

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15594

研究課題名（和文）リンカー技術と抗体工学を駆使したアスタチン-211の腫瘍特異的送達方法の開発

研究課題名（英文）Altered biodistribution of astatine-211 via linker technology and antibody engineering in radioimmunotherapy

研究代表者

高島 大輝（Takashima, Hiroki）

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・研究員

研究者番号：10785588

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）：アスタチン-211標識抗体に対する放射線分解は標識抗体の腫瘍集積性を減弱させるが、ラジカルスカベンジャーを用いて、これを回避できること、またアスタチン-211を用いた放射免疫療法では、受動的標的化よりも、能動的標的化が重要であり、後者が核種の主たる腫瘍集積メカニズムであることを明らかにした。

放射線分解から標識抗体を保護することは、核種の正常臓器への分布には影響を及ぼさなかったが、複数の制御方法を組み合わせることで、正常臓器への分布をより厳格に制限できることを実証した。また、正常臓器の被曝が軽減し、アスタチン-211の生体内での腫瘍特異性が向上することの毒性学的な意義を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、アルファ線放出核種アスタチン-211標識抗体が放射線分解を受けると、腫瘍への薬剤の集積性が低下することを明らかにした。放射線分解が放射性同位元素（RI）を標識した医薬品に及ぼす影響を正しく理解することで、放射性医薬品に対して必要十分な品質管理を行うことができる。放射性医薬品の品質管理に資する重要な知見が得られた。

また、アスタチン-211を用いたRI内用療法において、正常臓器への被曝を軽減することの毒性学的な意義を明らかにした。

いずれも将来のアスタチン-211を用いたがん治療開発に資する重要な知見と考える。

研究成果の概要（英文）：We revealed that radiolysis denatures antibody labeled with astatine-211 and decreases tumor accumulation of radioactive antibody, whereas stabilization with a free radical scavenger contributes to avoiding the denaturation and maintaining tumor accumulation in radioimmunotherapy. Moreover, we elucidated that active targeting via antigen-antibody reaction dominantly contributes to delivering astatine-211 to tumor site compared with passive targeting via the EPR effect.

Although the stabilization with a free radical scavenger has no impact on distribution of astatine-211 to normal organs, we significantly decreased distribution to normal organs using multiple strategies. Moreover, we confirmed that the improved tumor specificity of the radionuclide resulted in attenuating toxicity.

研究分野：Drug delivery system

キーワード：Drug delivery system アスタチン-211 放射免疫療法 リンカー技術 抗体改変技術 薬理学 毒性学

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗体にリンカーを介して抗腫瘍活性を持つ薬剤や治療用 radioisotope (RI) を結合させた武装化抗体 (図 1) の開発が盛んに行われ、これまでに複数の抗体-薬物複合体 (antibody-drug conjugate : ADC) が承認を得ている。

RI 標識抗体を用いたがん治療は、放射免疫療法 (radioimmunotherapy : RIT) と呼ばれ、抗 CD20 抗体にベータ線放出核種 yttrium-90 (^{90}Y) を結合させた ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan (Zevalin) が、非ホジキンリンパ腫に対する治療薬として実用化されている。近年、アルファ線放出核種をがん治療に応用する試みが活発となっている。アルファ線は、ベータ線と比較して、線エネルギー付与が高く、DNA の二重鎖切断を介した細胞死を効率的に誘導可能で、組織内における飛程距離は数十マイクロメートルと短く、細胞数個程度である。アルファ線放出核種をがん病巣に選択的に集積させることで、がん周囲の正常細胞への被曝は限定的なものとしつつ、高い抗腫瘍活性が得られる。

