

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム セットアップスキーム (ACT-MS)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) EPRによる抗体イメージング法の開発
(英語) Development of antibody imaging method by EPR

研究開発実施期間：2017年10月1日～2019年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 井上 豪
(英語) Tsuyoshi Inoue

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 大阪大学・大学院薬学研究科・教授
(英語) Osaka University, Graduate School of Pharmaceutical Science, Osaka University, Professor

II 研究開発の概要

本研究課題では、抗体を癌部位に予め集積させた後、電子スピン共鳴 (EPR; Electron Paramagnetic Resonance) 法で検出可能な化合物を低濃度で、かつ、短時間に、癌部位に送達し、癌をイメージングする技術の開発を行うことを目的としている。これまでのイメージングには、①ラジオアイソトープや、②蛍光等のラベル化合物が用いられてきたが、それぞれ、①内部被曝や、②感度の問題があり、患者の QOL や、診断のタイミングや設備、疾患の種類等に制限があるなど、様々な問題が存在した。そこで、非放射線・高感度な検出法として EPR 法を選択し、実際に生体内で高感度かつ簡便に、疾患組織のイメージングに応用できるかを検証した。

生体内には EPR で検出可能な活性酸素種やヘムなど、不対電子による常磁性を示す化合物が存在するが、山本らは、水中で安定な窒素ラジカルカチオン種の創製に成功し、酸素やヘム鉄とは異なる位置に EPR シグナルを示すことを実証した。

一方、我々は世界初でプレターゲット抗体イメージング法の開発に成功していた。すなわち、大腸癌を認識する小分子化抗体 (scFv) に、天然型ビオチンに感受性がなく、非天然型ビオチンであるビスイミノビオチン (BisIMN) にのみ高い親和性を示す改変型ストレプトアビジン (

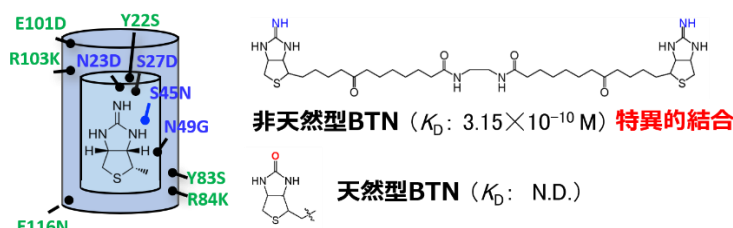


図1. 改変型ストレプトアビジン(MTSA)の構造とこれに特異性をもつ非天然型のビオチン(BTN)であるビスイミノビオチン(BisIMN)の構造

MTSA) を連結させ、先に投与して癌部位に集積させた後、⁶⁴Cu (半減期 12 時間) でラベル化した BisIMN を投与することによって、短時間 (化合物の投与後 12 時間) で癌の PET 法診断が可能であることを実証した。

一般に、抗体の集積には 1~2 日の時間を要し、¹¹¹In (半減期 2.8 日) などを conjugate した抗体が使用されてきたが、本手法では半減期の短い化合物が使用可能で、放射線被曝の低減や投与量の抑制には繋がるものの、ゼロにはならず、放射性化合物の投与直前の調製という時間的問題、使用場所の問題などが存在し、簡便に受診できる技術ではない。

抗体と窒素ラジカルカチオン誘導体を 2 段階に分けて投与し、EPR で検出できる手法が確立できれば、放射線被曝のない、かつ、時間や場所に制限を受けない、画期的なイメージング技術となるだけでなく、抗体開発の初期段階において動物実験を行う際にも特殊なアイソトープの調製を不要とすることから研究のハードルを下げる新たな技術としても期待でき、本技術を開発する意義は大きい。そこで本研究では、プレターゲット抗体イメージングに用いる化合物を、PET から EPR 法で検出可能な物質に置き換えることによって、放射線被曝の問題を解決した新たなイメージング技術の開発を目指し、窒素原子によるラジカルカチオン種を短時間で標的細胞に集積できるか、転移癌を鋭敏に捉える技術になるかを見極める第 1 歩として実証研究に取り組んだ (図 2)。

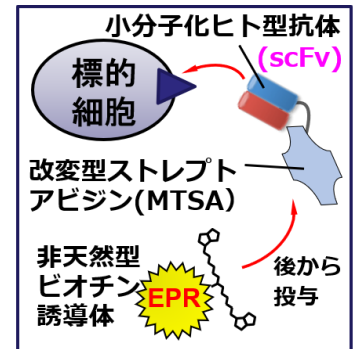


図 2. EPR による抗体イメージング技術の概念図

EPR のプローブの合成については下図のように当初予定していた超原子価窒素化合物を合成し、ビスイミノビオチンとの連結体を合成したものの、血中という還元剤の存在下における安定性が低いことが後ほど判明した。そこで、窒素ラジカル種である 3CP (図 3) をビスイミノビオチンに連結した誘導体を別途合成し、これに成功した。

