

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端利用技術推進研究事業

新規 γ ・ β 線核種によるがん診断・治療の開発研究

(H17-ナノ-018)

平成17年度総括研究報告書

主任研究者 藤林 康久

平成18(2006)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
新規 γ ・ β 線核種によるがん診断・治療の開発研究	
藤林 康久	3
II. 分担研究報告	
1. 超小型サイクロトロンを用いる放射性同位元素の製造に関する研究	
藤林 康久	11
(別添資料1)	
2. 薬剤設計、合成に関する研究	
徳永 雄次、藤林 康久	15
3. 分子生物学的評価に関する研究	
—Cu-ATSMの腫瘍集積に関する分子生物学的検討—	
古川 高子	23
(別添資料2)	
4. カセット式自動合成装置を用いたPET用エストロゲン受容体イメージング	
薬剤F-18標識estradiol (FES)の製造に関する検討	
森 哲也、岡沢 秀彦	29
(別添資料3)	
6. 臨床診断に関する研究	
岡沢 秀彦、米倉 義晴	33
7. 婦人科腫瘍診断に関する研究	
婦人科癌再発診断におけるCT、PET融合画像の臨床的有用性に関する研究	
富樫 かおり	37
8. 微細電子飛跡検出器に関する研究	
谷森 達、身内賢太朗、窪 秀利	41
9. 研究成果の刊行に関する一覧表	47
10. 別添資料	49

總括研究報告

新規 γ ・ β 線核種によるがん診断・治療の開発研究

（主任）研究者 藤林 康久 福井大学高エネルギー医学研究センター・教授

研究要旨：超小型サイクロトロンによる新規放射性同位元素製造技術の確立，コンピュータシステムによるがん親和性分子設計と合成技術の開発，放射性薬剤の製造・品質管理に関する技術開発，NEDOプロジェクトによる超高感度放射線イメージング機器コンプトンCT（CPT）開発を融合することにより，新規 γ ・ β 線放出核種によるがん診断・治療に有用な薬剤ならびに医療技術を開発する。

A. 研究目的

新しい概念に基づく位置検出型放射線検出装置であるコンプトンCT（CPT）の開発により，従来の核医学用放射性核種に加えて，高エネルギーガンマ線，中半減期核種が標識核種として利用可能となると考えられる。このようなCPT検査では，

- ① 高感度であるため，少量投与で被ばく線量を安全な範囲に維持しながら，
- ② 広いガンマ線エネルギー範囲にわたって必要十分な分解能を確保し，
- ③ かつ，中半減期核種も利用できるため長時間にわたる動態を追跡できる可能性が高い。

また，上記放射性核種の中の多くがガンマ線とともにベータ線を放出することからがん選択性を有するイメージング薬剤がそのまま内部放射線治療薬剤としても利用可能となる可能性が高い。CPTとの併用により，標的となるがん部位ならびに副作用発現の可能性が高い部位における薬剤量（すなわち放射線量）を直接モニタリングできることが期待される。

本研究では，FDG-PETの保険適用により本邦に急速に普及しつつある超小型サイクロトロンを利用し，各病院・センターで実施可能な種々の放射性核種（RI）の製造技術を確立するとともに，それらを用いた新規な概念に基づくがん親和性薬剤の設計開発を行う。これにより，新しいがんの高感度診断法を確立するとともに，非侵襲的かつ最適化されたがん治療技術へと展開していく。

B. 研究方法

CPTの特性ならびに診断・治療同時進行型薬剤標識に適した放射性核種の文献調査から，比較的高エネルギーガンマ線を放出する核種を選択した。これを基にして，引き続き既設置の超小型サイクロトロンと固体ターゲットシステムを用いた放射性Cuの製造技術の改良を行うとともに，新規に放射性Brの製造を行うため先行研究が進展しているワシントン大学等で調査を行った。同時に，新規な非密封放射性同位元素を使用するための変更承認申請について打ち合わ

せを行っている。一方、これまでの研究において放射性Cu標識薬剤Cu-ATSMによるがんイメージングと治療の可能性を明らかにしてきたが、特に腫瘍組織内に質的に異なる形質を持つがん細胞が混在していること、申請者らが開発したCu-ATSMがそれらを識別できることを明らかにした。また分子設計システムを本研究費により導入し、RDG配列をリードとする新規ペプチド型および非ペプチド型分子の設計を開始した。

これらと並行して、がんへの移行性を有する放射性薬剤について、診断的見地からの臨床検討を行うための薬剤製造技術の確立ならびにそれらを用いた臨床検討を行い、診断から治療への展開の可能性を基礎的に考察した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、福井大学動物実験指針等に従い、実験内容についての承認を受けた上で実施した。

開発された放射能標識分子プローブを人体に適用するにあたっては、状況に応じて学内倫理委員会あるいは治験委員会に諮り、承認を得た上で実施した。被験者からは十分なインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果ならびに考察

超小型サイクロトロンを用いて、がん内部放射線照射治療に適した放射性同位元素の製造が可能であることを明らかにした。

がん細胞に対して特異的に結合する薬剤として、細胞膜インテグリンに対する結合性を有するRGDペプチドならびにその誘導体について構造計算による分子設計を行った。これにより、非ペプチド性分子プロー

ブ設計に必要な知見を得ることができた。

放射性Cuを用いたがん親和性薬剤のがん組織内集積とがん細胞の特性についての詳細な検討を行った結果、低酸素がん集積性を持つCu-ATSMを高度に集積するがん組織は、血管誘導が未だ行われず低酸素環境にありながら、増殖を停止することで安定に生存しているがん細胞からなることが明らかとなった。このような部位は抗がん剤、放射線照射のいずれに対しても抵抗性を有することが考えられ、質的な治療方針の決定に重要な情報であることが示された。

