

令和元年9月2日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10267

研究課題名(和文) 11C-標識タンパク質の無細胞合成用高濃縮[11C]メチオニン自動合成装置の開発

研究課題名(英文) Development of a high-concentrated [11C]methionine automated synthesizer for cell-free synthesis of 11C-labeled proteins

研究代表者

石川 洋一 (ISHIKAWA, Yoichi)

東北大学・サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター・助手

研究者番号：60361200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：11C-標識タンパク質の無細胞合成を目的に、[11C]メチオニン(MET)を高濃縮で合成する自動装置を開発した。[11C]チルトリフレートの本装置内に導き、電子冷却された微少チューブ内で先ず捕集濃縮した後、これを極少量の気体(～50 μ L)として極少量の前駆体溶液(10 μ L)を保持した使い捨てフィルターに通して[11C]METを合成した。次に、市販のOasis MAXによる固相抽出により[11C]METを微小容量(～200 μ L)で回収することに成功した。捕集と回収条件を最適化し、11C-標識タンパク質の無細胞合成に利用可能な[11C]METを迅速かつ再現性良く高収率で得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創薬分野では、開発コストを下げるため培養細胞を用いない無細胞タンパク質合成法を応用した開発が盛んに行われている。この技術を応用した[11C]メチオニンからの11C-標識ペプチド・タンパク質合成法は新規性と応用性が高く、今後の展開が期待される。また本研究で開発された極少量スケールでの合成技術を応用することで、高品質の11C-標識プローブ合成の開発につながり、PET診断法の発展に大きく寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：A high-speed automated microreactor has been developed for [11C]methionine using [11C]methyl triflate. [11C]Methyl triflate was trapped in a small diameter tube thermoelectrically cooled. It was then released and flowed through a precursor solvent (10 μ L) retained on a disposable small filter. [11C]Methionine was recovered in a small volume of phosphate buffer (ca. 200 μ L) after purified with an Oasis MAX cartridge. Thus, it was demonstrated that the microreactor could efficiently and reproducibly provide [11C]methionine suitable for cell-free synthesis of 11C-labeled peptides and proteins.

研究分野：医歯薬学

キーワード：PET診断プローブ メチオニン ペプチドタンパク質標識 自動合成

1. 研究開始当初の背景

PET (陽電子断層撮影法) 診断に利用される陽電子放出プローブ開発の歴史を振り返れば、黎明期の 1970 年から 1990 年代にかけては、比較的低分子の生体関連物質 (糖類、アミノ酸、核酸塩基など) や薬物 (レセプターリガンドや酵素阻害剤など) を ^{11}C や ^{18}F で標識して診断プローブとしての有用性が評価されていた。その後ポストゲノム時代が幕を開け、この流れに沿ってペプチド・タンパク質製剤や抗体医薬品が創薬の主役の時代に突入し、PET プローブの標識対象もこれらの巨大分子へと急速に拡大してきた。その標識には、アミノ残基に標識された小さな基 (補欠分子族) を導入する古典的な Bolton-Hunter 法 (*N*-succinimidyl 4- ^{18}F fluorobenzoate を用いる標識法が有名) や最近では Click chemistry を応用した温和で迅速な標識法が用いられている。一方、主に $^{99\text{m}}\text{Tc}$ で培われた二官能性試薬を用いる標識法を応用し、比較的長半減期のポジトロン放出金属核種 (^{64}Cu や ^{68}Ga など) をキレート化して用いる開発研究もますます活発な状況である。これらは、できるだけペプチド・タンパク質の本来の機能を阻害しない部位に標識するものであるが、その化学構造に変更を加えることに変わりがない。

