

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) イメージング活用創薬の視点からの異分野技術融合によるシームレスな薬効評価システムの構築と実施
(英語) Establishment of seamless drug development system advanced by molecular imaging through the fusion of diverse research technologies
- 研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター
センター長 渡邊恭良
- 所属 役職 氏名： (英語) Yasuyoshi Watanabe, Director,
RIKEN Center for Life Science Technologies
- 実施期間： 平成 28 年 5 月 25 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究
開発課題名： (日本語) 低分子、抗体医薬品のためのイメージング活用創薬システムの構築
(英語) Establishment of drug development advanced by molecular imaging for small molecule-based drugs and antibody drugs
- 研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター
センター長 渡邊恭良
- 所属 役職 氏名： (英語) Yasuyoshi Watanabe, Director,
RIKEN Center for Life Science Technologies
- 分担研究 (日本語) 核酸、ペプチド医薬品のためのイメージング活用創薬システムの構築とアップコンバージョンナノ粒子を用いた近赤外光応答性ケージド化合物の開発
- 開発課題名： (英語) Establishment of drug development advanced by molecular imaging for nucleic acid and peptide medicines; development of NIR-triggered caged compounds using upconversion nanoparticles

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター
ユニットリーダー 向井英史

所属 役職 氏名 : (英 語) Hidefumi Mukai, Unit Leader, RIKEN Center for Life Science Technologies

分担研究 (日本語) 非天然型アミノ酸の導入技術を応用した抗体の標識及びコンジュゲート
技術の開発

開発課題名 : (英 語) Technology development for antibody labeling and chemical conjugation
based on the utility of non-natural amino acids

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター
グループディレクター 坂本健作

所属 役職 氏名 : (英 語) Kensaku Sakamoto, Group Director,
RIKEN Center for Life Science Technologies

分担研究 (日本語) 低分子医薬のポジロン標識技術の高度化と近赤外光応答性ケージド
化合物の開発

開発課題名 : (英 語) Improvement of Labeling Technologies of Small Molecular-Based
Medicines with Positron Nuclei and Development of NIR-Triggered Caged
Compounds

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター
副チームリーダー 丹羽 節

所属 役職 氏名 : (英 語) Takashi Niwa, Deputy Team Leader,
RIKEN Center for Life Science Technologies

分担研究 (日本語) 抗 HGF 特殊環状ペプチドのイメージング活用創薬

開発課題名 : (英 語) Imaging-assisted drug discovery of anti-HGF non-standard macrocyclic
peptide

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人金沢大学 がん進展制御研究所 教授 松本邦夫

所属 役職 氏名 : (英 語) Kunio Matsumoto, Professor,
Cancer Research Institute, Kanazawa University

分担研究 (日本語) 抗 HGF 特殊環状ペプチドのイメージング活用創薬

開発課題名 : (英 語) Imaging-assisted drug discovery of anti-HGF non-standard macrocyclic
peptide

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学大学院理学系研究科 特任助教 Passioura Toby

所属 役職 氏名 : (英 語) Toby Passioura, Project Assistant Professor,
Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo

- 分担研究 (日本語) VASH2 を分子標的とした核酸医薬に関する研究
 開発課題名: (英語) Research for nucleic acid therapeutics targeting vasohibin-2
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東北大学 教授 佐藤靖史
 所属 役職 氏名: (英語) Yasufumi Sato, Professor, Tohoku University
- 分担研究 (日本語) がん転移巣を描出する PET プローブの作製と応用
 開発課題名: (英語) Generation and application of PET probe to visualize cancer metastatic niche
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人九州大学 生体防御医学研究所 特任助教 弓本佳苗
 所属 役職 氏名: (英語) Kanae Yumimoto, Assistant Professor, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University
- 分担研究 (日本語) 超早期がん及び浸潤性がんをターゲットとした抗体医薬開発
 開発課題名: (英語) Development of antibody therapy target for early phase and invasive cancer
- 研究開発分担者 (日本語) 神奈川県立がんセンター臨床研究所 主任研究員 星野大輔
 所属 役職 氏名: (英語) Daisuke Hoshino, Senior Researcher, Kanagawa Cancer Center, Research Institute

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

以下に記載の通り、研究開発項目 (1) 低分子/抗体/核酸/ペプチド医薬品の任意位置ポジロン核種標識技術の高度化と組織中薬物濃度推移の直接評価、(2) がん微小環境やがん間質の特性を反映するイメージングバイオマーカーの開発、(3) 近赤外光応答性ケージド化合物を用いたがん組織特異的薬効誘導システムの開発、(4) セラノスティクス実現のための抗体-薬物-ポジロン核種トリプルコンジュゲートの開発に関する技術開発を進めながら、4種類の標的に対するイメージング活用創薬を行った。

