

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04258

研究課題名（和文）がん免疫を賦活させる新規放射性核種標識薬剤を用いた革新的な放射線内用療法の開発

研究課題名（英文）Development of radiotheranostics agent using Fab fragment of anti-regulatory T cells

研究代表者

上原 知也（Uehara, Tomoya）

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：10323403

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、従来開発した腎臓への非特異的集積を低減させる放射性ガリウム標識薬剤が、治療量の放射性核種である放射性銅を用いた場合において適用できるかを抗c-kit抗体Fabフラグメントを用いて検討した。その結果、放射性ガリウムから放射性銅へと変更することで酵素認識は低下するが、酵素認識性を保持していること、さらにインビボでは、放射性ガリウム体と同様に腎臓への放射活性を低減可能であることを示した。また、制御性T細胞に対する抗体のFabフラグメントを用いた場合においても同様に腎集積低減効果が得られることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、診断用の放射性核種である放射性ガリウムを用いて開発した腎臓の放射活性を低減する抗体Fabフラグメントの標識薬剤が治療用の放射性薬剤である銅-64でも適用可能であることを示したことは、個別化医療につながるradiotheranosticsへ、本標識薬剤が適用可能であることを実証したと考えている。また、銅-64はガリウム-68に比べ半減期の長いPET核種であり、Fabを用いたPETから治療への応用がより一層期待でき、精密な診断と治療を行うradiotheranosticsに大いに貢献できると考えている。

研究成果の概要（英文）：We have developed the gallium-67/68 labeling agent, NOTA-MVK-Mal, for antibody fragment to reduce renal radioactivity levels so far. In this study, we investigated the applicability of this labeling agent to the therapeutic radionuclide, copper-64, using anti-c-kit antibody Fab fragment. In in vitro study, the recognition of brush border enzymes to the Cu-64 labeled probe was reduced compared with Ga-67 labeled counterpart. However, in the biodistribution study using normal mice, the renal radioactivity levels after injection of Cu-64 labeled Fab fragments using this labeling agent were similar to those of Ga-67 labeled Fab fragments. These results suggested that the this radiolabeling agent would be applicable to the Cu-64. Furthermore, the reduction of renal radioactivity levels was observed even if Fab fragment against a regulatory T cells (CD25) as Fab fragment were used.

研究分野：核医学治療

キーワード：核医学治療 Treg

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんは1981年より日本人の死因第一位であり、その死亡者数は年々増加している。そのため、がん治療に対する新たな治療法や治療薬剤の開発に対する期待は大きい。従来、がんの治療法として、外科手術、化学療法、放射線療法の3種が三大標準治療法として用いられてきたが、近年免疫チェックポイントを阻害するがん免疫療法が第4の治療法として注目されている。薬剤ではなく自身の免疫作用を利用してがんを攻撃することから、がん腫を問わず効果が期待できる利点を有する。しかし、自己免疫からの攻撃を回避する方法も同様の機構を利用しているため、これらの薬剤の副作用として自己免疫疾患様の作用が高頻度に観察され、治療時の問題となっている。一方、細胞殺傷性放射性核種 (RI) で標識した薬剤を用いる核医学治療では、RI から放射される放射線の飛程により、薬剤が結合していない周囲の細胞にも殺傷能力を示す (クロスファイヤー効果) ことから、他のがん治療薬剤に比べ治療効果が高い。また本効果は、高密度に標的細胞が存在する場合、効率よく殺傷可能であり、逆に低密度で存在する場合、その効果は低くなると考えられる。したがって、RI 標識抗 Treg 低分子抗体を作製することができれば、高密度に Treg 細胞が存在する腫瘍では効率良く殺傷する一方で、低密度に存在する正常組織、循環血液中ではその影響が小さくできると考えられ、副作用の少ないがん免疫療法が可能となると考えられる。また、Treg 細胞などの免疫抑制細胞は T 細胞の一種であり、一般に T 細胞は放射線感受性が高いことから、核医学治療薬剤の標的としても有用と考えられる。

