

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21564

研究課題名(和文)神経疾患への応用を目指したフッ素18標識タンパク質PET分子プローブの開発

研究課題名(英文)Development of Fluorine-18 labeled protein PET molecular probes for the application to neurological diseases

研究代表者

谷内 一彦(Yanai, Kazuhiko)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50192787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患の脳内に蓄積する異常タンパク質がPETにより可視化できるようになった。その分子プローブには低分子化合物を用いて開発されてきたが、異常タンパク質の中には低分子化合物では認識できない分子構造を持つものも存在し、それが技術的な限界となっている。タンパク質リガンドはユニークな結合機構から様々な分子を標的とすることができるが、脳移行性が低いという課題がある。そこで本研究では脳・血液脳関門(BBB)透過性ペプチドを融合させた18F標識タンパク質をデザインし、その有効性を検討することを目的とした。その結果、BBB透過性ペプチド融合18F標識タンパク質の合成に成功し、脳移行性の増加が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではBBB透過ペプチドを融合することで脳移行性が増加することが示せたが、実際にモデル動物において脳内に存在する標的分子の画像化は示せていないところが今後の課題である。優れた薬物動態(脳移行性とクリアランス)を示す18F標識タンパク質リガンドが開発することができれば、これまで低分子化合物で標的にすることができなかった様々な標的を画像化することができると期待できる。すなわち、分子プローブによる画像化できる標的の制限から開放されることになり、より多くの標的分子の画像化による病態生理の理解、治療薬評価のサロゲートマーカーとしての応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Recent advances in the development of small molecule-based radiotracers enabled us to visualize misfolded proteins in the brain of neurodegenerative diseases. Some of the misfolded proteins have conformation that small molecules cannot recognize, which is a technical limitation. Protein ligands can target a variety of molecules including conformations due to their unique binding mechanisms, but they have low blood-brain barrier (BBB) penetration. In this study, we designed 18F-labeled proteins fused with BBB-permeable peptides and aimed to investigate their efficacy. We successfully prepared the 18F-labeled proteins and confirmed the improvement of brain uptake in mice.

研究分野：薬理学

キーワード：タンパク質プローブ Fluorine-18 神経疾患 BBB透過性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) をはじめとする神経変性疾患脳内では何らかの原因で異常凝集したタンパク質 (ミスフォールディングタンパク質) の蓄積を求める。AD の死後脳ではアミロイド β から成る老人斑とタウ蛋白質から成る神経原線維変化が、パーキンソン病 (PD)・レビー小体型認知症 (DLB) の死後脳では α シヌクレインのから成るレビー小体を認める。陽電子断層撮影法 (Positron Emission Tomography) を用いた分子イメージング法の開発により、脳内に蓄積したアミロイドおよびタウが画像化できるようになった。申請者の研究グループは世界に先駆けて α -シヌクレイン、タウ病変を検出する PET プローブの開発を開始し、探索的臨床研究により先駆的な業績を上げてきた。しかし、残念ながら我々の開発した PET プローブは特異性が低く、off-target binding などの問題で開発を中断せざるを得ないなどを経験してきた。低分子型の PET プローブの特異性が低いという欠点を克服するために本研究では抗体同様の高い結合親和性と標的特異性を持ち、分子量が比較的小さく、血中半減期が短い、Affibody に着目した。一般的に、脳と末梢の間には血液脳関門 (Blood-Brain Barrier; BBB) が存在し、特異的なトランスポーターを介する基質や脂溶性を持った低分子化合物を除いて末梢から脳への物質の輸送は制限されている。したがって、水溶性が高く、分子量も大きいタンパク質は脳への移行は難しい。神経変性疾患の治療薬において薬物を脳へ輸送することは重要と位置づけられ、BBB に発現するトランスポーターに発現する分子を標的とした抗体やペプチドが積極的に開発されている。そこで研究代表者らは Affibody 分子に BBB 透過ペプチド (BBB penetrating peptide; BPP) を融合させ、脳移行性の高い ^{18}F 標識タンパク質を用いる脳内 PET イメージング法を開発して、神経疾患への応用を着想した。

2. 研究の目的

そこで本研究では、 α シヌクレイン、アミロイド β を標的とした Affibody 分子に BPP を融合させた分子を設計し、 ^{18}F -フルオロエチルチロシン (^{18}F -FET) と改良型無細胞タンパク質合成法により、 ^{18}F 標識タンパク質を調製し、結合親和性、薬物動態を評価し、中枢に存在する分子を標的とした PET イメージング法の可能性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) α シヌクレインを標的とする Affibody と BPP 融合タンパク質の合成と結合性評価

