

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390328

研究課題名（和文） アイソトープ治療に適した抗体標識薬剤の分子設計

研究課題名（英文） Chemical design of chelating agents suitable to radiotherapy using antibody fragments as vehicles.

研究代表者

氏名（ローマ字）：荒野 泰（Yasushi Arano）

所属機関・部局・職：千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：90151167

研究成果の概要：

組織移行性と血液消失の速やかな低分子化抗体や Affibody などのポリペプチドが開発され、アイソトープ治療の有効性と安全性の向上が期待される。しかし、これらのポリペプチドは腎臓への非特異的な集積を示して重篤な腎臓障害を招く。ポリペプチドが腎細胞へ取り込まれる前に、放射性化合物を遊離させて尿中へ排泄できれば腎臓の放射活性を大きく低減できると考えた。本薬剤設計に必要な、腎臓の酵素で速やかに開裂される結合様式と新たな標識薬剤についての知見を得た。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2007年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：放射性薬品化学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：抗体、アイソトープ治療、腎障害、刷子縁膜酵素、代謝開列性スパーサ、インジウム-111、テクネチウム-99m、イットリウム-90

1. 研究開始当初の背景

(1) イットリウム-90 (^{90}Y) 標識抗 CD20 抗体の臨床研究から、標識抗体を用いるがんのアイソトープ治療の有効性が明らかになった。

(2) しかし、IgG を母体とする本薬剤は、血液からの消失速度が緩徐であるため、血液中を循環する間に骨髄を照射し、それによる副作用が観察されている。

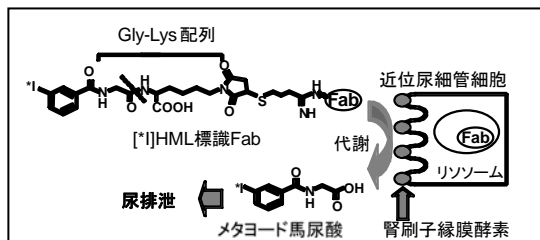
(3) Single chain Fv フラグメント及び Diabody などの低分子化抗体や Affibody を始めとするポリペプチドは、標的であるがんへの高い結合親和性と共に腫瘍内での均一

な分布、さらに血液からの速やかな消失を示すことから、アイソトープ治療の有効性と安全性の向上に適した体内動態特性を有する。

(4) しかし、これらの低分子ポリペプチドをアイソトープ治療に適した放射性核種である ^{90}Y やレニウム-186/188 ($^{186/188}\text{Re}$) で標識した場合、腎臓へ取り込まれてリソソーム代謝で生成する放射性代謝物がリソソーム内に長時間存在するため腎臓に対して重篤な副作用を招く。

(5) 我々は放射性ヨウ素を用いた以前の検討から、抗体フラグメントと尿排泄性の高い

ヨード馬尿酸とを、抗体フラグメントが取り込まれる腎臓近位尿管刷子縁膜の酵素の基質を介して結合した標識薬剤 (HML) を開発し、本薬剤を用いて作製した標識抗体が投与早期から腎臓の放射活性を大きく低減することが可能であることを明らかにした。本薬剤設計を下図に示す。



2. 研究の目的

放射性ヨウ素で達成された薬剤設計をアイソトープ治療に適した⁹⁰Yや^{186/188}Reへ展開することが可能となれば、アイソトープ治療の有効性と安全性を大きく向上することが可能となる。これを達成するための基礎的知見を得る目的で、以下に記す研究を行った。

(1) 先の研究から、^{[188Re]tricarbonyl-(carboxycyclopentadienyl)rhenium (CpTR-COOH)} を生体に投与すると、グリシン抱合を受けて尿中へ速やかに排泄を受けることを示した。そこで、本有機レニウム錯体を用いて、放射性ヨウ素で提唱した薬剤設計が金属錯体へも応用が可能であるかを検証した。

(2) 有機レニウム錯体の合成には、多くの工程と時間を要するため、広汎な応用は困難である。そのため、生体内で安定で尿排泄性が高く、さらに低濃度においても⁹⁰Yあるいは^{186/188}Reと高い放射化学的収率で錯体を与える配位子をそれぞれ探索した。