婦人科領域においてホルモン感受性腫瘍の検出に有用とされるF-18標識エストラジオール (FES) の合成法ならびにその臨床検討を行った。市販カセット型FDG自動合成装置のプログラムならびにカセット配管を変更することにより、機器そのものに改造を加えることなく人体適用可能なFESを安定供給できることを明らかにした。

FESを用いた婦人科腫瘍診断において、近年増加傾向にある子宮筋腫と肉腫との鑑別診断に非常に有用な指標となることが示された。

また、融合画像による婦人科腫瘍診断が、治療方針の決定に重要であることを、明らかにできた。

これらの基礎ならびに臨床医学研究と並行して、コンプトンCT (CPT) の開発を行い、可搬型装置の製作に成功した。

D. 結論

放射性同位元素の製造、その利用から検出技術の開発にいたる、一連の研究体制が構築され、有機的に連携できることが示された。次年度は、さらに具体的目標を設定

し研究を推進する。

E. 健康危険情報
特になし

分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

（分担）研究報告書

超小型サイクロトロンを用いる放射性同位元素の製造に関する研究

（分担）研究者 藤林 康久 福井大学高エネルギー医学研究センター・教授

研究要旨：本研究では、超小型サイクロトロンによる新規放射性同位元素製造技術の確立、コンピュータシステムによるがん親和性分子設計と合成技術の開発、放射性薬剤の製造・品質管理に関する技術開発、NEDOプロジェクトによる超高感度放射線イメージング機器CPT開発を融合することにより、新規 γ ・ β 線放出核種によるがん診断・治療に有用な薬剤ならびに医療技術を開発する。PET検査の保険適用に伴い急速に普及しつつある超小型サイクロトロンを用いた新しい放射性同位元素製造は、内部照射治療用放射性同位元素の供給の途を開きその普及に資するのみでなく、高価なサイクロトロンの効率的運用に非常に有用である。本年度は、適当な長さの半減期を持つ β 線放出核種製造について、基礎検討ならびに技術の確立を行った。

A. 研究目的

F-18-フロオロデオキシグルコース (FDG) ならびにポジトロンCT (PET) を用いた検査が保険適用となり、FDG-PETの普及が急速に進んでいる。F-18の半減期は焼く2時間と短いため、製薬企業による全面的供給は難しく、現在本邦のみでも100程度のPET検査施設では超小型サイクロトロンを設置して自らFDGの製造を行っているのが実情である。現状では、F-18製造にサイクロトロンが使われる時間は一日あたり数時間以内であり、高価な機器が有効利用されていない。

近年、共同研究者らによりコンプトン散乱を原理とする新たな γ 線検出装置 (CPT) が開発された。CPTは、非常に感度が高くかつ高エネルギー γ 線でも位置弁別できることから、従来利用が難しいと思われてきた放射性同位元素にも適用可能である。それらの中には、 β 線を同時放出することによ

りがんの内部放射線照射治療に適すると考えられるものが多く含まれる。幸いなことに、それらのいくつかは、超小型サイクロトロンによって製造可能であると考えられる。

本研究では、超小型サイクロトロンを用いてCPTによる検出ならびにがんの内部放射線照射治療に適すると考えられる放射性同位元素の製造技術を確立することを目的とする。

B. 研究方法

上記の目的に適すると考えられる Cu-64 については、すでに、半自動法によって製造可能であることを明らかにした。また、福井大学に設置されたサイクロトロンには、Cu-64を製造するための固体ターゲット自動着脱装置が設置されている。臨床治療に

必要な大量のCu-64を安全に製造するには、Cu-64製造装置が完全に遠隔自動化される必要がある。そこで、本年度の研究では、市販のロボット制御システムを用いた簡便なCu-64自動精製装置の開発を行った。

これとは別に、F-18のようなハロゲン元素は、有機化合物の標識に有用と考えられる。Brの放射性同位元素であるBr-76、Br-77もCu-64と同様、超小型サイクロトロンでの製造が可能と考えられる。特にBr-77は、半減期が3日弱、核崩壊に際して1%未満のポジトロンすなわち511KeVの電磁波と、90%程度の内部転換電子（低エネルギー電子）を放出することから、本研究の目的とする放射性同位元素として理想的と考えられる。本年度は、放射性Brの製造について実績のある米国セントルイス市ワシントン大学を訪問し、放射性Br製造についての現状調査を行った。

(倫理面への配慮)

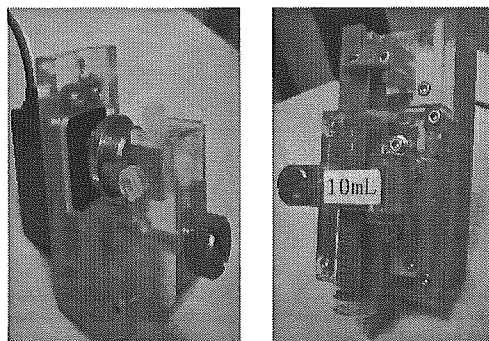


図1. 要素パーツ (シリンジ、バルブ)

人体適用ならびに動物実験を行っておらず、特に問題はない。

C. 研究結果ならびに考察

ロボット化に必要な要素技術、要素パーツを確立した。それらを組み合わせることにより、容易に大量の放射能を取り扱うことのできる装置を構築した。ロボット制御用ボードを用いることにより、操作手順を実際に教示する手法を用いてプログラムを