細胞やその中に含まれる遺伝子を人工的に操作する細胞工学や遺伝子工学等が急速に発展してきた。創薬分野では、培養細胞を用いて人工的に抗体を大量に産生する抗体医薬品開発が盛んであるが、一方ではコスト高の主因である培養細胞によらない合成技術が模索されてきた。無細胞タンパク質合成法とは、細胞からタンパク質合成に必要な DNA や RNA などの因子を抽出した液を用いて、アミノ酸を原料にしてタンパク質を作製する合成技術であり、これを応用すれば従来法のような標識による構造変化を伴わない。この点に着目し、PET 診断用に開発された ^{11}C や ^{18}F -標識アミノ酸から陽電子放出ペプチド・タンパク質の合成法を開発しているが、L- ^{11}C メチオニン (^{11}C MET) を出発原料とする標識合成は既に報告している。

^{11}C MET 合成法の歴史は古く、現在用いられている合成反応は 1976 年に初めて報告された方法と基本的には変わらない。 ^{11}C MET は、その有用性と合成の容易さから腫瘍イメージングプローブとして広く用いられ、合成操作は迅速さと簡便さを目的に改良されてきた。現在ではルーチン製造に簡便なオンカラム標識法が用いられることが多い。最近先進医療 B として認められた方法では、 ^{11}C よう化メチルからオンライン的に変換して得られる ^{11}C メチルトリフレートを標識試薬に使用してオンカラム標識し、反応後は使い捨てのイオン交換カラムを通すだけの精製で注射液として迅速に調製される。しかし、この合成法で得られる ^{11}C MET 注射液は、前駆体物質由来のホモシステインなどが夾雑物として存在し、液量も数 mL であるため、人へ投与される注射液としては適当でも、そのまま無細胞タンパク質合成に用いることはできない。できるだけ夾雑物を含まず、水溶液として最大でも液量を 100 μL 程度まで濃縮し、かつこれらの操作を自動化しなければ、無細胞合成による ^{11}C -標識ペプチド・タンパク質合成法の更なる発展が望めない。

2. 研究の目的

我々はこれまでオンカラム標識による ^{11}C MET 注射液の調製法をより信頼性の高いものに改良する目的で、pH 調整だけの固相抽出精製に代わる新しい精製法を提案した。反応液中の ^{11}C MET を先ず陽イオンカラムに捕捉し添加物などを除去して生食液で溶出するこの精製法では、前駆体由来のホモシステインの大部分を除去でき、このことは、HPLC を用いなくとも固相抽出だけで ^{11}C MET を十分高い純度で精製できることを示唆するものである。

反応スケール (前駆体使用量) を大幅に低減する方法として、 ^{11}C メチルトリフレートを冷却捕集し濃縮する冷却捕集装置を用いて ^{11}C MET のオンカラム標識に応用することで、小さな固相抽出カラムで ^{11}C MET の分離精製が実現できると考える。

本研究では、 ^{11}C MET を 200 μL 以下の水溶液として濃縮することを目的とする。この濃縮合成法を開発するとともに、無細胞タンパク質合成系に供する自動合成装置を試作する。無細胞合成によるペプチド・タンパク質標識は、その潜在的な有用性が認められている反面未だ先駆的な域を出ず、今後の進展が待たれる新しい標識合成法である。天然のアミノ酸の標識体である ^{11}C MET はその重要な出発物質であるが、そのための調製法の自動化は手つかずの状態であり、無細胞合成操作は完全な手作業である。本研究で開発する自動合成装置は、無細胞合成による ^{11}C -標識タンパク質を自動合成する重要な第一歩となる。その完成は、無細胞タンパク質合成系を利用する PET プローブ合成を世界的に推進する結果となることが期待される。

3. 研究の方法

本研究では、200 μL 以下の水溶液に無細胞タンパク質合成に使用できる ^{11}C MET を得るため、反応の前駆体量をできるだけ減らす一方、高い反応収率を維持するため予め濃縮した ^{11}C メチルトリフレートを低流速でカラムに通しオンカラム標識反応を行った。生成した ^{11}C MET をイオン交換カラムに捕捉して前駆体と不必要な添加物から分離し、次に揮発性の酸またはアルカリでカラムから溶出した。最終的に 200 μL 以下の共存物を含まない水に ^{11}C MET を効率よく回収した。次に、これらの操作を再現性良く自動的に実行する使い捨て部品で構成される

