

腫瘍選択的な放射能送達を目的とする RI 標識抗腫瘍抗体フラグメントの分子設計
—腎刷子縁膜酵素の作用を利用した腎臓への放射能集積の低減—

向 高弘,^{*,a} 藤岡 泰,^b 荒野 泰,^c 佐治英郎^b

**Design of Radiolabeled Antibody Fragments for Tumor-Selective Radioactivity
Localization—Brush Border Enzyme-Sensitive Bond to Decrease
Renal Accumulation of Radioactivity**

Takahiro MUKAI,^{*,a} Yasushi FUJIOKA,^b Yasushi ARANO,^c and Hideo SAJI^b

*Department of Nuclear Medicine and Diagnostic Imaging, Graduate School of Medicine, Kyoto University,^a
54 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan, Department of Patho-Functional
Bioanalysis, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,^b Yoshida
Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan and Department of Molecular
Imaging and Radiotherapy, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Chiba University,^c 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan*

(Received May 21, 2003)

Nonspecific renal radioactivity localization constitutes a problem in targeted imaging and therapy with radiolabeled antibody fragments. Based on the idea that the renal radioactivity levels should be reduced if radiolabeled compounds excreted in the urine are released from antibody fragments by tubular brush border enzymes, 3'-iodohippuryl *N*^ε-maleoyl-L-lysine (HML) was designed as a radioiodination reagent for antibody fragments; the glycyl-lysine sequence in HML is a substrate for a brush border enzyme and *m*-iodohippuric acid is released by cleavage of the linkage. In normal mice, HML-conjugated Fab demonstrated low renal radioactivity levels from early postinjection times. Directly radioiodinated Fab showed migration of radioactivity from the membrane to the lysosomal fraction of the renal cells from 10 to 30 min postinjection. On the other hand, the majority of the radioactivity was detected only in the membrane fraction after injection of HML-conjugated Fab. In tumor-bearing mice, HML-conjugated Fab showed a marked decrease in renal radioactivity localization without impairing the tumor accumulation. These findings indicate that HML is a useful reagent for reducing the renal radioactivity levels of antibody fragments.

Key words—antibody fragment; tumor; kidney; radioiodination reagent; brush border enzyme

1. はじめに

癌の核医学診断、内用放射線治療を目的とする放射性薬剤の開発研究は、現在、精力的に進められている。その方法の1つとして、ラジオアイソトープ (RI) 標識抗腫瘍抗体の利用が挙げられる。本法は、抗原-抗体反応に基づく腫瘍への特異的な放射能送達を可能とし、単クローン抗体の開発を契機に急速に進展した。しかしながら、これらの RI 標識

抗腫瘍抗体においては、血液クリアランス、及び腫瘍組織への移行が遅延すること、腫瘍組織内での分布が不均一であることなどが問題とされてきた。¹⁻³⁾ そこで、腫瘍組織への移行性、組織内分布に優れた抗腫瘍抗体フラグメントの利用が検討され、これまでに、抗体フラグメントのチロシン残基に直接放射性ヨウ素を結合させたものや、二官能性キレート試薬を用いて金属 RI を結合させたものが開発され、一部は臨床応用されるようになっている。⁴⁻⁶⁾ しかし、これらの RI 標識抗体フラグメントを生体に投与した場合、投与早期から長時間に渡る腎臓での非特異的な放射能滞留が認められ、診断や治療の大きな障害となる。最近の研究から、この放射能滞留は腎近位尿細管細胞内に取り込まれた RI 標識抗体フラグメントの代謝により生成する放射性

^{a)}京都大学医学部附属病院核医学科 (〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 54), ^{b)}京都大学大学院薬学研究科病態機能分析学分野 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町), ^{c)}千葉大学大学院薬学研究院分子画像薬品学研究室 (〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町 1-33)
e-mail: tmukai@kuhp.kyoto-u.ac.jp

*本総説は、平成 14 年度日本薬学会近畿支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

代謝物が、リソソームに長時間滞留することに起因することが明らかとされている。^{7,8)} これまでに、この解消を目的に様々な試みがなされてきたが、未だ有効な方法は得られていない。一方、腎臓におけるペプチドの代謝研究から、ある種の低分子ペプチドは、糸球体ろ過を受けて細胞内に取り込まれる課程で、近位尿細管細胞の管腔側に存在する刷子縁膜酵素によりアミノ酸にまで分解されることが報告されている。^{9,10)} そこで我々は、核医学診断、及び治療にそれぞれ有効な核種を有する放射性ヨウ素を標識 RI として用い、腎近位尿細管細胞へ取り込まれる前に刷子縁膜酵素によって尿排泄性の放射性化合物を速やかに遊離させることにより、腎臓への非特異的な放射能集積を低減することのできる RI 標識抗体フラグメントの開発を計画した。

