

《原 著》

¹¹¹In 標識アンチセンス核酸による腫瘍イメージングの可能性に関する検討

——合成, 安定性, 体内分布——

藤林 靖久*** 中川加寿夫** 脇 厚生* 阪原 晴海****
小西 淳二**** 横山 陽****

要旨 遺伝子の異常発現を標的とする短半減期金属核種標識アンチセンス鎖オリゴヌクレオチド放射性医薬品の開発を目的として, 塩基配列特異的細胞集積性に関する基礎検討を癌化遺伝子のひとつである c-erbB-2 を標的として実施するとともに, 金属放射性核種として ¹¹¹In を選択しオリゴヌクレオチドに ¹¹¹In 選択的キレートを導入した誘導体の合成とその評価を試みた. ³²P 標識オリゴヌクレオチドを用いた検討により, 特定の mRNA の塩基配列に相補的なアンチセンス鎖を有するオリゴヌクレオチドが mRNA を発現している細胞に高く集積することが示され, 塩基配列が放射性医薬品の標的として生理的条件下で利用可能であることが明らかとなった. また, アミノ化オリゴヌクレオチドに isothiocyanobenzyl-EDTA (IBE) を結合させることにより ¹¹¹In と安定に結合するオリゴヌクレオチド誘導体を合成することができた. 得られた ¹¹¹In-IBE-オリゴヌクレオチドは ³²P-オリゴヌクレオチドとは異なり血清中でも安定であり, 今後, 比放射能の改善等を行うことにより誘導体化によるインビボ適用の可能性が示された.

(核医学 33: 115-122, 1996)

I. 序 論

放射線に対する腫瘍細胞などの超早期反応として, いくつかの増殖関連遺伝子発現の亢進が観察されている. これらには, 増殖因子レセプターである EGFR 遺伝子¹⁾, 癌化遺伝子である ras²⁾, fos³⁾, jun⁴⁾, 増殖因子である FGF, platelet-derived

growth factor⁵⁾ 遺伝子などが挙げられている. これらの遺伝子発現変化の検出は, 放射線治療効果の超早期診断を考えるうえのみでなく腫瘍増殖と治療原理との関連を基礎的に考察するうえでも非常に興味深い.

癌関連遺伝子生成物(タンパク)を抗原とする腫瘍免疫診断はすでに試みられている⁶⁾が, それらの研究は定常的に過剰発現している遺伝子のタンパクを標的とするものであった. 一方, 放射線照射時における上記の遺伝子の発現亢進は非常に早く照射後数十分から数時間で検出され1~2日までに元のレベルに戻るものが多い. このような迅速な変化に対応するには, 長時間を要する腫瘍免疫画像診断では困難であり, 特定の遺伝子塩基配列に直接かつ特異的に反応するアンチセンス核酸が適していると考えられる⁷⁾. しかしながら,

* 福井医科大学高エネルギー医学研究センター
放射性医薬品化学講座

** 京都大学薬学部遺伝子薬品学講座

*** 同 放射性薬品化学講座

**** 京都大学医学部核医学講座

受付: 7年8月7日

最終稿受付: 7年11月17日

別刷請求先: 京都市左京区吉田下阿達町 (☎ 606)

京都大学薬学部遺伝子薬品学講座

藤 林 靖 久

アンチセンス核酸をインビボに適用するにはいくつかの問題点を解決する必要がある⁸⁾。すなわち、人体投与可能な短半減期放射性核種による標識法の確立、酵素的切断を受けやすい核酸の生体内安定性の改善、高分子アニオンである核酸が標的である mRNA の存在する細胞質へすみやかに到達するための細胞膜透過性の改善などである。

前述したように EGFR 遺伝子が放射線照射により過剰発現することが報告されているが、この遺伝子と同じ v-erbB 関連機能的ホモロジーを有する癌化遺伝子として c-erbB-2⁹⁾がある。本研究では、この遺伝子をモデルターゲットとしたアンチセンス核酸の ¹¹¹In 標識と基礎的評価を試みた。

II. 材料および方法

1) 試薬

5'-アミノ化 15 mer オリゴヌクレオチドは、Bio-Synthesis, Inc. (Lewisville Texas) から購入した。³²P 標識に用いた 15 mer オリゴヌクレオチドは東亜合成化学より購入した。Isothiocyanobenzyl-ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid (IBE) は同仁化学研究所より購入した。¹¹¹In は塩化インジウム溶液として日本メジフィジックス株式会社より供与を受けたものを用いた。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ は NEN より購入した。核酸を取り扱う試薬については核酸生化学用を、¹¹¹In については無鉄 HCl を、その他の試薬は試薬特級を用いた。