坂本健作グループディレクター (理化学研究所) らのグループは、抗体の薬物コンジュゲートやポジロン核種標識体の作製を促進するために、理化学研究所で開発した大腸菌 B-95. ΔA 株をベースにして、反応性官能基 (アジド基など) を含有する非天然型アミノ酸をタンパク質に導入するための宿主大腸菌株を作製した。これらの大腸菌株を用いることで、AzPheなどを部位特異的に導入したトラツズマブ Fab 分子や EGF 受容体特異的 VHH 抗体のバリエーションを 10mg/L 程度の収量で生産することが可能になった。渡邊恭良センター長 (理化学研究所) らのグループは、この AzPhe 修飾トラツズマブ Fab 分子と生体内標識安定性に優れた 2 官能性キレータの Bio-orthogonal なカップリング反応に基づき、位置特異的に ⁶⁴Cu 標識された均一性の高い抗体 PET プローブが作製可能であることを示した。加えて、坂本らは、セラノスティクス実現のための抗体-薬物-ポジロン核種トリプルコンジュゲートの開発として、2つの官能基を持つアミノ酸 (アミノアジド Z-リジン) を導

入したトラツヅマブ Fab 分子を 5mg/L の収量で生産量することに成功した。

丹羽節副チームリーダー（理化学研究所）らのグループは、¹⁸F-標識 PET プローブの標識前駆体として利便性の高いホウ素化合物を迅速に取得するために、すでに開発していた変換技術を高度化し、スケラビリティと再現性を高めた、空气中で安定な銅触媒のみを用いるホウ素化反応の開発に成功した。本手法は、市販医薬品であるロナセン（プロナンセリン）にも適用可能であり、また、10 g 程度のスケールでも行えるなど、実用性が向上した。

向井英史ユニットリーダー（理化学研究所）らのグループは、近赤外光応答性ケージド化合物を用いたがん組織特異的薬効誘導システムの開発を目的に、近赤外光照射により紫外光を発するアップコンバージョンナノ粒子について、がん集積に適するよう粒子径を 20 nm 程度に制御し、配位子交換や脂質膜でのコーティングにより水溶性を付与する作製法を確立した。

松本邦夫教授（金沢大学）と Passioura 特任助教（東京大学大学院）らのグループは、開発中のシーズである抗 HGF 環状ペプチドの安定性について PEG 化修飾による向上を達成するとともに、優位特性として、2 本鎖活性型 HGF に対する選択的阻害能を明らかにした。また、向井らとともに、抗 HGF ペプチドの標識、活性維持について検証した。抗 MET ペプチドについて MET 依存的エンドサイトーシスを評価した。さらに、臨床応用をふまえた薬効検証、イメージング研究のため、MET 欠損ヒトがん細胞ならびにヒト HGF ノックイン免疫不全マウスを作成・準備した。

佐藤靖史教授（東北大学）らのグループは、向井らとともに、開発中のシーズである vasohibin-2 (VASH2) を分子標的とした 2', 4' -BNA/LNA 修飾型アンチセンスヌクレオチド (ASO) の体内動態を、PET イメージングなどに基づき解析した。その結果、ASO は主に腎臓、肝臓に分布し、ヒト肝がん細胞を同所移植されたマウスでは、正常肝臓部位と比較して肝がん部位へは約 40% が集積することが明らかとなった。

星野大輔主任研究員（神奈川県立がんセンター）らのグループは、渡邊らとともに、抗ラミニン γ 2 単鎖抗体について、親和性を維持した ⁶⁴Cu 標識 PET プローブを作製し、抗ラミニン γ 2 単鎖発現がん細胞を移植した担がんマウスにおいて予備的な PET 試験を実施した。

英文

As a host cell for synthesizing protein variants containing a non-natural amino acid such as azidophenylalanine (AzPhe) having the azido group as a reactive moiety, Dr. Kensaku Sakamoto's group (RIKEN) successfully developed *E. coli* B95 (AzF) strain, etc., based on the proprietary B-95. Δ A strain. The development of these strains enabled harvesting Trastuzumab Fab with AzPhe at a defined site in an amount of 10 mg/L. As for VHH antibodies, they successfully synthesized more than 20 variants containing halogenated tyrosines, an azidophenylalanine model, at different positions. Using this AzPhe-modified Trastuzumab Fab, Dr. Yasuyoshi Watanabe's group (RIKEN) demonstrated the synthesis of site-specifically ⁶⁴Cu-labeled antibody with high homogeneity by bioorthogonal coupling. In addition, Dr. Sakamoto, et al. improved the method for creating triple conjugates of VHH antibodies, which are linked with two different payload molecules in the conjugates via AmAzZLys, a non-natural amino acid with two distinct functional groups, incorporated into the antibodies.