(3) 放射性ヨウ素標識薬剤を用いた検討から、glycine と lysine ペプチド結合は、血液中では安定に存在するが、腎臓の刷子縁膜酵素の作用で速やかに開裂することを見出した。多彩なキレート化合物への応用を考え、腎臓刷子縁膜酵素の基質となり得る新たなペプチド結合を探索した。

3. 研究の方法

(1) Glycyl-lysine 結合を介して CpTR-COOH を抗体 Fab フラグメントに結合し、以前開発した抗体の放射性ヨウ素標識薬剤である HML 標識抗体とのマウス体内動態を比較した。

(2) ヨード馬尿酸に様々なアミノ酸を結合したヨード標識ジペプチドについて、ペプチド結合の①マウス血液中での安定性②ラット腎皮質から作製した刷子縁膜小胞に存在する酵素による開裂性を検討した。さらに、上記検討から選出した新たな放射性ヨウ素標識薬剤を用いて抗体標識を行い、その体内

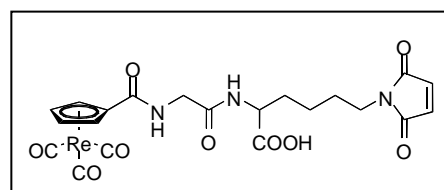
動態を比較した。

(3) ⁹⁰Y および ^{186/188}Re と化学的性質性質の類似した入手の容易な ¹¹¹In および ^{99m}Tc を用いて、これらの金属放射性核種と生体内で安定かつ尿排泄性の錯体を与える配位子の探索を行った。

4. 研究成果

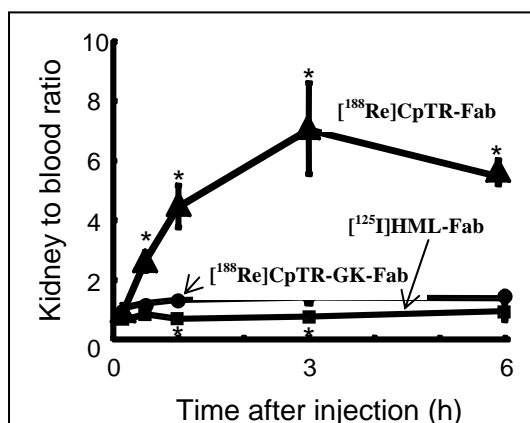
(1) 腎臓刷子縁膜酵素で開裂する代謝性スパーサを用いる標識抗体設計法の金属放射性核種への応用可能性

① 1価有機 ¹⁸⁸Re 標識化合物である CpTR-COOH を glycyl-lysine 配列を介して抗体 Fab フラグメントに結合して ¹⁸⁸Re 標識抗体を作製した。さらに CpTR-COOH を抗体に直接結合した標識抗体も作製した。抗体標識薬剤の化学構造を下図に示す。



② Glycyl-lysine 開裂を介して CpTR-COOH を結合しても刷子縁膜酵素の基質としての認識を受けるが、その親和性は HML の場合に比べてやや低減することを認めた。

③ CpTR-glycyl-lysine を用いた標識抗体 (^{[188Re]CpTR-GK-Fab}) は、CpTR-COOH を直接結合した標識抗体 (^{[188Re]CpTR-Fab}) に比べて腎臓の放射活性を投与早期から大きく低減した。しかし、HML 標識抗体に比べると、腎臓の放射活性はやや高値を示し、刷子縁膜小胞を用いたインビトロの結果と良く一致した。それぞれの標識抗体をマウスに投与したときの腎臓と血液の放射活性比



の経時変化を下図に示す。

④ これらの結果から、HML で提唱した薬剤設計は金属放射性核種への応用が基本的に可能であることを認めた。それと共に、放射性化合物の化学構造に応じて、代謝開裂型スパーサの構造の最適化が必要と考えられた。

