



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16060
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92759
Type	doctoral thesis
File Information	Tada_Tetsuro.pdf, この論文の全文



学 位 論 文

[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)

2 0 2 4 年 6 月

北海道大学

多田 哲朗

学 位 論 文

[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)

2 0 2 4 年 6 月

北海道大学

多田 哲朗

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	8 頁
第 1 章 $[\text{}^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$, $[\text{}^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ を用いた 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	
序論	9 頁
実験方法	9 頁
実験結果	18 頁
考察	26 頁
結論	30 頁
第 2 章 $[\text{}^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ を用いた 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	
序論	31 頁
実験方法	32 頁
実験結果	34 頁
考察	38 頁
結論	39 頁
第 3 章 $[\text{}^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp})_2]^+$ (dpp: ジフオスフィン) 錯体を用いた 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	
序論	40 頁
実験方法	41 頁
実験方法	42 頁
実験結果	43 頁
考察	46 頁
結論	47 頁
総括	48 頁
謝辞	51 頁
補足情報	52 頁
参考文献	68 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Tetsuro Tada, Yuki Mizuno, Yuki Shibata, Hironobu Yasui, Yuji Kuge
Application of copper (I) selective ligands for PET imaging of reactive oxygen species through metabolic trapping
Nuclear Medicine and Biology, 134 – 135, 108914, (2024)
DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2024.108914

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 多田哲朗, 水野雄貴, 柴田悠貴, 安井博宣, 久下裕司
ROS イメージングを目的としたメタボリックトラップ型 PET プローブの開発
発：Cu^I-BCA 錯体の利用
日本薬学会第 142 年会、2022 年 3 月 24 日・名古屋 (オンライン)
2. 多田哲朗, 水野雄貴, 柴田悠貴, 安井博宣, 久下裕司
ROS イメージングを目的とした[⁶⁴Cu]Cu⁺錯体の合成と評価：配位子構造が錯体の安定性に与える影響
第 62 日本核医学会学術総会、2022 年 9 月 12 日・京都
3. 多田哲朗, 水野雄貴, 柴田悠貴, 安井博宣, 久下裕司
レドックスイメージングを目的とした[⁶⁴Cu][Cu^I(BCS)₂]⁺の合成と ROS との反応性評価
第 5 回日本核医学会分科会 放射性薬品科学研究会、2022 年 9 月 17 日・福井
4. Tetsuro Tada, Yuki Mizuno, Yuki Shibata, Hironobu Yasui, Yuji Kuge
Synthesis of [⁶⁴Cu]Cu⁺ complex for redox imaging and evaluation of its reactivity with reactive oxygen species
The 25th International Symposium of Radiopharmaceutical Sciences,
2023 年 5 月 23 日・Honolulu, Hawaii

緒言

活性酸素種について

活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) は、酸素に由来し、高い反応性を持つ酸化剤の総称である。ROS は狭義には酸素に由来し、酸素原子を含む酸化剤を指すが、広義には狭義の ROS による酸化によって生じた脂質などのラジカルも含むことがある。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、タンパク質のカルボニル化を引き起こし、細胞死を誘発させる (Pham-Huy, He & Pham-Huy, 2008)。ROS の発生要因には、細胞内起源の内因性と細胞外起源の外因性の 2 つに大別される。

内因性 ROS の主要な発生源は、細胞内のミトコンドリアである。細胞内のミトコンドリアでは、好気呼吸による ATP 産生電子伝達の結果として酸素分子が 1 電子還元を受けスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) が生じる (Zorov, Juhaszova & Sollott, 2014)。また、シトクロム P450 による電子伝達反応も ROS の生成源の一つである (Zorov, Juhaszova & Sollott, 2014)。図 1 に、内因性 ROS の生成および消去経路を示す (Huang, Li & Zhang, 2022)。

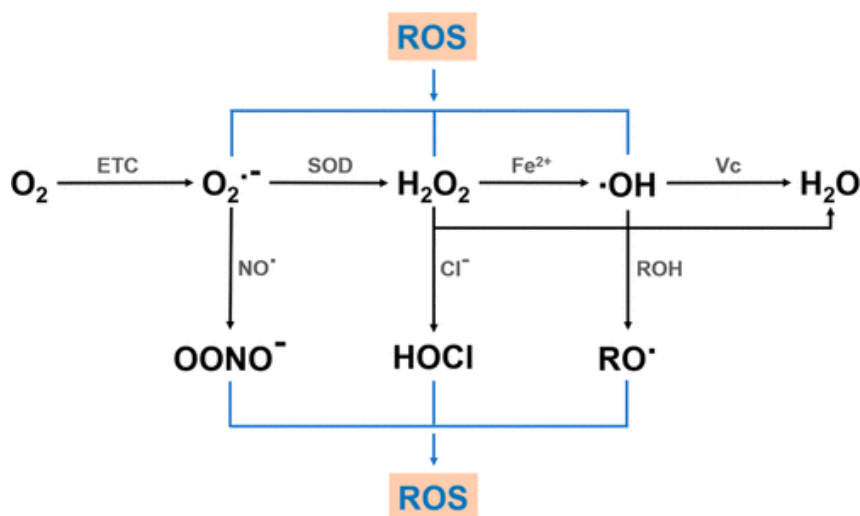


図 1 内因性の ROS の経路 (Huang, Li & Zhang, 2022)

略語の説明 : ETC: electron transport chain (電子伝達系), SOD: superoxide dismutase (スーパーオキシドジスムターゼ), Vc: vitamin C/ascorbic acid (ビタミン C / アスコルビン酸)

そのため、細胞には ROS に対する防御機構が備わっており、ミトコンドリアで生成された $O_2^{\cdot-}$ はスーパーオキシドジスムターゼ酵素によって過酸化水素 (H_2O_2) に変換される (Sheng et al., 2014)。また、 H_2O_2 はカタラーゼの触媒作用によって、水と酸素に分解される。 H_2O_2 の分解は、カタラーゼだけでなく、グルタチオンペルオキシダーゼやペルオキシレドキシシンによっても行われる

(Ighodaro & Akinloye, 2018)。さらに、細胞内で $O_2^{\cdot-}$ の増加を引き起こす原因となる老化したミトコンドリアはオートファジーによって除去される (Scherz-Shouval & Elazar, 2007)。このように、生体内の ROS 濃度は精密に制御されている。

外因性 ROS の生成要因としては、タバコ、アルコール濃度の高い飲料、高カロリー食、紫外線、電離放射線、金属原子によるものが報告されている (Halliwell & Gutteridge, 2015)。特に、電離放射線はヒドロキシラジカルなどの酸化還元電位が高い ROS を生成し、細胞内の分子をラジカル化させる (Riley, 1994)。ROS の反応性は、酸化還元力の指標である酸化還元電位 (水素ガスの電離電位を 0 V と定めた電位) と比例している。酸化還元電位が高い ROS ほど反応性が高く、細胞傷害性も強い。

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。がん細胞内の ROS は、がんの増殖や浸潤、転移との関連性が示唆されている (Cheung & Vousden, 2022; Schumacker, 2006)。

がん治療と ROS は密接に関係しており、がんの治療の 3 本柱である外科的治療、放射線治療、化学療法のうち、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 (Perillo et al., 2020)。これらの治療効果は、がん細胞の抗酸化回路の亢進状況に左右される (Zhang et al., 2023; Liou & Storz, 2010)。治療後の ROS の増分を観察することで、治療効果の判定が可能になるため、腫瘍組織内の ROS の非侵襲的な定量化が非常に重要であり、そのために ROS イメージング薬剤の開発が必要である。

ROS 特異的な PET イメージングプローブについて

陽電子放射断層撮影法 (Positron Emission Tomography; PET) イメージングは、その高分解能と高感度により、最も魅力的なイメージング手法の一つである。ROS の PET イメージングで一般的に用いられるのは、メタボリックトラップと呼ばれる戦略で、放射性標識したプローブが ROS によって酸化され、その酸化体が ROS 豊富な細胞に集積する。これまでに開発された多くの ROS イメージングプローブは、このメタボリックトラップに依存している (Hou et al., 2018; Al-Karmi et al., 2017; Solingapuram Sai et al., 2019; Pisaneschi et al., 2022; Egami et al., 2020; Waters et al., 2022; Mota et al., 2022)。一例として、 ^{18}F で標識されたジヒドロエチジウムである ^{18}F -ROStrace の例 (Hou et al., 2018) を図 2 に示す。 ^{18}F -ROStrace 中性電荷のため細胞膜を自由に通過することができ、膜透過によって細胞へ取り込まれる (Hou et al., 2018)。細胞内の ^{18}F -ROStrace が ROS によって酸化されると、 ^{18}F -ROStrace の電荷は正に変化し、膜透過性が低くなり、ROS の多い細胞内に捕捉される。したがって、 ^{18}F -ROStrace は ROS の多い組織に多く

集積し、PET イメージングによる生体内の ROS レベルを非侵襲的に測定することが可能になる。

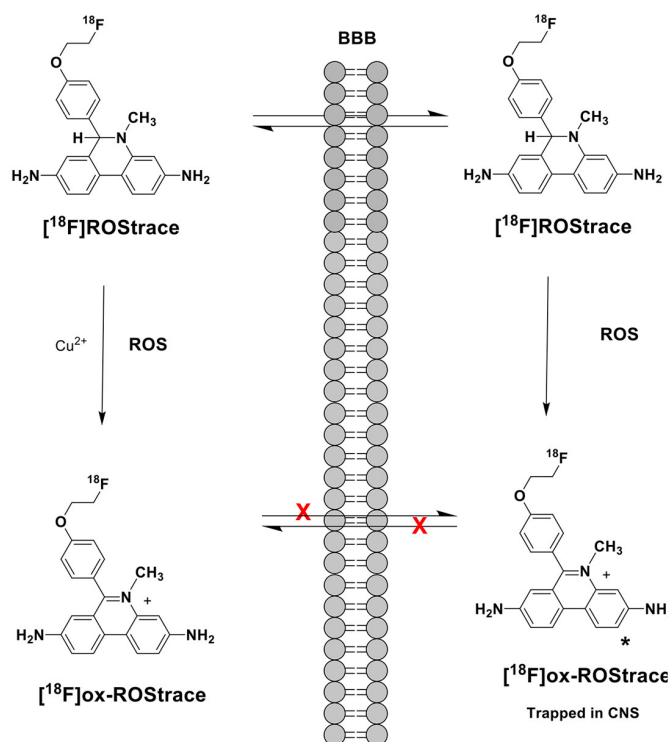


図 2 ROS 特異的な PET プローブにおけるメタボリックトラップの例
(Hou et al., 2018)

これまで報告されてきた ROS イメージング PET プローブの多くは、 ^{18}F によって標識されたものである (Hou et al., 2018; Al-Karmi et al., 2017; Solingapuram Sai et al., 2019; Pisaneschi et al., 2022; Egami et al., 2020; Waters et al., 2022; Mota et al., 2022)。これらの ^{18}F によって標識された ROS 特異的な PET プローブの可能性は前臨床試験において十分に実証されているが、フッ素の化学的性質に由来する低い放射化学的収率と複雑な合成手順が課題である (Jacobson, Kiesewetter & Chen, 2015)。実際、 ^{18}F -ROStrace も、合成後精製が必要でありその放射化学的収率は、比較的長い合成時間 (65 分) にもかかわらず、わずか 8~12% (減衰補正後) であった (Hou et al., 2018)。

一方、金属 RI (Radioisotope; 放射性同位体) とキレート剤の放射化学は ^{18}F 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 錯体が合成できる (Price & Orvig, 2014; Sun et al., 1996; Bailey et al., 2012)。したがって、金属 RI 錯体を ROS 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り実用上有用である。しかし、金属核種錯体を ROS イメージングプローブとして評価した例はほとんどない。例外として ^{68}Ga -Galuminox が報告

されているが、ROS の多い組織への集積機序については不明である (Sivapackiam et al., 2020)。そのため、本研究では金属 RI 錯体の酸化による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。

銅とその放射性同位体について

本研究では、使用する放射性核種として銅の RI を選定した。銅 (原子番号 $Z = 29$) は、2 つの安定同位体 ^{63}Cu (存在比: 69.15%) と ^{65}Cu (30.85%) を持ち、陽電子放出核種として、 ^{60}Cu (半減期 $T_{1/2} = 23.7$ min, 93% β^+)、 ^{61}Cu ($T_{1/2} = 3.33$ h, 61% β^+)、 ^{62}Cu ($T_{1/2} = 9.7$ min, 98% β^+)、 ^{64}Cu ($T_{1/2} = 12.7$ h, 19% β^+ , 38% β^-) の 4 種が知られている (McInnes, Rudd & Donnelly, 2017; Niccoli Asabella et al., 2014)。また、電子放出核種である ^{67}Cu ($T_{1/2} = 61.83$ h, 100% β^-) が治療目的の利用に有用であるとされている (Krasnovskaya et al., 2023)。

また、 ^{64}Cu は、銅の PET 核種の中で最も半減期が長く、臨床 PET イメージングに応用する魅力的な金属放射性核種の一つである。図 3 に、 ^{64}Cu の壊変図を示す。

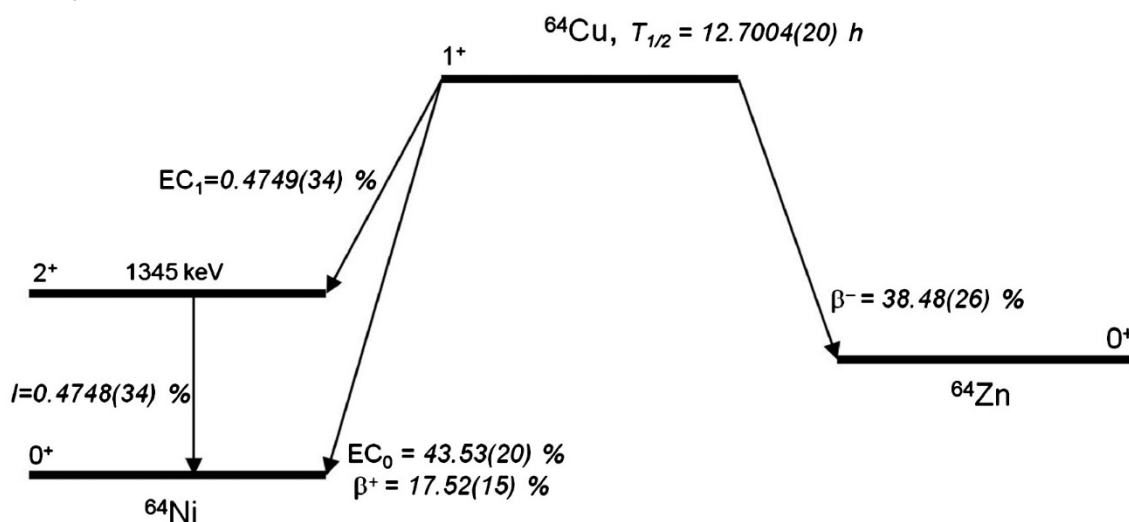


図 3 ^{64}Cu の壊変図 (Amiot et al., 2012)

水溶液中で銅イオンの主な形態となる Cu^{2+} は、境界ルイス酸でありハードおよびソフトの両方の配位子と錯体を形成することができる。一方、 Cu^+ はソフトな陽イオンであり、配位子の S や C、N 原子が電子供与基となるソフトなルイス塩基と容易に配位する。このため、 Cu^+ で安定な錯体を形成する配位子と Cu^{2+} で安定な錯体を形成する配位子が異なる性質がある (Sivasankar et al., 2007; Naskar et al., 2002)。

^{64}Cu 錯体のレドックスを利用した放射性医薬品に、 ^{64}Cu -diacetyl-bis(N^4 -methylthiosemicarbazone) (^{64}Cu -ATSM) が報告されている (Colombié et al., 2015)。 ^{64}Cu -ATSM は、 Cu^{II} とは安定な錯体を形成するが、 Cu^{I} とは安定な錯体を形成しない配位子 ATSM を用い Cu^{II} 錯体の還元反応を利用している。ATSM は、

bis(thiosemicarbazone) (BTSCs) の一種であり、 Cu^{2+} と安定した比較的親油性の高い銅錯体をつくる (Xie et al., 2016)。BTSCs は、配位子の化学構造が単純であるため、末端の官能基による修飾が容易であり、Cu-BTSC の構造活性相関が系統的に研究されている。数多くの研究により、Cu-BTSC の特性および生体内分布は、BTSC の骨格置換によって変化し、末端置換にはわずかしかな変化しないことが明らかにされている。Cu-BTSC の骨格のアルキル置換は、(a) $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ の酸化還元電位、(b) 細胞内での錯体からの銅の放出、(c) 細胞膜を透過する能力と関連がある (Dearling et al., 2002; Blower et al., 2003; Liu et al., 2020)。例として、Cu-(glyoxal-bis(4-methylthiosemicarbazonato); GTSM)と Cu-ATSM を用いて説明する (Jalilian & Osso, 2016)。図 4 に示すように、Cu-ATSM と Cu-GTSM の構造の違いは、骨格のジメチル置換の有無である。この骨格のジメチル置換により、錯体の中心にある Cu(II) イオンに対しより多くの電子が供与され、Cu-ATSM の酸化還元電位が Cu-GTSM よりも低くなる。その結果、ATSM の ^{64}Cu Cu 標識体である ^{64}Cu -ATSM は正常な細胞内では還元されない。一方で、がん細胞は、腫瘍内の血管が発達していないため酸素供給が不足し、低酸素状況になる傾向があり (Zhou et al., 2006)、低酸素状態のがん細胞内は酸化還元電位が低くなる。そのため、 ^{64}Cu -ATSM は低酸素状態のがん細胞においてのみ錯体中心の ^{64}Cu Cu^{2+} が ^{64}Cu Cu^+ に還元される (Dearling et al., 2002)。還元の結果、ATSM は Cu^I とは安定な錯体を形成できないため ^{64}Cu -ATSM から $^{64}\text{Cu}^+$ が放出され、腫瘍組織の低酸素領域へ集積する (Liu et al., 2020)。

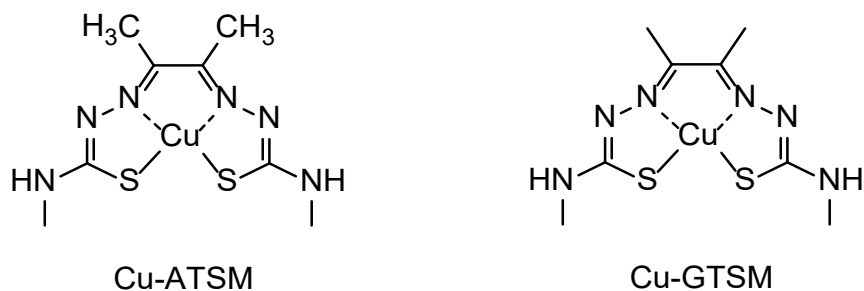


図 4 Cu-ATSM と Cu-GTSM の化学構造

さらに、 ^{64}Cu -ATSM は ^{64}Cu が PET 放出核種および、 β^- 放出核種であることを利用して、投与量を変化させることで治療と投与の両方を行うことができるセラノスティクスアプローチが可能である (Liu et al., 2020)。

そこで、本研究では ^{64}Cu -ATSM とは逆の発想で、 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配位子を使用することで、 ^{64}Cu Cu^+ 錯体の酸化反応によるメタボリックトラップに基づく ROS の PET イメージングが可能になる仮説を立てた。図 5 は、この仮説の概念図であり、「L」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配位子を示す。

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{L})_2]^+$ が ROS によって酸化されると、酸化された錯体は安定性が低い
ため、直ちに $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ を放出する。その後、放出された $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ イオンは細
胞内のタンパク質に捕捉され、細胞内にトラップ (保持) されるため、錯体の酸
化還元電位と細胞内の ROS 濃度に応じた PET シグナルが得られる。これまでの
知見において、 $\text{Cu}(\text{I})$ 選択的配位子をメタボリックトラップによる ROS の PET
イメージングに応用した報告はない。

本研究では、この新しい分子設計の ROS イメージングへの可能性を検討する
ため、第 1 章から第 3 章に記載する研究を行った。

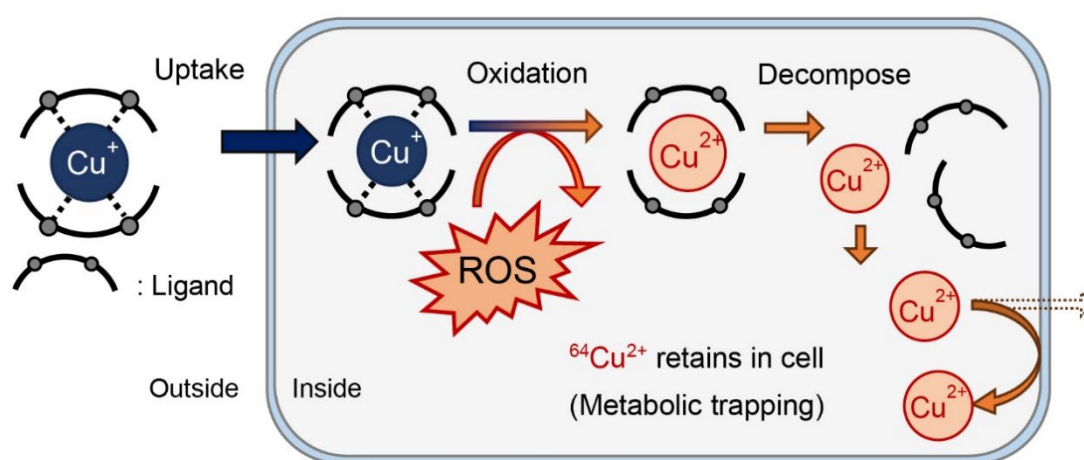


図 5 $\text{Cu}(\text{I})$ に選択的なキレーターを用いた ROS イメージングの原理

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ARG	autoradiography
BC	bathocuproine
BCA	bicinchoninic acid disodium salt
BCS	bathocuproine disulfonate acid disodium salt
DMF	N, N-dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid
dpp	diphosphine
dpp-ethane	1,2-bis(diphenylphosphino)ethane
dpp-ethene	cis-bis(diphenylphosphino)ethene
ESI-MS	electrospray ionization mass spectrometry
Fer-1	ferrostatin-1
HBSS	Hank's balanced salt solution
HPF	hydroxyphenyl fluorescein
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
ICP	inductively coupled plasma
I.D.	inter diameter
IKE	imidazole ketone erastin
LO [•]	lipid hydroxyl radical
LOH	lipid hydroxy
LOO [•]	lipid peroxy radical
LOOH	lipid peroxide
NHE	normal hydrogen electrode
O ₂ ^{•-}	superoxide
•OH	hydroxyl radical
PET	positron emissions tomography
%V _{Bur}	percent buried volume
RP-TLC	reverse phase thin-layer chromatography
ROS	reactive oxygen species
SD	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEPA	tris(2-pyridylmethyl) amine
TFA	trifluoroacetic acid
TLC	thin-layer chromatography

第 1 章 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$, $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ を用いた 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

序論

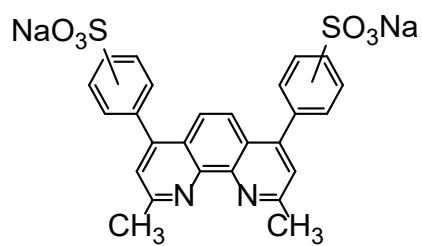
Cu^{I} 選択性が異なる 3 種類のキレート (BCA; bicinehoninic acid disodium salt, BCS; bathocuproinedisulfonic acid disodium salt, TEPA; tris(2-pyridylmethyl)amine)) を用いて $[\text{natCu}]\text{Cu}^{\text{I}}$ および $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{\text{I}}$ 錯体を合成し、数種類の ROS との反応性および希釈安定性を評価した。の Cu^{I} 錯体を合成し、ROS との反応性と生体内での安定性を評価した。さらに、今回提唱したコンセプトを実証する実験として、鉄依存的な細胞死であるフェロトシス誘導を行い細胞内の活性酸素レベルを上昇させたがん細胞への $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の取り込みを評価した。

実験方法

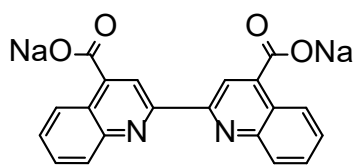
一般的事項

記載のない限り、すべての試薬は富士フイルム和光純薬 (大阪, 日本) から購入し、純度については、特級以上の試薬を用いた。超純水は Direct-Q UV3 (Merck-Millipore, Billerica, MA) から採水した。逆相薄層クロマトグラフィー (RP-TLC) 分析は、TLC Silica gel 60 RP-18 F₂₅₄s (Merck, Darmstadt, Germany) を用いて行った。順相薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析は、TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany) を用いて行った。統計解析は GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いて行った。エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) は、アイソトープ総合センターに設置されている solariX® (Brucker Co., Billerica, MA) を用いて測定した。

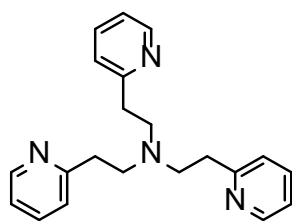
本研究では 3 種類の配位子、[2,2'-biquinoline]-4,4'-dicarboxylic acid (bicinehoninic acid disodium salt; BCA) disodium salt 、 2,9-dimethyl -4,7- diphenyl-1,10-phenanthrolinedisulfonic acid (bathocuproinedisulfonic acid disodium salt; BCS) disodium salt 、 2-pyridin-2-yl-N,N-bis(2-pyridin-2-ylethyl)ethanamine (tris (2-pyridylmethyl) amine; TEPA) を用いた (図 6)。



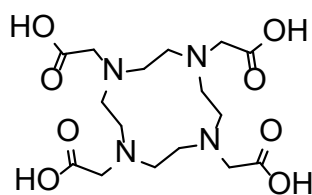
BCS disodium salt



BCA disodium salt



TEPA



DOTA

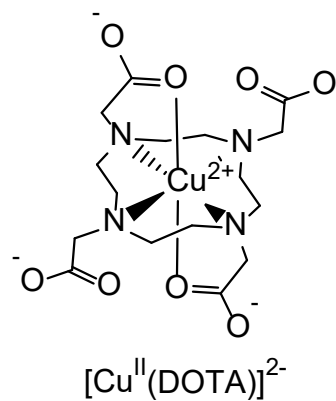
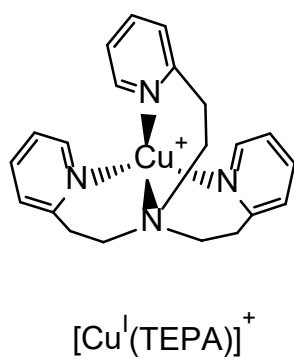
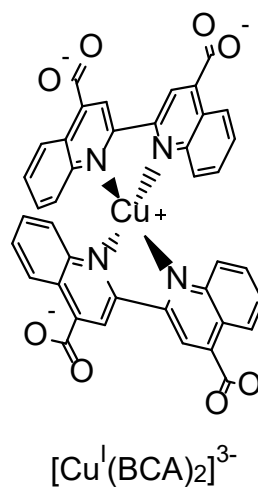
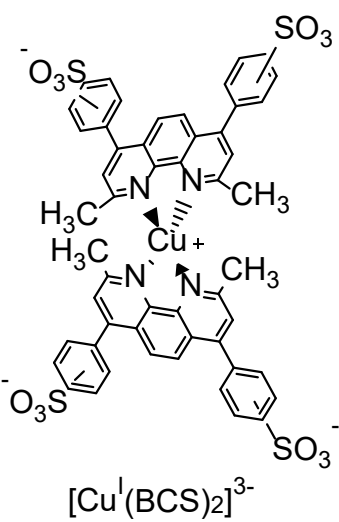


図 6 本研究で使用した配位子と銅錯体の化学構造

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ 、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の合成

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ は、斉藤ら (Saito, Nishikawa & Tsubomura, 2018) の方法に従って合成した。35.8 mg (92 μmol) の BCA disodium salt (>98%, 東京化成工業, 東京, 日本) を 1.84 mL のジメチルスルホキシド (DMSO) に懸濁し、超音波を用い溶解させた。この溶液に、3.8 mg (38 μmol) の CuCl (>95%, 純正化学, 東京, 日本) を N_2 (>99.99%, エア・ウォーター, 東京, 日本) 雰囲気下で 10 mL フラスコに加えた。次に、BCA 溶液 (BCA disodium salt : 76 μmol) 1.31 mL を攪拌しながら室温でフラスコに加えた。溶液の色は直ちに紫色に変化した。攪拌は 15 分後に終了した。RP-TLC 分析の結果、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ の R_f 値は 0.90 であった (表 1)。この反応溶液を $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ ストック溶液として、精製せず以降の実験に使用した。ESI-MS: calculated for $\text{C}_{40}\text{H}_{21}\text{CuN}_4\text{O}_8$, 374.04; found 374.05 [$\text{M} - 3\text{H}$] $^{2-}$ (Supplement).