### 2. 研究の目的

本申請課題では、Treg 細胞を標的とした核医学治療薬剤の開発を計画した。Treg 細胞を標的とする IgG 抗体を RI の運搬体として用いた場合、Fc 領域による補体活性が維持されるため、副作用の発現が想定される。一方、Fab フラグメント (以下 Fab) を RI 標識母体を選択した場合、標的への集積と共に腎臓への非特異的な高い集積が観察され、放射線による腎障害が問題となる。この問題に対して我々は、診断用放射性核種であるガリウム-67/68 ( $^{67/68}\text{Ga}$ ) に対する低分子抗体の標識薬剤として、腎刷子縁膜酵素の作用により尿排泄性の高い放射性代謝物  $^{67/68}\text{Ga}$ -NOTA-Met を遊離することで、腎臓の放射活性を低減する  $^{67/68}\text{Ga}$  標識薬剤 NOTA-MVK-Mal を開発した (Figure 1)。本薬剤を用いて作製した  $^{67/68}\text{Ga}$  標識 Fab は腫瘍の放射活性を損なうことなく、非特異的な腎放射活性を投与早期から大きく低減することを示した。本薬剤で使用されている配位子、NOTA、は  $^{67/68}\text{Ga}$  だけでなく核医学治療への応用が可能な銅-64/67 ( $^{64/67}\text{Cu}$ ) とも安定な錯体を形成することが知られている。したがって、本標識薬剤を  $^{64/67}\text{Cu}$  へ応用することができれば、腎傷害を解消し、より安全な核医学治療が期待される。しかし、Ga と Cu では陽イオンの価数が異なり錯構造の電荷が異なることから、これらの錯体の差が酵素認識性や体内動態へ影響を及ぼす可能性が懸念される。そこで、本申請課題では、腎臓および自己免疫疾患の副作用がない、がん免疫内用療法薬剤の開発を目的として、①  $^{67/68}\text{Ga}$  標識薬剤である NOTA-MVK-Mal の  $^{64}\text{Cu}$  への応用の可能性の評価、および②  $^{64}\text{Cu}$  標識 NOTA-MVK-Mal を用いた抗 Treg-Fab への応用について評価を行った。

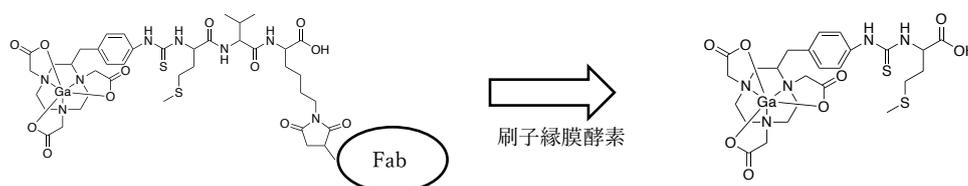


Figure 1. Ga-NOTA-MVK-Fab および Ga-NOTA-Met の構造とその代謝機構

### 3. 研究の方法

#### 試薬

NOTA-MVK-Mal, NOTA-Met および NOTA-MVK-Bzo は既報に従い合成した。刷子縁膜小胞 (BBMVs) も既報に従い作製した。

#### Cu-NOTA-Met の合成

CuCl<sub>2</sub> (1 mg, 7.44 μmol) を 0.25 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5, 50 μL) に溶解し NOTA-Met (3 mg, 5 μmol) を加えた。室温で 1 時間反応後、分析用 RP-HPLC により精製し、非放射性 Cu-NOTA-Met 0.4 mg (0.61 μmol, 12.2%) を青色固体として得た。ESI-MS m/z [M - H]<sup>-</sup> 659, Found 659.27.

