

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670273

研究課題名(和文)新規核種(89Zr)標識ヒト化低分子抗体によるがんのPET画像診断法の開発

研究課題名(英文)Development of a PET imaging system for cancer diagnosis using Zr-89 labeled anti-mesothelin scFv

研究代表者

松浦 栄次(Matsuura, Eiji)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：20181688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：種々のがんの高感度検出が可能で、かつ低被曝の「抗体PETプローブ」の開発を目的として、がん抗原mesothelin(MSLN)に対する低分子化抗体scFvを作製した。scFv抗体のMSLNに対する解離定数は約10-50nMで、これをキレート剤DFOにより修飾し、ジルコニウム(Zr)-89で標識した。89Zr標識抗MSLN-scFv抗体をNCI-H226中皮腫細胞移植担がんマウスに尾静脈より投与し、その生体内分布をPETイメージングおよび解剖後の臓器放射能測定により調べた。その結果、PETでは投与48時間後に最もコントラストが高く腫瘍が描出され、本PETプローブのがん検出への有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of developing an antibody-based PET imaging agent of cancer, we produced scFv against mesothelin (MSLN). MSLN is a 40-kDa cell differentiation-associated glycoprotein appeared with carcinogenesis and a potential target for a wide range of cancer diagnosis and therapy. Anti-MSLN scFv was conjugated with a chelator deferoxamine (DFO) and radiolabeled with zirconium-89. 89Zr-labeled anti-MSLN scFv was administered intravenously to NCI-H226 tumor bearing mice and imaged with PET/CT up to 48 h post administration followed by terminal biodistribution studies. 89Zr-labeled anti-MSLN scFv was highly accumulated in tumor and a PET image with the highest contrast of tumor to background was obtained at 48 h post injection. These results indicate the high potential of 89Zr-labeled anti-MSLN scFv as a PET probe for the detection of cancer.

研究分野：免疫学、病態検査学、分子イメージング

キーワード：Zr-89 がん PET 低分子抗体 画像診断

1. 研究開始当初の背景

グルコース(糖)代謝量を定量・可視化する FDG によるポジトロン断層法 (PET) が、がんの画像診断に汎用されているが、生理的に糖代謝の旺盛な組織におけるがんの鑑別が困難であるほか、腸管や炎症巣、良性腫瘍などに対しても偽陽性が認められるなどの問題がある。

一方、 ^{64}Cu 標識抗体による PET 診断研究は転移がんも検出可能である画期的技術である。しかしながら、 ^{64}Cu の β^- 壊変による細胞障害性や遊離型 ^{64}Cu の肝臓蓄積性、および、IgG(全長)の低クリアランス (体内半減期: 100 時間程度) による撮像までの長い待機時間 (48~72 時間) や持続的な被曝リスク、および網内系臓器 (肝臓など) への蓄積性など、標識核種および抗体の双方に種々の物性的問題が考えられる。

申請者らは、膵臓がん、卵巣がんをはじめとする多くのがん細胞に高発現することが知られる mesothelin (MSLN) に対する抗体を用いて、担がんマウスの移植腫瘍を極めて早い時期に PET 画像で検出できることを証明している。また、臨床応用を目指して、抵抗原性で、血中滞留時間の短いヒト化低分子抗体バリエーションを開発しており、抗 MSLN 抗体においてもヒト化・低分子化を行ってきた。さらに、 β^- 壊変が起こらず、肝臓蓄積の少ないジルコニウム-89 (^{89}Zr) の自動製造・精製システムを開発し、純度の高い ^{89}Zr が調製可能である。

2. 研究の目的

安全性が高く、微小がんの画像診断を可能にする抗体 PET プローブ、すなわち、 ^{89}Zr 標識ヒト化低分子抗 MSLN 抗体 (single-chain variable fragment, scFv) を用いたがんの画像診断システムの開発を目的として、当該抗体 PET プローブを作製し、担がんマウスの実験系でがんの PET 診断におけるその有用性

について評価した。

3. 研究の方法

(1) 抗 MSLN-scFv 抗体の作製

マウスモノクローナル抗 MSLN 抗体の CDR 領域遺伝子配列と、ヒト抗体のフレームワークを組み合わせで発現ベクターを構築し、ヒト化抗 MSLN 抗体 (全長) をチャイニーズハムスター卵巣細胞で発現させた。次に、L 鎖の可変領域と H 鎖の可変領域を Linker を介して繋げた scFv の遺伝子配列を発現ベクターに組み込み大腸菌で発現させた。ウエスタンブロットにより目的とする scFv のバンドを確認した後、抗原 MSLN を固相化したプレートを用いて濃縮培養上清の ELISA を行い、MSLN に対する結合を確認し、精製を行った。同様にマウス抗 MSLN-scFv 抗体を作製、精製した。