我々は、抗体に標識することができ、国内での製造が可能で、核種の供給体制が最も充実しているアルファ線放出核種 astatine-211 (^{211}At) を用いた RIT の前臨床研究を行い、これまでに以下の成果を得た。 ^{211}At 結合抗体は、標識後に溶液中で生じる活性酸素種によって放射線分解を来し、抗体の構造が破壊され、特異的結合能も障害を受けたが、精製に用いる溶出溶媒にアスコルビン酸 Na 等のラジカルスカベンジャーを添加することで、放射線分解は回避可能で、標識抗体の特異的結合能も維持管理することができた (S. Manabe and H. Takashima, et al. ACS Omega. 2021)。また、放射線分解された ^{211}At 結合抗体と比較して、アスコルビン酸 Na で保護した標識抗体の腫瘍増殖抑制効果は有意に優れることを明らかにした (H. Takashima, et al. Cancer Sci. 2021)。

有効で安全なアルファ線治療を達成するためには、薬効を得るために必要かつ十分な核種を腫瘍に到達する一方で、正常臓器への核種の分布を可及的に軽減させることが重要であるが、これまでに実施した ^{211}At 結合抗体の薬物動態試から、腫瘍への集積に加え、胃と甲状腺にも放射能が集積することが分かった。これは、抗体の体内分布とは異なること、また同族元素のヨウ素同様、 ^{211}At も胃と甲状腺に指向性を示すことから、抗体から遊離した ^{211}At がこれらの臓器に集積したと考えられる。

前記のようにアルファ線は生体内における飛程距離が数十マイクロメートルと短いため、正常臓器への分布をより厳格に制限することで、正常臓器の被曝が軽減され、毒性軽減と therapeutic window の拡大が期待できる。本研究は、正常臓器への被曝の軽減に焦点を当て、評価と解析を実施した。

2. 研究の目的

(1) 抗体からの ^{211}At の遊離を軽減し、胃と甲状腺への核種の分布をより厳格に制限しうるリンカー構造を同定することを本研究の目的の一つとした。

(2) 抗体改変技術と ^{211}At を用いた RIT とを融合し、 ^{211}At 標識抗体として応用した場合に、正常臓器への分布と被曝を軽減しうる改変抗体を見出し、これによって ^{211}At -RIT の therapeutic window を拡大させることをもう一つの目的に定め、研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 下記の検証に先んじて、前記の活性酸素種による放射線分解を回避することの薬理的な意義を検証した。つまり、放射線分解が ^{211}At 標識抗体の腫瘍集積性並びに正常臓器への分布に及ぼす影響と ^{211}At 標識抗体の腫瘍集積メカニズムを明らかにすべく、放射線分解された ^{211}At 標識抗体とアスコルビン酸 Na によって保護した標識抗体の薬物動態を評価し、得られた結果を比較した。

(2) 想定される抗体からの ^{211}At の遊離部位は、リンカーと抗体の結合部位 (図 2 (A) の (1))、もしくはリンカー化合物における ^{211}At の標識部位 (図 2 (A) の (2)) である。本研究では、前者 (図 2 (A) の (1)) に着目し、検証を行った。異なるリンカーを用いて ^{211}At 結合抗体を作製し、これらの保存溶液中での遊離 ^{211}At の程度、またこれらを投与した担癌マウスにお

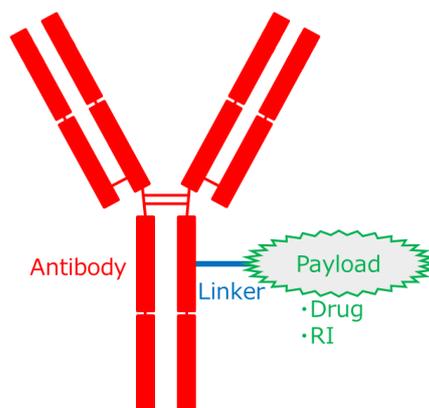


図1 武装化抗体の基本構造

ける放射能の腫瘍への集積、胃や甲状腺への分布を評価することで、抗体からの²¹¹Atの遊離

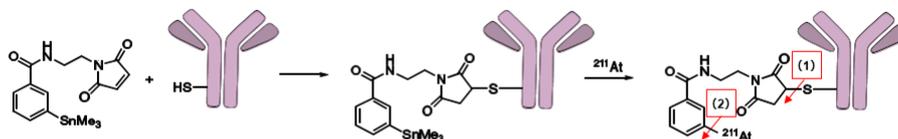


図2 プロトタイプ²¹¹At標識抗体

が低く、安定性に優れ、胃や甲状腺への分布をより低く抑えうるリンカー構造を、腫瘍集積性も加味しつつ、選定した。

(3) また、正常臓器への分布が軽減することが期待できる改変抗体を複数作製した上で、これらに対して前記の試験で選定したリンカーを用いて²¹¹Atを標識し、これらの薬物動態試験を行った。