#### Cu-NOTA-MVK(Bzo) の作製

CuCl<sub>2</sub> (1.0 mg, 7.44 μmol) を 0.25 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5, 50 μL) に溶解し NOTA-MVK-Bzo (4.0 mg, 4.30 μmol) を加えた。室温で 1 時間反応後、分析用 RP-HPLC により精製し、非放射性 Cu-NOTA-MVK(Bzo) 0.5 mg (0.50 μmol, 11.6%) を青色固体として得た。ESI-MS m/z [M - H]<sup>-</sup> 990, Found 990.65.

#### <sup>64</sup>Cu 標識錯体の合成

<sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub> (1.0 μL) を 0.1 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.5, 10 μL) に混和し、室温で 5 分間静置した。NOTA-Met または NOTA-MVK(Bzo) 溶液 (2.0 × 10<sup>-4</sup> M, 10 μL) を混合した後、37°C で 1 時間反応することで、<sup>64</sup>Cu-NOTA-Met および <sup>64</sup>Cu-NOTA-MVK(Bzo) を合成した。非放射性 Cu 錯体と RP-HPLC の保持時間が一致したことにより生成を確認した。

#### 抗 CD25 Fab の作製

Immobilized Ficin 33 % slurry (Thermo Scientific, Yokohama, Japan) を用いて作製した。

#### NOTA-MVK-Fab, NOTA-Fab の作製

既報に従い、抗 CD25Fab を用いて作製した。Fab あたりの NOTA-MVK および NOTA の結合数は、1.50-2.32 および 2.5 個であった。対象として、従来用いていた抗 c-kit 抗体の Fab を用いた化合物も作製した。<sup>67</sup>Ga および <sup>64</sup>Cu 標識は既報に従い行った。

#### <sup>67</sup>Ga 標識 Fab および <sup>64</sup>Cu 標識 Fab の正常マウス・MC38 腫瘍移植マウスの体内動態の検討

各 <sup>67</sup>Ga 標識 Fab および <sup>64</sup>Cu 標識 Fab をマウス尾静脈より、Fab 濃度を 5 μg/100 μL に調整した。投与後 10 分、1 時間、3 時間、6 時間で各群 3-5 匹のマウスを屠殺し、血液および関心臓器を採取し、重量を測定後、放射活性を測定した。また、投与 6 時間後までの糞尿を採取し、糞尿中に含まれる放射活性をオートウェルガンマシステムにより測定した。

### 4. 研究成果

ガリウムは Ga<sup>3+</sup> の形態をとるが、核医学分野で使用される銅は一般に Cu<sup>2+</sup> の形態が使用されるため、NOTA と形成する錯体は、中性の Ga-NOTA と異なり、マイナスの電荷を有した構造となる。基質の電価は酵素認識に影響する可能性が考えられることから、低分子モデル化合物 <sup>64</sup>Cu-