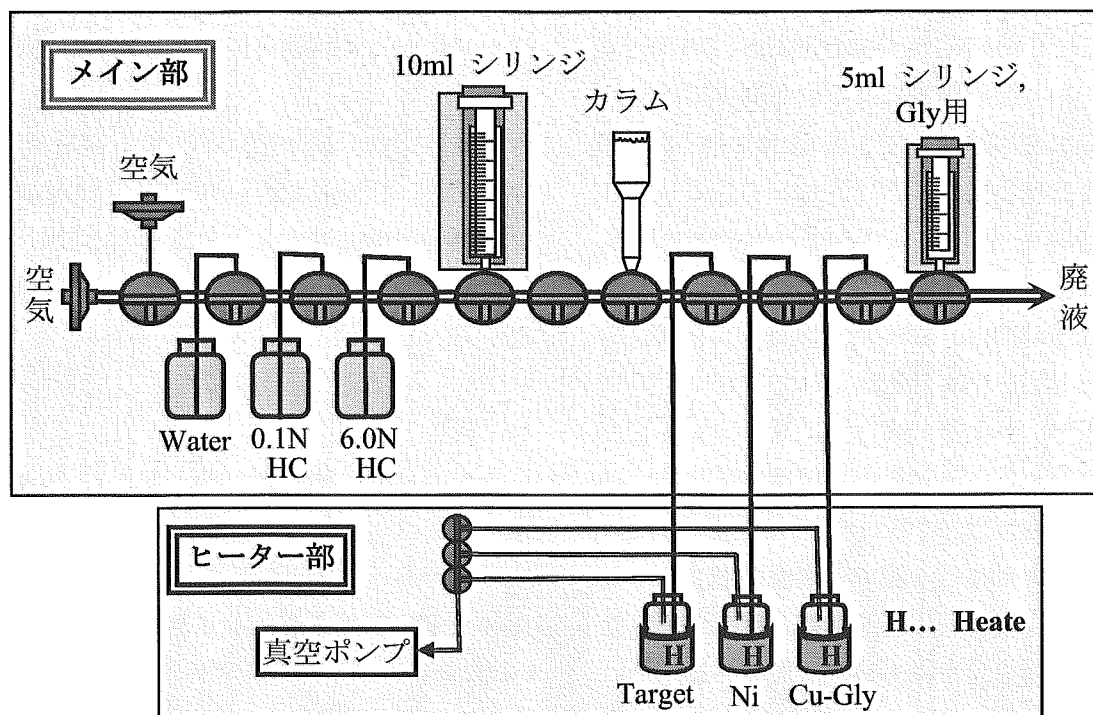


図2. システム設計案

自動生成することを可能としたため、機器操作に関するプログラム言語を習得することなく装置を取り扱うことが可能となった。

また、放射性Brの製造に関して、米国ワシントン大学における現状調査の結果、Br-77が、核崩壊あたり0.74%のポジトロン（飛程：0.2mm、消滅放射線：511keV）ならびに85%内部転換電子を放出する半減期2.4日の放射性同位元素として、本研究目的にもっとも合致するものであることが明らかとなった。Br-77の製造にあたっては、セレン(Se)-77をCu-63と1100-1150℃にて熔融処理したタングステンターゲットに溶着させたものをプロトン照射し、生成したBr-77を1080度に加熱することによりBr-77を昇華させることにより精製する手法がよいと考えられる。次年度には、これらの製造法について実際に検討を行う予定である。

D. 結論

超小型サイクロトロンを用いる治療用放射性同位元素の製造に関して、Cu-64、放射性ハロゲンについて検討ならびに調査を行った。Cu-64については、大量製造に必要な自動化精製装置の開発を行い、基盤となる要素技術の確立と、それらを用いた装置の構築を行った。放射性ハロゲンについては、Br-77が最適である可能性が高いことを見出した。

F. 研究発表

なし

G. 論文発表

なし

薬剤設計、合成に関する研究

（分担）研究者 徳永 雄次 福井大学工学部材料開発工学科・助教授
 藤林 康久 福井大学高エネルギー医学研究センター
 分子イメージング部門・教授

研究要旨：新規癌診断・治療薬の開発を目的に、癌細胞に対し特異的に結合する化合物の分子設計を行った。まず、癌細胞への結合の選択性を高めるため、細胞膜レセプターの一つとして知られているインテグリン $\alpha_v\beta_3$ を選別し、本レセプターに対し高い結合能を有するArg-Gly-Aspペプチドをリード化合物とした。次に、リード化合物を基に種々の化合物を設計し、それらの最安定コンフォメーションを分子計算によって求め、さらにインテグリンに対する結合能の評価を実施した。分子設計に際しては、Arg-Gly-Aspペプチドを母核としてレセプター結合部位への適合性を高めるため、1. Arg-Gly-Aspペプチドへの置換基導入によるコンフォメーションの固定化、2. 環状ペプチドすることによるコンフォメーションの固定化、を検討した。また、誘導體合成を容易にするため、3. グアニジン部を合成容易な複素環へ変換、さらに、レセプターへの結合部を除く置換基の大幅な変更を試み、4. 非ペプチド性分子の設計も行い、その最適化も分子計算を用いて実施した。その結果、Arg-Gly-Aspペプチドを母核とする直鎖状ペプチドではGlyの窒素への官能基化が可能であること、グアニジン部をイミダゾール類へ変換できること、また、非ペプチド性認識分子の可能性を示すことができた。

A. 研究目的

本研究の最終的な目的は、新規癌診断・治療薬を開発することである。そのためのアプローチとして、まず、癌細胞に特異的に結合する化合物の探索を行う。特に、癌細胞レセプターへの特異的な結合能を有する化合物の選別を分子計算を用いて行い、最適化を図る。続いて、分子計算によって得られた結果を基に癌細胞認識部の候補の化合物を合成し、レセプターとの結合能について実測して認識部位の選定を行う。最後に、認識部位に放射線放出部位等の導入を

