

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670522

研究課題名(和文) 不安定プラークの特異的イメージング：低分子人工抗体を用いた核医学診断薬の開発

研究課題名(英文) Specific imaging of vulnerable atherosclerotic plaque: development of a novel SPECT probe using low molecular artificial antibody

研究代表者

久下 裕司 (KUGE, YUJI)

北海道大学・アイソトープ総合センター・教授

研究者番号：70321958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化の診断においては、“破綻しやすいプラーク”を的確に把握することが重要である。本研究では、プラーク破綻とそれに伴う血栓形成に關与する組織因子(Tissue Factor, TF)を標的とし、血中や非標的組織から速やかに消失する低分子化抗体を母体骨格とする核医学診断剤の創製を目指した。すなわち、TFを認識する抗体より低分子化抗体“TF-Fab”を作製した後、<sup>99m</sup>Tcで標識し、<sup>99m</sup>Tc-TF-Fabを得た。また、<sup>99m</sup>Tc-TF-Fabはマウス血漿中にて安定に存在した。本研究により、<sup>99m</sup>Tc-TF-FabがTF発現に基づく動脈硬化イメージング剤としての特性を有することを示した。

研究成果の概要(英文)：In diagnosis of atherosclerosis, it is necessary for the distinct detection of vulnerable plaque which is needed to be treated as early as possible. In this study, we have planned to develop a novel SPECT imaging probe targeting to tissue factor (TF) which has close relationship to plaque rupture and following thrombus formation. As a basic compound, we chose Fab fragment of anti-TF antibody since Fab has been expected to have rapid clearance from non-targeted tissue especially blood. Therefore, we first developed anti-TF Fab, and then conjugated <sup>99m</sup>Tc via “HYNIC”, a bifunctional chelate to produce <sup>99m</sup>Tc-TF-Fab with its radiopurity not less than 90%. <sup>99m</sup>Tc-TF-Fab showed high stability in mice plasma for 24 hour. From these results, <sup>99m</sup>Tc-TF-Fab would have a property as a SPECT imaging probe for diagnosis of TF expressing atherosclerotic lesion.

研究分野：医歯薬学

キーワード：放射線 核医学診断 人工抗体 不安定プラーク 組織因子

## 1. 研究開始当初の背景

近年、動脈内のプラーク破綻とそれに伴う血栓形成が、心筋梗塞や脳梗塞の発症に深く関与していることが明らかとなってきた。したがって、動脈硬化病変の評価においては、早期治療を必要とする“破綻しやすいプラーク(不安定プラーク)”を的確に診断することが重要である(Circ Res, 2012)。このような背景の下、超音波診断法、MRI、CT等を用いた検討が行われているが、形態的診断が主で、質的診断に有効な方法は限定され、特に病変に発現する生体分子を質的診断する手法は皆無である(Nat Rev Drug Discov, 2004)。一方、ポジトロン断層撮像装置(Positron Emission Tomography; PET)、単光子断層撮像装置(Single Photon Emission Computed Tomography; SPECT)を用いる核医学分子イメージング法は、用いる分子プローブが標的とする生体内機能分子の非侵襲的インビボ画像化が可能であることから、動脈硬化プラークの不安定化に関与する機能分子を標的とする分子プローブを用いることで動脈硬化の質的診断への応用が期待されている。これまでに<sup>18</sup>F-FDGのマクロファージへの集積性や、<sup>99m</sup>Tc-annexin Vのアポトーシス細胞への集積を指標とする動脈内プラークの不安定性評価が試みられている(J Nucl Med, 2008など)。しかし、これらは初期・進行病変への集積も高く、临床上最も切望される“破綻を起こす危険性の高い不安定プラークを特異的に検出することのできる分子プローブ”の開発が望まれている(J Nucl Med, 2010)。

申請者は組織因子(Tissue Factor; TF)が血液凝固カスケードの初期因子として血栓形成に深く関与している(Cardiovasc Res, 2002)ことに着目し、TFイメージングにより“不安定プラーク”を特異的に検出することができると考えた。これまでに動脈硬化モデル動物を用いた検討から、1) TFの発現が不安定なプラークに選択的であること(Biol Pharm Bull, 2008)、2) <sup>99m</sup>Tc標識抗TF抗体(<sup>99m</sup>Tc-TF-mAb)が不安定性病変に高く集積すること(J Nucl Med, 2010)を明らかにしている。しかし、<sup>99m</sup>Tc-TF-mAbは、血液、非標的組織からのクリアランスが遅く、不安定性病変の明瞭な画像化には至っていないことが課題である。

