

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659579

研究課題名（和文）抗体を模倣した ^{99m}Tc 標識プローブ研究課題名（英文） ^{99m}Tc -labeled probes imitating antibodies

研究代表者

荒野 泰 (ARANO YASUSHI)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：90151167

研究成果の概要（和文）：

ラジオアイソトープ標識抗体が分子イメージングやアイソトープ治療に使用されている。標識抗体は、大過剰の非標識抗体と共に投与されるため、標的分子への標識抗体の結合を非標識抗体が阻害することが想定される。本研究では、 ^{99m}Tc の錯形成反応を利用することで、標識に使用した ^{99m}Tc と同じ比放射能の標識抗体を与える方法を開発した。本 ^{99m}Tc 標識抗体をアルブミンや $\text{F(ab}')_2$ と同時投与しても体内動態に相違は観られず、高比放射能標識抗体の分子イメージング応用への更なる研究が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Radiolabeled antibodies have been applied to molecular imaging and targeted radionuclide therapy. Since radiolabeled antibodies are administered in the presence of a large amount of non-labeled antibodies, the non-radiolabeled antibodies would inhibit the target accumulation of the radiolabeled antibodies. In this study, a new method was developed to prepare ^{99m}Tc -labeled antibodies of high specific activities utilizing ^{99m}Tc complexation reaction. The ^{99m}Tc -labeled antibodies exhibited similar biodistribution in the presence of albumin or antibody $\text{F(ab}')_2$ fragment, suggesting further studies are worth pursuing for molecular imaging and targeted radionuclides therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：分子イメージング、アイソトープ治療、抗体、比放射能、

1. 研究開始当初の背景

標識抗体やペプチドが分子イメージングやアイソトープ治療に応用されている。多くのペプチド製剤は、目的とする放射性核種 (RI) で標識した後、HPLC 等で原料に使用した前駆体を除去した、高い比放射能の化合物として入手が可能である。一方、抗体の場合、放射性ヨウ素や様々な金属 RI を用いる標識方法が開発されているが、いずれの方法においても標識抗体と非標識抗体は同じ抗原との結合性や分子サイズを有するため、両者の分離は困難であり、実験動物や臨床においても、標識抗体は、大過剰の非標識抗体と同時に投与されている。この結果、標的抗原

を標識抗体と非標識抗体とが競合し、標的へ集積する標識抗体を低減することが考えられる。しかし、実験動物を用いた多くの研究から、ある程度の量の非標識抗体の共存下での標識抗体の投与は抗原発現細胞への集積を向上することが認められている。その理由の一つに、標識抗体の非特異的な集積を非標識抗原が低減するためと説明されているが、これを証明する研究はなされていない。この問題の解明には、非標識抗体を含まない、標識抗体の作製方法を確立し、これを用いた実験が不可欠である。しかし、前述のように標識抗体と非標識抗体の分離は困難である。そのため、標識抗体のみを投与して、標識抗体

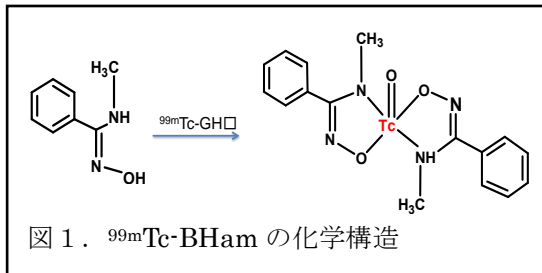
の体内分布に及ぼす非標識抗体の影響を評価することは困難であった。

2. 研究の目的

非標識抗体を含まない標識に使用した^{99m}Tcと同じ比放射能の標識抗体の作製方法の確立を目的とする。また、本標識抗体の体内動態に及ぼす非標識抗体の影響を明らかにする。

3. 研究の方法

我々の先の研究から、2分子のN-methyl benzohydroxamamide (BHam)は1原子の^{99m}Tcと生体内で安定な錯体を形成することを明らかにしてきた(図1)。



BHamは配位原子にチオール基を含まないため、BHamの導入による抗体分子のジスルフィド結合とのチオールジスルフィド交換反応などに伴う構造変化は進行しない。そこで、抗体FabフラグメントにBHamを導入した化合物を合成し、その後、^{99m}Tcとの錯形成反応を行うことにより、^{99m}Tc-BHam錯体を介して2分子のFabが結合したF(ab')₂様の2価抗体が得られると考えた。この場合、原料に用いたFab-BHamと生成した^{99m}Tc-(BHam-Fab)₂の分子量は、それぞれ50 kDaと100 kDaと2倍相違することから、通常の分子ふるいHPLCにより両者の分離が可能であり、その結果、標識に使用した^{99m}Tcと同じ比放射能を持つ標識抗体が得られる。