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ は、斉藤ら (Saito, Nishikawa & Tsubomura, 2018) の方法に従って合成した。41.8 mg (74 μmol) の BCS disodium salt (東京化成工業) を 1.48 mL の DMSO に溶解した。この溶液に、3.4 mg (34 μmol) の CuCl を、 N_2 (>99.99%, エア・ウォーター) 雰囲気下で、10 mL フラスコに加えた。次に、1.36 mL の BCS 溶液 (BCS disodium salt : 68 μmol) を攪拌しながら室温でなすフラスコに加えた。溶液の色は直ちに褐色に変化した。攪拌は 15 分後に終了した。RP-TLC 分析を行ったところ、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の R_f 値は 0.80 であった (表 1)。この反応溶液を $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ ストック溶液として、精製することなく以降の実験に使用した。ESI-MS: calculated for $\text{C}_{52}\text{H}_{36}\text{CuN}_4\text{NaO}_{12}\text{S}_4$, 561.02; found 561.06 [$\text{M} - 3\text{Na}$] $^{2-}$ (Supplement).

表 1 本研究で使用した銅錯体の TLC 分析条件と R_f 値。

錯体	TLC 相	移動相	R_f 値
$[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$	逆相	メタノール／0.1M 酢酸バッファー (pH 5)=6 : 4 (v : v)	0.90
$[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$	逆相	メタノール／0.1M 酢酸バッファー (pH 5)=6 : 4 (v : v)	0.80
$[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{TEPA})]^+$	順相	クロロホルム／メタノール=2 : 1 (v : v)	0.65
$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DOTA})]^{2-}$	順相	1 M 酢酸アンモニウム/メタノール = 1 : 1(v : v)	0.40

TEPA の合成

TEPA (tris(2-pyridylmethyl)amine) は、Schatz らの方法 (Schatz et al., 2001) を参考にして合成した。100 mL ナスフラスコに塩化アンモニウム 3.47 g (65 mmol) を秤量し、2-vinylpyridine 2.4 mL (23 mmol) (東京化成工業) と超純水 9.5 mL を入

れ、スターラーで攪拌しながら 85°C で 4 時間還流した。還流後、HPLC 精製を実施した(supplement, 図 S7)。HPLC 精製は以下の条件で行った。

HPLC 条件; 移動相 A: 水-0.1%TFA, B: MeOH-0.1%TFA B: 10-30% 0-25 min 検出器; UV 254 nm, 流量: 5 mL/min, カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II Guard column (ナカライテスク, 京都, 日本) 20 mm I.D. × 150 mm と COSMOSIL 5C₁₈-AR-II Packed column (ナカライテスク) 20 mm I.D. × 2 mm を接続して使用

HPLC によって精製した TEPA は、移動相由来の TFA が塩として混入していたため、溶媒抽出による脱 TFA を実施した。TEPA・nTFA 48 mg を分取し、クロロホルム 8 mL に溶解させた。分液漏斗に、TEPA が溶解したクロロホルムと同量の 0.1M NaOH 溶液を加え、溶媒抽出を行った。有機相を回収し、MgSO₄ で脱水後、折りたたんだろ紙でろ過した。ろ液をサンプル瓶に移し、乾燥させることで脱塩した TEPA を得た。

[^{nat}Cu][Cu^I(TEPA)]⁺の合成

[^{nat}Cu][Cu^I(TEPA)]⁺は、E. John らの方法 (Riedinger et al., 2015) を参考に TEPA とアスコルビン酸が含まれた溶液に Cu²⁺を加え還元した Cu⁺に対し TEPA を配位させて合成した。具体的には、500 μL チューブに TEPA 2.201 mg (6.6 μmol) をとり、MeOH 100 μL で溶解させた。その後、CuCl₂・2H₂O 0.565 mg (3.3 μmol) を加えた。この溶液から 50 μL 取り、水 50 μL 加えた後 100 mM L-アスコルビン酸水溶液を 50 μL 加え、TLC 分析を行った。展開溶媒はクロロホルム:メタノール = 2 : 1 (v : v) を使用した。反応後生じた R_f = 0.65 のスポットに対し、ESI-MS 測定を行ったところ、[^{nat}Cu][Cu^I(TEPA)]⁺の m/z と一致した (ESI-MS :calculated for C₄₀H₂₄CuN₄O₈, 395.13; found, 395.13 [M]⁺)。そのため、[^{nat}Cu][Cu^I(TEPA)]⁺ 錯体が合成できたと判断した。

活性酸素の発生

ヒドロキシラジカル ([•]OH) は、35.4 wt% (11.7 M) H₂O₂ を 0.1M 酢酸バッファー (pH 5) で希釈することで調製した、2 または 10 mM H₂O₂ 溶液 1 mL に 9 U (50 μg) の西洋ワサビペルオキシダーゼを溶解させて生成した (Chu et al., 2014)。

過酸化脂質 (LOOH) は、東らの方法 (Azuma et al., 2021) に従って生成した。具体的には、0.1M ホウ酸バッファー (pH 9) 中で 3.1 μL (10 μmol) のリノール酸と 4 μL の 10% Tween-20 (生化学用, Sigma) を混合し、リノール酸を超音波とボルトエクソを用いて乳化させた。このリノール酸溶液 1 mL を 8,428 U (50 μg) の大豆リポキシゲナーゼ (Sigma) に加え、LOOH を生成させた。

スーパーオキシド (O₂^{•-}) は、0.71 mg の超酸化カリウム (Sigma) を 1 mL または 5 mL の 0.1M 酢酸バッファー (pH 5) に溶解して生成した (Fink et al., 2004)。

[•]OH の発生は、Hydroxyphenyl Fluorescein (HPF) を用いて確認した (Setsukinai et al., 2003)。HPF (5 mM DMF 溶液, 五稜化薬, 札幌, 日本) を D-PBS で希釈し、10 μM HPF 溶液を調製した。96 ウェルプレートのウェルに 10 μM の HPF 溶液

を 100 μL 加えた。次に、100 μL の 2 mM H_2O_2 または $\cdot\text{OH}$ 溶液をウェルに加えた。37°Cで 1 時間インキュベートした後、プレートリーダー (POWER SCAN HT, DS Pharma Biomedical, 東京, 日本) を用いて各ウェルの蛍光シグナル (528 nm) を測定した。励起波長は 485 nm であった。

LOOH の生成は、BODIPY 581/591 C11 で確認した (Aldini et al., 2001)。BODIPY 581/591 C11 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を超純水で溶解し、20 μM BODIPY 581/591 C11 溶液を調製し、96 ウェルプレートのウェルに、100 μL ずつ加えた。次に、100 μL の 2 mM LOOH 溶液をウェルに加えた。37°Cで 1 時間インキュベートした後、プレートリーダーを用いて各ウェルの蛍光シグナル (528 nm) を測定した。励起波長は 485 nm であった。

スーパーオキシド ($\text{O}_2^{\cdot-}$) は、ジヒドロエチジウムで確認した (Chu et al., 2014)。DHE (生化学用, 富士フイルム和光純薬) を超純水で溶解し、300 μM ジヒドロエチジウム (DHE) 溶液を調製した。96 ウェルプレートのウェルに 300 μM の DHE 溶液を 100 μL 添加した。次に、100 μL の 2 mM $\text{O}_2^{\cdot-}$ 溶液をウェルに加えた。37°Cで 1 時間インキュベートした後、プレートリーダーを用いて各ウェルの蛍光シグナル (590 nm) を測定した。励起波長は 485 nm であった。

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ と $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と活性酸素との反応

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ および $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ をヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$)、過酸化脂質 (LOOH)、スーパーオキシド ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、過酸化水素 (H_2O_2) と反応させた。まず、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ および $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ のストック溶液を 0.1 M 酢酸バッファー (pH 5) で 100 μM に希釈した。次に、これらの溶液 100 μL を 96 ウェルプレートのウェルに加えた ($n=3$)。次に、2 mM の活性酸素 (ROS 濃度は基質の濃度で定義) 溶液 100 μL を各ウェルに加えた。37°Cで 30 分間インキュベートした後、吸光度 ($[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$; 562 nm (Walker, 1994); $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$; 492 nm (Bagchi et al., 2013)) をプレートリーダー (Absobance96, Byonoy GmbH, Hamburg, Germany) を用いて測定した。

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と活性酸素との反応におけるアスコルビン酸の影響

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と ROS の反応では、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の還元剤であるアスコルビン酸存在下で ROS による酸化反応が進行する。そのため、アスコルビン酸により ROS がクエンチされるおそれがある。そこで、アスコルビン酸存在下で $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と ROS を反応させ、アスコルビン酸による $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と ROS の反応への影響を検討した。まず、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ のストック溶液を 0.1M 酢酸バッファー (pH 5) で 200 μM に希釈した。次に、これらの溶液 50 μL を 96 ウェルプレートのウェルに加えた ($n=3$)。次に、0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4 mM アスコルビン酸水溶液を 50 μL を加えた。さらに、2 mM の ROS ($\cdot\text{OH}$, LOOH, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 ; ROS 濃度は基質の濃度で定義) 溶液 100 μL を各ウェルに加えた。37°Cで 60 分間インキュベートした後、492 nm の吸光度をプレートリーダーで測定した。

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ 、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ 、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{TEPA})]^+$ および $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DOTA})]^{2-}$ の合成

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ 、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ および $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{TEPA})]^+$ の合成はまず、2 mM BCA disodium salt、BCS disodium salt、あるいは TEPA 水溶液 10 μL を、0.1 M 酢酸バッファー (pH 5) 77 μL および 1 mM L-アスコルビン酸ナトリウム水溶液 10 μL が入った 500 μL のプラスチックチューブに加えた。次に、2 μL の 5% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液を加えた。最後に、同量の 0.05 M HCl (ICP 用、関東化学) で希釈した $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ 溶液 (PDR ファーマ、東京、日本) 1 μL (約 1 MBq) を加え、60°C で 10 分間加熱した。加熱後、溶液 1 μL を RP-TLC にスポットし、移動相 (表 1) により RP-TLC を展開した。蛍光イメージングプレート (BAS-TR 2025, 富士フイルム、東京、日本) と画像解析システム (LAS7000, Multi Gauge V 3.0, 富士フイルム) を用いてオートラジオグラフィー (ARG) を得た。放射化学的収率は Multi Gauge V 3.0 を用いて測定した。さらに、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ および $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の合成の確認は、TLC のほかに HPLC を用いて行った (Supplement)。

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DOTA})]^{2-}$ の合成は、2 mM 2, 2', 2'', 2'''- (1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetrayl) tetraacetic acid (DOTA; Macrocycles, Plano, TX) 水溶液 10 μL を、77 μL の 0.1M 酢酸バッファー (pH 5) 77 μL と超純水 10 μL を入れた 500 μL プラスチックチューブに加えた。次に、5% SDS 水溶液 2 μL を加えた。最後に、1 μL (約 1 MBq) の $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ 溶液を加え、60°C で 10 分間加熱した。加熱後、溶液 1 μL を順相 TLC にスポットし、移動相 (表 1) により TLC を展開した。放射化学的収率は、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ および $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の場合と同様に計算した。

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の RP-TLC の展開条件の検討

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の合成や ROS との反応後に行われた TLC 分析において、再現性に関する問題が観察された。この問題の原因として、BCS は Cu^+ だけではなく Cu^{2+} とも不安定ではあるが錯体を形成する性質が関係していると考えた。そこで、 $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ 溶液と BCS 水溶液を RP-TLC に共打ち (同じ位置にスポット) し、スポットの乾燥状態を変化させ TLC 分析を行うことで、TLC 上での $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BCS})_2]^{2-}$ 形成の可能性を検討した。図 7 に RP-TLC 上にスポットした溶液の種類と位置を示す。図 7 で示した RP-TLC を 2 枚準備し、1 枚は共打ちしたスポットをドライヤーの熱風で 1 分間乾燥したのち展開した。もう 1 枚は共打ちした溶液を乾燥させずに直ちに展開した。展開後それぞれの ARG を比較することで、 $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ の BCS への配位による $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BCS})_2]^{2-}$ 錯体の形成状況を比較した。

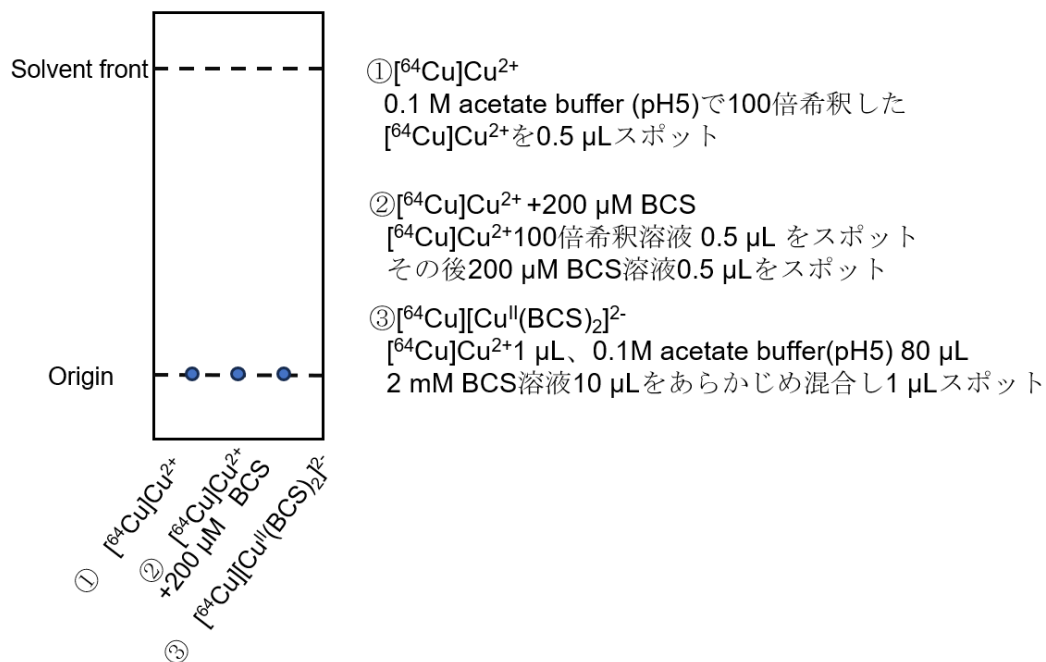


図 7 RP-TLC 上にスポットした溶液と位置

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ 、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ 、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DOTA})]^{2-}$ の希釈安定性

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ 、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ 、および $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DOTA})]^{2-}$ の溶液 (100 μL あたり約 1 MBq、配位子濃度 200 μM) を、0.1 M 酢酸バッファー (pH 5、0.1% SDS 含有) で 2 倍、10 倍、100 倍に希釈し、配位子の最終濃度をそれぞれ 100 μM 、20 μM 、2 μM とした。希釈後、溶液をピペティングで攪拌し、室温で 5 分間放置した後、未変化体の割合を RP-TLC を用いて分析した (表 1)。

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と活性酸素の反応

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の RP-TLC の展開条件の検討結果から、RP-TLC 上で $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ に BCS が配位することで形成される $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BCS})_2]^{2-}$ は、RP-TLC 上で展開されることが判明した。また、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BCS})_2]^{2-}$ の R_f 値は $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と近いことため区別することができず、ROS による錯体の酸化の過小評価につながる分析系の問題点が判明した。そこで、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BCS})_2]^{2-}$ の溶液を希釈しその安定性を調べ $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の結果と比較することでこの過小評価の程度を評価した。 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BCS})_2]^{2-}$ は、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の合成手順からアスコルビン酸を加えないことで合成した。 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BCS})_2]^{2-}$ の希釈は、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の希釈安定性の試験と同じ条件で行った。

次に、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を $\cdot\text{OH}$ 、 LOOH 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ および H_2O_2 と反応させた。500 μL のプラスチックチューブに、10 μL の 10 mM ROS (ROS 濃度は基質濃度で定義) と

80 μL の 0.1 M 酢酸バッファー (pH 5) を加えた。その後、 $[\text{}^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ (約 100 kBq、BCS disodium salt 濃度 200 μM) を 10 μL 加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベートした。反応後、溶液を RP-TLC で分析し (表 1)、原点の割合 (R_f : 0.0) を算出した。コントロール溶液は、 $[\text{}^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を 0.1 M 酢酸バッファー (pH 5) で 10 倍希釈して調製した。 $[\text{}^{\text{nat}}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ および $[\text{}^{\text{nat}}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の場合と同様の方法で、それぞれの ROS を発生させた。さらに、対照実験として、 $[\text{}^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を酵素のみと反応させ、酵素によって原点の割合が増加しないことを確認した。

細胞培養

HT-1080 ヒト線維肉腫細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA) から購入した。細胞は、10% ウシ胎児血清 (CELLect[®], MP Biomedicals, Santa Ana, CA) および 1% v/v ペニシリン-ストレプトマイシン (10,000 unit-10 mg/mL) を添加した高グルコース Dulbecco's Modified Eagle 培地 (L-グルタミン、フェノールレッド含有) 中で、5% CO_2 を含む加湿雰囲気下、37 $^{\circ}\text{C}$ で培養を行った。

イミダゾールケトンエラスチンによる細胞内脂質過酸化物の誘導

イミダゾールケトンエラスチン (IKE) は、Selleckchem 社 (Huston, TX) から、フェロスタチン-1 (Fer-1) は Sigma-Aldrich 社から購入した。HT-1080 細胞を I 型コラーゲンでコートした 8 ウェルスライド (Corning Inc., Corning, NY) に、1 ウェル当たり 3.6×10^4 個の密度で播種し、一晚接着させた。翌日、細胞を 500 μL の 10 μM IKE 単独または 10 μM IKE + 1 μM Fer-1 を含む培地中で、37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 環境下で、6 時間インキュベートした。インキュベーション後、各ウェルを 500 μL の Hank's balanced salt solution (HBSS) バッファー (+, without phenol red) 500 μL で 2 回洗浄した後、HBSS バッファーで希釈した 10 μM BODIPY C11 581/591 溶液 500 μL を加え 37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を HBSS バッファー 500 μL で 2 回洗浄し、BODIPY C11 581/591 およびその酸化体である Ox-BODIPY C11 の蛍光を測定した。蛍光画像は、Plan Apo 4x 対物レンズ (NA0.20, Nikon, Tokyo, Japan) を備えた蛍光顕微鏡 (Biozero BZ-8000, KEYENCE, Osaka, Japan) で測定した。BODIPY C11 およびその酸化体である Ox-BODIPY C11 の蛍光は、それぞれ TRITC フィルター (exaction: 545/25 nm, emission: 605/55 nm, dichroic: 565 nm, KEYENCE) および GFP-B フィルター (exaction: 470/40 nm, emission: 535/50 nm, dichroic: 495 nm, KEYENCE) を用いて検出した。

$[\text{}^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の細胞取り込み試験

$[\text{}^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ は BCS 濃度が 2 mM であることを除き、 $[\text{}^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の合成に記載した方法で合成した。HT-1080 細胞をタイプ I コラーゲンコート 18 ウェルプレート (AGC テクノグラス, 静岡, 日本) に 1 ウェルあたり 1×10^5 個の密度で播種し、一晚接着させた。翌日、細胞を 10 μM IKE 単独または 10 μM IKE

+ 1 μM Fer-1 を含む培地中 500 μL で、37°C、5% CO_2 環境下で、6 時間インキュベートした。インキュベーション後、各ウェルを HBSS バッファー 500 μL で 2 回洗浄し、HBSS バッファーで希釈した $^{64}\text{Cu}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ (10 kBq, BCS 濃度 8 μM)を加え、37°C で 30 分間インキュベートした。インキュベーション量は 500 μL に調整した。インキュベーション後、各ウェルを氷冷 HBSS バッファー 500 μL で 2 回洗浄した。その後、0.1% SDS を含む 0.25 M NaOH で 37°C、15 分間インキュベートして細胞を溶解し、オートウェル γ カウンター (2480 WiZARD², PerkinElmer, Waltham, MA) を用いて放射能を測定した。各細胞溶解液のタンパク質濃度は、micro-BCA assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、製品の説明書に従って測定した。結果は、タンパク質 1 ミリグラムあたりの投与放射能量 (% dose/mg protein) で示した。

中性溶液およびヒト血漿中における $^{64}\text{Cu}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の安定性

$^{64}\text{Cu}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の中性状態での安定性を調べるため、 $^{64}\text{Cu}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ (100 kBq, BCS 濃度 200 μM) 10 μL を 100 mM リン酸バッファー (pH 7.4) 90 μL で希釈した。 $^{64}\text{Cu}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ のヒト血漿中での安定性も以下のように評価した。85 μL のヒト血漿 (男性血漿, Sigma-Aldrich) に、 $^{64}\text{Cu}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ 添加後においても pH 7.4 を維持する目的で 5 μL の 0.1 M NaHCO_3 を加えた。その後、10 μL の $^{64}\text{Cu}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ 溶液 (100 kBq, BCS 濃度 200 μM) を加えた。さらに、10 μL の $^{64}\text{Cu}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ 溶液 (25 kBq, BCS 濃度 200 μM) を、20 μM の Fe^{3+} 、15 μM の Zn^{2+} 、または 20 μM の Fe^{3+} と 15 μM の Zn^{2+} を含む 100 mM リン酸バッファー (pH 7.4) 90 μL で希釈した。 Fe^{3+} または Zn^{2+} を含むリン酸バッファーは、 FeCl_3 (Sigma-Aldrich) または ZnCl_2 を 100 mM リン酸バッファー (pH 7.4) で希釈して調整した。各溶液を 37°C で 30 分間インキュベートし、未変化体の割合を RP-TLC で分析した (表 1)。

実験結果

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ および、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と活性酸素との反応

図 8 に示すように、それぞれの ROS の生成は、市販の蛍光試薬で個別に検証を行った。図 9 は、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ 、および $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を各 ROS と反応させた後の吸光度の変化をまとめたものである。 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ を $\cdot\text{OH}$ 、 LOOH 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ および H_2O_2 と反応させたところ、コントロールに対する吸光度はそれぞれ $53 \pm 1\%$ 、 $19 \pm 1\%$ 、 $77 \pm 3\%$ 、 $76 \pm 0\%$ に減少した。 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を、 $\cdot\text{OH}$ 、 LOOH 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ および H_2O_2 と反応させた後、コントロールに対する吸光度はそれぞれ $29 \pm 2\%$ 、 $26 \pm 5\%$ 、 $87 \pm 2\%$ 、 $85 \pm 3\%$ に減少した。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ の値のみ、コントロールと有意差がなかった。図 10 に示すように、アスコルビン酸濃度が $50 \mu\text{M}$ 以下の領域では、すべての ROS においてコントロールと比べて $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の吸光度が増加しなかった。このことから、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と ROS の反応に対するアスコルビン酸による障害はないと判断した。

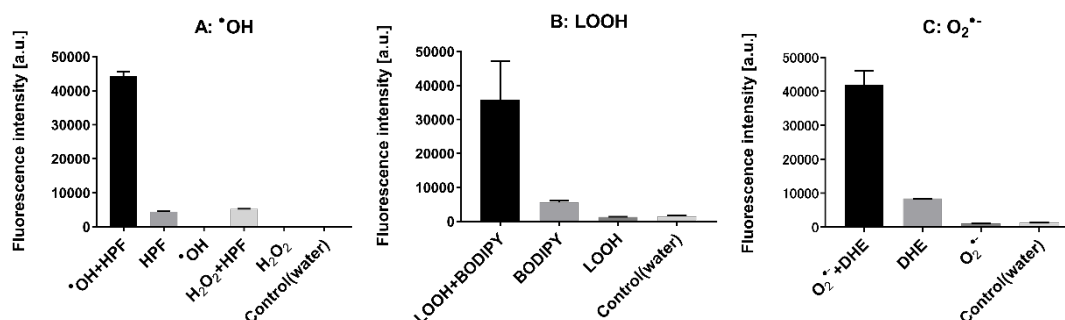


図 8 各 ROS の発生について、市販の蛍光試薬で検証した結果
エラーバーは平均値 $\pm$ SD を表す (n = 3)。

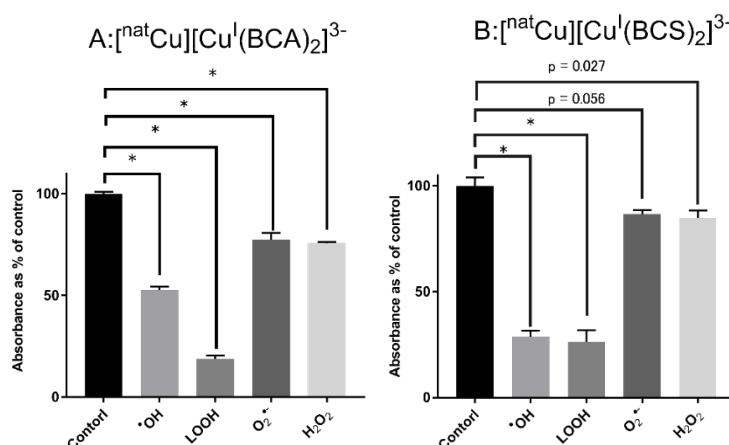


図 9 (A) $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ (B) $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の 4 種類の ROS との反応性
エラーバーは平均値 $\pm$ SD を表す (n = 3)。統計解析は、One-way-ANOVA 解析の後に Dunnet's の多重比較検定を用いて行った。*は $p < 0.001$ 、n.s.は有意差なしを示す。

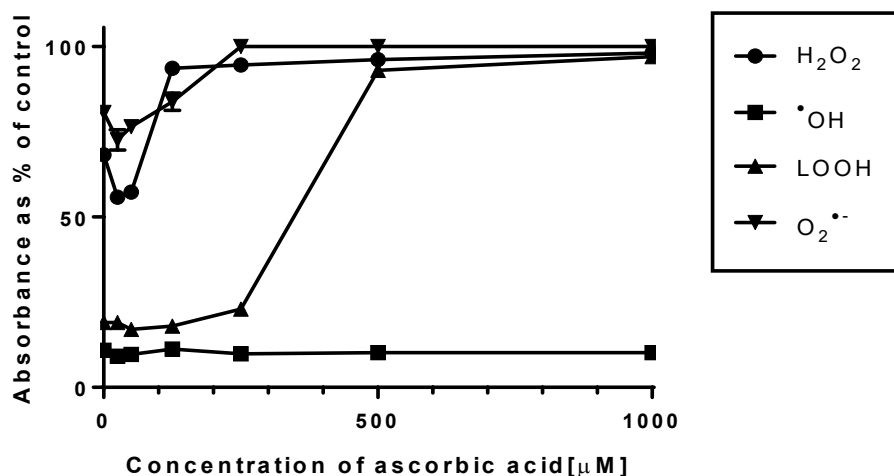


図 10 L-アスコルビン酸ナトリウム添加時における $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^3$ と 4 種類の ROS との反応 各プロットのエラーバーは平均値 $\pm$ SD を表す ($n=3$)。