## 2. 研究の目的

動脈内のプラーク破綻とそれに伴う血栓形成に深く関与する組織因子TFを標的とし、血中・非標的組織からの速やかな消失を示す低分子化抗体を母体骨格とした核医学分子イメージング剤を創製することにより、投与後早期に不安定プラークの特異的なイメージングを達成することを目指した。

具体的には母体骨格となる低分子化抗体として、抗TF抗体のTF認識部位であるFabを選択し、<sup>99m</sup>Tc標識抗TF-Fabの作製および本プローブの評価系の構築を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 母体骨格となるTF標的低分子化抗体のTF認識能評価系の構築

### TF recombinant Proteinの作製

His tag融合TF recombinant Protein発現ベクターを大腸菌(BL21(DE3)pLysS)に加え、42、45秒間ヒートショック反応を行った。さらにSOC培地を加え、37、1時間インキュベートした後、LB-カナマイシン クロラムフェニコール寒天培地に塗布し、37、一晚インキュベートした。寒天培地上に形成したコロニーをピッキングし、LB-カナマイシン クロラムフェニコール培地に加え、37、一晚インキュベートした後、Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosideを加え、37、3時間インキュベートした。得られた培地を遠心し、上清を除去した後、リン酸バッファーに再懸濁し、超音波処理した。超音波処理した懸濁液を遠心分離し、上清を除去した後、破砕バッファー(0.2% TritonX-100、10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1 mM EDTA-Na pH7.0)に再懸濁し、室温30分間攪拌した。再度遠心分離し、沈殿画分を超純水で洗浄した後、溶解バッファー(8 M urea、20 mM PB、500 mM NaCl、pH7.8)を加え、37、1時間インキュベートして溶解した後、アフィニティークロマトグラフィー(His-tag精製用カラム)にてTF recombinant Proteinを精製した。

表面プラズモン共鳴法によるTF認識能評価系の構築

得られたTF recombinant Proteinを10 mM酢酸バッファー(pH4.0、4.5、5.0、5.5)に溶解し、表面プラズモン共鳴測定機(Biacore X100)を用いて測定用チップ(CM5)への固定化について検討した。

### in vitro細胞アッセイ系の構築

MDA-MB-231細胞およびMCF-7細胞(いずれもヒト乳がん細胞)をRIPA buffer(1% Protease Inhibitor含有)に懸濁し、4、15分インキュベートした後、遠心分離して沈殿物を除去し、細胞溶解液を得た。得られた細胞溶解液をLaemmli Bufferと混合した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した(ゲル濃度:5-20%)。電気泳動したポリアクリルアミドゲルよりPVDF膜に転写し、ブロッキング、一次抗体(抗TF抗体ならびに抗b-actin抗体)および一次抗体に対応するHRP標識二次抗体との反応に供した後、HRP用化学発光基質を添加し、HRP陽性領域を発色させた。

(2) TFイメージング剤の母体骨格となる抗

## TF - Fab の作製

まず Fab の作製条件を評価するため、ポリクローナル IgG および Immobilized Papain を digestion buffer (0.02 M EDTA, 0.02 M cysteine in PBS) に溶解し、37、1-24 時間インキュベートした。反応液を遠心分離し、沈殿した Immobilized Papain を除去した後、上清を SDS-PAGE に供した。また、抗 TF 抗体および Immobilized Papain を digestion buffer に溶解し、37、2 時間インキュベートした。反応液を遠心分離し、沈殿した Immobilized Papain を除去した後、上清をアフィニティークロマトグラフィー (Protein A 結合カラム) にて精製した。

### (3) TF イメージング剤<sup>99m</sup>Tc-TF-Fab の作製

Abrams らの報告 (J Nucl Med, 1990) に従い二官能性キレートである 6-Hydrazinopyridine-3-carboxylic acid (HYNIC) のカルボキシル基に縮合剤を結合した HYNIC-NHS を合成した。次に (2) にて得られた抗 TF-Fab に HYNIC-NHS を 10 当量添加し、37、2 時間攪拌した。反応液は限外ろ過法 (Cut-off: 10 kDa) により高分子画分を精製し、HYNIC 導入抗 TF-Fab (HYNIC-TF-Fab) を得た。得られた HYNIC-TF-Fab に <sup>99m</sup>Tc(tricine)<sub>2</sub> を加え、37、1 時間攪拌した。反応液をサイズ排除カラムに供し、<sup>99m</sup>Tc-TF-Fab を得た (図 1)。得られた <sup>99m</sup>Tc-TF-Fab の放射化学的純度はサイズ排除クロマトグラフィー法により求めた。また、<sup>99m</sup>Tc-TF-Fab のマウス血漿中における化学的安定性について、<sup>99m</sup>Tc-TF-Fab を C57BL/6J (35 週齢) 血漿に添加し、37 にて添加 24 時間後までインキュベートし、経時的に上記と同様の方法で放射化学的純度を測定した。

