

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560410

研究課題名(和文)ワンポット/ワンフロー合成による⁶⁸Ga-DOTA標識の懸案解決と生体分子PET研究課題名(英文)Biomolecule PET based on one-pot/flow ⁶⁸Ga-DOTA labeling

研究代表者

田中 克典(Tanaka, Katsunori)

国立研究開発法人理化学研究所・田中生体機能合成化学研究室・准主任研究員

研究者番号：00403098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：報告者は、アジド・歪んだアセチレン間のクリック反応と理研クリック反応を融合した2つの高効率なワンポット標識法を確立し、生体分子のPET標識における懸案を解決した。すなわち、⁶⁸Gaを代表とする放射線を含む配位子分子に対して、報告者が開発した理研クリック反応の分子プローブ、そして標的とするペプチドやタンパク質、あるいは抗体や生細胞を温和な条件下で単に順番に作用させることにより、これらの生体分子を簡便に放射線で標識することが可能となった。さらに、この方法を用いて実際にPETイメージングに成功するとともに、MRイメージングの標識基や蛍光基にも展開し、診断や治療に適応できる一般的技術として確立した。

研究成果の概要(英文)：Convenient and general method for labeling of lysines of biomolecules was established. Azide-containing labels were initially conjugated with the unsaturated ester aldehyde containing the strained acetylenes, by the strain-promoted click reaction. The resulting probes were then treated with the peptides, proteins, antibodies, and even live cell surface in one-pot process, efficiently labeling these biomolecules by azaelectrocyclization (now called as RIKEN click reaction) under the mild conditions. The efficient one-pot procedure enabled the introduction of various labels, e.g., positron emitters, paramagnetic metals, and fluorescences, very rapidly onto the various biomolecules including the sensitive and precious materials which are available with only limited amount. Applicability of biologically important molecules towards diagnosis and therapy will be expanded significantly.

研究分野：有機合成化学、ケミカルバイオロジー

 キーワード：⁶⁸Ga-DOTA アザ電子環状反応 理研クリック反応 アルデヒド アミノ基 ポジトロン ペプチド PE
T

1. 研究開始当初の背景

ポジトロン放出断層撮影 (PET) は、生きている動物内の分子 (トレーサー) を高感度で非侵襲的に可視化できる分子イメージング法であり、短寿命放射線であるポジトロン放出核種で標識して実施されている。¹⁸F-FDG が癌診断に用いられている他に、最近では、タンパク質や抗体、あるいは生細胞をトレーサーとした PET が世界中で検討されており、特定の臓器や癌、炎症を生体内で効率的かつ選択的に可視化できる高分子や免疫担当細胞の探索が活発に行われている。再生医療分野では、iPS などの移植効率を早期に評価できる PET 実験系の確立を目指して、多くの研究者が競っている。現在、これら生体分子や細胞の PET ポジトロン放出核種として、⁶⁸Ga 金属に大きな注目が集まっている。⁶⁸Ga は ¹⁸F や ¹¹C の調製とは異なり、サイクロトロンを用いずに簡単にジェネレーターから得ることができ、さらに半減期が 68 分と比較的短いため、PET 実験の後、被験者を放射線にさらすことが少ないためである。実際に欧米では、⁶⁸Ga で標識したソマトスタチンが膵癌や髄膜炎などの PET 診断に用いられている。

報告者らは本研究開始以前に、金属配位子である DOTA を持つ不飽和共役アルデヒドプローブ **1** を開発していた (高速アザ電子環状反応: 現在では理研クリック反応と名付け、以降はこのように呼ぶ、図 1)。リジンに対して高速アザ電子環状反応を経て DOTA 標識を行った後、⁶⁸Ga を導入して PET が実現出来る。例えばこの手法を基に、タンパク質の N-型糖鎖付加による劇的な動態変化や臓器集積を初めて PET で可視化することに成功していた。

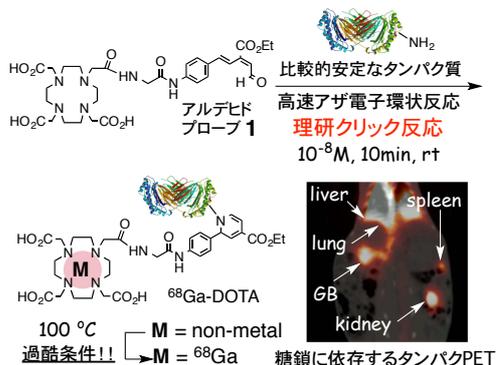


図 1 理研クリック反応による ⁶⁸Ga-DOTA 標識と PET イメージング

しかし、生体分子に導入した DOTA 配位子へ効率良く ⁶⁸Ga を導入するためには、100 °C の高温が必要であり、不安定なタンパク質や微量サンプルには適応できなかった (図 2)。

