

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861025

研究課題名(和文) At-211を用いる内用放射線治療に適した抗体フラグメント標識薬剤の開発

研究課題名(英文) Radiolabeling agent of antibody fragments for radionuclide therapy using At-211

研究代表者

鈴木 博元 (Suzuki, Hiroyuki)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00707648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： ^{211}At の短い半減期(7.2 h)に着目し、その半減期に適した速やかな体内動態を示す抗体フラグメントの ^{211}At 標識薬剤を開発した。本薬剤には、radioisotope標識抗体フラグメント投与後に腎臓において放射能が長時間観察される問題を解決するために、腎臓の刷子縁膜酵素により認識される代謝性リンカーを導入した。これにより、本 ^{211}At 標識薬剤を使用して作製した抗体Fabフラグメントは腎臓の放射能を低減することに成功した。本薬剤設計は ^{211}At を用いる内用放射線治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Since the half-life of ^{211}At (7.2 h) is relatively short, antibody fragment which showed rapid biodistribution was used. When radiolabeled antibody fragments were injected into animals, persistent localization in kidney was observed. To solve this problem, I introduced cleavable linker which is recognized by renal brush border membrane enzymes. Due to this, ^{211}At labeled Fab reduced renal radioactivity at early post injection. The molecular design would be useful for the application to clinical radiotherapy.

研究分野：放射性薬剤

キーワード： ^{211}At 抗体フラグメント 代謝性リンカー 内用放射線治療 刷子縁膜酵素 Fab

1. 研究開始当初の背景

内用放射線治療では、放射性同位元素(RI)を標的細胞に送達し、RIが放つ放射線による細胞障害作用を利用して治療を行う。これまでの内用放射線治療では、ベータ線放出核種の利用により、一定の治療効果を得てきたものの、固形がんに対する治療効果が低いことや骨髄抑制などの副作用が問題点として挙げられている。一方、2013年5月に骨転移を有する去勢抵抗性前立腺癌を適応とした塩化ラジウム-223が米国食品医薬品局に認可され、アルファ線放出核種を用いる内用放射線治療薬剤に対する注目が高まっている。アルファ線はベータ線よりも線エネルギー付与(LET)が高いため、生物学的効果比が高く、さらに酸素濃度や細胞周期の影響を受けにくいことから、従来困難であった放射線抵抗性のがんに対しても高い治療効果が期待できる。さらに、微小転移など腫瘍サイズの小さいがんの治療には、腫瘍近傍の正常組織への障害が回避可能なアルファ線の短い飛程(0.04-0.1 mm)が有効に働く。このように、アルファ線放出核種の利用には有効で安全な新しいがん治療が期待できることから、骨転移のみならず多様ながんに対してもアルファ線による内用放射線治療薬剤を展開できれば、がんの治療に大きく貢献できると考えられる。

アスタチン-211 (^{211}At)は線エネルギー付与(LET)の高いアルファ線を放出することから、細胞殺傷能力の高い核種である。また、アルファ線の飛程が非常に短いことから、腫瘍近傍の正常組織への無用な被ばくを低減できる。従って、患部に効果的に ^{211}At を送達する技術が開発できれば、従来の治療法では困難であった微小転移や放射線抵抗性のがんの克服につながる。 ^{211}At 運搬体としては、7.2時間の半減期を考慮すると抗体よりも集積の速い抗体フラグメントが望ましいが、腎臓への集積が問題となる。

2. 研究の目的

本研究では、 ^{211}At による内用放射線治療に適したRIの運搬体として抗体フラグメントを利用するために、抗体フラグメントの腎臓における ^{211}At 集積を低減できる ^{211}At 標識薬剤の開発を目的とした。腎集積を低減するための戦略としては、 ^{211}At 標識部位と抗体フラグメント結合部位の間に刷子縁膜酵素の認識を受けけるペプチド配列を導入する戦略を用い、その有用性を検証した。

3. 研究の方法

本研究で開発する ^{211}At 標識薬剤の設計を図1に示す。本薬剤は、 ^{211}At 標識部位、刷子縁膜酵素の認識を受けけるペプチドリンカー、抗体フラグメント結合部位より構成される。

なお、 ^{211}At の製造量には限りがあるため、本検討は入手及び取り扱いの容易なヨウ素

-125(^{125}I)を用いた事前検討を基にして ^{211}At 研究へと展開した。

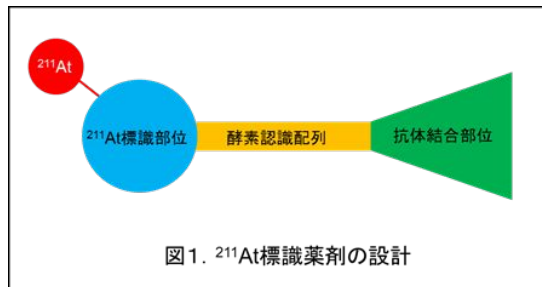


図1. ^{211}At 標識薬剤の設計

(1) ^{211}At 標識反応条件の検討

^{211}At 標識薬剤の開発に先駆けて、高収率で ^{211}At 標識体を得るための標識反応条件を事前に検討した。 ^{211}At 標識法には、放射性ヨウ素標識で汎用されるスズ-ハロゲン交換反応を用いた。本予備検討では、アミノ酸のトリアルキルスズ前駆体をモデル化合物として、前駆体濃度や添加剤の有無などの標識反応条件を検討した(図2)。

