

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10382

研究課題名（和文）At-211放射線免疫療法のためのCu-64標識抗体PETによる体内分布評価

研究課題名（英文）PET biodistribution study of Cu-64 labeled antibody for At-211 radioimmunotherapy

研究代表者

金山 洋介（Kanayama, Yousuke）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：60435641

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：線放出核種²¹¹Atを用いた放射線免疫療法の実現に向け、抗体分子への²¹¹At標識法と標識抗体の体内動態、腫瘍集積について検討するとともに、体内動態・分布を推定・追跡可能とする⁶⁴Cu-PETイメージング法についても検討した。²¹¹At標識後の疎水性増大を緩和するため、PEG含有リンカーを使用することで⁶⁴Cu標識抗体と同等の高い血中滞留性、腫瘍集積性を有する²¹¹At標識抗体の作製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線放出核種の中でも加速器製造が可能で娘核種による副作用の心配がない²¹¹Atは標的線治療法実用化に向けた期待が高い。しかし²¹¹At標識抗体の作製には課題も多いため、本研究において静脈注射後の高い腫瘍集積性を実現した²¹¹At標識抗体作製法に関する情報は有用と思われる。また²¹¹At標識抗体の動態を予測するためのセラノスティクス手法の確立もまた実用化に向けた重要な要素であり、既に標識抗体のPET臨床試験も実施されている⁶⁴Cuイメージングが活用できれば、応用性が広がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To realize radioimmunotherapy using a promising alpha-emitter ²¹¹At, we investigated the synthesis method of ²¹¹At-labeled antibody and its biodistribution and tumor accumulation properties. Also, the ⁶⁴Cu-PET imaging method was examined its availability for estimating the ²¹¹At-antibody biodistribution. We succeeded to obtain a ²¹¹At-antibody with high blood retention and tumor accumulation properties comparable with ⁶⁴Cu-antibody by using a PEG containing linker to reduce the hydrophobicity after ²¹¹At labeling.

研究分野：分子イメージング科学

キーワード：線標的治療 ²¹¹At ²¹¹At標識抗体 radioimmunotherapy decaborane ⁶⁴Cu 抗体PETイメージング 担がんマウス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射性同位体 (RI) を体内に投与し放射線を体内で直接照射する RI 内用療法の分野において、飛程が短く、線源近傍の限られた組織にのみ高い細胞障害性が期待できる α 線放出核種の有用性が広く認識され、様々な α 線核種の利用が盛んに研究されるようになった。 α 線の非常に高い細胞障害性から病変組織への選択的な集積が求められ、がん特異的に高発現する分子に対するリガンド分子や、抗体分子などを利用した分子標的治療薬の開発が進められている。また一方で、分子標的治療においては適用患者の判断のため予め標的分子発現の診断が必要であるが、 α 線による副作用を予測し効果的な治療を実現するために、針生検などによる限られた組織の評価だけでなく、全身を非侵襲的に確認可能な分子イメージング技術を併用することにより、RI 標識薬剤の体内分布、集積性を評価した上で治療を実施するラジオセラノスティクス手法の適用が求められている。

α 線治療薬に有用と考えられている α 線放出核種の中でも、アスタチン ^{211}At (^{211}At) は加速器で生産可能であり、運搬が可能な短すぎない物理学的半減期 (7.2 時間) を有し、シンプルな崩壊様式を持つことから娘・孫核種による副作用の心配がないことから実用化の期待が高い核種である。様々な ^{211}At 標識薬剤の開発が進められると同時に、 ^{211}At 標識薬剤の体内分布を評価するイメージング手法として ^{211}At から放出される 77~90keV の特性 X 線を利用したガンマカメラ、SPECT によるイメージングや、同じハロゲン元素である放射性ヨウ素を利用した PET または SPECT イメージングなどの検討が進められている。しかしながら治療前に ^{211}At 標識薬剤の適用性を判断するのに ^{211}At そのものをイメージング用には使用することはできず、また治療用の放射能で十分なイメージングが可能かも問題となる。また放射性ヨウ素に関しては ^{211}At 標識体と放射性ヨウ素標識体で生体内分布、標識安定性、排泄速度などの違いが報告され、放射性ヨウ素が ^{211}At の有効な代替プローブとは言えない問題がある。

