

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830107

研究課題名(和文) 64Cu標識抗体PETイメージングにおける非特異的集積に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of non-specific accumulation in PET imaging of 64Cu-labeled antibody

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・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：60435641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗体医薬を用いたPETイメージング法実用化に向けて、ポジトロン放出金属核種⁶⁴Cuを用いた抗体標識法の開発が進められている。非特異的集積を低減する標識法選択のため本研究ではDOTA-NHS-ester、SCN-Bn-NOTA、NODAGA-NHS-esterの三種の二官能性キレーターを用いて抗体とそのフラグメントを標識し、担がんモデルマウスのPETイメージングにより体内動態を比較した。結果、NOTA体が最も分解・代謝による⁶⁴Cu解離が少なく、非特異的集積が低減できることが示された。更に標識の体内安定性、解離⁶⁴Cu非特異的集積にはキレート構造だけでなくリンカー構造も重要となることが示された。

研究成果の概要(英文)：PET imaging of antibody drugs are expected to be highly useful for non-invasive diagnosis of target expression, selection of applicable patient, and treatment planning. To realize the antibody-based PET imaging, labeling method of positron emitting radiometal nuclide ⁶⁴Cu has been investigated. In this study, we compared in vivo distribution of whole antibody, Fab, or F(ab')₂ fragments labeled with ⁶⁴Cu using three different bifunctional chelator, DOTA-NHS-ester, SCN-Bn-NOTA, NODAGA-NHS-ester in the PET imaging of tumor-bearing mice. As result, DOTA- or NODAGA-labeled Fab probes showed the increasing liver accumulation after the radioactivity in the heart (blood pool) was almost disappeared. The behavior of liver accumulation might be influenced by free ⁶⁴Cu dissociated from chelators. On the contrary, NOTA-labeled probes showed lowest non-specific accumulations. Furthermore, it was indicated that linker structure was also able to affect the biodistribution.

研究分野：分子イメージング科学

キーワード：抗体PET ⁶⁴Cu がんイメージング キレーター 抗体フラグメント 非特異的集積

1. 研究開始当初の背景

抗体医薬はがんの分子標的治療薬として盛んに開発・利用されているが、患者へ効果的に適用するには腫瘍組織における標的抗原分子の発現の確定診断が必須である。現在、これには侵襲的なバイオプシーによる方法が主に用いられているが、苦痛を伴い、繰り返し実施することや体内深部への刺入が困難な問題がある。また治療過程や病態の進行において標的分子発現が変化する可能性や、針の刺入が転移を誘発する危険も報告されている。標的分子発現の変化に合わせ、高価で経済的負担の大きな抗体医薬を柔軟かつ有効に使用するために、非侵襲的な標的分子診断を可能とする分子イメージング技術の確立が期待されている。中でも、抗体分子に対しポジトロン放出核種を標識する PET イメージング法は PET の高い定量性から実用化に向け盛んに研究されている。

抗体分子は一般に血中滞留性が高く、標的がん部位へ持続的に集積が増加することが見込まれる一方、血中放射能バックグラウンドも高くなるため、集積部位の良好なコントラストを得るためには血中放射能が十分に減少するための長時間の追跡が必要となる。このため物理学的半減期 78.4 時間の ^{89}Zr が理想的な核種と考えられているが、一方で長期間体内に存在することで患者の被ばく線量が大きくなる問題がある。