2) 細胞および実験動物

Swiss mouse embryo fibroblast cell line である NIH3T3 細胞に c-erbB-2 遺伝子を導入した A4 細胞は、牛胎児血清 5% を含む Eagle's MEM 培養液中で継代培養したものを用い、必要に応じてヌードマウスの背部皮下に移植し固形腫瘍とした。NIH3T3 細胞は ATCC (Rockville, Maryland) より購入し牛血清 10% を含む Dulbecco's MEM 培養液中で継代培養したものを用いた。

3) c-erbB-2 mRNA 内標的塩基配列の選択

一般に、アンチセンス鎖オリゴヌクレオチドを mRNA に作用させる場合、標的として開始コドンを含む 10~20 塩基配列が選択されることが多

い。本検討でも開始コドンから 10 塩基上流から開始コドンを含む 15 塩基の配列を選択した。配列特異的細胞集積性は、³²P 標識オリゴヌクレオチドおよび培養細胞系を用いて確認した。

4) ³²P-オリゴヌクレオチドの標識および塩基配列特異的細胞集積性に関する基礎検討

非修飾オリゴヌクレオチド (10 pmol) に $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (NEG-002Z, 4,440 kBq/20 pmol) を加え、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (3 unit/3 μl) を 37°C 30 分作用させた後ゲル濾過精製 (Pharmacia NAP-5 Column) することにより 5'-末端 ³²P-オリゴヌクレオチドを調製した。

c-erbB-2 mRNA 発現の有無に対するアンチセンス鎖およびセンス鎖オリゴヌクレオチドの細胞集積性の相違について、³²P-オリゴヌクレオチドの A4 および NIH3T3 細胞への集積を検討した。集積検討には牛血清を含まない培養液を用い、また、³²P-標識オリゴヌクレオチドが同培養液中で 6 hr にわたって安定であることを確認した (後述)。各細胞 (4×10^5 cells/well) に 37 kBq (222 kBq/pmol, 200 μl) を加え 37°C 2 hr インキュベート後、培養液にて 3 回細胞を洗浄した。NCS 組織溶解剤 (Amersham) 0.1 ml にて細胞を溶解しトルエンシンチレータを加えた後、液体シンチレーションカウンタ (CA1900A, Packard Japan) にて放射能を測定した。

5) IBE-オリゴヌクレオチドの合成

5'-アミノ化オリゴヌクレオチド 1 mg (0.21 μmol) に IBE 1 mg (2.3 μmol) を加え、飽和リン酸三ナトリウム溶液 9 μl に溶解させた後 37°C 24 hr 反応させた。反応液を Sephadex G-25 カラム (10 \times 1000 mm, 流速 6.0 ml/hr) にて溶出しオリゴヌクレオチド画分と遊離 IBE 画分とを分離した。

6) IBE-オリゴヌクレオチドの結合率の測定

前述の反応液の一部 (1 μl) を 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 5.0) 100 μl および ¹¹¹In 塩化インジウム (370 kBq, 10 μl) を加え室温にて 1 hr 標識反応後、Sephadex G-25 カラム (5 \times 300 mm, 流速 30 ml/hr) にて溶出しオリゴヌクレオチド画分と遊離 IBE 画分とを分離した。得られた各画分の放射能からオ

リボヌクレオチド 1 分子あたりに結合した IBE の分子数 (結合率) を算出した。

7) 標識用 ^{111}In 溶液の調製

IBE-オリゴヌクレオチドの標識において比放射能の向上をはかるため、入手した ^{111}In 溶液から溶媒抽出によりさらに ^{111}In を精製、減容したものを用いた。精製は以下のように行った。 ^{111}In 塩化インジウム溶液 (74 MBq/ml) 1 ml に 9 N HBr 溶液 2 ml を加えた後ジイソプロピルエーテルにて ^{111}In を抽出した。有機溶媒相から 8 N HCl 溶液による逆抽出を二度行い、ロータリーエバポレータにて溶媒を留去した後、0.02 M HCl 溶液 250 μl を加えて標識用 ^{111}In 溶液とした。