4. 研究成果

(1) 放射線分解が標識抗体の薬物動態に及ぼす影響を検証すべく、放射線分解された²¹¹At標識抗体とラジカルスカベンジャーであるアスコルビン酸Naを添加して、活性酸素種を消去し、保護した標識抗体を、担癌マウスにそれぞれ投与し、腫瘍集積と正常臓器への分布を評価した。その結果、両者の血中滞留性と正常臓器への分布は同等である一方で、放射線分解を受けた標識抗体の腫瘍集積は、保護した標識抗体と比較し、有意に低下することが分かった。血中滞留性と正常臓器への分布に差異を認めなかったことから、放射線分解は、抗原抗体反応を介した能動的標的化を障害する一方で、enhanced permeability and retention effect (EPR効果)を介した受動的標的化には影響を及ぼしていないことが示唆された。また、腫瘍細胞に結合する抗体と結合しないコントロール抗体に²¹¹Atを標識し、アスコルビン酸Naを添加して放射線分解から保護した上で、担癌マウスに投与し、体内動態を評価した。腫瘍細胞に結合する標識抗体を投与した場合は、腫瘍におけるpercent injected dose/g (%ID/g)は、血液におけるそれを上回ったが、²¹¹At標識コントロール抗体を投与した場合は、腫瘍の%ID/gは、血液のそれを下回った。²¹¹Atの腫瘍送達においては、能動的標的化が特に重要であることを示している(H. Takashima, et al. Mol Pharm. 2023)。このように²¹¹At-RITにおいて、放射線分解を回避することは、標識抗体の腫瘍集積性の維持に寄与するが、放射線分解の制御は正常臓器への分布には影響しないことが分かった。正常臓器の被曝と毒性を軽減されるためには、異なる戦略が必要と考えられた。以降の検証は、²¹¹At標識抗体を放射線分解から保護し、標識抗体の腫瘍集積性を維持した上で実施した。

(2) 前記のように放射線分解された²¹¹At標識抗体とこれを回避し保護した標識抗体との間で、胃と甲状腺への分布には差異を認めなかった。放射線分解は²¹¹Atの抗体からの遊離と、遊離²¹¹Atに起因する胃と甲状腺への分布には影響しないことが示唆された。胃と甲状腺への分布をより厳格に低く抑えるべく、異なる構造を持つ複数の標識用試薬を準備し、これらをそれぞれ抗体に付加した複合体を作製の上、²¹¹Atを標識し、保存溶液中における²¹¹Atの遊離の程度、担癌マウスにおける標識抗体の体内分布を検証した。リンカー構造によって、保存溶液中の遊離核種の程度が有意に異なることが分かった。また、胃への分布並びに胃内容物へ分泌を比較したところ、特に標識抗体投与後早期において、異なる傾向が認められた。保存溶液中での遊離核種の経時的変化の差異は、実験並びにデータの再現性、将来的には放射性医薬品の品質管理に影響すると考え、より遊離が軽微で、安定性に優れる標識用試薬(リンカー構造)を以下の検証に用いることとした。標識用試薬の抗体への結合様式が、²¹¹At標識抗体の保存溶液中での安定性に影響することが確認できた。RITにおけるリンカーテクノロジーの重要性を示唆する結果である。一方で、現状のリンカーテクノロジーでは、核種の遊離を皆無とするまでには至っておらず、より厳格に胃や甲状腺への分布を制限するためには、異なる戦略やアプローチの併用も検討すべきと考えられた。そこで、前記の実験で選定した試薬を用いて標識した²¹¹At標識抗体を用いたRITに、胃と甲状腺への核種の集積をより軽減しようと考えられた戦略の併用を試みた。その結果、胃と甲状腺への集積と胃内容物への核種の分泌が、有意に軽減されることが確認された。また、胃と甲状腺への核種の分布やこれらの被曝を軽減させることの毒性学的な意義を検証し、これを明らかにした。