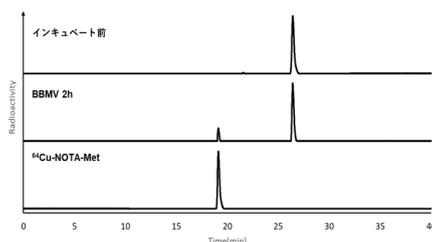


Figure 2. Co<sup>2+</sup> 添加条件下での BBMVs との反応

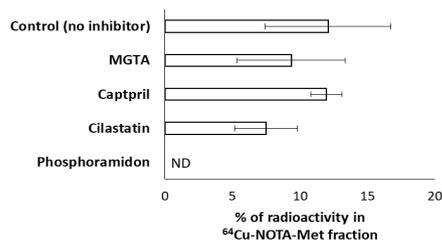


Figure 3. Co<sup>2+</sup> 添加条件下、各種阻害剤添加下での BBMVs との反応

NOTA-MVK-Bzo を用いて、酵素認識性について検討した。<sup>67</sup>Ga-NOTA-MVK-Bzo の場合、BBMVs との2時間のインキュベートにおいて代謝物である <sup>67</sup>Ga-NOTA-Met の遊離が観察されていたが、<sup>64</sup>Cu-NOTA-MVK-Bzo においては、<sup>64</sup>Cu-NOTA-Met の遊離は観察されなかった。一方、Co<sup>2+</sup>添加により酵素を活性化させた BBMVs では、<sup>64</sup>Cu-NOTA-Met の遊離が観察された(Figure 2)。各酵素の認識性について検討したところ、<sup>64</sup>Cu-NOTA-Met の遊離は neutralendopeptidase (NEP)の阻害剤である phosphoramidon によって有意に阻害を受けたことから、<sup>64</sup>Cu-NOTA-MVK-Bzo は <sup>7</sup>Ga-NOTA-MVK-Bzo と同様に、NEP により認識されることを認めた(Figure 3)。

Ga から Cu への変更により NOTA-MVK-Bzo の酵素認識性は低下したが、<sup>64</sup>Cu-NOTA-Met の遊離を観察したことから、次いで従来用いていた c-kiti に対する抗体 Fab フラグメントを用いた動物実験を行った。<sup>67</sup>Ga-NOTA-Fab(c-kit)、<sup>67</sup>Ga-NOTA-MVK-Fab(c-kit)、<sup>64</sup>Cu-NOTA-Fab(c-kit)、<sup>64</sup>Cu-NOTA-MVK-Fab(c-kit)を正常マウスに投与し、体内放射活性分布を比較・検討したところ、各標識 Fab は同様の血液クリアランスを示した一方で、腎放射活性には有意な差が認められた(Table 1)。<sup>67</sup>Ga-NOTA-Fab(c-kit)および <sup>64</sup>Cu-NOTA-Fab(c-kit)は、投与後 3 時間まで腎放射活性が増加したのに対して、<sup>67</sup>Ga-NOTA-MVK-Fab(c-kit)および <sup>64</sup>Cu-NOTA-MVK-Fab(c-kit)は、投与 1 時間後から <sup>67</sup>Ga-NOTA-Fab(c-kit)および <sup>64</sup>Cu-NOTA-Fab(c-kit)と比較し有意に低値を示した。また、<sup>67</sup>Ga-NOTA-MVK-Fab(c-kit)と <sup>64</sup>Cu-NOTA-MVK-Fab(c-kit)は同様の動態を示した。以上の結果より、<sup>67</sup>Ga 標識薬剤、NOTA-MVK-Mal は、<sup>64</sup>Cu においても応用可能であることが認められたことから、次いで、抗 Treg 抗体である抗 CD25 抗体の Fab を用いた展開へと進めた。<sup>64</sup>Cu-NOTA-MVK-Fab(CD25)および <sup>64</sup>Cu-NOTA-Fab(CD25)を作製し、正常マウスの体内動態を評価した。血液クリアランスに差が見られなかった一方で、腎臓への放射活性の集積は投与 1 時間後から有意に低減された。また、投与 6 時間後までに尿中に排泄された放射活性は有意に上昇した。さらに、<sup>64</sup>Cu-NOTA-MVK-Fab(CD25)投与後 6 時間までの尿に含まれる放射活性の分析を行ったところ、SE-HPLC の分析で、低分子画分に多くの放射活性が観察され、さらに本低分子画分を RP-HPLC により分析した結果、60 %以上の放射活性が <sup>64</sup>Cu-NOTA-Met として尿中に排泄されていることを認めた。このような結果は、これまでと同様に、<sup>64</sup>Cu-NOTA-MVK-Fab(CD25)が刷子縁膜酵素の作用により尿排泄性の <sup>64</sup>Cu-NOTA-Met を遊離することで腎臓の放射活性を低減していることを示す。