8) ^{111}In -IBE-オリゴヌクレオチドの標識

カラム分離により得られたオリゴヌクレオチド画分 (3.9 μM) 500 μl (0.1 M クエン酸緩衝液 pH 5.0) に標識用 ^{111}In 溶液 120 μl (30 MBq) を加え、3 hr 室温にて標識後、Sephadex G-25 カラム (10 \times 1000 mm, 流速 60 ml/hr) にて溶出、分取し ^{111}In -IBE-オリゴヌクレオチドを得た。同時に全溶出放射能に対する各画分の放射能から標識率を求めた。

9) ^{111}In -IBE-オリゴヌクレオチドの安定性に関する検討

得られた ^{111}In -IBE-オリゴヌクレオチドを 4 $^{\circ}\text{C}$ にて保存し経時的に Sephadex G-25 カラム (10 \times 1000 mm, 流速 30 ml/hr) にて溶出することにより、標識体の保存安定性を評価した。また、 ^{111}In -IBE-オリゴヌクレオチド 200 μl をヒト血清 1 ml に加え 37 $^{\circ}\text{C}$ にてインキュベートし同様の操作で血清中安定性を評価した。また細胞培養液中での安定性についても同様の検討を行った。対照として ^{32}P -オリゴヌクレオチドの安定性を Pharmacia NAP-5 column (Sephadex G-25) を用いて検討した。

10) ^{111}In -IBE-オリゴヌクレオチドおよび ^{32}P -オリゴヌクレオチドの腫瘍移植ヌードマウス体内分布に関する検討

背部皮下に A4 細胞を移植し 1 週間後、腫瘍径が 8–10 mm となったヌードマウスに、 ^{111}In -IBE-オリゴヌクレオチドおよび ^{32}P -オリゴヌクレオチ

ドの混合液 (^{111}In : 18 kBq, ^{32}P : 5.7 kBq) 0.25 ml を尾静脈より投与し、2 hr 後に屠殺解剖した。腫瘍を含む関心臓器を摘出し約 100 mg を秤量の後、バイアル中にて NCS 組織溶解剤 1 ml を加えはさみを用いてミンチ状とした。試料を 50 $^{\circ}\text{C}$ 3 hr 処理し溶解した後トルエンシンチレータ 10 ml を加えて液体シンチレーションカウンタ (CA1900A, Packard Japan) にて ^{111}In および ^{32}P のウインドウで二核種同時測定を行った。それぞれ単独核種を含む試料を別途調製しそれらが他方の核種ウインドウにおよぼす率 (クロストーク) を求めることにより試料中の ^{111}In および ^{32}P それぞれの放射能を分離した。組織への集積は % dose/g tissue として算出した。

III. 結 果

1. 塩基配列特異的細胞集積性に関する基礎検討

^{111}In 標識アンチセンスオリゴヌクレオチドによる検討を行うに先立って、選択された塩基配列および細胞系における塩基配列特異的細胞集積性を

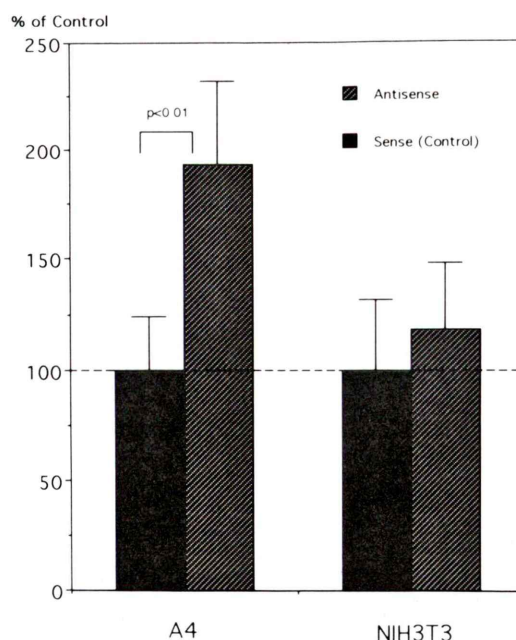


Fig. 1 Accumulation of 5'- ^{32}P labeled oligonucleotides in A4 and NIH3T3 cells in vitro.