我々は以前より半減期 12.7 時間の ^{64}Cu を使用した抗体イメージング法の開発を進めており、 ^{64}Cu で追跡可能な約 2 日間程度の時間でもがん描出が可能であることを示してきた。また国立がん研究センター病院との共同研究において、 ^{64}Cu -DOTA-Trastuzumab を用いた臨床 PET 試験により乳がん患者の HER2 陽性乳がんを投与後 48 時間で描出することに成功している。 ^{64}Cu 標識抗体での被ばく量はほぼ ^{18}F -FDG と同程度と推算されており、 ^{89}Zr に比べ被ばく量、診断にかかる時間を低減可能なことは ^{64}Cu 標識抗体による PET イメージングの利点と言える。しかしながら全量抗体の血中放射能バックグラウンドを十分に減少させるだけ長期間の追跡は ^{64}Cu では不可能であり、血液プール近傍等の特異的集積の判別が難しいことや、キレーター分子から解離した ^{64}Cu が内在性の銅と同様にふるまうため、銅要求性の臓器への非特異的に集積する可能性や目的組織外へ排出される可能性がある。そこで本研究では、血中滞留性、臓器特異性、標識抗体からの解離 ^{64}Cu の動態、銅要求性臓器への集積など非特異的集積に関する要素について詳細に分析し、抗体分子のフラグメント化やキレーターの分離など体内動態を改善する技術を検討することで、被ばくを最小におさえつつ、高精度・高感度な標的分子発現の診断を可能とする ^{64}Cu 標識抗体 PET イメージング法の開発を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究では ^{64}Cu 標識抗体 PET イメージングにおいて特異的集積の判別に影響を及ぼす要素、即ち非特異的集積に関わる要素について、動物実験によってその実態を明らかにし、非特異的集積を低減する手法の開発を目的とする。抗体の非特異的集積に関わる要素として、プローブ側の性質に依る(1)抗原への結合親和性、(2)血中滞留性、(3) 標識安定性、(4) 貪食の影響、(5) Fc 受容体結合性が考えられる。また対象側の状態として抗原発現量、抗原発現部位への到達性、その他の病態の有無が考えられる。その他の病態が抗体集積に関わる理由は例えば炎症巣があれば EPR 効果によってプローブが非特異的に集積し、またその分血中に循環する量が減少することで特異的集積に影響するし、または血流を妨げる様な繊維化などの病態がある場合にはその部位へのプローブの到達が妨げられると考えられる。本研究ではこれら対象側の要因については出来るだけ同条件の担がんモデルマウスを使用する。プローブとしての要因について、それぞれ、(1)キレート結合数の増加による結合親和性の変化と比放射能の検討、(2)全量抗体とフラグメント化抗体(Fab、F(ab')₂)での動態の比較、(3) キレート分子の種類による体内分布の比較、(4) 非標識抗体投与による肝集積の比較などの検討を行い、非特異的集積を低減し高感度・高精度に標的分子発現分布を反映する ^{64}Cu 標識抗体 PET イメージング法について検討する。

3. 研究の方法

全ての動物実験は理化学研究所動物実験審査委員会の承認を得て実施した。

(1) 担がんモデルマウス: 6 週令の雄 BALB/cヌードマウスに対し左右の肩部分にそれぞれ 1×10^6 個の HER2- がん細胞株(C6)と HER2+ がん細胞株(A431)を皮下に移植し、10 日後に PET 撮像に供した。

(2) 抗体: 全量抗体としては抗 HER2 ヒト化抗体 Trastuzumab を使用した。フラグメント体として、Trastuzumab を papain または pepsin 固定樹脂を用いて消化し、限外ろ過フィルターを用いて粗精製後、ゲル濾過カラムクロマトグラフィを用いて Fab または F(ab')₂ フラグメントを精製した。また、Fab' を F(ab')₂ を 0.1M システアミン塩酸塩溶液で還元することで作成し、ゲル濾過カラムクロマトグラフィにより精製した。還元状態を維持するため pH 6.0 の 0.1M リン酸ナトリウム + 5 mM EDTA 緩衝液とした。

(3) キレーター修飾: 二官能キレーター DOTA-NHS-ester、NODAGA-NHS-ester、p-SCN-Bn-NOTA を使用し、抗体またはフラグメント体に修飾した。キレーター修飾数は MALDI-TOF 質量分析により元の抗体質量との差より算出した。またキレーター修飾前後の抗体活性について水晶子マイクロバランス式分子間相互作用解析装置を用いて解離