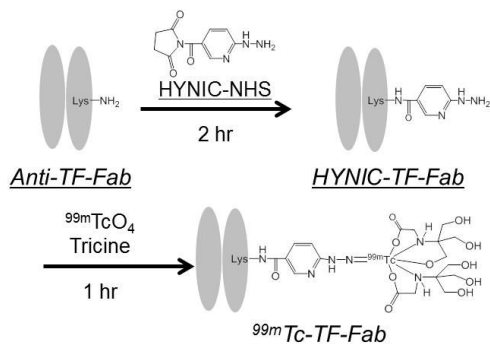


図 1. <sup>99m</sup>Tc-TF-Fab 合成スキーム。

## 4. 研究成果

(1) 母体骨格となる TF 標的的低分子化抗体の TF 認識能評価系の構築

### TF recombinant Protein の作製

SDS-PAGE により大腸菌に発現させた TF recombinant Protein を His-Tag 法により精製したことを確認した (図 2)。また本条件にて TF recombinant Protein を 271 μg 得ることに成功した。

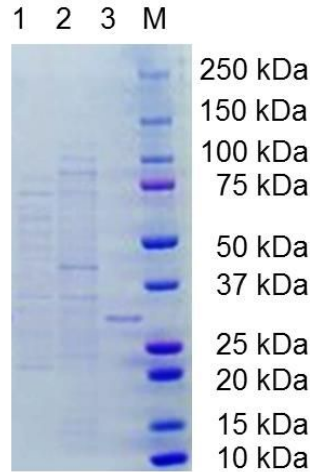


図 2. SDS-PAGE による TF recombinant Protein の精製確認。1: 精製前、2: 不純物画分、3: 精製画分、M: 分子量マーカー

### 表面プラズモン共鳴法による TF 認識能評価系の構築

各 pH の酢酸バッファーに溶解した TF recombinant Protein の CM5 チップへの固定化について評価したところ、pH 5.0 以下において十分固定化されることを見出した (図 3)。以上の結果より TF recombinant Protein の固定化におけるバッファーの pH は pH 5.0 が適していることが示唆された。

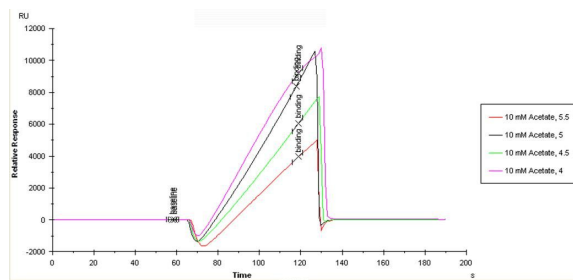


図 3. 表面プラズモン共鳴測定用チップへの TF recombinant Protein 固定化条件検討。

### in vitro 細胞アッセイ系の立ち上げ

MDA-MB-231 細胞では TF の発現が認められたのに対し、MCF-7 では TF の発現はほとんど認められなかった (図 4)。以上の結果より MDA-MB-231 細胞は TF 高発現細胞株、MCF-7 は TF 低発現細胞株として評価に用いられることが示唆された。

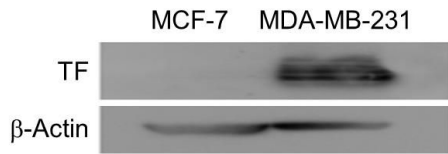


図4 .MDA-MB-231 および MCF-7 における TF 発現に関する Western Blotting 測定。

(2) TF イメージング剤の母体骨格となる抗 TF - Fab の作製

まず、ポリクローナル IgG を用いた Papain による Fab ドメイン切断反応条件検討において、Papain と 2 時間以上反応することで IgG がほぼ切断されることを見出した(図5)。この結果より、IgG と Papain の反応時間は 2 時間が適していると考えられたことから、抗 TF 抗体と Papain との反応時間を 2 時間とした。Papain と反応した抗 TF 抗体溶液を Protein A カラムにて精製したところ、収率 23.2%にて抗 TF-Fab を得た。また、得られた抗 TF-Fab について SDS-PAGE にて分子量を確認したところ、Fab の分子量である 50 kDa 付近にピークを認めたことから、抗 TF-Fab の精製を確認した(図6)。