2. 腎刷子縁膜酵素により解裂する放射性ヨウ素標識試薬

刷子縁膜酵素により遊離する放射性化合物としては、尿細管において再吸収されることなく、速やかに尿排泄されることが必要であり、また放射性ヨウ素を安定に結合するためのベンゼン環を有することが望ましい。そこで馬尿酸の高い尿排泄性に着目し、本化合物に放射性ヨウ素を導入したヨード馬尿酸を放射性代謝物として遊離させることを計画した。なお、生体内での結合安定性を考慮し、ヨウ素の導入部位は馬尿酸のメタ位とした。¹¹⁾

一方、腎近位尿細管細胞の管腔側には種々の刷子縁膜酵素が存在するが、標的とする酵素としては、ヒトの刷子縁膜に存在すること、その基質が標識試薬の設計に応用可能であることが条件となる。刷子縁膜に存在するペプチダーゼの1つ、カルボキシペプチダーゼ M は、C 末端側から塩基性アミノ酸を認識、切断するエキソペプチダーゼであり、グリシン・リジン配列がその基質となること、及びヒトの刷子縁膜においても高い活性を有することが知られている。¹²⁻¹⁴⁾ そこで、メタヨード馬尿酸のグリシン残基のカルボキシル基をリジンの α -アミノ基と結合させ、さらに、そのリジン残基の ϵ -アミノ基を抗体フラグメントとの結合に有効なマレイミド基に変換した、放射性ヨウ素標識試薬、3'-iodohippuryl *N*^ε-maleoyl-L-lysine (HML, Fig. 1) を設計した。なお、放射性ヨウ素標識を緩和な条件下で収率よく行うために有機スズ前駆体を合成し、これを用

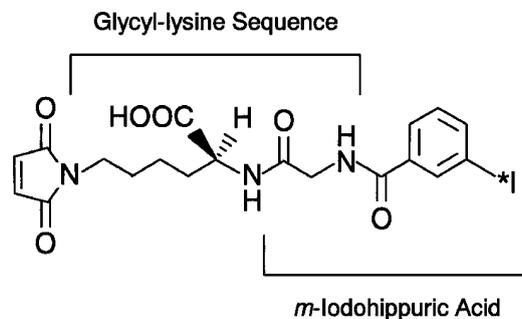


Fig. 1. Chemical Structure of HML

いることにより、高収率で [¹²⁵I/¹³¹I] HML を得ることに成功した。¹⁵⁾ また抗体の Fab フラグメント分子内のジスルフィド結合を還元して生成したチオール基との反応により、放射化学的純度 95% 以上の [¹²⁵I] HML-Fab を得た。

本薬剤設計の有用性を評価するため、マウス体内動態を放射性ヨウ素直接標識体 ([¹²⁵I] Fab) と比較したところ、血液からの放射能消失はほぼ同等であったが、腎臓中の放射能は、[¹²⁵I] HML-Fab の場合、投与初期から大きく低減された (Fig. 2)。また腎臓中の放射能の細胞内分布を検討したところ、[¹²⁵I] Fab の場合、投与後 10 分から 30 分で、放射能が膜画分からリソソーム画分へと移行したのに対し、[¹²⁵I] HML-Fab では、投与後 30 分でも膜画分のみ放射能が存在した (Fig. 3)。さらに、尿中へ排泄された放射性代謝物に関して分析したところ、その大部分がメタヨード馬尿酸であることが明らかとなった。したがって、[¹²⁵I] HML-Fab は、糸球体ろ過を受けた後、近位尿細管細胞のリソソームに移行する前に、刷子縁膜においてメタヨード馬尿酸を放射性代謝物として速やか、かつ選択的に遊離することで、投与早期から腎臓への放射能集積を大きく低減したと考えられる。

3. HML と Fab フラグメントとの結合様式

我々はこれまでに、代謝性スペーサーを含有する標識試薬をタンパク質と結合する場合、その結合様式によって、代謝性スペーサーの生体内における安定性や酵素による開裂性が変化することを明らかとしてきた。^{16,17)} そこで、HML と Fab フラグメントとの有用な結合様式について検討する目的で、Fab を 2-イミノチオランとの反応によりチオール化した後、HML を結合した HML-IT-Fab を作製し、