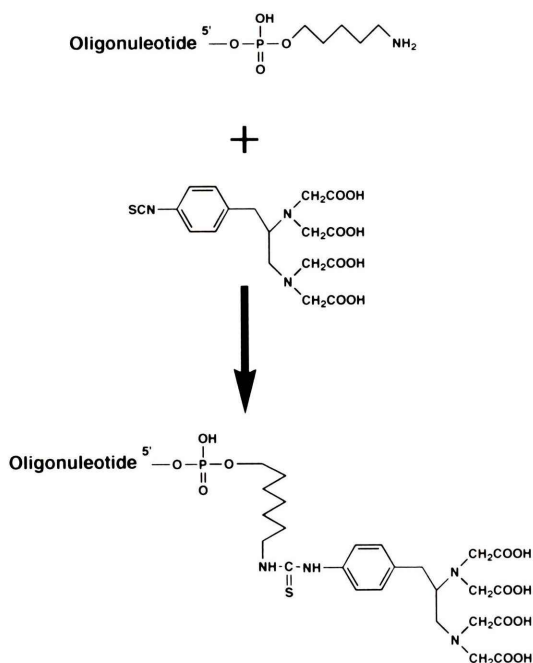


Fig. 2 Structure and schematic synthetic pathway of IBE-oligonucleotide.

基礎的に検討するために ^{32}P -アンチセンス鎖およびセンス鎖オリゴヌクレオチドの A4 および NIH3T3 細胞への集積を検討した (Fig. 1). c-erbB-2 mRNA を発現していない NIH3T3 細胞では、アンチセンス鎖、センス鎖とも同程度の集積を示したのに対し、c-erbB-2 mRNA を発現している A4 細胞ではセンス鎖に比較してアンチセンス鎖オリゴヌクレオチドは約 2 倍の集積を示した。

2. IBE-オリゴヌクレオチドの合成

Fig. 2 に合成の概略と得られた IBE-オリゴヌクレオチドの構造を示す。精製の結果、センス鎖、アンチセンス鎖とも IBE-オリゴヌクレオチドが得られることが確認されたが、結合率は約 0.03 個/オリゴヌクレオチドとかなり低く、改善の余地がのこされた。

3. ^{111}In -IBE-オリゴヌクレオチドの標識

標識反応後カラム分離した結果の代表例を Fig. 3 に示す。標識率 $31.3 \pm 0.3\%$ でセンス鎖、アンチセンス鎖とも ^{111}In -IBE-オリゴヌクレオチド (実

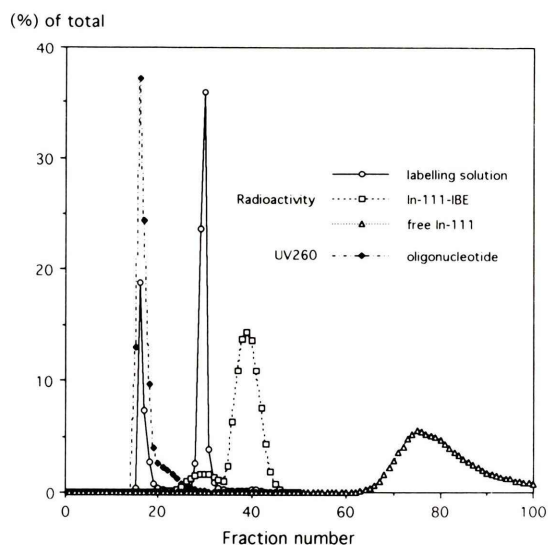


Fig. 3 Typical radioactivity elution profiles of ^{111}In -IBE-oligonucleotide labeling solution, ^{111}In -IBE, ^{111}In -InCl₃ and absorbance at 260 nm (oligonucleotide).

線, Fr. No. 17 付近, オリゴヌクレオチドの 260 nm の吸収に一致するピーク) が得られた。IBE を結合させていない 5'-アミノ化オリゴヌクレオチドでは ^{111}In の結合は見られず (予備実験), 得られた標識体が IBE を介して ^{111}In とオリゴヌクレオチドが結合したものであることが示された。オリゴヌクレオチドに結合しなかった ^{111}In は遊離の塩化インジウムが溶出される画分ではなく遊離 IBE が溶出される画分 (Fr. No. 30 付近) に見いだされた。この結果は、IBE-オリゴヌクレオチド合成の際にカラム分離を行ったにもかかわらず、一部の IBE が精製後の IBE-オリゴヌクレオチドに非特異的結合していたことを示すと考えられる。しかしながら、後述の安定性試験でも示されたように、得られた ^{111}In 標識オリゴヌクレオチド画分を再度カラム分離しても遊離 IBE 画分に ^{111}In の放射能は見いだされず、非特異吸着した IBE は ^{111}In と結合するとオリゴヌクレオチドから速やかに遊離するものと考えられた。したがって、標識後の分離操作により得られた ^{111}In -IBE-オリゴヌクレオチドは設計どおりの構造と標識位置を持つ