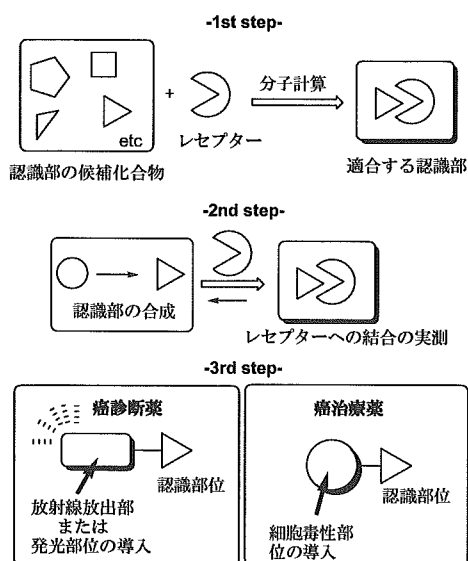


図1. 本研究のアプローチの模式図

行い診断薬として、さらに細胞毒性を有する部位を認識部に組み入れることによって癌治療薬への変換を実施する（図1）。

本年度は、上記研究の1段階目を行い、シミュレーションによる癌細胞の認識部候補の化合物の絞込みを実施する。

B. 研究方法

癌細胞増殖に重要な役割を果たしている細胞膜レセプターの一つに $\alpha_v \beta_3$ インテグリンが知られており、本レセプターに対してArg-Gly-Aspペプチドが高い結合能を示すことが報告されている。そこで本ペプチドを癌細胞認識部位のリードとして選定した。インテグリンに対する結合能を高める目的と放射線放出部の導入位置を決定する目的で、本ペプチドに対し種々の官能基を導入し、その安定立体配座を分子計算によって求め、目的の立体構造を持つ誘導体（認識化合物）の検索を行った。Arg-Gly-Aspペプチドがインテグリン $\alpha_v \beta_3$ に結合する際には、N末端に存在するグアニジン部とインテグリン α_v のAsp150及びAsp218とが水素結合によって、また、C末端のカルボキシル基においては、インテグリン β_3 のSer121、Ser123、及び、

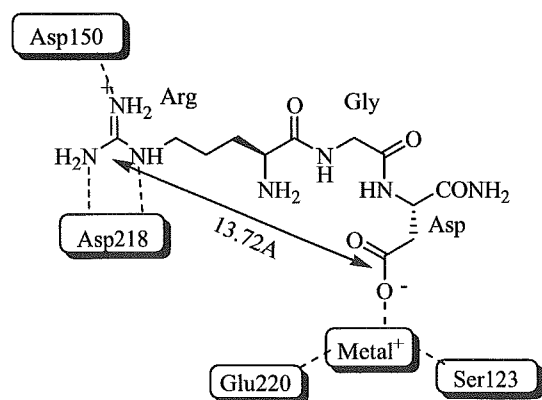


図2. X線より得られたArg-Gly-Aspペプチドとインテグリンとの結合様式

Glu220との間に存在する金属イオンと配位結合により特異的に結合することが知られており、またこれらの官能基の炭素-炭素間の距離は13.72Åであると報告されている（図2）。

そこで、合成面を考慮した官能基化を施し、官能基の最適化を分子計算によって次に示す4つの方法論にて検討した。

1. 認識部となるArg-Gly-Aspペプチドに対し、置換基の導入が容易な窒素上への官能基化を行い、インテグリン結合部に適合した立体構造を検索する。
2. 認識部となるArg-Gly-Asp部位を組み込んだ環状ペプチドを設計し、インテグリン結合部に適合した立体構造を検索する。
3. 合成上取り扱いにくいグアニジン部の他の官能基への変換を検討する。
4. 今後の展開と合成面を考慮し、非ペプチド性認識化合物への展開を図る。

以上、4項目それぞれに基づいて分子設計とその計算を実施した。

ところで、Arg-Gly-Aspペプチドがインテグリン $\alpha_v \beta_3$ に結合する様式については、前述のようにその詳細が報告されている。そこで報告されているX線結晶解析の結果と前述の分子計算の結果を土台に、インテグリンとインテグリン認識部位（Arg-Gly-Aspペプチド類）とを併せた分子計算を実施した。

（倫理面への配慮）

本段階において、倫理面への配慮は不必要である。

C. 研究結果

1. 認識部位単独での分子計算

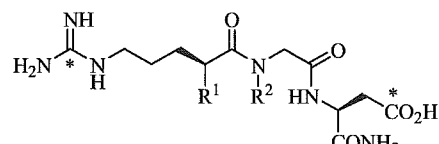
上記方法論に基づき種々の化合物の分子計

算を行った。その一部について以下に示す。

1-1. 官能基化しやすい窒素上への修飾

1) Argの窒素上への官能基化によるトリペプチドの配座固定：官能基化が容易なアルギニンの窒素に種々の置換基を導入し、トリペプチドの立体配座固定を分子計算にて解析した。置換基としては、立体的なかさ高さを考慮し、メチル基、フェニル基、テブチル基をそれぞれ導入して、また、分子計算は MacroModel 9.1を使用し、力場には OPLS2005を用いて行った。前述したように、Arg-Gly-Aspペプチドがインテグリンを認識する際には、N末端に存在するグアニジン部と、C末端のカルボキシル基が重要である。そこで計算結果には、安定コンフォメーションにおけるグアニジン部に存在する炭素とカルボキシル基上の炭素間の距離を用いた (図3 1-5)。

図3.



run	R ¹	R ²	the distance between C*s
1	H	H	12.72
2	NHMe	tBu	4.52
3	NHt-Bu	tBu	4.58
4	NHPh	tBu	4.47
5	NMe ₂	H	4.42
6	H	Me	11.73
7	H	tBu	10.97
8	H	Ph	11.85
9	H	Bn	10.62

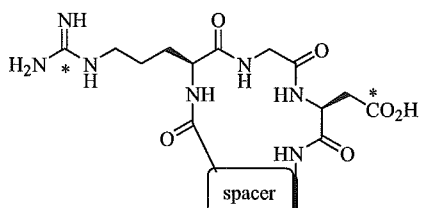
2) Glyの窒素上への官能基化によるトリペプチドの配座固定：上記1)と同様にグリシンの窒素上への置換基導入を行い、分子

計算を行った (図3 6-9)。全ての化合物において報告されている結果 (13.7Å) とは大きな違いが見られる。

1-2. Arg-Gly-Aspペプチド部を持つ環状ペプチド

Arg-Gly-Aspペプチドを環状とすることによる配座固定について検討した (図4)。尚、環状ペプチドを用いた検討については、他の研究グループにおいても行っているが、合成例が少ないこと、さらに、インテグリンへの結合能についての詳細な検討がなされていないため、種々の化合物の分子計算を行った。

図4.