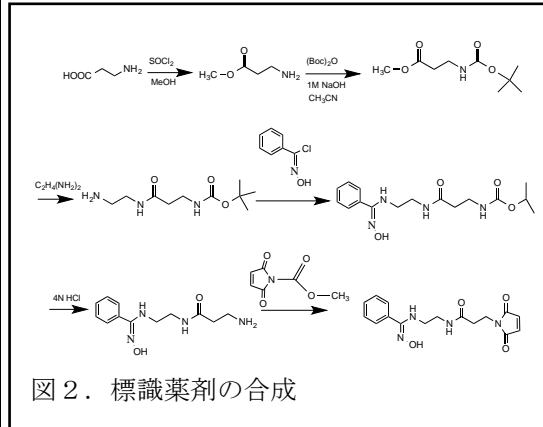
^{99m}Tc-(BHam-Fab)₂の合成条件の最適化を行った後、本標識抗体をF(ab')₂溶液あるいはアルブミン溶液として実験動物(マウス)に投与し、超高比放射能^{99m}Tc標識抗体の体内動態に及ぼすキャリアタンパク質の影響を検討した。更に、N-succinimidyl 3-[¹²⁵I]iodobenzoateで抗体F(ab')₂フラグメントを標識した¹²⁵I-SIB-F(ab')₂を作製し、実験動物における両標識抗体の体内動態を比較した。

4. 研究成果

(1) 標識薬剤の合成

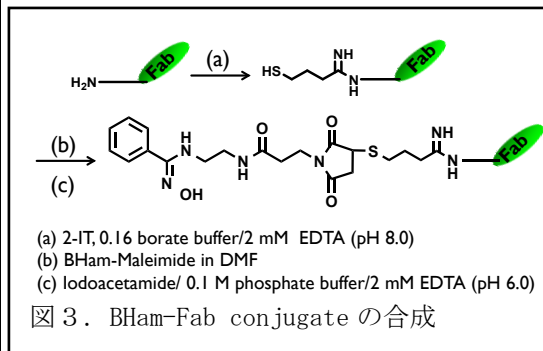
FabにBHamを導入するため、末端にマレイミド基を有するBHam誘導体を図2に記す方法で合成した。βアラニンを出発原料として、カルボン酸のエステル化、アミノ基のBoc化、エチレンジアミンとのアミノリシスで作製

したアミノ基誘導体を作製した。次いで、本化合物のアミノ基とbenzohydroximinoyl chlorideとの反応、脱Boc、N-methoxy-carbonyl maleimideとの反応により目的とする化合物を得た。本合成法は、出発原料にω位にアミノ基を有するカルボン酸を用いることで、種々の長さのスペーサ構造を有する誘導体の合成が可能である。



(2) BHam-Fab conjugateの合成

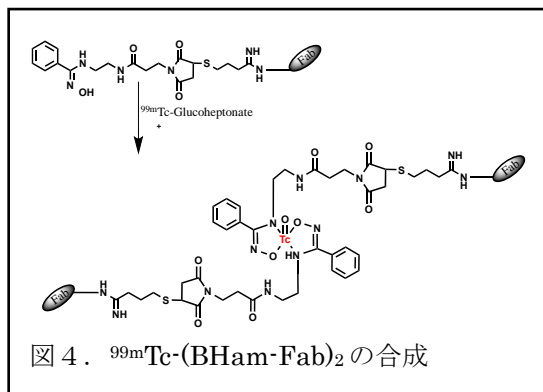
BHam-Fab conjugateの合成は図3に示す方法で行った。常法によりIgGから抗体Fabフラグメントを作製し、そのアミノ基にiminothiolaneを反応させてチオール基を導入した。その後、標識薬剤のマレイミド基とチオール基との反応から、目的とするBHam-Fab conjugateを作製した。反応前後のチオール基の定量から、Fab1分子に平均1.9分子のBHamが結合していることを認めた。



