

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300337

研究課題名（和文）

癌の超早期診断を目指した新規 PET/MRI 一体型腫瘍診断システムの開発研究

研究課題名（英文）

Development of a tumor diagnosis system using novel immuno-PET/MRI probe

研究代表者 中川 晋作 (NAKAGAWA SHINSAKU)

大阪大学大学院・薬学研究科・教授

研究者番号：70207728

研究成果の概要（和文）：

本研究では、腫瘍ターゲティング素子として腫瘍血管特異抗体を単離、精製し、RI でラベルすることで腫瘍イメージングプローブとして機能することを明らかにした。さらに本抗体を用いて immuno-PET/MRI の為のイメージングプローブとして開発すべく、MRI 造影剤としての金酸化鉄複合ナノ粒子を PEG 修飾し、さらにその PEG 鎖先端に本抗体を修飾するための方法論を確立した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we isolated and purified a tumor vascular endothelial cell specific monoclonal antibody as tumor targeting device. This monoclonal antibody which was labeled by RI functioned as a tumor imaging probe. Furthermore, we tried development as an imaging probe for immuno-PET/MRI using this antibody. As a result, we have established the technology to produce the PEGylated gold/iron oxide magnetic nanoparticles, which has modified monoclonal antibody on the tip of PEG chain, as a novel magnetic resonance imaging agent.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2012年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
総計	12,800,000	3,840,000	16,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：イメージング、モノクローナル抗体、腫瘍血管、PET/MRI

1. 研究開始当初の背景

周知の通り、分子イメージング技術は、体内での分子プロセスの可視化に関する基礎的。臨床的研究の総称であり、イメージング技術の進展に伴い、その精度・応用範囲は飛躍的な向上を遂げている。現在の分子イメージングの応用は、多岐に渡り、より効果的な創薬や病理の追及、オーダーメイドな医療などへの手がかりとして期待が集まってい

る。

しかしながら、このような in vivo における分子イメージングの成功は、プローブの性能に大きく依存し、低分子有機化合物を中心としたトライ・アンド・エラーによるプローブ合成のみでは、診断における擬陽性の出現を払拭可能な、特異性の高い腫瘍プローブの設計は極めて困難であるのが現状である。さらに PET や MRI といったイメージング技術の種

類によって個別のプロブを設計せねばならないという致命的問題点も相まって、微小病巣をも検出可能な、高い汎用性・診断能力を有する造影剤の開発は困難を極めているのが現状である。

そこで本研究では、工学系連携研究者らにより開発された血中滞留性に優れた金複合ナノ粒子へPET核種ラベルされた腫瘍血管特異的抗体を付与し、医学系連携研究者らにより開発されたPET/MRI一体型イメージング装置を有効活用することで、高い腫瘍特異性とPET/MRIバイモーダルイメージングを同時に達成可能な、immuno-PET/MRIとも言うべき微小腫瘍の高感度検出・診断システムの開発を目指すこととした。

2. 研究の目的

抗体・蛋白質を用いた分子特異的なイメージングは、これまでその可能性は期待されつつも、その腫瘍特異性が不十分であるなどの理由により応用例が少ない。従って、その技術を確立する為の基礎検討を行う事が本研究の目的である。具体的には、immuno-PET/MRIの為のイメージングプロブ開発を行い、腫瘍血管のイメージング・基礎解析研究を実施する。このイメージングプロブ開発にあたり、本研究で用いるモノクローナル抗体は、我々が独自に開発した新規腫瘍血管マーカーに対するものであり、VEGFR2などの既存の腫瘍血管内皮マーカーを標的とした場合よりも、より高精度な腫瘍血管ターゲティングが期待できる。また、もう一つのイメージングプロブとして新規MRI造影素材としての金酸化鉄複合ナノ粒子を用いる。この金酸化鉄複合ナノ粒子は、連携研究者の清野らによって開発された、酸化鉄ナノ粒子の表面に直径数nmの金コロイドを担持した複合ナノ粒子である。金コロイドは、古くから硫黄原子との間に強い特異的結合を形成することが知られており、チオール基(SH基等)を含む生体分子を強固に吸着する特性を持っている。その為、金コロイドは、ナノ粒子の表面を様々なチオール含有分子で修飾する為の足場となり得る。

本研究では、この2つのイメージングプロブを融合させる、即ち新規腫瘍血管特異抗体を金酸化鉄複合ナノ粒子に修飾する為の基礎検討を実施し、新規腫瘍診断システム開発の可能性を検証した。

3. 研究の方法

(1) イメージングプロブとしての腫瘍血管内皮細胞特異的モノクローナル抗体の単離精製とその特性評価

VEGFR2に対するモノクローナル抗体としてV2-02とV2-05i、Roundabout homolog 4 (Robo4)に対するモノクローナル抗体とし

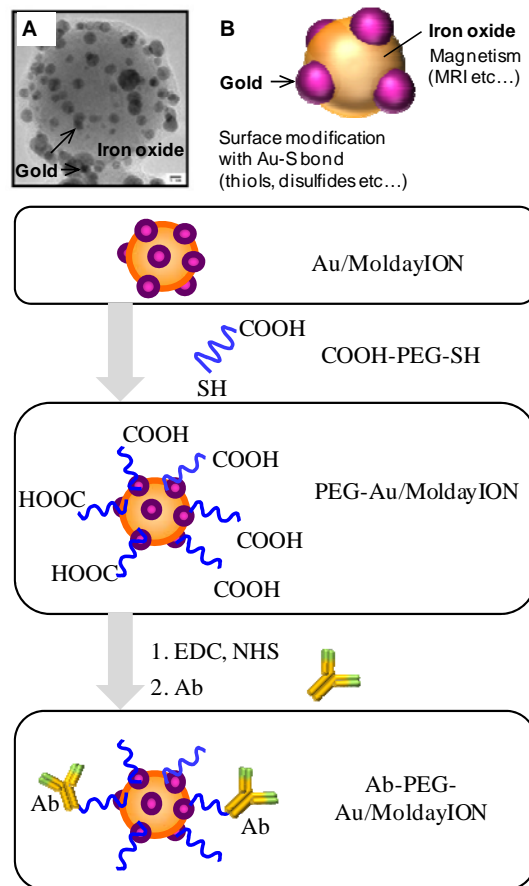


Figure 1. The design of Ab-PEG-Au/MoldayION

てR4-16とR4-13iを用いた。V2-05iとR4-13iは、細胞内侵入活性を有しており、V2-02とR4-16は、細胞内侵入活性が低いクローンである。各クローンについて一本鎖抗体(scFv)、Diabody及び完全型抗体(IgG)を作製し抗原特異性や親和性を評価した。またそれら抗体を¹²³Iおよび¹²⁵Iでラベル化して担がんマウスに投与し、その体内動態を評価した。

(2) イメージングプロブとしての金磁性ナノ粒子への抗体修飾とそのMRI造影能評価

金磁性ナノ粒子は、連携研究者である清野らの方法に従って作製した。今回の研究では、金磁性ナノ粒子としてAu/MoldayIONを用い、Fig. 1に示した方法に従いCOOH基とSH基を有するPEG(COOH-PEG-SH)を室温下で混合することで、Auが硫黄原子と強固に結合する特性を利用してPEG修飾MoldayIONを作製した。さらにPEG鎖のCOOH基とmAbのNH₂基を反応させることによりPEG鎖先端にモノクローナル抗体を修飾した抗体-PEG-Au/MoldayIONを作製し、その抗原特異的な結合性及びin vitro MRI造影能を評価した。さらに担がんマウスに対して抗体-PEG-Au/MoldayIONを投

与し、腫瘍に対する MRI 造影能を評価した。

4. 研究成果

(1) イメージングプローブとしての腫瘍血管内皮細胞特異的モノクローナル抗体の単離精製とその特性評価

まず初めに我々がこれまでに同定してきた腫瘍血管マーカーに対する抗体（複数種類）について一本鎖抗体 (scFv) および完全型抗体 (IgG) のリコンビナント蛋白質を高純度かつ高収率で作製可能な系を確立した。また、作製した抗体リコンビナント蛋白質の基礎的特性を評価した結果、抗原リコンビナント蛋白質に対し、特異的かつ極めて高い親和性で結合することを明らかにした (Table 1)。そこでこれら抗体の腫瘍ターゲティング素子としての有用性を評価すべく、これら抗体を ^{125}I でラベルし、その体内動態を B16BL6 腫瘍モデルマウスを用いて評価した。その結果、VEGFR2、Robo4 どちらに対する scFv も、細胞内侵入抗体と低侵入抗体がネガティブコントロール抗体と比較して腫瘍組織内に顕著に多く分布していることが明らかとなった。さらに、興味深いことに投与 24 時間後では細胞内侵入抗体は低侵入抗体と比較して約 2 倍もの抗体が腫瘍組織に分布していた (Fig. 2)。また同様の検討を Diabody を用いて行ったところ、細胞内侵入抗体と低侵入抗体は、腫瘍に顕著に集積しており、その集積量 (%ID/g tissue) は scFv と比較して多かった (Fig. 2)。

Table 1. The affinity of cell-internalizing and cell low-internalizing mAbs against mouse recombinant antigen

clone	KD (nM)		
	scFv	Diabody	IgG
V2-05i	3.2	0.5	0.3
V2-02	3.1	0.6	0.4
R4-13i	5.2	1.1	0.5
R4-16	5.4	1.2	0.5

さらに、immuno-PET (SPECT)/MRI への応用を目指し、作製した抗体リコンビナント蛋白質に対する SPECT 核種 (^{123}I , 半減期 13 時間) のラベル化条件の検討を試みた。その結果、1 分子の scFv に対し少なくとも 1 分子以上の ^{123}I をラベル化することに成功した。

そこで腫瘍血管特異的抗体 (V2-05i scFv と R4-13i scFv) を ^{123}I でラベル化し、B16BL6 腫瘍モデルマウスにおいて SPECT 画像を撮影した。その結果、その分布を経時的に観察可能であり、投与 24 時間後において腫瘍集積性を確認することが出来、腫瘍のイメージングプローブとして使用出来る可能性が示された (Fig. 3)。

以上、本研究で単離した VEGFR2 及び Robo4 に対する細胞内侵入抗体がともに腫瘍へと

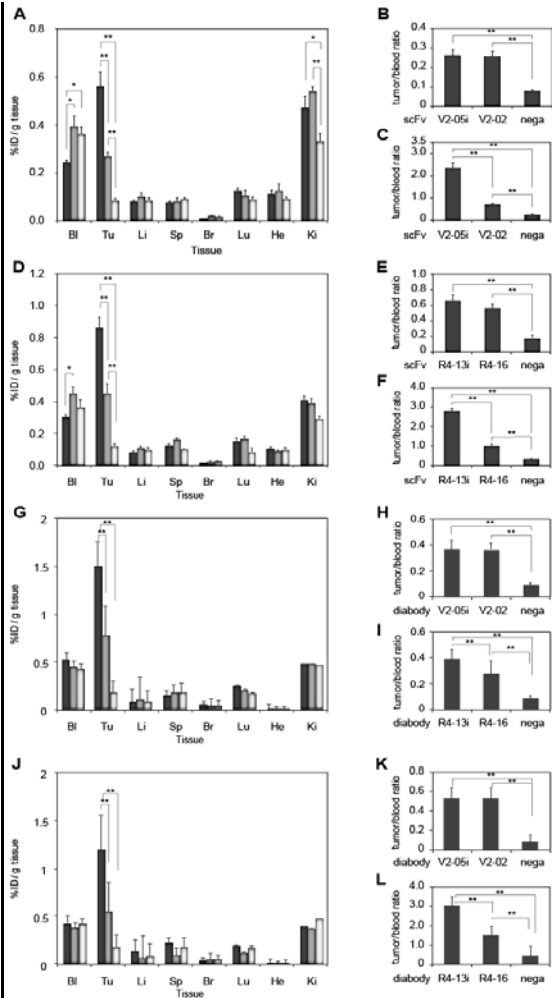


Figure 2. Biodistribution and tumor accumulation of scFVs and diabodies in B16BL6 tumor bearing mice

10 μg of ^{125}I labeled anti VEGFR2 scFVs (A-C), anti Robo4 scFVs (D-F), anti VEGFR2 diabodies (G-I), and anti Robo4 diabodies (J-L) were intravenously administrated into B16BL6 tumor bearing mice. (A, D, G, J) Biodistribution of scFVs and diabodies. 24 hrs after injection, the radioactivity distributed in each tissue were measured. %ID/g tissue were calculated as following formula: %ID/g tissue = [(count/g tissue) / (total injected count)] \times 100 (%). ■: V2-05i (A, G), R4-13i (D, J) ■; V2-02 (A, G), R4-16 (D, J) □; nega antibody. Values are shown as means \pm SE. * p <0.05, ** p <0.01 vs. negative control antibody. Bl; blood, Tu; tumor, Li; liver, Sp; spleen, Br; brain, Lu; lung, He; heart, Ki; kidney. (B, C, E, F, H, I, K, L) Tumor blood ratio of scFVs in B16BL6 tumor bearing mice. 2 hrs (B, E, H, K) or 24 hrs (C, F, I, L) after injection, the radioactivity of tumor and blood were measured. Tumor/blood ratio was calculated as following formula; Tumor/blood ratio = (count/g tissue of tumor) / (count/g tissue of blood). Values are shown as means \pm SE. ** p <0.01.

選択的に集積し、滞留性にも優れた腫瘍ターゲティングキャリアであることが示された。

(2) イメージングプローブとしての金磁性ナノ粒子への抗体修飾とその MRI 造影能評価

研究代表者は、既に MoldayION といった微細な MRI 用酸化鉄ナノ粒子表面に金を付与した複合ナノ粒子に対し、PEG などで表面修飾

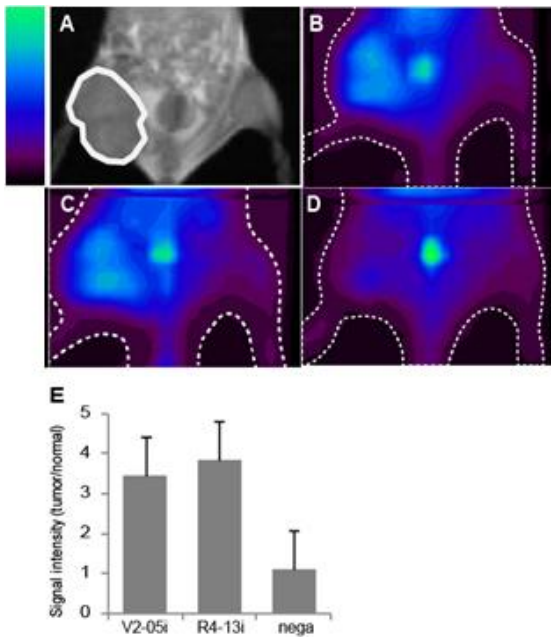


Figure 3. SPECT imaging of B16BL6 tumor bearing mice by ^{125}I labelled scFvs.

(A) Magnetic resonance imaging of B16BL6 tumor bearing mice. (B-D) Single photon emission computed tomography (SPECT). ^{125}I labeled V2-05i scFv (B; 9.0×10^8 cpm/200 μL /head), R4-13i scFv (C; 1.0×10^9 cpm/200 μL /head) and nega scFv (D; 1.1×10^9 cpm/200 μL /head) were intravenously administrated to B16BL6 tumor bearing mice respectively. SPECT images were taken at 24 hr after administration. (E) Signal intensity ratio (tumor/normal). Signal intensity of tumor transplanted left thigh and normal right thigh were calculated by imaging software, gpet view from each SPECT Image. The ratio of signal intensity of left thigh to that of right thigh were calculated respectively.

することで、腫瘍検出用 MRI 造影剤の開発を行っている。そこで、本研究では、immuno-PET/MRI の為のイメージングプローブ開発を念頭に、この造影剤について PEG を介して抗体蛋白質を修飾した新たな造影剤粒子を作製すべく、実際に腫瘍血管特異的抗体として VEGVR2 に対する IgG 型抗体リコンビナント蛋白質並びに、既に臨床で抗体医薬として用いられている抗体 (リツキサン) を用いて、種々の条件下で抗体-PEG-Au/MoldayION を作製した。その結果、0.1 mg 抗体/1.5 mg PEG/mg Fe で各種抗体を修飾することができた。そこで、VEGVR2 に対する抗体を用いて作製した抗体-PEG-Au/MoldayION の抗原特異性を評価した結果、VEGVR2 を発現していない細胞に対しては、ほとんど結合しなかったのに対して、VEGVR2 発現細胞には、高い結合性を有することを明らかにした。さらにこの抗体-PEG-Au/MoldayION とコントロールとして COOH-PEG-Au/MoldayION を B16BL6 腫瘍モデルマウスに投与し、マウス固形腫瘍モデルの造影を試みた (Fig. 4)。その結果、両者はと

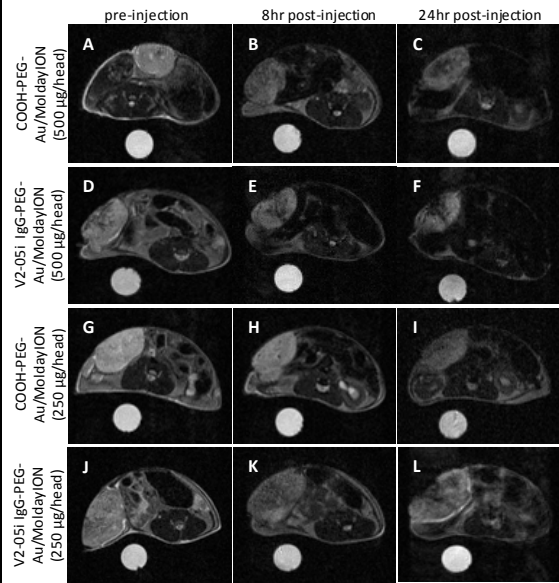


Figure 4. T2-weighted images of V2-05i IgG-PEG-Au/MoldayION injected mice.

COOH-PEG-Au/MoldayION (500 μg /head ; A-C and 250 μg /head ; G-I) and V2-05i IgG-PEG-Au/MoldayION (500 μg /head ; D-F and 250 μg /head ; G-I) were injected B16BL6 tumor bearing mice. T₂-weighted images (1.5 T, spin-echo sequence: TR = 2,000 ms, TE = 69 ms) were taken pre- (A, D, G, J) and 8 hr (B, E, H, K) and 24 hr (C, F, I, L) post-injection. All images were obtained using MRminiSA.

もに、500 μg /マウスで投与 8 時間後、及び 24 時間後に腫瘍組織の中央部が黒く造影されていることが確認された。しかし、残念ながら両者の造影能の強度には差が認められなかった。

またリツキサンを用いた抗体-PEG-Au/MoldayION についても CD20 を発現した担がんマウスに投与し、その造影能を評価したが、こちらも抗体を修飾していない PEG-Au/MoldayION と比較して造影能の強度に差は認められなかった。

今後、がん種並びに造影剤の投与量や造影条件について詳細に検討していく予定である。

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 4 件)

- ① H. Kojima, Y. Mukai, M. Yoshikawa, K. Kamei, T. Yoshikawa, M. Morita, T. Inubushi, TA. Yamamoto, Y. Yoshioka, N. Okada, S. Seino, S. Nakagawa, Simple PEG conjugation of SPIO via an Au-S bond improves its tumor targeting potency as a novel MR tumor imaging agent. *Bioconjug Chem.*, 21, 1026-1031, 2010. 査読あり, DOI: 10.1021/bc900487p.

- ② M. Yoshikawa, Y. Mukai, SI. Tsunoda, Y. Tsutsumi, Y. Yoshioka, N. Okada, S. Nakagawa, Modifying the antigen-immunization schedule improves the variety of monoclonal antibodies obtained from immune-phage antibody libraries against HIV-1 Nef and Vif. J Biosci Bioeng., 111, 597-599, 2011. 査読あり, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.12.025.
- ③ 向洋平、清野智史、中川晋作, がんの早期診断を目指した腫瘍ターゲティング型 MRI 造影剤の開発, 磁気と健康, 24, 6-10, 2012. 査読なし
- ④ M. Yoshikawa, Y. Mukai, Y. Okada, Y. Tsumori, S. Tsunoda, Y. Tsutsumi, W. C. Aird, Y. Yoshioka, N. Okada, T. Doi, S. Nakagawa, Robo4 is an effective tumor endothelial marker for antibody-drug conjugates based on the rapid isolation of the anti-Robo4 cell-internalizing antibody. Blood, 121, 2804-2813, 2013. 査読有り, DOI: 10.1182/blood-2012-12-468363.

[学会発表] (計10件)

- ① 吉川 舞、向洋平、吉岡靖雄、岡田直貴、堤康央、角田慎一、中川晋作, Antibody-drug conjugate 製剤の開発に適う細胞内侵入抗体の効率的創製法の確立, 第25回日本薬剤学会, 2010年5月12日, 徳島
- ② 吉川 舞、向洋平、吉岡靖雄、岡田直貴、堤康央、角田慎一、中川晋作, Immuno-conjugate 製剤における抗体の細胞内侵入活性と抗腫瘍効果の連関解析, 第26回日本DDS学会, 2010年6月18日, 大阪
- ③ 伴野由季、向洋平、吉川舞、小島拓記、清野智史、山本孝夫、森田将史、犬伏俊郎、吉岡靖雄、岡田直貴、中川晋作, 金磁性ナノ粒子を応用した新規MRI腫瘍造影剤の開発, 第26回日本薬剤学会, 2011年5月29-31日, タワーホール船堀 (東京)
- ④ 吉川 舞、向洋平、堤康央、角田慎一、吉岡靖雄、岡田直貴、中川晋作, 標的分子特異的な細胞内薬物送達を目指した細胞内侵入抗体の基礎的特性評価, 第26回日本薬剤学会, 2011年5月29-31日, タワーホール船堀 (東京)
- ⑤ Mai Yoshikawa, Yohei Mukai, Shin-ichi Tsunoda, Yasuo Tsutsumi, Yasuo Yoshioka, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, Modifying the antigen-immunization schedule improves the variety of monoclonal

antibodies obtained from immune-phage antibody libraries against HIV-1 Nef and Vif. HUPO 2011 10th world congress, 2011年9月2日~9日, ジュネーブ(スイス)

- ⑥ Mai Yoshikawa, Yohei Mukai, Shin-ichi Tsunoda, Yasuo Tsutsumi, Yasuo Yoshioka, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, Cell-internalizing monoclonal antibody against VEGFR2 is a potent anti-cancer agent carrier. 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月3日~5日, 名古屋国際会議場
- ⑦ 伴野由季、向洋平、吉川 舞、清野智史、山本孝夫、吉岡靖雄、岡田直貴、中川晋作, 金酸化鉄ナノ粒子の技術を応用した新規 MRI 腫瘍造影剤の開発, 第61回日本薬学会近畿支部大会, 2011年10月22日, 神戸学院大学
- ⑧ 吉川 舞、向洋平、伴野由季、金井泰和、渡部浩司、角田慎一、堤康央、畑澤 順、岡田直貴、中川晋作, VEGFR2 に対する抗体を用いた腫瘍イメージング, 第12回放射線医薬品・画像診断薬研究会, 2011年12月15日, 京都テルサ/京都府民総合交流プラザ
- ⑨ 柳澤有紀、向洋平、吉川 舞、岡田欣晃、吉岡靖雄、角田慎一、堤康央、岡田直貴、土井健史、中川晋作, 癌ターゲティング療法における腫瘍血管内皮細胞特異的な細胞内侵入抗体の有用性評価, 第28回日本DDS学会, 2012年7月4-5日, 札幌
- ⑩ S. Seino, M. Yoshikawa, H. Kojima, Y. Tomono, Y. Mukai, S. Nakagawa, T. Nakagawa, T. A. Yamamoto, Preparation of Antibody modified PEG-Au/iron-oxide composite nanoparticles as MR imaging agent., ICAUMS2012 International Conference of the Asian Union of Magnetics Societies, 2012年10月2-5日, 奈良

[図書] (計1件)

- ① 中川晋作、吉川 舞, ナノ医療, 第12巻 シリーズ生命倫理学 先端医療、234-256, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 晋作 (NAKAGAWA SHINSAKU)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 70207728

(2) 連携研究者

畑澤 順 (HATAZAWA JUN)
大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70198745

清野 智史 (SEINO SATOSHI)
大阪大学・大学院工学研究科・講師
研究者番号：90432517

向 洋平 (MUKAI YOHE)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：60444501