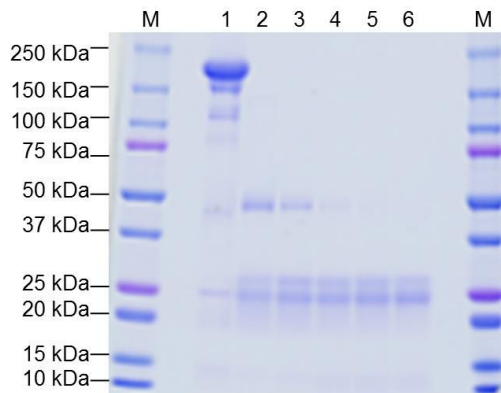


図5 . SDS-PAGE による Papain の IgG 切断反応進行度測定。1:反応前、2: 1 時間反応後、3: 2 時間反応後、4: 4 時間反応後、5: 8 時間反応後、6: 24 時間反応後、M: 分子量マーカー

(3) TF イメージング剤<sup>99m</sup>Tc-TF-Fab の作製

図1の合成経路に従い<sup>99m</sup>Tc-TF-Fab を放射化学的収率 12.1%で得た。また、得られた<sup>99m</sup>Tc-TF-Fab について、サイズ排除 HPLC にて分析したところ、放射化学的純度 98%以上にて得た(図7)。

また、<sup>99m</sup>Tc-TF-Fab のマウス血漿中における安定性については、血漿において 24 時間後まで放射化学的純度 90%以上で存在することを確認した(図8)。

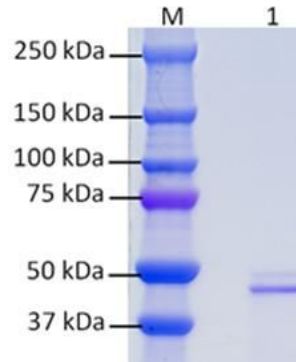


図6 SDS-PAGE による抗 TF-Fab 精製確認。1: 抗 TF-Fab 精製画分(抗 TF-Fab:50 kDa)、M: 分子量マーカー

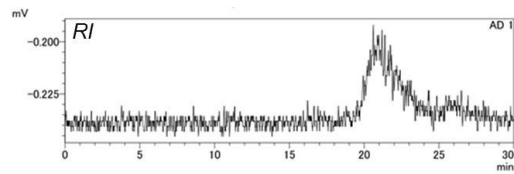


図7 .サイズ排除クロマトグラフィーによる<sup>99m</sup>Tc-TF-Fab の純度確認。

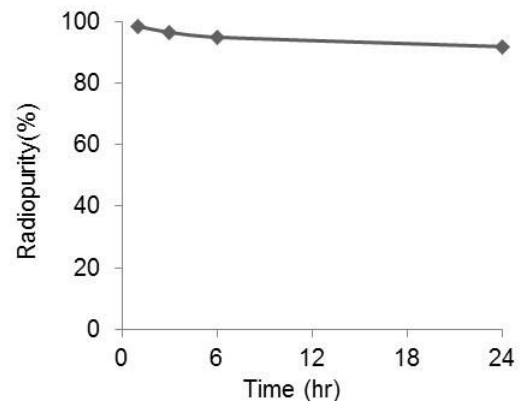


図8 . マウス血漿中における<sup>99m</sup>Tc-TF-Fab の放射化学的純度の経時的変化の確認。

以上の結果から、本研究では TF を標的とした核医学分子イメージング剤<sup>99m</sup>Tc-TF-Fab を創製する共に、本薬剤の評価系の確立したことから、TF を標的とした低分子化核医学分子イメージング剤の開発のための基盤構築が出来たものと考えられる。

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0件)  
なし

〔学会発表〕(計0件)

なし

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hokudai.ac.jp/radiois/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久下 裕司 (KUGE, Yuji)

北海道大学・アイソトープ総合センター・  
教授

研究者番号：70321958

### (2) 研究分担者

志水 陽一 (SHIMIZU, Yoichi)

北海道大学・アイソトープ総合センター・  
助教

研究者番号：90634212

趙 松吉 (Zhao, Songji)

北海道大学・大学院医学研究科・特任教授

研究者番号：80374239

### (3) 連携研究者

なし