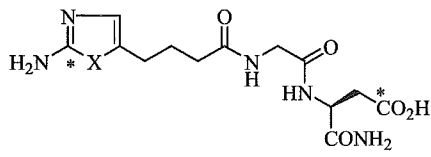
run	spacer	the distance
1		13.69
2		14.60
3		14.28
4		10.32
5		12.23
6		12.46
7		11.59
8		12.92

その結果、適切な位置への認識部の固定が可能であることが示唆された。

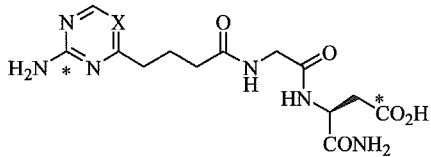
1-3. グアニジン部の変換

認識化合物の決定後、放射線放出部の導入を予定しているが、その誘導体化を鑑みると、合成化学上グアニジン部は官能基として好ましくない。そこで、合成が比較的容易で、精製や保護の面で有利と考えられる複素環（イミダゾール類、トリアジン類）を等価体とし、分子計算を行った（図5）。また、グリシンのアミノ基を修飾した誘導体についても相同的な効果を期待し、安定配座の分子計算を実施した。

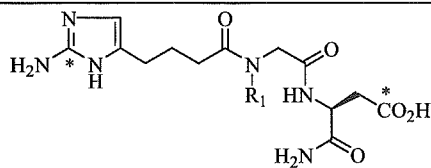
図5.



run	X	the distance
1	X = NH	12.91
2	X = S	13.20
3	X = O	12.81



run	X	the distance
4	X = CH	13.06
5	X = N	13.06



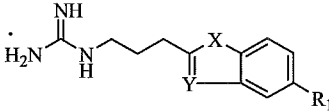
run	X	the distance
6	R ₁ = Me	12.09
7	R ₁ = tBu	13.00
8	R ₁ = Ph	12.02
9	R ₁ = Bn	11.89

直鎖状ペプチドより、良好な結果となった。

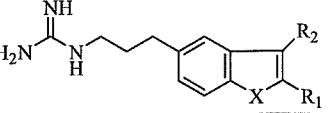
1-4. 非ペプチド性認識部位

Arg-Gly-Aspペプチドを認識部位に用いる場合に、取り扱いを困難にするアミド部位が存在すること、また複数の不斉炭素が存在しそれらがラセミ化すること、合成に多段階を有するなどの欠点がある。これらの欠点を回避するため、種々の化合物を設計しその分子計算を行った。その際、インテグリンの結合部位としてグアニジン部とカルボキシル基を導入し、様々なスペーサー部を検討したところ、ベンゾイミダゾール類縁体を含む誘導体について良好な結果を与えた（図6）。

図6.



run	the distance
1 X = NH, Y = N, R ₁ = CH ₂ CH ₂ CO ₂ H	13.94
2 X = NH, Y = N, R ₁ = CH=CHCO ₂ H (E)	13.52
3 X = NH, Y = N, R ₁ = CH=CHCO ₂ H (Z)	13.02
4 X = NH, Y = N, R ₁ = N(CH ₂ CO ₂ H) ₂	13.79 (12.26)
5 X = O, Y = N, R ₁ = CH ₂ CH ₂ CO ₂ H	14.06
6 X = O, Y = N, R ₁ = CH=CHCO ₂ H (E)	13.69
7 X = O, Y = N, R ₁ = CH=CHCO ₂ H (Z)	13.03
8 X = O, Y = N, R ₁ = N(CH ₂ CO ₂ H) ₂	13.73 (12.45)

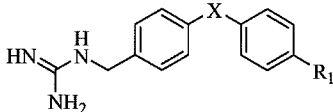


9 X = NH, R ₁ = CH ₂ CH ₂ CO ₂ H, R ₂ = H	13.69
10 X = NH, R ₁ = CH=CHCO ₂ H (E), R ₂ = H	14.18
11 X = NH, R ₁ = CH=CHCO ₂ H (Z), R ₂ = H	12.49
12 X = NH, R ₁ = N(CH ₂ CO ₂ H) ₂ , R ₂ = H	13.16 (12.61)
13 X = O, R ₁ = CH ₂ CH ₂ CO ₂ H, R ₂ = H	13.62
14 X = O, R ₁ = CH=CHCO ₂ H (E), R ₂ = H	14.14
15 X = O, R ₁ = CH=CHCO ₂ H (Z), R ₂ = H	12.55
16 X = O, R ₁ = N(CH ₂ CO ₂ H) ₂ , R ₂ = H	13.25
17 X = NH, R ₁ = H, R ₂ = N(CH ₂ CO ₂ H)	11.03 (10.92)

尚、本化合物はリード化合物と類似の位置にヘテロ原子を有する。

また、グアニジン部とカルボキシル基を有するジフェニルメタン誘導体についてもそれらの官能基間の距離が目的値と比較的一致した(図7)。本分子群は、パラ位に置換した2個のベンゼン環部が1個の原子を介して結合しているため、グアニジン部とカルボキシル基間の距離が固定された構造を持つ。従って本化合物群は、2個のベンゼン環に結合した原子を変換することで、グアニジン部とカルボキシル基間の距離を調整できる構造を有している。

