

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15314

研究課題名(和文) F-18標識アミノ酸と無細胞蛋白質合成による新規Affibody標識法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel labeling method for affibody by F-18 labeled amino acid and a cell-free protein synthesis system

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では直交系のアミノアシル合成酵素-tRNAペア、アンバーコドンに着目し、無細胞タンパク質合成試薬を用いたタンパク質のアミノ酸に依存しない新規ポジロン標識タンパク質合成の開発を検討した。18F-フルオロエチルチロシンと直交系のアミノアシル合成酵素-tRNAペア、アンバーコドンを用いること18F標識タンパク質の合成に成功した。HER2に対するaffibodyでHER2高発現のSKOV-3をヌードマウスに植えた担癌マウスにおけるPETイメージングを検討したところ、コントラストに優れた画像を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to develop a novel labeling method for affibody molecular that possess high binding affinity to targets and fast pharmacokinetics by F-18 labeled amino acid and a cell-free protein synthesis system. 18F-0-2-fluoroethyl tyrosine (FET) was successfully incorporated into proteins by using commercially available cell-free protein synthesis reagents with an engineered aminoacyl transferase/ tRNACUAopt pair and template DNA of the desired proteins inserted with an amber codon. 18F-labeled affibody for human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) demonstrated that high binding to SKOV-3 expressing HER2 with high level. In vivo PET imaging in SKOV-3 xenograft-bearing mice showed that high tracer accumulation in the SKOV-3 xenografts. In conclusion, this method might be useful for preparation of proteins with F-18 and molecular imaging in preclinical development.

研究分野：分子イメージング

キーワード：分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

C-11、F-18 などのポジトロン放出核種は医薬品などの低分子化合物の標識核種として利用され、ポジトロン断層撮影法 (PET) による病気の診断、薬物動態研究などの用途で用いられてきた。近年のバイオテクノロジー分野の発展に伴い、タンパク質などの高分子が注目されている。タンパク質などの高分子は低分子化合物では生み出すことが難しいユニークな結合機構を生み出すことが可能であるため、タンパク質リガンドの PET イメージングプローブへの応用が期待されている。通常の放射性標識タンパク質の合成法は、リンカー分子 (キレート剤) を用いて放射性金属元素を標識するが、非選択的標識が一般的であり、タンパク質の性質・機能に影響を与える場合が多い。また、標識タンパク質と非標識タンパク質の分離が不可能であり、原理的に比放射能が大きく低下する。申請者は、高比放射能アミノ酸と無細胞蛋白質合成試薬を用いて従来にない高比放射能タンパク質の合成法を開発してきた。この方法はタンパク質の合成で使用される 20 種類のアミノ酸のうち一つのアミノ酸を反応系から除き、その代わりに高比放射能ポジトロン標識アミノ酸を加え、反応させるというものであり、担体となる非標識アミノ酸が含まれないため高比放射能が実現できる (図 1 従来法)。しかし、この方法は、天然のアミノ酸を ^{18}F 標識天然アミノ酸に置換するため、導入効率および標識部位が導入タンパク質のアミノ酸配列に依存するという問題点があった。

そこで、本研究では非天然アミノ酸を 21 個目のアミノ酸に割り当てることができるアンバーコドンに着目し、天然のアミノ酸を認識せず、 ^{18}F -フルオロエチルチロシン (^{18}F -FET) を認識することができるアミノアシル合成酵素-tRNA ペアを用いて部位選択的な ^{18}F 標識タンパク質標識法の開発を試みた (図 1)。

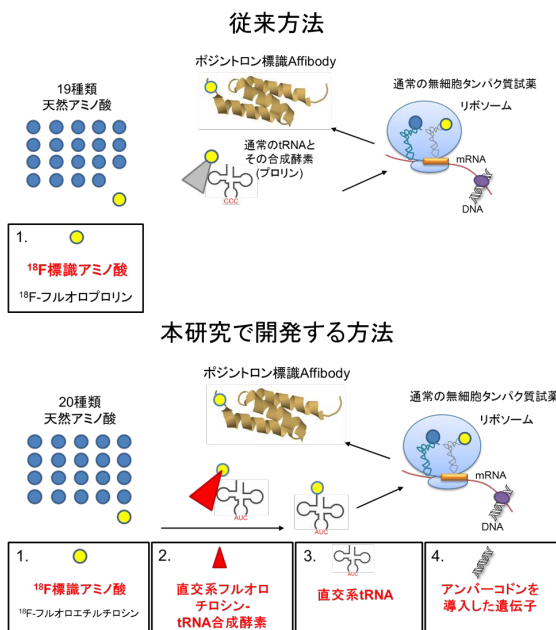


図 1 従来方法(A)と本研究で開発する方法の概略図

2. 研究の目的

本研究では、 ^{18}F 標識非天然アミノ酸である ^{18}F -FET、それを選択的に認識するアミノアシル tRNA 合成酵素-tRNA ペアとそれをアンバーコドンに割り当てた鋳型 DNA を追加した無細胞蛋白質合成試薬を用いて、タンパク質のアミノ酸配列に依存しない新規ポジトロン標識タンパク質合成法を開発し、Affibody 分子への展開を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ^{18}F -FET の μ スケール標識合成