$[\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^3$, $[\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^3$ および $[\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{TEPA})]^+$ の合成 TLC 展開系の検討

図 11 に示すように $[\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ と BCS を別々に RP-TLC にスポットし、ドライヤーによる乾燥を行った後展開した場合において、TLC 上で $[\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ が BCS に配位し $[\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BCS})_2]^2$ として展開される現象が観察された。そのため、本論文の実験では TLC を乾燥させずに展開を実施することとした。なお、同様の現象は $[\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ と BCA では発生しなかった。

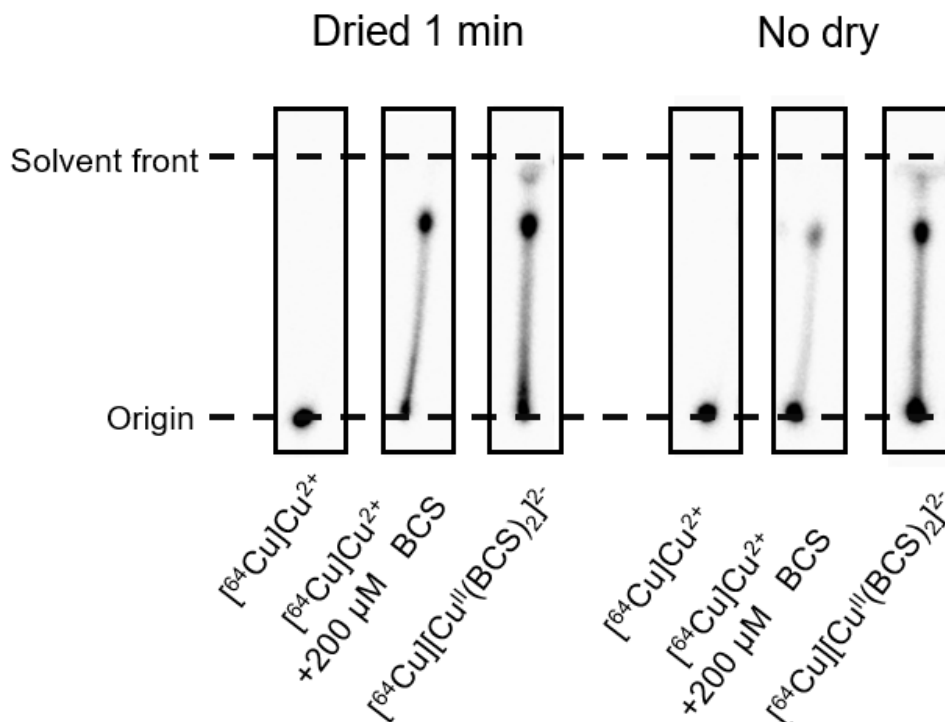


図 11 スポットの乾燥による Cu^{2+} の BCS に対する再配位

左: スポット後ドライヤーで 1 分間乾燥させ、展開した TLC の ARG

右: スポット後乾燥させずにただちに展開した TLC の ARG

$[\text{Cu}^{64}]\text{Cu}^{2+}$; $[\text{Cu}^{64}]\text{Cu}^{2+}$ 溶液のみスポット, $[\text{Cu}^{64}]\text{Cu}^{2+} + 200 \mu\text{M BCS}$; $[\text{Cu}^{64}]\text{Cu}^{2+}$ 溶液
スポット後に BCS 溶液スポット, $[\text{Cu}^{64}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BCS})_2]^{2-}$; あらかじめ
 $[\text{Cu}^{64}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BCS})_2]^{2-}$ を合成し、その溶液をスポット

図 12 は、合成後の $[\text{Cu}^{64/\text{nat}}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ および $[\text{Cu}^{64/\text{nat}}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の RP-TLC 画像である。蛍光スポットは RP-TLC を 365 nm の紫外線で励起して可視化した。主要な放射性スポットの R_f 値は、対応する非放射性銅錯体の R_f 値と同一であり、 $[\text{Cu}^{64}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ および $[\text{Cu}^{64}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の合成に成功したことを示している。 $[\text{Cu}^{64}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ と $[\text{Cu}^{64}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の放射化学的収率はそれぞれ $44 \pm 3\%$ と $86 \pm 1\%$ であった ($n = 3$)。 $[\text{Cu}^{64}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DOTA})]^{2-}$ の放射化学的収率は $96 \pm 1\%$ ($n = 3$) であった。しかしながら、 $[\text{Cu}^{64}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{TEPA})]^+$ の放射化学的収率は $5 \pm 2\%$ ($n = 3$) であった。

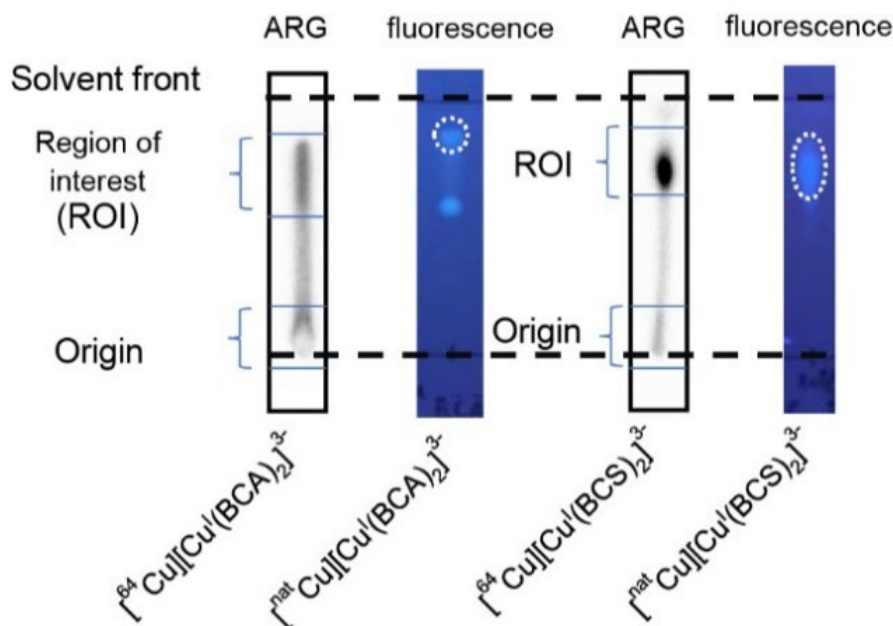


図 12 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ 、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ 、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ 、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の代表的な TLC 分析結果

^{64}Cu 錯体のスポットは ARG で可視化し、 natCu 錯体のスポットは蛍光シグナル (励起波長 365 nm) で可視化した。

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ と $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の希釈安定性

図 13 に、酢酸バッファーで希釈した後の未変化な $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ と $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の割合を示す。希釈により未変化体の割合が減少し、原点での放射能が増加した。100 倍希釈後、未変化な $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ と $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の割合は、それぞれ $2 \pm 3\%$ と $53 \pm 3\%$ に減少した。一方、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DOTA})]^{2-}$ の未変化体の割合は、100 倍希釈後も変化しなかった ($99.3 \pm 0.2\%$)。

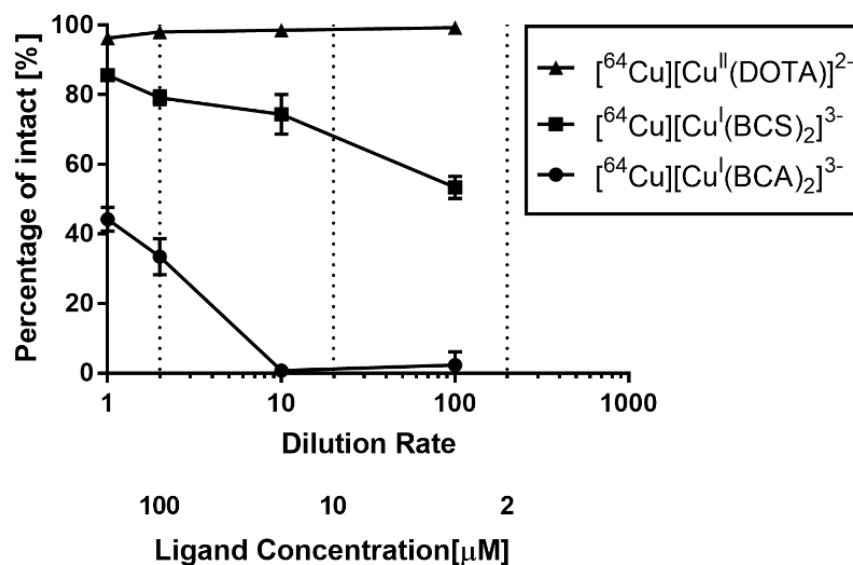


図 13 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ 、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ 、および $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DOTA})]^{2-}$ の希釈に対する安定性。エラーバーは平均値 $\pm$ SD (n = 3) を表す。

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と活性酸素の反応

図 14 は、配位子濃度別に $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ および $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BCS})_2]^{2-}$ の未変化体の割合である。横軸の配位子濃度が低くなるほど希釈を行っている。 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の未変化体の割合は、配位子濃度 20 μM (希釈倍率 10 倍) において $74.4 \pm 4.6\%$ であったが、同濃度で $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BCS})_2]^{2-}$ の未変化体の割合は $31.2 \pm 0.4\%$ であった。そのため、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と ROS との反応後に RP-TLC 上で展開されているスポットは、ROS によって酸化された $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BCS})_2]^{2-}$ の可能性もある。

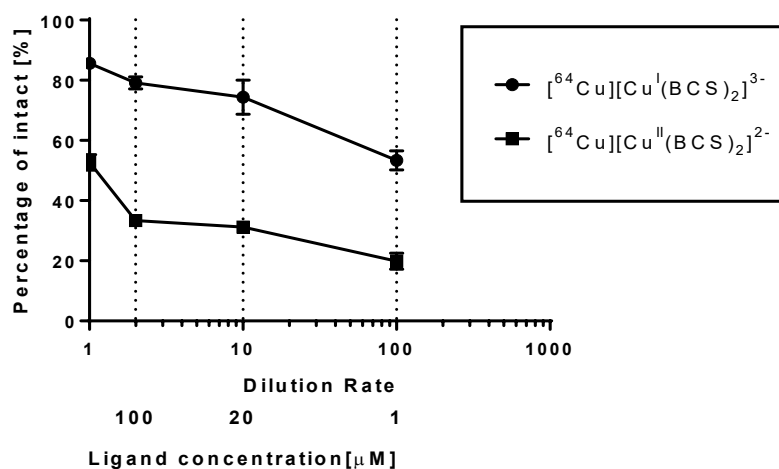


図 14 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BCS})_2]^{2-}$ および $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の希釈安定性

図 15 A および B は、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を 4 種類の ROS および酵素と単独で反応させた後の TLC 画像と原点における放射能の割合 (つまり、 $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ の割合) を示す。 $\cdot\text{OH}$, LOOH , $\text{O}_2\cdot^-$ または H_2O_2 との反応後、それぞれ $67 \pm 2\%$, $44 \pm 13\%$, $22 \pm 3\%$, $4 \pm 1\%$ の放射能が原点で観測された。 $\cdot\text{OH}$ および LOOH と反応させた後の原点の割合は、コントロール群と有意差があった。一方、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を 10 倍に希釈した場合 (コントロール) は、原点に $11 \pm 3\%$ の放射能が観測された。 $\text{O}_2\cdot^-$ と H_2O_2 と反応させた後の原点の割合は、有意差はなかった。 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ をペルオキシダーゼやリポキシゲナーゼとインキュベートしても、原点の割合は変わらなかった。

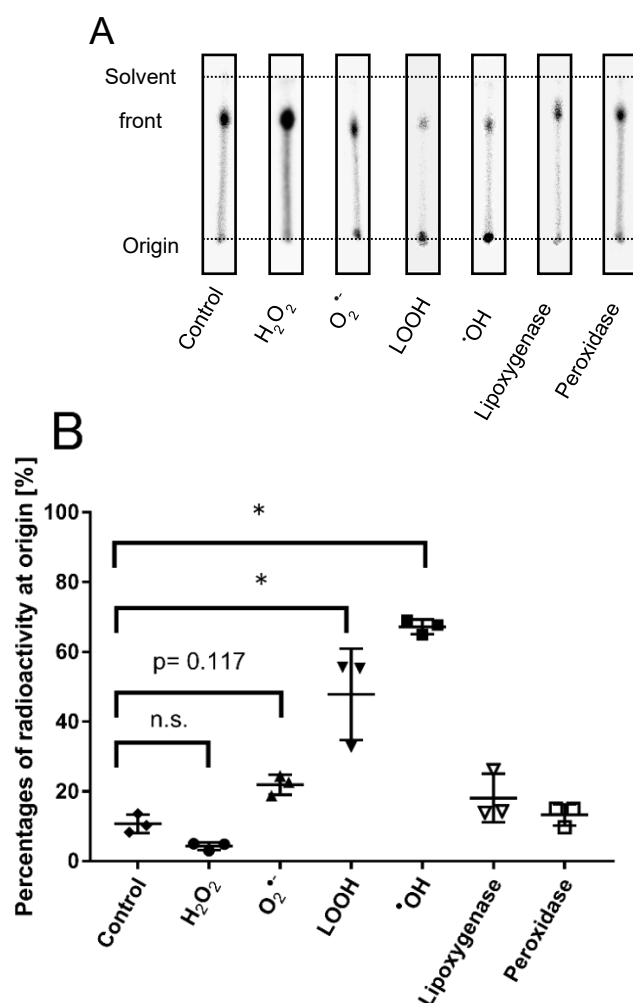


図 15 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の活性酸素との反応性 (A) $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を各 ROS とインキュベートした後の代表的な TLC の ARG 画像 (B) TLC の原点における放射能の割合。エラーバーは平均値 $\pm$ SD ($n = 3$) を表す。統計解析は、One-way-ANOVA 解析の後に Dunnett's の多重比較検定を用いて行った。n.s.は有意でないことを示し、*は $p < 0.0001$ を示す。

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の細胞取り込み試験

図 16 A は、IKE 単独または IKE + Fer-1 処理後の、BODIPY C11 581/591 およびその酸化体である Ox-BODIPY C11 で染色した HT-1080 細胞の蛍光画像を示す。IKE 処理群では、コントロール群と比較して BODIPY C11 の蛍光シグナルが減少し、Ox-BODIPY C11 の蛍光シグナルが増加したことから、IKE 処理による LOOH の形成が示された。一方、Ox-BODIPY C11 の蛍光シグナルは、IKE と Fer-1 との同時インキュベーションにより減少した。図 16 B は、3 つの異なる条件下における $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の HT-1080 細胞への細胞内取り込みの結果を示す。 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の取り込みは、IKE 処理群ではコントロール群に比べ有意に増加した。

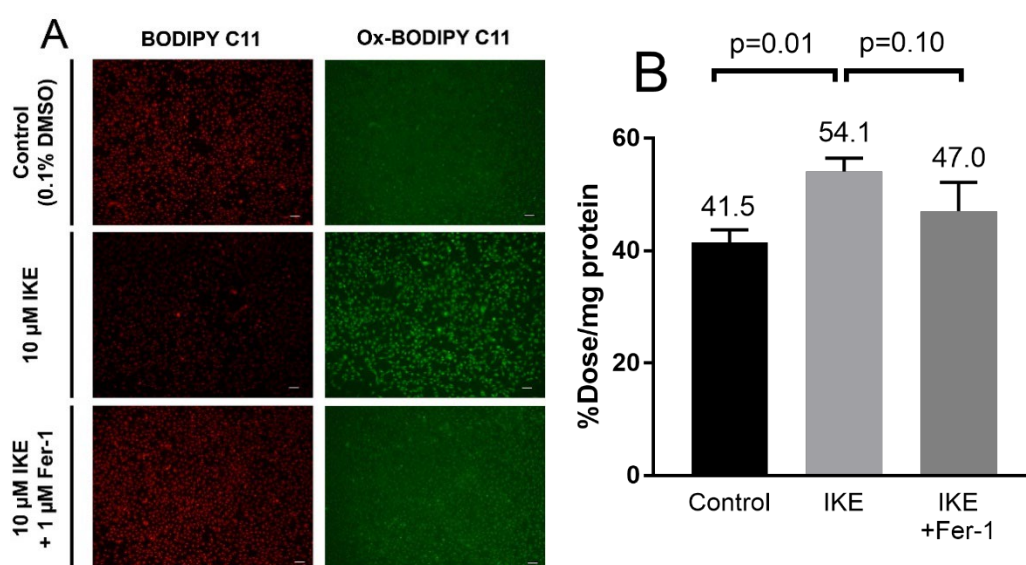


図 16 (A) BODIPY C11 (左) および Ox-BODIPY C11 (右) で染色した HT-1080 細胞の代表的な蛍光顕微鏡像。コントロール群 (上)、IKE 群 (中)、および IKE + Fer-1 群 (下) では、細胞をそれぞれ 0.1% DMSO、10 μM IKE、10 μM IKE + 1 μM Fer-1 でインキュベートした。スケールバー=100 μm 。(B) コントロール、IKE、および IKE + Fer-1 グループにおける $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の細胞内取り込み。エラーバーは平均値 $\pm$ SD を表す ($n = 3$)。統計解析は、一元配置分散分析 (One way ANOVA)、ダネットの多重比較検定 (Dunnet's multiple comparison test) を用いて行った。

中性溶液およびヒト血漿中における $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の安定性

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を中性バッファーおよびヒト血漿中でインキュベートした後の未変化体の割合は、それぞれ $78 \pm 2\%$ ($n = 3$) および $9 \pm 5\%$ ($n = 3$) であった。ヒト血漿中でのインキュベーション後、 $88 \pm 2\%$ の放射能が原点で検出された ($n = 3$)。 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、およびその両方を含む 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.4) でインキュベートした後の未変化体の割合は、それぞれ

$69 \pm 2\%$ ($n = 3$)、 $71 \pm 1\%$ ($n = 3$)、および $73 \pm 2\%$ ($n = 3$)であった。代表的な TLC 画像を図 17 に示す。

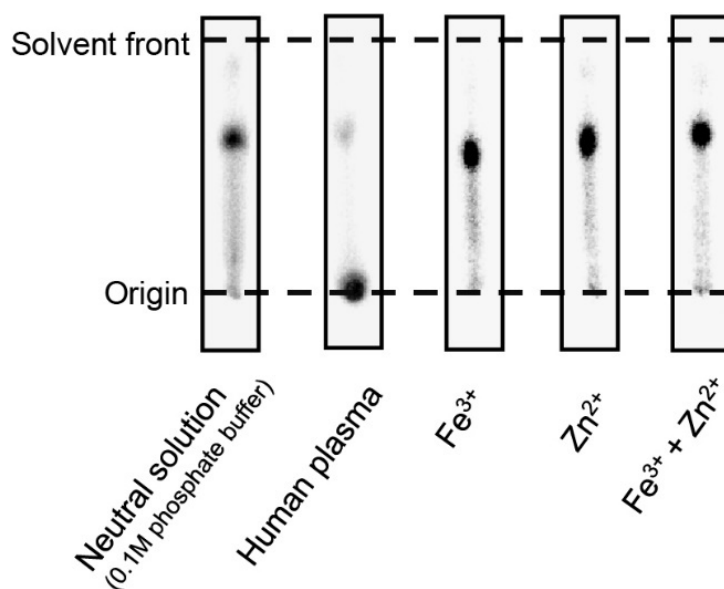


図 17 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を 0.1 M リン酸バッファ (pH 7.4)、ヒト血漿、および Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、またはその両方を含む 0.1 M リン酸バッファ (pH 7.4) でインキュベートした後の代表的な TLC 分析。 Fe^{3+} と Zn^{2+} の最終濃度は、それぞれ 18 μM と 13.5 μM

考察

本章では、 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を用いることで、メタボリックトラップに基づく ROS の PET イメージングが可能であるという仮説を証明するための実験を行った。このような特性を持つモデルキレーターとして、少なくとも Cu^{I} との安定度定数が既知の BCA、BCS および TEPA を選択した (表 2)。BCA および BCS は、 Cu^{I} とは非常に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ため、それぞれの $\text{Cu}(\text{I})$ 錯体はタンパク質の定量に日常的に使用されている (Wiechelman, Braun & Fitzpatrick, 1988)。

まず、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ と $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を合成し、4種類の活性酸素 ($\cdot\text{OH}$, LOOH , $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2) との反応性を評価した。これらの活性酸素を選んだ理由として、4つの ROS がさまざまな疾患に関連するほか、それぞれの酸化還元電位が異なることから選定した (表 3)。具体的には、 $\cdot\text{OH}$ と LOOH は、鉄依存性の細胞死であるフェロトキシスに参与している (Dixon et al., 2012)。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ と H_2O_2 は、がん (Aykin-Burns et al., 2009) やミトコンドリア機能障害疾患 (Brand, 2016) に参与している。 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ および $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ は、それぞれ 562 nm と 492 nm とに特徴的な吸収ピークを持つため (Walker, 1994; Bagchi et al., 2013; Ervin et al., 1998)、その吸収値の変化を測定することで、未変化な割合を評価した。予想通り、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ 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錯体が分解されたが、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ と H_2O_2 はほとんど吸光度は変化せず、錯体はほとんど分解されなかった (図 10)。この結果は、それぞれの ROS の酸化還元電位と一致している (表 3)。

次に、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ 、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ および $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{TEPA})]^+$ を入手が容易な $[\text{natCu}]\text{Cu}^{2+}$ を用いて合成した。 Cu^{2+} は CuCl_2 の化学形として供給されるため、 Cu^{2+} を Cu^{I} に還元するには適切な還元剤が必要である。本研究では、還元剤としてアスコルビン酸を用いた (Riedinger et al., 2015)。図 12 に示すように、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ は、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ よりもはるかに高い放射化学的収率で得られた。さらに、TLC (図 12) 上の $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ の放射性スポットがやや不明瞭であったことから、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ が TLC 上での展開中に分解したことが示唆された。加えて、BCA および BCS より低い安定度定数を持つ、TEPA を用いて $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{TEPA})]^+$ も合成したが、ほとんど合成できなかった。

このように $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{TEPA})]^+$ と $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ の安定性が $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と比べて低いのは、BCA と TEPA の $\text{Cu}(\text{I})$ 錯体の安定度定数が $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と比べて低いためと考えられる (表 2)。また、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ と $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の酢酸バッファーによる希釈に対する安定性を評価したところ (図 14)、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ は、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ よりも安定性が低い、同様の結果が得られた。このように $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ の希釈に対する安定性が劣っているのは、安定度定数が低いことから説明できる (表 2)。また、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ は四面体の錯体構造であり、酢酸イオンが Cu^{I} に配位するこ

とが知られている(Mounts, Ogura & Fernando, 1974)。したがって、希釈時の分解は会合経路が関与している可能性がある。一方、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DOTA})]^{2-}$ は八面体の錯体構造を持つ Cu(II)錯体 (Boswell et al., 2004) であり、安定度定数は 22.3 と高く、希釈に対しても優れた安定性を示した (図 13)。このことは、配位数と配位構造が銅錯体の希釈に対する安定性に大きな影響を与えることを示唆している。

表 2 $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$, $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$, $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{TEPA})]^+$
および $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DOTA})]^{2-}$ の安定度定数

配位子	安定度定数： $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{L})_2]^+$	安定度定数： $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L})_2]^{2+}$	参考文献
BCA	17.2	8.2	(Chen et al., 2018)
BCS	20.81	12.42	(Bagchi et al., 2013)
TEPA	15.8	Not determined	(Ambundo et al., 1999)
DOTA	Not determined	22.3	(Sun et al., 2003)

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ は高い放射化学的収率と希釈に対する優れた安定性を示したため、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と $\cdot\text{OH}$, LOOH , $\text{O}_2^{\cdot-}$ および H_2O_2 との反応性を評価した。TLC の分析結果では、 $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ が TLC の原点で検出された。この結果から、原点の放射能の割合は酸化時に $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ から放出された $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ の比率と解釈することができる。図 15 に示すように、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を $\cdot\text{OH}$ および LOOH と反応させた場合、原点の放射能の割合は増加したが、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ および H_2O_2 との反応では、その値は有意に増加しなかった。この傾向は、それぞれの ROS の酸化還元電位と一致している (表 3)。さらに、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を酵素のみ (ペルオキシダーゼ、リポキシナーゼのみ) と反応させた場合、原点の割合は変化しなかったことから、TLC 上の原点の割合の増加は $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ からの $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ 放出に起因すると考えられ、 ^{64}Cu と酵素複合体の形成によるものではないと考えられる。これらの結果は、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ が、 $\cdot\text{OH}$ や LOOH のような高い酸化還元電位を持つ ROS の検出に使用できる可能性を示唆している。

表 3 本研究で使用した活性酸素と錯体の酸化還元電位

活性酸素	酸化還元電位 [V/NHE]	参考文献
$\cdot\text{OH}+\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$ (1e^-)	2.3	(Wood, 1988)
$\text{LOOH}+\text{H}^+/\text{LO}\cdot+\text{H}_2\text{O}$ (1e^-)	1.9	(Koppenol, 1990)
$\text{LOOH}+2\text{H}^+/\text{LOH}+\text{H}_2\text{O}$ (2e^-)	1.7	(Koppenol, 1990)
$\text{LOO}\cdot+\text{H}^+/\text{LOOH}$ (1e^-)	0.77-1.44	(Halliwell & Gutteridge, 2015)
$\text{O}_2\cdot^-/\text{H}_2\text{O}_2$ (1e^-)	0.9	(Wood, 1988)
$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BCS})_2]^{2-}/[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ (1e^-)	0.66	(Chen et al., 2018)
$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BCA})_2]^{2-}/[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ (1e^-)	0.65	(Chen et al., 2018)
$\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}+\text{OH}^-$ (1e^-)	0.38	(Arnhold, Furtmüller & Obinger, 2003)

1e^- : 1 電子酸化, 2e^- : 2 電子酸化, $\text{LO}\cdot$: 脂質ヒドロキシラジカル, $\text{LOO}\cdot$: 脂質ペルオキシラジカル, LOH : 脂質ヒドロキシ, LOOH : 過酸化脂質。LOOH は脂質ペルオキシラジカルから作られる (Girotti, 1985)。

しかしながらこの実験は、プラスチックチューブ内で $^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と ROS を混合し、 $^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ から放出される $^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ の量を評価している。一方、細胞内の ROS 発生を伴う実際のプロセスははるかに複雑である。特に、細胞内の還元酵素や抗酸化物質による放出された $^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ の再還元の影響を考慮することが必要である (Murphy et al., 2022)。

そこで、この欠点を補うために、ROS の産生を伴う細胞死であるフェロトーシス誘導細胞に対し、 $^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を用いた取り込み試験を行った。この実験では、フェロトーシス感受性があるとされる HT-1080 細胞株を使用した (Dixon et al., 2012)。イミダゾールケトンエラスチン (IKE) は、シスチン-グルタミン酸対向輸送体であるシステム x^{c} の阻害を通じて、フェロトーシスを誘導し、かつ、代謝安定性を持つためフェロトーシス誘導剤として使用した (Zhang et al., 2019)。フェロスタチン-1 (Fer-1) は、LOOH を還元することで LOOH の連鎖的な発生を抑える (Miotto et al., 2020) ことからフェロトーシス阻害剤として使用した。

最初に、市販の蛍光プローブ BODIPY C11 を用いて、フェロトーシスの特徴である LOOH の生成を確認した。図 16 (A) に示すように、IKE 処理により LOOH が生成し、IKE と Fer-1 をともにインキュベートすることでその生成はコントロール群と同等のレベルまで抑制された。この結果は、IKE 処理した HT-1080 細胞が、新規イメージングプローブの ROS 特異的細胞取り込みを評価するのに適したモデルとなることを示している。

