

氏名	ふじ 藤 岡 泰
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 499 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	薬学研究科医療薬科学専攻
学位論文題目	腫瘍の核医学診断, 治療を目的とする放射性ヨウ素標識抗腫瘍抗体フラグメントの体内放射能挙動の制御に関する研究
論文調査委員	(主 査) 教授 佐 治 英 郎      教授 高 倉 喜 信      教授 乾      賢 一

### 論 文 内 容 の 要 旨

近年, IgG に比べて, 腫瘍組織への移行性に優れた Fab, Fv などの抗腫瘍抗体フラグメントが開発され, これらを用いる癌の核医学診断薬剤, 治療薬剤の臨床応用が強く期待されている。そこで, 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ラジオアイソトープ (RI) を結合させたものが開発され, 一部は臨床応用されている。しかし, これらの RI 標識抗体フラグメントにおいては, 投与後, 腎臓で糸球体ろ過された後, 管腔側から腎近位尿細管細胞に取り込まれ, そこで代謝され, 生成した放射性代謝物が細胞内に長時間滞留するため, 診断精度の低下や治療時の副作用を招き, 臨床上問題となっている。このような背景のもと, 本研究では, 核医学診断およ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。

そこで, 腎刷子縁膜に存在するカルボキシペプチダーゼ M がグリシン・リジン配列を選択的に切断すること, また, メタヨード馬尿酸 (*m*-IHA) が速やかに尿排泄されることに着目して, 抗体フラグメントへの放射性ヨウ素結合試薬として, 放射性ヨウ素標識 *m*-IHA のグリシン残基のカルボキシル基をリジンの  $\alpha$  アミノ基と結合させ, さらにそのリジン残基の  $\epsilon$  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 3'-iodohippuryl  $N^{\epsilon}$ -maleoyl-L-lysine (HML) を設計, 合成した。

まず, HML のグリシン・リジン配列のカルボキシペプチダーゼ M による切断を検討するために, HML の基本構造である 3'-[<sup>125</sup>I] iodohippuryl L-lysine について, ラット腎臓より調製した刷子縁膜小胞とインキュベートした。その結果, *m*-[<sup>125</sup>I] IHA が生成し, その生成量は経時的に増加すること, また, その生成はカルボキシペプチダーゼ M 阻害剤の添加により抑制されることを認めた。このことから, HML 結合抗体フラグメントは, カルボキシペプチダーゼ M により *m*-IHA を遊離する可能性が示された。

次いで, HML と抗体フラグメントとの有用な結合様式を検討するために, 二つの方法について評価した。すなわち, Fab フラグメントに 2-イミノチオラン (IT) を結合させてチオール化した後, または Fab 分子内のジスルフィド結合の還元によりチオール基を遊離させた後, それぞれ, 放射性ヨウ素標識 HML を結合させた。得られた 2 種類の放射性ヨウ素標識 HML 結合 Fab (HML-IT-Fab および HML-Fab) について, 正常マウスに投与した後の体内放射能動態を放射性ヨウ素直接標識 Fab ([<sup>125</sup>I] Fab) と比較した結果, [<sup>131</sup>I] HML-IT-Fab は, [<sup>125</sup>I] HML-Fab および [<sup>125</sup>I] Fab に比べて腎臓への放射能の集積量が低く, かつ速やかに消失した。また, マウスに投与後の腎細胞内放射能分布を比較検討したところ, [<sup>125</sup>I] Fab では経時的に放射能が腎細胞の膜画分からリソソーム画分に移行したのに対し, [<sup>131</sup>I] HML-IT-Fab および [<sup>125</sup>I] HML-Fab では膜画分にのみ放射能が検出された。さらに, 腎臓中の放射能を分析したところ, [<sup>131</sup>I] HML-IT-Fab では放射性代謝物として *m*-[<sup>131</sup>I] IHA のみが認められたが, [<sup>125</sup>I] HML-Fab では *m*-[<sup>125</sup>I] IHA 以外に中間代謝

物と考えられる放射性化合物の生成が観察された。また、 $^{131}\text{I}$  HML-IT-Fab を投与後、尿中に排泄された放射能を分析した結果、その大部分が  $m$ - $^{131}\text{I}$  IHA であった。これらの結果から、放射性ヨウ素標識 HML-IT-Fab, HML-Fab はともに腎臓で、刷子縁膜酵素により尿排泄性の高い  $m$ -IHA を遊離すること、また、HML-Fab よりも HML-IT-Fab の方がその遊離が速やかであることが明らかとなり、HML-IT-Fab が腎臓での放射能集積を低減するには最も有効であることが示された。

