

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791465

研究課題名(和文)新規タンパク質部位特異的18F標識法の開発と18F標識EGFの合成

研究課題名(英文)Development of a novel site-specific 18F protein labeling method and application for synthesis of 18F-EGF

研究代表者

長谷川 功紀(Hasegawa, Koki)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：50525798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：上皮成長因子(EGF)を分子プローブとして調製し、次に分子イメージング装置を立ち上げた。EGFはFmoc固相合成法により合成し、N末端にNODAGA(tBu)₃を導入した。保護ペプチド樹脂をTFA処理し最終脱保護を行い、HPLC精製し目的物を得た。次にジスルフィド結合を形成しフォールディングを行い、標識前駆体を得た。次に、分子イメージング研究のためにSPECT/CT装置の立ち上げを行った。DOTA-octreotateをプローブとして、標識核種は⁶⁷Gaを用いた。校正を行った後、H69腫瘍を植えたマウスを用いてSPECT撮像を行った。その結果、腫瘍組織のSPECTイメージングに成功した。

研究成果の概要(英文)：We prepared NODAGA-EGF as a molecular probe and set up the molecular imaging device in Kumamoto University. EGF, which consists of 53 amino acid residues, was synthesized by Fmoc solid-phase method. After elongation of peptide chain, NODAGA(tBu)₃ was introduced at N-terminus. Fully protected peptide resin was treated in TFA solution to cleave from resin and remove protection groups. After HPLC purification, disulfide bonds were formed to give the labeling precursor. Next, to perform molecular imaging study, SPECT/CT was set up. We established a method to form stable complex with Ga-67 via DOTA chelator. SPECT device was checked the accuracy of quantification and image resolution. SPECT imaging using ⁶⁷Ga-DOTA-octreotate was carried out on the mouse implanted with small cell lung tumor cell (H69). As the result, we could observe the accumulation of the Ga-67 in H69 tumor.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：EGF 上皮性腫瘍 SPECT ⁶⁷Ga 分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

多くの上皮性腫瘍では EGFR (上皮成長因子受容体) が過剰発現しており、また EGFR 発現腫瘍には抗 EGF 抗体医薬が適用できる。よって非侵襲的に全身の EGFR を画像化・定量することは診断・治療に重要である。しかし今行われている抗体医薬をそのままポジトロン標識した PET イメージングでは抗体の体内動態が緩慢なので患者の被曝量が大きくなる。よって抗体より低分子でクリアランスが早いと考えられる EGF に着目し、これを温和に PET プローブ化し、EGFR の分子イメージング研究をすることにした。

2. 研究の目的

(1) EGF の分子プローブ化と (2) EGFR を分子イメージングするため、分子イメージング装置の立ち上げ、(3) そして分子イメージング撮像と、その結果を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) EGF とその受容体の細胞外ドメインとの共結晶による X 線結晶解析の結果 [Hideo Ogiso, et al. *Cell*, 110, 775-787 (2002)] から、N 末端へ標識すれば結合活性への影響は少ないと考えられた。そこで EGF の N 末端特異的放射標識を検討した。EGF は 53 残基の小タンパク質なので Fmoc 固相合成法を適応して全長の合成を行い、温和に RI 標識できるキレータとして NODAGA を N 末端へ修飾することにした。

(2) 研究代表者は、本課題の途上、熊本大学へ異動した。そのため研究方法の大幅な変更を余儀なくされた。熊本大学では分子イメージング機器として PET 装置が無く、SPECT/CT 装置が設置されていたので、標識核種を SPECT 核種に変更した。また SPECT 装置での解像度、定量性を担保するため装置の立ち上げ、校正を行った。

(3) プローブへ SPECT 核種である ^{67}Ga の標識を行い、標的分子を発現する腫瘍を植えたマウスを用いて SPECT 撮像を行った。また撮像結果を評価するため、腫瘍組織を固定・パラフィン包埋し、標的分子を免疫染色してその発現部位を明らかにし、撮像結果と比較した。

4. 研究成果

(1) NODAGA-EGF の合成

53 残基の EGF の N 末端にキレータである NODAGA を導入した NODAGA-EGF の合成を行った。まずはモデルペプチドを用いて、N 末端選択的に脱アミノ化を経て、アルデヒド基に変換し、キレータ修飾する方法を検討したが、システイン側鎖のチオール基で副反応が起こり、これを避けることができなかった。そこで 53 残基全長を Fmoc 固相合成法により一気に合成することにした。ペプチド鎖伸長後、固相担体上で NODAGA (tBu)₃ を用いてキレータの導入を行った。合成後、保護ペプチド樹脂を TFA 処理し、担体からの切出しおよび最終脱保護を行った。その結果、目的物前駆体