α シヌクレインを標的とする Affibody として AS69 (14 kDa) を選択した。AS69 を選択した理由は α シヌクレインに対して $K_D = 250 \text{ nM}$ で、アミロイド β に対しては $K_D = 5000 \text{ nM}$ と比較的高い結合選択性を有していたためである (Mirecka EW et al., Angew Chem Int Ed Engl. 2014)。また BPP ペプチドは複数報告されているが、静脈内投与 2 時間後で最も高い脳移行性を示した ApoE ペプチド (ApoE(159-167)₂) (Böckenhoff A et al., J Neurosci. 2014) を選択した。AS69 と ApoE ペプチドの間には強固なヘリカルリンカーを挟んで融合させることでタンパク質の安定性の増加と AS69 と ApoE(159-167)₂ の機能が最大限に発揮できるようにデザインした。まずは大腸菌を用いて AS69 単体と AS69-ApoE を発現・精製を行い、SDS-PAGE で純度 95% を確認した。精製した α シヌクレインをメンブレンに固定し、AS69 と AS69-ApoE とインキュベーションし、His-Tag 抗体を用いて検出することで α シヌクレインへの結合性を評価した。 ^{18}F 標識のために、AS69 遺伝子、AS69-ApoE 遺伝子の開始コドンの次に終止コドン (TAG) を挿入した DNA を設計し、プラスミドを調製した。

(2) ^{18}F -FET と無細胞タンパク質合成試薬による ^{18}F 標識タンパク質の合成

研究代表者らはこれまでに高比放射能で合成した ^{18}F 標識アミノ酸である ^{18}F -FET を TAG コドンを導入した遺伝子と直交系 tRNA-改変型アミノアシル合成酵素ペアを用いて無細胞タンパク質合成系 (Cell-Free Protein Radiosynthesis: CFPRS) において ^{18}F 標識タンパク質を合成することに成功している (Yanai A et al., Mol Imaging Biol. 2019)。さらに本研究では、 ^{18}F 標識タンパク質を His タグで簡易に精製できるようにするために、改変型アミノアシル合成酵素に Strept タグを導入した。この方法を用いて ^{18}F -AS69 と ^{18}F -AS69-ApoE の合成検討を行った。His タグ精製後のフラクションを SDS-PAGE を行い、ゲルをイメージングプレートにコンタクトさせた。FLA-9500 (GE healthcare) でイメージングプレートのスキャンすることでゲルオートラジオグラフィ画像により、目的の ^{18}F 標識タンパク質の合成を確認した。

(3) ^{18}F 標識タンパク質の体内動態評価

^{18}F -AS69、 ^{18}F -AS69-ApoE (185-370 kBq) をそれぞれ正常マウス (Slc:ICR) に静脈内投与した。投与 2 分、10 分、30 分、60 分、120 分後にマウスを解剖し、各臓器を摘出した。回収した臓器は γ カウンターにより放射能を計測し、各臓器への放射性薬剤の取り込みを %ID/g として計算した。血漿の代謝物解析をゲルオートラジオグラフィにより実施し

た。また、 ^{18}F -AS69、 ^{18}F -AS69-ApoE (3.3–4.6 MBq) を正常マウスに静脈内投与し、Clarivio PET (Shimadzu) を用いた 120 分間のダイナミック撮影を行った。AMIDE ソフトウェアを用いて Standardized uptake value (SUV) を算出した。動物実験に関しては東北大学・環境安全委員会動物実験専門委員会の承認を得て実施した。

4. 研究成果

(1) α シヌクレインを標的とする Affibody と BPP 融合タンパク質の合成と結合性評価

AS69 と AS-69-ApoE を精製タンパク質として調製することができた。次に α シヌクレインに対する結合選択性を評価した結果、AS69 と AS-69-ApoE 共にアミロイド β には結合せず、 α シヌクレインに選択的に結合した。さらに、構造の異なる (モノマー、線維) α シヌクレインに対しての結合性を評価した結果、線維に結合するチオフラビン T の蛍光強度がインキュベーション時間依存的に増加したのに対し、AS69、AS69-ApoE の結合シグナル時間依存的に減少した。すなわち、AS69 と AS-69-ApoE はモノマーに対して結合し、凝集体である線維に対する結合性は弱いことが明らかとなった。

(2) [^{18}F]FET と無細胞タンパク質合成試薬による ^{18}F 標識タンパク質の合成

CFPRS により、 ^{18}F -AS69 と ^{18}F -AS-69-ApoE の合成に精製時間も含めて 60 分以内で成功した。ゲルオートラジオグラフィーの結果より、放射化学純度は 95% 以上であった。目的タンパク質には理論的に一つの [^{18}F]FET しか含まれないことから、目的タンパク質は [^{18}F]FET と同じ比放射能になり、[^{18}F]FET より算出した今回得られた標識タンパク質の比放射能は 498 GBq/ μmol であった。今後、 ^{18}F 標識タンパク質の比放射能の直接計測する方法を検討する。放射化学収率は、 ^{18}F -AS69 と ^{18}F -AS-69-ApoE でかなり異なり、それぞれ 17% と 3% であった。すなわち、 ^{18}F 標識タンパク質の収率は目的タンパク質のアミノ酸配列に依存することが明らかとなった。AS69 と AS69-ApoE はリンカー+ApoE の配列のみの違いにもかかわらず、収率が 5 倍以上低かった。