図7.



run	X	R ₁	the distance
1	CH ₂	CH=CHCO ₂ H (<i>E</i>)	14.16
2	O	CH=CHCO ₂ H (<i>E</i>)	14.26
3	NH	CH=CHCO ₂ H (<i>E</i>)	14.97
4	C=O	CH=CHCO ₂ H (<i>E</i>)	14.42
5	CHOMe	CH=CHCO ₂ H (<i>E</i>)	13.96
6	C{O(CH ₂) ₂ O}	CH=CHCO ₂ H (<i>E</i>)	12.18
7	C=O	CH ₂ CH ₂ CO ₂ H	14.97
8	C=O	CH=CHCO ₂ H (<i>Z</i>)	12.25
9	C=O	OCH ₂ CO ₂ H	14.70
10	C=O	NHCH ₂ CO ₂ H	14.68
11	C=O	N(CH ₂ CO ₂ H) ₂	13.26 (14.23)

いずれの誘導体でもカルボキシル側置換基の変更により良好な数値を与える。

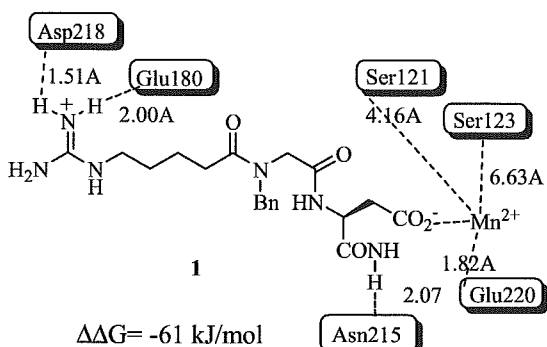
2. インテグリンとインテグリン認識部位とを併せた分子計算

前述の結果を基にインテグリンとインテグ

リン認識部位を併せた計算(計算ソフト: MacroModel9.1、力場:OPLS2005)を行った。この際、グアニジン部とインテグリン(Asp150及びAsp218)との間の水素結合、並びに金属イオンを介したカルボキシル基とインテグリン(Ser121、Ser123、及びGlu220)との間の結合が重要であるため、これらを指標に結合能を評価した。さらに、計算結果から新たに働く相互作用にも着目しその評価を行った。その結果の一例をそれぞれ以下に示す。

2-1. Arg-Gly-Aspペプチド誘導体

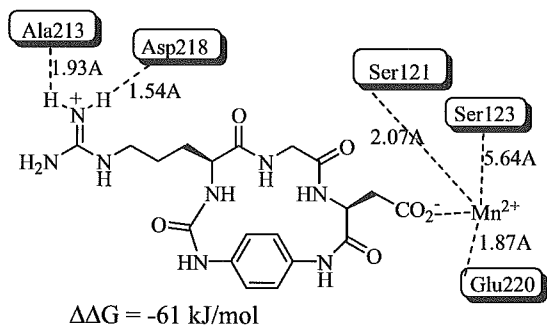
典型的な結果(化合物1)を示す。新たな水素結合が観測されたこと、金属イオン-インテグリン間の結合が弱まっていることが特徴である。



(ただし $\Delta\Delta G$ の値は、複合体の自由エネルギーから認識化合物の自由エネルギーを引いた値)

2-2. Arg-Gly-Asp部を持つ環状ペプチド

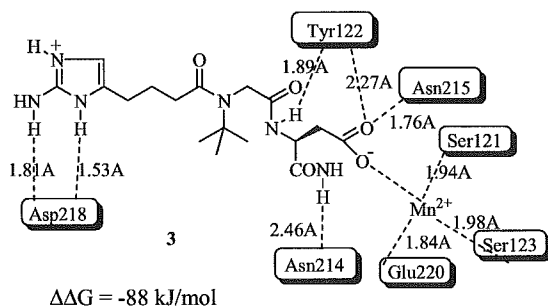
典型的な結果(化合物2)を示す。



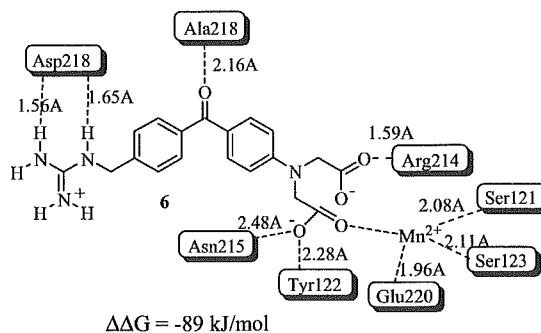
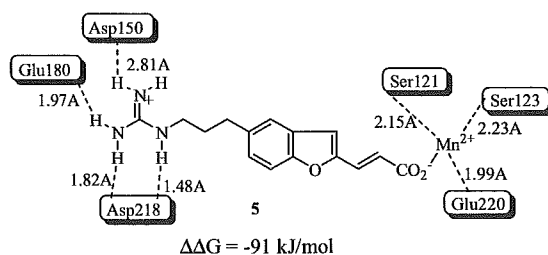
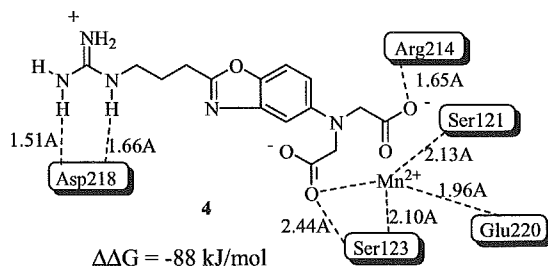
新たな水素結合は観測されず、また、金属-インテグリン間の結合が弱まっている。