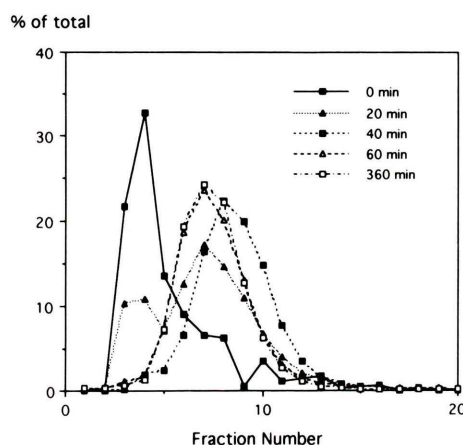
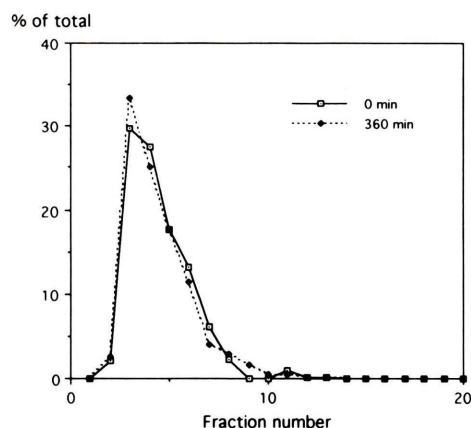


Fig. 4 Stability of 5'- ^{32}P -oligonucleotide in Eagle's MEM medium containing 5% FBS (top) or human serum (bottom) at 37 °C.

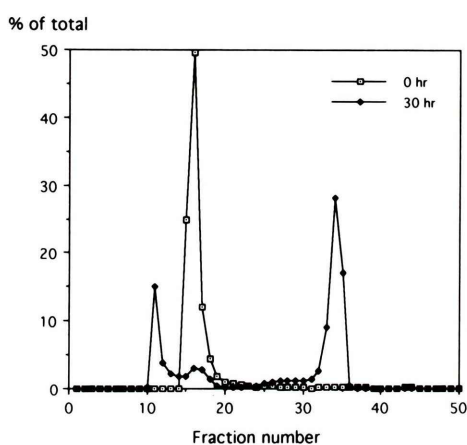
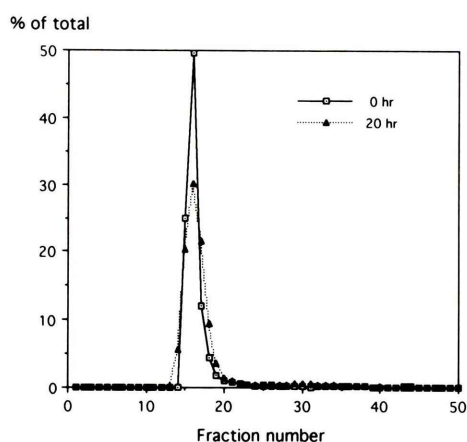


Fig. 5 Stability of ^{111}In -IBE-oligonucleotide in Eagle's MEM medium containing 5% FBS (top) or human serum (bottom) at 37°C.

ものであることが強く示唆された。また、前述の結合率の検討における結果は、非特異吸着していたIBEも遊離IBE画分に溶出されたと考えられることから共有結合したIBEの数を示すものであり、問題はないことが示された。得られた ^{111}In 標識オリゴヌクレオチド画分の吸光度および放射能から比放射能は3.7 kBq/pmolと算出された。