合成装置を試作した。

(1) $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ 合成と精製の検討

我々の施設では、ルーチンな $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ 注射液の調製法としてオンカラム標識法で合成し、蒸発乾固の後残渣を生食で溶解し滅菌濾過している。この注射液には原料由来のホモシステインが除去されずに残存している。無細胞合成に供するため、この残存物をできるだけ取り除き水溶液中に $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ を得て、これを濃縮する必要があった。そのための方策として以下の検討を行った。

前駆体物質の使用量を可能な限り減らし固相抽出カラムに対する負荷量を軽減した。

反応液の前駆体濃度を維持しつつその液量を減らすことで、減量した前駆体溶液でも $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ を高収率で合成するため、少量の液体でも効率的に捕捉できる $[^{11}\text{C}]\text{メチルトリフレート}$ を使用した。また、できるだけ流速を低くするため、反応カラムに導入前に $[^{11}\text{C}]\text{メチルトリフレート}$ 濃縮した。

反応カラムで生成した $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ は水で容易に溶出されるが、 $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ だけを選択的に捕捉するイオン交換カラムを選び出し、捕捉、洗浄、溶出条件を求めた。

イオン交換カラムからの溶出液に添加する試薬には、溶出後簡単に処理できるものを選択し、その溶出液の組成と液量に関して検討した。

ロータリエバポレータを使用しないで揮発性添加物を除去し、最終的に 200 μL 以下の水に $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ を濃縮するため、できるだけ少ない液量で $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ をカラムから溶出し、気流による迅速な留去を実現するコンパクトなモジュールを設計した。

上記各項目を検討しつつ自動的合成装置を基本設計した。自動合成装置を構成するシリンジ、バルブ、チューブ等はできるだけ使い捨てのパーツを使用し、3 方活栓の組合せで構成された(図 1)。

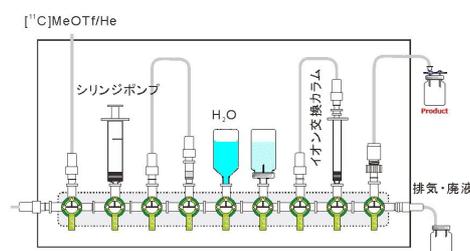


図 1 . 使い捨てパーツを使用する $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ オンカラム合成装置の構成

4 . 研究成果

(1) 前駆体物質の使用量を可能な限り減らし反応溶媒量を 10 μL 以下で $[^{11}\text{C}]\text{メチルトリフレート}$ の高い補足効率を維持するため、これまで使用してきた Sep-Pak tC18 カートリッジを止め、使い捨てのルーアー型シリンジ積層フィルタ(穴径 10 μm)を用いた。接触面積が大きく、前駆体溶液を保持しつつマイクロバブルサイズでガスが接触することで $[^{11}\text{C}]\text{メチルトリフレート}$ を効率的(約 95.4%)に捕捉でき、 $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ を高収率合成することに成功した。穴径 10 μm とすることで湿潤時でも低圧力損失で通気できた。また、冷却トラップを加熱してガス化した $[^{11}\text{C}]\text{メチルトリフレート}$ の溶出量は 34 μL と小さく、短時間での高回収率、かつ良好な再現性を認めた。

(2) $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ 合成装置の試作と評価

試作した $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ オンカラム合成装置の外観を図 2 に示す。この装置の使用により、最適化した条件下では、合成に使用する前駆体量を 0.01 mg (臨床利用での 1/50 ~ 1/200 程度) と大幅に低減することができた。