(3) 当初、三種の改変抗体を作製の上、検証を行う計画であったが、物性が不良で、十分な収量が得られなかった改変体があり、評価並びに検証できた改変抗体は二種であった。これらに前記の実験で選定した標識用試薬を結合させ、さらにこの複合体に²¹¹Atを標識することで、²¹¹At標識改変抗体を得た。²¹¹At標識抗体の収率は、未改変の抗体に²¹¹Atを標識した場合と同等であり、明らかな差異や遜色は認めなかった。²¹¹At標識改変抗体を担癌マウスに投与し、腫瘍集積と正常臓器への分布を評価の上、未改変の²¹¹At標識抗体と比較した。いずれの標識抗体も正常臓器と比較し、腫瘍に高く集積した。また、これらの腫瘍集積性は同等であり、また薬効

試験を行ったところ、腫瘍増殖抑制効果も同等であった。本研究で検証した抗体改変技術は、 ^{211}At -RIT に応用した際の腫瘍集積性並びに薬効に悪影響を及ぼすものではないと判断した。一方で、改変を加えたことで、正常臓器への分布に差異を認めた。当該改変技術は、腫瘍集積性には影響しない一方で、正常臓器への分布には影響を及ぼすことが確認できた。

(4) 標的アルファ線治療では、十分なアルファ線放出核種を腫瘍に送達させると共に、正常臓器への被曝を軽減し、生体内における核種の腫瘍特異性を向上させることが重要である。本研究は、複数の戦略を組み合わせることで、 ^{211}At -RIT における therapeutic window は拡大しうることを実証した。加えて、生体内の腫瘍特異性を向上させることの毒性学的な意義を明らかにした。本研究を通じて、将来の ^{211}At -RIT 開発に寄与しうる重要な知見が得られたと考える。

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 Takashima Hiroki, Ohnuki Kazunobu, Manabe Shino, Koga Yoshikatsu, Tsumura Ryo, Anzai Takahiro, Wang Yang, Yin Xiaojie, Sato Nozomi, Shigekawa Yudai, Nambu Akihiro, Usuda Sachiko, Haba Hiromitsu, Fujii Hirofumi, Yasunaga Masahiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Tumor Targeting of 211At-Labeled Antibody under Sodium Ascorbate Protection against Radiolysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1156 ~ 1167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.molpharmaceut.2c00869	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高島 大輝、大貫 和信、眞鍋 史乃、古賀 宣勝、津村 遼、安西 高廣、WANG Yang、羽場 宏光、藤井 博史、安永 正浩
2. 発表標題 アスコルビン酸Naは放射線分解による能動的標的化の障害からアスタチン-211結合抗体を保護する
3. 学会等名 第38回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高島 大輝、眞鍋 史乃、大貫 和信、古賀 宣勝、津村 遼、安西 高廣、WANG Yang、YIN Xiaojie、佐藤 望、重河 優大、南部 明弘、白田 祥子、羽場 宏光、藤井 博史、松村 保広、安永 正浩
2. 発表標題 アルファ線放出核種アスタチン-211結合抗体の前臨床試験
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroki Takashima, Kazunobu Ohnuki, Shino Manabe, Yoshikatsu Koga, Ryo Tsumura, Takahiro Anzai, Yang Wang, Xiaojie Yin, Nozomi Sato, Yudai Shigekawa, Akihiro Nambu, Sachiko Usuda, Hiromitsu Haba, Hirofumi Fuji, Masahiro Yasunaga
2. 発表標題 Sodium ascorbate protection against radiolysis is indispensable to maintain active targeting of ²¹¹ At-labeled antibody
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------