以上の検討結果をもとに、ヒト骨肉腫細胞に対する単クローン抗体の Fab フラグメントを用いて  $^{131}\text{I}$  HML-IT-Fab を作製し、その骨肉腫細胞移植ヌードマウスにおける体内動態を検討したところ、標的組織である腫瘍への放射能集積を損なうことなく、非標的組織である腎臓の放射能を低減し、明瞭な腫瘍のイメージを得ることに成功した。

以上、著者は、腎臓への非特異的な放射能集積を低減させ、腫瘍の核医学診断、治療に有効な放射性ヨウ素標識抗腫瘍抗体フラグメントを得るための放射性ヨウ素標識試薬を開発した。本研究の成果は、放射性ヨウ素標識抗体フラグメントのみならず、核医学診断、治療に有効な性質を有する金属 RI を標識核種とするペプチド放射性薬剤の設計に有用な指針を与えるものと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

近年、腫瘍組織への移行性に優れた Fab, Fv などの抗腫瘍抗体フラグメントが開発され、これらを用いる癌の核医学診断薬剤、治療薬剤の臨床応用が強く期待されている。そこで、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ラジオアイソトープ (RI) を結合させたものが開発されている。しかし、これらの RI 標識抗体フラグメントにおいては、投与後、腎臓で糸球体ろ過された後、管腔側から腎近位尿管細胞に取り込まれ、そこで代謝され、生成した放射性代謝物が細胞内に長時間滞留するため、診断精度の低下や治療時の副作用を招く。このような背景のもと、本論文は、核医学診断およ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抗体フラグメントの RI 標識法について検討したものである。

そこで、著者は、腎刷子縁膜に存在するカルボキシペプチダーゼ M がグリシン・リジン配列を選択的に切断すること、また、メタヨード馬尿酸 ( $m$ -IHA) が速やかに尿排泄されることに着目して、放射性ヨウ素標識  $m$ -IHA のグリシン残基のカルボキシル基をリジンの  $\alpha$  アミノ基と結合させ、さらにそのリジン残基の  $\epsilon$  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 3'-iodohippuryl  $N^\epsilon$ -maleoyl-L-lysine (HML) を設計、合成した。そして、HML のグリシン・リジン配列のカルボキシペプチダーゼ M による切断を検討するために、HML の基本構造である 3'- $^{125}\text{I}$  iodohippuryl L-lysine について、ラット腎臓より調製した刷子縁膜小胞とインキュベートした結果、本化合物はカルボキシペプチダーゼ M により  $m$ -IHA を遊離することを認めた。また、著者は、HML と抗体フラグメントとの結合様式について検討した結果、Fab フラグメントに 2-イミノチオラン (IT) を結合させてチオール化した後放射性ヨウ素標識 HML を結合させた場合 (HML-IT-Fab)、Fab 分子内のジスルフィド結合の還元によりチオール基を遊離させた後放射性ヨウ素標識 HML を結合させた場合 (HML-Fab) よりも、マウスに投与した後の腎臓での尿排泄性  $m$ -IHA の遊離が速やかであることを認め、HML-IT-Fab が腎臓での放射能集積を低減するには非常に有効であることを見出した。さらに、これらの検討結果をもとに、ヒト骨肉腫細胞に対する単クローン抗体の Fab フラグメントを用いて  $^{131}\text{I}$  HML-IT-Fab を作製し、その骨肉腫細胞移植ヌードマウスにおける体内動態を検討したところ、標的組織である腫瘍への放射能集積を損なうことなく、非標的組織である腎臓の放射能を低減し、明瞭な腫瘍のイメージを得ることに成功した。

以上、本研究は、腎臓への非特異的な放射能集積を低減させ、腫瘍の核医学診断、治療に有効な放射性ヨウ素標識抗腫瘍抗体フラグメントを得るための放射性ヨウ素標識試薬を開発したものであり、金属 RI を標識核種とするペプチド放射性薬剤の設計にも有用な指針を与えるものと評価される。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成14年2月27日論文内容とそれに関連した口答試問を行った結果合格と認めた。