

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790527

研究課題名(和文)無細胞合成系によるフッ素18新規ポジトロン標識蛋白質の開発

研究課題名(英文)Synthesis of [18F]labelled proteins using cell-free system

研究代表者

渋谷 勝彦 (SHIBUYA, Katsuhiko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教育研究支援者

研究者番号：30596268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：まずinterleukin-8 (IL-8)に含まれるプロリンを非標識フルオロプロリンへと置換した[非標識F]IL-8の合成と評価を行った。その結果、純度の高い[非標識F]IL-8が十分量得られることが明らかとなった。またこの蛋白質のIL-8受容体への結合能は保たれていることを確認した。次に[18F]プロリンの合成に取り組み、問題なく合成できることを確認した。この[18F]プロリンを用いてIL-8の合成を行い、更に精製を行ったところ、放射化学純度が91%の[18F]IL-8が短時間で合成可能であることを明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：First, we synthesized [19F]-interleukin-8 (IL-8) which contained non-labelled fluoroproline instead of proline using the cell-free protein synthesis system. We confirmed that pure and abundant [19F]-IL-8 could be obtained. The binding affinity of [19F]IL-8 to IL8 receptors was retained. Next, we synthesized [18F]IL-8 using [18F]proline. After ion-exchanged chromatography, we could obtain [18F]IL-8 which had 91% of radiochemical purity in a short time.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：イメージング

1. 研究開始当初の背景

ポジトロン断層撮影法 (positron emission tomography, PET) は様々な放射性薬剤を用いて行う断層撮影技術である。近年、放射性薬剤として低分子化合物を標識した薬剤に加え、抗体やリガンドといった蛋白質を標識した薬剤が開発された。申請者等は従来技術の問題点である比放射能の低下や蛋白質の性質変化をもたらすことのない、新規の蛋白質ポジトロン標識法の確立を目的として研究を進めてきた。我々は再構成無細胞蛋白質合成法 (転写因子や翻訳因子などの蛋白質合成に必要な因子を全て別々に調整後、再構成した *in vitro* 蛋白合成システム) に着目し、研究を行っている。

2. 研究の目的

これまでに我々は¹¹Cメチオニンと無細胞蛋白質合成法を用いることで、従来の標識法の欠点を克服した蛋白質標識薬剤を簡便に合成可能であることを報告してきた。そこで本研究計画では、¹⁸Fプロリンと無細胞蛋白質合成法を組み合わせた高比放射能蛋白質合成法の確立を考えている。¹¹Cは半減期が 20 分程度であり、被曝量が低く抑えられる利点があるものの、長時間の薬物動態研究などには用いることができず、使用用途が限られてしまうことが欠点であった。一方、¹⁸Fは半減期が 110 分程度であり、長時間の撮影に適している。¹⁸Fプロリンとプロリンを置換した溶液を作製すれば、比放射能が高く、従来の性質を維持し、更に長時間の撮影も可能である理想的なポジトロン標識蛋白質化合物が合成できると考えられた。

3. 研究の方法

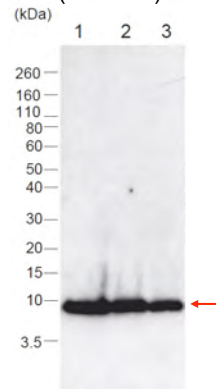
これまでに実績のある interleukin-8 (IL-8) を、無細胞蛋白質合成法を用いて、¹⁸FIL-8 を合成する。これにより¹⁸Fプロリンの合成や標識化合物の精製などのノウハウを得る。次に¹⁸F標識による IL-8 の性質への影響を IL-8 受容体への結合能を指標に検討する。そして¹⁸FIL-8 を実験用動物に注射し、動物用 PET-CT を用いて体内動態を解析する。