	<sup>67</sup> Ga-NOTA-Fab(c-kit), ddY mice				<sup>67</sup> Ga-NOTA-MVK-Fab(c-kit), ddY mice			
	1 h		3 h		1 h		3 h	
Blood	8.13	± 0.64	2.91	± 0.46	12.63	± 1.19	5.50	± 0.41
Liver	2.21	± 0.17	1.79	± 0.24	2.51	± 0.23	1.72	± 0.16
Kidney	46.9 <sup>a</sup>	± 4.01	60.43 <sup>a</sup>	± 12.68	17.9 <sup>a</sup>	± 1.85	12.33 <sup>a</sup>	± 1.25
Intestine*	3.18	± 0.26	2.48	± 0.44	4.33	± 0.25	5.65	± 1.05
	<sup>64</sup> Cu-NOTA-Fab(c-kit), ddY mice				<sup>64</sup> Cu-NOTA-MVK-Fab(c-kit), ddY mice			
	1 h		3 h		1 h		3 h	
Blood	10.42	± 1.20	3.06	± 0.54	11.31	± 1.63	4.29	± 0.62
Liver	3.42	± 0.35	2.18	± 0.55	2.91	± 0.45	1.65	± 0.38
Kidney	54.32 <sup>b</sup>	± 6.16	48.07 <sup>b</sup>	± 5.80	12.46 <sup>b</sup>	± 2.63	6.73 <sup>b</sup>	± 0.37
Intestine*	3.64	± 0.36	3.40	± 0.67	4.09	± 0.56	7.39	± 1.10

Table 1. <sup>67</sup>Ga-NOTA-Fab(c-kit)、<sup>67</sup>Ga-NOTA-MVK-Fab(c-kit)、<sup>64</sup>Cu-NOTA-Fab(c-kit)、<sup>64</sup>Cu-NOTA-MVK-Fab(c-kit)の正常マウス(ddY)体内分布

Tissue radioactivity is expressed as %ID/g. Results are expressed as mean ± SD of three to five experiments. \* Expressed as %ID.

<sup>a</sup> p < 0.01 compared <sup>67</sup>Ga-NOTA-Fab(c-kit) with <sup>67</sup>Ga-NOTA-MVK-Fab(c-kit)

<sup>b</sup> p < 0.001 compared <sup>64</sup>Cu-NOTA-Fab(c-kit) with <sup>64</sup>Cu-NOTA-MVK-Fab(c-kit)

<sup>67</sup> Ga-NOTA-Fab(CD25), ddY mice								
	10 min		1 h		3 h			
Blood	26.06	± 7.74	12.75	± 0.84	6.22	± 0.87		
Liver	6.00	± 1.51	5.37	± 0.33	5.03	± 0.19		
Kidney	16.15	± 4.53	29.81	± 2.03	46.30	± 6.81		
Intestine*	2.24	± 0.82	3.90	± 0.04	4.34	± 0.38		

<sup>67</sup> Ga-NOTA-MVK-Fab(CD25), ddY mice								
	10 min		1 h		3 h			
Blood	24.54	± 2.68	15.07	± 0.55	6.41	± 1.18		
Liver	6.79	± 0.75	6.78	± 0.52	3.72	± 0.80		
Kidney	10.11	± 0.93	9.87	± 0.14	5.01	± 0.68		
Intestine*	2.44	± 0.21	5.89	± 0.19	8.12	± 1.37		

Table 2. <sup>67</sup>Ga-NOTA-Fab(CD25)、<sup>67</sup>Ga-NOTA-MVK-Fab(CD25)の正常マウス(C57BL/6J)体内分布  
Tissue radioactivity is expressed as %ID/g. Results are expressed as mean ± SD of three to five experiments. \* Expressed as %ID.