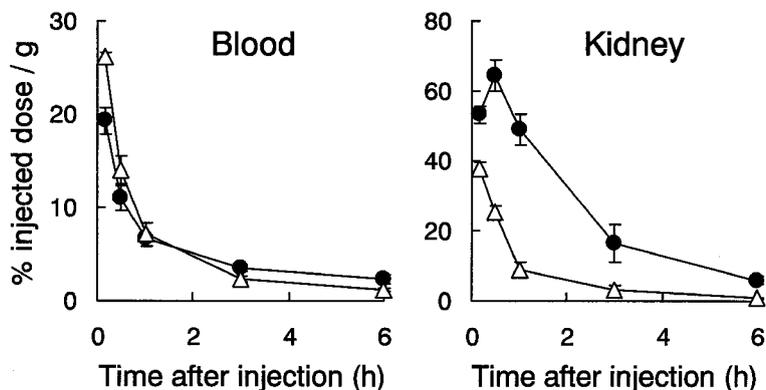


Fig. 2. Biodistribution of Radioactivity after Injection of $[^{125}\text{I}]$ HML-Fab (Δ) and $[^{125}\text{I}]$ Fab (\bullet) in Mice

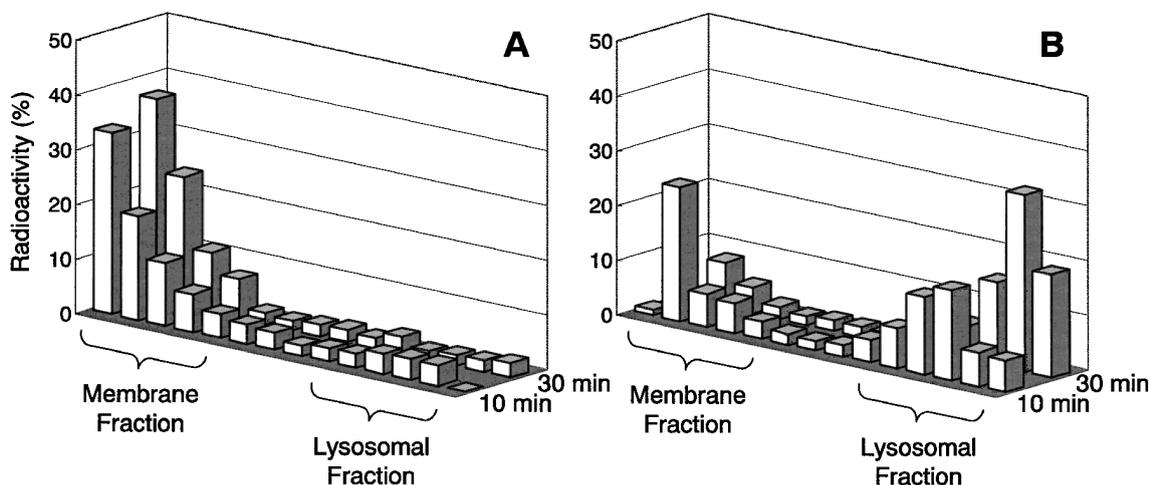


Fig. 3. Subcellular Distribution of Radioactivity in the Kidney at 10 and 30 min after Injection of $[^{125}\text{I}]$ HML-Fab (A) and $[^{125}\text{I}]$ Fab (B) in Mice

Percoll density gradients were collected in 14 fractions and assayed for lysosomal enzyme (β -galactosidase) and plasma membrane enzyme (alkaline phosphodiesterase I).

その体内動態を HML-Fab と比較検討した (Fig. 4). まず、ヒト血清中で、 $[^{131}\text{I}]$ HML-IT-Fab 及び $[^{131}\text{I}]$ HML-Fab をインキュベートした結果、いずれの場合も、24 時間後でもほとんど分解が認められず、両者のグリシン・リジン結合は、血清中で安定であることが示された。一方、 $[^{131}\text{I}]$ HML-IT-Fab と $[^{125}\text{I}]$ HML-Fab とをマウスに投与し、腎臓への放射能集積量を比較すると、投与 10, 30 分後で、 $[^{131}\text{I}]$ HML-IT-Fab の方が有意に低い値を示した (Fig. 5). これらの相違が生じた原因を検討するため、それぞれの時間における腎臓中での放射性代謝物を分析した。その結果、HML-IT-Fab を投与した場合には、腎臓において未変化体とメタヨード馬尿酸のみが検出されたのに対して、HML-Fab では、複数の放射性化合物が観察された (Fig. 6). 前