そこで、蛍光実験と同様の条件で、HT-1080 細胞への $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の取り込みを評価した。図 16 (B) に示すように、IKE 処理群における $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の取り込みは、コントロール群よりも有意に高かった。さらに、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の取り込み増加は、IKE と Fer-1 を同時にインキュベートすることで減少したことから、IKE 処理細胞への $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の取り込みは LOOH 特異的であることが示唆された。

ただし、 $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ は中性条件下では負電荷を帯びるため、一般的には細胞膜を通過しないと考えられている。しかし、フェルトーシス誘導を行った細胞では、LOOH が細胞膜の完全性を損なうことから、細胞膜の透過性が増す報告がある。したがって、この実験では $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ が、損傷を通じて細胞内に取り込まれ、その後 ROS によって酸化され、細胞内または細胞膜に捕捉された可能性が考えられる (Pedrera et al., 2020; Riegman et al., 2020)。

コントロール群においても、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の細胞への取り込みは見られた。この理由として、細胞膜上のトランスポーターによって取り込まれた可能性や、エンドサイトーシスによって取り込まれた可能性が考えられる。

最後に、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の中性条件下および生物学的条件下での安定性を評価した。図 17 に示すように、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ は中性バッファー中では安定であったが、ヒト血漿と 30 分間インキュベートするとほぼ完全に分解した。この安定性の低さは、希釈に対する安定性の低さと同様に、ヒト血漿中のタンパク質が $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の Cu^+ に配位し、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ 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。実際、ヒト血漿には銅と非常に高い親和性を持つタンパク質が豊富に含まれている (Linder, 2016)。一方、血漿中に存在する Fe^{3+} と Zn^{2+} も、BCS における $\text{Cu}(\text{I})$ の配位部位であるフェナントロリンと安定な錯体を形成することができる (Brandt, Dwyer & Gyarfas, 1954; Cooper et al., 2012)。そのため、これらの金属イオンが $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の不安定性にどのように寄与しているかどうかを明らかにするために、血漿と同等濃度の Fe^{3+} または Zn^{2+} を含む中性バッファー中で、銅錯体の安定性を評価した (Erdman, MacDonald & Zeisel, 2012)。図 17 に示すように、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ はこれらの条件下で安定であり、ヒト血漿中における $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の不安定性には、 Fe^{3+} や Zn^{2+} が関与していないことが示された。

本結果から、ヒト血漿中の $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の分解には、会合経路が関与している可能性が考えられる。従って、かさ高い配位子を用いることで、会合経路を介した分解を防ぎ、生体内での安定性を向上させた $\text{Cu}(\text{I})$ 錯体を提供できる可能性がある (Alidori et al., 2008)。かさ高さの指標としては、立体障害指数、ファンデルワールス体積、配位子円錐角、Buried volume ($\%V_{\text{Bur}}$) がある (Escayola, Bahri-Laleh & Poater, 2024; Falivene et al., 2016)。そのため、これらの指標を参考に配位子を選定することが適当であると考えられる。

結論

本章では、Cu(I)と安定な錯体を形成する複数の配位子 (BCA, BCS, TEPA) を用いて、 $[\text{natCu}]\text{Cu}^{\text{I}}$ および $[\text{}^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{\text{I}}$ 錯体を合成した。合成した錯体の安定性は、配位子の安定度定数との関連性が示唆された。

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$, $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ および $[\text{}^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と ROS を反応させたところ、錯体の崩壊は、ROS の酸化還元電位との関連性が示唆された。

in vitro 実験において $[\text{}^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ は、フェロトーシス誘導を行ったがん細胞への取り込みが促進された。細胞への取り込み機序については、カチオンの膜透過によるものではなく、フェロトーシス誘導に伴う細胞膜障害に起因する膜透過性の亢進によることが示唆された。

一方で、血漿中の $[\text{}^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の安定性は低かった。ヒト血漿中の $[\text{}^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の分解においては、血漿中の金属元素ではなく、血漿中に存在するタンパク質によるものであり、分解には会合経路が関与している可能性が示唆された。

本章では、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配位子を用いることで、メタボリックトラップに基づく活性酸素の PET イメージングを行うための基礎的な知見を得ることができた。

第2章 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ を用い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

序論

中性条件下における $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^3$ は、配位子のスルホン酸に由来する負電荷を帯びるため、細胞膜を通過しないと考えられている。一方で、脂溶性の高いカチオンは、一般的に細胞膜透過性が高いと考えられている(Pauwels et al. 1998)。そこで、BCS の分子構造から、負電荷の原因となるスルホン酸ナトリウムを除去した Cu^{I} 選択的配位子である bathocuproine (BC) を用いて、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ および $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ を合成した。合成した錯体を用い、第1章で行った ROS との反応性の評価および細胞取り込み試験を行った。図18にこの章で使用した配位子と錯体の構造を示す。

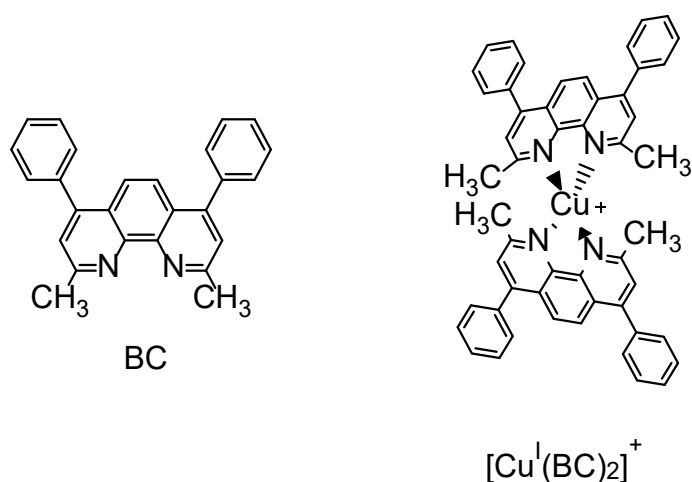


図18 今回検討した配位子と銅錯体の構造

実験方法

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の合成

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ は、斉藤ら (Saito, Nishikawa and Tsubomura, 2018) の方法を参考に合成した。簡単に述べると、11.01 mg (61 μmol) の BC を 10 mL の DMF に溶解した。溶解には、超音波と攪拌を用いた。25 mL フラスコに 1.20 mg (11.3 μmol) の CuCl を、 N_2 (>99.99%, Air Water) 雰囲気下で加えた。次に、3.70 mL の BC 溶液 (BC : 22.6 μmol) を攪拌しながら室温でフラスコに加えた。溶液の色は直ちに褐色に変化した。攪拌は 30 分後に終了した。TLC 分析の結果、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の Rf 値は 0.80 であった (表 4)。この反応液を $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ ストック溶液として、精製することなく以降の実験に使用した。ESI-MS は、solarix® (Brucker Co.) を用いて測定した。ESI-MS: calculated for $\text{C}_{52}\text{H}_{40}\text{CuN}_4$, 783.25; found 783.25 [M^+] (Supplement).

表 4 本研究で使用した銅錯体の TLC 分析条件と Rf 値

錯体	TLC 相	移動相	Rf 値
$[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$	順相	メタノール/10 wt%酢酸ア ンモニウム溶液=9 : 1 (v : v)	0.80

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ と ROS との反応

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ を $\cdot\text{OH}$ 、 LOOH 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 と反応させた。まず、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ のストック溶液を 0.1M 酢酸バッファー (pH 5) で 100 μM に希釈した。次に、希釈した $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ 溶液 100 μL を 96 ウェルプレートのウェルに加えた ($n=3$)。次に、2 mM の ROS (ROS 濃度は基質の濃度で定義) 溶液 100 μL を各ウェルに加えた。37°C で 30 分間インキュベートした後、吸光度 ($[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$; 495 nm) をプレートリーダー (POWER SCAN HT) で測定した。

$[\text{64Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の合成

$[\text{64Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の合成は、以下の手順で行った。500 μL のプラスチックチューブに、0.4 mM BC DMF 溶液 25 μL 、超純水 18.5 μL および 10 mM L-アスコルビン酸ナトリウム水溶液 5 μL をそれぞれ加えた。次に、1 μL の 5% SDS 水溶液を加えた。最後に、同量の 0.05 M HCl (ICP 用、関東化学) で希釈した $[\text{64Cu}]\text{Cu}^{2+}$ 溶液 (PDR ファーマ) 0.5 μL (約 1 MBq) を加え、溶液を 60°C で 10 分間加熱した。加熱後、TLC および HPLC 分析を行った。

HPLC 分析条件: 移動相 A: 10 mM リン酸バッファー (pH 6) B: MeOH B: 95% 0-9 min, 流速: 3 mL/min, カラム COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (5 μm , 4.6 $\times$ 150 mm; ナカライテスク) 検出器: UV (測定波長 254 nm) および RI (NaI(Tl), Gabi star®, Elysia Raytest Co., Straubenhardt, Germany, 10000 cps = 1 V, 時定数 5 s), 注入量; 10 μL

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ と ROS との反応

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ を $\cdot\text{OH}$ 、 LOOH 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ および H_2O_2 と反応させた。具体的には、5 μL の 10 mM ROS 溶液 (ROS 濃度は基質の濃度で定義した) に対し、40 μL の 0.1 M 酢酸バッファー (pH 5) を加えた後、5 μL の $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ (約 100 kBq、BC 濃度 200 μM) を加えた。37°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、ROS との反応の確認は、HPLC のピーク面積を比較することで反応を確認した。分析条件; 移動相: A: 10 mM リン酸バッファー (pH 6), B: MeOH B: 95% 0 - 9 min, 流速: 3 mL/min, カラム: COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (5 μm , 4.6 $\times$ 150 mm; ナカライテスク), 検出器: UV (254 nm) および RI (NaI(Tl), Gabi star[®], 10000 cps = 1 V, 時定数 5 s), 注入量; 45 μL

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ in vitro 細胞取り込み試験

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の合成は、BCS 濃度が 2 mM であることを除き、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の合成に記載した方法と同様に合成した。HT-1080 細胞をタイプ I コラーゲンコートプレート (AGC テクノグラス株式会社) に 1 ウェルあたり 1×10^5 個の密度で播種し、一晚接着させた。翌日、細胞を 10 μM IKE 単独または 10 μM IKE + 1 μM Fer-1 を含む培地中で、37°C、5% CO₂ 環境下で、6 時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を HBSS バッファーで 2 回洗浄し、HBSS バッファーで希釈した $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ (10 kBq, BC 濃度 8 μM) を加えて、37 °C で 30, 60, 120 分間インキュベートした。総インキュベーション量は 500 μL に調整した。インキュベーション後、各ウェルを 500 μL の氷冷 HBSS バッファーで 2 回洗浄した。0.1% SDS を含む 0.25 M NaOH で 37 °C、15 分間インキュベートして細胞を溶解し、オートウェル γ カウンター (2480 WiZARD²) を用いて放射能を測定した。各細胞溶解液のタンパク質濃度は、micro-BCA assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、製品の説明書に従って測定した。結果は、タンパク質 1 ミリグラムあたりの投与放射エネルギー (% dose/mg protein) で示した。得られた結果について、第 1 章で記載した $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の取り込み試験結果と比較した。

実験結果

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ と ROS との反応

図 19 に、ROS と反応後の吸光度変化を示す。 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の吸光度の変化は、 $\cdot\text{OH}$ で一番大きく、次いで LOOH において減少した。一方で、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ および H_2O_2 では変化が見られなかった。

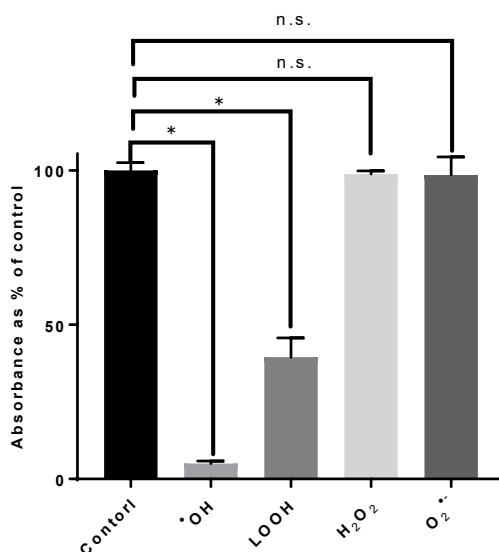


図 19 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の 4 種類の活性酸素との反応性 エラーバーは平均値 $\pm$ SD を表す (n=3)。統計解析は、One-way-ANOVA 解析の後に Dunnet's の多重比較検定を用いて行った。*は $p < 0.001$ 、n.s.は有意差なしを示す。

$[\text{64Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の合成

図 20 に、 $[\text{64Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ を TLC 分析した際の ARG を示す。 $[\text{64Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ は、TLC 上でテーリングした。一方で、HPLC 分析 (図 21) では、RI ピークは 1 つであり放射化学的純度は 98%以上だった。

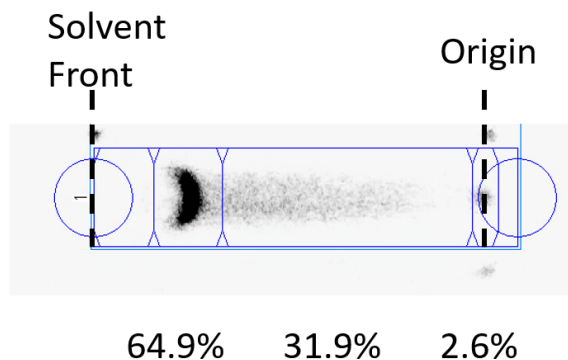


図 20 $[\text{64Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の TLC 分析結果
TLC 下部の数値は、放射能の割合

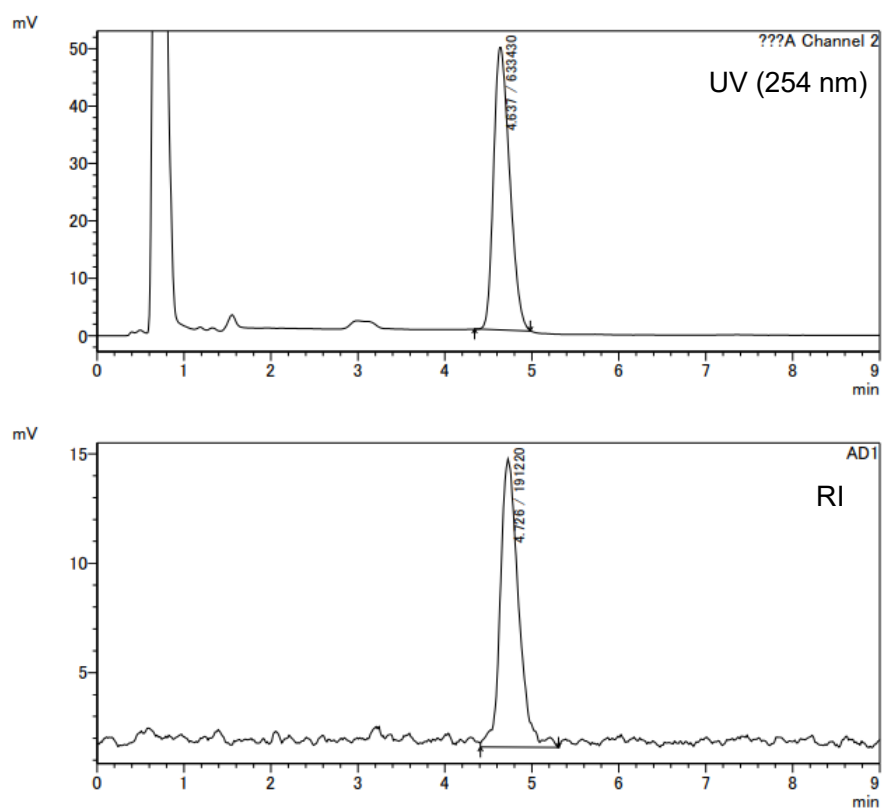


図 21 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ を $[\text{nat}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ (2 nmol) とともに HPLC 分析した際のクロマトグラム
 上段:UV (254 nm), 下段:RI 検出器 ピーク横の数値は 保持時間/ピーク面積

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ と ROS との反応

図 22 に、ROS との反応後のピーク面積を示す。各溶液の HPLC 分析における $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ のピーク面積は、 $\cdot\text{OH}$ のみが有意に減少した。また、ピーク面積の標準偏差は、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ で使用した RP-TLC 分析の結果と比べると大きい。

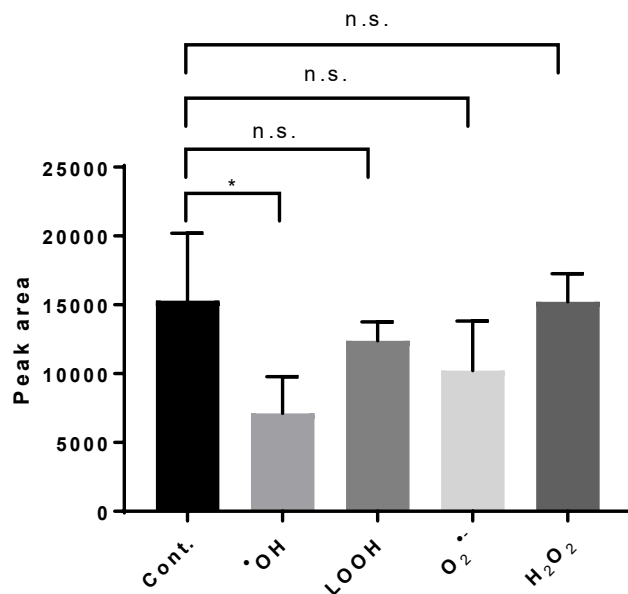


図 22 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の 4 種類の活性酸素との反応性。エラーバーは平均値 $\pm$ SD を表す($n = 3$)。統計解析は、One-way-ANOVA 解析の後に Dunnet's の多重比較検定を用いて行った。*は、コントロール群に対し $p < 0.001$ 、n.s. はコントロール群に対し有意差なしを示す。

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の細胞取り込み試験

図 23 に IKE 処置および IKE+フェロスタチン-1 処置を行った HT-1080 細胞の $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の取り込みの経時変化を示す。

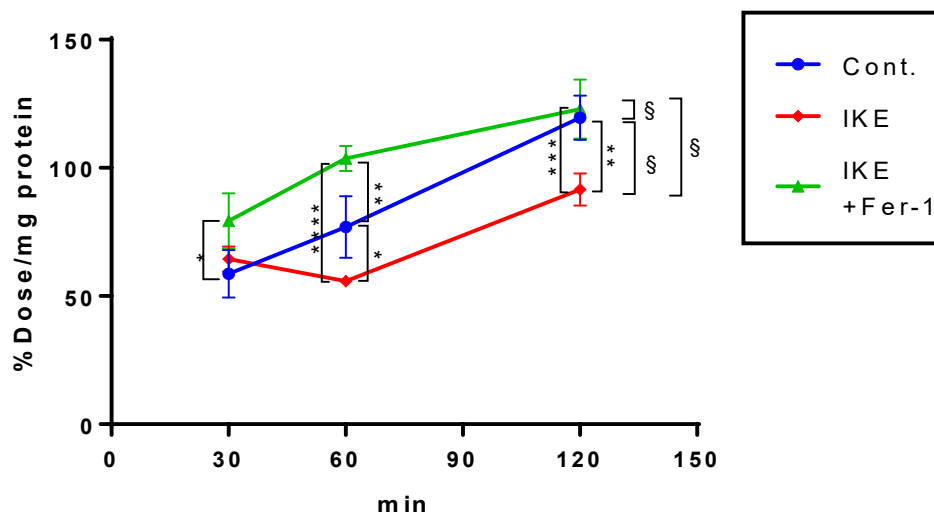


図 23 HT-1080 細胞の $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の取り込み Cont.; コントロール群, IKE; IKE 処置群, IKE + Fer-1; IKE および Fer-1 処置群 エラーバーは平均値 $\pm$ SD を表す (n=3)。統計解析は、Two-way-ANOVA 解析の後に Turkey's の多重比較検定を行った。*; p<0.05、**; p<0.01、***; p<0.005、****; p<0.0001、§; 群間に有意差ありを示す。

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の取り込みは、コントロール群と IKE+Fer-1 処置群においては、経時的に取り込みが増加した。一方で、IKE 処置群においては、60 分の取り込みは 30 分の取り込みよりやや低下しその後増加した。Two-way-ANOVA 解析の結果、3 群間には相互に有意差が見られた。各処置時間での取り込みを統計解析したところ、処置時間 30 分ではコントロール群と IKE+Fer-1 処置群のみ有意差があった。加えて、処置時間 60 分では全ての群間において取り込みの有意差があり、処置時間 120 分においては IKE 処置群とそのほかの群間に有意差があった。

考察

第1章で検討した、 $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ は中性条件下では負電荷を帯びるため、細胞膜を通過しないと考えられている。一方で、脂溶性の高いカチオンは、細胞膜透過性が高いと考えられている (Pauwels et al. 1998)。そこで、BCS の分子構造から、負電荷の原因となるスルホン酸ナトリウムを除去した配位子である bathocuproine (BC) の Cu^{I} 錯体 $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ を用い、脂溶性の高いカチオン性錯体とすることで、錯体の細胞膜透過性が向上すると考えた。

非放射性錯体である $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ を合成し ROS と反応させたところ、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ に特徴的な吸光度 (Ruthkosky, Castellano & Meyer, 1996) が $\cdot\text{OH}$ と LOOH では減少した。この実験結果は、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の結果と同様であり、ROS が持っている酸化還元電位が高いほど、酸化反応が進む結果となった。

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の酸化還元電位は、0.58 V との報告があり (Ruthkosky, Castellano & Meyer, 1996)、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ とほぼ同じ酸化還元電位であることから、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と同様の結果になったと考えられる。

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の合成では、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ で用いた順相 TLC 分析系が、テーリングを起こして使用できなかった。理由としては、順相 TLC 上のシリカルのシラノール基が解離し負に帯電しているため (Baba, Yoneda & Muto, 1968)、カチオン錯体が分解または吸着した可能性がある。一方で、HPLC 分析においては RI 検出器のクロマトグラムから判断する限り非常に高い放射化学的純度であった。

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ と ROS との反応性試験では、 $\cdot\text{OH}$ のみが有意に減少した。このことから、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ と ROS との反応性試験の結果が部分的に再現できた。一方で、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ のピーク面積の標準偏差が TLC を用いた分析を行った $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と比べて非常に大きいため、得られた結果の信頼性は $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と比べて低い。

最後に、IKE でフェロトシス誘導を行った HT-1080 細胞での $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の経時的な取り込み変化を調べた。処置時間 30 分におけるコントロール群の $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の取り込み ($58.6 \pm 7.6\%$ dose/mg protein) は、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ ($41.5 \pm 1.8\%$ dose/mg protein) と比べて有意に増加した。この理由としては、使用する錯体を脂溶性の高いカチオン性錯体に変更することで、錯体の細胞膜透過性が増加したことが原因だと考えられる。しかしながら、IKE 処置群における $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の経時的な取り込みは、処置時間 30 分においてはコントロール群と統計的有意差はなく、60 分および 120 分では有意に減少し図 5 で示した仮説と逆の結果になった。この原因については、今後の詳細な検討が必要である。

結論

本章では、 $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の類似体であり、脂溶性の高いカチオン錯体である $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ を用いて第1章と同様の試験を行った。ROS と $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ および $[\text{64Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ との反応試験では、第1章に記載した $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と類似した結果の傾向が得られた。このことは、ROS による酸化によって $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ が酸化されたことを示唆している。HT-1080 細胞での $[\text{64Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の取り込みは $[\text{64Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と比べて増加した。これは使用する錯体を脂溶性の高いカチオン性錯体に変更することで、錯体の細胞膜透過性が増加したためであると考えられる。しかしながら、フェロトーシス誘導を行った HT-1080 細胞において $[\text{64Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の取り込みは、 $[\text{64Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の取り込みとは異なり、取り込み時間 30 分においてはコントロール群と有意差はなく、60 分および 120 分では有意に減少した。これらの原因については、今後の検討が必要である。

第3章 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp})_2]^+$ (dpp: ジフォスフィン) 錯体を用い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

序論

Cu^{I} と安定な錯体を形成する配位子として、ジフォスフィン (diphosphines; dpp) 系の配位子が知られている。また、dpp 配位子を用いて $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp})_2]^+$ 錯体を合成したという報告がある (Hungnes et al. 2023; J. S. Lewis et al. 2000)。さらに、この $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp})_2]^+$ 錯体は、血漿中でも安定であると報告されている (Hungnes et al. 2023)。このことは、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^3$ -最大の課題であった血漿中安定性を克服できる可能性がある。そこで、配位子が購入可能かつ合成手順が報告されている 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane および cis-bis(diphenylphosphino)ethene の2種類の配位子を用いて、かさ高いリポフェリックカチオンである $[\text{natCu}]\text{Cu}^{\text{I}}$ 錯体および $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{\text{I}}$ 錯体を合成し、ROS との反応性を評価した。図 24 に使用した配位子と錯体を示す。

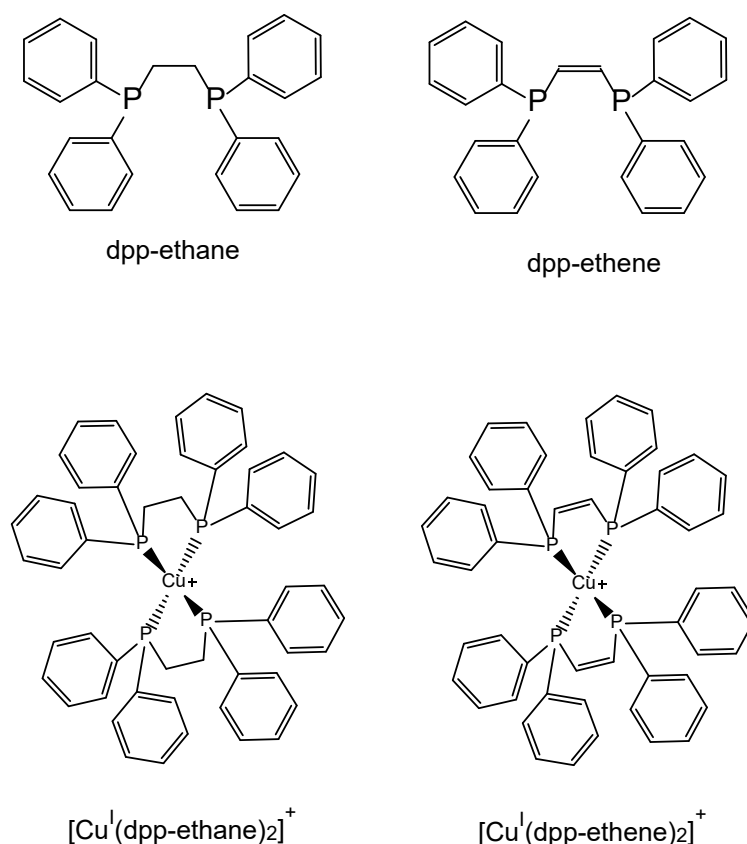


図 24 使用した配位子と銅錯体

実験方法

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp})_2]^+$ 錯体の合成

1,2-bis(diphenylphosphino)ethane (以下、dpp-ethane) および cis-bis(diphenylphosphino)ethene (以下、dpp-ethene) は、東京化成工業から購入し、精製を行わずにそのまま使用した。

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp})_2]^+$ および、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp})_2]^+$ の合成は、Lewis らの方法 (Jason S. Lewis, Zweit, and Blower 1998) と同様に dpp 配位子を過剰量入れることで、配位子により Cu^{2+} を還元し、 Cu^+ に配位させる合成経路を用いた。ナスフラスコに dpp-ethane または dpp-ethene 52 mg (0.13 mmol) を入れ、それぞれ熱したエタノール 3 mL および 2 mL に溶解させた。配位子を溶解させたエタノール溶液に、0.1 M $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mL (0.05 mmol) 水溶液を加えた。溶液をエバポレーションし、PLC (PLC Silica gel 60 F₂₅₄ 1 mm, Merck) にアプライし、分取薄層クロマトグラフィー精製 (Preparative Thin-Layer Chromatography; PTLC, 移動相; クロロホルム/酢酸=8:2 (v:v)) を行った。PLC 上の目的物 (R_f : 0.4) を含んだシリカゲルをスパーテルでかき取り、溶媒抽出 (溶媒: クロロホルム:エタノール 8:2 = (v:v)) を行った。抽出した溶液をエバポレーション後、いずれも白色の粉末が得られた ($[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$; 38.3 mg, 収率: 89%, $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethene})_2]^+$; 44.1 mg, 収率: 99%)。

ESI-MS は、solarix® (Brucker Co.) を用いて測定した。 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ ESI-MS :calculated for $\text{C}_{52}\text{H}_{48}\text{CuP}_4$, 859.20; found, 859.20 $[\text{M}]^+$. $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethene})_2]^+$ ESI-MS :calculated for $\text{C}_{52}\text{H}_{44}\text{CuP}_4$, 855.17; found, 855.17 $[\text{M}]^+$ (Supplement).

