染色体 DNA の両端に存在する 5'-(TTAGGG)-3' という 6 塩基の 10kbp におよぶ繰返し配列であり、染色体の安定性を保つ役割を担っている。

(2) 正常細胞では、細胞分裂毎にテロメアが短縮し、5kbp 程度になると分裂寿命の限界に達し、分裂できなくなった細胞は最終的にアポトーシスへと至る (Harley et al. Nature, 1990)。

(3) しかし、80~90%のがん細胞においては、テロメアを伸長させるテロメラーゼの活性が高いために、分裂寿命に至らず細胞が不死化してしまうことが明らかとなっている (Kim et al. Science, 1994)。

(4) さらに、がん幹細胞においても、テロメラーゼ活性が上昇していることが報告されている (Phatak et al. Br J Cancer, 2007)。

(5) このような背景のもと、テロメラーゼ活性を調節することが、がん治療の重要な標的になりつつある。

2. 研究の目的

(1) 放射性銅-64 (Cu-64) 標識フタロシアニン誘導体がテロメラーゼ活性イメージング剤となるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 薬剤設計

フタロシアニンとは 4 つのフタル酸イミドが窒素原子で架橋された構造を持つ環状化合物である。ポルフィリンと類似の構造を持ち、平面を持つ平面構造をとる。この構造が、テロメアを形成する特殊な構造 (G-quadruplex) に結合してテロメラーゼ反応を阻害すると考えられている。

フタロシアニンはテロメラーゼ阻害剤として利用されているが、大半がカチオン性であるが DNA はアニオン性のため、テロメア部位以外にも非特異的に結合してしまう。これは結果として阻害効率が著しく低下することになってしまう。ところが、アニオン性のフタロシアニンは静電的反発があるためにアニオン性である DNA には結合せずに、テロメアのみ結合するということが見出された。

本研究ではアニオン性のフタロシアニンである Metal phthalocyanine tetrasulfonic acid (Me-PcTS) を化合物として選択した。

Cu-64 は低エネルギーの陽子線を用いて効率よく製造できるため、医療用の小型サイクロトロンを用いて製造することができる。

また Cu-64 は、 γ 線の外に β^+ 線を放出することから、標的部位への放射能の集積状態を評価しながら治療することができるため、高い汎用性をもった内用放射性薬剤の標識核種として有効であると考えられている。Cu-64 はまた、半減期が 12.7 時間と比較的に長いので Me-PcTS の Me として Cu-64 を選択した (図 1)。

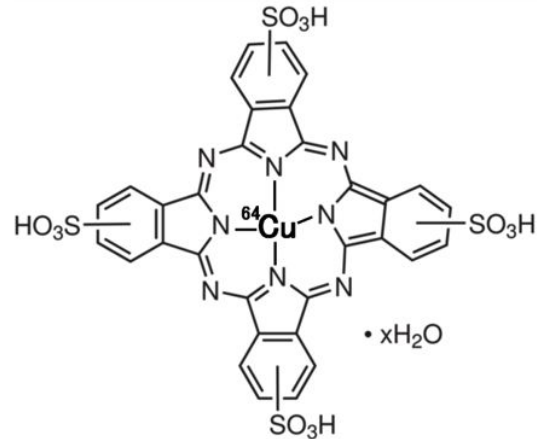


図 1. $[^{64}\text{Cu}]\text{PcTS}$ の構造式

(2) $[^{64}\text{Cu}]\text{PcTS}$ の合成

Cu-64 の製造は医療用超小型サイクロトロンを用いて行った。Ni-64 を電着させた固体ターゲット用金ディスクをサイクロトロンにセットし、11 MeV、20 $\mu\text{A}\cdot\text{min}$ で陽子を照射して $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ 反応による Cu-64 の製造を行った。照射終了後、金ディスクを 6N 塩酸の中に入れ、加熱を行い、Ni-64 と Cu-64 を溶出した。

多くの金属イオンは、錯形成反応によって陰イオンに変えることにより、陰イオン交換樹脂カラムで分離することができる。この原理をにより、6N 塩酸溶液中で Cu-64 は錯イオンを形成するため、陰イオン交換樹脂に吸着しカラムに保持される。一方、Ni-64 は錯イオンを形成しないため、カラムから溶出される。Ni-64 を洗い流したあと、塩酸濃度を 0.1 N に下げることでカラムから Cu-64 の溶出を行った。

$[^{64}\text{Cu}]\text{PcTS}$ の標識は、標識前駆体のテトラスルホン酸フタロシアニン水和物 (PcTS) に、製造した Cu-64 と緩衝液に酢酸アンモニウム水溶液 10 mM を加え、サーモステーション MD-mini で 1 時間加熱し反応させることにより行った。非放射性 Cu-PcTS をを用いて HPLC で分析を行い、その結果を踏まえて、HPLC により $[^{64}\text{Cu}]\text{PcTS}$ の分取を行った。分取 HPLC の分取条件は以下のとおりである。移動相はメタノール : 10 mM リン酸緩衝液 (pH=6) = 20:80 を 30 分かけて 60:40 までグラジエントをかけた。分取カラムは Cosmosil 5C₁₈AR-II 10 x 250 mm を使用した。流速は 3.0 ml/min であった。分析 HPLC の条件は以

下のとおりである。移動相は分取 HPLC と同じ条件を使用した。分析カラムは Cosmosil 5C₁₈ AR-II 4.6 x 150 mm を使用し、流速は 1.0 ml/min であった。

