

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791351

研究課題名(和文)新規アポトーシス検出用PETプローブの開発

研究課題名(英文)Development of a new PET probe for apoptosis

研究代表者

松本 恭子(Matsumoto, Yasuko)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究・客員研究員

研究者番号：10612187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではホスファチジルセリン(PS)結合蛋白質であるTim4タンパク質を元とした生体内でのアポトーシスの検出を目的とした陽電子放射断層撮像(PET)用プローブの開発を行った。マウスTim4の細胞外ドメインの一部とIgG-Fc領域の融合タンパク質を⁶⁴Cu標識化し、抗癌剤投与によって腫瘍にアポトーシスを誘導した担癌マウスに作成したプローブ(Tim4-184-Fc)を投与した。その結果、腫瘍への集積は対照群の2~4倍認められた。次に臨床応用を目的にマウスからヒトTim4に変換したが、PS結合能はマウスTim4を用いた場合より低下し、動物実験においても腫瘍への集積に対照群との差が認められなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a new PET probe which based on Tim4 protein for detecting apoptosis. To develop new PET probe for PS, we designated the fusion protein composed of extracellular region of mouse Tim4 and human IgG-Fc region, named Tim4-Fc. [⁶⁴Cu] Tim4-184-Fc was evaluated in mouse xenograft model bearing human epithelial carcinoma A431. PET experiments showed that its tumor accumulation was 4 times higher in MitomycinC (MMC) treated mice than in non-treated mice. Next, we tried to convert mouse Tim4 into human Tim4 for clinical use. However, PS binding ability of [⁶⁴Cu] hTim4-187-Fc has lower than [⁶⁴Cu]Tim4-184-Fc. In PET experiment, we could not observed difference of RI accumulation to tumor between MMC treated mice and control mice.

研究分野：生化学

キーワード：アポトーシス Tim4

1. 研究開始当初の背景

生体内におけるアポトーシスの可視化はがん治療の効果判定・予後診断、心疾患診断、不安定性動脈硬化プラークの同定、脳障害領域の同定など様々な領域で求められている。これまでに PET/SPECT 用の RI 標識プローブとして Annexin A5 や Synaptotagmin I が用いられているが、これらは肝臓または腎臓への集積が高く、それによる放射線障害が懸念されている。また、その多くは SPECT 用のプローブであり、定量性のある PET で使用できるプローブの開発が求められている。

Tim4 は、近年ホスファチジルセリン (PS) レセプターであることが確認された一回膜貫通型糖タンパク質で、貪食細胞の細胞膜上に発現しアポトーシス細胞の表在化した PS に結合する。Tim4 の PS への結合能は Annexin A5 (Kd=0.1-2 nM) とほぼ同等であり、Synaptotagmin I (Kd=115 nM) よりも高ことが報告されている (Freeman J. G. et. al., Immunol. Rev., 2010 vol. 235, p172)。そこで Tim4 タンパク質の細胞外ドメイン (IgV ドメインおよびムチン様ドメイン) と IgG-Fc 領域を結合させたアポトーシス検出用 PET プローブの開発を行った。

2. 研究の目的

- (1) マウス Tim4 と IgG-Fc 領域を結合させた Tim4-Fc へ ⁶⁴Cu 標識した PET プローブの作成
- (2) アポトーシスを誘導した担癌マウスにおける [⁶⁴Cu]Tim4-Fc を用いた抗腫瘍薬剤の効果判定
- (3) ヒト Tim4-Fc の作成および改変

3. 研究の方法

(1) マウス Tim4-Fc の改変

Tim4 タンパク質の細胞外ドメインと IgG-Fc 領域を結合させた Tim4-Fc からムチン様ドメインを一部削除した Tim4-230-Fc および Tim4-187-Fc を作成した。

(2) ⁶⁴Cu 標識

プローブタンパク質にキレーター (p-SCN-Bn-NOTA) を付加し、⁶⁴Cu と反応させて標識を行った。

(3) 動物モデル

ヒト上皮様細胞癌由来 A431 細胞 1 × 10⁶ 個をヌードマウス皮下に担癌し、PET プローブ投与の 1 日、3 日、5 日前の計 3 回マイトマイシン C (MMC) の投与 (5 mg / kg) を行い、腫瘍にアポトーシスを誘導した。対照群には生理食塩水投与個体を使用した。