^{18}F -FET の標識合成反応スキームを図 2 に示す。東北大学サイクロトロンラジオアイソトープセンターの岩田錬名誉教授が開発した μ スケール標識合成により ^{18}F -FET を合成した。20~30 μL の DMSO 溶液に Kryptofix 222/KF 複合体として ^{18}F を調製し、前駆体のフッ素化および脱保護反応を行った。反応後、PBS でクエンチし、C18 分析カラムで精製した。精製後、溶媒を乾固させ、無細胞反応用のバッファーに溶解した。

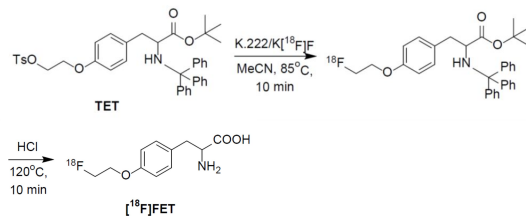


図 2 ^{18}F -FET の標識合成スキーム

(2) ^{18}F -FET と無細胞蛋白質合成試薬を用いた ^{18}F 標識タンパク質の合成の検討

^{18}F -FET と市販の無細胞蛋白質合成試薬、改変した直交系アミノアシル合成酵素/tRNA ペア、アンバーコドンを含む目的タンパク質の鋳型 DNA (IL-8, 抗 HER affibody) を加え、30 で 30~120 分間反応させた。反応後、電気泳動を行い、ゲルオートラジオグラフィーにより合成を確認した。 ^{18}F 標識抗 HER2 affibody の精製は、His スピнкаラムにより精製し、NAP-5 により PBS に置換することで製剤化した。

(3) ^{18}F 標識抗 HER2 affibody の結合実験

HER2 高発現細胞株 SKOV-3 を用いて ^{18}F 標識抗 HER2 affibody の結合実験を行った。リガンドを加えて 37 で 1 時間反応させた後、リガンドを除き、洗浄後、細胞を溶解させ、ガンマカウンターにより結合量を算出した。また、非特異的結合を評価するために非標識抗 HER2 affibody を加え、同様の実験を行った。

(4) 担癌マウスを用いた PET イメージング

SKOV-3 細胞株を脇の下に移植した担癌マ

ウスを用いて小動物 PET イメージングを行った。SKOV-3 細胞株をヌードマウスに移植して 3~4 週間腫瘍を成長させた後に、イメージングに使用した。¹⁸F 標識抗 HER2 affibody を尾静脈より投与して 120 分間、Clairvivo-PET により撮影した。動物実験は東北大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

4. 研究成果

(1) ¹⁸F-FET の μ スケール標識合成

全体の合成時間は 60 分で、放射化学純度 95%以上、放射化学収率 30-50%で得ることができた。また、合成時の比放射能(減衰補正後)は 566 ± 244 GBq/ μ mol であった。

(2) ¹⁸F-FET と無細胞蛋白質合成試薬を用いた ¹⁸F 標識タンパク質の合成の検討

予備検討において、FET は通常は無細胞蛋白質合成試薬においてはチロシンの代わりに導入されることはなかったことから、FET はチロシン転移酵素とクロス反応は起こらないことが示唆された。そこで、次に ¹⁸F-FET を用いて 21 番目のアミノ酸として導入することが可能かどうか検討を行った。合成検討の結果、¹⁸F-FET と合成に必要な試薬(直交系アミノアシル合成酵素、t-RNA、アンバーコードンを含む DNA)を添加した結果、すべての因子を加えて試料においてのみ ¹⁸F-FET が導入された IL-8 の合成が確認された(図 3)。¹⁸F 標識抗 HER2 affibody も同様に放射化学収率 6.5%(減衰補正なし)で合成・精製に成功した。PBS で脱塩した ¹⁸F 標識 HER2 affibody を以下の生物評価実験に用いた。

Time (min)	30	60	90	120				
pCNF RS	+	+	+	+	-	-	+	-
tRNA CUA _{opt}	+	+	+	+	-	+	-	-
pET-28a IL-8 TAG	+	+	+	+	-	+	+	+
pET-28a IL-8	-	-	-	-	+	-	-	-
¹⁸ F-FET	+	+	+	+	+	+	+	+