述したように、 $[^{125}\text{I}]$ HML-Fab 投与後、尿中に排泄された放射能はほとんどがメタヨード馬尿酸であったことから、腎臓において認められる複数の放射性代謝物は、 $[^{125}\text{I}]$ HML を分子内に含む中間代謝物であることが示唆される。すなわち、Fab 分子内のチオール基へ HML を結合した場合には、HML が Fab 分子による立体障害を受けやすい位置に結合しているため、選択的にメタヨード馬尿酸が遊離する経路以外に、Fab 分子内の他のペプチド結合が開裂し、HML を含むフラグメントに代謝された後、メタヨード馬尿酸を遊離するという段階的な経路が存在すると思われる。これに対し、2-イミノチオランを介して HML を導入した場合には、HML が立体障害を受けにくい位置に結合しているため、より選択的にメタヨード馬尿酸を遊離するこ

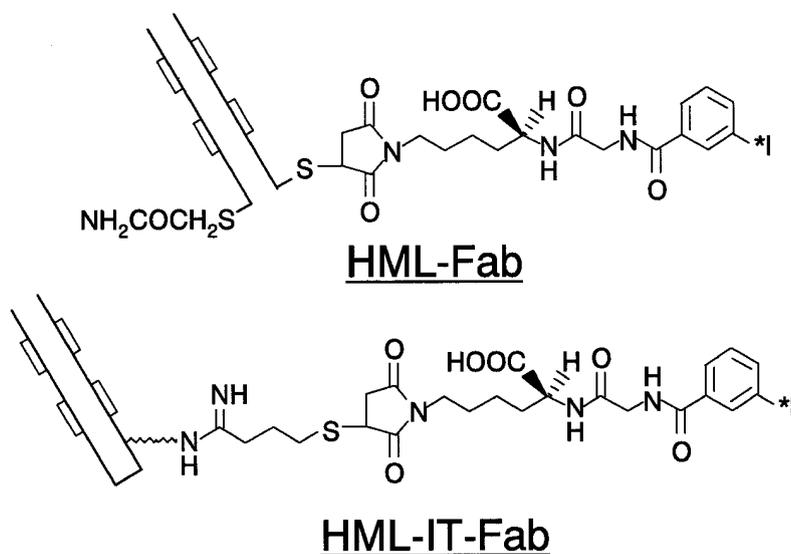


Fig. 4. Chemical Structures of HML-Fab and HML-IT-Fab

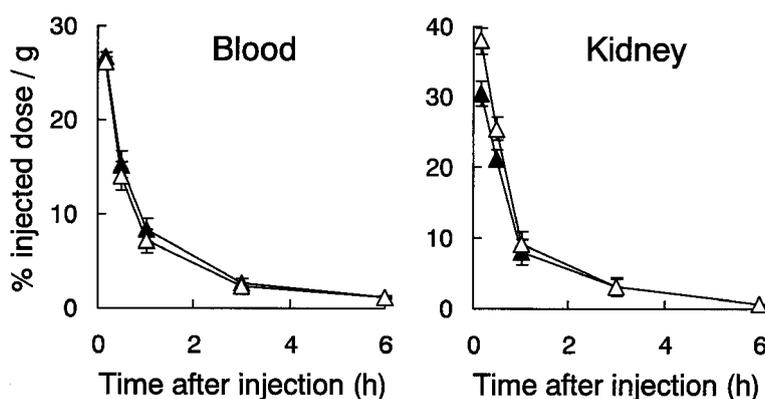


Fig. 5. Biodistribution of Radioactivity after Injection of [^{131}I]HML-IT-Fab (▲) and [^{125}I]HML-Fab (△) in Mice

とが示唆される。したがって、投与早期に観察された腎臓への放射能集積値の差は、両者の刷子縁膜酵素によるグリシン・リジン配列の認識性の相違が反映されたものと考察される。¹⁸⁾

以上の結果から、HML-IT-Fabの方が腎臓での放射能集積を低減するにはより有効であることが示されたことから、ヒト骨肉腫細胞KT005に対する単クローン抗体(OST7, IgG₁)のFabフラグメントを用いてHML-IT-Fabを作製し、骨肉腫腫瘍移植ヌードマウスにおける体内放射能動態を検討し、核医学診断、治療薬剤としての有用性を評価した。まず、 ^{125}I HML-IT-FabのKT005細胞との結合性を検討したところ、 ^{125}I Fabとほぼ同程度であったことから、HMLの導入によっても抗体活性は損