定数として測定した。Fabについてはさらに、p-SCN-Bn-NODAGA を使用した修飾も行った。また、Fab'については DiAmSar を修飾して標識前駆体化した。NHS と maleimide の二官能性架橋剤である MBS (m-Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccinimide ester) と pH=6.0 で反応させた後、PBS に置換し未反応の MBS を除去し、DiAmSar を加えて反応させることで DiAmSar-Fab を合成した。

(4) ^{64}Cu 標識：小型サイクロトロンを用いて 12 MeV の陽子ビームを 99%以上の同位体濃縮 ^{64}Ni を電着メッキした金ディスクターゲットに照射し、 $^{64}\text{Ni}(p,n)$ 核反応により ^{64}Cu を製造した。イオン交換カラムを用いて ^{64}Cu を精製し、キレーター修飾した抗体と pH=6.5 の 0.1 M 酢酸バッファー溶液中で 40 1 時間反応させ、標識した。限外ろ過フィルターと 1 M グリシンバッファを用いて未反応の ^{64}Cu を除去し、 ^{64}Cu 標識抗体プローブを精製した。生理食塩水で希釈し、投与溶液とした。

(5) PET イメージング：動物用 PET 撮像装置を用いて PET 撮像を実施した。マウスは撮像前にイソフルラン吸入麻酔下にて尾静脈にカテーテルを留置し、撮像用ベッド上にて直腸検温プローブとホットパッドにより体温調節下で保定し、撮像終了までイソフルラン吸入麻酔下においた。撮像はプローブの投与と同時に開始し、1 時間撮像した後、投与後 4、8、12 時間、1 日、2 日後にそれぞれ 30 分間の撮像を行った。NODAGA-Bn-Fab、DiAmSar-Fab に関しては 1、2 日後のみ撮像を実施した。初回の撮像終了後にカテーテルを除去した他は同じ条件で保定した。得られたデータは画像再構成後、関心領域を設定し画像解析した。2 日後の撮像終了後は速やかに解剖に供し、尿、血液、心臓、肺、膵臓、脾臓、腎臓、肝臓、腸管、大腿筋、HER2+ がん部位、HER2-がん部位をそれぞれ採取し、秤量後オートウェルガンマカウンタを用いて放射能測定した。

4. 研究成果

(1) プローブ合成：本研究では ^{64}Cu 標識に DOTA-NHS-ester、p-SCN-Bn-NOTA、NODAGA-NHS-ester の 3 種類の二官能性キレート試薬を使用した。3 種ともに抗体分子アミノ酸配列中に存在するリジン残基の NH_2 基に対しランダムに反応し結合する。NOTA と NODAGA は基本となるキレート分子骨格は同じであるが、リンカー部分の構造が異なる。DOTA-NHS-ester、NODAGA-NHS-ester では NH_2 基との反応の際に NHS が脱離するため NH_2 基とキレーターが部分が直接的に結合するのに対し、p-SCN-Bn-NOTA ではベンゼン環を介して NOTA が結合する形となる。Trastuzumab またはそのフラグメント体にこれら 3 種のキレートを反応させ、標識前駆体を合成した。

モル比依存的に修飾キレーター数は増加し、DOTA-NHS-ester ではモル比 1 : 5 程度で Trastuzumab 1 分子に DOTA 1 個前後結合するが、モル比 1 : 1000 で 33 個結合した。しかしながら抗体活性はキレーター数 1 個ではほとんど損なわれない(が、キレーター数が増えるとともに低下し、33 個では一桁程度低下した。PET 撮像にはキレーター数 1-2 個のものを使用し、各標識前駆体の抗体活性(解離定数 K_d)は DOTA-Trastuzumab : 1.47 nM、NOTA-Bn-Trastuzumab : 1.52 nM、NODAGA-Trastuzumab : 1.02 nM、DOTA-F(ab')₂ : 2.08 nM、NOTA-Bn-F(ab')₂ : 2.33 nM、NODAGA-F(ab')₂ : 2.08 nM、DOTA-Fab : 3.54 nM、NOTA-Bn-Fab : 3.94 nM、NODAGA-Fab : 3.81 nM、NODAGA-Bn-Fab : 4.30 nM、DiAmSar-Fab : 3.69 nM であり、それぞれの分子サイズごとに同程度の活性となった。標識前の Fab' は Fab と比較し約 1000 m/z 質量が大きい結果となった。