表 5 本研究で使用した銅錯体の TLC 分析条件と R_f

錯体	TLC 相	移動相	R_f 値
$[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$	順相	生理食塩水/アセトニトリル =6:4 (v:v)	0.60
$[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$	順相	クロロホルム/酢酸=8:2 (v:v)	0.40
$[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$	順相	生理食塩水/アセトニトリル =6:4 (v:v)	0.60
$[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethene})_2]^+$	順相	クロロホルム/酢酸=8:2 (v:v)	0.40

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp})_2]^+$ 錯体と ROS の反応

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp})_2]^+$ 錯体を、 $\cdot\text{OH}$ と反応させた。合成した $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp})_2]^+$ 錯体を DMSO に溶解させ、200 μM の $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp})_2]^+$ 錯体のストック溶液を作成した。この溶液 100 μL を 1 mM ROS 溶液 900 μL で希釈した後、37°C 30 分間インキュベートした。なお、ROS の発生方法については、ROS の基質の希釈に PBS(-)を

用いたこと以外は、第 1 章と同様に行った。インキュベート後、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp})_2]^+$ の HPLC 分析を行い、錯体のピーク面積を比較した。

HPLC 分析条件：移動相; A:水 (0.1% TFA), B:MeOH (0.1%TFA), B:70-100-100%, 0-20-30min, 流速; 1 mL/min, カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (5 μm , 4.6 x 150 mm; ナカライテスク), 測定波長; 254 nm, 注入量; 50 μL

$[\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ 錯体の合成

$[\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ の合成は、以下の手順で行った。まず、200 μM dpp-ethane DMSO 溶液 10 μL を、0.1 M 酢酸バッファー (pH 5) 87 μL が入った 500 μL のプラスチックチューブに加えた。次に、1 μL の 5% SDS 水溶液を加えた。最後に、 $[\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ 溶液 1 μL (約 200 kBq) を加え、溶液を室温で 10 分間インキュベートした。インキュベート後、TLC 分析を行った。さらに、dpp-ethane DMSO 溶液の濃度を 20 μM , 10 μM にして合成を行った。

$[\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ 錯体と ROS との反応

$[\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ と ROS の反応は、dpp-ethane の濃度 10 μM で合成した $[\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ を $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 と反応させた。10 μL の 10 mM ROS 溶液 (ROS 濃度は基質の濃度で定義した) に対し、80 μL の D-PBS (-) を加えた後、10 μL の $[\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ (約 10 kBq、dpp-ethane 濃度 10 μM) を加えた。その後、37°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、TLC 分析を行うことで、ROS との反応の確認をした。

実験結果

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp})_2]^+$ 錯体と ROS の反応

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ と $\cdot\text{OH}$ の反応前後の溶液の HPLC のクロマトグラムを図 25 に示す。 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethene})_2]^+$ と $\cdot\text{OH}$ の反応前後の HPLC のクロマトグラムを図 26 に示す。

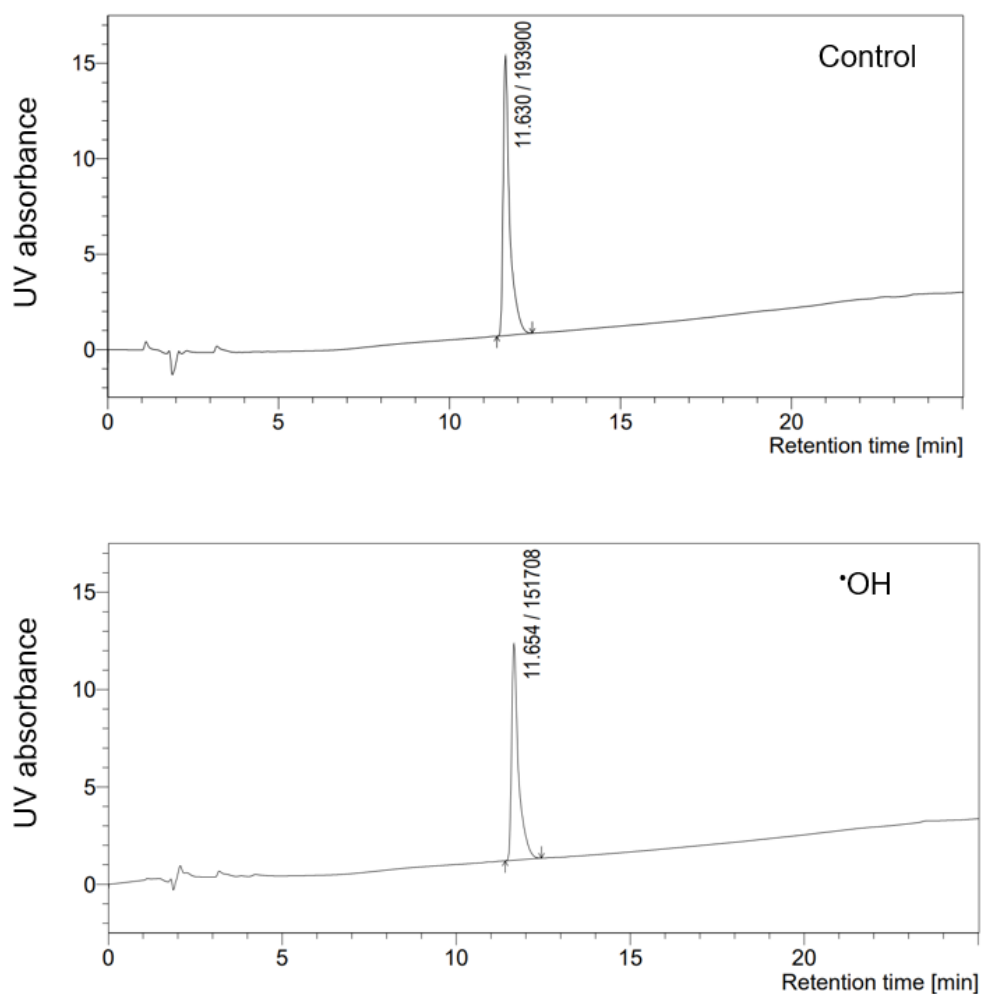


図 25 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ と $\cdot\text{OH}$ の反応前後の HPLC クロマトグラム
上段:コントロール (PBS で希釈), 下段: $\cdot\text{OH}$ と反応後
ピーク横の数値は 保持時間/ピーク面積

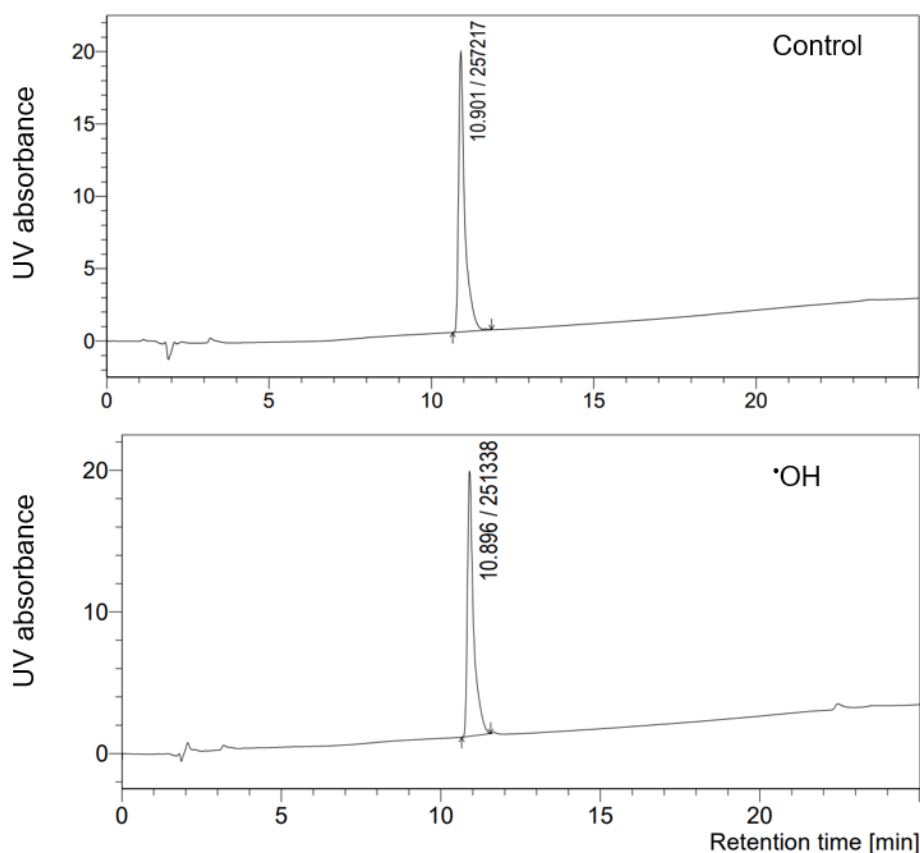


図 26 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ と $\cdot\text{OH}$ の反応後のクロマトグラム
上段: コントロール (D-PBS で希釈), 下段: $\cdot\text{OH}$ と反応後
ピーク横の数値は 保持時間/ピーク面積

表 6 $\cdot\text{OH}$ と反応後のピーク面積の割合 (コントロール比)

$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$	$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$
77.8 $\pm$ 4.0	96.3 $\pm$ 2.3

図 25 では、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ と $\cdot\text{OH}$ を反応させた溶液を HPLC 分析したところ、保持時間 11.6 分の $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ のピークがコントロール比で 22% 減少した (表 6, $p = 0.05$, $n = 3$)。一方で、図 26 に示すように $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ と $\cdot\text{OH}$ を反応させた溶液を HPLC 分析したところ、保持時間 10.9 分の $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ のピークは有意に減少しなかった。なお、 $\text{O}_2\cdot^-$ および、 H_2O_2 の反応後では、いずれの $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp})_2]^+$ 錯体ともピーク面積は減少しなかった ($n = 2$)。

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ 錯体の合成

図 27 に、TLC の ARG を示す。溶液の dpp-ethane 濃度が、200 μM の場合 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ 錯体の放射化学的収率は、95%であった。配位子濃度を 10 μM まで減少させても放射化学的収率は、82%であった。

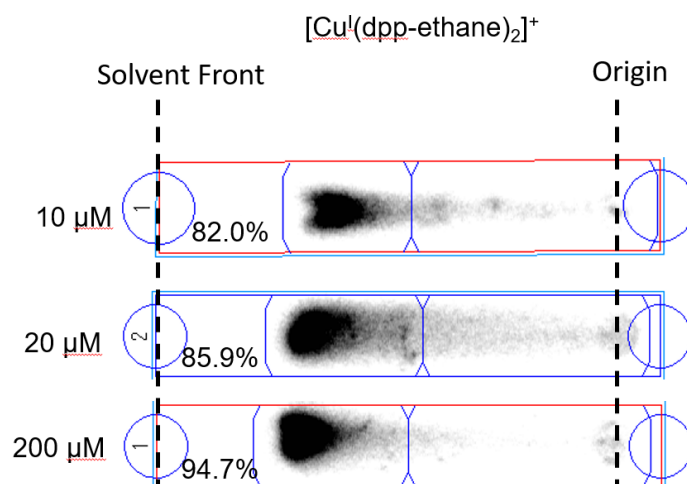


図 27 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ TLC 分析結果
dpp-ethane 濃度 10 μM (上) 20 μM (中) 200 μM (下)。TLC 上の数値は $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ の放射化学的純度 [%] を示す

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ と ROS との反応

図 28 に、ROS と反応後の TLC の ARG を示す。ROS によって、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ の未変化体の割合は減少しなかった。

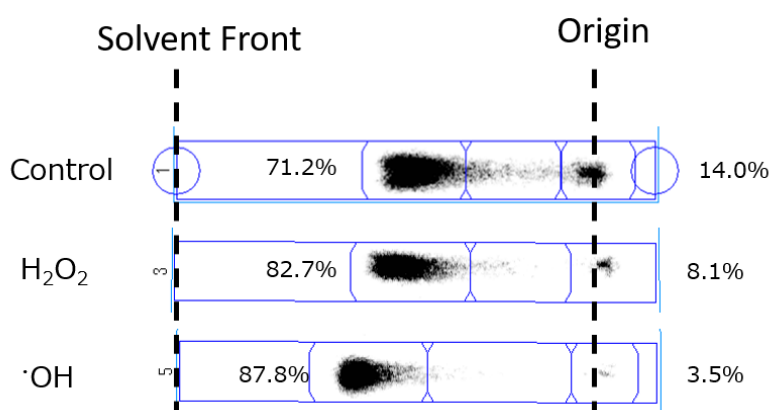


図 28 ROS と反応後の $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ 溶液の TLC 分析結果
(上) コントロール (中) H_2O_2 (下) $\cdot\text{OH}$, Solvent front 側の数値は $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ の放射化学的純度、原点側の数字は原点の放射能の割合。dpp-ethane 終濃度: 1 μM , ROS (あるいは ROS の基質) 濃度 1 mM

考察

本章では、血漿中で安定なことが知られている $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp: ジフオスフィン})_2]^+$ 錯体を合成し、ROS との反応性を評価した。

非放射性錯体である、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ および $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethene})_2]^+$ を合成し ROS と反応させたところ、HPLC 分析において $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ のピークが $\cdot\text{OH}$ との反応後において有意に減少した。一方で、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethene})_2]^+$ と $\cdot\text{OH}$ との反応では、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethene})_2]^+$ のピークは減少しなかった。これらの結果については、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ および $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethene})_2]^+$ の酸化還元電位がそれぞれの錯体で異なることに起因していると考えられる。また、 $\cdot\text{OH}$ との反応後の溶液の HPLC 分析において、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ のピークの減少割合は、第 1 章、第 2 章で検討した $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^3$ 、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の吸光度の減少より少なかった。このことから、 $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ の酸化還元電位は、 $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^3$ 、 $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ (約 0.6 V) よりも高いことが示唆される。そのため、酸化力の強い $\cdot\text{OH}$ (酸化還元電位 2.3 V) との反応後でも、 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ 錯体は大部分が酸化されず未変化体のままであったと考えられる。

次に、 $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ の合成を行った。 $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ 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く、希釈に対する安定性が示唆された。

一方で、 $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ と ROS との反応後の溶液を TLC 分析したところ、 $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ の未変化体の割合がいずれの ROS 反応後でも減少していなかった。原因として、前述した $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ の酸化還元電位の高さに起因する安定性の高さのほかに、錯体を形成していない dpp-ethane の影響が考えられる。 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ と $\cdot\text{OH}$ を反応させる実験では、錯体を形成していない dpp-ethane が存在しない条件で $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ に対し $\cdot\text{OH}$ を反応させた。一方で、 $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ と $\cdot\text{OH}$ との反応時には $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ に対して大過剰の dpp-ethane 存在下で反応を行った。実験方法に記載しているように、dpp-ethane は還元性を持つことから、 $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ が ROS により酸化された結果放出された $[\text{Cu}^{\text{I}}]\text{Cu}^{2+}$ が dpp-ethane によって再度還元され $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ 錯体を形成した可能性も考えられる。

結論

本章では、血漿中で安定なことが知られている $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp: ジフオスフィン})_2]^+$ 錯体を合成し、ROS との反応性を評価した。

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ 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く、希釈に対する安定性が示唆された。

一方で、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ と $\cdot\text{OH}$ との反応後の溶液を TLC 分析したところ、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ の未変化体の割合は減少していない結果となった。原因として、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ の酸化還元電位が第 1 章で検討した $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^3$ より高い可能性に加えて、錯体を形成していない dpp-ethane の影響が考えられる。

総括

本研究では、以下の知見が得られた。

第 1 章では、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の錯体の崩壊は ROS の酸化還元電位との関連性が示唆された。

また、安定性評価として希釈安定性を評価した。合成した $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{\text{I}}$ 錯体の希釈安定性は、配位子の安定度定数との関連性が示唆された。

in vitro 実験において、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ は、フェロトーシス誘導を行ったがん細胞への取り込みが促進された。細胞への取り込み機序については、カチオンの膜透過によるものではなく、フェロトーシス誘導に伴う細胞膜透過性の亢進によって取り込まれたことが示唆された。

一方で、血漿中の $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の安定性は低かった。ヒト血漿中の $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の分解においては、会合経路が関与している可能性が示唆された。

第 2 章では、 $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の類似体であり、脂溶性の高いカチオン錯体である $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ を用いて第 1 章と同様の試験を行った。ROS と $[^{\text{nat}}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ および $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ との反応試験では、第 1 章に記載した $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と類似した結果の傾向が得られた。このことは、ROS によって $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ が酸化されたことが示唆される。一方で、フェロトーシス誘導を行った、HT-1080 細胞での $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$ の取り込みは、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ と反対に未処置群と比べて減少した。この原因については、様々な要因が考えられるため更なる検討が必要である。

第 3 章では、血漿中で安定なことが知られている $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp: ジフオスフィン})_2]^+$ 錯体を合成し ROS との反応性を評価した。

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ の放射化学的収率は、配位子濃度がこれまで検討してきた錯体の中で最も高く、希釈に対する安定性が示唆された。

一方で、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ と $\cdot\text{OH}$ との反応後でも、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ の未変化体の割合は変化していなかった。原因として、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ の酸化還元電位が第 1 章で検討した $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ より高い可能性や、錯体を形成していない dpp-ethane の影響が考えられる。

表 7 に本研究で検討した錯体についてまとめる。

表 7 本研究で検討した $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu(I)}$ 錯体のまとめ

	第 1 章 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$	第 1 章 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$	第 2 章 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$	第 3 章 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$	第 3 章 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$
錯体の 合成	△	○	○	○	○
ROS 反応性	○	○	△	×	×
細胞膜 透過性	Not evaluated (△)	△	○	○ (Lewis et al., 2000)	○ (Lewis et al., 2000)
生体内 安定性	×	×	Not evaluated (×)	○ (Lewis et al., 2000)	○ (Lewis et al., 2000)

各実験結果は、新しい $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}(\text{I})$ 標識錯体を用いた活性酸素の PET イメージングのためのドラッグデザインに要求される因子として、 $\text{Cu}(\text{I})$ 錯体の ROS との反応性、細胞膜透過性、生体内での安定性が重要であることを示している (表 7)。また ROS との反応性については $\text{Cu}(\text{I})$ 錯体の酸化還元電位、細胞膜透過性については錯体の電荷、生体内の安定性については錯体のかさ高さがそれぞれの評価指標となることが示唆された。

本研究成果は、これらに関する基礎的な知見を供するものであり、今後の $\text{Cu}(\text{I})$ 選択的配位子を活性酸素の非侵襲的 PET イメージングに応用するための重要な評価指針となると考えられる。

謝辞

本研究の全過程において、ご指導、ご助言を賜りました久下裕司教授、水野雄貴助教に厚くお礼申し上げます。また、本研究論文を査読していただき、貴重なご意見をいただきました、副査の合川正幸教授に深く感謝いたします。

さらに、安井博宣准教授 (北海道大学大学院獣医学研究院)、柴田悠貴博士 (Urologic Oncology Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institution of Health) の貴重な見識とコメントを頂き深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、博士号取得の機会を与えて頂いた株式会社アトックスに感謝の意を表します。

加えて、研究中のストレス発散に付き合っていた中塩信行博士 (株式会社アトックス技術開発センター)、中島宏教授 (北海道大学大学院工学研究院)、吉田善行博士 (原子力規制庁原子力規制部) に感謝します。

最後に、荒れ果てた部屋の片づけ等身の回りの世話をしていただいた家族にも感謝します。

本研究は JSPS 科研費 21K19433 の助成を受けたものです。

補足情報

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ の HPLC 分析

HPLC 分析条件：移動相; A: 10 mM リン酸バッファー (pH 6), B: MeOH, B:10-40-40%, 0-10-15 min, 流速; 1 mL/min, カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (5 μm, 4.6 x 150 mm; ナカライテスク), 測定波長; 254 nm, 注入量; 10 μL

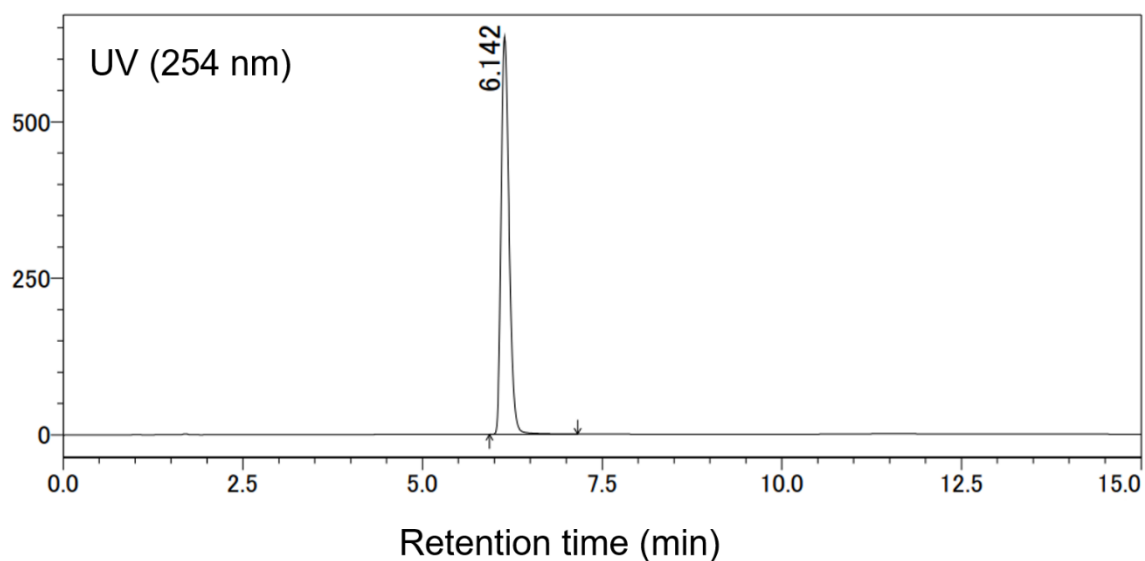


Figure S1. BCA の HPLC 分析 (2 nmol)

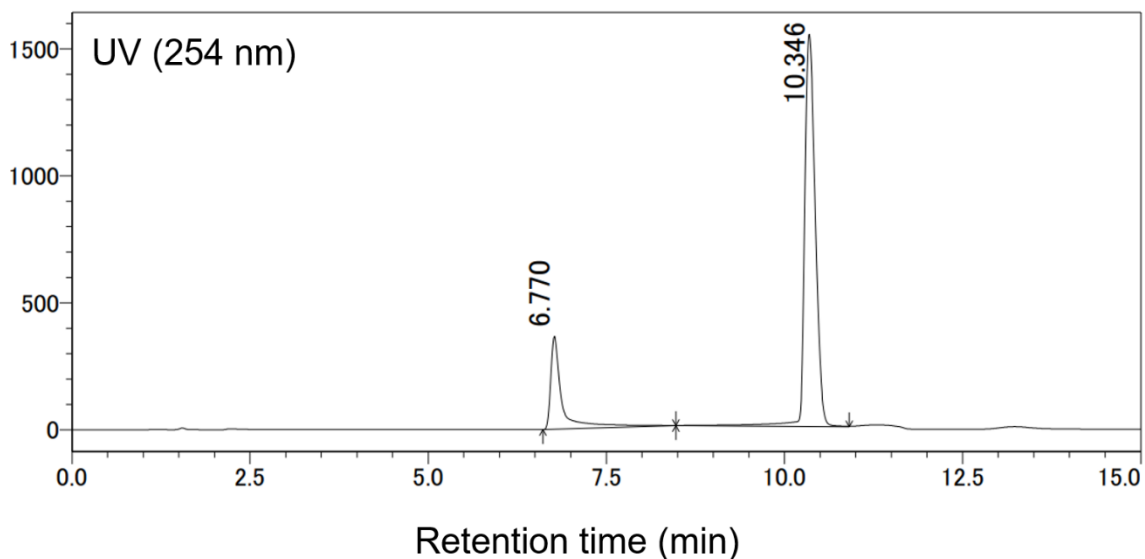


Figure S2. $[^{\text{nat}}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ の HPLC 分析 (10 nmol).