^{111}In -IBEのみを溶出した場合、二つのピークが観察されたが、前者はアミノ基との反応性を失った不活性型、後者は活性型と考えられた。

4. ^{111}In -IBE-オリゴヌクレオチドの安定性

4°Cにて保存した場合、 ^{111}In -IBE-オリゴヌクレ

オチドの安定性は非常に高く、4日間の検討で分解は非常に少なかった(精製後0, 24, 96時間後における標識率: 96.0, 92.1, 90.4%)。

さらに、血清含有培養液中での使用や生体への適用の可能性を考え、5%牛胎児血清を含む培養液およびヒト血清中での安定性について検討した結果をFig. 4, 5に示す。 ^{32}P -オリゴヌクレオチドはヒト血清中では混和後20分でほとんど分解されたが培養液中では6時間まで比較的安定に存在することが示された。一方、 ^{111}In -IBE-オリゴヌクレオチドはいずれにおいても非常に安定であり、ヒト血清中においてもタンパクには結合するもの

Table 1 In vivo biodistribution of ^{111}In -labeled oligonucleotide in tumor bearing nude mice

% dose/g	^{111}In -Antisense	^{111}In -Sense
Tumor	1.04 (0.16)	0.50 (0.16)
Muscle	0.41 (0.23)	0.46 (0.36)
Lung	0.91 (0.19)	0.51 (0.12)
Liver	1.84 (0.45)	1.10 (0.13)
Kidney	4.56 (1.52)	3.63 (0.29)
Spleen	1.07 (0.24)	0.66 (0.07)
Plasma	0.77 (0.11)	0.21 (0.03)

Tumor/tissue	^{111}In -Antisense	^{111}In -Sense
Muscle	3.13 (1.25)	1.01 (0.44)
Lung	1.20 (0.40)	1.05 (0.51)
Liver	0.59 (0.14)	0.46 (0.16)
Kidney	0.25 (0.12)	0.14 (0.05)
Spleen	1.02 (0.33)	0.74 (0.19)
Plasma	1.36 (0.20)	2.33 (0.63)

Average (1 s.d.) of 4 animals.

Table 2 In vivo biodistribution of ^{32}P -labeled oligonucleotide in tumor bearing nude mice

% dose/g	^{32}P -Antisense	^{32}P -Sense
Tumor	6.94 (0.91)	7.55 (0.53)
Muscle	4.16 (0.43)	3.44 (0.22)
Lung	2.41 (0.88)	2.03 (1.00)
Liver	6.18 (1.92)	6.72 (1.24)
Kidney	8.01 (3.76)	6.12 (0.82)
Spleen	4.15 (1.14)	3.71 (1.04)
Plasma	0.57 (0.10)	0.49 (0.07)

Tumor/tissue	^{32}P -Antisense	^{32}P -Sense
Muscle	1.69 (0.31)	2.20 (0.15)
Lung	3.20 (1.09)	6.17 (6.62)
Liver	1.19 (0.28)	1.16 (0.26)
Kidney	1.08 (0.62)	1.26 (0.22)
Spleen	1.80 (0.61)	2.15 (0.53)
Plasma	12.27 (2.02)	15.59 (1.96)

Average (1 s.d.) of 4 animals.

のかかなりの放射能が標識体として存在し得ることが明らかとなった。

5. ^{111}In -IBE-オリゴヌクレオチドおよび ^{32}P -オリゴヌクレオチドの腫瘍移植ヌードマウス体内分布

^{111}In -IBE-オリゴヌクレオチドおよび ^{32}P -オリゴヌクレオチドの腫瘍移植ヌードマウスにおける体

内分布を検討した結果を腫瘍対他組織比で Table 1, 2 に示す。

^{111}In -IBE-オリゴヌクレオチドでは腫瘍に対してアンチセンス鎖がセンス鎖の約 2 倍の集積を示し、その結果腫瘍対筋肉比でアンチセンス鎖が 3 以上の値を示したのに対してセンス鎖が約 1 にとどまったが、一方で、血液や他の組織への集積では 2 者に複雑な相違がみられた。

一方、 ^{32}P -オリゴヌクレオチドでは、アンチセンス鎖とセンス鎖の間にマウス体内分布における差は見いだされなかった。

IV. 考 察

アンチセンス核酸を母体とする放射性医薬品開発の試みは、近年の分子生物学発展により得られた多くの知見を直接利用できるとともに選択的結合部位設計が核酸配列という特異かつ単純な原理に基づくことから、大きな期待が寄せられている。しかしながら、実際にはインビボという非常に限定された条件での配列特異的集積には多くの問題があり一般的手法としての可能性は未知である。