(2) PET イメージング結果

全量抗体のイメージング結果としては DOTA 体では血中放射能が NOTA、NODAGA 体に比べ高く、またそれに伴い HER2+、HER2-がん部位ともに高い集積を示した。NOTA と NODAGA の比較では血液、脾臓、腎臓、肝臓で NODAGA の方が高い集積が見られたが、がん部位の集積には差がなかった。HER2+/肝臓集積比としては DOTA>NOTA>NODAGA の順で高く、

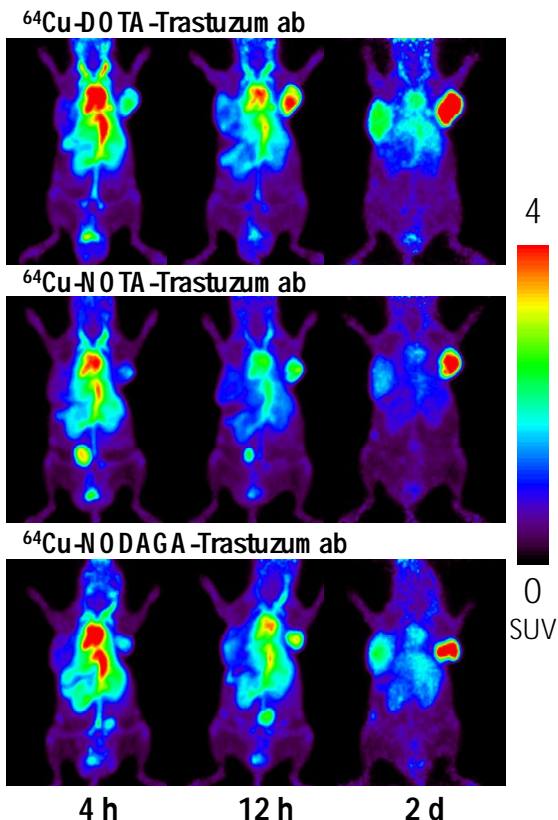
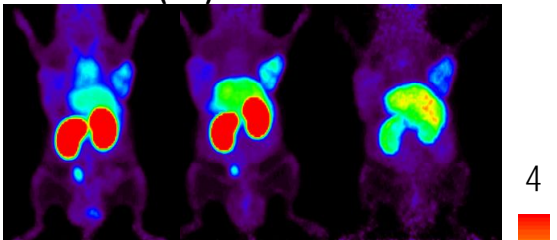


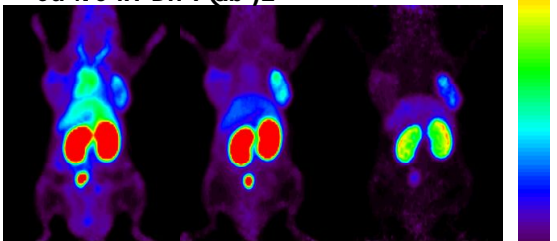
図 1. PET イメージング結果 (全量抗体)

HER2+/HER2- 集積比で見た場合には DOTA=NOTA>NODAGA となった。一方、F(ab')₂ の撮像結果では全体に腎集積が高かった他、DOTA 体では肝臓に顕著な集積が見られ、またその集積は 2 日にかけて増加傾向があった。集積量は少ないが NODAGA 体でも同様の集積挙動が見られたのに対し、NOTA 体では肝集積は低値を示した。肝集積は DOTA 体 15.5%ID/g に対し NOTA 体 4.18、NODAGA 体 10.78%ID/g であった。集積比としては HER2+/肝集積では DOTA 体、NODAGA 体では 1 より低く NOTA>NODAGA>DOTA となり、HER2+/HER2-集積比で見た場合も同様の順に高い結果となった。F(ab')₂ フラグメントでは全体的にがん部位への集積は低下するものの、同じく NOTA 体を使用することで全量抗体よりも早いタイミング(投与後 8 h)でがん部位の描出が可能であった。

