

^{103}Ru の腫瘍親和性

第 2 編

ルテニウムのがん細胞結合機構の解析

岡山大学医学部放射線医学教室

(主任：山本道夫教授 直接指導：田辺正忠助教授)

水 川 帰 一 郎

(昭和53年10月4日受稿)

緒 言

現在まで ^{67}Ga をはじめとして種々の放射性金属核種の悪性腫瘍に対する親和性が検討され、臨床的にも応用されている。しかし、これらの放射性金属核種の腫瘍集積機構には不明の点が多く、これを解明するためには、腫瘍細胞あるいは腫瘍組織と腫瘍親和性金属との相互作用に関するそれぞれの特異的性質を究明する必要がある。

最近、がん細胞の性状について、その細胞膜に見られる変化との関連が注目されている。そしてがん細胞に見られる多くの特異的現象が、がん細胞膜表面の複合糖質の変化に起因していることが明らかになりつつある。^{1)~3)} 細胞膜表面の変化に基づくと考えられる現象の一つとしてがん化細胞ではRR(ルテニウムレッド)による電子染色の程度が強くなることが知られている。⁴⁾ このことから Tanabe ら⁵⁾⁶⁾ は Ru (ルテニウム) と腫瘍の関連に着目し、放射性 Ru 核種が腫瘍親和性を有しており、臨床応用の可能性があることを報告した。

RRの性質として、細胞膜表面の糖タンパクおよび酸性ムコ多糖体との結合、がん細胞の凝集⁷⁾、細胞膜およびミトコンドリアにおける Ca^{2+} 輸送の阻害⁸⁾⁹⁾ などが知られ、RRと細胞膜の Ca^{2+} 結合タンパクとの関連が推測されている。これらのRRに関する知見をもとに ^{103}Ru の腫瘍親和性について検討した。そして腫瘍ホモジネートを遠心分画して ^{103}Ru の細

胞内分布を検討した実験では、ミトコンドリアが ^{103}Ru を結合する能力が高いことが示され¹⁰⁾、 ^{103}Ru と Ca^{2+} 結合タンパクとの関連が推測された。本編では ^{103}Ru のがん細胞表面への結合について検討した結果を報告する。

材料および方法

1. 核種

Radiochemical Centre 製 ^{103}Ru -chloride 4 N HCl 溶液 (比放射能約 1 mCi/mg) に 1 N NaOH 溶液を加えて pH 1.5~2.0 に調整し、ミリポアフィルター (0.45 μ) でろ過滅菌して実験に使用した。

2. がん細胞

ドンリュウ系雄性ラット (体重約 200g) の腹腔内に AH-130 腹水肝がん細胞を移植した。移植後 7 日目に腹水を採取、がん細胞を Utsumi ら¹¹⁾ の方法で分離し、生理食塩水を用いて遠心洗じょうして実験に供した。

3. 放射能およびタンパク量の測定

^{103}Ru の放射能活性はウェル型シンチレーションカウンター (Aloca Multimode Scaler, TDC-601) で測定した。

タンパクの定量はビウレット法¹²⁾で行った。

4. ^{103}Ru のがん細胞への結合

(1) インキュベーション時間による変化

がん細胞を生理食塩水に浮遊し、この細胞浮遊液 (タンパク量 0.8 mg/ml) の 1ml ずつに ^{103}Ru -chloride

約 6×10^5 c. p. m. を加え、 37°C でインキュベートした。そして30秒、5、10、15、20および30分間インキュベートしたものについて吸引ろ過法で細胞を分離し、細胞に結合している放射能を測定した。吸引ろ過には 3μ のミリポアフィルターを用いた。

(2) 定量分析

非放射性 Ru-chloride (半井化学薬品社製) に tracer として ^{103}Ru -chloride を加え (約 3×10^6 c. p. m. / $\mu\text{mole Ru}$)、 0.15 M NaCl 溶液を用いて種々の濃度の Ru 液を調整した。ついでその各々 0.5 ml にがん細胞生食浮遊液 0.5 ml を加え、タンパク量 3.2 mg/ml 、終末 Ru 濃度 3、10、20、30、50、100、および $150 \mu\text{M}$ の混合液とした。そして各々の混合液を 37°C 10分間インキュベートしたのち吸引ろ過法で細胞を分離し、放射能を測定して細胞に結合している Ru 量を求めた。