精製には酸性化合物の保持を目的とする逆相 - 陰イオン交換ミックスモード充填剤の Oasis MAX (10 mg) カラムに流速 1 mL/min で反応液を通し、ガスパージと蒸留水による洗浄の後 50 mM リン酸緩衝液 200 μL で $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ を溶出した。

$[^{11}\text{C}]\text{MET}$ 放射能量 1.4 ~ 2.1 GBq

$[^{11}\text{C}]\text{MET}$ 比放射能 77 GBq/ μmol

溶出溶媒の乾固濃縮を必要とせずに固相処理により迅速な分離精製を実現した。

以上の結果は、冷却捕集された極微量の濃縮 $[^{11}\text{C}]\text{メチルトリフレート}$ を用いる効率的な ^{11}C -メチル化反応の実用性を示すものであり、本システムを応用することで、種々の有用な ^{11}C -標識 PET プローブがより簡便に供給できることが期待される。



図 2 . $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ オンカラム合成装置

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 10 件)

- Yanai A, Harada R, Iwata R, Yoshikawa T, Ishikawa Y, Furumoto S, Ishida T, Yanai K., Site-Specific Labeling of F-18 Proteins Using a Supplemented Cell-Free Protein Synthesis System and O-2-[¹⁸F]Fluoroethyl-L-Tyrosine: [¹⁸F]FET-HER2 Affibody Molecule., *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging*, 査読有, DOI: 0.1007/s11307-018-1266-z
- Iwata R, Pascali C, Terasaki K, Ishikawa Y, Furumoto S, Yanai K., Practical microscale one-pot radiosynthesis of ¹⁸F-labeled probes., *Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals* 61(7) 540-549, 査読有, DOI: 10.1002/jlcr.3618
- Ishiki A, Harada R, Kai H, Sato N, Totsune T, Tomita N, Watanuki S, Hiraoka K, Ishikawa Y, Funaki Y, Iwata R, Furumoto S, Tashiro M, Sasano H, Kitamoto T, Kudo Y, Yanai K, Furukawa K, Okamura N, Arai H., Neuroimaging-pathological correlations of [¹⁸F]THK5351 PET in progressive supranuclear palsy., *Acta neuropathologica communications* 6(1) 53, 査読有, DOI: 10.1186/s40478-018-0556-7
- Harada R., Okamura N., Furumoto S, Furukawa K., Ishiki A., Tomita N., Tago T., Hiraoka K., Watanuki S., Shidahara M., Miyake M., Ishikawa Y, Matsuda R., Inami A., Yoshikawa T., Funaki Y., Iwata R, Tashiro M., Yanai K., Arai H., Kudo Y., [¹⁸F]THK-5351: a novel PET radiotracer for imaging neurofibrillary pathology in Alzheimer disease. , *Nucl. Med. Mol. Imag.* 57 (2016) 208-214. DOI: 10.2967/jnumed.115.164848
- Harada R., Furumoto S, Yoshikawa T., Ishikawa Y, Shibuya K., Okamura N., Ishiwata K., Iwata R, Yanai K., Synthesis and characterization of ¹⁸F-interleukin-8 using a cell-free translation system and 4-¹⁸F-fluoro-L-proline., *J. Nucl. Med.* 査読有, *Mol. Imag.* 57 (2016) 634-639. DOI: 10.2967/jnumed.115.162602
- Tago T., Furumoto S, Okamura N., Harada R., Adachi Hajime., Ishikawa Y, Yanai K., Iwata R, Kudo Y., Structure-activity relationship of 2-arylquinolines as PET imaging tracers for tau pathology in Alzheimer's disease., *J. Nucl. Med.* 査読有, *Mol. Imag.* 57 (2016) 608-614. DOI: 10.2967/jnumed.115.166652
- Tominaga T., Ito H., Ishikawa Y, Iwata R, Ishikawa K., Furumoto S, Radiosynthesis and preliminary biological evaluation of a new ¹⁸F-labeled triethylene glycol derivative of triphenylphosphonium., *J. Label. Compd. Radiopharm.* 59 (2016) 117-123. DOI: 10.1002/jlcr.3379
- Sato K., Shidahara M., Watabe H., Watanuki S., Ishikawa Y, Arakawa Y., Nai Y.H., Furumoto S, Tashiro M., Shoji T., Performance evaluation of the small-animal PET scanner ClairvivoPET using NEMA NU 4-2008 Standards., *Phys. Med. Biol.* 61 (2016) 696-711. DOI: 10.1088/0031-9155/61/2/696
- Iwata R, Pascali C., Terasaki K., Ishikawa Y, Furumoto S, Yanai K., Minimization of the amount of Kryptofix 222-KHCO₃ for applications to microscale ¹⁸F-radiolabeling., *Appl. Radiat. Isot.* 125 (2017) 113-118. DOI: 10.1016/j.apradiso.2017.04.021
- Shidahara M., Thomas B.A., Okamura N., Ibaraki M., Matsubara K., Oyama S., Ishikawa Y, Watanuki S., Iwata R, Furumoto S, Tashiro M., Yanai K., Gonda K., Watabe H., A comparison of five partial volume correction methods for Tau and Amyloid PET imaging with [¹⁸F]THK5351 and [¹¹C]PiB., *Ann. Nucl. Med.* 31 (2017) 563-569. DOI: 10.1007/s12149-017-1185-0