また、あらかじめ活性反応基を持つ DOTA 誘導体に ⁶⁸Ga³⁺ を導入する場合にも、過激な反応条件下でこれら誘導体が分解するために、適応することはできなかった。これらの問題は、⁶⁸Ga を用いた生体分子の PET 分野全般の懸案とされてきた。

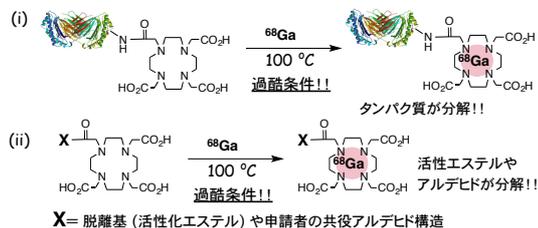


図 2 ⁶⁸Ga-DOTA 標識における従来の問題点

2. 研究の目的

本研究課題では、申請者の理研クリック反応を他のクリック型反応と併用などによりさらに進化させ、⁶⁸Ga-DOTA を用いる生体分子 PET の懸案を解決する革新的手法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

これまでの問題点を解決する 2 つのワンポット ⁶⁸Ga-DOTA 標識法を検討した。すなわち、あらかじめ調製した ⁶⁸Ga-DOTA 誘導体を用いて、(1) 2 回の理研クリック反応を繰り返すことにより、生体アミンに標識することを検討した。一方、(2) 歪み解消クリック反応によりまず不飽和アルデヒドに結合させ、続けて理研クリック反応を活用することにより生体アミンに標識することを検討した。さらに、(3) 両者の方法をマイクロチップ上でワンフロー合成を検討するとともに、(4) これらの効率的な標識法を様々な標識基に展開することを試みた。

4. 研究成果

生体分子の一般的な ⁶⁸Ga-DOTA 標識の実現を目的とする本研究において、独自の理研クリック反応を駆使した 2 つの方法論をまず評価した。

(1) 2 回の理研クリック反応を繰り返して標識する方法の検討

これまでに報告者が開発した、理研クリック反応の基質である共役エステルアルデヒドを 2 量化する。そして、アミノ基を持つ ⁶⁸Ga-DOTA とタンパク質や細胞表層のリジン残基を 2 回の段階的な理研クリック反応を繰り返すことによってワンポットで効率的に繋ぐことを検討した。ポジトロン放出金

属である $^{68}\text{Ga}^{3+}$ を使用する前に、まずはコールドの Ga^{3+} を用いて検討した。アミノ官能基を持つ安定な DOTA 分子に対して、予め Ga^{3+} を 100 度、30 分の反応時間で導入した (ステップ 1)。次いで、得られた Ga-DOTA アミンの溶液をそのまま用い、これに対してアルデヒドを 2 量化したプローブ 2 を作用させ、1 つ目の高速アザ電子環状反応を数分以内で実施した (ステップ 2)。この際に、濃度を厳密に制御することで、1 分子のアミンと選択的に反応させることを検討した。高濃度の Ga^{3+} を用いて実験を行った際には、濃度を厳密に調節でき、2 量体の生成を防ぐことができたが、低濃度の Ga^{3+} を用いた場合には、濃度による反応性の調節ができず、目的とする化合物を効率的に得ることはできなかった。

高濃度で調製した Ga-DOTA アミン溶液に対して、さらに続けてモデルペプチドを室温、短時間作用させたところ、2 つ目の高速アザ電子環状反応が進行し (ステップ 3)、高速な Ga-DOTA 標識を実施することができた。