(3) papain 処理による変化

以下の3群のがん細胞を Ru とインキュベートし、Ru の結合量を比較した。

- ①群 低濃度の papain で処理した細胞
- ②群 同様の papain 処理後洗じようした細胞
- ③群 papain 処理しない対照群細胞

すなわち、がん細胞を 0.15 M NaCl - 5 mM MOPS 、 $[3 - (\text{N-Morpholino})\text{propanesulfonic Acid}] \text{ pH } 6.8$ の緩衝液 (以下 saline-MOPS 液と略) に浮遊させ、終末濃度が 0.0025% papain、 5 mM cysteamine になるように両者を含む saline-MOPS 液を加え、 37°C 15分間インキュベートした。そして、そのままの細胞浮遊液を①群、細胞をインキュベートのち saline-MOPS 液で遠心洗じようし、再び saline-MOPS 液に浮遊させたものを②群とした。また、papain、cysteamine を加えず同様の調整およびインキュベーションを行った細胞浮遊液を③群とした。

各群の細胞浮遊液の各々 0.5 ml に、種々の濃度の tracer 加 Ru-chloride の Saline-MOPS 液 0.5 ml を加え、各群につき終末 Ru 濃度 5、10、15、20、30および $50 \mu\text{M}$ 、タンパク量 10 mg/ml の混合液を 37°C 10分間インキュベートし、ついで $2,500 \text{ r.p.m.}$ 10分間遠心して細胞を分離し、遠心洗じよう後放射能を測定してそれぞれの細胞に結合している Ru 量を求めた。

(4) papain 処理で遊離する糖タンパクとの結合

がん細胞の saline-MOPS 浮遊液 (タンパク量 5 mg/ml) の 10 ml に、saline-MOPS 液で希釈した tracer 加 Ru-chloride 液 2 ml ($41,500 \text{ c.p.m.}$) を

加え 37°C 10分間インキュベートした。ついで $2,500 \text{ r.p.m.}$ 10分間遠心して細胞を分離し、saline-MOPS 液 5 ml に浮遊した。その 1 ml を放射能測定に使用し、 4 ml の細胞浮遊液に papain、cysteamine の saline-MOPS 溶液 6 ml を終末濃度がそれぞれ 0.0025% 、 5 mM になるように加えた。そして 37°C 10分間インキュベートしたのち $2,500 \text{ r.p.m.}$ 10分間遠心して上清を分離した。その上清 2 ml を saline-MOPS 液で6倍に希釈し、 10% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 0.5 ml を加え、 37°C で一昼夜インキュベートしたのち、 $3,000 \text{ r.p.m.}$ 10分間遠心して沈さを分離し、放射能を測定した。また、がん細胞を含まない液について同様の操作を行い、生じた沈さの放射能を補正した。

結 果

1. Ru の AH-130 腹水肝がん細胞への結合

^{103}Ru とがん細胞を 37°C でインキュベートすると、Fig. 1 に示すごとく、細胞に結合する Ru 量はインキュベート開始後 5～15分ではほぼ最高値に達した。

Ru 濃度とがん細胞のタンパク 1 mg あたりに結合する Ru モル数との関係を Scatchard plot で示した (Fig. 2)。これらの関係は折れ線として表わされ、がん細胞の Ru レセプターには親和性の強い部位と弱い部位があることが示された。