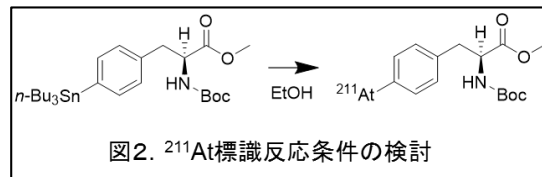


図2. ^{211}At 標識反応条件の検討

また、上記一般的な手法で標識した ^{211}At 標識アミノ酸誘導体の安定性を合わせて評価した。 ^{211}At 標識アミノ酸誘導体をヒト血清中でインキュベートし、3時間後の反応液を薄層クロマトグラフィー(TLC)で分析した。TLCの解析にはバイオイメージングアナライザーを用いた。

(2) ^{211}At 標識部位の検討

^{211}At 標識化合物は、放射性ヨウ素標識で汎用されるbenzoateを介した結合法で標識した場合、生体内での安定性が低いとされている[2]。一方で、標識反応の初期検討に用いたフェニルアラニン誘導体は生体内でも安定に存在することが確認できたため、フェニルアラニンの構造を参考に、ベンジル基を介して結合できる標識法についても検討することとした。そこで、benzoate誘導体($^{211}\text{At-Ph-COOH}$)およびphenylacetate誘導体($^{211}\text{At-Bn-COOH}$)を合成し、マウス血漿中安定性を検討した(図3)。

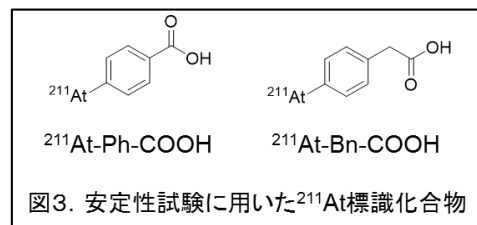


図3. 安定性試験に用いた ^{211}At 標識化合物

(3) 基質配列の検討

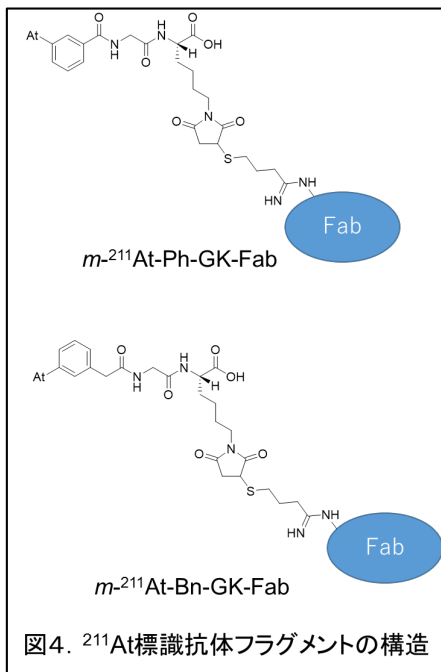
腎刷子縁膜酵素による認識を受けるペプチド配列の探索には、ラット腎臓より調製した腎刷子縁膜小胞と低分子モデル化合物を用いる実験系を利用した[3]。Benzoate を標識部位とする抗体フラグメントの放射性ヨウ素標識薬剤は Gly-Phe 配列が認識されることで、尿排泄性の高いメタヨード馬尿酸を遊離することで、腎集積を低減することに成功している [4]。そこで、phenylacetate を標識部位とし、酵素認識配列として Gly-Phe 配列を有する低分子化合物を設計した。本低分子化合物のトリプチルスズ前駆体を合成し、¹²⁵I 標識した後、腎刷子縁膜小胞とインキュベートし、放射性代謝物の遊離の有無を逆相 HPLC により検証した。

(4) ²¹¹At 標識薬剤の合成と抗体フラグメント標識

ペプチド配列中の Lys 側鎖のアミノ基をマレイミド基に変換することで、標識部位の異なる二種の ²¹¹At 標識薬剤を合成した。本薬剤を用いて、2-イミノチオランによってチオール基を導入した抗体 Fab フラグメントの ²¹¹At 標識を行った。