(3) 細胞取込実験

PC3、Colon26、LNCaP の 3 種類の細胞を用いて [⁶⁴Cu]PcTS の細胞の取り込み量を評価した。[⁶⁴Cu]PcTS が会合体を形成するために細胞取り込みが行われにくい可能性があるため、一部の実験では [⁶⁴Cu]PcTS を単離させる目的で界面活性剤 Tween80 を添加した。

4. 研究成果

(1) Cu-64 の精製収率

Cu-64 自動分離精製装置を用いて Cu-64 の精製を行った。その結果を表 1 に示す。Cu-64 の放射収率は 59.1 ± 14.1 % (n = 4) であった。

表 1 . ⁶⁴Cu 自動分離精製装置による Cu-64 の収率

精製前 ディスク線量 [MBq]	合成後 Cu 回収 バイアル 線量 [MBq]	減衰補 正線量 [MBq]	平均 [%]	標準 偏差 [%]
1846	840	958	59.1	14.1
1558	551	622		
1306	807	907		
1132	755	851		

(2) [⁶⁴Cu]PcTS の標識合成と精製

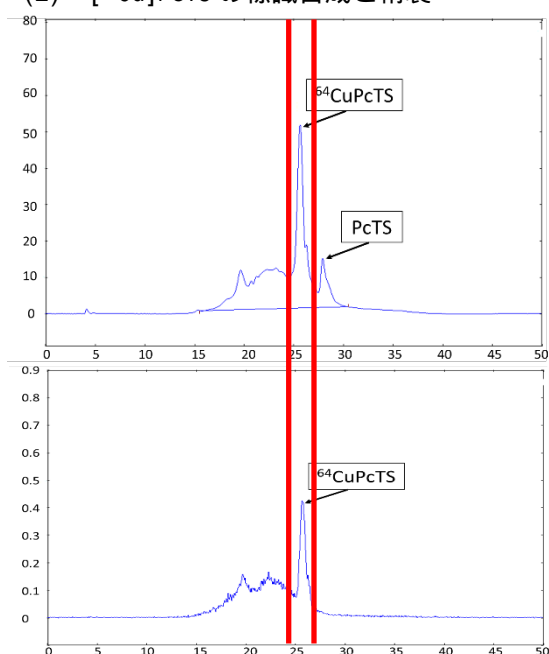


図 2 . 分取 HPLC のクロマトグラム (上 : UV、

下 : RI)

標識反応液を分取カラムで分取したクロマトグラムを図 2 に示す。図 2 中赤線が [⁶⁴Cu]PcTS の画分であるため、この部分を分取した。分取画分を分析 HPLC で確認した結果が図 3 である。

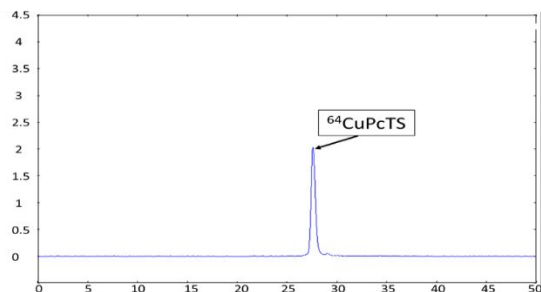


図 3 . 分析 HPLC の RI のクロマトグラム

図 3 に示す様に、単一の放射能ピークが得られており、高純度の [⁶⁴Cu]PcTS が分離精製できたことが示された。放射化学的収率は 11.1 ± 3.4% (n=3) であった。

(3) 細胞取込実験

[⁶⁴Cu]PcTS を細胞に添加後、経時的に細胞への集積量を観察した。その結果、PC3 および Colon 26 細胞では経時的にその集積が増加した。一方で、LNCaP 細胞においては、添加 48 時間後の集積は低下していた。界面活性剤の影響はほとんど見られなかった。図 4 にその結果を示す。

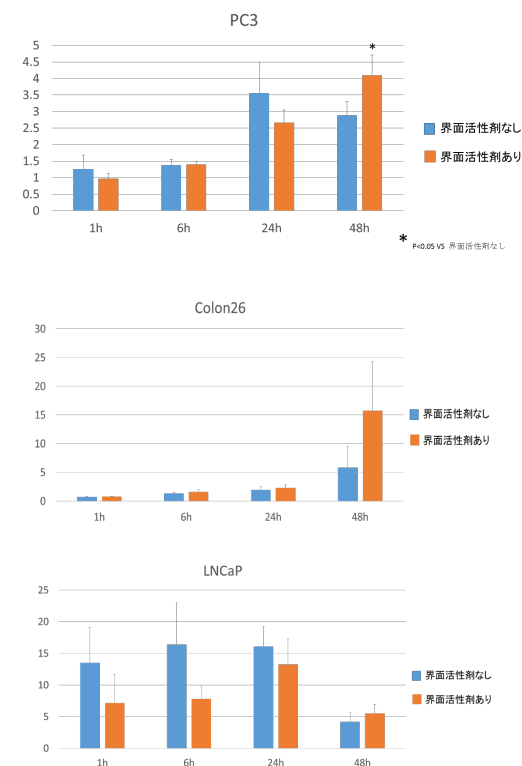


図 4 . [⁶⁴Cu]PcTS の細胞内集積量 (上 : PC3、中 : Colon26、下 : LNCaP)

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0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

(2) 研究分担者

森 哲也 (MORI, Tetsuya)
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：40397287

(3) 連携研究者

なし