2. papain 処理による変化

Fig. 3 に示すごとく、papain 処理後そのまま Ru とインキュベートしたがん細胞に結合する Ru は対照群に比べて著しく少なく、Ru の多くが、papain 処理によって浮遊液中に離脱した表層タンパクにより強く結合したと考えられる。papain 処理後洗じようして浮遊液中の可溶化された表層タンパクが除かれた状態においても、Ru 濃度 $15 \mu\text{M}$ 以下では細胞に結合する Ru 量は対照群より少なく、この傾向は Ru 濃度が低いほど顕著であった。しかし、Ru 濃度が $20 \mu\text{M}$ 以上にたると表層タンパク除去の影響はみられなくなり、細胞に結合する Ru 量は逆に対照群より多くなった。この原因は明らかではないが、AH-130 腹水肝がん細胞が $20 \mu\text{M}$ 以上の Ru-chloride に対して明らかな凝集性を示す¹⁾ことが関係しているのかもしれない。

低濃度域でがん細胞に結合する Ru と低濃度 papain 処理で可溶化される細胞表層タンパクとの関連について Table 1 に示した。細胞に結合した Ru の約 65% が papain 処理によって可溶化され、その 45

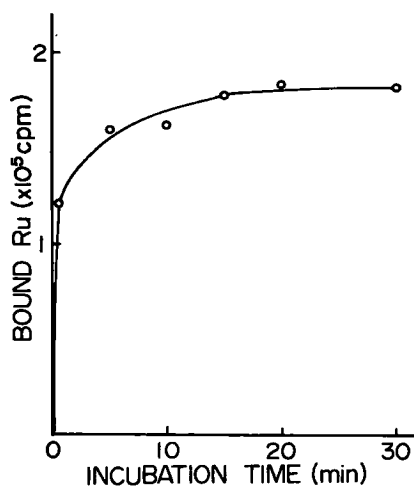


Fig. 1. Time course of ^{103}Ru bound to AH-130 ascites hepatoma cells incubated at 37 °C.

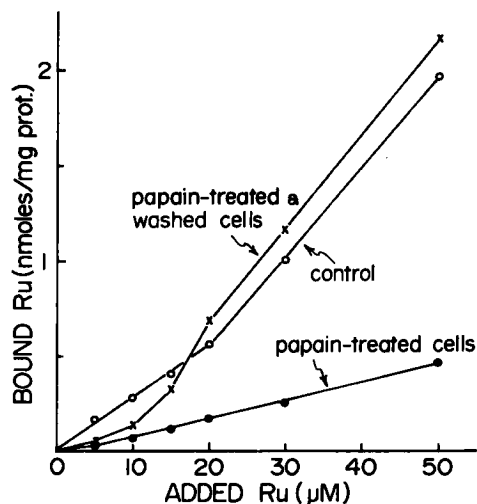


Fig. 3. Effect of the mild papain treatment on ruthenium binding to AH-130 ascites hepatoma cells.

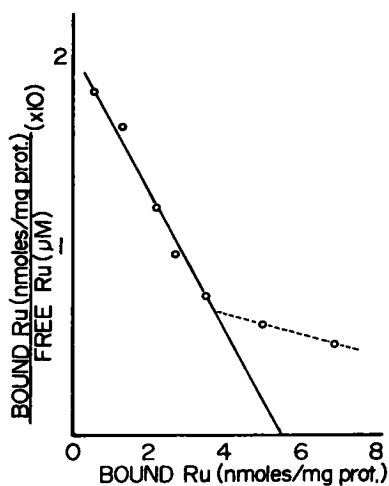


Fig. 2. Scatchard plot of ruthenium bound to AH-130 ascites hepatoma cells.

が CTAB で沈澱した。これは最初に細胞に結合していた Ru の約 30% に相当し、Ru が細胞膜表面の糖タンパクと強く結合していることを示していると考えられる。

考 案

腫瘍親和性放射性金属 ^{103}Ru の腫瘍集積機序を解明する目的で Ru とがん細胞表面の関連について検討した。その結果、AH-130 腹水肝がん細胞の Ru 結合レセプターには親和性の高い部位と低い部位が存在し、親和性の高いレセプターは papain 処理によって可溶化される細胞表面の糖タンパクであることが示された。このような Ru の性質は、これまでに報告されている RR に関する知見に類似している。RR は細胞表面の糖タンパク、酸性ムコ多糖体と結合し⁷⁾、細胞膜の Ca^{2+} 輸送を阻害する。⁸⁾⁹⁾ そして、この Ca^{2+} 輸送阻害は細胞膜の Ca^{2+} 結合糖タンパクに RR が競合的に結合することによると考えられている。¹¹⁾ これらのことから ^{103}Ru の腫瘍集積はがん細胞膜表面の Ca^{2+} 結合糖タンパクに対する Ru の親和性に関連していることが推測される。