(2) 抗 MSLN-scFv 抗体のキレート剤修飾および ^{89}Zr 標識

0.1M 炭酸緩衝液 pH9.0 中の抗 MSLN-scFv 抗体に対して DMSO に溶解したキレート剤 deferoxamine (p-SCN-Bn-DFO) を 3 当量混和し、37 °C で 60 分間反応させた後、PD-10 カラムを用いて未反応 p-SCN-Bn-DFO を除去し、DFO 修飾抗 MSLN-scFv 抗体を調整した。次に、サイクロトロンにより製造した ^{89}Zr を精製し ^{89}Zr -シュウ酸塩を得た。得られた ^{89}Zr -シュウ酸塩を中和し、0.1M HEPES 緩衝液 pH7.0 中で DFO 修飾抗 MSLN-scFv 抗体と 40 °C で 60 分間反応させた後、PD-10 カラムで精製することで ^{89}Zr -DFO-scFv 抗体を得た。また、対照としてマウス抗 MSLN 抗体 IgG について同様に DFO 修飾・ ^{89}Zr 標識、あるいは DOTA 修飾・ ^{64}Cu 標識を行った。

(3) ^{89}Zr 標識抗 MSLN-scFv 抗体を用いた担がんマウスの PET イメージング

MSLN 陽性がん細胞である NCI-H226 細胞 (ヒト中皮腫由来) を BALB/c nu/nu マウス右肩皮下に 4×10^6 個/0.1ml ずつ移植し担がんマウ

スを作製した。移植 3 週間後に、 ^{89}Zr 標識抗 MSLN-scFv 抗体 $4.72 \pm 0.04 \text{ MBq}$ をマウス尾静脈より投与し ($n = 3$)、3、6、12、24、48 時間後に PET・CT イメージングを行い、終了後に解剖し臓器放射能測定を行った。また、対照実験として、 ^{89}Zr 標識抗 MSLN 抗体 IgG、 ^{64}Cu 標識抗 MSLN 抗体 IgG を同様に投与し、臓器放射能分布を測定した。

4. 研究成果

(1) 抗 MSLN-scFv 抗体の作製

ヒト化抗 MSLN 抗体の L 鎖と H 鎖の可変領域より scFv を作成したが、目的の scFv の発現量が少なく、凝集物が多く確認された。この原因として、ヒト化により、安定した形に folding されにくくなったことが推定されたため、収量改善のためにマウス抗 MSLN 抗体の配列に戻って scFv を作製した。その結果、収量は十分でないもののヒト化 scFv よりは多い発現量を得ることができた。得られた抗 MSLN-scFv 抗体の抗原 MSLN に対する結合親和性を、分子間相互作用測定装置 BLItz (ForteBio 社) により測定した結果、ロットごとに約 10-50nM の解離定数 (K_D) を示し、高い活性を示す scFv 抗体が得られた (図 1)。

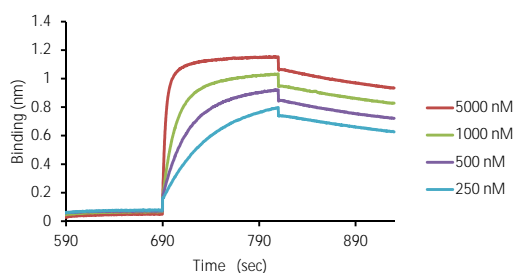


図 1. 分子間相互作用解析装置を用いた抗 MSLN-scFv 抗体の抗原 MSLN への結合解析

(解離定数 $K_D = 23 \text{ nM}$)

ヒト化抗 MSLN-scFv については収量が低く凝集も見られたため、今後、ヒト抗体ファージライブラリからの作製など別の方法を検

討する必要がある。

(2) 抗 MSLN-scFv 抗体のキレート剤修飾および ^{89}Zr 標識

作製した抗 MSLN-scFv 抗体に、 ^{89}Zr に対するキレート剤である DFO を修飾した後、ELISA および分子間相互作用測定装置を用いて DFO-抗 MSLN-scFv 抗体が MSLN に対する親和性を保持していることを確認した (解離定数 $1.4 \mu\text{M}$)。次に、DFO-抗 MSLN-scFv 抗体に対してサイクロトロンより製造・精製した ^{89}Zr を標識した結果、 97MBq/mg の高い比放射能で ^{89}Zr 標識体を得られた。