(5) ²¹¹At 標識抗体フラグメントの正常マウス体内動態の検討

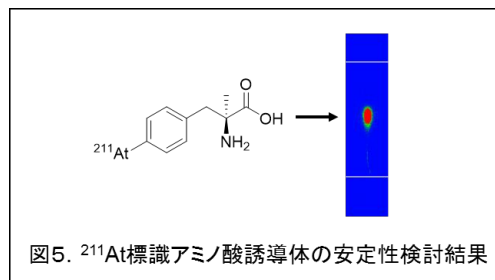
Benzoate、または phenylacetate を標識部位に持つ ²¹¹At 標識抗体フラグメント (図 4) をそれぞれ正常マウスに投与することで、腎集積低減効果を検証した。



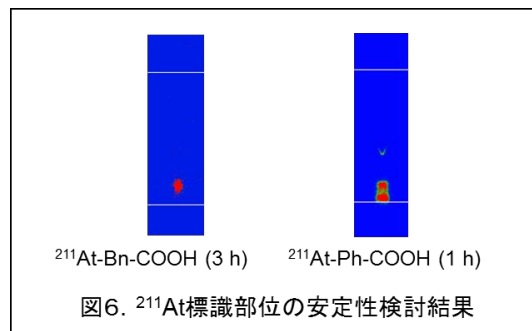
4. 研究成果

²¹¹At 標識反応条件を検証するための予備検討の結果、トリプチルスズ標識前駆体の濃度依存的に ²¹¹At 標識反応の放射化学的収率が向上した (0.016 mM:24 ± 4%, 0.16 mM:64 ± 6%, 1.6 mM:73 ± 7%)。

位にメチル基を有するフェニルアラニン誘導体を ²¹¹At 標識し、ヒト血清中でインキュベートした結果、3 時間後においても ²¹¹At の脱離は観察されず、TLC 上には ²¹¹At 標識アミノ酸のスポットのみが観察された (図 5)。²¹¹At はベンゼン環に結合させた場合、生体内において ²¹¹At が脱離することが報告されている [2]。上記研究成果は、これまで安定に結合することが困難であった ²¹¹At を安定に結合する標識法の開発に有用な知見を与える。



本研究では、従来通り benzoate 誘導体を標識部位とする標識薬剤以外に、フェニルアラニンの構造を参考に、ベンジル基を介して ²¹¹At 標識が可能な標識部位を有する薬剤を設計した。本薬剤設計を基に、基本構造として用いる ²¹¹At-Bn-COOH のマウス血漿中安定性を検証したところ、3 時間後においても単一のスポットが確認された (図 6 左)。同様の評価系で ²¹¹At-Ph-COOH の安定性を検証したところ、1 時間後において、すでに複数のスポットが観察され、²¹¹At の脱離が示唆された (図 6 右)。



腎刷子縁膜酵素による認識を受けるペプチド配列の検討に用いるため、すでに酵素認識されることが確認されている低分子モデル化合物 I-HBL を参考に、I-Bn-Gly-Lys(Boc) を設計した [3]。

トリブチルスズ標識前駆体を合成し、スズ-ヨウ素交換反応により作製した低分子化合物 $[^{125}\text{I}]\text{I-Bn-Gly-Lys(Boc)}$ を腎刷子縁膜小胞とインキュベートしたところ、放射性代謝物の遊離が観察された。遊離した放射性代謝物の HPLC の保持時間が非放射性ヨウ素化合物 I-Bn-Gly-OH の保持時間と近接したことから、 $[^{125}\text{I}]\text{I-Bn-Gly-Lys(Boc)}$ の Gly-Lys 配列は刷子縁膜酵素の認識を受け、 $[^{125}\text{I}]\text{I-Bn-Gly-OH}$ が遊離することが示された(図7)。

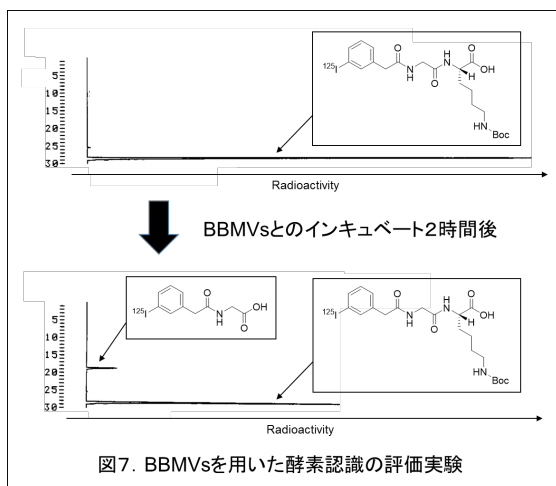


図7. BBMVsを用いた酵素認識の評価実験

Benzoate、および phenylacetate、いずれの標識部位を用いた場合でも、Gly-Lys 配列が酵素認識を受けることから、抗体フラグメントの ^{211}At 標識薬剤の合成をした。トリアルキルスズをメタ位に有する $m\text{-Bu}_3\text{Sn-Ph-Gly-Lys(mal)-OH}$ 、および $m\text{-Me}_3\text{Sn-Bn-Gly-Lys(mal)-OH}$ を合成し、それぞれを ^{211}At 標識した。その後、2-イミノチオランによりチオール基を導入した抗体 Fab フラグメントと反応させることで、 $m\text{-}^{211}\text{At-Ph-GK-Fab}$ 、および $m\text{-}^{211}\text{At-Bn-GK-Fab}$ をそれぞれ作製した。

