

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月16日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791387

研究課題名（和文）無細胞タンパク質合成系を利用した新規ポジトロン標識タンパク質作製法の確立と応用

研究課題名（英文）Novel synthetic approach for a positron emitter labeled protein by cell free protein synthesis system

研究代表者

古本 祥三（FURUMOTO SHOZO）

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00375198

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ポジトロン標識アミノ酸と無細胞タンパク質合成系を利用したポジトロン標識タンパク質の合成を検討した。 $^{11}\text{C}$ -Met を用いて  $^{11}\text{C}$ -GFP の合成を行ったところ、非常に高速でタンパク合成が進行した。一方、 $^{18}\text{F}$ -Pro の場合は合成速度が遅いことが判明した。 $^{11}\text{C}$ -Met を用いて EGFR 認識 scFv の合成にも成功し、EGFR 発現細胞への特異的結合とその担癌マウスでの腫瘍集積性が確認された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we evaluated a novel synthetic approach for a positron emitter labeled protein by cell-free protein synthesis (CFPS) system. Synthesis of  $^{11}\text{C}$ -GFP using  $^{11}\text{C}$ -Met and CFPS afforded the product within a short time. On the other hand, when using  $^{18}\text{F}$ -Pro, the  $^{18}\text{F}$ -labeled GFP was produced too slowly to use it practically. We succeeded to prepare  $^{11}\text{C}$ -labeled scFv antibody to EGFR, which showed specific binding to EGFR-positive tumor cells in vitro and specific uptake by the EGFR-positive tumor in vivo. These results suggest the usefulness of the  $^{11}\text{C}$ -labeled protein synthesis by CFPS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：放射性医薬品・造影剤

## 1. 研究開始当初の背景

ポジトロン断層撮影法 (PET) では、ポジトロン放出核種 ( $^{11}\text{C}$  や  $^{18}\text{F}$  など) で標識された分子プローブを使用して、生体内の生理機能や病態に関与する分子の状態 (分布, 活性) を非侵襲的に画像化できる。現在、PET で利用されている画像化プローブのほとんどは、糖やアミノ酸、レセプターリガンドなどの低分子化合物である。一方で、生体内で重要な生理活性機能を示すサイトカインや近年急速に開発が進んでいる抗体医薬品などの高分子

化合物 (タンパク質) については、PET 用画像化プローブへの展開がほとんど進んでいない。

従来からあるタンパク質のポジトロン標識技術は、金属元素やヨウ素をリンカー分子 (キレート剤) の介在や酸化剤の使用 (ヨウ素標識) によってタンパク質に結合させるが、それによってタンパク質の性質、機能、動態が大きく影響を受ける場合が多く、またヨウ素標識の場合は、生体内での代謝でヨウ素が遊離し、甲状腺に集積するなどの問題点もある。さらに従来の方法では標識タンパク質と

非標識タンパク質の分離が不可能で、原理的に比放射能が大きく低下する。

そこで我々は発想を大きく転換し、従来の「既存のタンパク質にポジトロン放出核種を結合させて標識する」という戦略ではなく、「ポジトロン標識アミノ酸を使用してポジトロン標識タンパク質そのものを合成する」という戦略を考えた。すなわち、従来法はタンパク質に対して有機化学的手法で放射性元素を結合させて標識プローブを作製するのに対し、新規手法は、放射性アミノ酸を原料の一部として使用して、生化学的手法で標識タンパク質(プローブ)そのものを作製するというものである。

我々はこの新規標識法の実効性を確認するために、探索的な実験として、簡便な実験操作で迅速にタンパク質を合成できる無細胞タンパク質合成 (cell-free protein synthesis: CFPS) 系と  $^{14}\text{C}$ -メチオニン(Met) を使用して、炎症に関与しているインターロイキン-8 (IL-8) の  $^{14}\text{C}$ -標識体の合成を試みた。その結果、短時間で標識合成、精製を行うことができ、動物に投与できる高純度・高比放射能の  $^{14}\text{C}$ -IL-8 を作製することに世界で初めて成功した。