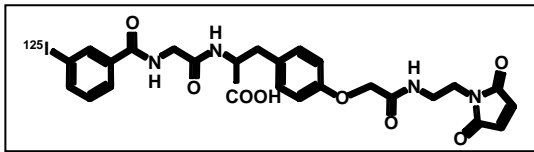
(2) Glycyl-lysine 以外の代謝開裂型スペーサの探索

① HML の glycyl-lysine 配列の lysine に代わり、側鎖を有する様々なアミノ酸を導入したジペプチドを合成した。

② これらは血液中で安定に存在した。

③ 刷子縁膜小胞との反応により、glycyl-lysine 結合と共に glycyl-tyrosine 結合や glycyl-aspartic acid 結合がヨード馬尿酸を遊離することを認めたが、両者を比較した場合 glycyl-tyrosine の方がより多くの馬尿酸を遊離した。

④ Tyrosine にヨード馬尿酸を結合し、さらに tyrosine のフェノール性水酸基に化学修飾を施し、アルキル鎖を介してマレイミド基を導入した化合物を合成した。本化合物の化学構造を下図に示す。



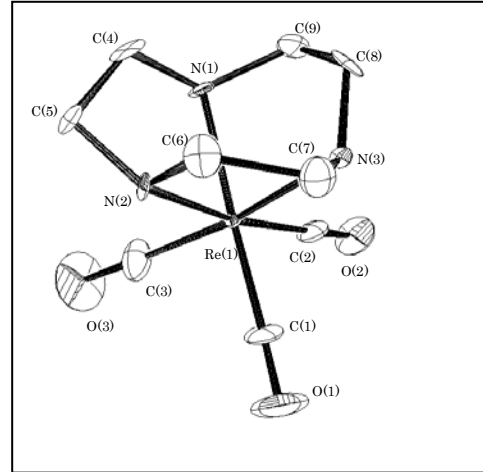
⑤ この化合物を抗体 Fab フラグメントに結合し、その体内動態を HML 標識抗体と比較した。その結果、両者はほぼ同じ体内動態を示した。さらに、尿中へはヨード馬尿酸として排泄されることを認めた。以上の結果は、放射性化合物の化学構造に応じて代謝開裂型スペーサ構造を最適化することにより、腎臓の刷子縁膜酵素の作用で尿排泄性の放射性化合物を抗体から遊離し、金属放射性核種標識抗体やポリペプチドの投与で観察される腎臓の放射活性を大きく低減できることを強く示唆する。

(3) ⁹⁰Y および ^{186/188}Re に対する配位子の探索

^{186/188}Re とテクネチウム-99m (^{99m}Tc) とは類似した化学的性質を有する。共に様々な酸化状態を取り、これまで主に 5 価の酸化状態が放射性薬剤の開発に使用されている。一方、1 価の Tc と Re は化学的に安定であり、比放射能の高い標識体の合成に有利である。さらに近年、1 価の酸化状態の Tc や Re である $[M(CO)_3(OH_2)_3]^+$ を簡便な方法で合成する方法が確立した。こうした背景から、1 価の Tc および Re と安定な錯体を形成する配位子について基礎的な検討を行った。

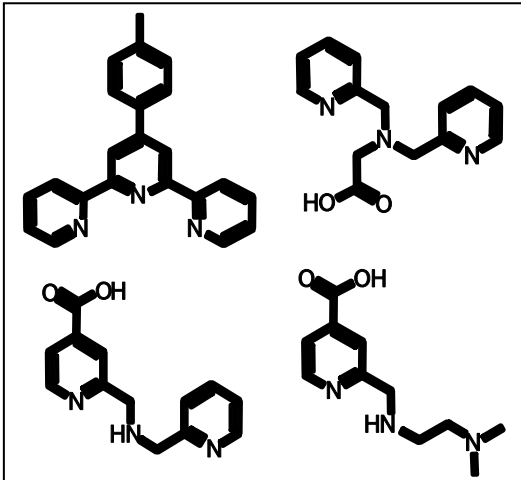
① $[M(CO)_3(OH_2)_3]^+$ についての先行研究から、アミノ基を配位原子とする配位子が安定な錯体の合成に有用と考えられている。これに加えて大環状ポリアミンに特徴的なマクロサイクリック効果による錯体の安定化効果を考え、大環状ポリアミンの一つである 1,4,7-triazacyclononane との反応を検討した。非放射性レニウムを用いた結晶解析により、この配位子が 1 価 ^{99m}Tc および ¹⁸⁸Re と生体内で安定な錯体を形成することを認めた。