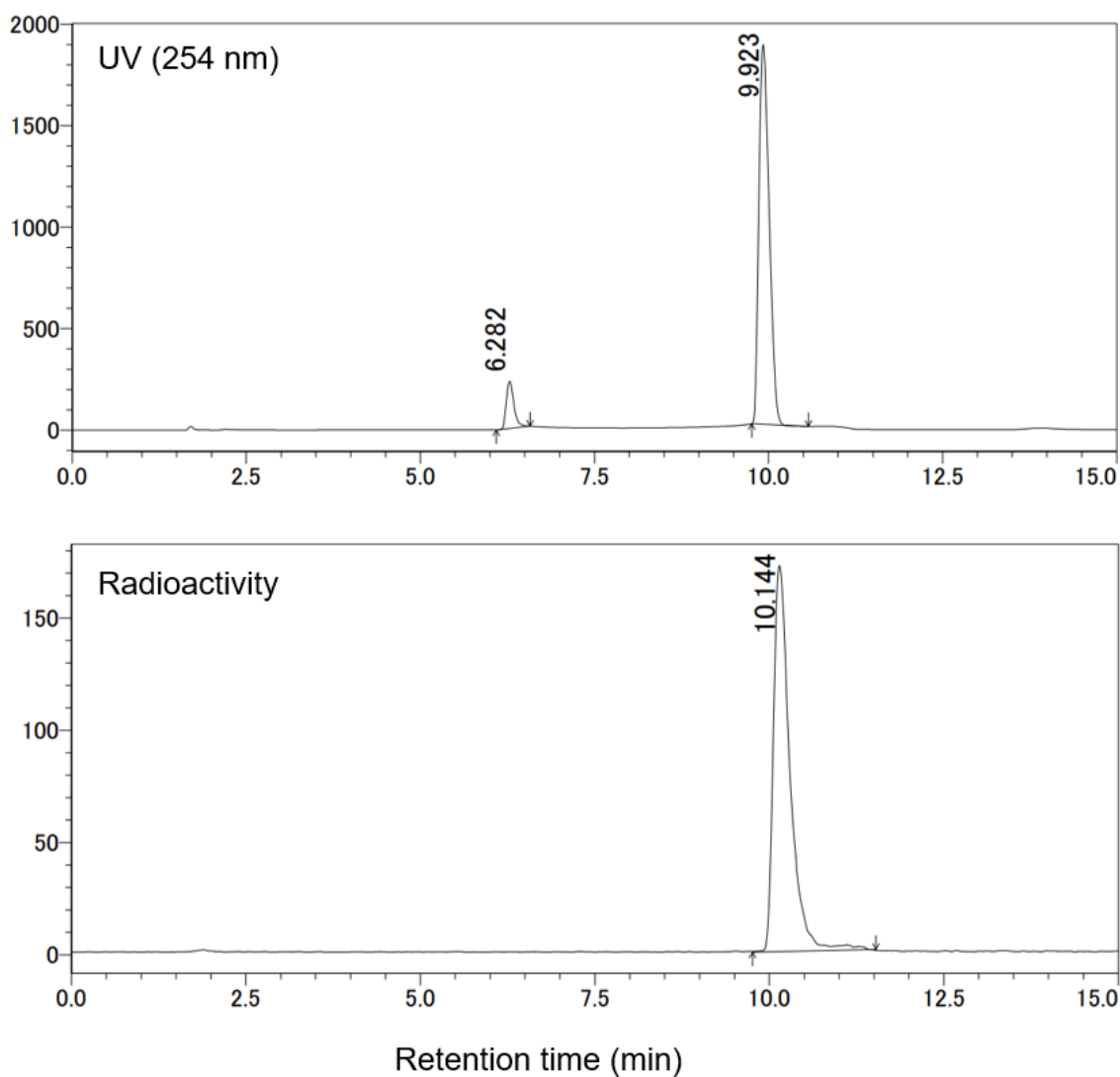


Figure S3. ^{64}Cu 標識反応を行った BCA 溶液の HPLC 分析
 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ (10 nmol) を標品として同時にインジェクションした

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の HPLC 分析

HPLC 分析条件：移動相; A: 10 mM リン酸バッファー (pH 6), B: MeOH, B: 40-40-60% (0-5-20 min), 流速; 1 mL/min, カラム; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (5 μm, 4.6 x 150 mm; ナカライテスク), 測定波長; 254 nm, 注入量; 10 μL

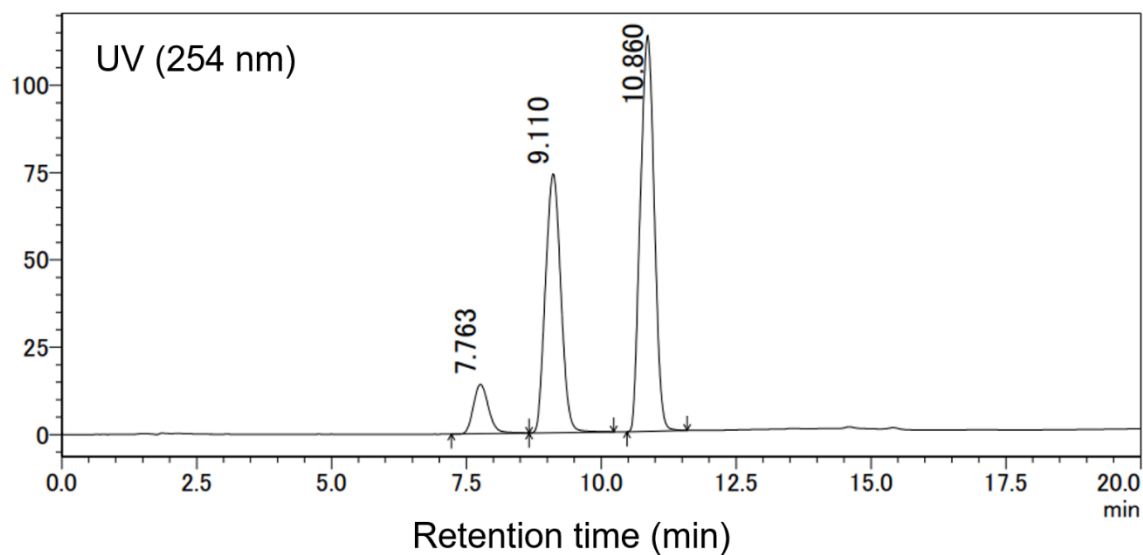


Figure S4. $[^{\text{nat}}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の HPLC 分析 (2 nmol).

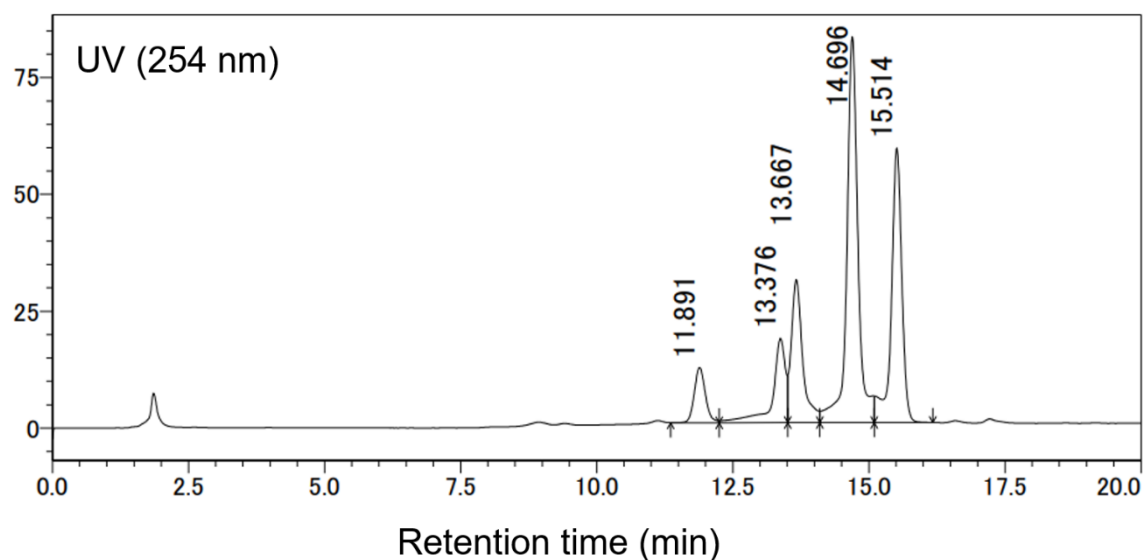


Figure S5. $[^{\text{nat}}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の HPLC 分析 (1 nmol)

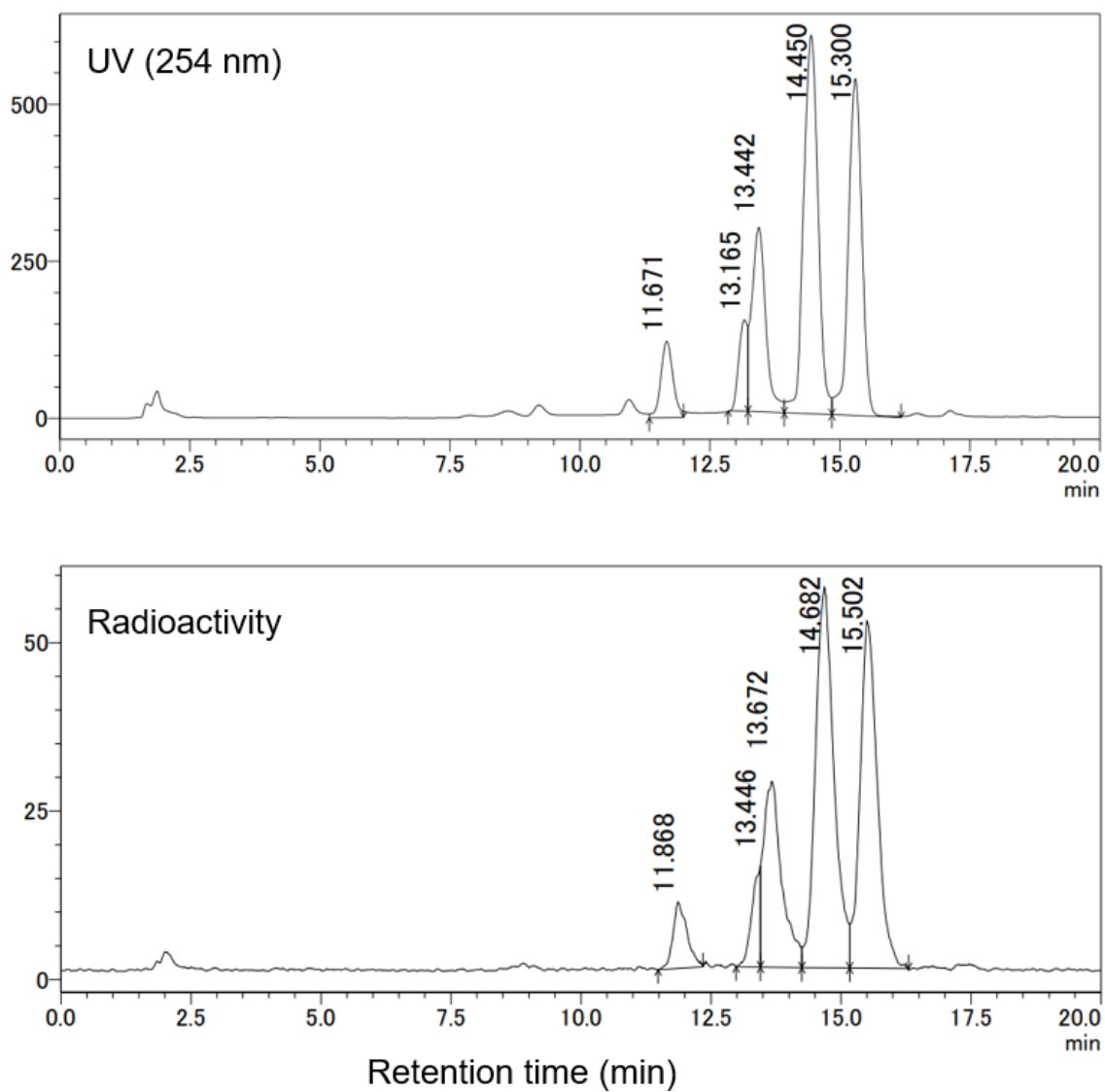


Figure S6. ^{64}Cu 標識反応を行った BCS 溶液の HPLC 分析
 $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ (10 nmol) を標品として同時にインジェクションを行った

TEPA の合成

TEPA 精製時の HPLC クロマトグラムを図 S7 に示す。

〈クロマトグラム〉
mV

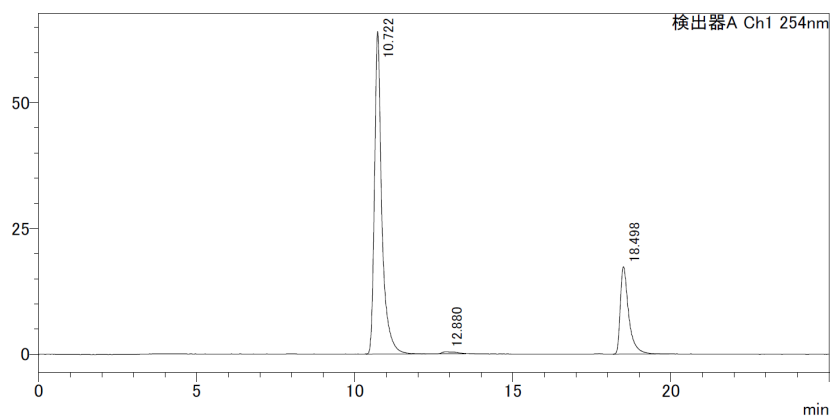
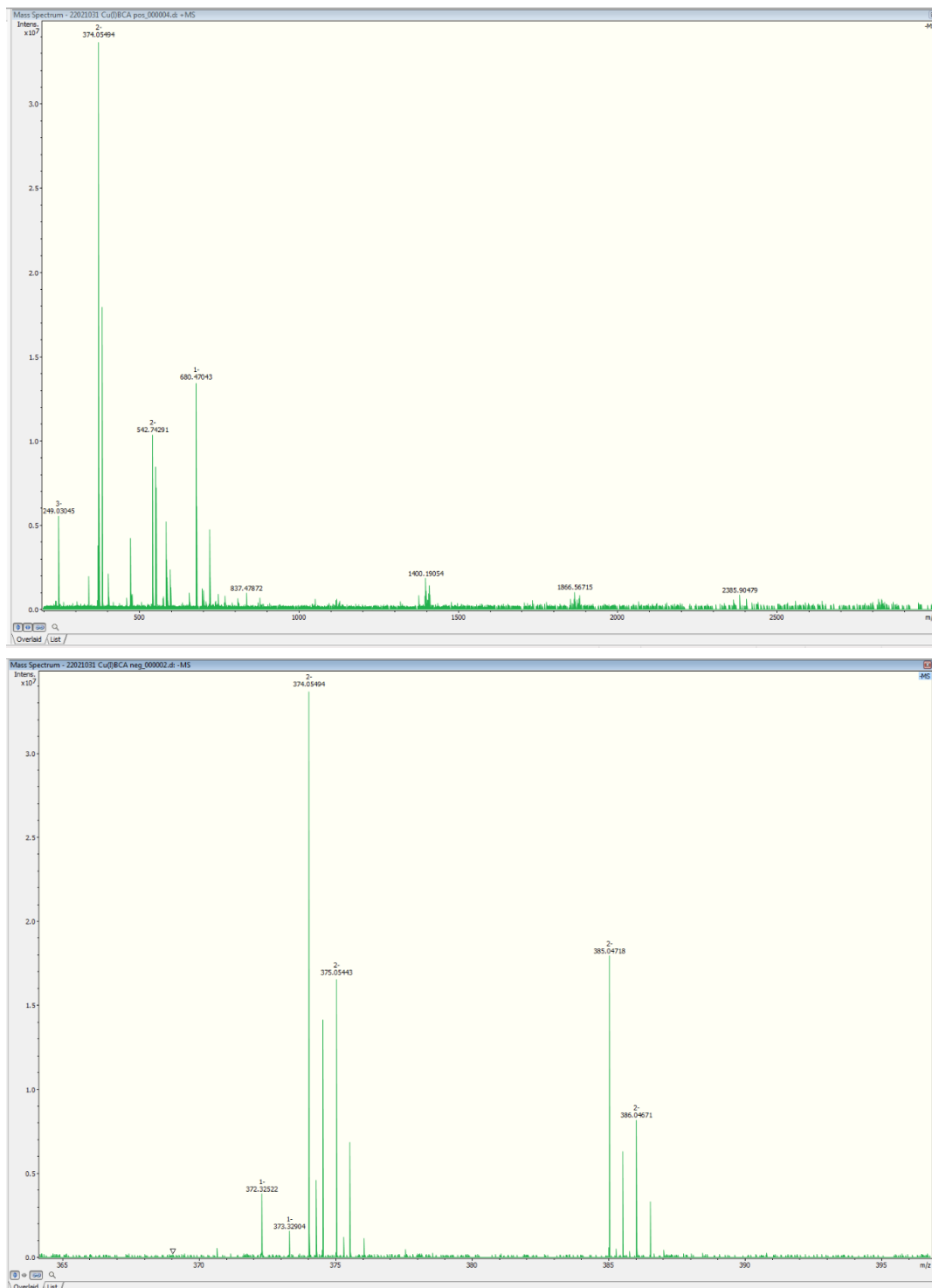


図 S7 TEPA 精製時の HPLC クロマトグラム

図 S7 に示すように、還流後の反応溶液に対して実施した HPLC 分析では、クロマトグラムのピークは 10.5 分と 18.5 分の 2 つのピークが観察された。それぞれのピークを分取し、ESI-MS 測定を行ったところ、10.5 分のピークは $m/z = 228.14$ が観測され、これは原料の 2 量体 ($C_{14}H_{17}N_3$ calculated 227.14) の $[M+H]^+$ であると判断した。一方、18.5 分のピークは、 $m/z = 332.20$ が観測されたため、目的物である TEPA ($C_{21}H_{24}N_4$, calculated 333.20) の $[M]^+$ であると判断し、18.5 分のピークのフラクションを濃縮した。

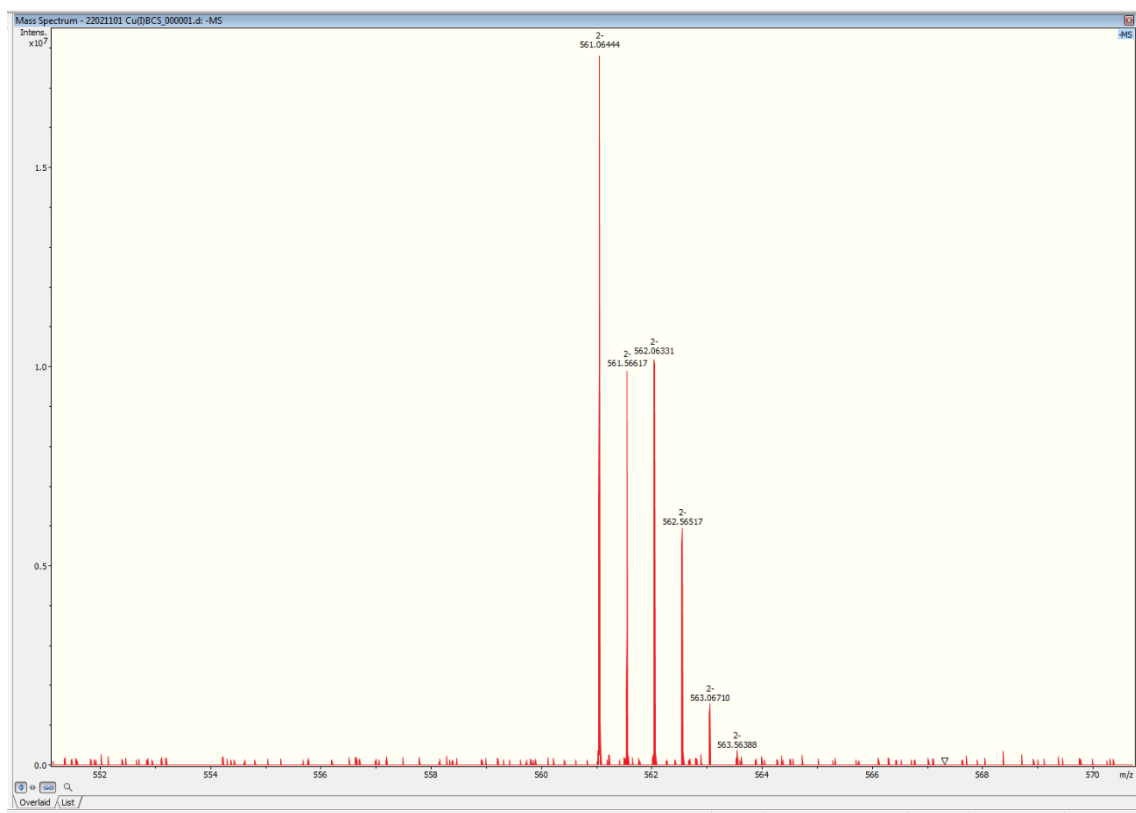
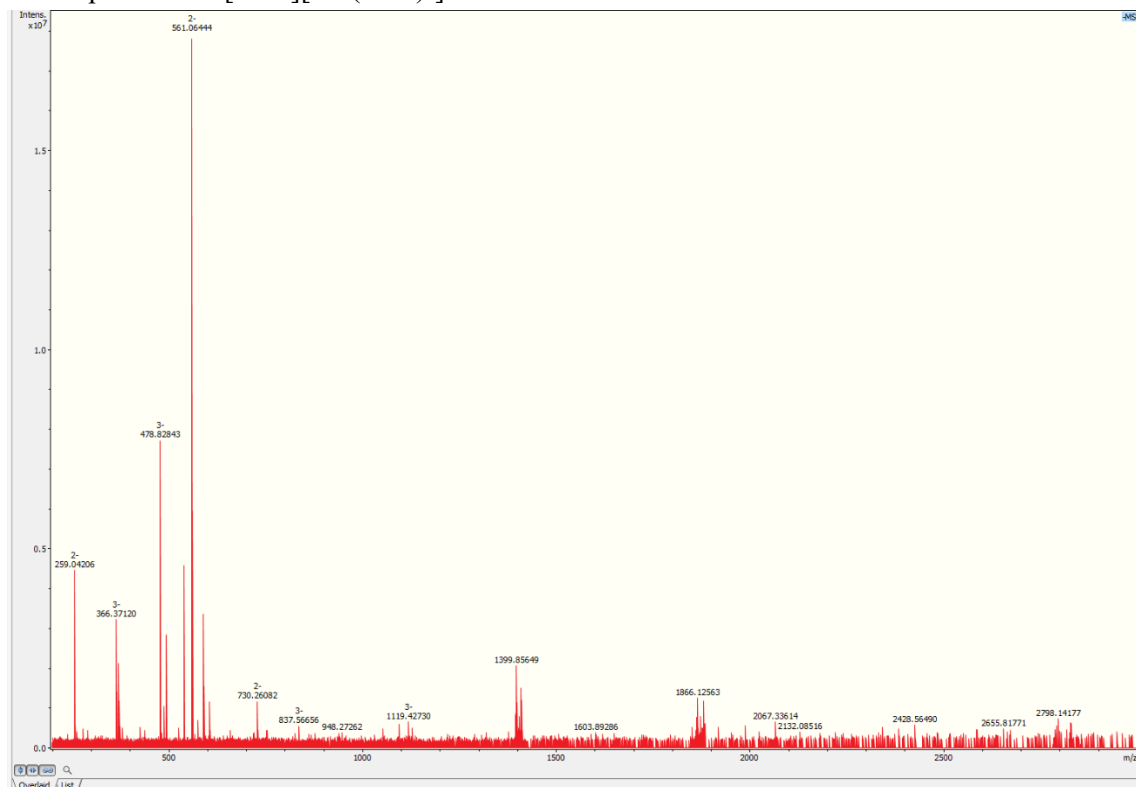
Mass data

Mass spectrum of $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$



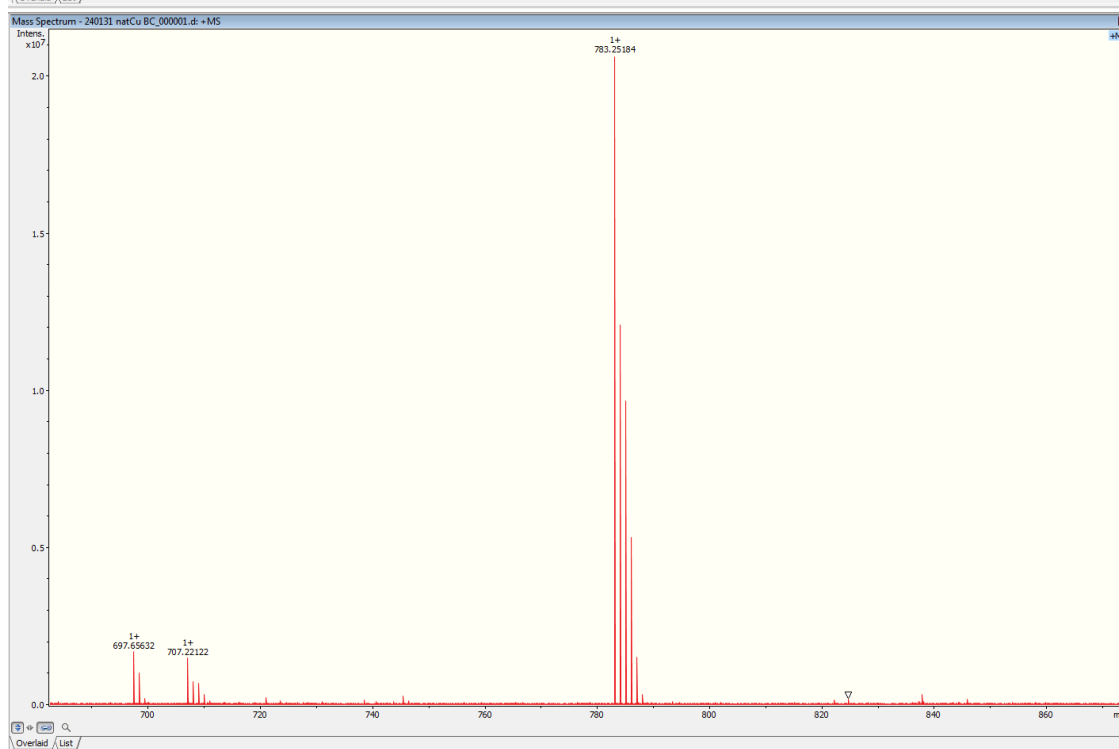
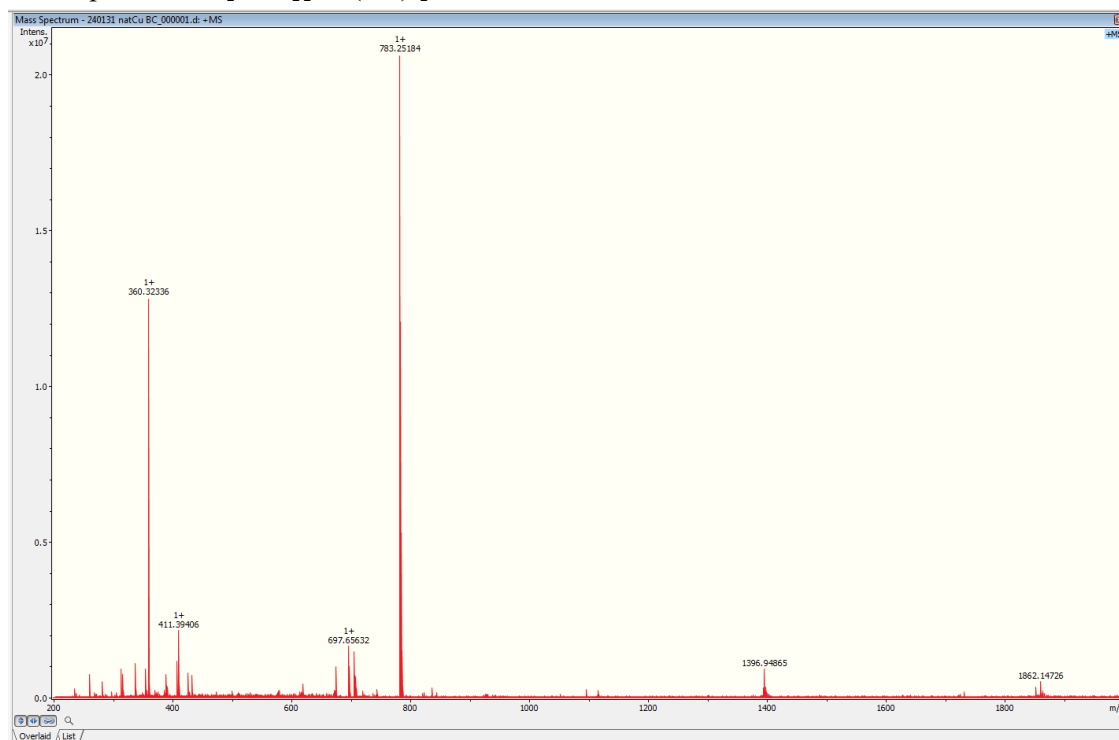
ESI-MS: calculated for $\text{C}_{40}\text{H}_{21}\text{CuN}_4\text{O}_8$, 374.04; found 374.05 $[\text{M} - 3\text{H}]^{2-}$.

