

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15444

研究課題名(和文) 微小空間での放射性金属核種の電気化学的濃縮とペプチド標識

研究課題名(英文) Electrochemical concentration of radiometals in the microspace and its application to labeling of peptid

研究代表者

岩田 錬 (Iwata, Ren)

東北大学・サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター・名誉教授

研究者番号：60143038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：電極表面での電気化学的吸脱着を利用して放射性金属イオンを微小空間でのペプチド・抗体標識に応用する挑戦的な研究を行った。[18F]フッ素イオンを微小な空間を有する電極チップで捕捉し、Al³⁺イオンと反応させてAl[18F]F₂⁺を>75%の収率で得たが、全回収率は再現性に乏しく、電極表面の状態変化が原因と推測された。HM12サイクロトロンを用いて⁶⁴Ni(p,n)⁶⁴Cu核反応により⁶⁴Cuを製造するための照射容器を試作した。HERS抗体のTranstuzumabとCetuximabを修飾して、これらと⁶⁴Cuを微小空間で錯形成を行う最適な反応法と分離精製法のための調製プロトコルを確立した。

研究成果の概要(英文)：The present study was aimed to develop a challenging method for separating radioactive metal ions in a small space by electrochemical adsorption and desorption on the Pt/carbon electrode and for labeling peptides or antibodies with recovered radioactive metals by chelating reactions. [18F]Fluoride was concentrated and then converted in >75% to Al[18F]F₂⁺ with Al³⁺ in the narrow channel of an electrochemical chip. Recovery yields, however, were varied independently on applied voltage and time probably due to the surface conditions of the carbon electrode. A custom-made target chamber was developed and successfully tested for producing ⁶⁴Cu by the ⁶⁴Ni(p,n)⁶⁴Cu reaction with the HM12 cyclotron at CYRIC. Transtuzumab and Cetuximab were chosen as a candidate antibody. They were modified with DOTA-NHS-ester as a chelating agent and a protocol suitable for the preparation of ⁶⁴Cu-DOTA-Transtuzumab and ⁶⁴Cu-DOTA-Cetuximab in a small scale was established.

研究分野：放射線科学

キーワード：放射性金属 電気化学的濃縮 ペプチド・抗体標識 標識技術

1. 研究開始当初の背景

ペプチド・タンパク質・抗体の放射性核種による標識法として、これまでいくつかの方法が開発されてきた。古典的な放射性ヨウ素のチロシン残基やヒスチジン残基への酸化的な置換反応による標識法や Bolton-Hunter 試薬を用いる選択的な方法、放射性金属との錯体形成部位(キレーター)を有する二官能性キレート試薬による方法などが知られている。PET 診断プローブでは、Bolton-Hunter 試薬の一種である *N*-succinimidyl 4-[¹⁸F]-fluorobenzoate やその類似体を用いて 4-[¹⁸F]fluorobenzoyl 基をペプチドや抗体に prosthetic group として導入する標識法が最もよく利用されているが、水溶液中で比較的温和な反応条件で ¹⁸F-標識化が可能な Click chemistry による方法も近年注目されている。また、我々は標識したアミノ酸からキット化された無細胞合成法により標識ペプチドを合成することに最近成功した (R. Harada et al., *Nucl. Med. Biol.* **39** (2012) 155-160; T. Matsuda et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **20** (2012) 6579-6582)。一方、Al イオンと ¹⁸F イオンが結合した [Al¹⁸F]²⁺ が金属イオンと同様に錯体形成することを利用して容易に ¹⁸F-標識ペプチドを合成する方法が開発され注目を集めている。今後このような新しい合成技術がペプチド・抗体標識に利用されるものと期待される。

一方、ペプチドや抗体の生体内での代謝が ¹⁸F の半減期に比べ遅いため、比較的半減期が長い陽電子放出金属核種を標識に使用することが近年盛んになっている。低エネルギーのプロトンを加速する PET 用のサイクロトロンで容易に製造可能な ⁶⁴Cu (半減期: 12.7 時間) がその代表核種であり、ペプチド・抗体系の PET プローブが今後益々その重要性を増すものと予想される。

