

低分子抗体やペプチドを用いるがんのイメージングと治療：腎臓負担軽く



荒野 泰

Arano Yasushi

(千葉大学大学院薬学研究院)

1 RI 標識抗体やペプチドによるがん診断と治療

1906 年に Paul Ehrlich により提唱された “Magic Bullet” の概念は ^{90}Y 標識抗 CD20 抗体によるリンパ腫の治療により具現化され、抗体を運搬体を利用して特異的にがん細胞へ細胞殺傷性アイソトープを送達する、がん治療の有効性が明らかとなった。また、診断用放射性核種で標識した抗体やペプチドを投与してがんへの集積性や体内動態を画像から評価した後、治療用放射性核種で同じ抗体やペプチドを標識して、がんの治療を行う radiotheranostics が個別化医療の観点からも注目を集めている。

一方、がん全体の 80% を占める固形がんは、不均一な抗原分布やその高い組織内圧力など液性がんとは異なる特性を持ち、抗体が血管壁を透過して標的抗原に結合するまでに多くの障害が存在する¹⁾。これらの障害はがんの成長に伴って増大すること、抗体の組織移行性はその分子サイズの影響を受けることから、Fab, F(ab')₂, single chain(sc) Fv fragments や diabody などの低分子抗体が RI の運搬体に有用である。合成ソマトスタチン誘導体である octreotide などの分子サイズの小さい抗腫瘍ペプチドの利用も進められている。これらの低分子抗体やペプチドは、IgG 抗体に比べて腫瘍組織への速やかな移行と分子サイズに応じた組織内での均一な分布を示し、アイソトープ治療に適した動体特性を有する。血液からも速やかに消失することから、 ^{90}Y 標

識 IgG 抗体で観察される骨髄被ばくの低減にも有用である。しかし、アルブミンよりも分子サイズの小さな RI 標識低分子抗体やペプチドを投与した場合、腎臓に高い放射活性が観察される。これは金属 RI で標識した場合に顕著である。腎臓への集積はアイソトープ治療の大きな障害となることから、集積原因の解明とその対応が長年望まれていた。

2 なぜ腎臓に滞留するのか

図 1 に RI 標識低分子抗体やペプチドが腎臓に長時間放射活性が滞留する機序を示す。糸球体濾過を受けた標識抗体やペプチドは、腎臓近位尿細管から細胞内へ取り込まれて、リソソーム代謝を受ける。

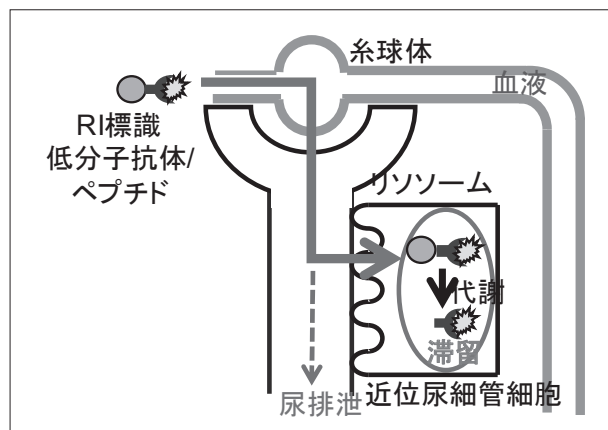


図 1 RI 標識低分子抗体、ペプチドの投与で観察される腎臓の放射活性滞留機序

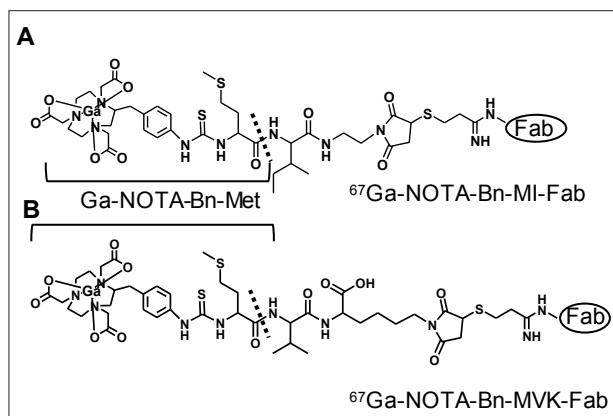


図2 臓リソソーム代謝 (A) 及び腎刷子縁膜酵素の作用 (B) で ^{67}Ga -NOTA-Bn-Met を遊離する ^{67}Ga 標識 Fab

その結果生成した最終放射性代謝物が腎臓に滞留することが、腎臓に放射活性が長時間存在する原因である。筆者らは、①リソソーム代謝で生成する放射性代謝物として、リソソームから細胞質、そして尿細管へと排泄される化合物が選択的に生成する標識薬剤の設計、②総電荷の修飾による RI 標識ペプチド自身の腎臓への取込み低減、③腎臓近位尿細管刷子縁膜に存在する酵素を利用した標識抗体から尿排泄性の高い放射性化合物の遊離、3つの方法から、その低減効果を検討してきた。