その構造を下図に示す。



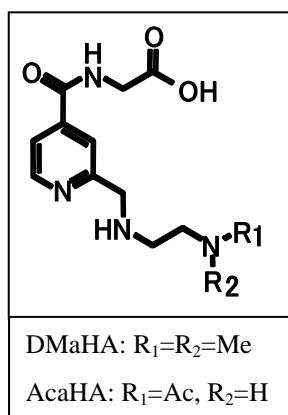
しかし、その錯形成反応収率は予想に反して低かったことから、大環状構造に代わりピリジン性窒素を有する配位子について検討を行った。

② 下図に示すように、配位子分子内にピリジン環を 1 から 3 有する化合物について 1 価 ^{99m}Tc との反応を検討した。その結果、ピリジン環が 1 個で十分な生体内での安定性を有することを認めた。



③ グリシンを結合したイソニコチン酸を母体構造に選択し、2 位の炭素にエチレンジアミン構造を導入した誘導体を合成し、1 価 ^{99m}Tc との錯形成反応を検討した。そして、末端のアミノ基をアミドに変換することで反応収率が低減すること、2 級アミノ基の化学修飾も錯形成反応収率を低減することを認め、次ページ図で DMaHA と表記した配位子が、10 μM 以上の配位子濃度において、40°C 1 時間の反応で 90% 以上の放射化学的収率で目的とする ^{99m}Tc 錯体を与えることを認めた。Tc 錯体の構造は対応する非放射性レニウム錯体を合成し、化学構造を確認した後、それぞれの HPLC 並びに TLC における挙動の比較から行った。^{99m}Tc-DMaHA をマウスに投与したと

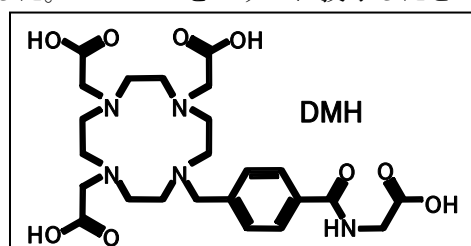
ころ、投与6時間後において、投与した70%以上が尿中に排泄され、腎臓への放射活性の残存は見られなかった。これらの結果から、 ^{99m}Tc -DMAHAはHMLの薬剤設計におけるヨード馬尿酸に対応する化合物と位置付けられる。



④さらに、DMAHAにリジンおよびチロシンを結合したところ、両ペプチド結合は、ラット腎皮質より調整した刷子縁膜小胞により、切断を受けることを認めた。現在、本化合物に更なる化学修飾を施し、その最適構造の探索を続行中である。

⑤ ^{90}Y については、入手と取り扱いの容易さから Y と化学的に類似したインジウム(In)の放射性同位体である ^{111}In を用いて検討を進めた。

⑥大環状ポリアミノカルボン酸である1,4,7,10-tetraazacyclododecanetetra-carboxylic acid (DOTA)を基本構造に選択した。そして、DOTAの酢酸の一つをmethyl benzoylglycineに置換した化合物DMHを合成した。 ^{111}In -DMHをマウスに投与したところ、



速やかな全身からの尿排泄が観察され、HMLに基づく薬剤設計におけるヨード馬尿酸に対応する ^{111}In および ^{90}Y 標識化合物としての可能性を認めた。さらに本配位子にリジンあるいはチロシンを結合した ^{111}In 標識体は、グリシンとの間のペプチド結合が刷子縁膜酵素による切断を受けることを認めた。しかし、本配位子と ^{111}In とが形成する錯体の安定性ならびに錯形成反応収率が十分でなかったため、新たな配位子の探索へと研究を進めた。しかし、本研究から、 ^{111}In -DOTA誘導体が結合した場合でも、適切なアミノ酸配列を導入することで、刷子縁膜酵素の作用を受けてこの配列が開裂することが確認され、配位子と

スパーサ構造を最適化することにより、 ^{111}In および ^{90}Y 標識ポリペプチドの腎集積を本研究で検討した薬剤設計により低減できる可能性を認めた。

⑦ ^{111}In および ^{90}Y 錯体の安定性を考慮して、DOTA構造への修飾を施す設計から、DOTA構造への修飾を行わずに、新たにカルボン酸を導入するよう薬剤設計を変更した。そして、ベンジルDOTAのパラ位にカルボン酸を有する化合物を新たな候補化合物に選出した。しかし、本化合物は既知でないため、本化合物の合成法から検討を行った。そして、ベンジルDOTA合成方法についての新たな方法を開発した。現在、本合成経路によるベンジルDOTAのカルボン酸誘導体の合成についての詳細な検討を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