2. 研究の目的

巨大分子のペプチド・タンパク・抗体プローブの標識合成では、使用した合成前駆体を短時間に分離除去することができない。従って、標識合成に使用した全量を生体に投与せざるを得ず、PET プローブの特徴である高比放射能の利点を十分に生かすことができない。本研究では、マイクロリアクター合成を目的に開発した ¹⁸F イオンの電気化学的濃縮技術を活用して、マイクロフローセル内で放射性金属核種イオン (⁶⁴Cu²⁺) を数十 μL 程度の水溶液に濃縮し、この同じフローセル内で微量容量を保持したままペプチドと錯体形成を行なうマイクロスケールでの ⁶⁴Cu 標識ペプチド合成法の開発に挑戦する。

3. 研究の方法

(1) Al¹⁸F²⁺ の電極内オンチップ形成反応の検討

¹⁸O-濃縮水をターゲットとして製造される無担体添加の ¹⁸F イオンを微量空間 (約 16 μL) に C-Pt 電極を持つチップの炭素電極表面に捕捉し、次に逆電圧をかけてこの ¹⁸F イオンを脱着し、そのまま Al³⁺ イオンとの錯体形成を促す方法を検討した。その実験法を下記に示す。

1. ¹⁸F イオンをチップ電極に捕捉。
2. H₂O (1 mL) でチップ内を洗浄。
3. 手動バルブ (MV) を切換え、0.1~2 mM Al³⁺/酢酸緩衝液をチップに充填。
4. MV を切換えて、Al³⁺ 導入ラインを水で洗浄。
5. MV を中間の位置に切り替えてチップ内を閉鎖系として、80°C で印加電圧 1~5 V で、1~10 min の間保持する。
6. MV を切換え、約 2 mL の 0.1 mM 酢酸水溶液又は緩衝液 (pH 4) で反応溶液を SPE カラム (CM+QMA) に通して回収し、イオン性成分の分布を求める。

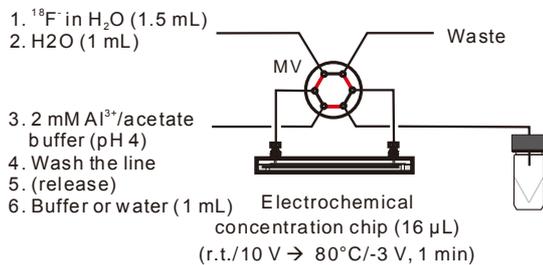


図 1. 実験系概略図

得られた Al¹⁸F²⁺ 錯体と以下に示す 2 つのリガンドを用いて錯体形成反応 (5 mM TOTA/酢酸緩衝液 100 μL, 80-90°C, 10-35 分) を行い、HPLC 分析で反応をチェックした。

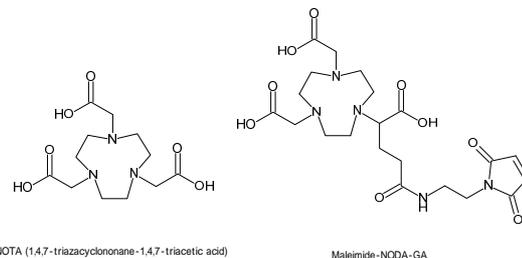


図 2. 錯体形成反応に使用した NOTA 誘導体

(2) HM12 サイクロトロン用 ⁶⁴Cu 製造照射容器の試作

研究分担者が当初所属した理研ライフサイエンス技術基盤研究センターには、(1) で使用した電気化学的 ¹⁸F イオン濃縮装置と同等の装置が設置され、⁶⁴Cu がルーチン的に製造されていた。しかし、分担者が慶応大学に異動したため、これらを利用することができなくなり、急遽東北大学で ⁶⁴Cu を製造す

ることを検討した。しかし、東北大学のHM12サイクロトロン(住友重機械工業製)は気体と液体だけを照射できるターゲットシステムを備えているだけで、 ^{64}Cu 製造のための固体ターゲット(濃縮ターゲットである ^{64}Ni でメッキされた金ディスク)を照射する機能を有していなかった。そこで、現有システムの変更を伴わない固体照射容器を設計し用いることとした。設計した照射容器の概略図を下記に示す。