## 2. 研究の目的

上述のように、我々は無細胞タンパク質合成系とポジトロン標識アミノ酸を利用すれば、半減期の短い炭素 11 ( $t_{1/2}=20$  分) でもポジトロン標識タンパク質を合成できることを世界で初めて実証し、ポジトロン標識タンパク質の全く新しい作製方法の可能性を示した。そこでこの新しい標識方法の実用性の検証として、本研究において無細胞タンパク質合成系を利用したポジトロン標識タンパク質の合成と PET プローブへの応用を目的とした研究課題に取り組むこととした。

## 3. 研究の方法

本研究では、CFPS 系として、大腸菌 S30 抽出液で構成される無細胞くん®キット(大陽日酸、東京)を利用した。同キットには、合成したいタンパク質の遺伝子を加えて  $37^{\circ}\text{C}$  でインキュベーションすれば合成が行われるように、タンパク質合成に必須の成分(酵素、アミノ酸、その他生化学因子)がすべて入っている(図 1)。非標識体の標品は、そのキットに目的タンパク質のプラスミドを添加して合成した。ポジトロン標識アミノ酸を用いてタンパク質を標識試合成する場合は、そのアミノ酸を除いた CFPS 系を利用した。

まず、 $^{14}\text{C}$ -Met を使用して GFP の合成を行い、 $^{14}\text{C}$ -GFP 収量の時間変化を調べた。GFP の濃度は、低濃度でも感度よく蛍光検出器で測定で

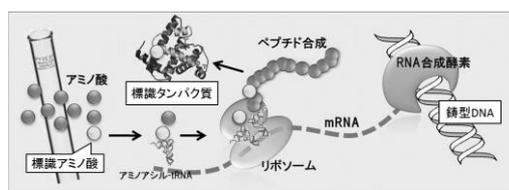


図 1

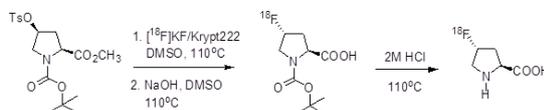


図 2

きるため、モデルタンパク質として選択した。 $^{14}\text{C}$ -Met は、臨床向けの製造法で合成し、生理食塩液のまま使用した。合成反応は、CFPS ( $116 \mu\text{L}$ )、鋳型遺伝子 ( $4 \mu\text{L}$ )、 $^{14}\text{C}$ -Met ( $80 \mu\text{L}$ ,  $850\sim 1330 \text{ MBq/mL}$ ) の各試薬の割合で行った。 $37^{\circ}\text{C}$  でインキュベーションし、経時的に反応液を採取して、冷却反応停止した。 $^{14}\text{C}$ -GFP の収量は、反応溶液サンプルを非還元系の SDS-PAGE によって分離し、そのゲルのオートラジオグラフィ (GEL-ARG、BAS5000 使用) により調べた。

同様に、 $^{18}\text{F}$ -Pro を使用して GFP の合成を検討した。 $^{18}\text{F}$ -Pro は、まずその標識前駆体を文献に従って合成し、図 2 に示す反応式に従って標識合成した。精製はセミ分取 HPLC でを行い、実験に使用した。

また、変異型 EGFRviii 認識一本鎖抗体 (scFv) の MR1-1 についても、 $^{14}\text{C}$ -GFP の合成法に準じて合成し、その収量の時間変化を調べた。さらに、そのエピトープを固定した樹脂を充填したカラムによって、標識合成した  $^{14}\text{C}$ -MR1-1 を単離精製した。

$^{14}\text{C}$ -MR1-1 の抗原への結合性を調べるために、EGFRviii 高発現細胞に対する結合試験を行った。12well プレートにラットのグリオーマである F98 および F98 に EGFRviii を恒常的に発現させた F98-EGFRviii を培養し、精製後の  $^{14}\text{C}$ -MR1-1 を添加して 30 分間インキュベートした。次いで PBS で洗浄した後、トリプシンで細胞をはがして放射能を測定した。また、非標識体の MR1-1 を用いた Blocking 試験も行った。非標識体の MR1-1 は EGFR に対しても高い結合性を持つので、 $^{14}\text{C}$ -MR1-1 の EGFR に対する結合性を評価する為に EGFR 高発現細胞である A431 を用いて、同様に細胞結合試験を行った。対照となる EGFR 陰性細胞には F98 を用いた。