Mass spectrum of $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$



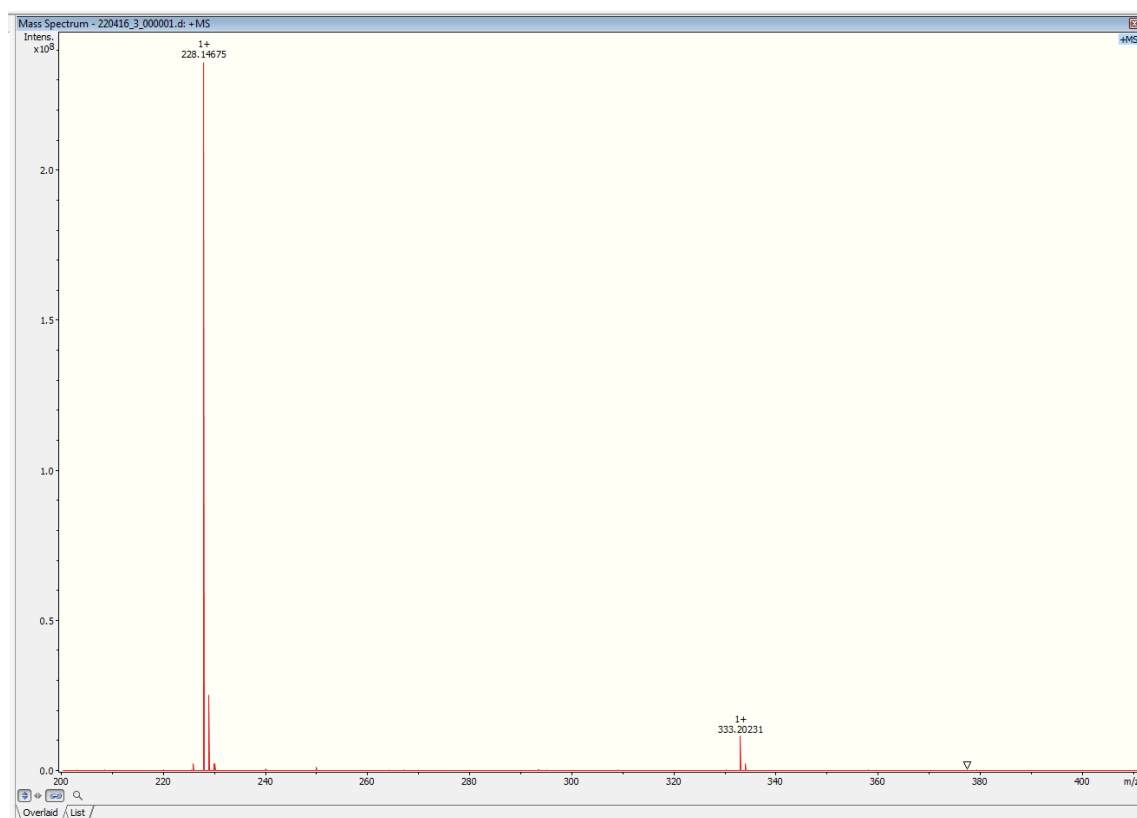
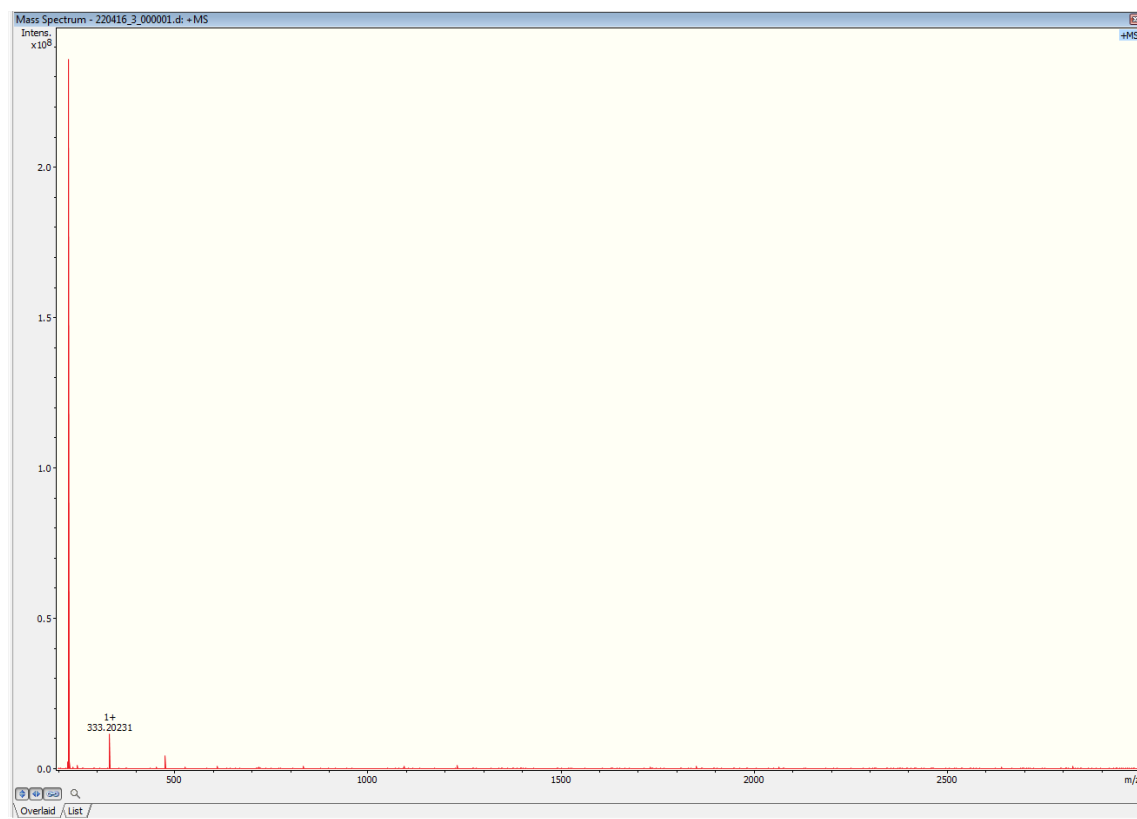
ESI-MS: calculated for $\text{C}_{52}\text{H}_{36}\text{CuN}_4\text{NaO}_{12}\text{S}_4$, 561.02; found 561.06 $[\text{M} - 3\text{Na}]^{2-}$.

Mass spectrum of $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BC})_2]^+$



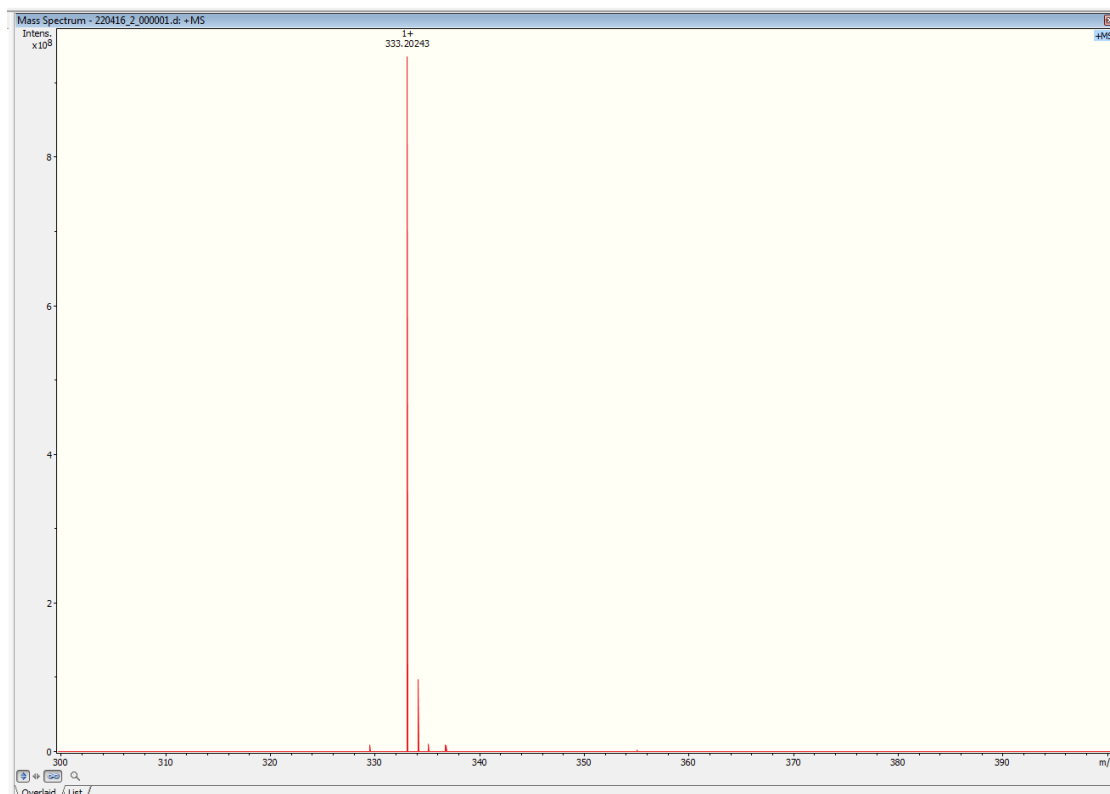
ESI-MS: calculated for $\text{C}_{52}\text{H}_{40}\text{CuN}_4$, 783.25; found 783.25 $[\text{M}^+]$

Mass spectrum of 10.5 min peak of Figure S7



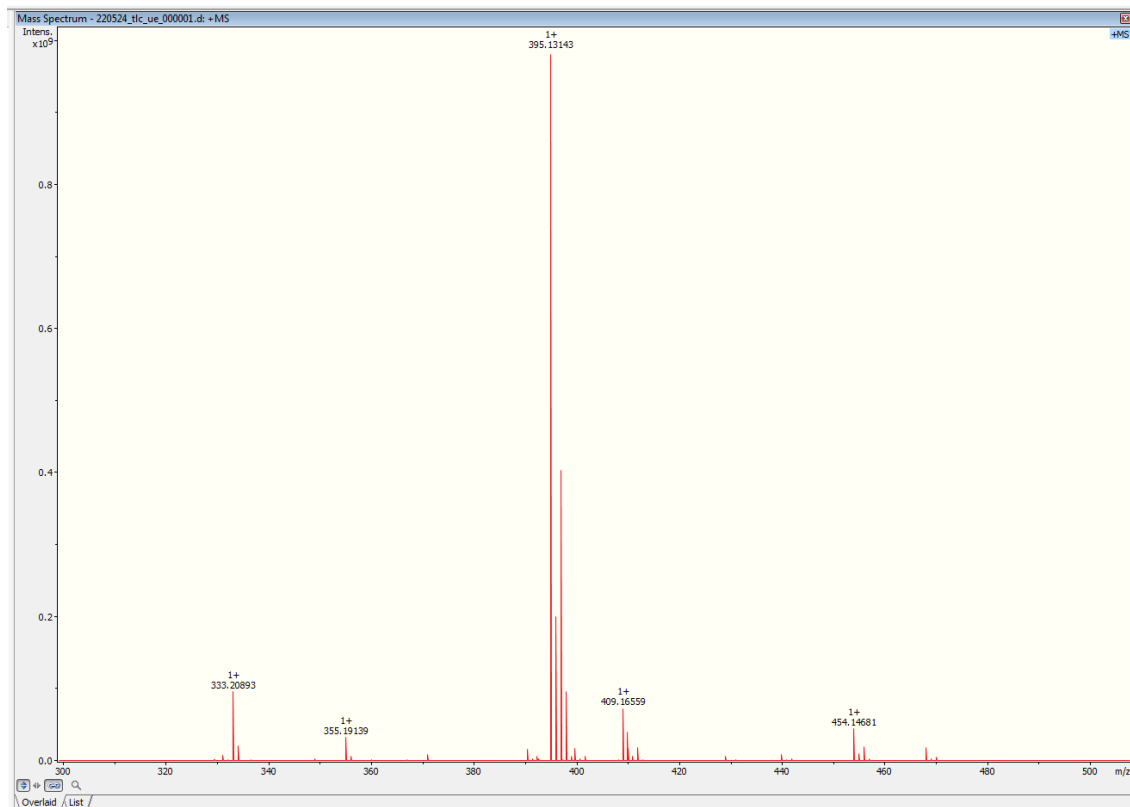
ESI-MS: calculated for $C_{14}H_{18}N_3$, 228.14; found 228.14 $[M + H]^+$.

Mass spectrum of 18.5 min peak of Figure S7



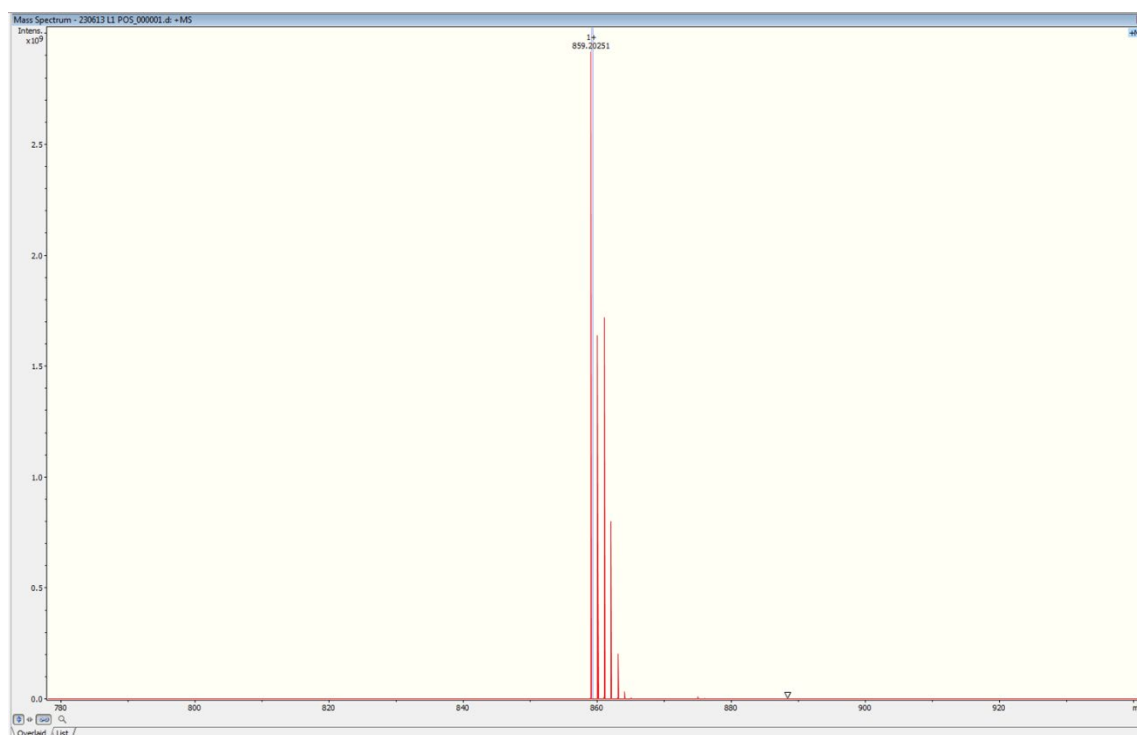
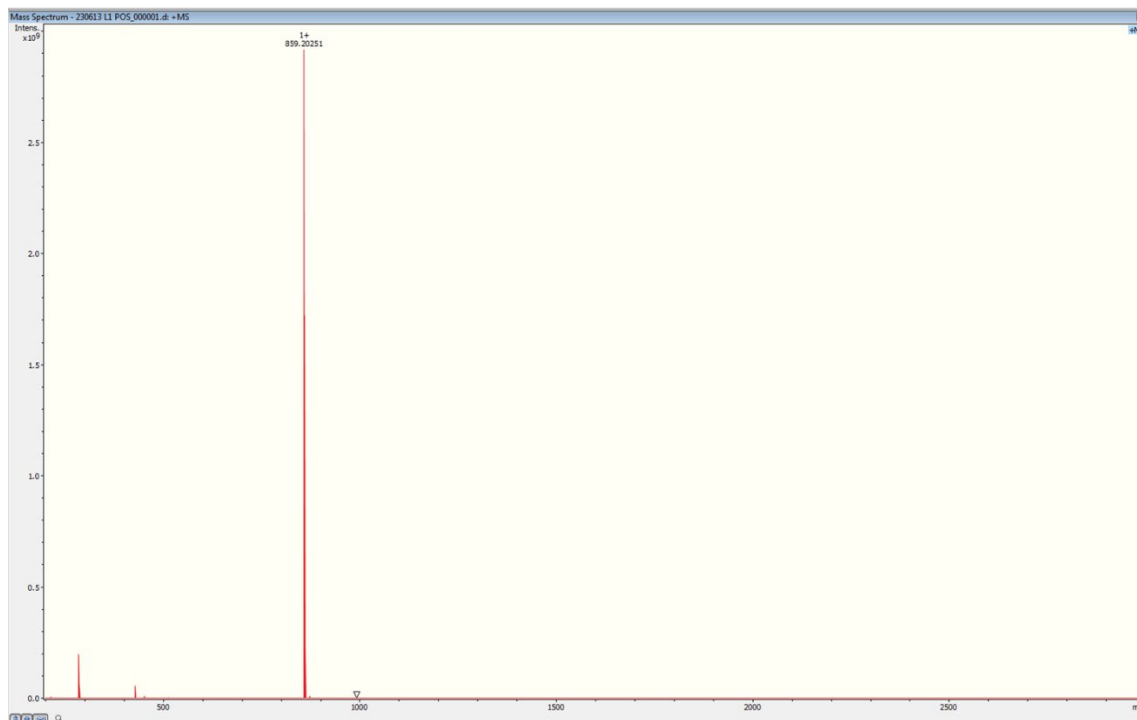
ESI-MS: calculated for $C_{21}H_{24}N_4$, 333.20; found 333.20 $[M]^+$.

Mass spectrum of $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{TEPA})]^+$



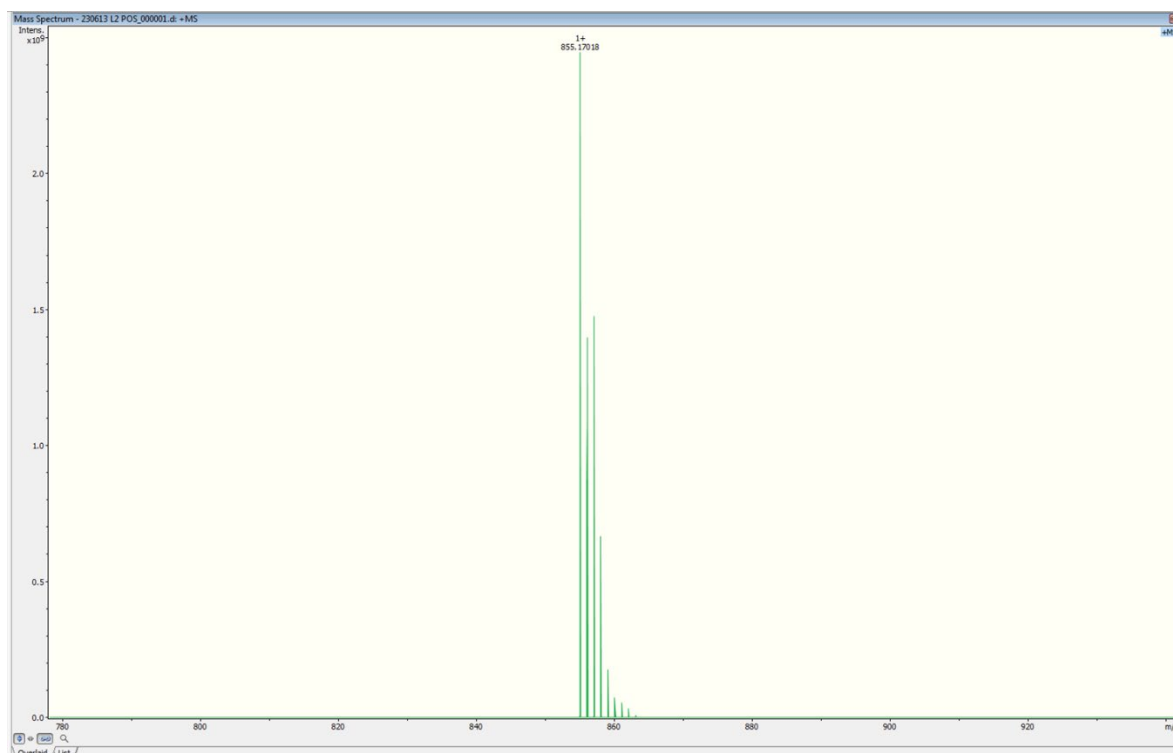
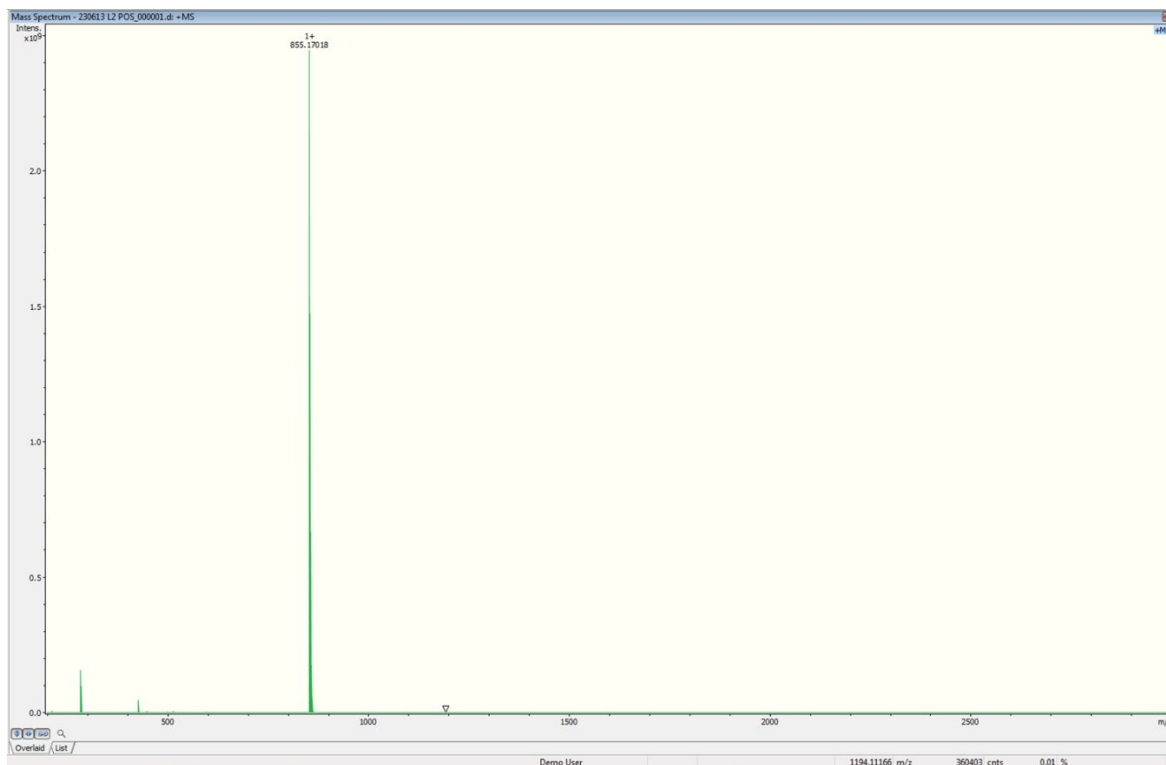
ESI-MS: calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{CuN}_4$, 395.13; found 395.13 $[\text{M}]^+$.

Mass spectrum of $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$



$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethane})_2]^+$ ESI-MS :calculated for $\text{C}_{52}\text{H}_{48}\text{CuP}_4$, 859.20; found, 859.20 $[\text{M}]^+$.

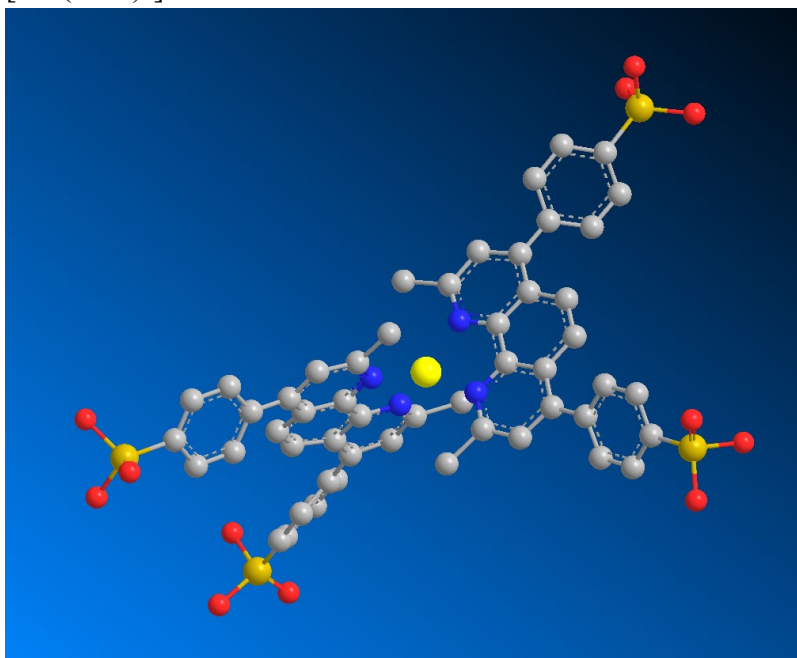
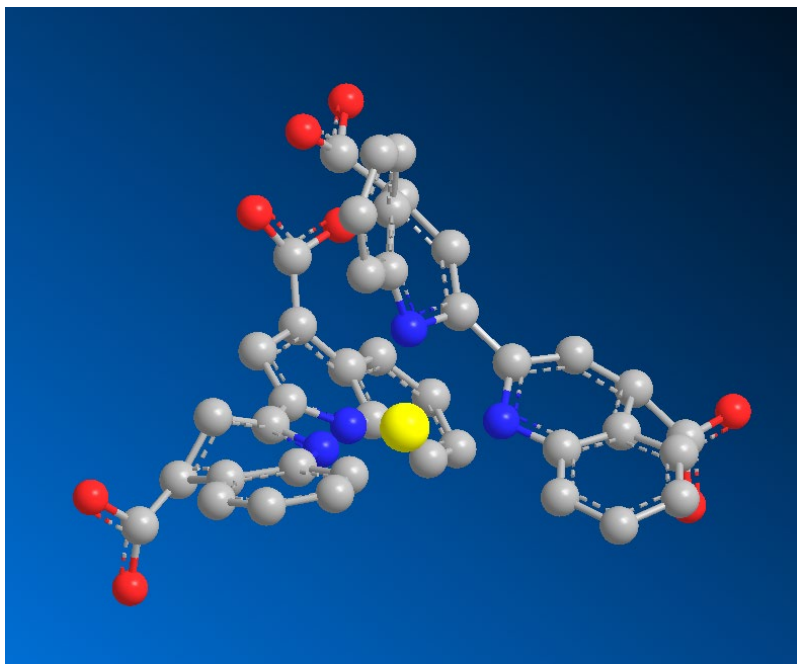
Mass spectrum of $[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethene})_2]^+$