他の腫瘍親和性金属核種の腫瘍集積機序が ^{103}Ru と共通であるかどうかは明らかでないが、細胞膜の Ca^{2+} 輸送を阻害する性質はランタニド元素についても認められる¹⁴⁾ ことから、ランタニド元素である ^{109}Yb 、 ^{167}mTm などの腫瘍親和性は Ca^{2+} 結合タンパクと関連しているのかもしれない。Anghileri¹⁵⁾ は ^{67}Ga の腫瘍親和性が Ca 代謝に関連していると報告したが、

Table 1. Radioactivity liberated by the mild papain treatment from the AH-130 ascites hepatoma cells incubated with ruthenium chloride containing ^{103}Ru -chloride as a tracer, and radioactivity precipitated by CTAB with the papain fragments.

| | cpm |
|---|-------|
| 0, 15 M NaCl-5mM MOPS medium, pH 6.8 | 41500 |
| Bound to cells | 2553 |
| Liberated by the mild papain treatment | 1664 |
| Precipitated by CTAB | 736 |

その後この点に関する研究報告はみられない。

形質転換細胞が麦芽凝集素やコンカナバリンAによって特異的に凝集する¹⁸⁾¹⁷⁾ことが発見されて以来がん細胞膜構造の研究が進み、がん細胞の特異的性質の多くががん化による細胞膜表層の複合糖質の変化によって発現することが明らかになりつつある。^{1)~3)}がん細胞膜の性質のうち金属の腫瘍親和性に関連するものとして、陰性荷電の増加あるいは透過性の亢進などが挙げられている¹⁸⁾¹⁹⁾が、これらについての十分な検討は行われていない。現在、がん細胞の性質の研究としてがん細胞膜構造の解析が進められており、金属の腫瘍親和性機序の解明についても、この方面の検討が必要であろうと思われる。

結 論

^{103}Ru の腫瘍親和性を解明する目的で、 ^{103}Ru -chlorideをトレーサーとして加えたRu-chlorideとAH-130腹水肝がん細胞を*in vitro*でインキュベートし、Ruのがん細胞への結合と細胞膜表層のタンパクとの関連について検討した。がん細胞に結合するRu量

はRu濃度が高いほど多く、がん細胞のRu結合レセプターに親和性の高い部位と低い部位が存在することが示された。がん細胞を低濃度のpapainで処理するとRuの多くは可溶化されたタンパクと結合し、細胞にはあまり結合しなかった。しかし、papain処理で可溶化されたタンパクを除去すると、再び多くのRuが細胞との結合を示した。また、papain処理で可溶化されたタンパクのうちCetyltrimethylammonium bromideで沈澱する糖タンパクに対してRuが親和性をもつことが示された。

これらのことから ^{103}Ru のがん細胞への結合にはがん細胞膜表層の糖タンパクが重要な役割を果たしていると考えられる。

稿を終るにあたり、御指導および御校閲をいただいた山本道夫教授、ならびに直接実験の御指導をいただいた田辺正忠助教授、山本剛禧講師に深謝します。なお本研究に御協力いただいた放射線医学教室の各位に謝意を表します。

文 献

1. 小島清秀, 小泉恵子: ガン細胞の表面構造—特に肝ガン細胞の cell coat を中心に—. 蛋白質核酸酵素, **19**, 202-210, 1974.
2. 穂積本男: 癌細胞の異常増殖性—細胞膜の特異性とプロテアーゼの役割について—. 癌と化学療法, **3**, 339-349, 1976.
3. 柄崎脩一: エクトエンザイムとガン細胞膜. 蛋白質核酸酵素, **23**, 1-9, 1978.
4. 牧田章: 癌の細胞膜. 臨床生理, **5**, 100-108, 1975.

