



Title	[64Cu]Cu+錯体を母体としたレドックスイメージング薬剤の開発に関する基礎的検討 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	多田, 哲朗
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医理工学)
Dissertation Number	甲第16060号
Issue Date	2024-06-28
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92758
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Tada_Tetsuro_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医理工学） 氏名 多田 哲朗

学位論文題名

[⁶⁴Cu]Cu⁺錯体を母体としたレドックスイメージング薬剤の
開発に関する基礎的検討

(Fundamental studies on the development of redox imaging agents
based on [⁶⁴Cu]Cu⁺ complexes)

【背景と目的】 活性酸素種(Reactive Oxygen Species; ROS)は、酸素に由来する酸化剤の総称である。一般的に、ROS は反応性が非常に高く、DNA 塩基損傷や脂質の過酸化を引き起こし、細胞死を誘発させる。がんにおいて ROS は、制御されていないがん細胞の増殖に伴う代謝活性の増加やミトコンドリアの機能不全により、通常の組織よりも多く ROS が産生されている。一方で、がん細胞は抗酸化回路の亢進によって、がん細胞が産生する ROS による細胞死を防いでいる。がん治療と ROS は密接に関係しており、がんの治療法のうち放射線療法と化学療法は、がん組織に過剰の ROS を生じさせることでがん細胞死を誘導する。よって、腫瘍組織内における ROS の非侵襲的な定量化が非常に重要であり、ROS イメージングプローブの開発が必要である。

これまで報告されてきた ROS イメージング PET プローブは、¹⁸F によって標識されたプローブがほとんどである。しかし、¹⁸F 標識反応の放射化学的収率は低く複雑な合成手順が課題となっている。一方、金属 RI (Radioisotope; 放射性同位体) とキレートの放射化学は ¹⁸F とは異なり、短い反応時間かつ高い放射化学的収率で金属 RI 標識錯体の合成ができる。したがって、金属 RI 錯体を活性酸素の PET イメージングに利用できれば ROS 特異的な PET プローブの合成が簡便になるため実用上有用である。

そのため、本研究では金属 RI 錯体の酸化によって錯体の崩壊を利用した新規 ROS イメージングの可能性を検討した。本研究では、Cu^I とは安定な錯体を形成するが、Cu^{II} とは安定な錯体を形成しないキレート剤 (L) を用いることで、メタボリックトラッピングに基づく活性酸素の PET イメージングが可能になると考えた。すなわち、[⁶⁴Cu][Cu^I(L)₂]⁺ が ROS によって酸化されると、酸化された錯体は[⁶⁴Cu]Cu²⁺を放出する。そして、放出された[⁶⁴Cu]Cu²⁺は細胞内に捕捉され、結果として ROS の酸化還元電位に応じた PET シグナルが得られる。

本研究の第 1 章では、Cu^I 選択性が異なる 3 種類のキレート (BCA; bicinchoninic acid disodium salt, BCS; bathocuproinedisulfonic acid disodium salt, TEPA; tris(2-pyridylmethyl)amine)) を用いて[⁶⁴Cu]Cu^I および[⁶⁴Cu]Cu^I 錯体を合成し、数種類の ROS との反応性および希釈安定性を評価した。また、フェロトーシス誘導を行ったがん細胞に対し[⁶⁴Cu][Cu^I(BCS)₂]³⁻の取り込み試験を行った。加えて、[⁶⁴Cu][Cu^I(BCS)₂]³⁻の生体内での安定性も評価した。第 2 章では、細胞取り込みの増加を狙い[⁶⁴Cu][Cu^I(BCS)₂]³⁻の類似体、かつ脂溶性の高いカチオン錯体である[Cu^I(BC; bathocuproine)₂]⁺を用いて第 1 章と同様の試験を行った。第 3 章では、生体内で安定なことが知られている[⁶⁴Cu][Cu^I(dpp; diphosphine)₂]⁺錯体を用いて ROS との反応性を評価した。

【材料と方法】

【第 1 章】 [⁶⁴Cu][Cu^I(BCA)₂]³⁻と[⁶⁴Cu][Cu^I(BCS)₂]³⁻を合成し、酸化還元電位の異なる 4 種類の ROS (ヒドロキシラジカル; [•]OH, 過酸化脂質; LOOH, スーパーオキシド; O₂^{•-}, 過酸化水素; H₂O₂) との反応性を錯体の吸光度からそれぞれの未変化体の割合を評価した。