3 腎臓リソソーム代謝を基盤とする薬剤設計

筆者らは最初、 ^{131}I ヨード馬尿酸と抗体 Fab フラグメントとをエステル結合を介して結合した ^{131}I 標識 Fab を作製した。本標識抗体は、従来の方法で作製した標識抗体に比べて腎臓の放射活性を有意に低減した²⁾。しかし、エステル結合は血液中で化学的及び酵素による加水分解を受けて開裂する。また、標識母体の抗体を IgG から Fab へ変換するとエステル結合の開裂が亢進する。これらの理由から、血液中で安定であり、かつリソソーム代謝で目的とする放射性代謝物を遊離するスパーサを有する標識薬剤の設計が必要と考えた。

Wu らは ^{67}Ga -NOTA-Bn-SCN をリジンεアミノ基及び N 末 Met に結合した ^{67}Ga 標識 scFv の腎代謝を検討した。そして、リソソーム代謝で ^{67}Ga -NOTA-Bn-Lys と ^{67}Ga -NOTA-Bn-Met が最終放射性代謝物として生成すること、前者はリソソーム内に滞留するが、後者はリソソームから消失して尿排泄されことを認

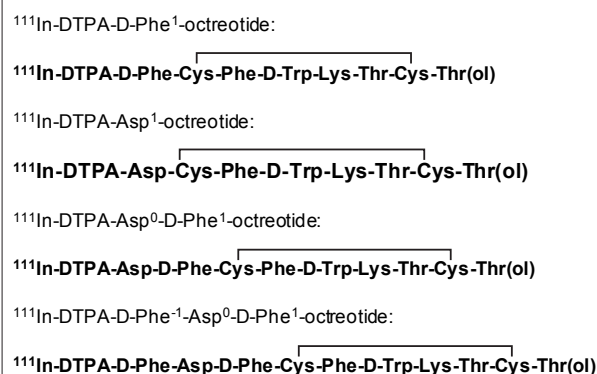


図3 ^{111}In -DTPA-octreotide 誘導体の構造

めた³⁾。本抗体では N 末 Met は Ile と結合していることから、リソソーム代謝で ^{67}Ga -NOTA-Bn-Met と Ile との結合が開裂することを示す。そこで腎リソソーム代謝で ^{67}Ga -NOTA-Bn-Met を生成するよう ^{67}Ga -NOTA-Bn-Met-Ile 配列を抗体に結合した (図 2A)。本標識抗体は腎臓の放射活性を投与 1 時間後から有意に低減した。尿中には ^{67}Ga -NOTA-Bn-Met が主たる低分子代謝物として検出され、所期の機序で腎臓の放射活性を低減したことが示された。しかし、後述の ^{131}I HML 標識 Fab に比べると腎臓の放射活性が低減するまでに時間を要したことから、より早期に腎臓の放射活性を低減する薬剤が必要とされた⁴⁾。

4 抗体やペプチドの腎細胞取り込みの制御

^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide の腎取込みは塩基性アミノ酸で一時的に抑制されることから、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide に負電荷を導入して正電荷を有する腎臓刷子縁膜との静電的相互作用を低減することで腎細胞への取込みが低減すると考えた (図 3)。Octreotide の N 末 D-Phe を L-Asp に置換した ^{111}In -DTPA-Asp¹-octreotide⁵⁾、あるいは octreotide の N 末 D-Phe と ^{111}In -DTPA の間に Asp を導入して負電荷を導入した ^{111}In -Asp⁰-D-Phe¹-octreotide が、腎臓への取込みを低減することを認めた⁶⁾。更に、 ^{111}In -Asp⁰-D-Phe¹-octreotide の DTPA の隣に D-Phe を導入した ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-Asp⁰-D-Phe¹-octreotide は、 ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide に比べて腎集積を低減するだけでなく、ソマトスタチン産生腫瘍細胞への集積を向上した⁷⁾。本成果は、RI 標識塩基性低分子ペプ