2-3. グアニジン部を複素環に変換したArg-Gly-Aspペプチド誘導体

最も優れた結果（化合物3）を示す。他の類似化合物では、二次的な相互作用は観測されず、イミダゾールとAsp218との水素結合、また金属イオンとカルボキシレートの結合のみが観察され、 $\Delta\Delta G$ も約60 kJ/mol程度の値を示した。



2-4. 非ペプチド性化合物



4-6いずれの場合もインテグリンとの間に新たな水素結合が観測され、また金属イオンを介した結合においてもその距離から報告されたX線解析の結果を上回る結合力が期待でき、さらにエネルギー面においても良好な結果を与えた。

D. 考察

Arg-Gly-Aspペプチドの誘導体化について

1-1 1) Argの窒素上への置換基導入：図2に示すようにArgの窒素上への置換基導入は、目的の立体配座をとり難くする結果となった。また、アミノ基の存在も有効に働くことがないため、合成ターゲットには、デアミノアルギニンを用いることが望ましい。

1-1 2). Glyの窒素上への置換基導入：図2に示すようにArgの窒素上への置換基を導入は、目的の立体配座の固定にほぼ関与しないことが判明した。また、インテグリン存在下の分子計算を行ったところ、本置換基はインテグリンとは逆方向に位置することが示された。この際、インテグリンとの結合を積極的に促す構造ではないものの、妨げにならないものと推察される。

1-2. Arg-Gly-Asp部を持つ環状ペプチド認識部単独での分子計算においては、グアニジン部とカルボキシル基間の距離の面で良好な値を示したが、インテグリンとの相

相互作用を計算した結果、現在までのところ鎖状ペプチドと同等の値である。今後、分子間に働く水素結合の角度にも着目し、更なる設計を行う必要がある。

1-3. グアニジン部の変換

グアニジン等価体として複素環を用いたところ、認識部位のみの計算結果では良好な数値を与えた。しかしながらインテグリン存在下でのシミュレーションでは、Asp150との結合が観測されなかった。本結合は、報告されているX線解析の結果においても弱い結合であるため、第3の認識部の存在で補えるものと考えられる。事実、イミダゾールへ変換した化合物で、C末端に存在するGlu部位への好ましい影響が観測され、変換法としての可能性を示すことができた。

1-4. 非ペプチド性認識化合物

グアニジン部とカルボキシル基との距離に着目し、またそれらを固定する分子設計を行ったため、認識分子単独においても、またインテグリンと結合した状態でも良好な結果が得られた。またC末端部位に2個のカルボキシル基を導入するとArg214等との結合も付加され、エネルギー的に有利な値を示した。骨格自体を大きく変更しているため、健常細胞との選択性について問題は残るものの、合成ターゲットとして魅力ある化合物と考えられる。

E. 結論

分子計算によるインテグリン認識化合物の分子設計結果は以下の通りである。

1. 直鎖状Arg-Gly-Aspペプチド誘導体では、
①Arg上窒素への官能基導入は結合能を低下させる、
②Gly上窒素への官能基化は、結合能を大きく左右しない。

2. 環状Arg-Gly-Aspペプチド誘導体では、現在まで良好な設計はできていないものの、環状とするため新たに導入した部位が、インテグリンと反対側に位置するため、この位置への放射線放出部の導入が可能である。
3. グアニジン等価体としてイミダゾールやチアゾール類が有効である可能性を示した。
4. 非ペプチド性認識化合物として3種の化合物群が効果的であることを見出した。これらの化合物は複数の芳香環を持つため、放射線放出部の導入が容易と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

分子生物学的評価に関する研究

— Cu-ATSM の腫瘍集積に関する分子生物学的検討 —

（分担）研究者 古川 高子 福井大学高エネルギー医学研究センター・助教授

研究要旨： ポジトロン標識 Cu-ATSM は低酸素組織および腫瘍に集積する薬剤として PET 画像診断における臨床的有用性が報告されている。Cu-ATSM の腫瘍集積には低酸素状態と NADPH-P450 reductase (CPR) や NADH-cytochrome b5 reductase (b5R) などの酵素が必要であり、一方、CPR や b5R の発現量と培養細胞の低酸素耐性の間の関係が示唆されている。本研究では、培養細胞における CPR や b5R の発現量と低酸素耐性の関係、固形腫瘍内でのこれらの酵素の発現と Cu-ATSM の取り込みの関係について分子生物学的手法を用いて検討した。現在のところ培養中のマウス腫瘍細胞における CPR および b5R の発現量のコントロールは、siRNA 法により可能であることが分かった段階であるが、今後この手法を用いて、両酵素の発現量の低酸素耐性への影響について検討する予定である。また、固形腫瘍モデルでは腫瘍内各部位の CPR および b5R の発現量と Cu-ATSM の取り込み量との間に直接の関係は認められなかったが、低酸素耐性と Cu-ATSM の取り込みの間には何らかの関係が予想され、今後さらに検討を続けていきたいと考えている。

A. 研究目的

ポジトロン標識 Cu-ATSM は低酸素組織および腫瘍に集積する薬剤として PET 画像診断における臨床的有用性が報告されている。Cu-ATSM の腫瘍／非腫瘍集積比の高い患者では治療後の予後が悪いことから、Cu-ATSM の集積は腫瘍の悪性度に関係する何らかの情報を伝えていると考えられる。Cu-ATSM の腫瘍集積には低酸素状態と NADPH-P450 reductase (CPR) や NADH-cytochrome b5 reductase (b5R) な

どのミクロソームの電子伝達系酵素が必要であることが分かっているが、Cu-ATSM の集積と腫瘍の生化学的・分子生物学的性質や腫瘍の悪性度との関係は明らかになっていない。CPR や b5R の発現は Cu-ATSM の腫瘍集積に必要とされるが、一方で、CPR や b5R の発現量が多い培養細胞ほど低酸素耐性が強いという傾向が観察されている。このように、CPR や b5R の発現と腫瘍の低酸素耐性、Cu-ATSM の腫瘍内低酸素部位への集積の間には密接な