(3) ^{18}F 標識タンパク質の体内動態評価

^{18}F -AS69 と ^{18}F -AS69-ApoE の体内動態評価の結果、投与後 30 分後で ^{18}F -AS69-ApoE は ^{18}F -AS69 と比較して高い脳への取り込み (2.4%ID/g) を示した (図 1A)。また、 ^{18}F -AS69-ApoE の脳の放射能は投与 120 分後において投与 60 分後と比較して有意に減少した。一方で、 ^{18}F -AS69 単体では投与 120 分後と 60 分後で違いを認めなかった。また小動物 PET イメージングの結果、投与 30 分後の画像において ^{18}F -AS69 と ^{18}F -AS69-ApoE で違いを認め、これは Ex vivo 体内分布の結果と一致していた (図 1C)。[^{18}F]FET はグリオーマを画像化するための PET 薬剤として利用されており、アミノ酸トランスポーターを介して脳内に移行する。したがって、 ^{18}F 標識タンパク質が体内で分解され、結果として生じた [^{18}F]FET が脳内に移行した可能性がある。その可能性を否定するために代謝物解析をゲルオートラジオグラフィーにより実施した。その結果、血漿中で認めた放射能は ^{18}F 標識タンパク質由来であることが確認できた。したがって、投与した ^{18}F 標識タンパク質が体内で [^{18}F]FET に分解されることによって脳移行性が認められたわけではない。以上のことから、ApoE ペプチドを付加した AS69 は脳移行性が改善され、また脳移行性だけでなくクリアランスも向上させる可能性を示唆した。AS69 は α シヌクレイン凝集体への結合を認めなかったため、モデルでの評価は実施しなかったが、今後は標的分子への結合親和性が高いタンパク質リガンドを用いて脳内に存在する標的分子の PET イメージングを検証する。

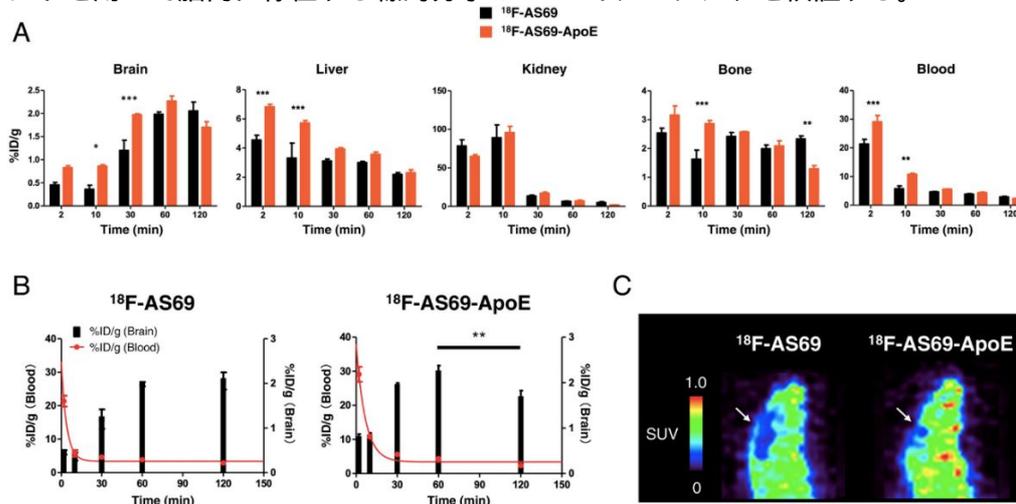


図 1 正常マウスにおける ^{18}F -AS69 と ^{18}F -AS69-ApoE の体内動態評価と小動物 PET 画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morito Takahiro, Harada Ryuichi, Iwata Ren, Du Yiqing, Okamura Nobuyuki, Kudo Yukitsuka, Yanai Kazuhiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Synthesis and pharmacokinetic characterisation of a fluorine-18 labelled brain shuttle peptide fusion dimeric affibody	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-82037-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 盛戸貴裕、原田 龍一、岩田 練、岡村信行、谷内 一彦
2. 発表標題 生体脳の分子イメージングに向けた18F標識タンパク質の検討
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 盛戸貴裕、原田龍一、岩田練、古本祥三、岡村信行、工藤幸司、谷内一彦
2. 発表標題 18F標識タンパク質を用いた脳内PETイメージング手法の開発に向けて
3. 学会等名 放射性医薬品研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 盛戸貴裕、原田 龍一、岩田 練、堵 怡青、岡村 信行、工藤 幸司、谷内 一彦
2. 発表標題 18F標識タンパク質による脳内分子イメージング手法の開発
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 盛戸貴裕、原田 龍一、岩田 練、谷内 一彦
2. 発表標題 非天然アミノ酸の導入技術によるタンパク質RI標識法の開発
3. 学会等名 第71回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	原田 龍一 (Harada Ryuichi) (60735455)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------