二種の ^{211}At 標識 Fab、 $m\text{-}^{211}\text{At-Ph-GK-Fab}$ 、および $m\text{-}^{211}\text{At-Bn-GK-Fab}$ をそれぞれ正常マウスに投与したところ、いずれの ^{211}At 標識 Fab も腎臓から速やかにクリアランスされた(図8)。これらの体内動態は HML 標識 Fab に類似しており、本標識薬剤も刷子縁膜酵素の認識を受けることで、尿排泄性の放射性代謝物が遊離し、腎集積を低減したことが推察される。一方で、どちらの ^{211}At 標識 Fab も胃への集積が継続的に増加しており、 ^{211}At が Fab から脱離したことが示唆された。

以上より、 ^{211}At を安定に結合させるための標識法の開発が必要であるものの、抗体フラグメントの腎集積を低減するために刷子縁膜酵素の基質配列を導入する放射性ヨウ素の標識薬剤の設計は ^{211}At にも応用可能であることを認めた。よって、本研究成果はより有効で安全なアルファ線内用放射線治療の実現への貢献が期待される。

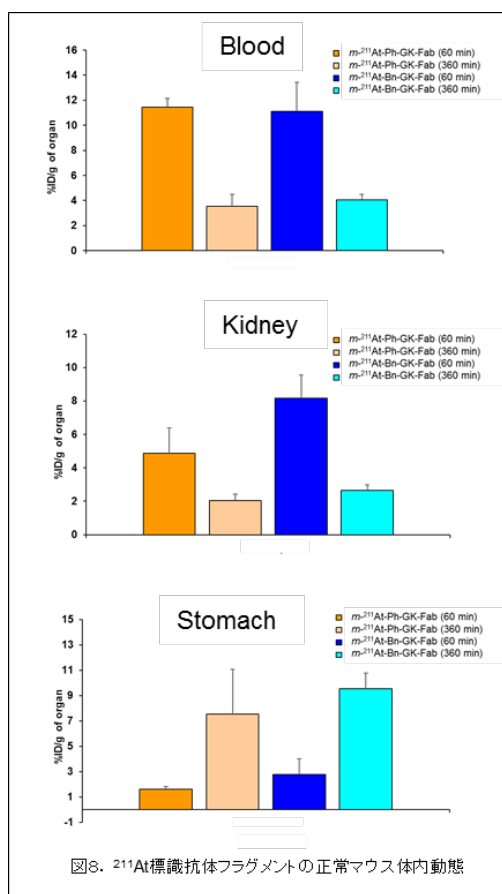


図8. ^{211}At 標識抗体フラグメントの正常マウス体内動態

<引用文献>

- [1] Steiner M. et al. *Clin. Cancer Res*, 17, 6406-6416, 2011
- [2] S. W. Hadley et al. *Bioconjugate Chem.*, 2, 171-179, 1991
- [3] K. Fujioka et al. *Bioconjugate Chem.*, 16, 1610-1616, 2005
- [4] Y. Arano et al. *Cancer Res.*, 59, 128-134, 1999

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

鈴木博元、大島康宏、花岡宏史、渡辺茂樹、渡辺智、佐々木一郎、坂下哲哉、荒野泰、石岡典子

^{211}At 標識 a-methyl-L-phenylalanine の合成とその基礎的評価

日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 27 日、横浜

Yasuhiro Ohshima, Hiroyuki Suzuki, Hirofumi Hanaoka, Shigeki Watanabe, Satoshi Watanabe, Naoyuki Watanabe, Yoshito Tsushima, Keigo Endo, Yasushi Arano, Noriko Ishioka

Development of ^{211}At -labeled a-methyl-L-phenylalanine (2-AAMP) as a novel radiopharmaceutical

for internal radiotherapy
2015 International Chemical Congress of
Pacific Basin Societies, 2015 年 12 月 17
日, Honolulu, USA

鈴木博元、橋本和幸、西中一朗、渡辺茂樹、
佐々木一郎、石岡典子
内用放射線治療に適した At-211 標識薬剤の
開発～基本物質アミノ酸誘導体への標識～
第 15 回放射線プロセスシンポジウム、2014
年 6 月 18 日、東京

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 博元 (Hiroyuki Suzuki)
千葉大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：00707648