

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「DDS 技術」

(PET イメージング診断とアイソトープ DDS 治療を統合する進行大腸がんのプレターゲッティング治療薬の実用化)

2. 研究開発代表者：国立大学法人東京大学先端科学技術研究センター 教授 児玉龍彦

3. 研究開発の成果：

本研究開発では、「最先端研究開発支援プログラム (FIRST プログラム)」において開発を進めてきたプレターゲッティング治療薬の実用化に向け、大腸がん細胞に発現したエピレギュリン分子を認識する HM1scFv-Cupid 融合タンパク質の産生系構築、RI 標識用に使用する改変ビオチン (Psyche B-DOTA) の大量合成、両者を用いたプレターゲッティング法による腫瘍集積、体内動態の解析を進めた。また、Psyche H と Psyche H-DOTA それぞれと Cupid との結晶構造解析により Cupid と Psyche の結合に及ぼす DOTA の影響の解析を進めた。以下に、その開発成果を記す。

「HM1scFv-Cupid の高純度精製品を得る技術の開発」では、大腸菌分泌発現によるタンパク質大量発現系および精製方法の開発を進めた。培養時間、培養温度などの条件検討の結果、1L x 4 本の培養液に対し発現誘導後 20°C で一晚 (18 時間程度) の培養条件で約 0.25mg/L の収量で精製タンパク質を得る系を樹立した。また、高純度化精製法の検討として His-Tag アフィニティーカラムで粗精製と Protein-L カラムによるアフィニティー精製を組み合わせた方法により CBB 染色での検定で約 90% の純度の精製物を得る精製系を樹立した。さらなるゲルろ過やイオン交換カラムによる高純度化は、目的タンパク質のカラムへの吸着がおこるため難しいことが確認された。

また、「プレターゲッティングによる PET イメージングのための低分子造影剤の開発」では、Psyche-F の Cupid との親和性が低下していることが判明したため、イミノビオチンを結ぶリンカーを再検討し Psyche H を合成した。その結果、Cupid との強い親和性確保には、当該リンカー部位の疎水性が重要であることを見出した。この知見をもとに、Psyche-B-DOTA の合成をアミドカップリングによって行い、5mg 程度のスケールで、安定的に合成が可能となった。一方、「複合体の結晶構造解析による分子結合機構の解析」については、新規 Psyche-H とその DOTA 化派生体 Psyche-H(DOTA) のそれぞれと Cupid との複合体状態の結晶構造を決定し、結合の分子機構を解明した。DOTA にガドリニウム (Gd) 原子を配位させることで、DOTA の位置を Gd の異常散乱マップにより特定することに成功した。また、Psyche-H(DOTA) は Psyche-H よりもリンカー領域のフレキシビリティが高くなり、それにより結合親和性が低下していることを明らかにした。また、スーパーコンピュータによる HM1 抗体とエピレギュリンの MD シミュレーションでは、HM1scFv は重鎖と軽鎖の界面の相対位置の変化が安定性や親和性を低下させる要因の一つであることが確認された。Cupid-PsycheB の MD シミュレーションでは結合ポケット内のビオチンヘッドが水分子とともにフレキシブルに動くことが明らかになった。

最後に「プレターゲッティング技術の評価検討」については、HM1scFv-Cupid の投与量、HM1scFv-Cupid のウォッシュアウト時間、Psyche B-DOTA (111In) の投与量、Psyche-DOTA (111In) の投与後の結合時間について検討した。その結果、HM1scFv-Cupid の投与量 (100 pmol)、ウォッシュアウト時間 (24 時間)、Psyche-DOTA (111In) の投与量 (100 pmol)、Psyche-DOTA (111In) の投与後の結合時間 (48 時間) の条件にてエピレギュリンをターゲットとしたプレターゲッティング法による腫瘍への集積率が約 7%ID/g と最大となることが確認された。