本論文でも、選択された標的 mRNA とアンチセンス核酸との結合性を ^{32}P 標識体を用いて生理的条件下で実験することから検討を開始した。これによりまず塩基配列特異的集積の存在が細胞レベルで示唆されるとともに、本検討で選択された mRNA 内標的塩基配列がアンチセンス鎖オリゴヌクレオチドの特異的集積性に関与し得ることが示された。

そこで、 γ 線放出核種である ^{111}In 標識オリゴヌクレオチドの合成を行った。必要とする IBE-オリゴヌクレオチドは得られたがその結合率は低い値にとどまった。原料の 5'-アミノ化オリゴヌクレオチドを電気泳動したところいくつかのバンドが観察され、合成収率の低さの原因としてオリゴヌクレオチドの 5'-アミノ化による副反応生成物の存在が考えられた。これを精製することは現在のところ非常に困難であり、また一般にアミノ化オリゴヌクレオチドの粗生成物に修飾基を反応さ

せた後に修飾基の性質を利用して精製する方法をとっていることから IBE 結合後に IBE-オリゴヌクレオチドとして精製する方法も試みたが成功するに至らなかった。

得られた IBE-オリゴヌクレオチドの ¹¹¹In 標識の標識率は約 30% にとどまった。これは結合率の低さにも一因があるが、同時にオリゴヌクレオチドに共有結合していない IBE を十分分離できなかったことにもよると考えられる。比放射能の向上には IBE の非特異吸着が起こらないような条件下での分離精製法の確立の必要性が示唆された。

このように、¹¹¹In 標識オリゴヌクレオチドの合成・標識には若干の問題点が残されたが、その安定性については満足すべき結果が得られた。すなわち ¹¹¹In-IBE-オリゴヌクレオチドは標識後 4 日間の比較的長期にわたって安定に使用可能であることが示された。また血清中での安定性では ³²P オリゴヌクレオチドが速やかに分解されたのに対して ¹¹¹In-IBE-オリゴヌクレオチドではタンパクには結合するものの混和後 30 時間でもかなりの放射能が高分子画分に存在しその高い安定性が示された。このことは、アンチセンス鎖オリゴヌクレオチドの人体への投与を考える上で本修飾法が安定性の向上の観点からも有用であることを示すものと考えられる。末端修飾によるオリゴヌクレオチド安定性の向上については 5'-修飾で同様の検討が行われており¹⁰⁾、それらとも一致する結果であった。

得られた ¹¹¹In-IBE-オリゴヌクレオチドの担腫瘍ヌードマウスにおける体内分布では、アンチセンス鎖がセンス鎖に比較して選択的腫瘍集積を示すことを示唆する結果を得たが、他の組織への分布は複雑に相違しており、本研究において想定した特定の塩基配列によるアンチセンス配列認識とは異なる因子の存在も考慮に入れる必要があることが示唆された。その可能性としては、配列の相違による物性の変化や特定の核酸塩基配列がレセプターなどのタンパクに特異的に結合するアプタマーなどの存在があるが、今後の検討が必要である。

同時投与した ³²P 標識オリゴヌクレオチドではアンチセンス鎖とセンス鎖の体内分布に差がみられなかった。インビトロでの血清中安定性に関する検討で明らかとなったように ³²P 標識オリゴヌクレオチドが血清中で速やかに分解するため配列特異的集積性を示すことができなかったものと考えられる。したがって、この結果のみからアンチセンス核酸放射性医薬品による腫瘍イメージングが困難であるとの結論を出すには問題があると思われる。

Dewanjee らは、c-myc mRNA を標的として ¹¹¹In-標識オリゴヌクレオチドの腫瘍イメージングに関する基礎検討を行っている⁷⁾。標的とする mRNA、オリゴヌクレオチドに導入された配位子、評価実験系の相違などがあるため単純な比較は困難であるが、彼らの報告に比較して本報告での ¹¹¹In-標識アンチセンス鎖オリゴヌクレオチドの腫瘍選択性はかなり小さいものであった。この相違が標的とする mRNA あるいはその発現量の相違によるものであるならば実用的な意味において標的となる mRNA の選択範囲はかなり制限される可能性が高い。しかしながら、生体内で非常に不安定なオリゴヌクレオチドが 5'-末端を修飾することにより高い安定性を獲得できたことは、オリゴヌクレオチドを母体とする薬剤を設計するうえで非常に興味ある知見であり、核医学診断薬剤のみならず今後の展開に期待がもてるものと考えられる。