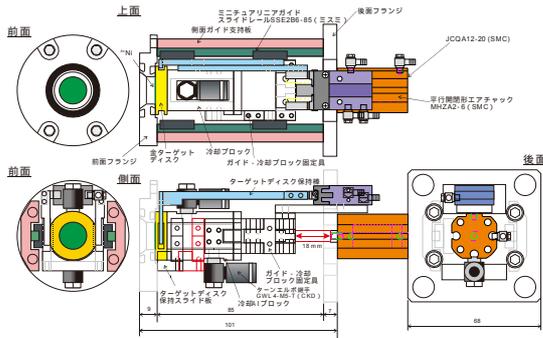


図3. ^{64}Cu 製造用照射容器設計図(組立図)

金ディスクは上方より手でホルダーに置き後方から冷却部を押し付けて照射する。照射終了後ホルダーを遠隔的に放すことで下方に自然落下させ運搬用の遮蔽容器に入れる方式とした。

(3) ^{64}Cu を用いるペプチド・抗体標識

微小空間での ^{64}Cu を用いた抗体標識検討に先立ち、 ^{64}Cu -DOTA-Transtuzumab及び ^{64}Cu -DOTA-Cetuximab(図4)をモデル標識抗体として、反応容量100 μL での安定した標識プロトコルを検討した。

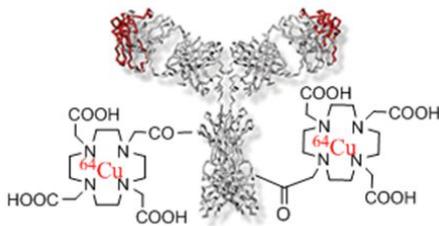


図4. ^{64}Cu -DOTA-Cetuximabの模式図

1. リガンドであるDOTA-NHS-esterのPBS溶液(10 mM)を抗体のPBS溶液と100:1の割合で混合し、室温下3時間攪拌して反応させた。PD-10カラムとAmicon MLtra-4で濃縮精製した。
2. ^{64}Cu の酢酸緩衝液(0.1 M, pH 6.5)に上で調製した抗体溶液を加え、40で1時間放置した。
3. この溶液をAmicon MLtra-0.5に移し、グリシン緩衝液で遠心分離し、 ^{64}Cu -DOTA-抗体溶液を得た。
4. 得られた標識抗体をTLCとHPLCで分析した。

4. 研究成果

(1) $\text{Al}^{18}\text{F}\text{F}^{2+}$ の電極内オンチップ形成反応の検討

- 生成した $\text{Al}^{18}\text{F}\text{F}^{2+}$ の分析法を確立した。 $^{18}\text{F}\text{F}^-$ と Al^{3+} の反応液をイオン交換カートリッジ(Sep-Pak CMとSep-Pak QMAを連結したもの)に通すことで陽イオンと陰イオンのそれぞれを分離捕集し、その生成を確認するとともに、割合を算出した。 $^{18}\text{F}^- + 6 \mu\text{L} 2 \text{ mM } \text{Al}^{3+}/\text{緩衝液} + 200 \mu\text{L } \text{H}_2\text{O}$ を室温下、約10分で反応させた結果、 $>75\%$ の $\text{Al}^{18}\text{F}\text{F}^{2+}$ が得られた。
- 次にこの分析法を用いて、オンチップでの生成法を検討した。 $^{18}\text{F}\text{F}^-$ を捕捉したチップ内に Al^{3+} 濃度5 μM ~2 mMの緩衝液を満たし、電圧を-1.5~-3 Vに変化させ、80で1-20分放置後、緩衝液を回収して分析した。その結果、 ^{18}F の回収率は15~100%まで変化し、 $\text{Al}^{18}\text{F}\text{F}^{2+}$ 生成の割合は最大で83%であったが、その再現性は乏しかった。電極チップの利用回数などで炭素電極表面の状態が変化(一部の電極材が剥離)するためと推測され、高価なチップを1回だけ使用して最適化を進めることができず、これ以上の実験を実施しなかった。
- 2つのリガンドを用いて錯体形成反応(5 mM TOTA/酢酸緩衝液100 μL , 80-90 $^\circ\text{C}$, 10-35分)を行い反応液のHPLC分析を行った結果、無担体添加の $^{18}\text{F}\text{F}^-$ がカラム充填剤(エンドキャップされている)に一部吸着されるため、分析系の信頼性に疑問が出てきた。図5に示すように、 $^{18}\text{F}\text{F}^-$ の試料を注入し、ほぼ溶媒先端に溶出する放射能ピーク($^{18}\text{F}\text{F}^-$ と推定される)が出終わった後に、非放射性のKF水溶液を注入すると、再び大きな放射能ピークを観測した。このことは吸着した $^{18}\text{F}\text{F}^-$ が非放射性のフッ素と交換して溶出したと考えられる。