チドの腎集積の低減に対して新たな指針を与える。現在、 ^{111}In , ^{90}Y , ^{177}Lu と生体内で安定な錯体を形成する DOTA を導入した octreotide が臨床使用されているが、本研究成果を DOTA へ展開することで、ソマトスタチン産生腫瘍の画像診断、アイソトープ治療に対して、従来よりも遙かに安全で有効な薬剤の創製に繋がると考えている。

5 腎刷子縁膜酵素を利用した腎集積の低減

グルタチオンは、糸球体濾過を受けて腎細胞に取り込まれる際の刷子縁膜酵素との僅かな接触時間でグルタミン酸を遊離する。これを低分子抗体へ応用できれば、投与早期（低分子抗体が腎細胞内へ取り込まれる間）に抗体から尿排泄性の放射性化合物が遊離され、腎放射活性が大きく低減すると考えた。そこで、尿排泄性が高く、生体内で安定なメタヨード馬尿酸が腎刷子縁膜酵素により抗体フラグメントから遊離する薬剤、HML を考案、合成した。 ^{131}I HML 標識 Fab は投与極めて早期から腎臓の放射活性を大きく低減し、尿中にはヨード馬尿酸が代謝物として排泄された（図 4）⁸⁾。更に、HML の薬剤設計に基づき、有機レニウム錯体 CpTR-COOH に Gly-Lys 配列を導入した ^{188}Re CpTR-GK-Fab（図 4）も、投与早期から腎臓の放射活性をヨード標識抗体と同程度に低減した⁹⁾。

本薬剤設計を $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識抗体へと展開する目的で、馬尿酸や CpTR-Gly と構造の類似した $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IPG-G を Gly-Lys 配列や Gly-Tyr 配列を介して抗体に導入した。しかし、いずれのジペプチド結合とも刷子縁膜酵素による認識を受けなかった。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IPG-G へのスペーサの導入部位を変換しても認識は改善されず、酵素認識に及ばず嵩高い $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 錯体の影響が予想以上に大きいことが判明した。筆者自身、本薬剤設計はヨード馬尿酸や CpTR-Gly などの一部の化合物にのみ適応可能な方法ではないかと諦め気味であった。しかし、当時の大学院学生の精力的な実験から、従来のジペプチドから Gly-Phe-Lys (GFK) トリペプチド配列を酵素認識配列とすることにより、Gly-Phe の結合が開裂して目的とする $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IPG-G を遊離することが可能となった。GFK 配列を介して $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IPG を抗体 Fab フラグメントに結合した場合（図 4）、腫瘍への集積を損なうことなく投与早期から腎臓の

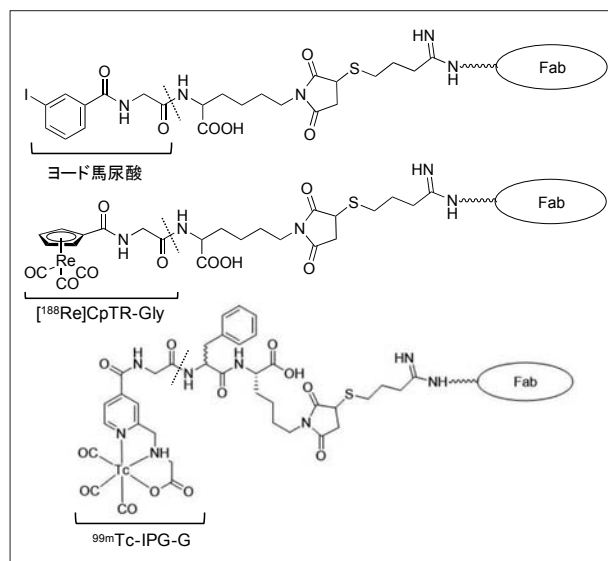


図 4 腎臓刷子縁膜酵素の作用で、 ^{131}I ヨード馬尿酸 (top), ^{188}Re CpTR-Gly (middle), $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IPG-G (bottom) を標識母体の Fab から遊離して、投与早期から腎臓の放射活性を低減する RI 標識 Fab

放射活性を大きく低減することが達成できた。

本成果に勇気づけられ、本薬剤設計を $^{67/68}\text{Ga}$ へ展開した。前述のように、腎臓リソソーム代謝で生成した ^{67}Ga -NOTA-Bn-Met は、腎リソソームから細胞質を経て尿中へ排泄される。そこで、刷子縁膜酵素の作用で抗体から ^{67}Ga -NOTA-Bn-Met を遊離させる目的で、neutral endopeptidase の基質である Met-Val-Lys 配列を介して ^{67}Ga -NOTA-Bn と抗体とを架橋した ^{67}Ga 標識 Fab を作製した（図 2B）。本 ^{67}Ga 標識抗体も腫瘍の放射活性を損なうことなく投与早期から有意に腎臓の放射活性を低減することを認めた。