なわれていないことが示された。さらに、腫瘍移植ヌードマウスを用いた検討において、 ^{131}I HML-IT-Fabは腫瘍への放射能集積を損なうことなく、腎臓の放射能を低減し(Table 1)、その結果、腫瘍と腎臓との放射能集積比を大きく向上した。今回用いたOST7を含めて、これまでに開発されてきた固形腫瘍に対する単クローン抗体の多くは、細胞内へ取り込まれずに細胞表面に結合したままで存在することが知られている。したがって、放射性ヨウ素標識HML結合Fabフラグメントは、標的組織である腫瘍においては抗原-抗体反応に基づいて、腫瘍細胞の表面に結合したまま放射能が保持されるのに対して、非標的組織である腎臓においては、細胞内に取り込まれる前に刷子縁膜酵素によりHMLの

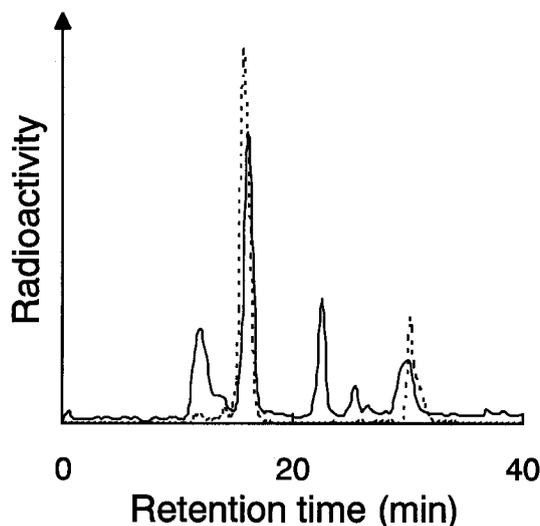


Fig. 6. Size-Exclusion HPLC Profiles of Kidney Homogenates at 10 Min Postinjection of [¹²⁵I]HML-IT-Fab (Dotted Line) and [¹²⁵I]HML-Fab (Solid Line) in Mice

Under these conditions, Fab (50 kDa), cytochrome C (13 kDa), aprotinin (6 kDa) and *m*-iodohippuric acid (305 Da) had retention times of 16, 21, 28.5 and 31 min, respectively.

Table 1. Biodistribution of Radioactivity after Injection of [¹³¹I]HML-IT-Fab and [¹²⁵I]Fab in Nude Mice Bearing Osteogenic Sarcoma

	[¹³¹ I]HML-IT-Fab	[¹²⁵ I]Fab
Blood	3.38 ± 0.33	3.61 ± 0.48
Kidney	2.08 ± 0.25*	9.57 ± 2.76
Tumor	10.30 ± 1.77	11.06 ± 1.65

Tissue radioactivity is expressed as % injected dose per gram. Each value represents mean ± S.D. for six animals at 3 h postinjection. *Significant differences from [¹²⁵I]Fab ($p < 0.005$).

グリシン・リジン間のペプチド結合が開裂し、メタヨード馬尿酸が遊離、尿排泄され、その結果、腫瘍への選択的な放射能集積を達成したと考えられる。これらの結果から、HMLが核医学診断、治療上有効な放射性ヨウ素標識抗体フラグメントを得るために有用な放射性ヨウ素標識試薬であることが示された。

4. おわりに

近年、腫瘍細胞に親和性を有する生理活性ペプチドを母体とする放射性薬剤の開発研究が盛んに行われているが、RI標識抗体フラグメントと同様に、腎臓への非特異的な放射能集積が大きな問題となっており、標的組織である腫瘍への放射能集積を損なうことなく、腎臓への放射能を低減するための有効

な方法の開発が強く望まれている。これらのペプチドの多くは、固形腫瘍に対する単クローン抗体と異なり、腫瘍細胞内へ内在化され代謝を受ける。そのためHMLを利用した場合、腫瘍細胞におけるリソソーム代謝により放射性代謝物としてメタヨード馬尿酸が生成し、これが尿排泄され、その結果、腎臓だけでなく腫瘍組織からも放射能が消失する可能性がある。この場合は、腫瘍細胞においてはリソソームで代謝された後、細胞内に長時間滞留するが、腎臓においては、刷子縁膜酵素による遊離後、速やかに尿排泄される性質を有する放射性代謝物をペプチドから生成させるようなRI標識ペプチドの分子設計が必要と考えられる。近年、免疫原性の低いヒト型抗体や腫瘍集積性を高めた低分子化抗体の開発が進められており、^{19,20} さらにアンギオテンシンの昇圧作用などの宿主側の生体反応の変化を利用した腫瘍への抗体集積の向上も検討されている。^{21,22} したがって、これらの研究成果との組み合わせにより、放射能の運搬体となるタンパク質、ペプチドが腫瘍細胞に内在化されない場合のみならず、内在化される場合においても従来の方法に比べてはるかに高い画像診断精度の達成と治療効果の増強が期待される。