5. Tanabe, M. and Yamamoto, G. : Tissue distributions of ^{87}Ru and ^{103}Ru in subcutaneous tumor of rodents. *Acta Med. Okayama* **29**, 431-436, 1975.
6. Tanabe, M. : Clinical trials on tumor scanning with ^{103}Ru . *Radioisotopes* **24**, 232-237, 1976.
7. Utsumi, K. and Oda, T. : Ruthenium-red-induced cell agglutination and surface glycoprotein and mucopolysaccharide. *J. Cell Sci.* **13**, 901-911, 1973.
8. Vasington, F.D., Gazzoti, P., Tiozzo, R. and Carafoli, E. : The effect of ruthenium red on Ca^{2+} transport and respiration in rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **256**, 43-54, 1972.
9. Cittadini, A., Scarpa, A. and Chance, B. : Calcium transport in intact Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* **291**, 246-259, 1973.
10. 水川帰一郎 : ^{103}Ru の腫瘍親和性 第1編 ^{103}Ru -chloride の腫瘍および肝臓内分布 岡山医学会雑誌 (投稿中).
11. Utsumi, K., Inaba, K., Yamamoto, M., Yamamoto, G., Urakami, H. and Seno, S. : The effect of high fatty acid on the glucose metabolism of Ehrlich ascites tumor cells. *Acta Med. Okayama* **16**, 177-191, 1962.
12. Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M. : Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biol. chem.* **177**, 751-756, 1949.
13. 未発表.
14. Carafoli, E., Gazzoti, P., Saltini, C., Rossi, C. S., Sottocasa, G. L., Sandri, G., Panfili, E. and de Bernard, B. : Further studies on the mitochondrial Ca^{2+} -binding glycoprotein. In *Mechanisms in Bioenergetics* eds, G.F. Azzone, L. Ernster, S., Papa, E. Quagliariello, and N. Siliprandi, Academic Press, New York and London, pp. 293-307, 1973.
15. Anghileri, L. J. : Studies on the accumulation mechanisms of radioisotopes used in tumor diagnostic. *Strahlentherapie* **142**, 456-462, 1971.
16. Aub, J. C., Tieslau, C. and Lankester, A. : Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes. I. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **50**, 613-619, 1963.
17. Inbar, M. and Sachs, L. : Interaction of the carbohydrate-binding protein concanavalin A with normal and transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **63**, 1418-1425, 1969.
18. 安東醇, 久田欣一, 平木辰之助, 安東逸子, 真田茂 : ^{169}Yb , ^{67}Ga , ^{111}In の腫瘍親和性機序 (I) 静注直後の体内分布の解析と結合様式の推定. *Radioisotopes* **23**, 161-165, 1974.
19. 久田欣一 : がん親和性放射性薬剤—IAEA “腫瘍親和性放射性薬剤” に関する会議に出席して—. *Radioisotopes* **24**, 204-213, 1975.

^{103}Ru for Tumor Scanning**Part II. The mechanism of ruthenium binding to tumor cells****Kiichiro MIZUKAWA**

Department of Radiation Medicine, Okayama University Medical School,
Okayama, Japan

(Directors : Prof. M.Yamamoto and associate prof. M.Tanabe)

The mechanism of ^{103}Ru -uptake in tumors was investigated through the incubation of rat ascites hepatoma cells (AH-130) *in vitro* with various concentrations of Ru-chloride containing ^{103}Ru -chloride as a tracer. Quantitative analysis of Ru binding to the cells indicated that ascites hepatoma cells contained high- and low-affinity binding sites for Ru. When ascites hepatoma cells were incubated with Ru after incubation with a low concentration of papain, most of the Ru was not bound to the cells but was found in the medium containing solubilized glycoproteins. However Ru bound mainly to washed cells after the incubation with papain. About 65% of the Ru bound to ascites hepatoma cells was liberated by the papain treatment, and about 45% of the liberated Ru was precipitated by cetyltrimethylammonium bromide, indicating that Ru bound tightly to glycopeptides. These results suggest that the tumor affinity of ^{103}Ru is related to specific binding to glycopeptides on the tumor cell surface.