$^{14}\text{C}$ -MR1-1 の動態評価は、A431 の皮下投与によって作製した担癌マウスに対して生食薬液を尾静脈内投与し、5 分後から 55 分間クレビボ-PET(島津、京都)にて撮像した。撮像終了後、被験マウスを解剖して、腫瘍組織及び重要臓器を摘出して、放射能分布を測定した。なお、動物を利用した実験については、

東北大学における動物実験等に関する規程に従い実験計画を申請し、倫理委員会での承認を得た上で実施した。

#### 4. 研究成果

$^{11}\text{C}$ -GFP の合成に関しては、反応開始後 2, 5, 10, 20, 30 分後に反応溶液をサンプリングし、GEL-ARG で生成物の変化を調べたところ、図 3 のようなオートラジオグラムが得られた。放射性のバンドは、主に原料の  $^{11}\text{C}$ -Met と  $^{11}\text{C}$ -GFP であり、分子量的に両者の間にある中間体はほとんど存在しないことが明らかになった。その ARG 画像を定量解析したところ、反応時間と放射化学的収率の関係は、図 4 のようになった。反応開始後 5 分で補正収率は 60% を超え、その後緩やかに値は上昇した。補正なしの値では反応開始後 5 分で最大の収率となった。炭素 11 は半減期が約 20 分と短い、反応時間は 5 分で十分な収率が得られていることから、 $^{11}\text{C}$ -Met によるタンパク質合成も一般の有機化学反応と同等の時間スケールでは、取り扱えることが明らかになり、本標識合成の実用性が認められる。

一方、 $^{18}\text{F}$ -Pro を用いた  $^{18}\text{F}$ -GFP の合成では、その収率の上昇は非常に遅く、60 分の反応でも十分な量の生成物が得られず、 $^{18}\text{F}$  の半減期の長さ(110 分)を考慮しても、実用性の観点

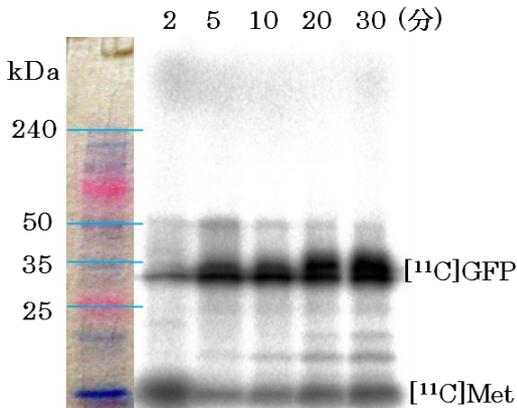


図 3

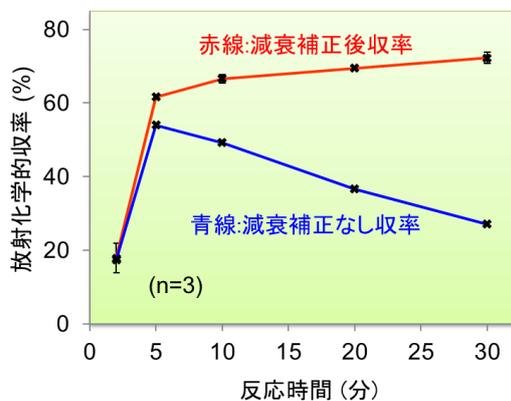


図 4

では不十分な結果であった。F-Pro は非天然アミノ酸であり、タンパク質合成のいずれかのステップで酵素への基質親和性が弱くなって合成速度の遅延につながった可能性がある。今後、CFPS に適したフッ素 18 標識アミノ酸の探索や開発が重要となる。