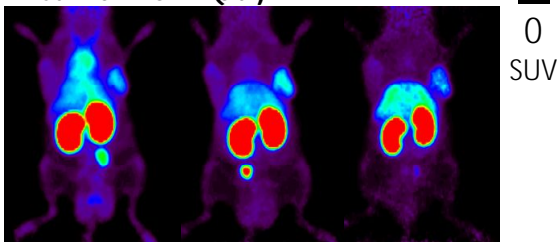
⁶⁴Cu-DOTA-F(ab')₂



⁶⁴Cu-NOTA-Bn-F(ab')₂



⁶⁴Cu-NODAGA-F(ab')₂



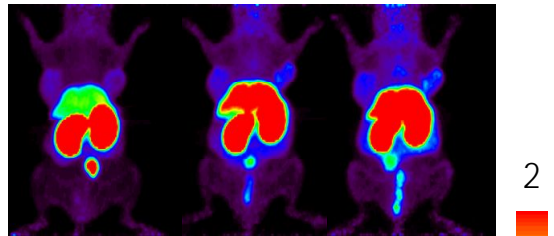
4 h 12 h 2 d

図 2. PET イメージング結果 (F(ab')₂)

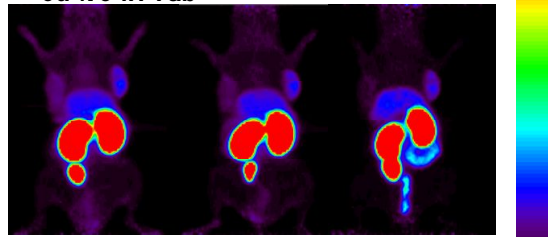
更に Fab の結果ではいずれも投与後 1h で血中放射能の大部分が消失し、ほとんどが腎臓に集積する。腎系球体で捕捉され一部は尿排泄されるが、多くは細胞内で代謝・分解を受け、タンパク質として再吸収されると思われる。PET 像での集積挙動で重要なのは、心腔内放射能がほぼ消失していることから投与されたプローブは血中になくとも関わらず、DOTA 体、NODAGA 体では肝臓、癌部位の集積が経時的に増加する点である。このことは、腎内で代謝を受け解離した ⁶⁴Cu が体内

に再循環していることを示唆している。それに対し、NOTA 体では投与後 4 h から 2 d にかけてほとんど肝臓、癌部位の集積に変化がない。また、DOTA 体、NODAGA 体では 4 h から 2 d にかけてマウスの輪郭が明瞭になって行く、即ち血中放射能が増加しているのに対し、NOTA 体ではむしろ輪郭は見えなくなり、血中への放射能の移行がないことが示唆