REFERENCES

- 1) Fujimori K., Covell D. G., Flecher J. E., Weinstein J. N., *Cancer Res.*, **49**, 5656–5663 (1989).
- 2) Clauss M. A., Jain R. K., *Cancer Res.*, **50**, 3487–3492 (1990).
- 3) Yokota T., Milenic D. E., Whitlow M., Schlom J., *Cancer Res.*, **52**, 3402–3408 (1992).
- 4) Buijs W. C. A. M., Massuger L. F. A. G., Claessens R. A. M. J., Kenemans P., Corstens F. H. M., *J. Nucl. Med.*, **33**, 1113–1120 (1992).
- 5) Baum R. P., Niesen A., Hertel A., Adams S., Kojouharoff G., Goldenberg D. M., Hor G., *Cancer*, **73**, 896–899 (1994).
- 6) Behr T. M., Becker W. S., Bair H. J., Klein M. W., Stuhler C. M., Cidlinsky K. P., Wittekind C. W., Scheele J. R., Wolf F. G., *J. Nucl. Med.*, **36**, 430–441 (1995).
- 7) Rogers B. E., Franano F. N., Duncan J. R., Edwards W. B., Anderson C. J., Connett J.

- M., Welch M. J., *Cancer Res.*, **55**, S5714–S5720 (1995).
- 8) Wu C., Jagoda E., Brechbiel M., Webber K. O., Pastan I., Gansow O., Eckelman W. C., *Bioconjugate Chem.*, **8**, 365–369 (1997).
- 9) Kenny A. J., Maroux S., *Physiol. Rev.*, **62**, 91–128 (1982).
- 10) Silbernagl S., *Physiol. Rev.*, **68**, 811–1007 (1988).
- 11) Garg P. K., Slade S. K., Harrison C. L., Zalutsky M. R., *Nucl. Med. Biol.*, **16**, 669–673 (1989).
- 12) Skidgel R. A., *Trends Pharmacol. Sci.*, **91**, 299–304 (1988).
- 13) Skidgel R. A., Davis R. M., Tan F., *J. Biol. Chem.*, **264**, 2236–2241 (1989).
- 14) Skidgel R. A., Erdös E. G., *Immunol. Rev.*, **161**, 129–141 (1998).
- 15) Arano Y., Fujioka Y., Akizawa H., Ono M., Uehara T., Wakisaka K., Nakayama M., Sakahara H., Konishi J., Saji H., *Cancer Res.*, **59**, 128–134 (1999).
- 16) Arano Y., Inoue T., Mukai T., Wakisaka K., Sakahara H., Konishi J., Yokoyama A., *J. Nucl. Med.*, **35**, 326–333 (1994).
- 17) Arano Y., Wakisaka K., Mukai T., Uezono T., Motonari H., Akizawa H., Kairiyama C., Ohmomo Y., Tanaka C., Ishiyama M., Sakahara H., Konishi J., Yokoyama A., *Nucl. Med. Biol.*, **23**, 129–136 (1996).
- 18) Fujioka Y., Arano Y., Ono M., Uehara T., Ogawa K., Namba S., Saga T., Nakamoto Y., Mukai T., Konishi J., Saji H., *Bioconjugate Chem.*, **12**, 178–185 (2001).
- 19) Adams G. P., Schier R., Marshall K., Wolf E. J., McCall A. M., Marks J. D., Weiner L. M., *Cancer Res.*, **58**, 485–490 (1998).
- 20) Bera T. K., Viner J., Brinkmann E., Pastan I., *Cancer Res.*, **59**, 4018–4022 (1999).
- 21) Kinuya S., Yokoyama K., Konishi S., Tonami N., Hisada K., *Nucl. Med. Biol.*, **23**, 137–140 (1996).
- 22) Grenier J. W., Ullmann C. D., Nieroda C., Qi C. F., Eggensperger D., Shimada S., Steinberg S. M., Schlom J., *Cancer Res.*, **53**, 600–608 (1996).