これらの結果を踏まえ、腫瘍の重要な治療標的である EGFR の画像化プローブ開発を目指して、EGFRviii 認識一本鎖抗体 (scFv) の MRI-1 について、 $^{11}\text{C}$ -Met と CFPS を利用して  $^{11}\text{C}$  標識体の合成を試みた。 $^{11}\text{C}$ -GFP の合成検討と同様に収率の時間変化を調べたところ、この場合も反応開始後 5 分で収率が約 36% に達した後、緩やかに増加する傾向が見られた (図 5)。この場合、 $^{11}\text{C}$ -GFP と比較して収率は低くなったが、目的物とは異なる未知の生成物ができたためであった (図 6)。

続いて、 $^{11}\text{C}$ -MRI-1 の精製について検討した。同抗体の場合はエピトープのペプチド配列が明らかになっているため、それを固相に固定したエピトープカラムによる精製法を利用した。精製操作時の各ステップの酸プロを GEL-ARG で分析したところ、非常に選択的に目的とする抗体だけを精製できることが確認できた (図 7)。図 7 のサンプルは、それぞれ Lane A: 反応液 (クルード), Lane B: 素通り画分, Lane C: 洗浄液 (1 回目), Lane D: 溶出液 (1 回目), Lane E: 溶出液 (2 回目) である。精製物の放射能強度プロファイルから、

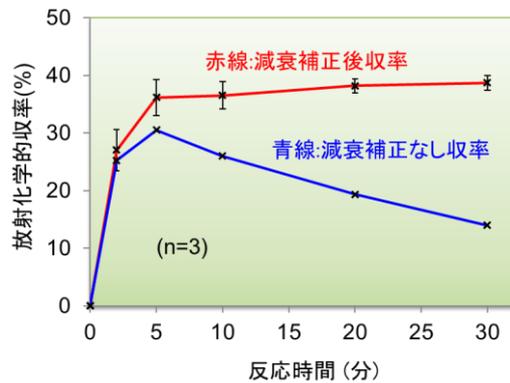


図 5

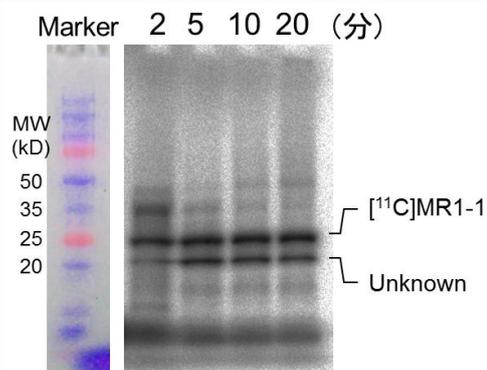


図 6

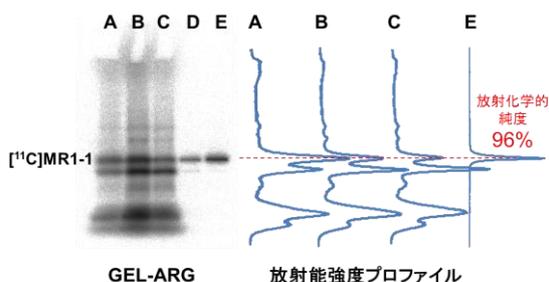


図 7

$^{11}\text{C}$ -MR1-1 の放射化学的純度は 96%以上であった。放射化学的収率は、 $9.8 \pm 2.2\%$  ( $n=4$ ) であった。精製後の収率が GEL-ARG で明らかになった収率よりも低い値になった原因としては、エピトープカラム素通り画分 (Lane B) の中に  $^{11}\text{C}$ -MR1-1 が検出されたことから、エピトープへの結合効率が低かったことが考えられる。また、エピトープ結合から溶離操作後にカラムへの放射能残留が確認されたことから、カラム固相への吸着が考えられる。今後、より効率的な精製法の検討が必要である。