[⁶⁴Cu][Cu^I(BCS)₂]³⁻、[⁶⁴Cu][Cu^I(BCA)₂]³⁻および[⁶⁴Cu][Cu^I(TEPA)]⁺の合成は、[⁶⁴Cu]Cu²⁺をアスコルビン酸で[⁶⁴Cu]Cu⁺に還元することでキレートと配位させた。放射化学的収率は、薄層クロマトグラフィー (TLC) で分析した。合成したこれらの錯体を希釈することで希釈安定性を評価した。

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を ROS ($\cdot\text{OH}$, LOOH , $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2) とインキュベートした後、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ から放出された $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ の割合を TLC で評価した。

HT-1080 ヒト線維芽細胞に対し、イミダゾールケトンエラスチン (IKE) を用いフェロトシス誘導を行ったのち、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の取り込みを評価した。加えて、フェロトシス阻害剤であるフェロスタチン-1 (Fer-1) と IKE の同時処置後の取り込みの変化も評価した。[第 2 章] $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ および $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ を合成し、ROS と反応させた。 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の未変化体の割合は吸光度で測定し、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の未変化体の割合は HPLC で評価した。さらに、第 1 章と同様にフェロトシス誘導を行った HT-1080 細胞に対し $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ 取り込み試験を行った。

[第 3 章] $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp})_2]^+$ を合成し、ROS と反応させた。 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp})_2]^+$ から放出された $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ の割合は TLC で評価した。

【結果】[第 1 章] $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ と $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ は、 $\cdot\text{OH}$ と LOOH によって吸光度が大きく減少したが、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ と H_2O_2 ではほとんど吸光度は変化しなかった。 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の放射化学的収率は、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ よりも高い放射化学的収率で得られたが $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{TEPA})]^+$ は、ほとんど合成できなかった。 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の希釈安定性は、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ よりも高かった。 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を $\cdot\text{OH}$, LOOH , $\text{O}_2^{\cdot-}$ と反応させた結果、全放射能の $67 \pm 2\%$ 、 $44 \pm 13\%$ 、 $22 \pm 3\%$ がそれぞれ $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ として検出された。一方、 H_2O_2 との反応では有意に増加しなかった ($4 \pm 1\%$)。 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の細胞内取り込み、コントロール群 ($42 \pm 2\%$)、IKE 処置群 ($54 \pm 2\%$) および IKE + Fer-1 処置群 ($47 \pm 5\%$ Dose/mg protein) であった。しかし、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ のヒト血清中インキュベーション後の未変化体の割合は $9 \pm 5\%$ であった。

[第 2 章] $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ および $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ を合成し ROS と反応させたところ、第 1 章で得られた結果と同様の傾向が得られた。 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の細胞取り込みは、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の取り込みより増加した。一方で、IKE 処置群における $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の取り込みは、コントロール群より減少した。

[第 3 章] $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp})_2]^+$ の放射化学的収率は、これまで検討してきた錯体の中で最も高かった。一方で、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp})_2]^+$ と $\cdot\text{OH}$ を反応させても、放出された $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ の割合は変化しなかった。

【考察】 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ および $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と ROS の反応においては、それぞれの錯体が酸化された割合は ROS の酸化還元電位と関連性が示唆された。この傾向は、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ および $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ と ROS の反応でも同様であった。

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{TEPA})]^+$ および $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ の安定性が $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と比べて低かった理由として、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{TEPA})]^+$ と $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ の安定度定数が $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と比べて低いためであると考えられる。また、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ は四面体の錯体構造であり、酢酸イオンが Cu^+ に配位することが知られているため、希釈時の分解は会合機構が関与している可能性がある。 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ のヒト血漿中での安定性の低さは、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の BCS がヒト血漿中のタンパク質で置換されたためと考えられる。

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の取り込み試験において、IKE 処置群における $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の取り込みは、コントロール群よりも有意に高く、IKE + Fer-1 同時処置群で IKE 群より減少したことから、IKE 処置細胞への $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の取り込みは ROS 特異的であることが示唆された。

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp})_2]^+$ と $\cdot\text{OH}$ の反応において、 $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ の割合が増加していなかった理由として、錯体を形成していない遊離配位子の存在や、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp})_2]^+$ の酸化還元電位の高さの影響が考えられる。

【結論】 本研究の結果は、 Cu^{I} 選択的リガンドを用いることで、メタボリックトラップを利用した活性酸素の PET イメージングが可能であることを示した。 Cu^{I} 錯体の生物学的安定性の向上が必要であるが、今回の結果は、ROS の PET イメージングに向けた新規 ^{64}Cu 標識錯体の開発に道を開くものである。