The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	クリック化学を用いたオリゴ核酸の新規18F標識化法
Author(s)	窪山, 剛之
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58577
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

状形態であるミトコンドリアが粒子状に断片化すること、さらにミトコンドリアの膜電位が低下することを明らかとした。また、断片化作用には、HPGBの20から49番目のアミノ酸配列からなる領域が必要であることを示した。

③ ミトコンドリア内膜融合に対する特異的な阻害作用　ミトコンドリアの形態的変化は、融合・分裂過程のバランスの結果とも言えるものである。そこで、マトリクス局在性タンパクの発現細胞を用いた細胞融合実験により、HPGBがミトコンドリア内膜の融合を特異的に阻害する作用を持つことを明らかにした。

④ 機能との関連　膜電位が低下しているミトコンドリアにHPGBが集積することも明らかにした。この結果は、HPGBは機能低下したミトコンドリアを選択的に排除する機構に関与する可能性を示唆するものである。

HPGBのようにミトコンドリア動態を抑制的に制御する因子は非常に少なく、特に内膜の融合を特異的に阻害する因子は、世界で初めてのものとなる。ミトコンドリアの動態制御を介した機能維持機構は単純な融合促進と分裂促進のバランスのみで成り立つのではなく、細胞内の環境の変化に応じて、精巧かつダイナミックに調節されているものと推測される。本研究は、このような研究にも貢献する、新しいミトコンドリア動態制御機構を持つ分子を発見したものとして大いに意義がある。

以上の通り、本研究の成果は、薬学博士の授与に十分に値するものであると判断する。

【11】

氏　　名	窪　山　剛　之（くぼ　やま　たけ　し）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　２４５１８　号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 23 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第４条第１項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学　位　論　文　名	**クリック化学を用いたオリゴ核酸の新規^{18}F標識化法**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　小比賀　聡 （副査） 教　授　宇野　公之　　教　授　藤岡　弘道　　教　授　田中　徹明

論 文 内 容 の 要 旨

PET（Positron Emission Tomography，ポジトロン断層法）は、フッ素-18（^{18}F，半減期110分）などの短寿命ポジトロン放射核種で標識化された分子（PETプローブ）の生体内での動きを3次元画像化する技術である。一般にPETプローブの合成では、核種が短寿命であるために短時間に操作を終えることや、核種が微量であるために高希釈条件で反応を行うことが必要である。また強力な放射線から実験者を守るために鉛遮蔽容器内に設置した遠隔操作の標識用合成装置で実験を行うことも必要である。

このような通常の有機合成とは異なる制限が存在する中でも、すでにオリゴ核酸の^{18}F標識化法は複数報告されている。サイクロトロン加速器から得られる[^{18}F]フッ化物イオンを低分子量の中間体「^{18}F接合団」へと導き、これを標的オリゴ核酸とアルキル化反応、アミド化反応やクリック化学（Huisgen反応）などでカップリングさせて^{18}F標識化オリゴ核酸を合成する方法である。しかしいずれの報告例でも、比較的大きな標識化のための部位がオリゴ核酸本来の動態を変化させる懸念があることと、標識化実験ごとに多量のオリゴ核酸前駆体を消費しなくてはならないことが課題であった。そこで筆者はこれら2つの課題を解決した新たなオリゴ核酸^{18}F標識化法の開発を行った。

最初に筆者はオリゴ核酸本来の物性を変化させない標識化法の開発を意図して、エチニル化オリゴ核酸**3**とクリック化学で反応しうる新規なアジド型^{18}F接合団*m*-または*p*-azido([^{18}F]fluoromethyl)benzene（*m*-または*p*-[^{18}F]**2**）を次のような考え方のもとに設計した（**式１**）。まず装置の簡便性やプロセス時間短縮の観点から[^{18}F]フッ化物イオンから１段階で合成可能であるものが好ましいと考え、トシラート体**1**から1段階で合成可能なベンジルフルオリド構造とした。また^{18}F接合団は分取HPLC精製等によって高純度化を行う必要があることからUV-HPLCで高感度な検出を可能とするためにクリック化学の反応点であるアジド基をベンゼン環と共役させてUV吸光団とした。さらに**3**と[^{18}F]**2**とがクリック化学を経て生じる[^{18}F]**4**は、^{18}Fと標的分子を結び付けるための部位をプリンヌクレオシドの類縁体と見立てることができ、本来のオリゴ核酸と似た物性を持つことが期待できる。加えてこの方法ならば標識化位置は配列上の末端でも内部でも自由に設計可能である。

次いで筆者はフッ化反応（**式１**）の条件検討を行った。その結果、定法に従ってサイクロトロンから得られる[^{18}F]フッ酸を$TBAHCO_3$で中和して[^{18}F]TBAFとして活性化し、これをトシラート**1**とCH_3CNまたは$PhCF_3$中で85℃、5分間反応させる条件を見出した。