我々はこれまでにポジトロン放出金属核種 ^{64}Cu 、 ^{89}Zr などを用いた抗体 PET イメージング法の実用化を行っており、様々な標識抗体を用いた担癌マウスの PET イメージングを実施した経験がある。特に ^{64}Cu 標識抗体においては国立がん研究センター中央病院との共同研究において世界初の ^{64}Cu -DOTA-Trastuzumab による HER2 陽性乳がんの臨床 PET イメージング試験に成功している。この経験を活かし、 ^{211}At 標識抗体を合成し、それに合わせた形の ^{64}Cu 標識抗体によるラジオセラノスティクス手法の可能性について検討することとした。

2. 研究の目的

^{64}Cu 標識抗体で ^{211}At 標識抗体の動態を推測可能か検討するためには、まず ^{211}At 標識抗体がどのような動態を示すか把握する必要がある。そのため本研究ではまず ^{211}At 標識抗体を合成し、正常マウスまたは担癌マウスを用いて体内動態、腫瘍集積性を検討し、 ^{64}Cu 標識抗体の体内動態、腫瘍集積性と比較する。また抗腫瘍効果を評価して治療に有用な ^{211}At 標識抗体作製法を確立する。さらに、標識抗体の非特異的集積を低減するプレターゲティング法への展開を目指し、生体内クリック反応が可能な標識リンカーを合成し、 ^{211}At 、 ^{64}Cu 標識後のリンカーの体内動態、先に投与した抗体との結合による腫瘍集積能について検討する。

3. 研究の方法

(1) ^{211}At 標識法の検討 : 本研究の開始時点で ^{211}At 標識法として主に 2 種類の手法が想定された。すなわちスズ含有化合物 *N*-succinimidyl-3-(trimethylstannyl)benzoate (m-MeATE) を用いる手法と、ホウ素クラスター化合物 decaborane を用いる手法である。スズ含有化合物の ^{211}At 標識への利用は多くの文献で採用されている手法であるが、一方で生体内での ^{211}At 脱離の可能性が示唆されており、長い血中滞留性から標的部への集積の観察に長時間を必要とする抗体で問題となる可能性が考えられた。ホウ素クラスター化合物に関しては生体内の標識安定性が高いとの報告があり、有用性が高いと予想された。そこでそれぞれの化合物を用いた標識抗体の合成について検討することとした。Decaborane を用いた標識に関しては理化学研究所田中生体機能合成化学研究室との共同研究において検討した¹⁾。抗 HER2 抗体 Trastuzumab に対し 2 種のクリック化学リンカーを介した標識前駆体抗体に対し、理化学研究所仁科加速器科学研究センターにて製造された ^{211}At 水溶液を PBS 溶液下で反応させた。作成した ^{211}At -decaborane-Trastuzumab を担癌マウスに尾静脈投与し、3, 24, 48h 後の体内分布を測定した。また別群の担癌マウスに対し腫瘍内投与後の抗腫瘍効果について観察した。一方、スズ化合物による標識は Lindegren らの手法²⁾を参考にし、m-MeATE を Trastuzumab に修飾して標識前駆体を作成した。理化学研究所仁科加速器科学研究センターにて製造された ^{211}At 溶液 (1% 酢酸+MeOH) を加え、最終 MeOH 濃度 11% として ^{211}At を反応させた。合成した ^{211}At -MeATE-抗体の担癌マウスに尾静脈注射し、3, 24h 後の体内分布を測定した。

(2) ^{211}At 標識法の検討 : Decaborane-PEG4-DBCO (dibenzylcyclooctyne) を合成し、azide-PEG1-NHS を修飾した Trastuzumab と反応させ、標識前駆体を作成した。これに PBS 溶液下で ^{211}At を反応させ、 ^{211}At -PEG5-Trastuzumab を得た。担癌マウスを用いて尾静脈注射後の 3, 24, 48h 後の体内分布を測定し、さらに抗腫瘍効果も同様に実施した。