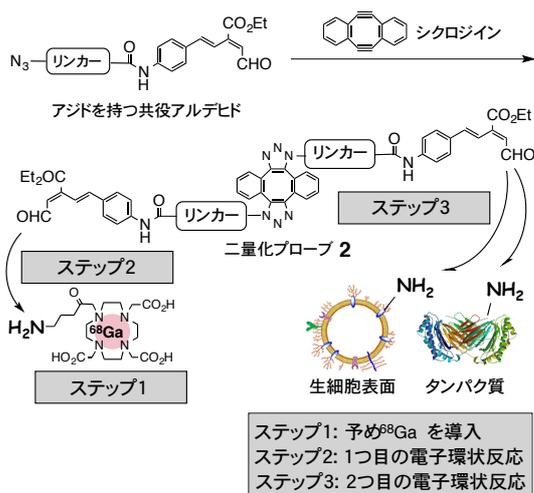


図 3 2 回の理研クリック反応を繰り返す標識法

しかし、実際にポジトロン放出金属である $^{68}\text{Ga}^{3+}$ を使用する際には、極低濃度の溶液を使用しなければならなかった。そこで、2 つ目の方法を検討することとした。

(2) 歪み解消クリック反応と理研クリック反応を融合させる標識法の検討

上記(1)で検討した理研クリック反応を繰り返す ^{68}Ga -DOTA ワンポット標識法は、実際のイメージング標識実験で用いる低濃度条件下での問題を残していたので、第 2 のワンポット法を検討した。本法では、理研クリック反応の基質であるアルデヒドプローブ 3 に対して、まず ^{68}Ga -DOTA を結合させる。続け

て、生体分子のリジン残基と反応させることにより、生体分子の効率的なワンポット ^{68}Ga -DOTA 標識を検討した。既上記(1)の結果により、報告者のアルデヒド分子は歪んだ活性化アセチレンとは反応しないことが分かっていた。そこで、8 員環アセチレン基を導入したアルデヒドプローブ 3 に対して、あらかじめ調製したコールドの Ga^{3+} を導入した DOTA アジド分子を歪み解消クリック反応により結合させた。この場合には、実際に PET 実験に使用する極微量の ^{68}Ga -DOTA の濃度でも十分対応可能であることが判明した。さらに、続けてワンポットでペプチドやタンパク質を作用させることにより、電子環状反応を効率的に進行させ、コールドの Ga-DOTA で標識することに成功した。

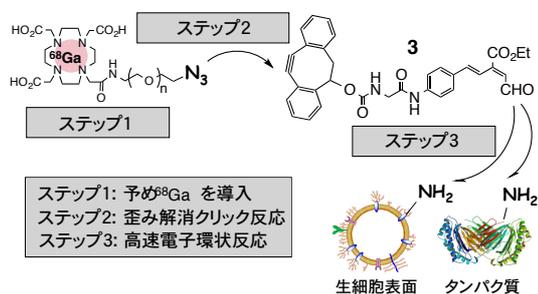


図 4 歪み解消クリック反応と理研クリック反応を融合させる標識法

これらのコールドの Ga^{3+} を用いた検討を基にして、さらにポジトロン放出核種である ^{68}Ga を用いて標識実験を実施した。種々検討の結果、まず、アジド基を有する DOTA 配位子に対して、 $^{68}\text{Ga}^{3+}$ を塩酸中、100 °C で 15 分間反応させることにより配位させた。HPLC により速やかに精製した後、さらに歪んだアセチレンを有する共役アルデヒドプローブへの結合 (75 °C、15 分、100%)、さらに続けてペプチドやタンパク質のアミノ基へほぼ定量的に標識することに成功した。

さらに本法の生体内イメージングへの応用として、RGD ペプチドに対して効率的に ^{68}Ga -DOTA 標識を施し、ヌードマウスを用いたがんの PET イメージングに成功した。

(3) マイクロチップを用いたワンフロー合成の検討

最後に、更なる効率性と利便性を追求して、放射線取扱いのための使い捨てチップ上でのワンフロー標識技術も併せて検討した。しかし、アジドと歪んだアセチレン間の歪み解消クリック反応が高温を必要とし、室温では長い反応時間を必要とすることから、エッペンドルフ内での実施が実用的な観点から適当であると判断した。

(4) 標識法の一般性

さらに報告者は、本法を ^{64}Cu -NOTA、あるいは MR イメージングの標識基である Gd-DOTA や蛍光基にも展開し、ペプチドや抗体、あるいはタンパク質、さらには生細胞への効率的な標識を実現した。このように、 ^{68}Ga -DOTA 標識基に関わらず、イメージングや治療にも適応できる様々な標識基を導入できる一般的技術として確立した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 21 件)