4. 研究成果

まず、プロリンを除いた 19 種類のアミノ酸を含んだ無細胞蛋白質合成系に、コールド体のフルオロプロリン (¹⁹Fプロリン) を加えて、37 度、2 時間反応させ、IL-8 が合成できるかどうか検討を行った。なおフルオロプロリンには、トランス体とシス体の二種類が存在するため、両者について検討した。その結果、シス体およびトランス体のフルオロプロリンのいずれもが IL-8 にとりこまれて問題なく合成できることを、ウェスタンブロット法を用いて確認した。また MALDI-TOF MS により分子量を測定したところ、フッ素 4 つ分の分子量 (IL-8 にはプロリンが 4 つ含まれている) が増加していることが確認でき、フル

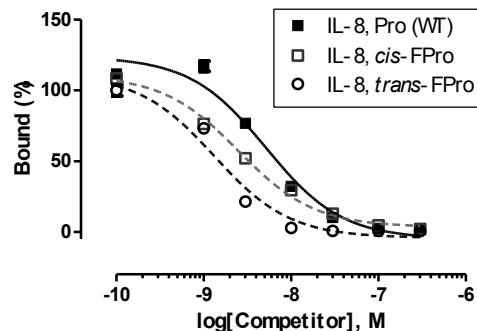
オロプロリンが導入された IL-8 が合成できていることも併せて確認をした。

Western blot (anti-IL-8)

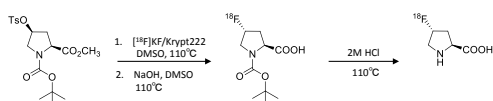


1: IL-8, Pro
2: IL-8, *cis*-FPro
3: IL-8, *trans*-FPro

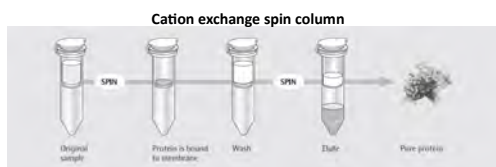
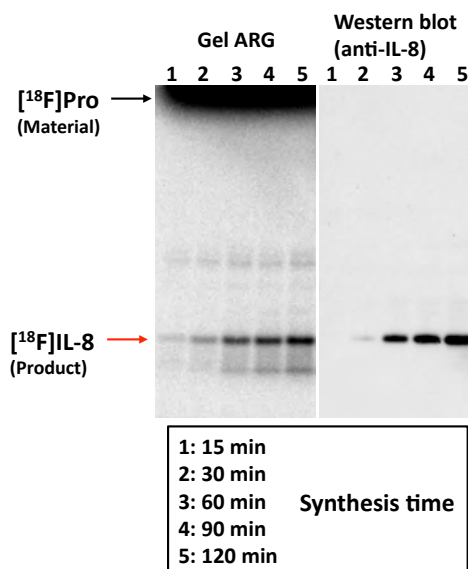
次に合成したフルオロプロリンを含む IL-8 の IL-8 受容体への結合性について、¹²⁵I で標識された IL-8 および IL-8 受容体を強制発現させた HEK293 細胞を用いた cell binding assay により評価を行った。その結果、従来の IL-8 の *K_i* 値が 5.9 nM であったが、シス体のフルオロプロリンを導入した IL-8 は 2.9 nM、トランス体のフルオロプロリンを導入した IL-8 は 1.4 nM と算出され、プロリンをフルオロプロリンへと置換したものの、IL-8 受容体への結合性については、全く低下していないことが明らかとなった。トランス体のフルオロプロリンを含む IL-8 が最も IL-8 受容体に対する結合性が高かったことから、標識アミノ酸はトランス体のフルオロプロリンを用いることとした。



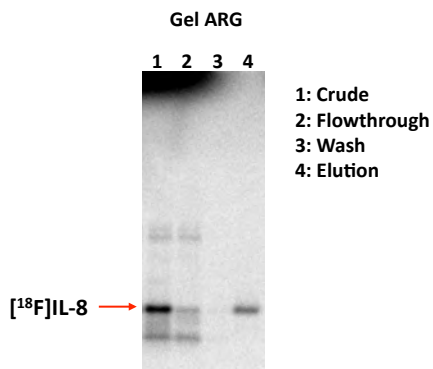
¹⁸Fプロリンの合成は下に示すスキームを用いて行い、放射化学収率は 30%程度であった。