① Okamura T, Igarashi J, Kikuchi T, Fukushi K, Arano Y, Irie T. A radiotracer method to study efflux transport of iodide liberated from thyroid hormones via deiodination metabolism in the brain. *Life Sci.* in press 査読有り

② Saito Y, Furukawa T, Arano Y, Fujibayashi Y, Saga T. Comparison of semiquantitative fluorescence imaging and PET tracer uptake in mesothelioma models as a monitoring system for growth and therapeutic effects. *Nucl. Med. Biol.* 35, 851-860, 2008 査読有り

③ Odaka K, Uehara T, Arano Y, Adachi S, Tadokoro H, Yoshida K, Hasegawa H, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Hiroe M, Irie T, Tanada S, Komuro I. Noninvasive detection of cardiac repair after acute myocardial infarction in rats by ^{111}In Fab fragment of monoclonal antibody specific for tenascin-C. *Int. Heart J.* 49, 481-492, 2008 査読有り

④ Suzuki K, Shimmura T, Thipyapong K, Uehara T, Akizawa H, Arano Y. Assessment of macrocyclic triamine ligands as syntons for organometallic ^{99m}Tc radiopharmaceuticals. *Inorg. Chem.* 47, 2593-2600 (2008) 査読有り

⑤ Akizawa H, Saito M, Tsukamoto I, Ohkura T, Shimizu T, Kitamura Y, Mifune I, Saito Y, Arano Y, Saji H. Effect of carboxyl-group of D-glutamic acid or γ -carboxy-D-glutamic acid as N-terminal amino acid of ^{111}In -diethylenetriaminepentaacetic acid-octreotide on accumulation of radioactivity in the kidney. *Chem. Pharm. Bull.* 30, 2226-2228, 2007 査読有り

⑥ Akizawa H, Uehara T, Arano Y. Renal uptake and metabolism of radiopharmaceuticals derived from peptides and proteins. *Adv. Drug Deliv. Review* 60, 1319-1328 (2008) 査読有り

⑦ Uehara T, Uemura T, Hirabayashi S, Adachi S, Odaka K, Akizawa H, Magata Y, Irie T, Arano Y. Technetium-99m-labeled long chain fatty acid analogs metabolized by β -oxidation in the heart. *J. Med. Chem.* 50, 543-549 (2007) 査読有り

⑧ Uehara T, Koike M, Nakata H, Hanaoka H, K, Iida Y, Hashimoto K, Akizawa H, Endo K, Arano Y. Design, synthesis and evaluation of [^{186}Re]organorhenium-labeled antibody fragments with renal enzyme-cleavable linkage for low renal radioactivity levels. *Bioconjugate Chem.* 18, 190-198 (2007) 査読有り

[学会発表] (計 16 件)

① 平林正次、上原知也、鈴木優章、根矢三郎、荒野 泰。 $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ 錯体の生成収率および安定性に及ぼす配位子分子内ピリジン性窒素数の影響(3月26日2009年)日本薬学会第129年会、京都。

② 宮本 怜、秋澤 宏行、上原 知也、東祐翼、二木 史郎、花岡 宏史、飯田 靖彦、遠藤 啓吾、荒野 泰。抗体のオクタアルギニン修飾が細胞への結合性に及ぼす影響(3月27日2009年)日本薬学会第129年会、京都。

③ 小川 愛那、富岡 直子、黒川 将弘、初芝 清徳、松島 理、秋澤 宏行、上原 知也、荒野 泰。肝動脈塞栓療法併用アイソトープ治療を目的とする放射性ヨウ素標識環状ポリアミン誘導体の合成と基礎的検討(3月26日2009年)日本薬学会第129年会、京都。