(4) PET

⁶⁴Cu 標識したプローブタンパク質をマウスに尾静注し、投与の 24 時間後および 48 時間後に 60 分間の PET 撮像を行った。撮像終了後

にマウスを解剖し、腫瘍臓器における放射能の集積をカウンターで測定し、% injected dose per gram (%ID/g) を算出した。

(5) ヒト Tim4-Fc の作成

ヒトへの投与を行うために、マウス Tim4 タンパク質をヒト Tim4 タンパク質に変えたプローブを作成した。

4. 研究成果

Tim4 タンパク質の細胞外ドメインと IgG-Fc 領域を結合させた Tim4-Fc を ⁶⁴Cu 標識化し、比放射能が 597 MBq/nmol、PS 結合能 (Kd) が 8.9 nM のプローブ、[⁶⁴Cu]Tim4-Fc を作成した。ところが、アポトーシス誘導した担癌マウスにおいて目的部位への集積が確認できなかった。そこで、PS 結合に関係しないムチン様ドメインの C 末端側の 1/3、または 2/3 を削除した Tim4-230-Fc および Tim4-184-Fc を作成した。⁶⁴Cu 標識化後の比放射能はそれぞれ 623 MBq/nmol、783 MBq/nmol であり、Kd 値はそれぞれ 5.2 nM、2.4 nM であった。これらのプローブを用いて、PET 実験を行ったところ、MMC によってアポトーシスを誘導した担癌マウスでは、腫瘍への集積が観察された (図 1A)。

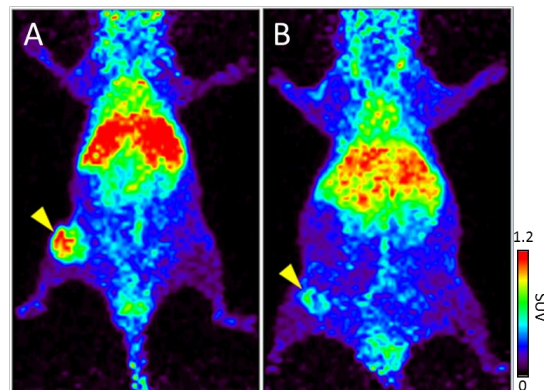


図 1 Tim4-184-Fc 投与後 48 時間の PET 画像 (MIP)

A: MMC 投与マウス、B: 生理食塩水投与マウス
矢尻は腫瘍部位を示す。SUV: Standard uptake value

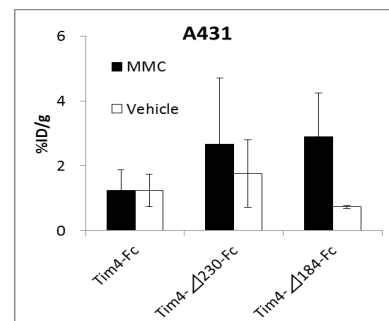


図 2 投与後 48 時間の腫瘍への各種プローブの集積

一方、MMC による誘導を行わなかった群にお

いては腫瘍への顕著な集積は認められなかった(図 1B)。さらに解剖後の摘出腫瘍中の放射線量を測定した結果、Tim4-184-Fc で MMC 群において放射線の集積が顕著に認められた。このことから、Tim4 配列中のムチン様ドメインの長さは *in vitro* におけるホスファチジルセリン(PS)への結合に影響しないが、PET プローブとして *in vivo* で利用する場合には Tim4-Fc の体内動態に影響を及ぼすことが示唆された。その原因としては各タンパク質の分子量が関係している可能性が考えられる。