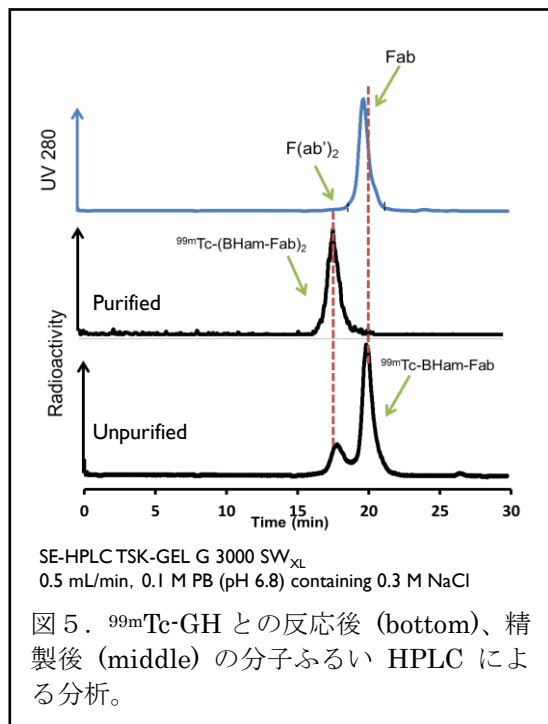
(3) ^{99m}Tc-(BHam-Fab)₂の合成

BHam-Fab溶液に^{99m}Tc-glucoheptonate(^{99m}Tc-GH)を加えて、40°Cで反応を行い、配位子交換反応により目的とする標識体の合成を行った(図4)。このとき、BHam-Fab濃度、反応pH、GH濃度についての検討を行い、最適条件を求めた。その結果、本標識抗体の収率は、GH濃度、抗体濃度、反応pHの影響を強く受け、反応pH 5.0、GH濃度10 mg/mL、抗体濃度4 mg/mLの反応条件において、23%の放射化学的収率で目的の^{99m}Tc-(BHam-Fab)₂

が得られた。



$^{99m}\text{Tc}-(\text{BHam-Fab})_2$ の反応後、および分子ふるい HPLC を用いて精製した後の放射活性を指標とした HPLC 分析結果を図 5 に示す。Fab に導入した BHam と結合した ^{99m}Tc が、同じ Fab 分子内のアミノ酸残基と結合したと考えられる 1 価の ^{99m}Tc -BHam-Fab の生成が多く観られた。BHam と Fab とを共有結合することなく 2 : 1 のモル比で混和し、この溶液に ^{99m}Tc -GH



を加えたところ、 ^{99m}Tc -BHam₂ が 95% 以上の放射化学的収率で得られた。このときの BHam 濃度はおよそ 1.5×10^{-4} M であるが、BHam 単独で標識反応を行った場合、 10^{-5} M 程度の濃度でも ^{99m}Tc 錯体を 95% 以上の放射化学的収率で与える。したがって、今回作製した標識薬剤では、錯形成部位である BHam と Fab との結合部位であるマレイミドとの結合距離が十分でないため、1 分子の BHam-Fab と結合した ^{99m}Tc が、もう 1 分子の BHam-Fab と錯形成反応を行うのを Fab 分子が、その立体障害から阻害したと推測している。BHam とマレ

イミド基とを適切な結合距離で架橋することにより、目的とする 2 価の $^{99m}\text{Tc}-(\text{BHam-Fab})_2$ が、低タンパク質濃度においても高い収率で得られると考え、現在、スペーサ長についての検討を進めている。

(4) $^{99m}\text{Tc}-(\text{BHam-Fab})_2$ の安定性

未反応の BHam-Fab を除去した「キャリアフリー」の $^{99m}\text{Tc}-(\text{BHam-Fab})_2$ の安定性をマウス血漿中、37°C で測定した。その結果、インキュベート 3 時間、6 時間後においてそれぞれ 84.49 (4.88)%, 78.29 (0.07)% が安定に存在することを認め、 ^{99m}Tc の半減期を考慮すると十分な血漿中での安定性を有すると考えられる。

(5) 実験動物における体内動態

$^{99m}\text{Tc}-(\text{BHam-Fab})_2$ を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の $\text{F}(\text{ab}')_2$ あるいは同濃度の牛アルブミン溶液と混和後に、その 100 μL をマウスに静脈投与した時の体内分布を表 1 に示す。