④ 平林 正次、上原 知也、荒野 泰。安定なテクネチウムトリカルボニル錯体を形成する新規標識薬剤の開発(10月24日2008年)第48回日本核医学会、千葉。

⑤ 小高謙一、上原 知也、荒野 泰、長谷川 洋、田所 裕之、吉田 勝哉、今中 恭子、廣江 道昭、棚田 修二、小室 一成、入江 俊章。In-111 標識抗テネニンC抗体による急性心筋梗塞後組織修復の非侵襲的評価法の開発(10月25日2008年)第48回日本核医学会、千葉。

⑥ 上原 知也、鈴木 博元、石井 大輔、秋澤 宏行、高間 雅志、村上 正裕、荒野 泰。 dendrimer の体内動態制御に関する基礎的研究(10月24日2008年)第48回日本核医学会、千葉。

⑦ 上原 知也、平良 優一郎、土屋 将夫、秋澤 宏行、荒野 泰。多価効果による標的分子への集積向上を目指した新たな $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標

識薬剤の設計(10月24日2008年)第48回日本核医学会、千葉。

⑧ 加川 信也、西井 龍一、東 達也、上原 知也、岸辺 喜彦、岩崎 甚衛、川井 恵一、荒野 泰。アミノ酸輸送システムAを標的とした[N-methyl- ^{14}C]MeAIB合成の基礎的検討(10月24日2008年)第48回日本核医学会、千葉。

⑨ 秋澤 宏行、宮本 怜、上原 知也、東祐翼、中瀬 生彦、二木 史郎、花岡 宏史、飯田 靖彦、遠藤 啓吾、荒野 泰。(10月25日2008年)第48回日本核医学会、千葉。

⑩ 秋澤 宏行、富岡 直子、黒川 将弘、上原 知也、荒野 泰。肝動脈塞栓療法併用アイソトープ治療を目的とする環状ポリアミン誘導体の比較(10月24日2008年)第48回日本核医学会、千葉。

⑪ Miyamoto R, Akizawa H, Uehara T, Takayama K, Futaki S, Hanaoka H, Iida Y, Endo K, Arano Y. Prolonged retention of antibody on target by modification with arginine-rich peptide (June 16, 2008). Society of Nuclear Medicine 2008 Annual Meeting, New Orleans.

⑫ Tomioka N, Akizawa H, Uehara T, Sun W-J, Kurokawa M, Matsushima S, Hatsushiba K, Hashimoto K, Arano Y. A simple and convenient method to estimate therapeutic radiopharmaceuticals for transcatheter arterial embolization (June 16, 2008). Society of Nuclear Medicine 2008 Annual Meeting, New Orleans.

⑬ 上原 知也、平林 正次、秋澤 宏行、荒野 泰。非特異的腎集積を低減する金属RI標識抗体フラグメントの開発(11月4日2007年)第47回日本核医学会、仙台。

⑭ 荒野 泰。RI内用療法の動向。アイソトープ治療薬剤の開発研究(11月4日2007年)第47回日本核医学会、仙台。

⑮ 上原 知也、土屋 将夫、内田 雪絵、平良 優一郎、秋澤 宏行、荒野 泰。標的分子への集積向上を目的とする新たな $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識薬剤の設計(11月5日2007年)第47回日本核医学会、仙台。

⑯ 土屋 将夫、石井 大輔、上村 友恵、内田 雪絵、上原 知也、秋澤 宏行、荒野 泰。 dendrimer の化学修飾による動態制御(3月28日2007年)日本薬学会第128年会、富山。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：放射性標識化合物

発明者：荒野 泰、上原 知也

権利者：国立大学法人千葉大学

種類：国内
番号：特願 2008-278563
出願年日：2008 年 10 月 29 日

上記特許の国際出願
種類：国外 (PCT 出願)
番号：PCT/JP2009/58372
出願年日：2009 年 4 月 28 日

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ
<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/housha/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒野 泰 (Arano Yasushi)
千葉大学大学院薬学研究院・教授
研究者番号：90151167

(2) 研究分担者

上原 知也 (Uehara Tomoya)
千葉大学大学院薬学研究院・講師
研究者番号：10323403

遠藤 啓吾 (Endo Keigo)
群馬大学医学系大学院・教授
研究者番号：10115800

秋澤 宏行 (Akizawa Hiromichi)
北海道医療大学薬学部・准教授
研究者番号：90311795

(3) 連携研究者

なし