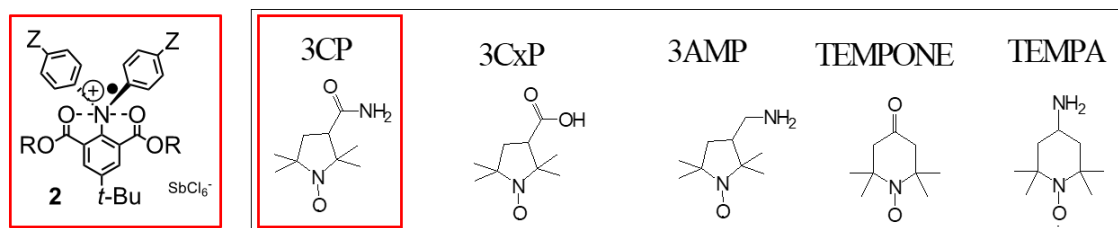
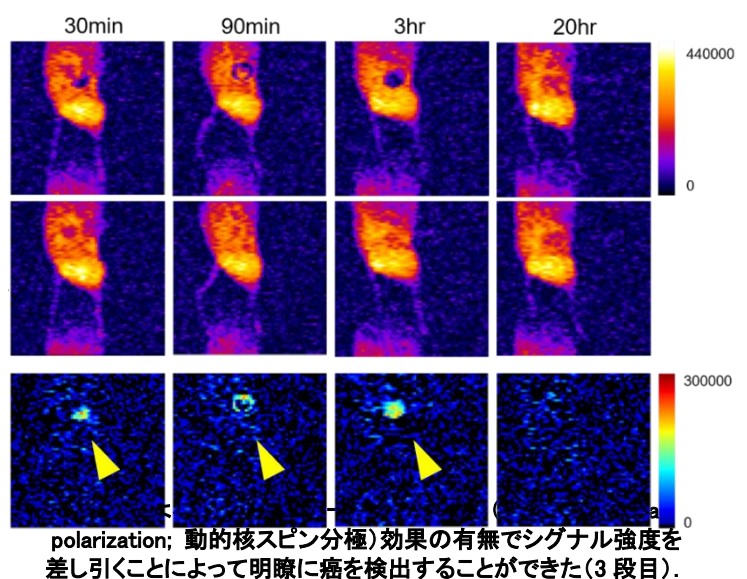


図 3. EPR による抗体イメージング技術に用いた窒素ラジカル活性種の構造式

大腸癌に特異的な標的タンパク質を特異的に認識する小分子化抗体に連結した改変型ストレプトアビジン (MTSA) を担癌マウスに静脈注射し、2 日間プレターゲット法によって集積させた後、MTSA に特異的に結合する窒素ラジカル活性種を連結した非天然型ビオチン誘導体が大腸癌のモデルマウスの尾静脈から注入して送達したところ、ラジカル活性種が約 10 分後から癌部位に到達しはじめ、約 30 分後から 3 時間までの間、癌部位を EPR で検出することができた。

ラジカル活性種である 3CP の化合物そのものの血中半減期は 8.5 分と報告があり、非常に短いにも関わらず、癌部位に集積した MTSA 周囲に化合物が上手く留まり、癌診断の新たな技術を創出することができたと考えられる。



一方、目標に掲げていた他の抗体についてもイメージングを行うということについて、腫瘍血管に特異的に発現する他の標的タンパク質に対する 2 種類の小分子化抗体と改変型ストレプトアビジン (MTSA) を連結した蛋白質をリフォールディングによって精製する手法について種々の条件を検討し、これに成功した。しかし、課題の期間内にはイメージングには至らなかった。一方で標的タンパク質に対する IgG 抗体にルシフェラーゼを結合した抗体を用いた *in vivo* 実験も行い、抗体が腫瘍部位に集まり、機能することは確認できたので、今後、EPR を用いたプレターゲット法によるイメージングを進めていくことができると確信している。

最後に、EPR の測定に際しては、九州大学先端医療イノベーションセンターの兵藤文紀准教授 (現岐阜大学医学系研究科放射線医学分野特任准教授)、江藤比奈子学術研究員、日本レドックス株式会社澤田政久様、長沼辰弥様に大変に御世話になりました。この場をお借りして謝意を表します。

Exogenous molecules such as radioisotopes, supermagnetic or paramagnetic metals, microbubbles, various visible and near-infrared (NIR) dyes, and fluorescence have been developed and utilized to image cancer. However, these compounds are non-targeted agents, providing a problem of non-specific contrast. The biggest issue with imaging is sensitivity. Radioisotopes are most commonly used, however, there is a new problem of internal exposure. Even if radioisotopes can detect cancer, there are significant problem with the patient's quality of life, timing between administration and preparation of compounds, and equipment for diagnosis. On the contrary, the electron spin resonance (EPR) method is known as a non-radioactive and high-sensitivity detection method, however, since the probe is unstable *in vivo*, it has not been tried so much to show high sensitivity. It has been considered unsuitable for cancer imaging.