刷子縁膜酵素を利用した低分子抗体の腎集積の改善について振り返ってみると、例外的にジペプチド配列を用いた場合でも刷子縁膜酵素の認識を受けた安息香酸や CpTR を選択したお陰で、腎臓刷子縁膜酵素を利用した腎臓の放射活性を低減する方法を提案できたと考えている。そのため、本薬剤設計を $^{99\text{m}}\text{Tc}$ や ^{67}Ga へ展開するのに想定以上の労力と時間を伴う結果となった。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IPG と ^{67}Ga -NOTA-Bn-Met では、その化学構造が大きく異なっているが、両者ともトリペプチド配列を酵素認識配列に用いることで腎集積を投与早期から低減することが可能となった。他の金属 RI へ本薬剤設計を展開するにも、トリペプチド配列以上のペプチド鎖長が有用と考えている。しかし、ペプチド鎖長の増加は、血液中で

ペプチド配列の分解に繋がること、金属錯体構造はペプチド鎖の酵素認識に想像以上の影響を及ぼすことを心に留めた我慢強い検討が必要と言いつた聞かしている。

6 おわりに

低分子抗体及びペプチドの投与で観察される腎臓の放射活性の原因と、その解消を目的として筆者らが進めてきた研究成果を概説した。低分子ペプチドでは腎細胞へ取り込まれない設計、低分子抗体では腎臓近位尿細管刷子縁膜の酵素を利用する設計が有用と考えている。現在、核医学ではアイソトープ治療への応用に注力されており、 ^{90}Y や ^{177}Lu などの β 線放出核種、 ^{211}At や ^{255}Ac などの α 線放出核種を用いた研究が進められている。標識薬剤設計についての基礎的知見は集積したと考えている。 α 線や β 線の治療応用に対する更なる知見を集積することで、近い将来、有効で安全性の高いアイソトープ治療薬剤が本邦から創出されると期待している。

7 謝辞

本稿で記した ^{111}In -DTPA-octreotideの研究は、昭和薬科大学秋澤宏行教授、北海道医療大学大倉一枝教授、大島伸宏助教が、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ や ^{67}Ga 標識抗体フラグメントの腎集積低減は、浜松医科大学鈴木千恵助教、千葉大学上原知也准教授が、中心となって実施された成果を纏めたものである。

引用文献

- 1) Saga, T., *et al.*, Targeting cancer micrometastases with monoclonal antibodies: a binding-site barrier, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **92**, 8999-9003 (1995)
- 2) Arano, Y., *et al.*, Assessment of the radiochemical design of antibodies with a metabolizable linkage for target-selective radioactivity delivery, *Bioconjugate Chem.*, **9**, 497-506 (1998)
- 3) Wu, C., *et al.*, Biodistribution and catabolism of Ga-67-labeled anti-Tac dsFv fragment, *Bioconjugate Chem.*, **8**, 365-9 (1997)
- 4) Uehara, T., *et al.*, $^{67/68}\text{Ga}$ -labeling agent that liberates $^{67/68}\text{Ga}$ -NOTA-methionine by lysosomal proteolysis of parental low molecular weight polypeptides to reduce renal radioactivity levels, *Bioconjugate Chem.*, **25**, 2038-45 (2014)
- 5) Akizawa, H., *et al.*, Effect of molecular charges on renal uptake of ^{111}In -DTPA-conjugated peptides, *Nucl Med Biol.*, **28**, 761-8 (2001)
- 6) Oshima, N., *et al.*, Design, synthesis and biological evaluation of negatively charged ^{111}In -DTPA-octreotide derivatives, *Bioorg Med Chem.*, **22**, 1377-82 (2014)
- 7) Oshima, N., *et al.*, ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-Asp⁰-D-Phe¹-octreotide exhibits higher tumor accumulation and lower renal radioactivity than ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide, *Nucl Med Biol.*, **54**, 18-26 (2017)
- 8) Arano, Y., *et al.*, Chemical design of radiolabeled antibody fragments for low renal radioactivity levels, *Cancer Res.*, **59**, 128-34 (1999)
- 9) Uehara, T., *et al.*, Design, Synthesis, and Evaluation of [^{188}Re]organorhenium-labeled antibody fragments with renal enzyme-cleavable linkage for low renal radioactivity levels, *Bioconjugate Chem.*, **18**, 190-98 (2007)