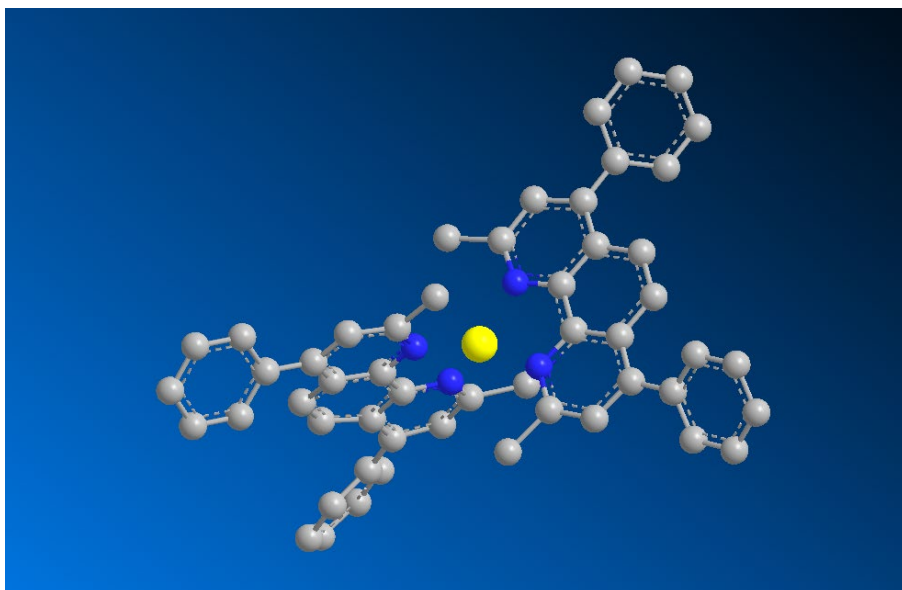
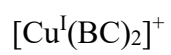
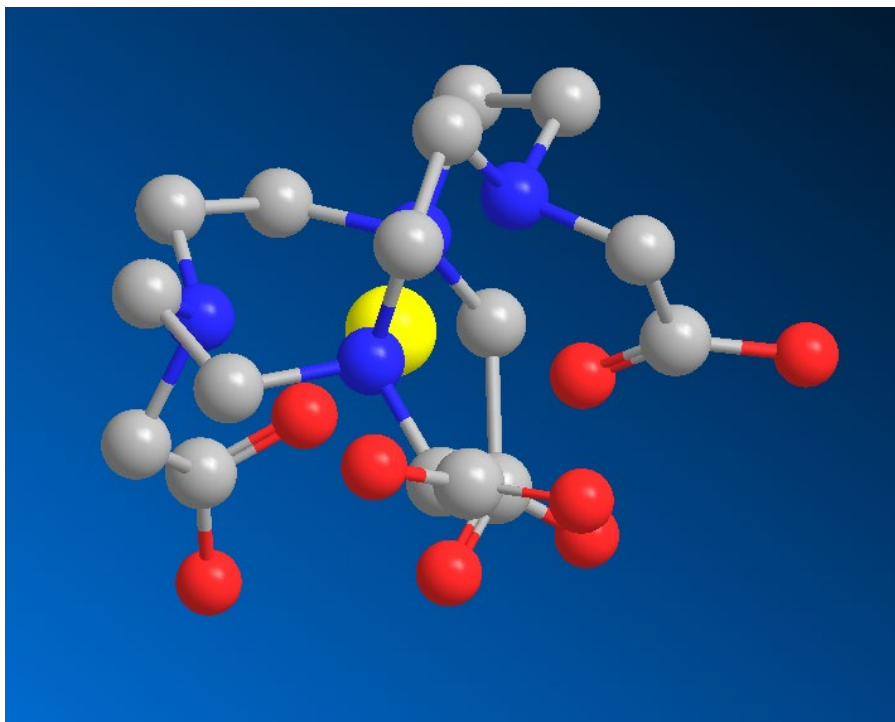


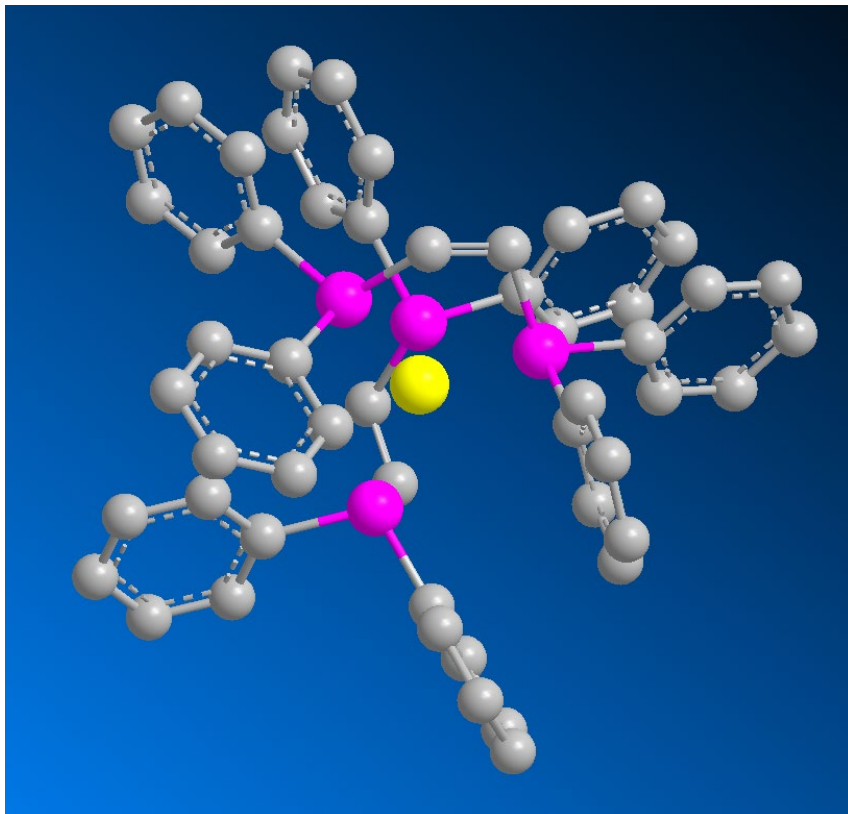
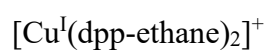
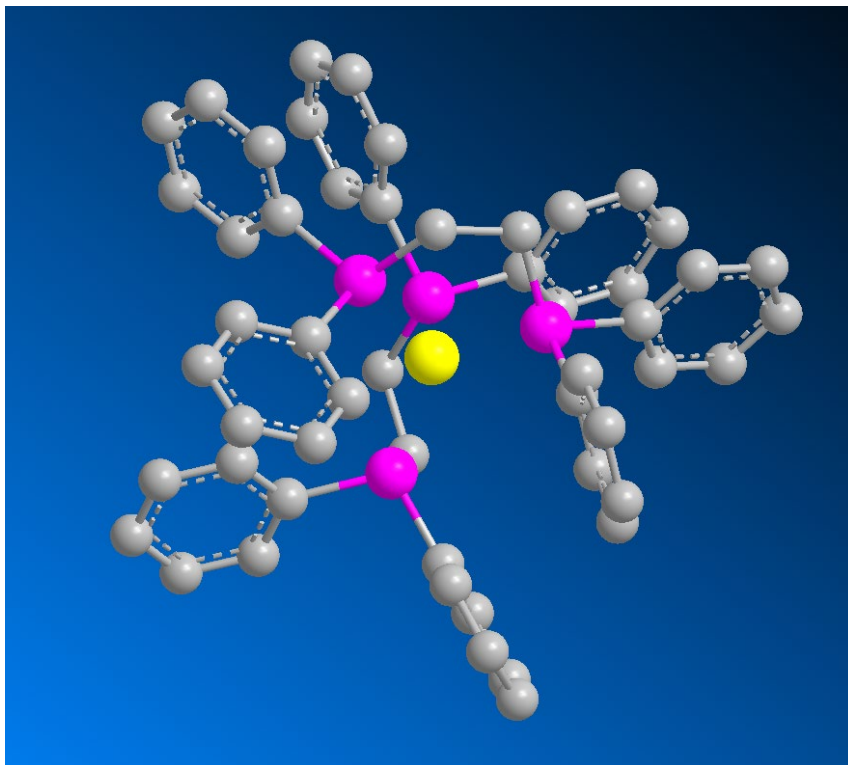
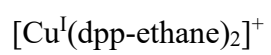
$[\text{natCu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{dpp-ethene})_2]^+$ ESI-MS :calculated for $\text{C}_{52}\text{H}_{44}\text{CuP}_4$, 855.17; found, 855.17 $[\text{M}]^+$.

本研究で試験した錯体の立体構造

本研究で試験を行った Cu 錯体の立体構造は、Chem3D (PerkinElmer, Waltham, MA) を用いて描画した。各 Cu 錯体中心の Cu は黄色で示し、配位子のリン原子およびチッ素原子はそれぞれピンク色、青色で示している。水素原子および不対電子対の表示は省略している。







参考文献

- Aldini, G., Yeum, K.J., Russell, R.M. & Krinsky, N.I. (2001) A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free radical biology & medicine*. 31 (9), 1043–1050.
- Alidori, S., Gioia Lobbia, G., Papini, G., Pellei, M., Porchia, M., Refosco, F., Tisato, F., Lewis, J.S. & Santini, C. (2008) Synthesis, in vitro and in vivo characterization of $^{64}\text{Cu}(\text{I})$ complexes derived from hydrophilic tris(hydroxymethyl)phosphane and 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane ligands. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*. 13 (2), 307–315.
- Al-Karmi, S., Albu, S.A., Vito, A., Janzen, N., Czorny, S., Banevicius, L., Nanao, M., Zubieta, J., Capretta, A. & Valliant, J.F. (2017) Preparation of an 18 F-labeled hydrocyanine dye as a multimodal probe for reactive oxygen species. *Chemistry*. 23 (2), 254–258.
- Ambundo, E.A., Deydier, M.-V., Grall, A.J., Aguera-Vega, N., Dressel, L.T., Cooper, T.H., Heeg, M.J., Ochrymowycz, L.A. & Rorabacher, D.B. (1999) Influence of Coordination Geometry upon Copper(II/I) Redox Potentials. Physical Parameters for Twelve Copper Tripodal Ligand Complexes. *Inorganic chemistry*. 38 (19), 4233–4242.
- Amiot, M.N., Bé, M.M., Branger, T., Cassette, P., Lépy, M.C., Ménesguen, Y. & Da Silva, I. (2012) Standardization of ^{64}Cu using an improved decay scheme. *Nuclear instruments & methods in physics research. Section A, Accelerators, spectrometers, detectors and associated equipment*. 684, 97–104.
- Arnhold, J., Furtmüller, P.G. & Obinger, C. (2003) Redox properties of myeloperoxidase. *Redox report: communications in free radical research*. 8 (4), 179–186.
- Aykin-Burns, N., Ahmad, I.M., Zhu, Y., Oberley, L.W. & Spitz, D.R. (2009) Increased levels of superoxide and H_2O_2 mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. *Biochemical Journal*. 418 (1), 29–37.
- Azuma, R., Yamasaki, T., Sano, K., Munekane, M., Matsuoka, Y., Yamada, K.-I. & Mukai, T. (2021) A radioiodinated nitroxide probe with improved stability against bioreduction for in vivo detection of lipid radicals. *Free radical biology & medicine*. 163, 297–305.
- Baba, T., Yoneda, H. & Muto, M. (1968) Studies of thin-layer chromatography of inorganic salts. I. the separation of inert metallic complexes by means of thin-layer chromatography on silica gel. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 41, 1965–1966.
- Bagchi, P., Morgan, M.T., Bacsa, J. & Fahrni, C.J. (2013) Robust affinity standards for

Cu(I) biochemistry. *Journal of the American Chemical Society*. 135 (49), 18549–18559.

Bailey, G.A., Price, E.W., Zeglis, B.M., Ferreira, C.L., Boros, E., Lacasse, M.J., Patrick, B.O., Lewis, J.S., Adam, M.J. & Orvig, C. (2012) H2azapa: a Versatile Acyclic Multifunctional Chelator for ^{67}Ga , ^{64}Cu , ^{111}In , and ^{177}Lu . *Inorganic chemistry*. 51 (22), 12575–12589.

Blower, P.J., Castle, T.C., Cowley, A.R., Dilworth, J.R., Donnelly, P.S., Labisbal, E., Sowrey, F.E., Teat, S.J. & Went, M.J. (2003) Structural trends in copper(II) bis(thiosemicarbazone) radiopharmaceuticals. *Dalton transactions* . (23), 4416–4425.

Boswell, C.A., Sun, X., Niu, W., Weisman, G.R., Wong, E.H., Rheingold, A.L. & Anderson, C.J. (2004) Comparative in Vivo Stability of Copper-64-Labeled Cross-Bridged and Conventional Tetraazamacrocyclic Complexes. *Journal of medicinal chemistry*. 47 (6), 1465–1474.

Brand, M.D. (2016) Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free radical biology & medicine*. 100, 14–31.

Brandt, W.W., Dwyer, F.P. & Gyarfas, E.D. (1954) Chelate Complexes of 1,10-Phenanthroline and Related Compounds. *Chemical reviews*. 54 (6), 959–1017.

Chen, D., Wang, X., He, Y., Kai, T., Li, Z., Xiang, J., Jiang, D. & Zhou, F. (2018) Studies of electrode reactions and coordination geometries of Cu(I) and Cu(II) complexes with bicinechonic acid. *Electroanalysis*. 30 (3), 479–485.

Cheung, E.C. & Vousden, K.H. (2022) The role of ROS in tumour development and progression. *Nature reviews. Cancer*. 22 (5), 280–297.

Chu, W., Chepetan, A., Zhou, D., Shoghi, K.I., Xu, J., Dugan, L.L., Gropler, R.J., Mintun, M.A. & Mach, R.H. (2014) Development of a PET radiotracer for non-invasive imaging of the reactive oxygen species, superoxide, in vivo. *Organic & biomolecular chemistry*. 12 (25), 4421–4431.

Colombié, M., Gouard, S., Frindel, M., Vidal, A., Chérel, M., Kraeber-Bodéré, F., Rousseau, C. & Bourgeois, M. (2015) Focus on the Controversial Aspects of ^{64}Cu -ATSM in Tumoral Hypoxia Mapping by PET Imaging. *Frontiers in Medicine*. 2. doi:10.3389/fmed.2015.00058.

Cooper, M.S., Ma, M.T., Sunassee, K., Shaw, K.P., Williams, J.D., Paul, R.L., Donnelly, P.S. & Blower, P.J. (2012) Comparison of ^{64}Cu -Complexing Bifunctional Chelators for Radioimmunoconjugation: Labeling Efficiency, Specific Activity, and in Vitro/in Vivo

Stability. *Bioconjugate chemistry*. 23 (5), 1029–1039.

Dearling, J.L.J., Lewis, J.S., Mullen, G.E.D., Welch, M.J. & Blower, P.J. (2002) Copper bis(thiosemicarbazone) complexes as hypoxia imaging agents: structure-activity relationships. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*. 7 (3), 249–259.

Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., Morrison, B., 3rd & Stockwell, B.R. (2012) Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 149 (5), 1060–1072.

Egami, H., Nakagawa, S., Katsura, Y., Kanazawa, M., Nishiyama, S., Sakai, T., Arano, Y., Tsukada, H., Inoue, O., Todoroki, K. & Hamashima, Y. (2020) 18 F-Labeled dihydromethidine: positron emission tomography radiotracer for imaging of reactive oxygen species in intact brain. *Organic & biomolecular chemistry*. 18 (13), 2387–2391.

Erdman, J.W., Jr, MacDonald, I.A. & Zeisel, S.H. (2012) *Present Knowledge in Nutrition*. Wiley & Sons, Limited, John.

Ervin, A.M., Ewing, K.J., Nau, G., Rowley, D.A., Lamontagne, R.A. & Aggarwal, I.D. (1998) Investigation of a robust flow-through Cu(I) optical sensor using 2,9-dimethyl-4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline immobilized into a Nafion film. *Sensors and actuators. B, Chemical*. 53 (1), 104–110.

Escayola, S., Bahri-Laleh, N. & Poater, A. (2024) % V Bur index and steric maps: from predictive catalysis to machine learning. *Chemical Society reviews*. 53 (2), 853–882.

Falivene, L., Credendino, R., Poater, A., Petta, A., Serra, L., Oliva, R., Scarano, V. & Cavallo, L. (2016) SambVca 2. A Web Tool for Analyzing Catalytic Pockets with Topographic Steric Maps. *Organometallics*. 35 (13), 2286–2293.

Fink, B., Laude, K., McCann, L., Doughan, A., Harrison, D.G. & Dikalov, S. (2004) Detection of intracellular superoxide formation in endothelial cells and intact tissues using dihydroethidium and an HPLC-based assay. *American journal of physiology. Cell physiology*. 287 (4), C895-902.

Girotti, A.W. (1985) Mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of free radicals in biology & medicine*. 1 (2), 87–95.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.

Hou, C., Hsieh, C.-J., Li, S., Lee, H., Graham, T.J., Xu, K., Weng, C.-C., Doot, R.K., Chu,

- W., Chakraborty, S.K., Dugan, L.L., Mintun, M.A. & Mach, R.H. (2018) Development of a Positron Emission Tomography Radiotracer for Imaging Elevated Levels of Superoxide in Neuroinflammation. *ACS chemical neuroscience*. 9 (3), 578–586.
- Huang, L., Li, Z. & Zhang, X. (2022) Radiotracers for Nuclear Imaging of Reactive Oxygen Species: Advances Made So Far. *Bioconjugate chemistry*. 33 (5), 749–766.
- Hungnes, I.N., Pham, T.T., Rivas, C., Jarvis, J.A., Nuttall, R.E., Cooper, S.M., Young, J.D., Blower, P.J., Pringle, P.G. & Ma, M.T. (2023) Versatile Diphosphine Chelators for Radiolabeling Peptides with ^{99m}Tc and ⁶⁴Cu. *Inorganic chemistry*. 62 (50), 20608–20620.
- Ighodaro, O.M. & Akinloye, O.A. (2018) First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 54 (4), 287–293.
- Jacobson, O., Kieseewetter, D.O. & Chen, X. (2015) Fluorine-18 Radiochemistry, Labeling Strategies and Synthetic Routes. *Bioconjugate chemistry*. 26 (1), 1–18.
- Jalilian, A. & Osso, J. (2016) The current status and future of theranostic Copper-64 radiopharmaceuticals. *Iranian Journal of Nuclear Medicine*. https://irjnm.tums.ac.ir/irjnm/article/viewFile/342/journal/themes/base/front/assets/plugins/journal/article_23081_c272d9e1c0191e57cbdfa5dfdf9baad8.pdf.
- Koppenol, W.H. (1990) Oxyradical reactions: from bond-dissociation energies to reduction potentials. *FEBS letters*. 264 (2), 165–167.
- Krasnovskaya, O.O., Abramchuck, D., Erofeev, A., Gorelkin, P., Kuznetsov, A., Shemukhin, A. & Beloglazkina, E.K. (2023) Recent Advances in ⁶⁴Cu/⁶⁷Cu-Based Radiopharmaceuticals. *International journal of molecular sciences*. 24 (11), 9154.
- Lewis, J.S., Dearling, J.L., Sosabowski, J.K., Zweit, J., Carnochan, P., Kelland, L.R., Coley, H.M. & Blower, P.J. (2000) Copper bis(diphosphine) complexes: radiopharmaceuticals for the detection of multi-drug resistance in tumours by PET. *European journal of nuclear medicine*. 27 (6), 638–646.
- Lewis, J.S., Zweit, J. & Blower, P.J. (1998) Effect of ligand and solvent on chloride ion coordination in anti-tumour copper(I) diphosphine complexes: Synthesis of [Cu(dppe)₂]Cl and analogous complexes (dppe = 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane). *Polyhedron*. 17 (4), 513–517.
- Linder, M.C. (2016) Ceruloplasmin and other copper binding components of blood

plasma and their functions: an update. *Metallomics: integrated biometal science*. 8 (9), 887–905.

Liou, G.-Y. & Storz, P. (2010) Reactive oxygen species in cancer. *Free radical research*. 44 (5), 479–496.

Liu, T., Karlsen, M., Karlberg, A.M. & Redalen, K.R. (2020) Hypoxia imaging and theranostic potential of $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{ATSM})]$ and ionic Cu(II) salts: a review of current evidence and discussion of the retention mechanisms. *EJNMMI research*. 10 (1), 33.

McInnes, L.E., Rudd, S.E. & Donnelly, P.S. (2017) Copper, gallium and zirconium positron emission tomography imaging agents: The importance of metal ion speciation. *Coordination chemistry reviews*. 352, 499–516.

Miotto, G., Rossetto, M., Di Paolo, M.L., Orian, L., Venerando, R., Roveri, A., Vučković, A.-M., Bosello Travain, V., Zaccarin, M., Zennaro, L., Maiorino, M., Toppo, S., Ursini, F. & Cozza, G. (2020) Insight into the mechanism of ferroptosis inhibition by ferrostatin-1. *Redox biology*. 28, 101328.

Mota, F., Pell, V.R., Singh, N., Baark, F., Waters, E., Sadasivam, P., Southworth, R. & Yan, R. (2022) A Reactivity-Based ^{18}F -Labeled Probe for PET Imaging of Oxidative Stress in Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity. *Molecular pharmaceuticals*. 19 (1), 18–25.

Mounts, R.D., Ogura, T. & Fernando, Q. (1974) Crystal structure of copper(I) acetate. *Inorganic chemistry*. 13 (4), 802–805.

Murphy, M.P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C.J., Davies, K.J.A., et al. (2022) Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature Metabolism*. 4 (6), 651–662.

Naskar, J.P., Chowdhury, A., Drew, M. & Datta, D. (2002) Chemistry of the copper(I)–water bond. Some new observations. *New journal of chemistry = Nouveau journal de chimie*. 26, 170–175.

Niccoli Asabella, A., Cascini, G.L., Altini, C., Paparella, D., Notaristefano, A. & Rubini, G. (2014) The copper radioisotopes: a systematic review with special interest to ^{64}Cu . *BioMed research international*. 2014, 786463.

Pauwels, E.K., McCready, V.R., Stoot, J.H. & van Deurzen, D.F. (1998) The mechanism of accumulation of tumour-localising radiopharmaceuticals. *European journal of nuclear medicine*. 25 (3), 277–305.

Pedrera, L., Espiritu, R.A., Ros, U., Weber, J., Schmitt, A., Stroh, J., Hailfinger, S., von

- Karstedt, S. & García-Sáez, A.J. (2020) Ferroptotic pores induce Ca^{2+} fluxes and ESCRT-III activation to modulate cell death kinetics. *Cell death and differentiation*. 28 (5), 1644–1657.
- Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., Castoria, G. & Migliaccio, A. (2020) ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Experimental & molecular medicine*. 52 (2), 192–203.
- Pham-Huy, L.A., He, H. & Pham-Huy, C. (2008) Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*. 4 (2), 89–96.
- Pisaneschi, F., Gammon, S.T., Paolillo, V., Qureshy, S.A. & Piwnica-Worms, D. (2022) Imaging of innate immunity activation in vivo with a redox-tuned PET reporter. *Nature biotechnology*. 40 (6), 965–973.
- Price, E.W. & Orvig, C. (2014) Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chemical Society reviews*. 43 (1), 260–290.
- Riedinger, A., Avellini, T., Curcio, A., Asti, M., Xie, Y., Tu, R., Marras, S., Lorenzoni, A., Rubagotti, S., Iori, M., Capponi, P.C., Versari, A., Manna, L., Seregini, E. & Pellegrino, T. (2015) Post-Synthesis Incorporation of ^{64}Cu in CuS Nanocrystals to Radiolabel Photothermal Probes: A Feasible Approach for Clinics. *Journal of the American Chemical Society*. 137 (48), 15145–15151.
- Riegman, M., Sagie, L., Galed, C., Levin, T., Steinberg, N., Dixon, S.J., Wiesner, U., Bradbury, M.S., Niethammer, P., Zaritsky, A. & Overholtzer, M. (2020) Ferroptosis occurs through an osmotic mechanism and propagates independently of cell rupture. *Nature cell biology*. 22 (9), 1042–1048.
- Riley, P.A. (1994) Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International journal of radiation biology*. 65 (1), 27–33.
- Ruthkosky, M., Castellano, F.N. & Meyer, G.J. (1996) Photodriven Electron and Energy Transfer from Copper Phenanthroline Excited States. *Inorganic chemistry*. 35 (22), 6406–6412.
- Saito, Y., Nishikawa, M. & Tsubomura, T. (2018) Water-soluble copper(I) complexes bearing 2,2'-bicinechonic acid dipotassium salt with red-light absorption and repeatable colour change upon freezing operation. *New journal of chemistry = Nouveau journal de chimie*. 43 (1), 277–283.
- Schatz, M., Becker, M., Thaler, F., Hampel, F., Schindler, S., Jacobson, R.R., Tyeklár, Z., Murthy, N.N., Ghosh, P., Chen, Q., Zubieta, J. & Karlin, K.D. (2001) Copper(I)

complexes, copper(I)/O(2) reactivity, and copper(II) complex adducts, with a series of tetradentate tripyridylalkylamine tripodal ligands. *Inorganic chemistry*. 40 (10), 2312–2322.

Scherz-Shouval, R. & Elazar, Z. (2007) ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends in cell biology*. 17 (9), 422–427.

Schumacker, P.T. (2006) Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer cell*. 10 (3) pp.175–176.

Setsukinai, K.-I., Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H.J. & Nagano, T. (2003) Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *The Journal of biological chemistry*. 278 (5), 3170–3175.

Sheng, Y., Abreu, I.A., Cabelli, D.E., Maroney, M.J., Miller, A.-F., Teixeira, M. & Valentine, J.S. (2014) Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chemical reviews*. 114 (7), 3854–3918.

Sivapackiam, J., Liao, F., Zhou, D., Shoghi, K.I., Gropler, R.J., Gelman, A.E. & Sharma, V. (2020) Galuminox: Preclinical validation of a novel PET tracer for non-invasive imaging of oxidative stress in vivo. *Redox Biology*. 37, 101690.

Sivasankar, C., Sadhukhan, N., Bera, J. & Samuelson, A. (2007) Is copper(I) hard or soft? A density functional study of mixed ligand complexes. *New journal of chemistry = Nouveau journal de chimie*. 31, 385–393.

Solingapuram Sai, K.K., Bashetti, N., Chen, X., Norman, S., Hines, J.W., Meka, O., Kumar, J.V.S., Devanathan, S., Deep, G., Furdui, C.M. & Mintz, A. (2019) Initial biological evaluations of 18F-KS1, a novel ascorbate derivative to image oxidative stress in cancer. *EJNMMI research*. 9 (1), 43.

Sun, X., Wuest, M., Kovacs, Z., Sherry, A.D., Motekaitis, R., Wang, Z., Martell, A.E., Welch, M.J. & Anderson, C.J. (2003) In vivo behavior of copper-64-labeled methanephosphonate tetraaza macrocyclic ligands. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*. 8 (1–2), 217–225.

Sun, Y., Anderson, C.J., Pajean, T.S., Reichert, D.E., Hancock, R.D., Motekaitis, R.J., Martell, A.E. & Welch, M.J. (1996) Indium(III) and Gallium(III) Complexes of Bis(aminoethanethiol) Ligands with Different Denticities: Stabilities, Molecular Modeling, and in Vivo Behavior. *Journal of medicinal chemistry*. 39 (2), 458–470.

- Walker, J.M. (1994) The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods in molecular biology* . 32, 5–8.
- Waters, E.C.T., Baark, F., Yu, Z., Mota, F., Eykyn, T.R., Yan, R. & Southworth, R. (2022) Detecting Validated Intracellular ROS Generation with 18F-dihydroethidine-Based PET. *Molecular imaging and biology: MIB: the official publication of the Academy of Molecular Imaging*. 24 (3), 377–383.
- Wiechelman, K.J., Braun, R.D. & Fitzpatrick, J.D. (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Analytical biochemistry*. 175 (1), 231–237.
- Wood, P.M. (1988) The potential diagram for oxygen at pH 7. *Biochemical Journal*. 253 (1), 287–289.
- Xie, D., King, T.L., Banerjee, A., Kohli, V. & Que, E.L. (2016) Exploiting Copper Redox for (19)F Magnetic Resonance-Based Detection of Cellular Hypoxia. *Journal of the American Chemical Society*. 138 (9), 2937–2940.
- Zhang, H., Mao, Z., Kang, Y., Zhang, W., Mei, L. & Ji, X. (2023) Redox regulation and its emerging roles in cancer treatment. *Coordination chemistry reviews*. 475, 214897.
- Zhang, Y., Tan, H., Daniels, J.D., Zandkarimi, F., Liu, H., Brown, L.M., Uchida, K., O'Connor, O.A. & Stockwell, B.R. (2019) Imidazole Ketone Erastin Induces Ferroptosis and Slows Tumor Growth in a Mouse Lymphoma Model. *Cell chemical biology*. 26 (5), 623-633.e9.
- Zhou, J., Schmid, T., Schnitzer, S. & Brüne, B. (2006) Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer letters*. 237 (1), 10–21.
- Zorov, D.B., Juhaszova, M. & Sollott, S.J. (2014) Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews*. 94 (3), 909–950.