1. Katsunori Tanaka, A. Ogura, T. Tahara, S. Nozaki, H. Onoe, A. Kurbangalieva, Y. Watanabe, Glycan multivalency effects toward albumin enable N-glycan-dependent tumor targeting, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, 26, 2251-2254 (2016), DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.03.046
2. Katsunori Tanaka, A. Ogura, A. Kurbangalieva, Exploring The Glycan Interaction In Vivo: Future Prospects of Neo-glycoproteins for Diagnostics, *Glycobiology*, 査読有, in press, (2016), DOI:10.1016/j.bmcl.2016.03.046
3. Katsunori Tanaka, A. Ogura, T. Tahara, S. Nozaki, K. Morimoto, Y. Kizuka, S. Kitazume, M. Hara, S. Kojima, H. Onoe, A. Kurbangalieva, N. Taniguchi, Y. Watanabe, Visualizing Trimming Dependence of Biodistribution and Kinetics with Homo- and Heterogeneous N-Glycoclusters on Fluorescent Albumin, *Sci. Rep.*, 査読有, 6, 21797 (2016), DOI:10.1038/srep21797
4. Katsunori Tanaka, A. Ogura, Azaelectrocyclization on cell surface: convenient and general approach to chemical biology research, *Tetrahedron*, 査読有, 71, 4518-4521 (2015), DOI:10.1016/j.tet.2015.02.063
5. Katsunori Tanaka, A cascading reaction sequence involving ligand-directed azaelectrocyclization and autooxidation-induced fluorescence recovery enables visualization of target proteins on the surfaces of live cells, *M. Kitadani, A. Tsutsui, A. R. Pradipta, R. Imamaki, S. Kitazume, N. Taniguchi, K. Fukase, Org. Biomol. Chem.*, 査読有, 12, 1412-1418 (2014), DOI: 10.1039/C3OB42267D
6. K. Tanaka, Development of Bis-unsaturated Ester Aldehydes as Amino-glue Probes: Sequential Double Azaelectrocyclization as Promising Strategy for Bioconjugation, *Y. Nakamoto, E. R. O. Siwu, A. R. Pradipta, K. Morimoto, T. Fujiwara, S. Yoshida, T. Hosoya, Y. Tamura, G. Hirai, M. Sodeoka, K. Fukase, Org. Biomol. Chem.*, 査読有, 11, 7326-7333 (2013), DOI: 10.1039/C3OB41507D

[学会発表] (計 78 件)

1. 田中克典, 生体に学び生体を制御する有機合成化学～生体内合成化学治療～ (招待講演)、東京工業大学大学院理工学研究科 化学トピックス特別講義、2015.12.9、東京工業大学 (東京都目黒区)
2. Katsunori Tanaka, 6π -Azaelectrocyclization: From Enzyme Inhibition, Natural Products Synthesis to Glycochemical Biology, Asian Core Program (ACP) Lectureship in China (招待講演), 2015.9.23, Tsinghua University & Beijing Normal University(Beijing, China)
3. Katsunori Tanaka, 6π -Azaelectrocyclization: From Enzyme Inhibition, Natural Products Synthesis to Glycochemical Biology, Asian Core Program (ACP) Lectureship in China (招待講演), 2015.9.22, Peking University (Beijing, China)
4. 田中克典, グライコキャリアを活用した生体内合成化学治療、第 34 回日本糖質学会年会 (招待講演)、2015.8.2、東京大学安田講堂 (東京都文京区)
5. Katsunori Tanaka, One-pot fluorescence labeling of live cell surface by 6π -azaelectrocyclization (招待講演), 2015.7.3, Kazan Federal University(Kazan, Russia)
6. 田中克典, 動物内での触媒反応の実現による生体内合成化学治療 (招待講演)、大阪大学大学院薬学研究科講演会、2015.6.4、大阪大学 (大阪府吹田市)
7. 田中克典, 生体内合成化学治療 動物内での合成化学と医療展開を目指して (招待講演)、東京工業大学生命理工学部講演会、2015.6.3、東京工業大学 (東京都町田市)
8. 田中克典, 不均一な糖鎖クラスターによる腫瘍選択的なターゲティング、小椋章弘、浦野清香、田原強、野崎聡、渡辺恭良、日本化学会第 96 春季年会、2016.3.24-27、同志社大学 (京都府京田辺市)
9. 田中克典, 生体分子によるセラノスティクス標識プローブの開発、藤木勝将、日本化学会第 96 春季年会、2016.3.24-27、同志社大学 (京都府京田辺市)
10. Katsunori Tanaka, Akihiro Ogura, One-pot