を純度良く得ることができた。次に、ジスルフィド結合を形成する目的で、炭酸バッファーに溶解し、そこに 5mM になるように L-Cystein を加え反応を 1 時間行った。その後、5mM になるように L-Cystine を加えて、20 時間室温で反応を行った。反応後、ゲルカラムにより精製を行い、目的物を得ることに成功した。

(2) SPECT/CT 装置の校正

熊本大学へ異動後、分子イメージング装置として SPECT/CT を用いることとした。現在まで用いてきたキレータである DOTA、NOTAGA に錯形成可能な SPECT 核種として ^{67}Ga を標識核種として選択した。これまでに熊本大学では ^{67}Ga を SPECT 撮像で用いたことが無かったため、 ^{67}Ga を用いて装置の校正を行い、コリメータの違いによる空間分解能評価、放射能濃度と撮像画像から得たカウント値の関係による定量性の評価を行った。まずは、 $^{67}\text{GaCl}_3$ 溶液を空間分解能評価用ファントムに入れて撮像した結果、ピンホールコリメータを用いれば 0.5m 程度、マルチピンホールコリメータを用いれば 0.8mm 程度の空間分解能があることを確認した。(図 1)

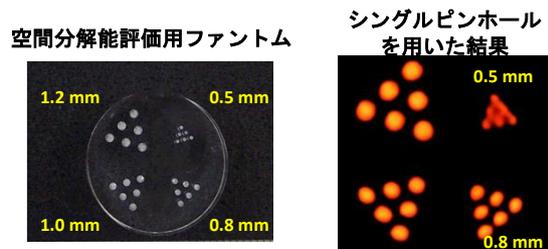


図 1. 空間分解能評価の結果

次に放射能濃度直線性評価ファントムを用い、放射能濃度とカウント値の関係を確認した。 $^{67}\text{GaCl}_3$ 溶液の濃度を倍々に希釈し、それらを区切られたファントムにそれぞれ入れたものを撮像した。得られた SPECT 画像から各濃度の画像範囲に関心領域を置いてカウント値を出した。結果、濃度とカウント値は良好な直線性を示した。(図 2、図 3) 以上の結果から、SPECT/CT 装置により解像度良く、高い定量性で分子イメージングできる事を確認できた。

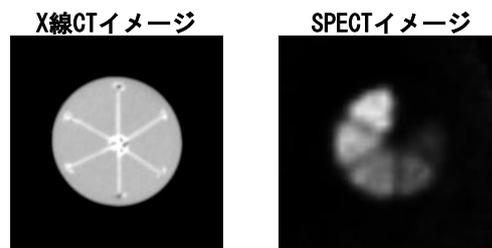


図 2. 放射能濃度直線性評価ファントム

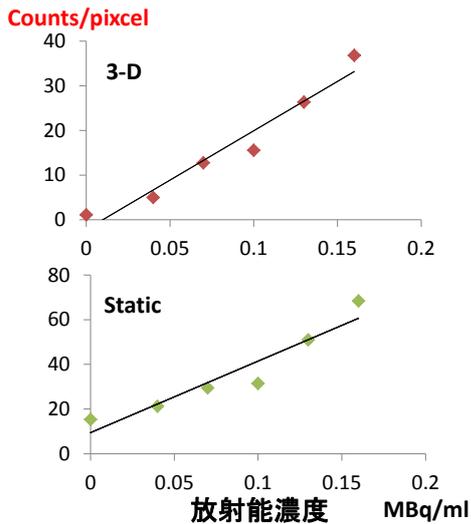


図 4. 放射能濃度とカウント値の関係

(3) 現在まで PET 撮像で用いた経験のあるソマトスタチン受容体リガンドの DOTA-octreotate を用いて $^{67}\text{GaCl}_3$ の標識条件を検討した。デリバリーで得た $^{67}\text{GaCl}_3$ と DOTA-octreotate を酢酸アンモニウム緩衝液中で 90°C 、20 分加熱し、 ^{67}Ga 標識を行った。その結果、10n モルの DOTA-octreotate に 40MBq を標識することに成功した。得られた ^{67}Ga -DOTA-octreotate を、ソマトスタチン受容体が発現している肺小細胞癌細胞を植えたマウスに 20MBq 投与し、SPECT 撮像を行った。撮像は投与 60 分後から開始し、60 分間撮像を行った。コリメータはピンホールコリメータを用いた。その結果、腫瘍にプローブが集積していることを確認できた。(図 5)