Organ	Time after injection			
	1 h	3 h	6 h	24 h
Blood	16.75±2.10	10.87±0.76	7.97±2.00	1.90±0.22
Liver	4.40±0.60	3.60±0.37	3.23±0.18	1.53±0.11
Spleen	2.46±0.51	1.70±0.18	1.49±0.35	0.84±0.48
Kidney	13.67±1.90	12.83±0.31	11.92±0.88	6.05±0.30
Pancreas	0.99±0.16	1.15±0.14	1.16±0.33	0.28±0.21
Heart	4.74±1.07	3.86±0.76	2.03±0.29	1.11±0.40
Lung	6.14±0.95	5.38±0.72	3.00±0.55	0.95±0.34
Stomach	1.92±0.08	1.31±0.27	1.24±0.15	0.43±0.24
Intestine	5.79±0.02	8.06±1.01	8.51±0.27	1.81±0.65
Urine #				38.03±73.12
Feces #				17.12±5.10
	$^{99m}\text{Tc}-(\text{BHam-Fab})_2/\text{BSA}$			
Blood	18.56±0.52	12.05±0.93	7.53±0.47	1.95±0.23
Liver	5.00±0.57	4.56±0.47	3.39±0.37	1.90±0.30
Spleen	2.35±0.64	1.94±0.47	1.52±0.16	0.92±0.33
Kidney	13.14±1.23	11.79±1.31	11.60±1.53	6.58±1.07
Pancreas	0.88±0.14	1.28±0.08	1.12±0.52	0.93±0.49
Heart	5.47±1.22	3.42±0.49	3.16±0.95	1.27±0.63
Lung	8.36±0.63	5.41±0.81	4.41±1.26	1.43±0.28
Stomach	1.03±0.07	0.87±0.10	0.67±0.08	0.35±0.14
Intestine	4.76±0.46	6.77±0.60	7.66±0.91	3.40±1.17
Urine #				42.55±3.30
Feces #				11.58±1.11

Expressed as percent injected dose per gram wet tissue.
Expressed as percent injected dose per wet tissue.

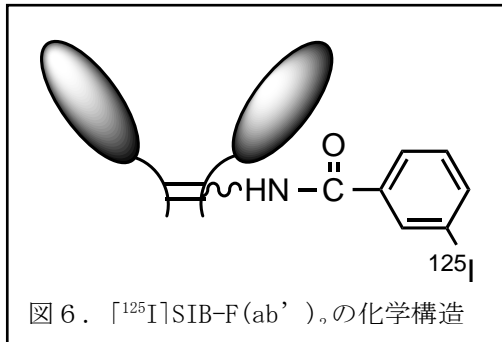
表 1. $^{99m}\text{Tc}-(\text{BHam-Fab})_2$ を BSA および $\text{F}(\text{ab}')_2$ 溶液としてマウスに投与した場合の体内動態。

それぞれの溶液で調整した $^{99m}\text{Tc}-(\text{BHam-Fab})_2$ の体内動態には大きな相違は観られず、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ の添加による非特異的な集積の低減効果も観られなかった。両者とも投与早期から腎臓への高い集積が観察された。一般に、腎臓の糸球体濾過は、アルブミンよりも分子サイズの小さいポリペプチドで観察される。したがって、本実験結果は、 $^{99m}\text{Tc}-(\text{BHam-Fab})_2$ は血液中で一部が開裂して 1 価の ^{99m}Tc -BHam-Fab が生成し、これが腎臓の糸球体濾過を受けたことを示唆する。

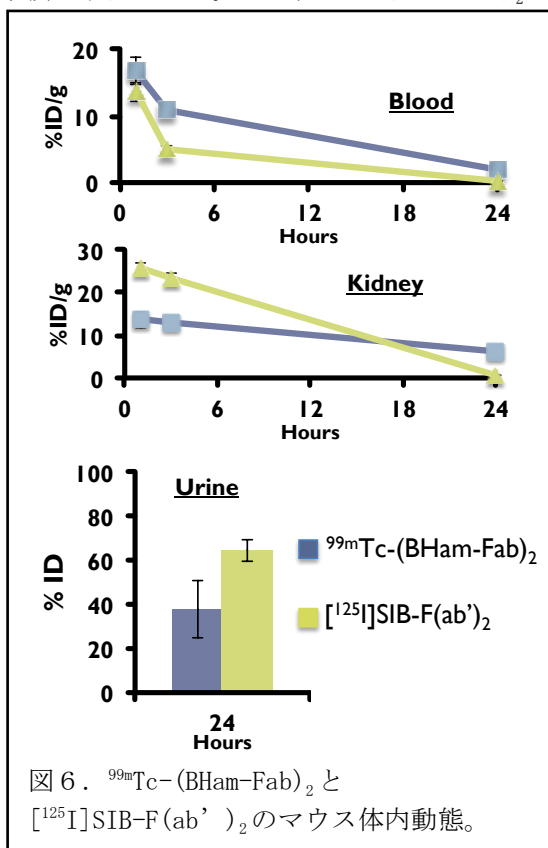
本標識抗体の動態特性をより詳細に検討する目的で、抗体 $\text{F}(\text{ab}')_2$ フラグメントを N-succinimidyl 3-[^{125}I]iodobenzoate で標識した ^{125}I -SIB- $\text{F}(\text{ab}')_2$ と比較した。本標識抗