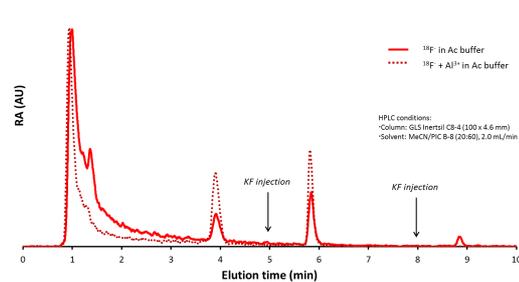


図5. $^{18}\text{F}\text{F}^-$ のHPLC分析プロファイル

これらの結果から、水溶性の高いリガンドは $\text{Al}^{18}\text{F}\text{F}^{2+}$ との錯形成反応を評価するには適さないと考えられた。従って、これ以上の実験を中止した。

(2) HM12サイクロトロン用 ^{64}Cu 製造照射容器の試作

図3に示した設計に基づきアルミ製の照射容器を試作したものを図6に示す。これに、

2 個のシリンダー駆動の圧縮空気切換え用のバルブを接続して、HM12 サイクロトロンの照射サイトに取付けた（写真 7）。

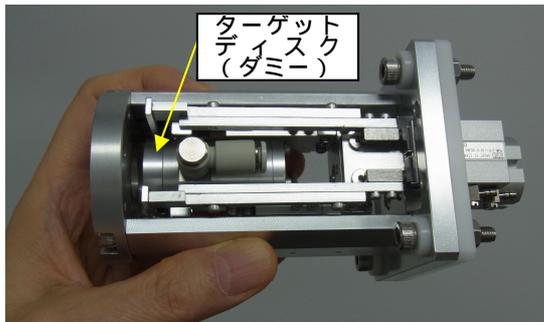


図 6 . 照射容器（斜め上方から見た写真。ビームは左側から入射）

ターゲットディスク
保持用チャックと冷却
ブロック駆動用の
バルブ

ポジション#1 に固定
された照射容器



図 7 . 照射容器を A サイトのポジション#1 に取付けた様子

ターゲットディスクの回収を試行し、問題なく遠隔的に回収できることを確認した。

(3) ^{64}Cu を用いるペプチド・抗体標識

ペプチド・抗体等の標識に応用することを念頭に、 ^{64}Cu の配位子である DOTA を有する DOTA-Trastuzumab の調製とその標識反応を検討した。DOTA-NHS と Trastuzumab の最適な比率を求め 1 分子当たり 8-10 個の DOTA を導入することができた。この前駆体（抗体）と ^{64}Cu の最適な割合を求めて良好な比放射能で目的物を得ることができた。また、HER2 に対する親和性の指標である K_d 値を求めた。その結果を以下の表に示す。

プローブ名	50-5	100-6
Trastuzumab : DOTA-NHS モル反応比	1:50	1:100
Trastuzumab 1分子あたりのDOTA数	8.7	10.6
Tras(mg) : $^{64}\text{CuCl}_2$ (MBq) 反応比	1:5	1:6
比放射能 (MBq/ μg)	3.5	3.0
HER2に対する親和性 K_d 値	3.90E-09	8.56E-09

EGFR 抗体 Cetuximab の ^{64}Cu 標識化を検討した結果、方法で示したプロトコルの実用性が示された。図 8 はその TLC 分析結果を示すが、98%以上の十分に高い放射化学的純度で得ることができた。

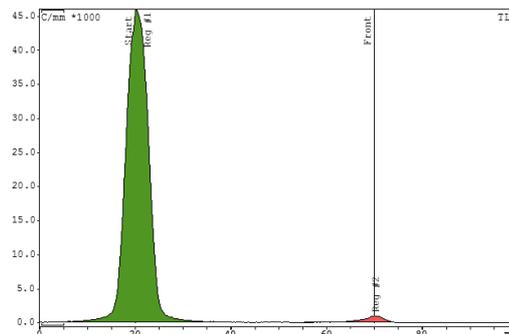


図 8 . ^{64}Cu -Cetuximab のラジオ TLC

結論

微小空間を有するチップ内で放射性のイオン物質を電気化学的に吸脱着することで高濃縮し標識利用する方法の実現を目指したが、 ^{18}F から Al^{3+} との反応では炭素電極の状態変化のため $\text{Al}^{18}\text{F}^{2+}$ を再現性良く高収率で得ることができなかつた。また、リガンドとの錯体形成反応では無担体添加の ^{18}F と HPLC に問題があり、反応の最適化を行うことができなかった。