- glycan conjugation to protein via azaelectrocyclization: Dynamics analysis of neoglycoproteins in live animal, Pacificchem 2015, 2015.12.18, Hilton Hawaiian Village(Hawaii, USA)
11. Katsunori Tanaka, Akihiro Ogura, General labeling method of cell surface via azaelectrocyclization, Pacificchem 2015, 2015.12.17, Hawaii Convention Center(Hawaii, USA)
 12. 田中克典、小椋章弘、田原強、野崎聡、尾上浩隆、渡辺恭良、分子イメージングを駆使した天然 N-結合型糖鎖が操る生体内動態の解析、第 57 回天然有機化合物討論会、2015.9.9-11、神奈川県民ホール (神奈川県横浜市)
 13. 田中克典、小椋章弘、田原強、野崎聡、尾上浩隆、木塚康彦、北爪しのぶ、谷口直之、渡辺恭良、タンパク質表面へのワンポット複合化による不均一糖鎖クラスターの合成と動物内での動態制御、第 34 回日本糖質学会年会、2015.7.31-2015.8.2、東京大学安田講堂(東京都文京区)
 14. 田中克典、Therapeutic in vivo synthesis by glyco carriers, 249th ACS National Meetings 受賞講演 (招待講演), 2015.3.22, Sheraton Denver Downtown Hotel(Denver, Colorado, USA)
 15. 田中克典、Therapeutic In Vivo Synthetic Chemistry: Synthesis of Bioactive Compounds in Live Animals, ICCEOCA-9/NICCEOCA (招待講演), 2014.12.2, Eastin Hotel Petaling Jaya(Kuala Lumpur, Malaysia)
 16. 田中克典、Therapeutic In Vivo Synthetic Chemistry by Glyco carriers, SFG-JSCR Joint Meeting 2014, Satellite 1: Chemical Aspects of Glycobiology (招待講演), 2014.11.16, Hilton Hawaiian Village Waikiki Beach Resort(Hawaii, USA)
 17. 田中克典、診断と治療を指向した糖鎖複合体のイメージング、新規医療イノベーションのためのシンポジウム (招待講演)、2014.11.11、大阪大学会館豊中キャンパス (大阪府豊中市)
 18. 田中克典、Therapeutic In Vivo Synthetic Chemistry: Synthesis of Bioactive Compounds in Live Animals, Swiss-Japanese Chemical Biology Symposium 2014 (招待講演), 2014.10.2, University of Bern(Bern, Switzerland)
 19. 田中克典、Therapeutic In Vivo Synthetic Chemistry: Total Synthesis of Bioactive Compounds in Live Animals, CCS-CSJ Forum 2014 (招待講演), 2014.8.5, Peking University(Beijing, P.R.China)
 20. 田中克典、生体内合成治療 ～生きている動物内での合成研究～、FIBER 未来大学 Lectures in NanoBioNow Series (招待講演)、2014.7.29、ポートアイランドキャンパス (兵庫県神戸市)
 21. Katsunori Tanaka, Akihiro Ogura, One-pot Glycan Conjugation to Protein via Azaelectrocyclization: Dynamics Analysis of Neoglycoproteins in Live Animal, 20th International Conference on Organic Synthesis, 2014.6.29-2014.7.4, (Budapest, Hungary)
 22. 田中克典、中本悠佳、向井英史、造田真希、渡辺恭良、深瀬浩一、歪み解消クリック反応とアザ電子環状反応を融合したアミノ基の効率的標識化法と PET イメージングへの適用、ケミカルバイオロジー学会第 9 年会、2014.6.11-13、大阪大学豊中キャンパス (大阪府豊中市)
 23. 田中克典、中本悠佳、向井英史、造田真希、渡辺恭良、深瀬浩一、歪み解消クリック反応とアザ電子環状反応を融合したアミノ基の効率的 68Ga-DOTA 標識、日本化学会第 94 春季年会、日本化学会、2014.3.27-30、名古屋大学東山キャンパス (愛知県名古屋市)
 24. 田中克典、生体内での反応解析から開拓、制御、さらにものづくりまで、第 3 回 CSJ 化学フェスタ 2013 ナノ機能への挑戦ー材料、素子、バイオ、そして未来ー (招待講演)、2013.10.21、タワーホール船堀 (東京都江戸川区)
 25. 田中克典、Exploring the Chemistry and Biology of Unsaturated Imines, Tsukuba Global Science Week 2013 Integration of Chemistry and Life Science Session (招待講演)、2013.10.02、つくば国際会議場(茨城県筑波市)
 26. 田中克典、革新的化学標識法による糖鎖の個体イメージング、自治医科大学 分子病態治療研究センターセミナー (招待講演)、2013.09.14、自治医科大学 (栃木県下野市)
 27. 田中克典、生体内での「隠された化学反応」の開拓と生体機能解明および動物内合成への挑戦、東京工業大学生命理工学研究科 生体分子機能工学専攻生体分子サイエンスセミナー (招待講演)、2013.08.29、東京工業大学 (神奈川県横浜市)
 28. 田中克典、「化合物」ではなく「合成化学反応」から生体機能化学を攻める、生体機能関連化学部会若手の会 第 25 回サマースクール (招待講演)、2013.07.26、八王子セミナーハウス (東京都八王子