謝辞：稿を終えるにあたり、A4 細胞をご供与下さいました大阪大学応用微生物研究所教授秋山徹先生ならびに東京大学医科学研究所教授山本雅先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Peter RU, Beetz A, Ried C, Michel G, van Beuningen D, Rizicka T: Increased expression of the epidermal growth factor receptor in human epidermal keratinocytes after exposure to ionizing radiation. *Radiation Res* **136**: 65-70, 1993
- 2) Mendonca MS, Boukamp P, Stanbridge EJ, Redpath JL: The radiosensitivity of human keratinocytes:

- influence of activated c-H-ras oncogene expression and tumorigenicity. *Int J Radiat Biol* **59**: 1195–1206, 1991
- 3) Kasid UN, Pfeifer A, Weichselbaum RR, Dritschilo A, Mark GE: The raf-oncogene is associated with a radiation-resistant human laryngeal cancer. *Science* **237**: 1039–1041, 1987
 - 4) Sherman ML, Datta R, Hallahan DE, Weichselbaum RR, Kufe DW: Ionizing radiation regulates expression of the c-jun protooncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 5663–5666, 1990
 - 5) Witte L, Fuks Z, Haimovitz-Friedman A, Vlodavsky I, Goodman DS, Eldor A: Effects of irradiation on the release of growth factors from cultured bovine, porcine and human endothelial cells. *Cancer Res* **49**: 5066–5072, 1989
 - 6) Saga T, Endo K, Akiyama T, Sakahara H, Koizumi M, Watanabe Y, et al: Scintigraphic detection of overexpressed c-erbB-2 protooncogene products by a class-switched murine anti-c-erbB-2 protein monoclonal antibody. *Cancer Res* **51**: 990–994, 1991
 - 7) Dewanjee MK, Ghafouripour AK, Kapadvanjwala M, Dewanjee S, Serafini AN, Lopez DM, et al: Non-invasive imaging of c-myc oncogene messenger RNA with indium-111-antisense probes in a mammary tumor-bearing mouse model. *J Nucl Med* **35**: 1054–1063, 1994
 - 8) Piwnica-Worms D: Making sense out of anti-sense: challenges of imaging gene translation with radio-labeled oligonucleotides. *J Nucl Med* **35**: 1064–1066, 1994
 - 9) Semba K, Kamata N, Toyoshima K, Yamamoto T: A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 6497–6501, 1985
 - 10) Mann JS, Shibata Y, Meehan T: Synthesis and properties of an oligodeoxynucleotide modified with a pyrene derivative at the 5'-phosphate. *Bioconjug Chem* **3**: 554–558, 1992

Summary

Basic Studies on the ^{111}In Labeled Antisense Oligonucleotide for Tumor Imaging

Yasuhisa FUJIBAYASHI***, Kazuo NAKAGAWA**, Atsuo WAKI*,
Harumi SAKAHARA****, Junji KONISHI**** and Akira YOKOYAMA****

*Department of Radiopharmaceutical Chemistry, Biomedical Imaging Research Center, Fukui Medical School

Department of Genetic Biochemistry, *Department of Radiopharmaceutical Chemistry,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

****Department of Nuclear Medicine, School of Medicine, Kyoto University

Antisense oligonucleotide labeled with short lived radionuclide has been proposed as a radiopharmaceutical for the detection of abnormal gene expression. In this study, plausibility of ^{32}P or ^{111}In labeled oligonucleotide was basically evaluated using c-erbB-2 protooncogene mRNA as a model target. In cell uptake studies, sequence specific accumulation of ^{32}P -oligonucleotide was found in the cells with c-erbB-2 mRNA expression, but not control cells, indicating the basic possibility of antisense strategy. Synthesis of

^{111}In labeled isothiocyanobenzyl-EDTA (IBE)-oligonucleotide could be performed, but some problems were found in purification step. Stability of ^{111}In -IBE-oligonucleotide was high when compared with that of ^{32}P -oligonucleotide, and in vivo biodistribution data might indicate that ^{111}In -IBE-oligonucleotide was plausible for tumor imaging.

Key words: Antisense oligonucleotide, ^{111}In , Metal radionuclide, Tumor, c-erbB-2 Protooncogene.