次いで、マウス結腸がん細胞である MC38 細胞を用いて、皮下腫瘍モデルマウスを作製し、その体内動態の検討を行った。<sup>64</sup>Cu-NOTA-MVK-Fab(CD25)は代謝基質配列を含まない <sup>64</sup>Cu-NOTA-Fab(CD25)に比べ、腫瘍への集積に有意な差は観察されなかった一方で、腎臓への放射活性の集積においては、本 <sup>64</sup>Cu 標識薬剤では対照化合物に対して約 75%低い値を有意に示した。一方、Fab(CD25)における MC38 細胞およびマウス T リンパ球由来 HT-2 細胞に対する結合親和性を放射性ヨウ素(<sup>125</sup>I)標識 Fab(CD25)により評価したところ、Fab(CD25)はリンパ球への親和性を示す一方で、MC38 細胞への親和性は示さなかった。このような結果は、腫瘍組織に見られた放射活性は Fab(CD25)が腫瘍細胞に結合しているのではなく、腫瘍に集積したリンパ球に集積していることを示す。一方、血液中の放射活性は、c-kit を用いた場合よりも高く、血液中のリンパ球に Fab(CD25)が結合したために、血液クリアランスの遅延したものと考えられた。今後、Fab(CD25)の前投与など、<sup>64</sup>Cu-NOTA-MVK-Fab(CD25)が循環血液中のリンパ球と結合を防ぐことが必要と考えられた。

	<sup>64</sup> Cu-NOTA-Fab(CD25)		<sup>64</sup> Cu-NOTA-MVK-Fab(CD25)	
	3 h		3 h	
Blood	10.94	± 0.56	13.98	± 0.93
Liver	5.61	± 0.41	5.28	± 0.44
Kidney	71.04 <sup>a</sup>	± 5.17	17.75 <sup>a</sup>	± 2.03
Intestine*	3.46	± 0.45	7.68	± 0.72
tumor	5.89 <sup>bc</sup>	± 1.44	5.51 <sup>bc</sup>	± 0.78

	<sup>125</sup> I-Fab(CD25)		<sup>125</sup> I-Fab(horseradish)	
	3 h		3 h	
Blood	10.54	± 0.79	9.65	± 1.62
Liver	2.60	± 0.11	3.06	± 0.51
Kidney	11.30	± 0.63	11.64	± 1.05
Intestine*	3.06	± 0.33	3.37	± 0.18
tumor	4.07	± 1.08	2.83	± 0.42

Figure 3. <sup>64</sup>Cu-NOTA-Fab(CD25)、<sup>64</sup>Cu-NOTA-MVK-Fab(CD25)の MC38 腫瘍モデルマウスにおける体内分布

Tissue radioactivity is expressed as %ID/g. Results are expressed as mean ± SD of three to five experiments. \* Expressed as %ID.

<sup>a</sup> p < 0.0001 compared <sup>64</sup>Cu-NOTA-Fab(CD25) with <sup>64</sup>Cu-NOTA-MVK-Fab(CD25)

以上の結果より、NOTA-MVK-Fab は、錯体を負電荷に帯電させる <sup>64</sup>Cu を用いた場合でも、腎臓子縁膜酵素的作用により基質配列が開裂し、放射性代謝物を速やかに尿排泄させることで、有意に腎臓への放射活性の集積を低減させることが示され、治療薬剤への応用が期待できた。また、本薬剤は、Fab(CD25)へ応用した場合においても、適用可能であった。しかしながら、血液中のリンパ球との結合と考えられる血液クリアランスの遅延が観察され、治療薬剤への応用には Fab(CD25)の投与量などの検討がさらに必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 喜瀬翔太、上原知也、小林まどか、鈴木博元、荒野泰
2. 発表標題 腎放射活性の低減に刷子縁膜酵素を利用した抗体フラグメント標識薬剤のCu-64への応用
3. 学会等名 第3回日本核医学会分科会放射性医薬品科学研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤井 博史  (Fujii Hirofumi)  (80218982)	国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・分野長   (82606)	
研究分担者	中野 直子  (Nakano Naoko)  (90222166)	東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・准教授   (32660)	