[学会発表] (計 6 件)

- 原田龍一、谷内亜衣、岩田錬、吉川雄朗、石川洋一、古本祥三、谷内一彦、アンバーコードを用いた無細胞タンパク質合成法による新規 ¹⁸F 標識法タンパク質合成法、第 58 回日本核医学会学術総会、2018 年 11 月 15 日、沖縄コンベンションセンター
- 伊東由夏、富永隆裕、石川洋一、岩田錬、石渡喜一、古本祥三、¹⁸F - ホスホニウム型 MPI トレーサーの開発と ¹⁸F-Flurpiridaz との動態比較、第 58 回日本核医学会学術総会、2018 年 11 月 15 日、沖縄コンベンションセンター
- 富永隆裕、秋田諒、石川洋一、岩田錬、石渡喜一、古本祥三、心筋血流イメージング剤 ¹⁸F-TAP-31 の開発と ¹⁸F-Flurpiridaz との比較評価、第 13 回日本分子イメージング学会総会、2018 年 5 月 31 日、東京大学 伊藤国際学術研究センター
- 富永隆裕、秋田諒、石川洋一、岩田錬、石渡喜一、古本祥三、¹⁸F 標識ホスホニウム型

ロープの構造最適化と集積メカニズムの検証、第 57 回日本核医学会学術総会、2017 年 10 月 5 日、パシフィコ横浜

S. Furumoto, T. Tominaga, R. Akita, A. Kazama, Y. Ishikawa, R. Iwata, K. Ishiwata.; Novel ^{18}F -labeled triarylphosphonium derivatives for mitochondria imaging.; 30th Annual EANM Congress of the European Association of Nuclear Medicine 2017, 21 to 25 October 2017, Austria Center Vienna

Takahiro Tominaga, Ryo Akita, Yoichi Ishikawa, Ren Iwata, Kiichi Ishiwata, Shozo Furumoto.; Development of novel ^{18}F -labeled phosphonium derivatives for mitochondria imaging by positron emission tomography.; 22st International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences Dresden, Germany, May 14 19, 2017, International Congress Center

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕 出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

東北大学サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター核薬学研究部

<http://www.cyric.tohoku.ac.jp/kenkyu/yakugaku.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

古本 祥三 (FURUMOTO, Shozo)

東北大学・サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター・教授

研究者番号：00375198

(2) 研究分担者

岩田 錬 (IWATA, Ren)

東北大学・サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター・名誉教授

研究者番号：60143038

(3) 研究協力者

寺崎 一典 (TERASAKI, Kazunori)

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60285632