For expeditious preparation of an organoboron compound that is a versatile labeling precursor for an ¹⁸F-labeled PET probe, Dr. Takashi Niwa's group (RIKEN) developed a more practical defluoroborylation of fluoroarenes by improvement of their previous method. Briefly,

they found that the desired defluoroborylation of fluoroarenes was achievable using only an air-stable copper complex. The method was applicable to various fluoroarenes, including a commercially available lonasen (blonanserin) and also showed high scalability, enabling the transformation in a decagram scale.

For development of tumor-specific induction system of drug effect using NIR-triggered caged compounds, Dr. Hidefumi Mukai's group (RIKEN) established the synthesis procedure of upconversion nanoparticles having around 20 nm diameter and water dispersibility based on ligand exchange and lipid layer coating.

Professor Kunio Matsumoto's group (Kanazawa University) and Dr. Toby Passioura (The University of Tokyo) improved the stability of anti-HGF peptide, one of their drug seeds, by PEGylation. The specific inhibitory action for two-chain/active HGF was revealed as a superior characteristic of anti-HGF peptide. Also, with Dr. Mukai (RIKEN), they confirmed ^{64}Cu -labeling and bioactivity of chelator-conjugated anti-HGF peptide for imaging analysis. In addition, the endocytosis of anti-MET peptide was evaluated. Then, MET knock-out cells and human HGF knock-in mice were prepared for evaluation of therapeutic efficacy and imaging analysis applicable to clinical study.

Professor Yasufumi Sato's group (Tohoku University) and Dr. Mukai's group (RIKEN) examined the distribution of 2, 4-BNA/LNA-modified antisense oligonucleotide (ASO) against vasohibin-2 (VASH2) in mice by in vivo PET imaging. They showed that ASO distributed mainly in the kidney and liver, and when compared with normal liver, about 40% of ASO distributed in hepatic tumor of mice orthotopically inoculated with human hepatocellular carcinoma cells.

Dr. Daisuke Hoshino's group (Kanagawa Cancer Center) and Dr. Watanabe's group (RIKEN) synthesized ^{64}Cu -labeled anti-laminin $\gamma 2$ monomer chain antibody. Briefly, Dr. Hoshino's group purified antigen for ELISA using cell culture system. Using this antigen, it was revealed that the ^{64}Cu -labeled antibody maintained the affinity for laminin $\gamma 2$ monomer chain. Moreover, a preliminary PET study was conducted.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 1 件）

1. Koyanagi T, Suzuki Y, Komori K, Saga Y, Matsubara S, Fujiwara H, Sato Y. Targeting human vasohibin-2 by a neutralizing monoclonal antibody for anti-cancer treatment. *Cancer Sci.* 2017, 108: 512-9.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 特殊環状ペプチドからなる人工 MET/HGF 受容体アゴニストの細胞内シグナル・遺伝子発現制御特性, ポスター, Miao Wenyu, 酒井克也, 小澤直也, 伊藤健一郎, 菅裕明, 松本邦夫, 第 89 回日本生化学会大会, 2016/9/25, 国内.

2. 特殊環状ペプチドによる人工 Met アゴニスト, ポスター, 酒井克也, 伊藤健一郎, 鈴木芳典, 小澤直也, 菅裕明, 松本邦夫, 第 89 回日本生化学会大会, 2016/9/25, 国内.
3. B16F10 メラノーマの造腫瘍性/転移性における Met 階層的発現の意義, ポスター, 足立恵理, 酒井克也, 今村龍, 松本邦夫, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/8, 国内.
4. Koyanagi T, Suzuki Y, Saga Y, Fujiwara H, Matsubara S, Sato Y: Blocking human vasohibin-2 with neutralizing monoclonal antibody for anti-cancer treatment. 19th International Vascular Biology Meeting, 2016/11/2, 国外 (アメリカ、ボストン)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 分子イメージング概説と理研分子イメージング研究拠点の紹介, 渡邊恭良, 分子イメージングサマースクール 2016, 2016/8/4, 国内.
2. 分子イメージングと創薬のための生体高分子 PET プローブ, 向井英史, 分子イメージングサマースクール 2016, 2016/8/5, 国内.
3. 生物学とバイオ医薬と縁, 松本邦夫, 石川県高等学校教育研究会生物部会, 2016/11/21, 国内.
4. その他、理化学研究所神戸事業所の一般公開 (2016/11/5) において、分子イメージング技術を活用した創薬に関する展示を行った。

(4) 特許出願

該当なし