図 5. ^{67}Ga -DOTA-Octreotate を用いた SPECT/CT

腫瘍への集積は腫瘍塊の表層に高い集積を示し、中心部は集積が低い結果であった。そこで同様の大きさの腫瘍塊をホルマリン固定・パラフィン包埋し、組織切片を作成して、ソマトスタチン受容体 2a の抗体を用いて免疫染色した結果、表層部に標的分子の発現が高く、中心部は壊死組織であることを確認した。(図 6)

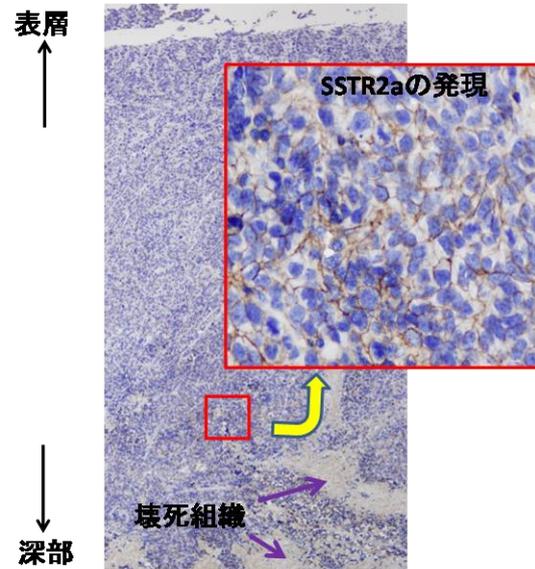


図 6. ソマトスタチン受容体 2a の免疫染色

この結果から、SPECT 撮像で腫瘍組織に発現する標的分子を解像度高く撮像することに成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Sako, T., Hasegawa, K., Nishimura, M., Kanayama, Y., Wada, Y., Hayashinaka, E., Cui, Y., Kataoka, Y., Senda, M., Watanabe, Y. Positron emission tomography study on pancreatic somatostatin receptors in normal and diabetic rats with ^{68}Ga -DOTA-octreotide: A potential PET tracer for beta cell mass measurement (2013) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **442** (1-2), pp. 79-84. 査読有
- ② Kawachi, E., Uehara, Y., Hasegawa, K., Yahiro, E., Ando, S., Wada, Y., Yano, T., Nishikawa, H., Shiomi, M., Miura, S., Watanabe, Y., Saku, K. Novel molecular imaging of atherosclerosis with Gallium-68-labeled Apolipoprotein A-I mimetic peptide and positron emission Tomography (2013) *Circulation Journal*, **77** (6),

pp. 1482-1489. 査読有

- ③ Nakamura, I., Hasegawa, K., Wada, Y., Hirase, T., Node, K., Watanabe, Y. Detection of early stage atherosclerotic plaques using PET and CT fusion imaging targeting P-selectin in low density lipoprotein receptor-deficient mice (2013) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **433** (1), pp. 47-51. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 長谷川功紀, 伊藤隆明 パラフィン包埋切片を用いた低分子リガンドによる受容体染色法の開発 日本組織細胞化学会総会 2013 年 9 月 28 日 東京・航空会館
- ② Koki Hasegawa, Hiroki Kameyama, Shinji Kudoh, Wael Hassan, Kanako Niimori-Kita, Takaaki Ito Mutant epidermal growth factor receptor reduces expression of Notch receptors and modifies lung epithelial differentiation 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry 26-29 August 2012 Kyoto, Japan
- ③ 長谷川功紀, 川内絵未、桑原廉、八尋英二、林中恵美、和田康弘、矢野恒夫、上原吉就、三浦伸一郎、朔啓二郎、渡辺恭良 [⁶⁸Ga]DOTA-FAMP の合成と動脈硬化性プラークの PET 研究 第 48 回ペプチド討論会 2011 年 9 月 27-29 日、札幌・札幌コンベンションセンター

[図書] (計 1 件)

- ① 生体高分子の PET イメージングとその応用 : 薬剤開発促進, 疾病の早期診断, 薬剤の効果判定法開発を目指して 長谷川 功紀 Isotope news (688) 2-7 2011 年 8 月

[その他]

ホームページ等

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dep/pathol/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 功紀 (Hasegawa Koki)

熊本大学大・生命科学研究部・助教

研究者番号 : 50525798