The purpose of this project is to develop technology for cancer imaging by using the EPR method. In this research, the pre-targeting with antibody has been performed to concentrate the mutant streptavidin (MTSA) at the cancer site before injection of EPR probe, and to examine whether the unstable probes can be delivered in a short time and the EPR method can detect them.

We have already developed a mutant streptavidin (MTSA) which binds only to a synthetic bis-iminobiotin (BisIMN) with K_d value of 3.0×10^{-10} M without any binding to endogenous biotin present as vitamin B7 in our body (Fig. 1). We have already succeeded in the development of "pre-target PET antibody imaging" method, in which an antibody conjugated with MTSA was firstly administered and then a BisIMN compound labeled with a radioactive isotope was injected after accumulation of MTSA at the cancer cells, showing a detectable image with the PET method (Positron Emission Tomography).

It was necessary for the antibodies to accumulate on the cancer cells for 1 or 2 days, a compound with relatively long half-life such as ^{111}In (half life 2.8 days) should be utilized, however, ^{64}Cu (half life 12 hours) became usable by using the pre-target method, suppressing the dose of the compound. However, we have still two problems. One is the radiation exposure by PET, and the other is the limitation for usage of radioactive compound just before administration. "Time" and "Place" are the big problem for the PET imaging.

On the other hand, compounds *in vivo* having unpaired electrons with paramagnetic character, such as reactive oxygen species and heme, are chemically reactive and unstable. Therefore, no attempt was made to detect cancer cells. However, a stable nitrogen radical cation derivative in water was synthesized by Prof. Yamamoto in our group. If this compound was conjugated to bisIMN instead of ^{64}Cu , we thought that we could establish a novel imaging technology without exposure to radiation. The "time and place" problem will be overcome. Furthermore, this method could be applied to study whether an antibody is accumulated on the surface of cancer cells or internalized and incorporated into a cell, reducing the time to

develop antibody drugs in many pharmaceutical companies.

Therefore, in this study, we aimed to develop a technology to detect cancer cells by EPR (Electron Paramagnetic Resonance) method. One kind of antibody is conjugated with MTSA is firstly accumulated at the colon cancer, and then an exogenous BisIMN derivative conjugated the EPR probe is injected later. We then examined whether colon cancer can be detected by the EPR method (Fig. 2).

Firstly, we tried to synthesize the N-probe containing the hypervalent nitrogen atom conjugated with bisiminobotone (BisIMN), however, the hybrid compound was found to be unstable in blood with reducing properties. We then synthesized the complex conjugated with 3CP (Fig. 3). The 3CP compound was reported to be stable as radical species for 8.5 minutes in blood. However, the vivo imaging succeeded to be detected by using the Pre-targeting method. Namely, the mutant streptavidin (MTSA) conjugated with an anti-colon cancer was firstly injected into a cancer model mouse. The exogenous BisIMN carrying the stable nitrogen radical cation species in an aqueous solution was then injected after the accumulation of antibodies conjugated with MTSA on the cancer cells. The accumulated MTSA proteins could capture the nitrogen radical cation species, and then imaging by EPR has been succeeded (Fig. 4). We have developed a technology to detect colon cancer with EPR by using the pre-target antibody imaging.

We are currently examining whether EPR pre-target antibody imaging is also possible using another two types of antibodies specific for liver cancer. The novel imaging method using EPR can be promoted in the future.

III 事後評価総合所見

被ばく量を低減することを含め、社会的なニーズがある研究であり、大腸癌のモデルマウスを用いた本電子スピン共鳴法により生体内イメージングが可能であることを示すことができたことは評価されました。

一方で、本イメージング法がPET等に代替するという根拠に繋がる具体的なデータ取得までは至っておらず、既存の診断ツールを、安全性だけではなく診断精度において上回るためには、さらなる検討が必要と考えられます。現状の産学連携体制を維持しつつ、今後、本イメージング技術基盤の構築を通じて、着実にイノベーション創出に近づけることを期待します。