体の化学構造を図6に、マウスにおける体内動態を図7に示す。

$[^{125}\text{I}]\text{SIB-F}(\text{ab}')_2$ は $^{99\text{m}}\text{Tc}-(\text{BHam-Fab})_2$ に比べて血液からの速やかな消失を示した。こ



れまでの研究から、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ フラグメントは、血液を循環中にヒンジ部位のジスルフィド結合が開裂して Fab' へと分解され、本抗体フラグメントが腎臓の糸球体濾過を受けることが知られている。しかし、 Fab に比べると $[^{125}\text{I}]\text{SIB-F}(\text{ab}')_2$ は腫瘍への高い集積を示すことから、 $[^{125}\text{I}]\text{SIB-F}(\text{ab}')_2$ と同じ2価の抗体であり、かつ血液からの消失がやや緩徐な $^{99\text{m}}\text{Tc}-(\text{BHam-Fab})_2$ は腫瘍組織への十分な集積が期待される。更に、 $^{99\text{m}}\text{Tc}-(\text{BHam-Fab})_2$



の場合、非標識抗体が存在していないため、腫瘍集積は直接血中放射活性の減少に結びつく。こうした体内動態から、今後、抗腫瘍抗体を用いたインビボでの腫瘍集積につい

て詳細に検討する予定である。

なお、 $[^{125}\text{I}]\text{SIB-F}(\text{ab}')_2$ は投与早期に高い腎臓への集積を示したが、その後の腎臓からの消失速度は極めて速やかであった。また、腎臓からの速やかな消失は、投与24時間後に尿中へ排泄された放射活性が極めて高いこととも一致する。今回の研究では代謝分析を行っていないが、これまでの研究成果を考えると、 $[^{125}\text{I}]\text{SIB-F}(\text{ab}')_2$ は血液中で $[^{125}\text{I}]\text{SIB-Fab}'$ の化学形へと分解され、そのままの化学形で糸球体濾過を受けて腎細胞に取り込まれる。そして、腎細胞のリソソーム代謝で $[^{125}\text{I}]\text{SIB-lysine}$ にまで代謝を受け、本代謝物が速やかに腎細胞から尿中へ排泄されたと考えられる。

【結語】

本研究では、標識に使用した $^{99\text{m}}\text{Tc}$ と同じ比放射能の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識抗体を作製する方法を明らかにした。本標識抗体の放射化学的収率は23%と十分ではなく、今後BHamキレート部位と抗体との結合部位との結合距離を最適化して、収率の向上を図ることが必要である。一方、本研究から、超高比放射能の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識抗体はキャリアの抗体が存在しなくとも肝臓などへ非特異的な集積が増加しないことを明らかにした。非標識抗体が存在する従来の標識抗体とは異なり、超高比放射能の標識抗体では、腫瘍へ集積した割合だけ血液の放射活性が低減する。このことは、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ のような短半減期の放射性核種を用いて、投与短時間に腫瘍を始めとする標的を画像として捉えることが可能であることを示唆する。

5. 主な発表論文等

現在、更なる検討を進めている。結果がまとまり次第、特許申請と論文発表を計画している。

〔産業財産権〕：2価の超高比放射能 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識抗体がより高い放射化学的収率で得られる条件が明らかになり次第、特許申請を行いたいと考えている。現在、そのための実験を進めている。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒野 泰 (ARANO YASUSHI)
千葉大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：90151167

(2) 研究分担者

上原 知也 (UEHARA TOMOYA)
千葉大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号：10323403

(3) 連携研究者

花岡 宏史 (HANAOKA HIROFUMI)
千葉大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：50361390