(3) プレターゲティング法に関する検討 : Decaborane-PEG6-tetrazine、Decaborane-PEG12-tetrazine、DOTA-PEG6-tetrazine、DOTA-PEG12-tetrazine の 4 種のリンカーを合成し、NHS-PEG4-TCO (*trans*-cyclooctene) 修飾した Trastuzumab を用いて、クリック反応後に ^{211}At または ^{64}Cu を標識してマウ

スに投与した場合と、TCO-Trastuzumab 投与後に ^{211}At または ^{64}Cu 標識リンカーを投与した場合（プレターゲットング）の体内分布について検討した。 ^{64}Cu 標識体に関しては PET イメージングも実施した。

4. 研究成果

(1) ^{211}At 標識後の decaborane-抗体は精製に用いた限外ろ過フィルターへの吸着率が著しく高くなり回収が困難であったため、Tween20 を精製前に加える必要があった。 ^{211}At 標識後に疎水性が増大したことが原因と考えられた。体内分布についても $0.92\ \mu\text{g}$ の ^{211}At -decaborane-Trastuzumab 尾静脈注射後に疎水性の増大に依ると思われる肝、脾臓への高集積と血中滞留性の低下が見られ、腫瘍への集積も $3\sim 5\ \text{\%ID/g}$ と低濃度であった。この手法による ^{211}At 標識抗体の全身動態は従来の ^{64}Cu 標識抗体 PET で得られてきた結果と全く異なるものとなった。この標識体では静脈注射では十分な治療効果は望めないとと思われるが、一方で腫瘍に十分集積した場合にはどの程度の治療効果が得られるのか検討するため、腫瘍内注射後の抗腫瘍効果について検討した。 $1.4\ \text{MBq}/6.3\ \mu\text{g}$ の ^{211}At -decaobonane-Trastuzumab 腫瘍内注射を行った群において、PBS や非標識抗体、 ^{211}At 溶液を同様に腫瘍内注射した群に比べ著しい腫瘍体積増加の抑制効果が観察できた。 0.1 、 0.5 、 $1.0\ \text{MBq}$ の投与量でも試験した結果、腫瘍体積増加の抑制効果は見られたが、投与量に相関して抑制効果が低下する様子が見られた。しかしながら腫瘍内注射では放射能の腫瘍内集積に個体差が大きく、より効率的に腫瘍全体に治療効果を発揮するためには血中から抗原親和性により腫瘍細胞へ集積する必要があると考えられた。

また一方、m-MeATE を用いた標識については、毎回の標識率が安定せず、さらに精製段階で ^{211}At 標識体のみ回収されない現象が生じ、標識抗体を得ることが困難であった。参考文献では乾固状態の ^{211}At を微量の $1\ \%$ 酢酸+MeOH 溶液で溶解して反応させているのに対し、我々は最初から $1\ \%$ 酢酸+MeOH 溶液として作成された ^{211}At を用いたことが一因と考えられた。この当時の理研の ^{211}At 供給が溶液状態に限定されていたことが溶液を使用した理由であるが、 $1\ \%$ 酢酸+MeOH 溶液中では 線の作用によって多様な化学種が発生し、標識反応に悪影響を及ぼしたものと考えられた。Decaborane の実験では ^{211}At 水溶液を使用しており、このような悪影響がより少なかったものと思われる。また精製段階で限外ろ過やゲルろ過カラムを用いた精製法では ^{211}At 標識体のみカラムに吸着する現象が見られ、このことも ^{211}At 標識による疎水性増大の影響と考えられたため、非特異的吸着を抑えた Sephadex G50 gel DNA grade (GE ヘルスケア社(当時))を用いたところ、放射能収率を改善することができた。この手法は Decaborane 体の収率改善にも効果があった。