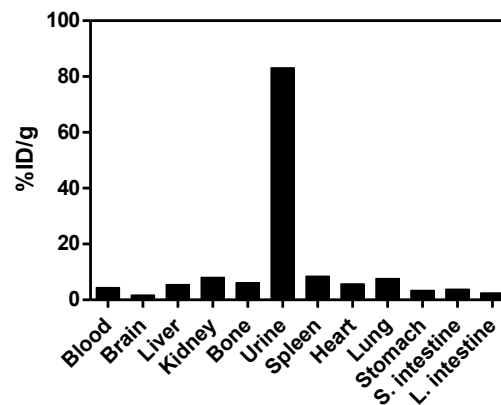
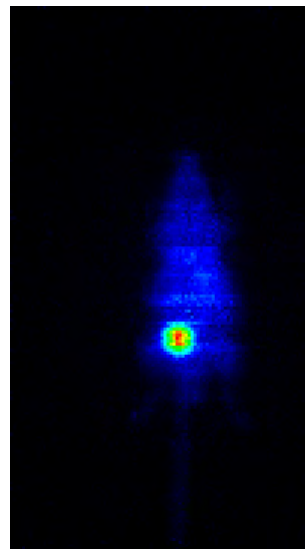
この ^{18}F プロリンを用いて、無細胞蛋白質合成系を用いて IL-8 の合成を試みた。30 分から 120 分まで時間を振って確認したところ、時間依存的に ^{18}F 標識 IL-8 が合成できていることが明らかとなった。更に陽イオン交換カラムを用いた精製を行い、30 分ほどの短時間で精製が可能であること、放射化学純度が 91%とイメージングを行うのに十分な純度の標識 IL-8 が得られることがわかった。



Wash buffer: 25 mM HEPES, 0.1 M NaCl, pH 7.6
Elution buffer: 25 mM HEPES, 0.5 M NaCl, pH 7.6



またこの ^{18}F IL-8 が IL-8 受容体に対して十分な結合性を示す事も確認した。得られた ^{18}F IL-8 をまず野生型マウスに投与してPETイメージングを行い、体内動態を観察した。その結果、尿路系以外の特定の臓器への集積は認められなかった。



現在、IL-8 受容体を安定発現させた CHO 細胞を nude マウスに移植し、このマウスを用いてイメージングを行う準備を行っている。

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 2 件)

① Mohsen A, Yoshikawa T, Miura Y, Nakamura T, Naganuma F, Shibuya K, Iida T, Harada R, Okamura N, Watanabe T, Yanai K. Mechanism of the histamine H3 receptor-mediated increase in exploratory locomotor activity and anxiety-like behaviours in mice. *Neuropharmacology* 81: 188-194, 2014 doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.02.003

② Shibuya K, Funaki Y, Hiraoka K, Yoshikawa T, Naganuma F, Miyake M, Watanuki S, Sato H, Tashiro M, Yanai K. [(11)C]Doxepin binding to histamine H1 receptors in living human brain: reproducibility during attentive waking and circadian rhythm. *Front Synt Neurosci*

〔学会発表〕(計 1 件)

①稲見暁恵、小倉毅、田代学、四月朔日聖一、マスト・メヘディ、渋谷勝彦、三宅正泰、平岡宏太良、伊藤正敏、山口慶一郎、谷内一彦、頸部痛および肩こり患者における用手療法施術後の脳および骨格筋糖代謝変化：[18F]FDG-PET 研究、第 52 回日本核医学会学術総会、2012 年 10 月 11 日、札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渋谷 勝彦 (SHIBUYA, Katsuhiko)
東北大学・大学院医学系研究科・教育研究
支援者
研究者番号：30596268

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：