関係が予想され、この関係を明らかにすることは、腫瘍の悪性度に関わる性質の一つと考えられる低酸素耐性についての理解を深め、さらに、腫瘍の低酸素耐性の画像化につながると期待される。

本研究では、CPR や b5R の発現量と細胞の低酸素耐性の関係を明らかにすることを第一の目的とし、また、固形腫瘍内でのこれらの酵素の発現と Cu-ATSM の取り込みの関係についても検討した。

B. 研究方法

CPR および b5R の発現量が低酸素耐性に与える影響をより直接的に評価するため、培養細胞におけるこれらの酵素の発現量を増加させる、抑制することを考えた。まず、酵素の発現量を増加させるため、これらの酵素に T7-tag をつけ、CMV promoter の支配下に発現する plasmid を作製した。T7-tag をつけても酵素活性が失われないことは transient transfection により確認した。これらの plasmid を B16、colon26、3T3 などのマウス培養細胞に transfect しそれぞれの transformant を薬剤耐性により選択した。導入した酵素の発現は T7-tag に対する抗体を、また、酵素全体の発現についてはそれぞれの酵素に対する抗体を用いて、Western blotting によって確認した。酵素発現の抑制には siRNA 法を用いた。使用した RNA の配列は、iGene 社にデザインを依頼し、提示されたうち 2

種類を試して、より発現抑制が顕著であったものを選択した。それぞれの配列を以下に記す、

CPR: 5'-CUCAGUACCUGGAAAACAUG
AAGAU-AG-3'

3'-UA-GAGUCAUGGACCUUUUG
UACUUCUA-3'

B5R: 5'-AGAGCAGCUUCGUGGAAAAG
AUGAA-AG-3'

3'-UA-UCUCGUCGAAGCACCUU
UUCUACUU-5'

またコントロールとしては iGene 社の scramble(ヒト or マウス用配列)を同様の条件で各細胞に transfect した。

それぞれの酵素の発現量はそれぞれの酵素に対するウサギ抗体を一時抗体として RNA の transfect 3 - 7 日後に Western blotting をおこなって調べ、酵素発現量の抑制を確認した。

CPR または b5R を過剰発現する B16 細胞、RNA transfect 2 日後の B16, colon26 および 3T3 細胞は直径 35 mm の培養プレートあたり 5×10^4 個を植え込み、10%の FCS を加えた培地 (B16, 3T3: DMEM, colon26: RPMI1640) で通常の培養条件で 24 時間培養した。その後、培養プレートを 2 群にわけ、1 群は通常の条件下で培養を続け、もう 1 群は 1.5%の酸素、5%の二酸化炭素の条件下に移して培養した。培養開始後 24 時間ごとに細胞数を計数し、通常の酸素圧下で培養した場合と低酸素状態で培養した場合の細胞数の変化を比較した。

マウス固形腫瘍モデルは、B16 および LLC 細胞は C57BL/6, colon26 は BALB/C マウスの皮下に約 10^7 個を移植して作製し、2-3 週間後、腫瘍が径 1cm 以上に成長するのを待って使用した。尾静脈より、1 mCi の F-18-FDG と 5 μ Ci の Cu-64-Cu-ATSM を注射し、1 時間後、マウスを麻酔下に屠殺し、腫瘍を摘出、OCT コンパウンド中で凍結した。ブロックをいくつかのセクションに切り分け、表面をマイクロトームで滑らかにした後、数分間、イメージングプレートを用いて FDG に由来する F-18 の radioactivity を検出し、その後、約 2 日間 F-18 の減衰を待った後、3-4 日間をかけて Cu-64 の radioactivity をイメージングプレートで検出した。Radioactivity の検出後、そのままブロックを凍結したまま減衰を待ち、組織をパラホルムアルデヒドを用いて再固定し、切片を作製した。作製した切片について、一次抗体に抗 b5R ウサギ抗体、または抗 CPR ウサギ抗体、二次抗体に HRP を結合した抗ウサギヤギ抗体を用いて免疫染色を行った。染色結果を FDG および Cu-ATSM の分布と比較検討した。また、動物実験については、全ての過程において福井大学の規定を遵守して行った。

C. 研究結果

B16 細胞においては b5R、CPR とともに transformant を数株ずつ作製することができた。3T3 細胞については CPR のみ

transformant がえられ、colon26 細胞ではどちらについても作製できなかった。

Transformants における、各酵素の発現量は、親株に比べ、10 % 程度上昇していた。

siRNA による酵素発現の抑制は、B16 細胞より colon26, および 3T3 細胞においてより顕著にみられた。transfect 後 3 日から 7 日にかけて発現抑制がみられ、発現抑制は CPR では最大 70% 程度、b5R では最大 50 % 程度であった。

B16 細胞を親株として作製した CPR および b5R の transformant の通常および低酸素条件下での細胞数の変化を親株と比較したところ、通常の培養条件化では両者の細胞数の増加にほとんど差は見られなかったが、低酸素条件下では、transformant のほうが細胞数が、親株に比べてやや多い傾向が見られた。ただし、実験を行った例数が少なく、優位差を得るにはいたらなかった。

siRNA 法による CPR および b5R の発現抑制の影響については現在検討中である。

マウスの皮下に作製した腫瘍では、腫瘍中央部にみられる壊死部分の近傍に F-18-FDG の高集積部位が観察され、その外側に Cu-64-Cu-ATSM の高集積部位が観察された。一方、免疫染色によってみた CPR および b5R のタンパク質発現の分布は腫瘍内でほぼ均一で、Cu-64-Cu-ATSM の取り込みとの相関関係は認められなかった。