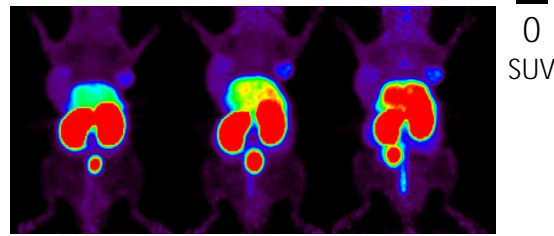
⁶⁴Cu-DOTA-Fab



⁶⁴Cu-NOTA-Fab



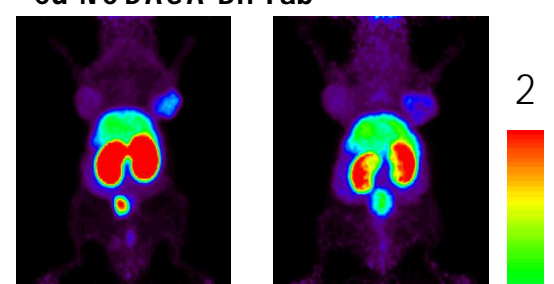
⁶⁴Cu-NODAGA-Fab



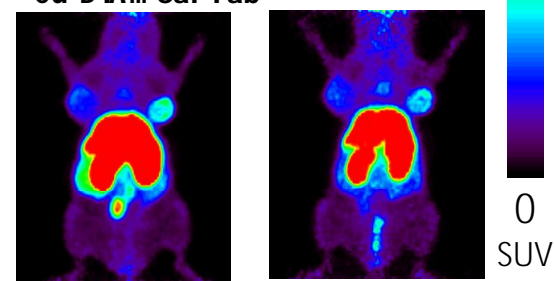
4 h 12 h 2 d

図 3. PET イメージング結果 (Fab)

⁶⁴Cu-NODAGA-Bn-Fab



⁶⁴Cu-DiAm Sar-Fab



1 d 2 d

図 4. PET イメージング結果 (Fab) 2

される。集積比の傾向は F(ab')₂ と同様であり、NOTA 体は HER2+/肝臓集積比、HER2+/HER2-集積比ともに最も高い値を示した。キレーターの構造として NOTA と NODAGA はほぼ同一であるが、NODAGA は NOTA よりカルボン酸の配置が 1 本異なることと、リンカー構造が異なることから集積に差が生じたと思われる。この点について確認するため、p-SCN-Bn-NODAGA を使用した場合の集積挙動を検討した。この場合、NODAGA 部分は全く同一のため、NODAGA 体と NODAGA-Bn 体の差はリンカー構造の影響が大きいと思われる。結果として NODAGA 体に比べ NODAGA-Bn 体は腎集積、肝集積が低くなったものの、解離 ⁶⁴Cu による血中等への放射能移行も存在する結果となった。DiAmSar-Fab は他のキレーターとは二官能性キレーターが市販されていなかったため、還元した SH 基に対する標識を実施したため抗体活性は完全に維持されたプローブとなった。しかしながら、その集積分布は DOTA 体と似ており、肝臓に高集積が見られ、解離 ⁶⁴Cu の影響があるものと思われた。

⁶⁴Cu のキレーターとの解離は腎臓や肝臓などの組織中に取込まれ、タンパク質の分解等の代謝を受ける際に生じると考えられる。このため生体内安定性の低いキレーターでは解離した ⁶⁴Cu が銅要求性の高い肝臓に集積し、血中アルブミンまたはセルロプラスミンに結合して全身の血中放射能バックグラウンドを上昇させると考えられる。今回、NOTA-F(ab')₂ 体や NOTA-Fab 体で肝集積の増加が見られなかったことは、NOTA が NODAGA よりも安定性が高いことを示しており、また NODAGA 体と NODAGA-Bn 体の分布の差と併せて考慮すると Bn を介したリンカー構造の場合にはキレーターから解離せずにリンカーごと分離して尿排泄され易いと考えられる。NOTA 体がどの分子サイズでも全体に集積が低くなることもこれが原因と思われる。

結論として、ほぼ同一の構造を持つ NODAGA と NOTA で体内動態には大きな差があることを明らかにし、分解・代謝を受けても解離 ⁶⁴Cu による肝集積増大を招かない NOTA 体の集積が最も抗体集積を反映したものであると言える。標識の体内安定性、非特異的集積の低減にはキレーターの種類だけでなくリンカー構造も重要であることが明らかとなった。今回検討した中では p-SCN-Bn-NOTA の使用が望ましいと言える。

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)

[学会発表](計 1 件)

Yousuke Kanayama, Riyo Zochi, Emi Hayashinaka, Asumi Yamazaki, Yasuhiro

Wada, Yasuyoshi Watanabe, Comparison of in vivo distribution of ⁶⁴Cu-labeled trastuzumab fragments conjugated with DOTA, NOTA, and NODAGA in PET imaging of tumor-bearing mice、World Molecular Imaging Congress 2015, 2015 年 9 月 2-5 日、ホノルル(アメリカ)

6. 研究組織

(1) 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・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：60435641