- 市)
29. 田中克典、Aza-Electrocyclic Reaction for Visualizing Biomolecules in Live Animals, The First Asian Conference for "MONODUKURI" Strategy by Synthetic Organic Chemistry (ACMS) (招待講演)、2013.07.17、サザンビーチホテル&リゾート沖縄 (沖縄県糸満市)
 30. 田中克典、有機合成化学者の生物学への挑戦：共役イミンの新奇反応性の開拓と生きている動物内への展開、岡山理科大学 平成 25 年度第 2 回グリーン元素講演会 (招待講演)、2013.07.12、岡山理科大学 (岡山県岡山市)
 31. Katsunori Tanaka, Kenta Moriwaki, Eiji Miyoshi, Koichi Fukase, WHOLE-BODY IMAGING OF GLYCAN-DEPENDENCE ON TUMOR METASTASIS, Glyco22, 2013.06.23-28, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Science(Dalin, China)
 32. 田中克典、『合成化合物』ではなく『有機合成反応』で生命科学を学び、操る、東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻講演会「化学と生命のかけはし」(招待講演)、2013.04.27、東京大学 (東京都文京区)

〔図書〕(計 10 件)

1. Katsunori Tanaka, T. Endo, P. H. Seeberger, G. W. Hart, C.-H. Wong, N. Taniguchi (eds), PET Imaging of Glycoconjugates, In Glycoscience: Biology and Medicine, Springer, 査読有, 485-490 (2015), http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-4-431-54836-2_112-1?no-access=true
2. 田中克典、野崎聡、深瀬浩一、渡辺恭良、秋吉一成監修、第 5 編 メディカルサイエンスと糖鎖 第 3 章 1. 糖鎖イメージング、「糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック～創薬・医療から食品開発まで」、(株) エヌ・ディー・エス、461-464 (2015).
3. 田中克典、高田十志和、小山靖人、深瀬浩一監修、アザ電子環状反応、Staudinger Ligation、深瀬浩一、ファインケミカルシリーズ「クリックケミストリー -基礎から実用まで-」、(株) シーエムシー出版、第 23 章 (2014).
4. 田中克典、深瀬浩一、動物個体内における糖鎖複合体の分子イメージング、第三の生命鎖 糖鎖の機能と疾患 (実験医学増刊)、株式会社羊土社出版、31、176-185 (2013).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：「アルブミン-糖鎖複合体 (糖鎖クラスター化アルブミンの開発)」
 発明者：田中克典、渡辺恭良、小椋章弘、山本貴博
 権利者：田中克典、渡辺恭良、小椋章弘、山本貴博
 種類：特許
 番号：2015-132002
 出願年月日：平成 27 年 6 月 30 日
 国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：新規な 68Ga-DOTA 標識化合物
 発明者：田中克典、渡辺恭良、野崎聡、深瀬浩一
 権利者：田中克典、渡辺恭良、野崎聡、深瀬浩一
 種類：特許
 番号：2013-161407
 取得年月日：平成 25 年 8 月 2 日
 国内外の別：国内

〔その他〕

田中生体機能合成化学研究室
http://www.riken.jp/research/labs/associate/biofuct_synth_chem/
 田中生体機能合成化学研究室オリジナルホームページ
<http://www.riken.jp/nori-tanaka-lab/>
 田中克典准主任が米国化学会 Horce S. Isbell Award を受賞
http://www.riken.jp/pr/topics/2014/20141023_2/
 理研ニュース (No.405 March 2015)
<http://www.riken.jp/~media/riken/pr/publication/s/news/2015/rn201503.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 克典 (TANAKA, Katsunori)
 国立研究開発法人理化学研究所・田中生体機能合成化学研究室・准主任研究員
 研究者番号：00403098