一方、クリック化学はバイオコンジュゲート化学の分野で汎用される反応だが、一般に反応時間は数時間から数日と長く、これまでの例では半減期の短い^{18}Fへ応用するには大剰量の生体分子前駆体を加えて反応を加速する必要があった。ところが、Chanらが報告したリガンドTBTA（tris((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amine）を銅触媒系に加える条件ならば、高度に希釈された基質同士でも再現性良く短時間で反応が終結することを筆者は見出した。そこで触媒条件・反応条件をさらに精緻化し、DMSO－緩衝液中でTBTA－銅－アスコルビン酸ナトリウム（1:2:2）を触媒とし反応温度を40℃とすることで、オリゴ核酸前駆体の投入量をサイクロトロンから得られる[^{18}F]フッ化物イオンとほぼ同じ量である20 nmolへと削減しつつ、希薄な基質間でも15分間で反応が終結（低分子モデル基質の場合で収率96%）する高速なクリック化学反応条件を開発した。

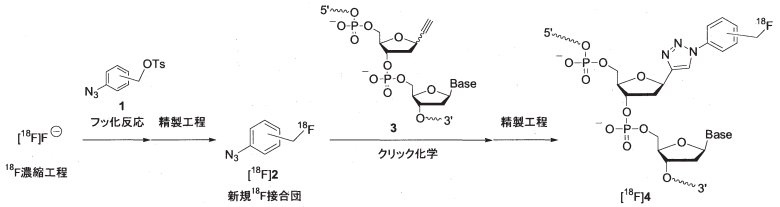
実際の標識用合成装置を用いて標識化プロセスを構築するにあたってもう一つ重要であるのが^{18}F接合団の純度とそれを決める精製工程（**式１**）であった。これは不純物としてオリゴ核酸前駆体と反応する、あるいは反応を阻害する化合物が含まれると、それを補うため多量のオリゴ核酸前駆体を加える必要があるからである。制限された時間のもと合成装置で精製工程を行うPET化学では純度の高い単離精製は必ずしも容易ではなく、当初SPE（Solid Phase Extraction; 固相抽出法）精製を用いた簡便な装置によるプロセスの開発を目指したが良い結果は得られなかった。そこで分取HPLCにより純度95%以上の[^{18}F]**2**を得る精製条件を見出し、これで得た高純度化[^{18}F]**2**で15~18 merのDNAをクリック化学により標識化したところ、90~93%のラジオHPLC分析収率で^{18}F標識化オリゴ核酸を合成することに成功した。

以上の検討結果をもとに、^{8}F濃縮行程、フッ化反応、^{18}F接合団精製工程、クリック化学、最終精製工程からなる標識化プロセスを標識用合成装置を用いて構築することに成功した（**式１**）。

このプロセスを用い、サイクロトロン加速器より50 GBqの放射線量を入力して18 merの天然型DNAを*p*-または*m*-[^{18}F]**2**で^{18}F標識化したところ、それぞれ2.5および2.1 GBqの放射線量の^{18}F標識化オリゴ核酸を得ることができた。また同配列を2’,4’-BNA化したオリゴ核酸も*m*-[^{18}F]**2**で^{18}F標識化し、1.7 GBqの^{18}F標識化体を得ることができた。一方、この配列のリン酸ジエステル結合をすべてホスホロチオアート結合に置換したものを*m*-[^{18}F]**2**で^{18}F標識化した場合は、硫黄原子が銅を被毒するためかクリック化学の効率が低下（ラジオHPLC分析収率で12%）したものの、0.86 GBqという動物に投与するには十分な量の^{18}F標識化体を得ることができた。

最後に本法で得られたこれらの^{18}F標識化オリゴ核酸がPETプローブとしてオリゴ核酸の動態評価に用いることができるかを確認するために、ラットに投与してPET撮像を行った。その結果、18 merの天然型DNAでは速やかな代謝分解を示唆する骨への放射活性の集積を示した。一方代謝的に安定であろうホスホロチオアート化2’,4’-BNAオリゴ核酸では骨への放射活性集積は大幅に減少し、肝臓、腎臓、脾臓への集積が観察された。以上の結果は文献情報によるDNAおよびホスホロチオアート化2’,4’-BNAオリゴ核酸の体内動態と合致していた。これらのことから、今回新規に開発したオリゴ核酸^{18}F標識化手法により得られるPET分子プローブは、オリゴ核酸の動

態解析に有用であることが示された。



式1　オリゴ核酸の新規^{18}F標識化プロセス

論文審査の結果の要旨

近年、Positron Emission Tomography（PET）を利用した診断技術の開発並びに創薬研究への応用が急速に進んでおり、新たなPETプローブの創製に大きな期待が寄せられている。窪山剛之君は、核酸医薬の体内動態解析並びに遺伝子発現のin vivoイメージングへの利用を念頭に、オリゴ核酸の新たな^{18}F標識化手法を検討し、以下の成果を得た。

1) 新規なクリック化学用^{18}F-接合団を設計し、その合成に成功した。
2) ^{18}F-接合団とエチニル化オリゴ核酸を組み合わせ、オリゴ核酸本来の物性に影響を与えにくい新規標識化法を開発した。
3) PETプローブ合成における希薄な反応条件下、15分間という短時間で反応を完結させる高速なクリック化学条件を見出した。
4) 新規^{18}F-接合団を用いたオリゴ核酸標識化プロセスを構築し、ヒトおよび動物投与可能な量なの^{18}F標識化オリゴ核酸を自動合成装置により合成した。
5) ^{18}F標識化オリゴ核酸をラットに投与しPET撮像を行い、骨格修飾の違いによるオリゴ核酸の動態の違いを確認した。

以上の研究成果は、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。