^{64}Cu を利用するため、その照射容器を試作したが、ターゲットである ^{64}Ni が高価であるため購入できなかった。一方では、少量の ^{64}Cu を用いて抗体への標識化の基礎的検討を進め、条件を確立できた。

本研究は、放射性の金属核種を電気化学的に濃縮してペプチド・抗体等の微量の標識反応に提要する方法の開発を目指したが、いくつかの困難のため実現できなかった。しかしこれらは解決可能であり、今後もこの挑戦的な研究課題に継続的に取り組む予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Harada R., Okamura N., Furumoto S., Furukawa K., Ishiki A., Tomita N., Hiraoka K., Watanuki S., Shidahara M., Miyake M., Ishikawa Y., Matsuda R., Inami A., Yoshikawa T., Tago T., Funaki Y., Iwata R., Tashiro M., Yanai K., Arai H., Kudo Y., ^{18}F THK-5117 PET for assessing neurofibrillary pathology in Alzheimer disease, Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag., 査読有, 42, 1052-1061 (2015). Doi: 10.1007/s00259-015-3035-4.

Beppu T., Sasaki T., Terasaki K., Saura H., Matsuura H., Ogasawara K., Sasaki M., Ehara S., Iwata R., Takai Y. High-uptake areas on positron emission tomography with the hypoxic radiotracer

¹⁸F-FRP170 in glioblastomas include regions retaining proliferative activity under hypoxia. *Ann. Nucl. Med.*、査読有、29, 336-341 (2015). Doi: 10.1007/s12149-015-0951-0.

Shidahara M., Watabe H., Tashiro M., Okamura N., Furumoto S., Watanuki S., Furukawa K., Arakawa Y., Funaki Y., Iwata R., Gonda K., Kudo Y., Arai H., Ishikawa Y., Yanai K. Quantitative kinetic analysis of PET amyloid imaging agents [¹¹C]BF227 and [¹⁸F]FACT in human brain. *Nucl. Med. Biol.*、査読有、47, 734-744 (2015). Doi: 10.1016/j.nucmedbio.2015.05.001.

Kimura H., Tomatsu K., Saiki H., Arimitsu K., Ono M., Kawashima H., Iwata R., Nakanishi H., Ozeki E., Kuge Y., Saji H. Continuous-flow synthesis of *N*-succinimidyl 4-[¹⁸F]fluorobenzoate using a single microfluidic chip. *Plos One*、査読有、11 e0159303 (2016). Doi: 10.1371/journal.pone.0159303.

Harada R., Furumoto S., Yoshikawa T., Ishikawa Y., Shibuya K., Okamura N., Ishiwata K., Iwata R., Yanai K. Synthesis and characterization of ¹⁸F-interleukin-8 using a cell-free translation system and 4-¹⁸F-fluoro-L-proline. *J. Nucl. Med. Mol. Imag.*、査読有、57, 634-639 (2016). Doi: 10.2967/jnumed.115.162602.

Tago T., Furumoto S., Okamura N., Harada R., Adachi Hajime., Ishikawa Y., Yanai K., Iwata R., Kudo Y. Structure-activity relationship of 2-arylquinolines as PET imaging tracers for tau pathology in Alzheimer's disease. *J. Nucl. Med. Mol. Imag.*、査読有、57, 608-614 (2016). Doi: 10.2967/jnumed.115.166652

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩田 錬 (IWATA, Ren)
東北大学・サイクロトロン・ラジオアイソ

トープセンター・名誉教授

研究者番号：60143038

(2)研究分担者

高橋 和弘 (TAKAHASHI, Kazuhiro)

慶応義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：20370257

(3)連携研究者

石川 洋一 (ISHIKAWA, Yoichi)

東北大学・サイクロトロン・ラジオアイソ

トープセンター・助手

研究者番号：60361200