(2)上記の検討で問題となった ^{211}At 標識後の疎水性増大を緩和し、体内動態を改善するため、親水性の PEG 鎖をリンカーに導入した。Decaborane-PEG4-DBCO と azide-PEG1-NHS を用いた ^{211}At -PEG5-Trastuzumab は尾静脈投与後 48h で $20\ \%$ ID を維持する長い血中滞留性と投与後 24h で約 $21.5\ \%$ ID/g、48h 後で約 $26\ \%$ ID/g と ^{64}Cu 抗体 PET イメージングでの通常の結果に近い値となり、体内動態を大きく改善することに成功した。しかしながら $\%ID$ で評価した場合、腫瘍への集積は約 $2.5\ \%$ ID に留まったため、この集積量で治療効果が見られるかどうか、抗腫瘍効果試験により観察した。 $1.0\ \text{MBq}$ および $1.8\ \text{MBq}$ の ^{211}At -PEG5-Trastuzumab を投与した群では非標識の ^{211}At 溶液を投与した群に比べ著しい腫瘍体積増加の抑制が見られた。従来法による ^{64}Cu 標識抗体の動態と同等の体内動態、特異的集積性を示す ^{211}At 標識抗体作製法を確立することができた。

(3)ここまでの検討で得られた知見をプレターゲットング法に応用することを目指し、PEG 鎖長の異なる Decaborane 体、DOTA 体の tetrazine リンカーを合成し、TCO 修飾抗体とのクリック反応による標識抗体の体内動態の検討と TCO 修飾抗体をあらかじめ投与してのプレターゲットング法の検討を行った。 ^{211}At 標識抗体として投与した場合、腫瘍集積は尾静脈注射後 48h で $20\ \%$ ID/g 程度の集積が得られたが、肝、腎への集積が高い結果となった。腎への高集積からリンカー構造が不安定な可能性が示唆された。また DOTA 体を用いた ^{64}Cu 標識においては標識率が著しく低い結果となり、腫瘍集積も $10\ \%$ ID/g 程度と低く、また肝臓への高集積が見られた。 ^{64}Cu 標識率の低下は精製時の ^{64}Cu 脱落の様子からリンカー構造が DOTA との錯体形成を阻害している可能性が考えられ、また肝臓への著しい高集積から体内での ^{64}Cu 脱落が示唆された。一方、あらかじめ TCO 修飾抗体を投与した個体に標識リンカーを投与するプレターゲットングの検討においては、残念ながら PEG6 体、PEG12 体ともに腫瘍部位への集積は非常に低く、ほとんど体内でのクリック反応による集積が見られなかった。その一方で非常に高い肝、腎集積が見られた。プレターゲットングでうまく腫瘍集積しなかった原因として、前駆抗体の腫瘍細胞表面に結合している量、標識リンカー投与量が特異的集積を検出するのに適してなかった可能性があり、internalization の少ない細胞の使用、標識リンカーの高比放射能化・微量投与、標識リンカー投与タイミング最適化など条件検討の余地がある。 ^{211}At 標識後の安定性、 ^{64}Cu 標識率などの問題点が明らかとなり、現時点では同一構造で ^{211}At と ^{64}Cu を標識可能なセラノスティクス用リンカー構造を検討する段階に至っていない。

参考文献

- 1) K. Fujiki et al., *Chem. Sci.* **10**, 1936 (2019)
- 2) S. Lindgren et al., *J Nucl. Med.* **49**, 1537 (2008).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujiki Katsumasa, Kanayama Yousuke, Yano Shinya, Sato Nozomi, Yokokita Takuya, Ahmadi Peni, Watanabe Yasuyoshi, Haba Hiromitsu, Tanaka Katsunori	4. 巻 10
2. 論文標題 211At-labeled immunoconjugate via a one-pot three-component double click strategy: practical access to β -emission cancer radiotherapeutics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 1936 ~ 1944
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c8sc04747b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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 金山洋介、坂本健作、藏地理代、中谷友香、Wang Yang、横北卓也、小森有希子、森大輝、羽場宏光、渡辺恭良
2. 発表標題 211At-decaborate標識 trastuzumabの静脈投与による抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 日本分子イメージング学会 web大会 2020年5月26日-6月8日
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----