(3) ^{89}Zr 標識抗 MSLN-scFv 抗体を用いたがんマウスの PET イメージングおよび臓器放射能分布

H226 腫瘍モデルマウスに $4.72 \pm 0.04\text{MBq}$ (約 $50 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) の ^{89}Zr -DFO 修飾抗 MSLN-scFv 抗体を投与し、解剖後にその各臓器放射能分布を調べた結果、投与 48 時間後に代謝・排泄に関わる腎臓 ($43.88 \pm 24.57 \% \text{ID/g}$) および脾臓 ($7.33 \pm 0.86 \% \text{ID/g}$)、肝臓 ($5.96 \pm 5.42 \% \text{ID/g}$) に次いで腫瘍 ($1.39 \pm 1.20 \% \text{ID/g}$) への高い集積が確認された (図 2)。

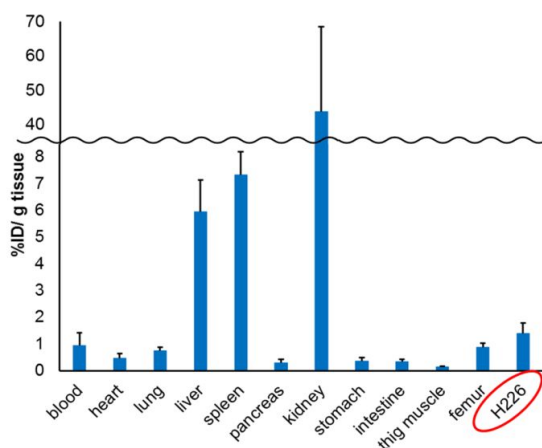


図 2. H226 腫瘍モデルマウス投与 48 時間後の組織放射能分布

^{89}Zr -DFO 修飾抗 MSLN-scFv 抗体投与後のがんマウスを用いて PET イメージングを行っ

た結果、腫瘍対バックグラウンド臓器集積比は投与後の時間経過とともに増大し、解剖後の臓器放射能分布と同様に投与 48 時間後に最もコントラストが高く腫瘍が描出される PET 画像が得られた (図 3)。

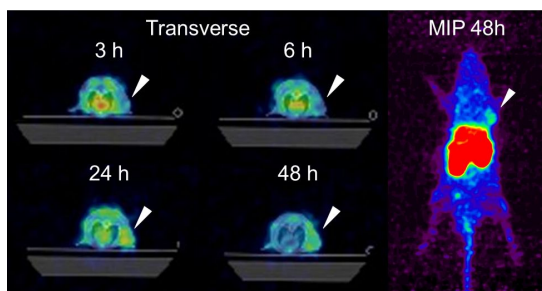


図 3. ^{89}Zr -DF0 修飾抗 MSLN-scFv 抗体投与後の PET イメージング画像

さらに、画像診断精度の指標となる腫瘍対血液比、および腫瘍対筋肉比はそれぞれ 1.60 ± 0.25 、および 3.42 ± 1.05 と高い値を示した (図 4)。

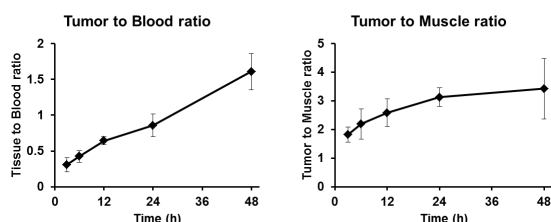


図 4. PET 画像解析により得られた腫瘍対血液および腫瘍対筋肉集積比

PET イメージング実験および臓器放射能分布測定の結果から、本研究中で開発された ^{89}Zr -DF0 修飾抗 MSLN-scFv は高コントラストに MSLN 発現腫瘍を描出できることが示唆された。したがって、本研究により得られた成果は抗体を用いた PET イメージング診断における種々の問題点を克服した、安全性の高い抗体 PET プローブを開発する上で有益な知見

となると期待される。

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 1 件)

1. Kazuko Kobayashi, Takanori Sasaki, Fumiaki Takenaka, Hiromasa Yakushiji, Yoshihiro Fujii, Yoshiro Kishi, Shoichi Kita, Lianhua Shen, Hiromi Kumon, and Eiji Matsuura. A Novel PET Imaging Using ^{64}Cu -Labeled Monoclonal Antibody against Mesothelin Commonly Expressed on Cancer Cells. *Journal of Immunology Research*, Vol 2015, 2015.

DOI: 10.1155/2015/268172 (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 栄次 (Matsuura Eiji)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：20181688

(2) 研究分担者

竹中 文章 (Takenaka Fumiaki)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：10642522

佐々木 崇了 (Sasaki Takanori)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：10461253

(4) 研究協力者

小林 和子 (Kobayashi Kazuko)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：20304298

喜多 祥一 (Kita Shoichi)
株式会社医学生物学研究所
研究者番号：70524205