次に、臨床応用を目的として、マウス Tim4 配列をヒト Tim4 配列に置換した融合タンパク質、hTim4-Fc の作成を行った。マウス配列の場合と異なり、*in vitro* において PS へ結合することのできる hTim4-Fc はムチン様ドメインの長さに顕著に影響を受けることが明らかとなった。ムチン様ドメインの N 末端側およそ 1/3 を残した融合タンパク質でのみ PS への結合能を有し、削除を行わない配列、N 末端側 1/3 を削除した配列、N 末端側を 2/3 残した配列では PS への結合能は失われた(表 1)。

表 1 作成タンパク質の PS 結合能(Kd)

| | A.A. | Kd (nM) |
|---------------------------|------|---------------|
| hTim4-Fc | 534 | - |
| hTim4-240-Fc | 464 | 7.1 ± 14.9 |
| hTim4-Δ131-187-Fc | 481 | - |
| hTim4-Δ131-240-Fc | 408 | 147.9 ± 85.8 |
| hTim4-Δ131-187Δ241-310-Fc | 411 | 131.6 ± 304.6 |
| hTim4-187-Fc | 411 | 62.8 ± 20.2 |
| hTim4-184-Fc | 408 | 100.1 ± 45.2 |
| hTim4-181-Fc | 405 | 47.5 ± 6.2 |
| hTim4-178-Fc | 402 | 67 ± 54.8 |
| hTim4-175-Fc | 399 | 76.2 ± 19.5 |
| hTim4-162-Fc | 386 | 193.9 ± 244.6 |
| hTim4-149-Fc | 373 | 232.6 ± 550.8 |
| hTim4-135-Fc | 359 | 26.7 ± 60.9 |
| hTim4-130-Fc | 354 | - |

A.A.: アミノ酸残基数、-: 検出不能、n = 3

さらに、⁶⁴Cu 標識を行うためのキレーター付加によって PS への結合能が失われることが明らかとなった。そのため、PS 結合部位である IgV 領域中のキレーター付加部位であるリジン (K) をアラニン(A) に置換したところ、PS への結合能が回復した。しかし、⁶⁴Cu 標識後の比活性と PS 結合能はマウス Tim4-184-Fc より低く、それぞれ 547 MBq/nmol、200 nM であった。また、⁶⁴Cu Tim4-187-Fc をアポトーシス誘導した担癌マウスに投与し 48 時間後に PET を実施

したところ抗癌剤投与 / 非投与群間の腫瘍への集積の差が小さく (SUV0.63 または 0.58)、さらに肝臓への非特異的集積が観察された。

肝臓への非特異的集積の軽減と目的部位への特異的集積の向上を目的に Tim4-187-Fc の低分子量化を試みたが各種タンパク質発現系では発現タンパク質量が極端に減少したため、天然型 Tim4 からの細胞外ドメインの分離を試みた。Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 等の薬剤は、細胞内プロテアーゼ (ADAM-10、ADAM-17) の発現を誘導し、Tim4 細胞外ドメインを放出させる (Schweigert O et al., BBA 1843, 2014 p275)。293F 細胞における ADAM-10/17 の mRNA 量は GAPDH 比でそれぞれ 0.64/0.86 で、PMA 処理後 2 日では 0.65/0.90 に、5 日後には 0.74/0.98 に増加した。Tim4 形質転換細胞の培養上清を回収しウェスタンブロットで調べたところ、PMA 処理した細胞上清からのみ Tim4-187-Fc (150 kDa) の約半分の 60 kDa のバンドが検出された。

ヒト Tim4 タンパク質はマウス Tim4 と比較してタンパク質の不安定化を生じやすい構造を持つと考えられる。ヒトへの臨床応用を行うにはさらなる改善を必要とする。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

松本恭子 他、⁶⁴Cu T-cell immunoglobulin mucin 4-Fc による細胞死の検出、第 7 回分子イメージング学術集会、2012 年 5 月 25 日、アクトシティ浜松 (浜松市)

Yasuko Matsumoto et. al., Imaging of Apoptosis using Cu-64 T-cell immunoglobulin mucin 4-Fc, The World Molecular Imaging Congress, September 19 2014, Coex Seoul, Korea

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 恭子 (MATSUMOTO, Yasuko) 国立研究
開発法人理化学研究所・ライフサイエンス
技術基盤研究センター・客員研究
員

研究者番号：10612187

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし