

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18447

研究課題名(和文)抗体薬物複合体療法における複数分子同時イメージングによる治療効果予測法の開発

研究課題名(英文)Imaging the antibody internalization by multiple-molecular simultaneous imaging for prediction of antibody-drug conjugates efficacy

研究代表者

竹中 文章 (Takenaka, Fumiaki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10642522

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)：本研究の目的は、非侵襲的に抗体医薬の全身分布および細胞内取込み後の挙動を生体イメージングにより把握する手法を確立することにある。この目的を達成するため、細胞内在化後に細胞内にトラップされる放射性ジルコニウムおよび細胞外へ排泄される放射性ヨウ素で標識した抗体医薬を用いて検討を行った。その結果、放射性ジルコニウムと放射性ヨウ素の腫瘍集積濃度の差を算出することで、免疫複合体の内在化量を非侵襲的かつ定量的に評価できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to establish the non-invasive technique to measure the whole-body distribution and the cell internalization levels of antibody based pharmaceuticals simultaneously. For this purpose, the in vitro and in vivo experiments were conducted using antibody radiolabeled with radioactive zirconium and iodine, which are residualizing or non-residualizing nuclides intracellularly after cell internalization, respectively. The results suggest that the value subtracted the concentration of iodine from that of zirconium correlates the internalization levels of immunocomplex, indicating multiple-molecular simultaneous imaging with radioactive zirconium/iodine labeled antibody could quantitatively map the antibody internalization in whole-body.

研究分野：放射性医薬品学

キーワード：抗体療法 分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤などの薬剤を疾患部位指向性を持つ抗体に結合することで、標的組織への選択的な薬剤送達を可能にする抗体-薬物複合体 (Antibody-Drug Conjugate, ADC) が新たながん治療戦略として注目を集めている。ADCにより得られる治療効果は抗原-抗体結合物の細胞内への取込、すなわち免疫複合体の内在化が密接に関与すると考えられている。一方で、免疫複合体の内在化速度はがん細胞ごとに異なることが予期され、内在化を非侵襲的かつ定量的に把握しうる方法が求められる。しかしながら、免疫複合体の内在化を生体内で捉える手法は確立されておらず、そのがん治療効果を事前に予期することは困難である。

一方、申請者らは複数分子の相互作用による生命現象の解明を目的として、生体内における複数の放射性核種の挙動を識別して同時に可視化するイメージング装置を開発し、これを用いた研究を展開してきた。また、その過程において、比較的長い血中半減期 (数日~20日程度) を有する抗体のイメージングに適した物理学的半減期を持つジルコニウム-89 (^{89}Zr 、半減期 3.27 日) および放射性ヨウ素等の生体イメージングへの応用に取り組んでいる。これらを用いた研究から、この2つの放射性核種は細胞内において異なる挙動を示すことが分かった。すなわち、 ^{89}Zr は標識抗体が細胞表面の抗原に結合し免疫複合体として細胞内に取り込まれると、リソソームで分解を受けた後に金属錯体として細胞内に滞留する。一方で、放射性ヨウ素は標識抗体が内在化の後に分解されるとともに、脱ヨウ素化反応を受け細胞外へ排出される。

そこで、上記の ^{89}Zr および放射性ヨウ素の性質に着目し、これらを標識した抗体の生体内における分布変化を複数同時イメージングにより可視化し、両者の集積量の差を算出することで、非侵襲的に標的となる免疫複合

体の内在化を定量的に可視化できると考えた。さらに、腫瘍モデル動物を用いてがん治療効果を測定することで、免疫複合体と ADC によるがん治療効果との関係が明らかになるとともに、複数同時イメージングによる ADC 治療適応患者の選定・治療効果予測などの効率的な治療介入につながると考え、本応募課題の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、ADC によるがん治療効果と免疫複合体の内在化速度との相関の解明に向けて、生体内における免疫複合体の内在化を非侵襲的に測定するイメージング手法の確立を目的とする。この目的を達成するため、抗体として抗 HER2 抗体を用い、HER2 の内在化を抑制することが知られる Lapatinib (dual HER2/EGFR TKI) の投与が *in vitro*/*in vivo* における各標識抗体の挙動に与える影響について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞における放射能分布

内在化後の挙動が異なる ^{89}Zr および放射性ヨウ素として $^{123/125}\text{I}$ を標識核種として、それぞれ、Deferoxamine を介した間接標識法、酸化剤として IODOGEN を用いた直接標識法により抗 HER2 抗体に標識した。標識後の HER2 に対する親和性を HER2 高発現細胞株である SKOV3 を用いて調べた。

次いで、各標識抗体を HER2 高発現細胞株である MDA-MB-361 乳がん細胞の表面に結合させた後、37°C でインキュベーションし、細胞表面、細胞内、および分解後の細胞外へ排出された画分における経時的な放射能分布変化を調べた。同様に Lapatinib 投与による放射能分布を検討した。

(2) 担がんマウスにおける放射能分布

(1) の検討で用いた MDA-MB-361 細胞株を皮下に移植し作製した担がんマウスに対し

て、各放射性核種を標識した抗体を投与し、その 24-120 時間後に解剖し臓器放射能分布を調べた。次いで、非侵襲的な評価の可否を検討するため、 $^{89}\text{Zr}/^{125}\text{I}$ 標識抗体を担がんマウスに投与し、経時的に PET/SPECT イメージングを行った。同様に Lapatinib 投与による放射能分布を検討した。

4. 研究成果

(1) 培養細胞における放射能分布

抗 HER2 抗体に対して ^{89}Zr および ^{125}I を標識し得られた放射標識抗体の HER2 に対する解離定数は、それぞれ 0.97、0.38nM と同程度の高い活性を示した (図 1)。

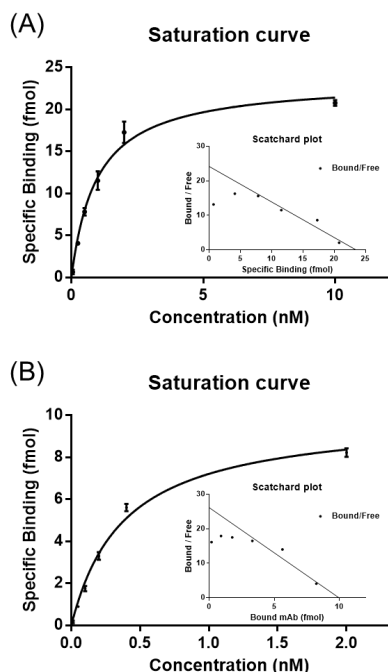


図 1. ^{89}Zr (A) および ^{125}I (B) 標識後の抗 HER2 抗体の SKOV3 細胞への結合曲線および Scatchard plot

各標識抗体をがん細胞表面に結合させた後、経時的な放射能分布を調べた結果、いずれの核種も細胞表面の分布は時間経過とともに減少した一方で、 ^{89}Zr を用いた場合には細胞内画分が、 ^{125}I を用いた場合には分解物画分が上昇した。また、Lapatinib を投与すること

で、細胞表面画分の減少、および ^{89}Zr の細胞内画分、 ^{125}I の分解物画分の上昇が顕著に抑制された。このことから、 ^{89}Zr は細胞内に蓄積し、 ^{125}I は分解物として細胞外へ排出される性質を示すことが確認された。

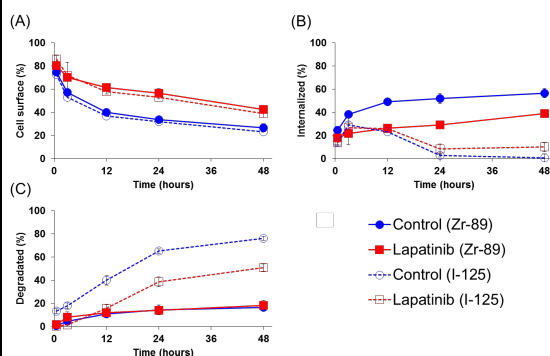


図 2. Lapatinib 投与の有無における $^{89}\text{Zr}/^{125}\text{I}$ 標識抗体の MDA-MB-361 細胞取込み後の細胞表面 (A)、細胞内 (B)、および培養液中 (C) の経時的な放射能分布

(2) 担がんマウスにおける放射能分布

担がんマウスを用いた臓器放射能分布実験の結果、 ^{89}Zr は時間経過とともに腫瘍への放射能集積が増大した一方、 ^{125}I は集積が減少した。また、Lapatinib 投与により ^{89}Zr の腫瘍集積は減少した一方で、 ^{125}I の集積は増大し、in vitro 実験と同様な傾向を示すことが確認された。いずれの場合においても血中の放射能濃度は同程度であった。得られた結果について ^{89}Zr と ^{125}I の腫瘍および血中放射能濃度の差を算出し、その値を Internalization Index とした。その結果、HER2 の内在化を抑制する Lapatinib の投与によって血液の Internalization Index は変化しなかった一方で、腫瘍で減少したことから、放射能集積濃度の差分が免疫複合体の内在化量を反映することが示唆された (図 3)。

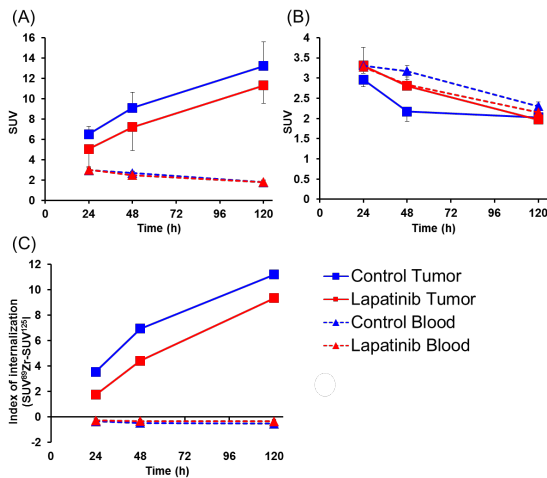


図3 . 臓器放射能分布実験により得られた Lapatinib 投与および非投与群における腫瘍および血中の ^{89}Zr (A)または ^{125}I (B)の放射能分布、および Internalization Index (C)

次いで、非侵襲的な評価として ^{89}Zr の放射能分布を PET で、 ^{123}I の放射能分布を SPECT でイメージングし、Lapatinib の投与による両者の腫瘍および血中の放射能濃度への影響を調べた。図4に代表例として各放射標識抗体を投与し24時間後にPET/SPECT撮像を行い得られた画像を示す。各タイムポイントで得られた画像を定量解析した結果、臓器放射能分布実験と同様に Lapatinib の投与により Internalization Index が減少する結果が得られ、免疫複合体の内在化抑制を反映することが示唆された(図5)。

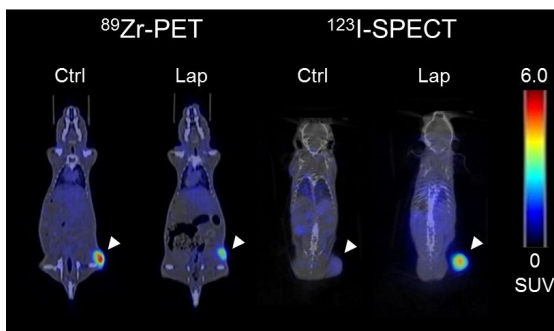


図4 . Lapatinib 投与および非投与マウスに対し、 ^{89}Zr または ^{123}I 標識抗体を投与した後に撮像し得られた PET/CT および SPECT/CT 画像

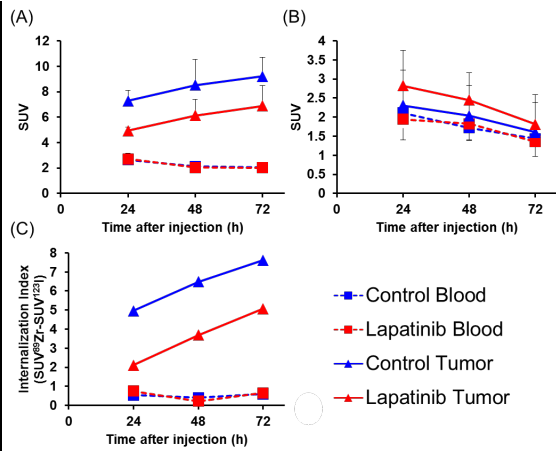


図5 .PET/SPECT イメージングにより得られた Lapatinib 投与および非投与群における腫瘍および血中の ^{89}Zr (A)または ^{123}I (B)の放射能分布、および Internalization Index (C)

本研究期間内に複数同時イメージングを達成することはできなかったものの、異なる2つの核種で標識した抗体を用いて同時にイメージングを行うことで、免疫複合体の内在化を非侵襲的かつ定量的に可視化できることが示唆された。

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 3件)

1. Sasaki T, Kobayashi K, Kita S, Kojima K, Hirano H, Shen L, Takenaka F, Kumon H, Matsuura E. In vivo distribution of single chain variable fragment (scFv) against atherothrombotic oxidized LDL/ β 2-glycoprotein I complexes into atherosclerotic plaques of WHHL rabbits: implication for clinical PET imaging. *Autoimmun Rev.* 16(2):159-167 (2017). (査読有り)
2. Xu P, Xu N, Guo K, Xu A, Takenaka F, Matsuura E, Liu C, Kumon H, Huang P. Real-time monitoring of tumor progression and drug responses in a preclinical mouse

model of prostate cancer. Oncotarget, 31;7(22):33025-34 (2016). (査読有り)

3. Wahyuningsih AT, Shen L, Kobayashi K, Sasaki T, Takenaka E, Hanada T, Akehi M, Akahoshi A, Ozeki E, Ando E, Matsuura E. The function of β 2-glycoprotein I in angiogenesis and its in vivo distribution in tumor xenografts. Acta Med. Okayama., 70(1): 13-24 (2016). (査読有り)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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

(4)研究協力者

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

本村 信治 (Motomura Shinji)

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・副チームリーダー

研究者番号：20360654