$^{11}\text{C}$ -MR1-1 の EGFR への結合特異性については、その発現細胞株を用いた結合試験によって評価した。MR1-1 は、変異株 EGFRviii に強い結合親和性を示すことから、同遺伝子を導入した F98 グリー間細胞を使用して、F98 との結合性を比較した。その結果、 $^{11}\text{C}$ -MR1-1 は F98EGFRviii に対して EGFRviii 発現していない F98 に比べて 10 倍以上結合し、また Blocking によりその結合は顕著に減少することが示された。このことから、 $^{11}\text{C}$ -MR1-1 は EGFRviii に対して非常に強い特異的な結合性を有していることが示された。また、非標識体の MR1-1 は EGFR に対しても高い結合性を示すことから、EGFR 高発現細胞である A431 を用いて  $^{11}\text{C}$ -MR1-1 の EGFR に対する結合

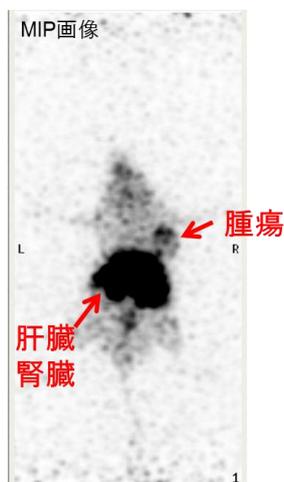


図 8

性を評価したところ、EGFR(-)の F98 と比較して有意に高い結合性を示した。

$^{11}\text{C}$ -MR1-1 は、A431 が発現する EGFR に結合性を示すことから、同細胞を移植して作製した腫瘍マウスを用いて小動物 PET による腫瘍イメージングを試みた。投与直後は腎臓に高い集積を示し、時間の経過と共に肝臓への集積が確認されたが、投与 60 分後には脇腹に形成した腫瘍塊を画像化することに成功した (図 8)。さらに、各臓器への集積を細かく検討する為、撮像後に各臓器を摘出して放射エネルギーを測定した結果、腎臓、肝臓、腫瘍の順で高い  $^{11}\text{C}$ -MR1-1 の集積が認められた。また、バックグラウンドとなる筋肉や血液への集積は比較的 low、PET プローブの集積性の指標となる腫瘍-筋肉比、腫瘍-血液比も筋肉比で 4 倍以上、血液比では 6 倍以上と良好な値を示した。

以上の結果から、 $^{11}\text{C}$ -Met と CFPS 系で  $^{11}\text{C}$ -標識タンパク質合成の有用性が示され、特に一本鎖抗体であれば、抗体としての高い特異的結合性を示すものが合成でき、イメージングプローブとしても利用できる可能性が示唆された。本方法は、原理的に天然型タンパク質と同一構造であり、そのタンパク質本来の性質を損なうことなく標識可能である。今後、タンパク質やペプチドに対する新たな放射性標識技術として利用される事が期待される。

## 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 3 件)

1. Matsuda T, Furumoto S, Higuchi K, Yokoyama J, Zhang MR, Yanai K, Iwata R, Kigawa T. Rapid biochemical synthesis of ( $^{11}\text{C}$ )-labeled single chain variable fragment antibody for immuno-PET by cell-free protein synthesis. *Bioorg Med Chem*. 2012 Nov 15;20(22):6579-6582. (査読あり)
2. Wong R, Iwata R, Saiki H, Furumoto S, Ishikawa Y, Ozeki E. Reactivity of electrochemically concentrated anhydrous [ $^{18}\text{F}$ ]fluoride for microfluidic radiosynthesis of  $^{18}\text{F}$ -labeled compounds. *Appl Radiat Isot*. 2012 Jan;70(1):193-199. (査読あり)
3. Harada R, Furumoto S, Yoshikawa T, Ishikawa Y, Shibuya K, Okamura N, Iwata R, Yanai K. Synthesis of [ $^{11}\text{C}$ ]interleukin 8 using a cell-free translation system and

L- $^{14}\text{C}$ methionine. Nucl Med Biol. 2012  
Jan;39(1):155-160. (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

1. 伊藤悠一、古本祥三、松田貴意、樋口佳恵、横山順、張明栄、谷内一彦、岩田錬、木川隆則、無細胞蛋白質合成系を用いた $^{14}\text{C}$ 標識一本鎖抗体の合成、第 52 回日本核医学会学術総会、2012 年 10 月 11 日、札幌。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古本 祥三 (FURUMOTO SHOZO)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00375198

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者