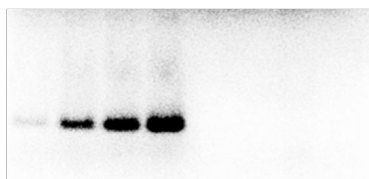


図 3 ゲルオートラジオグラフィー像
すべての因子を加えた試料のみで ¹⁸F-IL-8 のバンドが確認できる。

(3) ¹⁸F 標識抗 HER2 affibody の結合実験

培養細胞を用いた In vitro 結合試験の結果、¹⁸F 標識抗 HER2 affibody は HEK293 細胞と比較して、HER2 高発現細胞株 SKOV-3 に対して高い結合性を示した(図 4)。また、非標識抗 HER2 affibody を加えることでその結合が完全に置換されたことから、この結合は特異的結合であると考えられた。

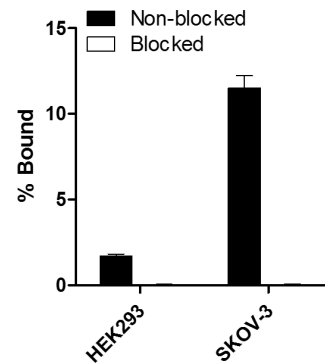


図 4 ¹⁸F 標識抗 HER2 affibody の In vitro 細胞結合実験

(4) 担癌マウスを用いた PET イメージング

小動物 PET イメージングの結果、¹⁸F 標識抗 HER2 affibody は SKOV-3 細胞株を移植した腫瘍に高集積を示した(図 5)。また、非標識抗 HER2 affibody を過剰量投与すると、その集積が有意に減少したことから、この集積は特異的結合によるものだと考えられた。肝臓への集積は低く、腎臓から膀胱へのクリアランスが確認された。また、脱フッ素による骨への集積などは認められなかった。以上のことから、¹⁸F-FET で標識した ¹⁸F 標識抗 HER2 affibody は HER2 を画像化する優れた PET トレーサーであることが示された。

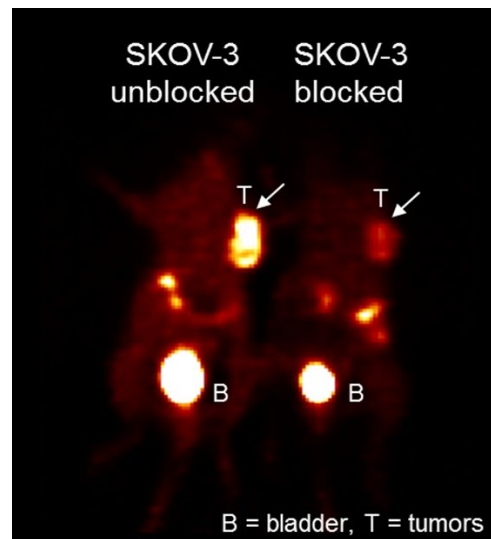


図 5 ¹⁸F 標識抗 HER2 affibody による HER2 の PET イメージング (左) ¹⁸F 標識抗 HER2 affibody のみ、(右) ¹⁸F 標識抗 HER2 affibody + 非標識抗 HER affibody 投与 T:腫瘍, B:膀胱

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)

- Iwata R, Pascali C, Terasaki K, Ishikawa Y, Furumoto S, Yanai K. Practical microscale

- one-pot radiosynthesis of ^{18}F -labeled probes. J Labelled Comp Radiopharm. 2018 Mar 8., doi: 10.1002/jlcr.3618. 印刷中, 査読有
2. Yanai A, Itoh M, Hirakawa H, Yanai K, Tashiro M, Harada R, Yoshikawa A, Yamamoto S, Ohuchi N, Ishida T. Newly-developed positron emission mammography (PEM) device for the detection of small breast cancer. Tohoku J. Exp. Med., 2018;245(1):13-19. doi: 10.1620/tjem.245.13. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 谷内亜衣、伊藤 正敏、矢野 文月、段 極東、相馬美代子、佐藤文彦、伊藤 繁記、佐藤弘樹、山本 誠一、谷内一彦、平川 久、大内憲明。乳腺専用 PET (PEM) による小型乳癌の検出能の検討。第 25 回日本乳癌学会学術総会 (福岡:平成 29 年 7 月 14 日)
2. 谷内亜衣、原田龍一、岩田錬、吉川雄朗、古本祥三、谷内一彦、石田孝宣、Affibody の新規 ^{18}F 標識法による HER2 発現乳癌の分子イメージング。第 26 回日本乳癌学会学術総会 (京都:平成 30 年 5 月 17 日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: ポジトロン放出核種標識タンパク質合成方法
発明者: 原田龍一、谷内一彦、岩田錬、古本祥三、谷内亜衣
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2017-219798
出願年月日: 2017 年 11 月 15 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)
なし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷内 一彦 (Kazuhiko Yanai)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 50192787

(2)研究分担者

吉川 雄朗 (Takeo Yoshikawa)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 70506633

原田 龍一 (Ryuichi Harada)

東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 60735455

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし