

were totally different from those of buffer-treated ones (Figure 5C). The pimonidazole-positive cells were gradually decreased in the TOP3-treated sections (Figure 5Cg, Cj, and Cm). Higher magnified images clearly show that the boundary areas between viable regions and necrotic regions, which corresponded to pimonidazole-positive cells in buffer-treated xenografts, were empty spaces in the TOP3-treated samples (Figure 6D–F). To investigate the status of the hypoxic tumor cells between 5 and 24 hr after TOP3 treatment, we examined xenografts with T α T-mediated α UTP nick end labelling (TUNEL) at 12 hr after TOP3 treatment. Much more TUNEL-positive green fluorescence was detected around the boundary area between viable and necrotic cells in the TOP3-treated xenograft than in the buffer-treated xenograft (compare Figure 7A with Figure 7D). These data indicate that TOP3 induces apoptosis in hypoxic tumor cells of the boundary regions and efficiently eliminates these cells.

Discussion

Recent progress in optical imaging in vivo provides us with various information such as neoplastic cell growth [30], molecular localization [32], enzymatic reaction [33], and protein–protein interactions [34] in living animals. It also contributes towards collecting internal information without the sacrifice of animals. All of the results presented here demonstrate that the optical imaging method using 5HRE-luciferase reporter gene enables us to efficiently and easily monitor tumor hypoxia, where HIF-1 is active in living animals, and precisely evaluate the efficacy of anti-cancer therapies on tumor hypoxia.

HIF-1-dependent promoter has been used to monitor hypoxic status in tumors [20,21,35]. Their reporters were fluorescent proteins. Because permeability of bioluminescence in living animals is much better than fluorescence, a luciferase reporter system allowed sensitive, quantitative, real-time spatio-temporal analyses of the dynamics of neoplastic cell growth [30]. Because the quantitation of total photons from xenografts, in which tumor cells express luciferase gene under a constitutively active promoter, is an indicator of tumor burden

Table 1. Statistical Analysis of TGDT

Treatment	HeLa/5HRE-Luc (days \pm SD)	CFPAC-1 (days \pm SD)
Buffer	3.2 \pm 1.2	4.8 \pm 2.3
TOP3	7.6 \pm 2.4*	12.6 \pm 5.4*

TGDT was calculated as the mean of the days on which relative tumor mass of each tumor reached to two fold of the one on Day 0. Data were based on the results obtained by using HeLa/5HRE-Luc cells ($n = 5$) and CFPAC-1 cells ($n = 6$) in Figures 4A and 5A, respectively.

* $p < .05$ (vs. buffer).

[30], progressive tumor growth or regression could be monitored by repeated analyses of HeLa/EF-Luc xenografts at serial time points (Figure 4A and C, tumors in left legs). On the other hand, because the quantitation of total photons from HeLa/5HRE-Luc xenografts is an indicator of tumor hypoxia, qualitative information (hypoxic status) of solid tumors could be obtained by this model system (Figure 4B and C, tumors in right legs). When the growths of HeLa/EF-Luc and HeLa/5HRE-Luc xenografts were assessed with caliper, they were equally suppressed with TOP3 treatment in vivo (data not shown), indicating that both xenografts showed equal sensitivity to TOP3 treatment. These results further strengthen the argument that the decrease in photon counts from TOP3-treated HeLa/5HRE-Luc would reflect the decrease of tumor hypoxia in the xenografts (Figure 4B and C).

According to the previous report, the HIF-1 α small interfering (si) RNA, but not the HIF-2 α siRNA, suppresses hypoxia-dependent VEGF promoter activity in HeLa cells [36]. This suggests that the HRE from the VEGF promoter is exclusively dependent on HIF-1 activity in HeLa cells. Moreover, Western blot analysis confirmed that the up-regulation of luciferase activity was accompanied with the stabilization of HIF-1 α protein in HeLa/5HRE-Luc cells (Figure 1). Because HIF-1 activity is closely associated with tumor hypoxia [37] and the HIF-1-induced expression of luciferase corresponds with hypoxic region in HeLa/5HRE-Luc xenografts (Figure 2A), bioluminescence from the xenografts should reflect the existence of tumor hypoxia where HIF-1 is active.

Figure 5. Decrease in hypoxic/HIF-1-expressing cells in the TOP3-treated tumor xenografts. (A) CFPAC-1 tumor-bearing mice were intraperitoneally injected with buffer or TOP3 on Days 0, 5, and 10. To calculate the relative tumor mass, the tumor mass measured with caliper on each day was divided by the one on Day 0. Results are the mean of 6 independent tumor-bearing mice \pm SD for each group. (B) Tumor xenografts of CFPAC-1 cells were surgically excised 5, 24, or 48 hr after buffer or TOP3 injection, and stained with anti-pimonidazole antibody. To calculate the percentage of hypoxic regions, the percentage of pimonidazole-positive cells to a whole solid tumor was quantified with NIH Image 1.63 software. Results are the mean of three to four tumors from independent tumor-bearing mice \pm SD for each group. * $p < .01$. (C) Buffer-treated (a–f) and TOP3-treated (g–o) CFPAC-1 xenografts were surgically excised at the indicated times after the treatments, and serial sections were stained with anti-pimonidazole antibody (a, d, g, j, and m), HE (c, f, i, l, and o), or secondary antibody only as a negative control (NC; b, e, h, k, and n). Three to four tumors from independent tumor-bearing mice were examined for each treatment group and representative tumor sections are shown. Bar = 1 mm. The areas squared in f and o are applied to Figure 6A–C and Figure 6D–6F, respectively.

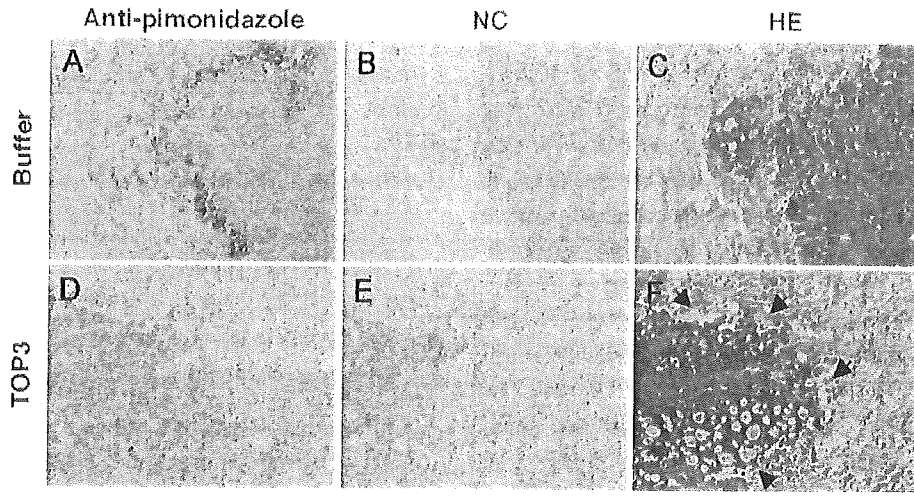


Figure 6. Effect of TOP3 on hypoxic/HIF-1-expressing cells in xenograft. The areas squared in Figure 5Cf and Co are magnified and shown in A–C and D–F, respectively. Buffer-treated (A–C) and TOP3-treated (D–F) CFPAC-1 xenografts were stained with HE (C and F), anti-pimonidazole antibody (A and D) and without primary antibody as a negative control (NC; B and E). Bar = 100 μ m. Arrow = empty spaces between viable region and necrotic region.

The immunohistochemical analysis using anti-luciferase antibody and anti-pimonidazole antibody indicated that the locations of the luciferase-expressing cells and the pimonidazole-positive cells were very similar. Both of them were located at the boundary areas between viable cells and necrotic regions (Figure 2A). However, their content and intensity were slightly different. The areas where luciferase was expressed were significantly wider than the ones where pimonidazole-positive cells were located. Because the oxygen concentration decreases as the distance from the blood vessels increases, HIF-1 α stabilization may have occurred under milder hypoxic conditions than the binding of pimonida-

zole compounds with thiol groups in proteins, which occurs in less than 10 mmHg [38] (www.radonc.unc.edu/pimo/main.htm). Although oxygen-dependent regulation is the major regulation for HIF-1 α expression, we must consider that HIF-1 expression is also affected by oxygen-independent regulation [39,40], and pimonidazole reactivity is absolutely oxygen-dependent [31,38]. Because HIF-1 activity is closely associated with malignant progression [5,16], monitoring HIF-1 activity in solid tumors is crucial for cancer therapy.

Because TOP3 stability is regulated by the same oxygen-dependent mechanism as HIF-1 α protein through common ODD domain, both TOP3 and HIF-

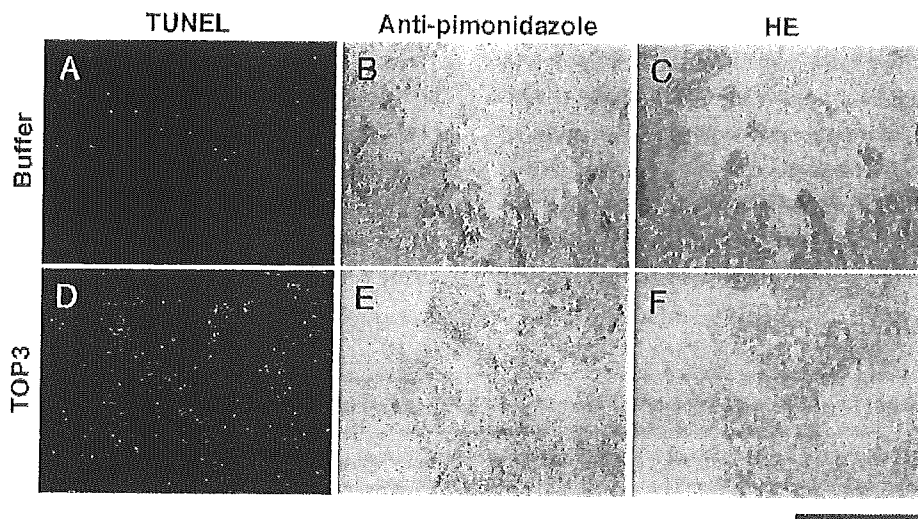


Figure 7. Apoptosis of hypoxic/HIF-1-expressing cells in TOP3-treated tumor xenograft. CFPAC-1 xenografts excised at 12 hr after either buffer (A–C) or TOP3 (D–F) administration were stained for TUNEL (A and D). Serial tumor sections were stained with anti-pimonidazole antibody (B and E) and HE (C and F). Three tumors were examined for each treatment group and representative tumor sections are shown. Bar = 1 mm.

1 α must be stabilized in the same hypoxic tumor cells in vivo as well as in vitro. Therefore, TOP3 is expected to target HIF-1 α -expressing hypoxic tumor cells, leading to shutting off the HIF-1-induced gene expression. In accordance with this expectation, the disappearance of pimonidazole-positive cells from TOP3-treated tumor sections (Figures 5B,C, 6D, and 7E) and the existence of empty spaces between viable and necrotic regions in the TOP3-treated tumor sections (Figure 6D–F) strongly suggests the elimination of hypoxic/HIF-1-expressing cells after TOP3 treatment. Although the disappearance of these areas may be a consequence of the removal of fragile apoptotic cells from the section during the staining process, TOP3-targeted cells must be removed in vivo because the total tumor mass and the photon counts of HeLa/5HRE-Luc xenografts were significantly reduced after TOP3 administration (Figure 4B and C). Although the precise mechanism underlying the removal of hypoxic tumor cells by TOP3 in vivo has not been investigated, it is likely that such cells initially undergo apoptosis, as shown in vitro [23] and in vivo (Figure 7), and that they might be removed by macrophages attracted by the caspase-3-induced “eat-me signal” [41].

TOP3 did not influence luciferase–luciferin reaction in vitro (data not shown). The bioluminescent signals from HeLa/EF-Luc were not so significantly decreased as the one from the HeLa/5HRE-Luc xenografts of TOP3-treated mice (Figure 4C). These results indicate that the significant decrease of the bioluminescent signals from HeLa/5HRE-Luc xenografts of TOP3-treated mice was not simply due to interference of TOP3 in luciferase–luciferin reaction in vivo. Low oxygen concentration influences the luciferin reaction, and thus, we cannot simply compare the bioluminescent signals from HeLa/EF-Luc xenografts with the one from HeLa/5HRE-Luc xenografts. However, as long as monitoring the same HeLa/5HRE-Luc xenografts, the change in the bioluminescent intensity should reflect the amount of hypoxic tumor cells.

The first TOP3 administration caused the most significant reduction in HIF-1 activity on Day 3 (Figure 4B and C). Because HeLa/5HRE-Luc cells had little luciferase activity under aerobic conditions in vitro (Figure 1A), the photon counts detected in the TOP3-treated xenografts on Day 3 may have been background (Figure 4B and C). If so, almost all HIF-1-expressing cells were removed as the results of the first administration. The sequential administration with TOP3 in 5-day intervals resulted in remarkable suppression of the increase in the bioluminescence from HeLa/5HRE-Luc xenografts.

The relative photon counts from buffer-treated HeLa/5HRE-Luc tumors reached 22-fold, whereas the ones from TOP3-treated tumors were still suppressed on Day 15 (Figure 4B and C). All of these results strongly suggest that the optical imaging of HIF-1 activity by a luciferase reporter system can contribute to the screening and the development of HIF-1-targeting drugs and the convenient evaluation of the efficacy of anti-cancer therapy on tumor hypoxia.

In optical imaging, there was a time lag between the decrease in the photon counts and the elimination of the pimonidazole-positive cells after TOP3 treatment (Figures 4A–C, 5B and C). Concretely, after the first TOP3 administration on Day 0, the tumor became the smallest on Day 2 (Figure 4A) and the pimonidazole-positive cells decreased within 2 days (48 hr; Figure 5B and C), whereas relative photon counts became the lowest on Day 3 (Figure 4B and C). Although luciferase expression is initiated by a hypoxic stimulus, luciferase activity remains even after the surrounding conditions change to aerobic until the protein is degraded. Hence, monitoring the HIF-1 activity as a luciferase activity may not be always punctual. Therefore, it is necessary to further improve the reporter system to realize real-time imaging.

Acknowledgments

We thank Dr. S. Kimura (Kyoto University, Kyoto, Japan) and S. Watanabe (SC BioScience) for IVIS technical support; N. Murakami-Harada, E. Nishimoto, and A. Morinibu for skilled technical assistance. This work was supported by research grants from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan and Kyoto City Collaboration of Regional Entities for the Advancement of Technological Excellence, JST.

References

- [1] Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P (1989). Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: A review. *Cancer Res.* **49**:6449–6465.
- [2] Brown JM (2000). Exploiting the hypoxic cancer cell: Mechanisms and therapeutic strategies. *Mol Med Today.* **6**:157–162.
- [3] Teicher BA (1994). Hypoxia and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev.* **13**:139–168.
- [4] Hockel M, Vaupel P (2001). Tumor hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst.* **93**:266–276.
- [5] Harris AL (2002). Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.* **2**:38–47.
- [6] Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P (1996). Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.* **56**:4509–4515.
- [7] Giaccia AJ (1996). Hypoxic stress proteins: Survival of the fittest. *Semin Radiat Oncol.* **6**:46–58.

- [8] O'Rourke JF, Dachs GU, Gleadle JM, Maxwell PH, Pugh CW, Stratford IJ, Wood SM, Ratcliffe PJ (1997). Hypoxia response elements. *Oncol Res*. **9**:327–332.
- [9] Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**: 5510–5514.
- [10] Bruick RK, McKnight SL (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. **294**:1337–1340.
- [11] Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. **107**:43–54.
- [12] Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH (2000). Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem*. **275**:25733–25741.
- [13] Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG (2000). Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol*. **2**:423–427.
- [14] Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, Conaway JW (2000). Activation of HIF1 α ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**:10430–10435.
- [15] Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L (2000). Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 α by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J*. **19**: 4298–4309.
- [16] Semenza GL (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. **3**:721–732.
- [17] Hernandez-Alcoceba R, Pihalja M, Qian D, Clarke MF (2002). New oncolytic adenoviruses with hypoxia- and estrogen receptor-regulated replication. *Hum Gene Ther*. **13**:1737–1750.
- [18] Kaliberov SA, Buchsbaum DJ, Gillespie GY, Curiel DT, Arafat WO, Carpenter M, Stackhouse MA (2002). Adenovirus-mediated transfer of BAX driven by the vascular endothelial growth factor promoter induces apoptosis in lung cancer cells. *Mol Ther*. **6**: 190–198.
- [19] Shibata T, Giaccia AJ, Brown JM (2000). Development of a hypoxia-responsive vector for tumor-specific gene therapy. *Gene Ther*. **7**:493–498.
- [20] Vordermark D, Shibata T, Brown JM (2001). Green fluorescent protein is a suitable reporter of tumor hypoxia despite an oxygen requirement for chromophore formation. *Neoplasia*. **3**:527–534.
- [21] Liu J, Qu R, Ogura M, Shibata T, Harada H, Hiraoka M (2005). Real-time imaging of hypoxia-inducible factor-1 activity in tumor xenografts. *J Radiat Res (Tokyo)*.
- [22] Shibata T, Giaccia AJ, Brown JM (2002). Hypoxia-inducible regulation of a prodrug-activating enzyme for tumor-specific gene therapy. *Neoplasia*. **4**:40–48.
- [23] Harada H, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S (2002). Antitumor effect of TAT-oxygen-dependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells. *Cancer Res*. **62**:2013–2018.
- [24] Kizaka-Kondoh S, Inoue M, Harada H, Hiraoka M (2003). Tumor hypoxia: A target for selective cancer therapy. *Cancer Sci*. **94**: 1021–1028.
- [25] Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF (1999). In vivo protein transduction: Delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*. **285**:1569–1572.
- [26] Wadia JS, Dowdy SF (2005). Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. **57**:579–596.
- [27] Inoue M, Mukai M, Hamanaka Y, Tatsuta M, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S (2004). Targeting hypoxic cancer cells with a protein prodrug is effective in experimental malignant ascites. *Int J Oncol*. **25**:713–720.
- [28] Kim DW, Uetsuki T, Kaziro Y, Yamaguchi N, Sugano S (1990). Use of the human elongation factor 1 α promoter as a versatile and efficient expression system. *Gene*. **91**:217–223.
- [29] Sunohara T, Jojima K, Tagami H, Inada T, Aiba H (2004). Ribosome stalling during translation elongation induces cleavage of mRNA being translated in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. **279**:15368–15375.
- [30] Sweeney TJ, Mailander V, Tucker AA, Olomu AB, Zhang W, Cao Y, Negrin RS, Contag CH (1999). Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals. *Proc Natl Acad Sci USA*. **96**:12044–12049.
- [31] Varia MA, Calkins-Adams DP, Rinker LH, Kennedy AS, Novotny DB, Fowler WC Jr., Raleigh JA (1998). Pimonidazole: A novel hypoxia marker for complementary study of tumor hypoxia and cell proliferation in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*. **71**: 270–277.
- [32] Chen WT, Tung CH, Weissleder R (2004). Imaging reactive oxygen species in arthritis. *Mol Imaging*. **3**:159–162.
- [33] Luker GD, Pica CM, Song J, Luker KE, Piwnicka-Worms D (2003). Imaging 26S proteasome activity and inhibition in living mice. *Nat Med*. **9**:969–973.
- [34] Ray P, Pimenta H, Paulmurugan R, Berger F, Phelps ME, Iyer M, Gambhir SS (2002). Noninvasive quantitative imaging of protein-protein interactions in living subjects. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**:3105–3110.
- [35] Serganova I, Doubrovin M, Vider J, Ponomarev V, Soghomonyan S, Beresten T, Ageyeva L, Serganov A, Cai S, Balatoni J, Blasberg R, Gelovani J (2004). Molecular imaging of temporal dynamics and spatial heterogeneity of hypoxia-inducible factor-1 signal transduction activity in tumors in living mice. *Cancer Res*. **64**: 6101–6108.
- [36] Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, Wiesener M, Eckardt KU (2004). Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α (EPAS-1) by the use of RNA interference: Erythropoietin is a HIF-2 α target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J*. **18**:1462–1464.
- [37] Vaupel P (2004). The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist*. **5**:10–17.
- [38] Raleigh JA, Koch CJ (1990). Importance of thiols in the reductive binding of 2-nitroimidazoles to macromolecules. *Biochem Pharmacol*. **40**:2457–2464.
- [39] Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL (2000). Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/Pten/Akt/FRAP pathway in human prostate cancer cells: Implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res*. **60**:1541–1545.
- [40] Krieg M, Haas R, Brauch H, Acker T, Flamme I, Plate KH (2000). Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene*. **19**:5435–5443.
- [41] Lauber K, Bohn E, Krober SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, Xu Y, Autenrieth IB, Schulze-Osthoff K, Belka C, Stuhler G, Wesselborg S (2003). Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell*. **113**:717–730.

9 革新的診断・治療へのアプローチ

一膜透過性・標的特異性を有する融合タンパク質を用いたイメージング・ターゲティング

近藤 科江・原田 浩・平岡 真寛

京都大学医学研究科・腫瘍放射線科学



近藤 科江
1989年大阪大学医学博士取得。90年学振特別研究員（若手）、93年東京A.T.O岡山細胞変換・ロコモーション研究員。99年京都大学医学研究員助手。2004年京都大学医学研究員（O.E.プロジェクト「転移増進を目指す基礎医学研究拠点」）兼任助教授。研究テーマは、低酸素がん細胞・メタスタシスの増殖と転移メカニズム。趣味は旅行。

Key words : 低酸素がん細胞、膜透過ドメイン (PTD; Protein transduction domain), HIF-1, 酸素濃度依存的分解 (ODD; Oxygen-dependent degradation)

Abstract

低酸素が問題になる疾患には、脳・心筋梗塞や閉塞性末梢動脈硬化症といった虚血性疾患のみならず、難治性固形腫瘍が含まれる。固形腫瘍には、細胞増殖と血管新生の不均衡に起因する「低酸素領域」が存在する。低酸素領域にあるがん細胞は、放射線や抗がん剤に感受性が低く、治療効果不良の主因であるばかりでなく、浸潤・転移・再発の温床となっている。しかし、低酸素環境は正常組織には存在しないため治療標的となりうる。我々は、低酸素環境下にある細胞内で特異的に安定化する融合タンパク質を開発し、それを用いることにより、低酸素細胞のイメージング・ターゲティング研究を行っている。本稿では、固形腫瘍を対象にした研究について紹介する。

はじめに

医学の進歩に伴い、がんの診断・治療技術も年々進歩してきている一方で、我が国では、世界のどの国も経験したことのない速度で人口の高齢化が進行している。これが我が国でがんが増える第一の要因になっている。血液検査、内視鏡、画像診断等の技術の向上により、多くのがんが早期に発見できるようになってきたが、「手軽に、どのがんでも」とい

うところまでは至っていない。我々の研究は、早期診断・早期治療に革新的イメージング・ターゲティング技術を提供することにより、がん撲滅に寄与することを目的としている。

1. 腫瘍内低酸素領域

固形がんには、非常に小さながん（数ミリ以下）でも通常ではありえないような低酸素状態のがん細胞が存在する。それは、がん細胞の増殖に血管新生が追いつかないために、血流からの酸素や栄養が十分行き渡らない領域が生じるため、酸素も栄養も枯渇して死んでしまったがん細胞と増殖しているがん細胞の境界の極めて限られた領域に存在する（図1）。この低酸素がん細胞は、過酷な環境に順応するために、増殖は停止し、代謝も解糖系を用いて省エネルギー化し、いわば冬眠状態にある。それだけであれば、これら低酸素がん細胞は注目に値しないのであるが、これらの細胞はがん治療の抵抗性の指標となるほど、抗がん剤や放射線治療に抵抗性を示す。従って、癌治療が終わった後も生き残り、再発の温床となる可能性が指摘されている。更

Imaging and targeting with a novel fusion protein possessing membrane permeability and target-specificity: Shin-ae Kondo, Hiroshi Harada, Masahiro Hiraoka, Department of Therapeutic Radiology and Oncology, Kyoto University Graduate School of Medicine

A SPECIAL EDITION

に、生き延びるために様々な因子（例えば VEGF, TGF- β , FGF, IGF）を分泌して、血管新生を促したり、転移や浸潤に関わったりして、腫瘍全体の悪性度を高める働きをする。故に、低酸素がん細胞は癌治療を行う上で、見逃すことができない標的であると同時に、低酸素がん細胞が存在する微小環境は「正常組織ではありえない」という点で絶好の標的（環境標的）となりうる。

2. 酸素濃度依存的制御機構

この低酸素がん細胞には、極めて興味深いタンパク質が存在する。そのタンパク質は HIF-1 α と呼ばれ、転写因子 HIF-1 を構成する 2 つのサブユニットのひとつで、低酸素環境で安定化し、通常の酸素環境下（有酸素環境）で速やかに分解される。そのため HIF-1 は低酸素環境下で機能し、低酸素特異的に応答する一連の遺伝子の発現を誘導する。それらの遺伝子は、低酸素がん細胞が過酷な微小環境に順応するために必要な因子や上記のがん悪性化に関与する因子をコードしている。

我々は、HIF-1 α タンパク質の酸素濃度依存的分解（ODD）制御機構に着目した。2001年に新たなプロリン水酸化酵素が発見さ

れた。我々は、HIF-1 α タンパク質の酸素濃度依存的分解（ODD）制御機構に着目した。2001年に新たなプロリン水酸化酵素が発見さ

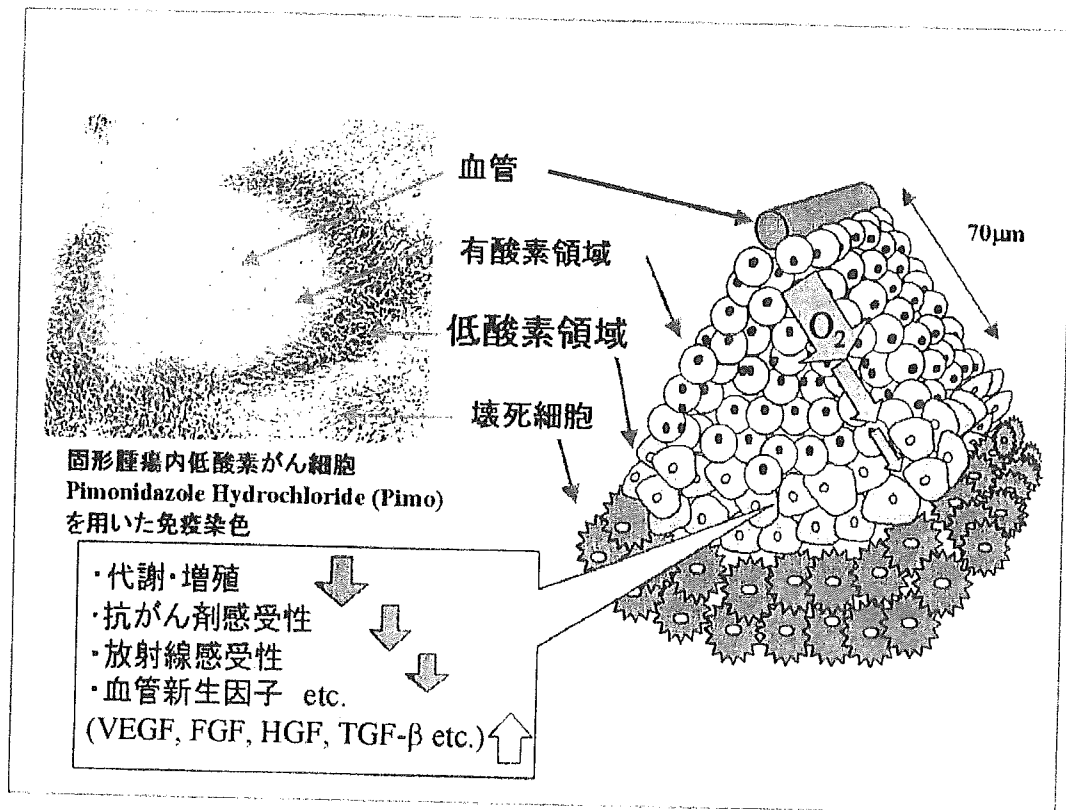


図1 固形腫瘍内低酸素領域

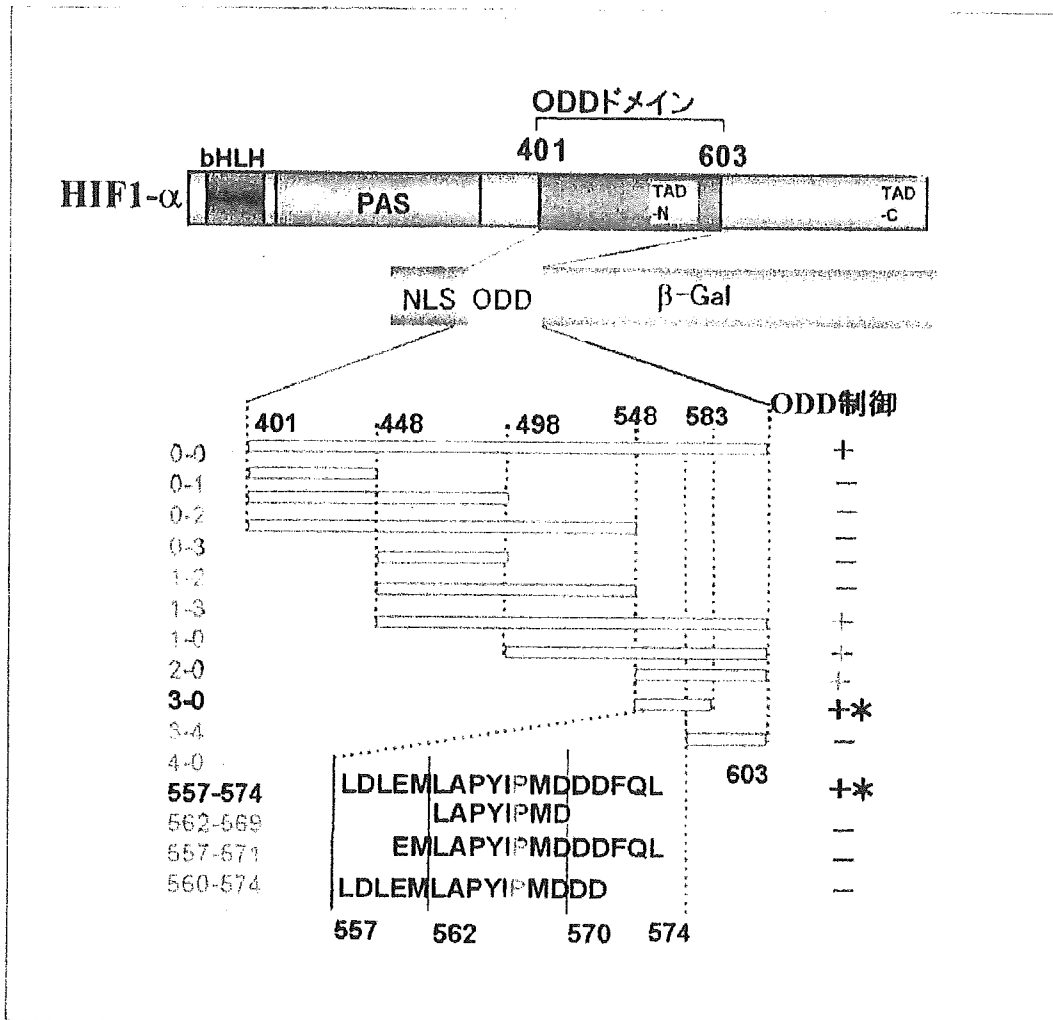


図2 ODD融合タンパク質のODD制御

れ、この制御機構は分子レベルで詳細が明らかにされている。即ち、プロリン水酸化酵素が、HIF-1 α タンパク質の中央付近にあるODDドメインのプロリン残基を水酸化し、これを目印にして結合するユビキチン連結酵素複合体E3により、HIF-1 α はユビキチン化されプロテオソームに運ばれて分解される。このプロリン水酸化酵素が機能す

る際に、酸素を含んだ鉄分子を必要とすることが酸素依存性の中核機構であった。このODD制御は極めて厳密で、低酸素下で安定化したHIF-1 α は、有酸素にすると数分以内に分解される。この極めて厳密なODD制御機構を応用して、低酸素がん細胞特異的イメージング・ターゲティング材料の構築が始まった。

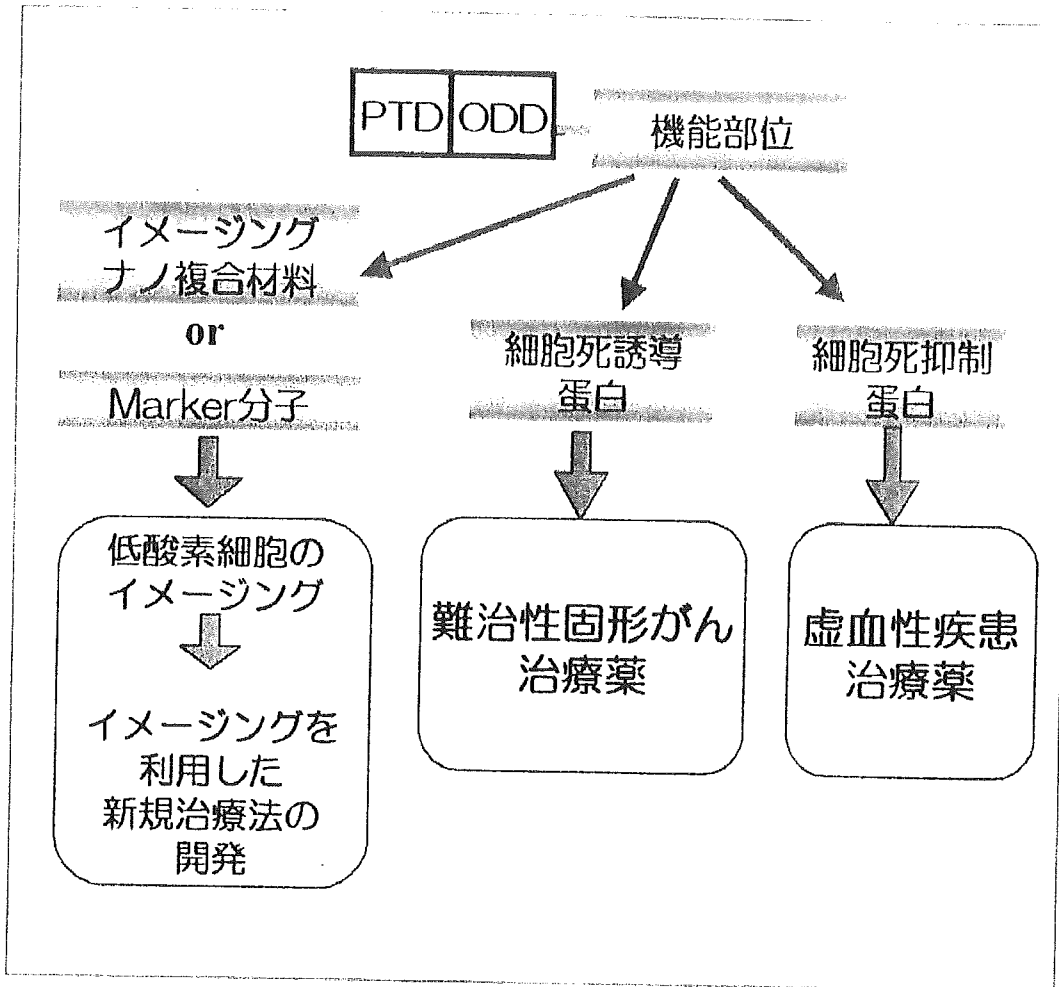


図3 PTD-ODD融合タンパク質の利用例

3. PTD-ODD融合タンパク質の構築

我々がまず行ったことは、上記のHIF-1 α にあるODDドメインを任意のタンパク質に融合させることで、任意のタンパク質が持つ機能を酸素濃度依存的に制御することができるか否かの検証である。ODDドメイン全部（約200アミノ酸）を付加すると、全体の分子量がかなり大きくなるので、最小のアミノ酸配列を決定するためにODDドメイ

ンを部分的に β -ガラクトシダーゼに融合させ、 β -ガラクトシダーゼ活性の酸素濃度依存性を調べた（図2）。その結果、少なくとも18個のアミノ酸があれば、任意のタンパク質の活性をODD制御できること、最適なODD制御のためには、約50個のアミノ酸配列からなるODDドメインが必要であることがわかった。

ODD制御できるタンパク質が作れても、細胞内に導入できなければ、細胞内で行われ

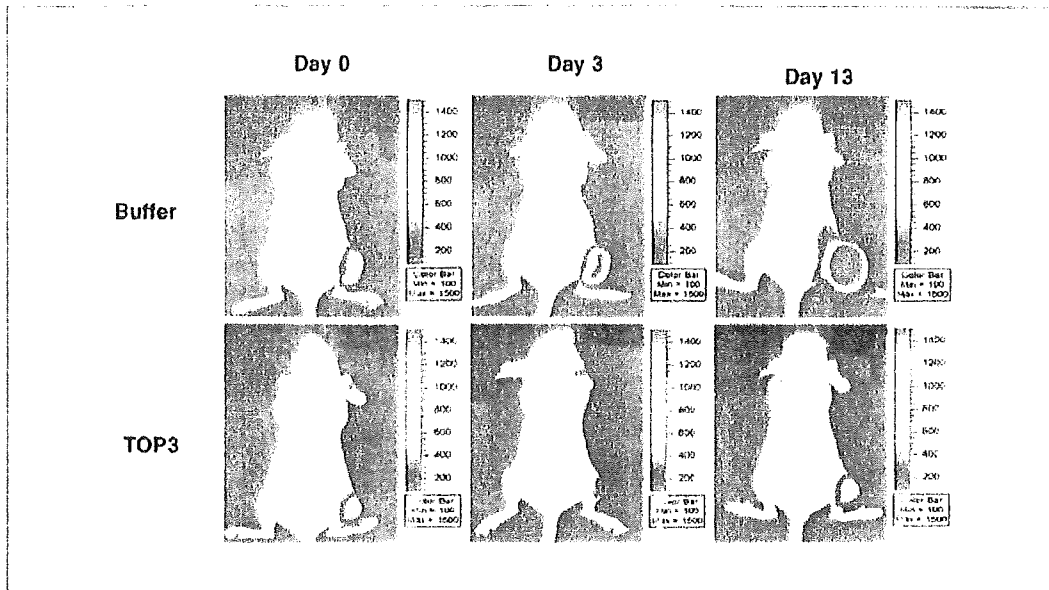


図4 TOP3による抗がん効果
光イメージングにより低酸素領域を可視化する系で同一マウス大腿部腫瘍内の低酸素がん細胞の量を経時的にモニターした。TOP3の投与は20mg/Kg, day0, 5, 10の3回。

るODD制御を受けることができない。そこで我々は、タンパク質に膜透過性を付加する膜透過ドメイン（PTD）をODD融合タンパク質に付加することにより、培養細胞を用いた実験でほぼ100%の細胞にタンパク質を導入し、酸素依存的に機能させることに成功した。しかもこのPTD融合タンパク質は、ネズミの腹腔内に投与すると、脳を含む全身の組織細胞にデリバリーされることが示されている。そこで我々は、PTD-ODD-β-ガラクトシダーゼを腹腔内に投与し、この融合タンパク質の体内分布とβ-ガラクトシダーゼ活性を調べた。その結果、ODDを付加していないタンパク質を投与した場合、正常肝組織と腫瘍組織全体で、タンパク質と活性が確認できたのに対し、ODDを付加したタンパク質を投与した場合は、正常組織ではタンパク質も活性も確認できず、腫瘍組織

でも一部でのみタンパク質と活性が確認できた。その部分が低酸素であるか否かを確認するために、低酸素マーカーとして知られている化合物（pimonidazole）を用いて腫瘍切片を染色したところ、低酸素マーカーと同一のところに、β-ガラクトシダーゼタンパク質が存在していることがわかった。これらの結果は、我々の設計通り、PTD-ODD融合タンパク質はODD制御を受け、低酸素がん細胞特異的に分布・機能することを示しており、低酸素がん細胞特異的イメージング・ターゲティングが可能であることを示していた。

4. ターゲティングへの応用

PTD-ODD融合タンパク質は、機能ドメインに付加するものを変えることで、様々な機能を持たせることができる（図3）。即

A SPECIAL EDITION

ち、低酸素がん細胞に細胞死を誘導する機能を付加することで、低酸素がん細胞のターゲティングを行うことができる。モデルタンパク質として構築したTOP3は、低酸素細胞内で安定化し、活性化され細胞死を誘導するように設計されている。TOP3を投与することにより、腫瘍サイズは小さくなった。ヒト膵臓がん細胞をネズミの皮下に移植した実験で、無処理群で腫瘍体積が2倍になる日数が 4.8 ± 2.3 日であったのに対し、TOP3投与群では、 12.6 ± 5.4 日 (* $p < 0.03$)と約3倍にのびている。この明らかな腫瘍増殖抑制効果の原因が低酸素がん細胞を効率よく腫瘍から除いているためであることが、腫瘍内低酸素がん細胞を光イメージングで可視化し、経時的に観察することにより明らかになった(図4)。今後臨床応用にむけて検討を行っていく予定である。

5. イメージングへの応用

タンパク質を用いる場合は光イメージングが最も容易で種類も多いが、光の透過度が小さいことから光イメージングの臨床応用は現状では極めて難しい。しかしながら、基礎的データが容易に集められることから、現在機能ドメインに光イメージングに対応する物を融合させて動物実験を行っている。将来的には、磁性体ナノ粒子の利用を検討しており、MRIによる低酸素がん細胞の画像化をめざして研究を進めている。

おわりに

「西暦2015年には、1年間に89万人ががんにかかる(がんセンターHP)」と予測されている。1990年代で既に、男性では55%、女性では65%が5年以上生存している。つまり、

毎年がん治療を受けて治った約50万人が、その後再発と転移の不安をかかえながら、長い人生を歩む時代が来たといえる。定期的なモニターによるがんの早期発見は、このようなハイリスク群のみならず、通常の検診でがんの早期発見を望んでいる予備群に対しても重要であることは言うまでもない。

現在の画像診断では、基本的に正常組織との違い(異常)を探し出すことで、がんを検出する手法が取られるため、小さな痛を見つけるためには、かなりの知識と経験が求められる。それでは、とても急増する需要に追いつくことができない。そのためにも誰が見ても明らかにがんの存在を示唆できるような鮮明な画像を提供できるプローブの開発が必須である。つまり、「がんが無ければ画面には何も写らず、イメージとして画面に写し出されたら、そこにがんがある」という極めて簡単な画像診断を提供でき、しかもがんの組織特異性に左右されず、どのようながんでも早期に検出が可能であるプローブ、そんな夢のようなプローブを我々は、これまでに医学の領域では使われることのなかった工学系の材料;ナノ複合材料を応用することで実現しようとしている。革新的診断・治療への挑戦である。

参考文献

- 1) Kizaka-Kondoh S, Inoue M, Harada H and Hiraoka M. Tumor hypoxia: a target for selective cancer therapy. *Cancer Science*. 94, 1021-8 (2003). Review.
- 2) Harris AL. Hypoxia - A key regulator factor in tumor growth. *Nature Rev. Cancer*;2:38-47.(2002). Review.
- 3) Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*. 285,1569-72. (1999).
- 4) Semenza GL. HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell*. 107,1-3. (2001). Review.

4. 癌治療における HIF-1 と Tumor Hypoxia

近藤 科江^{*} 平岡 真寛^{**1)} 原田 浩^{**}

Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) は、低酸素応答転写因子として見いだされ、固形腫瘍における血管新生、糖代謝、転移・浸潤等に関与する多くの遺伝子の発現を誘導し、がんの悪性化やがんによる死亡率上昇に深く関わっている事がわかってきた。基礎研究レベルでは、HIF-1 を抑制することで、がんの増殖が抑えられるという報告が多数あり、HIF-1 の活性を抑制するための研究が、抗がん治療において注目され始めている。ここでは、最近の HIF-1 研究と、HIF-1 を標的にしたがん治療戦略を我々の研究を含めて紹介したい。

1. Tumor Hypoxia と HIF-1

がんを構成するがん細胞の性質を知ることは、がんを治療する上で極めて重要である。分子生物学の発展とともに、がん研究は、細胞レベルから分子レベルに移行し、分子標的が抗がん治療において大きな注目を集めている。一方で、腫瘍全体の構造的特徴からくる腫瘍内環境いわゆる微小環境 (microenvironment) が、がん細胞の性質を大きく変えているということが分子レベルでも明らかになり、がんを治療するうえで考慮すべき極めて重要な研究テーマとして、注目され始めている。

がんの微細環境は、低酸素、低 pH、低ブドウ糖濃度等により特徴づけられている。がん細胞の無秩序な増

殖が極めて不規則な血管新生を引き起こし、不完全な血管構造と分布によって引き起こされる慢性 (chronic) および急性 (acute) の虚血領域が生じる¹⁾。慢性的な虚血状態は、がんの増殖に血管新生が追いつかない結果引き起こされる。血管から供給される酸素や栄養が細胞を維持できるのは、ただだか 100 μm 前後と言われており、それ以上血管からの距離が離れた位置にあるがん細胞は、虚血状態にあり、更に距離がはなれると細胞は壊死してしまう (図 1)。この壊死細胞に隣接する瀕死の虚血がん細胞が、実はがんの悪性に深く関わっている事が、最近の研究からわかってきた²⁻⁴⁾。

“瀕死の虚血がん細胞”が分布している領域は、低酸素状態にあるために腫瘍内低酸素領域 (Tumor

^{*} Shinae Kizaka-Kondoh 京都大学大学院医学研究科放射線腫瘍学・画像応用治療学 (OB) 助教授

^{**} Masahiro Hiraoka, Hiroyoshi Harada 京都大学大学院医学研究科放射線腫瘍学・画像応用治療学 教授

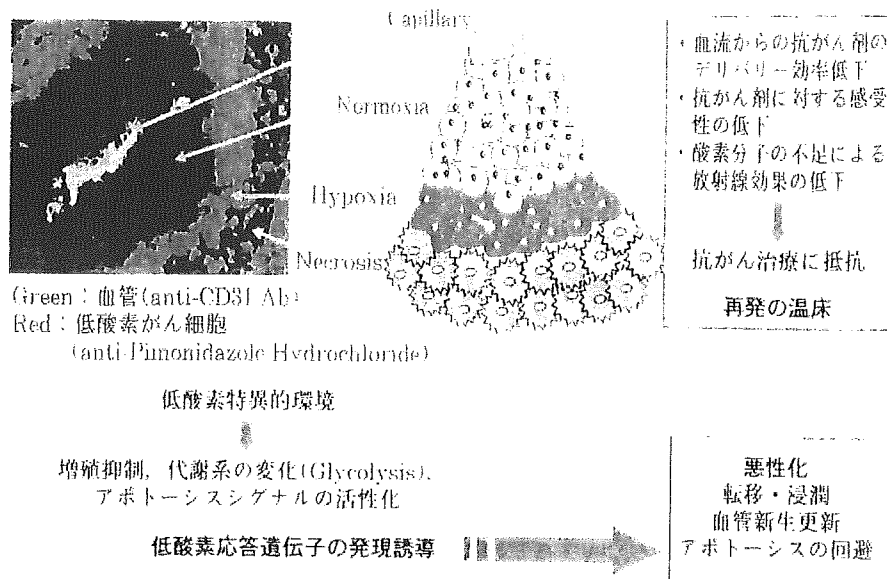


図1 がんの微小環境

腫瘍切片を血管(緑)と低酸素がん細胞(赤)を認識する抗体で免疫染色すると、低酸素領域は、血管から100 μ m程度離れた領域に、壊死領域を取り囲むように帯状に存在することがわかる(左上図)。低酸素がん細胞は、抗がん剤が届きにくい上に増殖が抑えられているため薬剤耐性であり、放射線にも抵抗性である。また、低酸素がん細胞で活性化するHIF-1により誘導される遺伝子の機能により、腫瘍全体の増殖・悪性化を亢進する(本文参照)。

hypoxia)，“瀕死の虚血がん細胞”は低酸素がん細胞(hypoxic tumor cells)と呼ばれている。低酸素がん細胞は、「瀕死状態」ではあるが、その劣悪な環境に適応しようと努力している。その努力の一翼を担っているのが低酸素応答転写因子として単離された hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) である。HIF-1は、低酸素条件下で速やかに活性化され、糖代謝や糖輸送に関与する遺伝子の発現を誘導したり、血管新生因子や増殖因子の発現を促進したりして、栄養環境の改善を図る。アポトーシスの回避や、遺伝子変異を誘導する遺伝子の発現をうながして、死を免れようとする。その一方で、転移や浸潤に関わる遺伝子の発現を誘導して、自ら新天地を切り開こうとする。このような「生き残り」のための行動が、がん全体の悪性化に繋がっていたのである¹⁾。また、低酸素領域の構造的な要因で、低酸素がん細胞は、がん治療に対して抵抗性である²⁾。血流によって運ばれる抗がん剤は、血管から遠い低酸素がん細胞までは効率よく運ばれないため、治療に有効な濃度に達する機会が少ない。また、多くの抗がん剤は、分裂している細胞を標的にしてい

るため、増殖を停止している低酸素がん細胞では有効に作用しない。更に、酸素分子により細胞死誘導能が増強される放射線やある種の抗がん剤は、低酸素条件下ではその治療効果が十分に発揮できない。したがって、放射線や抗がん剤治療の後に、周辺の活発に分裂していたがん細胞が死滅しても、低酸素がん細胞は生き残る場合があり、治療不良・再発の原因となることが示唆されている³⁾。一方で、固形腫瘍内の低酸素領域の酸素濃度は、無酸素状態(0%)に隣接するところまで続いており、正常組織にあり得ない低酸素状態にあるがん細胞が存在するため、腫瘍特異的標的になりうる。

低酸素(HIF-1)の制御機構

1992年に Semenza と Wang によって低酸素応答転写因子 HIF-1 の存在が報告され⁴⁾、1995年に単離・精製されて⁵⁾以来、分子レベルの研究が加速度的に進み、HIF-1の機能とがんとの関わりが次々に明らかになってきた。HIF-1によって直接発現が誘導される遺伝子

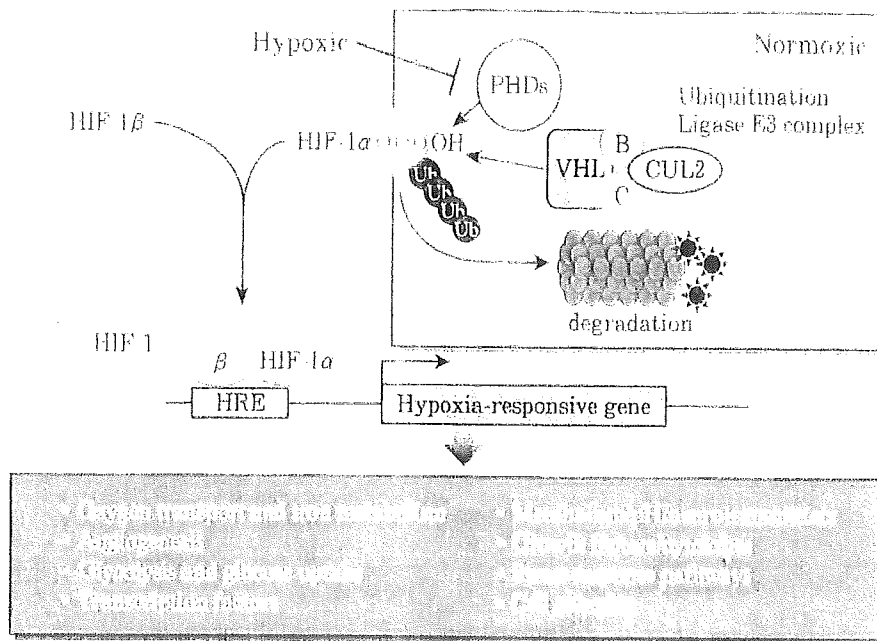


図2 HIF-1αの酸素依存的分解制御

有酸素細胞内では、プロリン水酸化酵素 (PHDs) によって修飾され、ユビキチン化酵素 (ubiquitin ligase E3 complex) がその修飾を認識して、VHLを介して結合する。ユビキチン化された HIF-1α はプロテアソームで分解される (右上図)。PHDs は酸素を必要とするため、低酸素細胞内では機能せず、HIF-1α は安定化する。低酸素細胞内では、HIF-1α は HIF-1β と結合して、転写因子 HIF-1 を形成し、様々な遺伝子の発現を誘導する。

の同定が盛んに行われ、現在までに既に 60 以上が報告されている¹⁾。これらの遺伝子は、プロモーター、エンハンサー領域に HIF-1 結合配列 hypoxia-responsive element (HRE) を持っており、HIF-1 が p300/CBP とユニットを作って HRE に結合し転写を促す。

HIF-1 は、αβ の異なる 2 つのサブユニットからなる (図 2)。β サブユニット (HIF-1β) は恒常的に発現しているが、α サブユニット (HIF-1α) の発現量は翻訳後修飾と翻訳レベルで厳密に制御されている (図 3)。従って HIF-1 の活性は HIF-1β に結合できる HIF-1α がどのくらい存在するかによって依存している。HIF-1α の翻訳後修飾による制御は、酸素依存的なプロリン水酸化酵素 (PHDs) により主になされているが、腫瘍によっては、p53-Mdm2 による制御も報告されている²⁾。転写活性制御は酸素依存的なアスパラギン酸水酸化酵素 (FIH) による抑制と、mitogen-activated protein kinase (MAPK) を介する活性化が知られている。翻訳レベルの制御は酸素非依存的で、増殖

因子等による phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) や ERK (extracellular-signal-regulated kinase) を介するシグナル伝達系の活性化が関与している。

3.1.2 HIF-1α の翻訳後修飾と翻訳レベルの制御

HIF-1α が有酸素状態の細胞内で分解される機構は、2001 年に PHDs がクローニングされることにより、ほぼ全容が解明された³⁾。有酸素状態の細胞内では、HIF-1α の 402 と 564 番目のプロリン残基が PHDs により翻訳後修飾を受け目印が付けられる。この目印をめぐって E3 ubiquitin-ligase complex が von Hippel-Lindau (VHL) を介して結合する事で Ubiquitin-mediated degradation が起こり、HIF-1α はプロテアソームで分解される (図 2)。即ち、有酸素状態の細胞 (通常の酸素状態にある細胞) では、HIF-1α タンパク質は常に作られ、即時に壊されるという不経済なタンパク質ではあるが、細胞が低酸素等のス

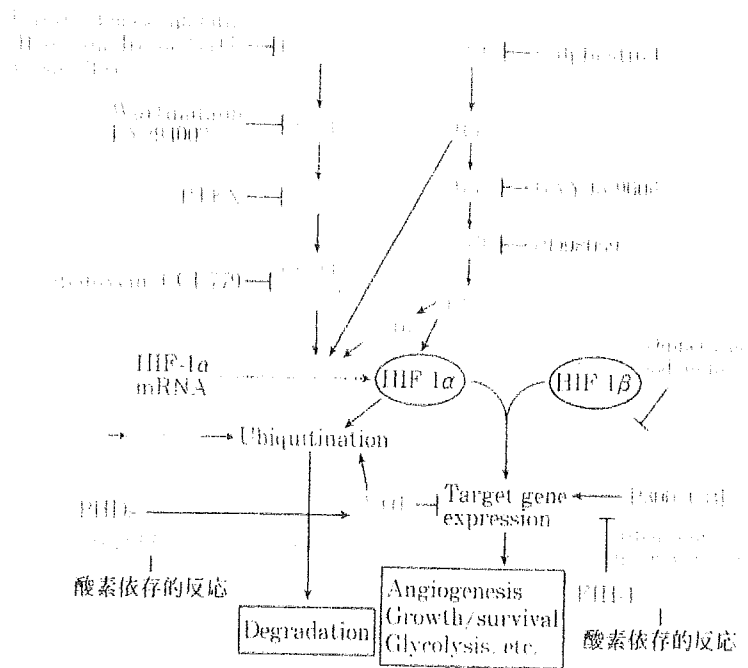


図3 HIF-1の発現・活性の制御機構と阻害物質
 HIF-1の制御に関わる因子を青字で、それらの阻害物質を赤字で示してある、
 詳細は本文参照。

表1 HIF-1活性の制御機構

タンパク質分解	フロリン水酸化酵素 P53 Mdm2	ユビキチン化	酸素依存的 / 細胞非特異的
転写活性抑制	アスパラギン酸水酸化酵素	ユビキチン化	酸素非依存的 / 細胞特異的
転写活性上昇	Raf-MEK-ERK シグナル	C末転写活性	酸素依存的 / 細胞非特異的
翻訳レベル上昇	PI3K-Akt-mTOR シグナル	HIF-1/p300 複合体形成	酸素非依存的 / 細胞特異的
翻訳レベル上昇	Raf-MEK-ERK シグナル	eIF-4E 活性	酸素非依存的 / 細胞特異的
		eIF-4E 活性	酸素非依存的 / 細胞特異的

トレス状態になった場合に、即座に対応できるように準備されている SOS 的な存在であると考えられる。PHDs はヒトでは 3 遺伝子がクローニングされており¹⁴、有酸素状態の細胞で主に HIF-1 α の分解を担当しているのは PHD2 であるという報告がある¹⁵。PHDs の機能は酸素濃度依存的である(表 2)が、必ずしも絶対酸素濃度により決定されている訳ではない。ヒトの組織の酸素濃度は、各々至適酸素濃度があり、例えば通常の酸素濃度が 20% に近い組織では、5% まで酸素濃度が下がると HIF-1 α の発現が確認できるようになる。一方で、通常の酸素濃度が 5% 程度の組織では、その濃度でも HIF-1 α の発現が認められない。つまり、PHDs の機能は、各々の組織細胞において、

「異常に低い酸素濃度」と PHDs が察知した時に機能していると考えられる。

アスパラギン酸水酸化酵素を介する転写活性抑制

HIF-1 α の転写活性ドメイン TAD-C に存在する 803 番のアスパラギン酸を水酸化する酵素 FIH-1 (factor inhibiting HIF-1) は、有酸素状態の細胞内で HIF-1 α を水酸化する事により p300/CBP と HIF-1 α との結合を阻止し、転写活性を抑制する¹⁶(表 1)。FIH-1 は更に VHL とも結合し、histone deacetylase を HIF-1 α にリクルートすることにより、有酸素状態で HIF-1 の転写活性を抑制することが報告されている¹⁷。

表 2 HIF-1 活性を制御する水酸化酵素

	細胞内分布	mRNA 誘導	HIF-1 α 核内移行	機能 / 備考
PHD1	核	酸素非依存的	阻害する	低酸素での HIF-1 α の分解 / estrogen により誘導 低酸素下で Siah2 により分解
PHD2	細胞質	酸素依存的	阻害する	有酸素での HIF-1 α の分解 / 低酸素で発現上昇
PHD3	細胞質と核	酸素依存的	阻害する	低酸素での HIF-1 α の分解 / 低酸素下で Siah2 により分解
PHI1	細胞質	酸素非依存的	阻害しない	有酸素での転写活性阻害 / 発現量は酸素非依存的

調製と評価

EGFR や PDGFR 等のチロシンキナーゼ受容体および下流のシグナル伝達因子は、がん遺伝子として同定されているものが多く、ヒト腫瘍におけるこれらの因子の変異や過剰発現は珍しくない。そのような腫瘍で、HIF-1 α の発現量が増え、HIF-1 活性が上昇したという報告が多数ある。たとえば、PTEN の loss of function mutant による PI3K-AKT-mTOR を介するシグナルの亢進や、Ras や Raf 癌遺伝子の変異による Raf-MEK-ERK シグナル亢進が HIF-1 の翻訳レベルを上昇させる (図 3)。HIF-1 α の翻訳レベル制御が、上述した翻訳後修飾と異なる点は、酸素非依存的である事に加えて、細胞特異性がある事である (表 2)。この細胞特異性は、HIF-1 α の発現量を上昇させる PI3K-AKT-mTOR や RAF-MEK-MAPK のシグナル伝達系 (図 3) を活性化する条件、つまり増殖因子やサイトカイン、その他の活性化因子の量やがん遺伝子の活性化の状態に依存していると考えられる。HIF-1 α の発現量が増えることによって、上記の酸素依存的分解を上回る量の HIF-1 α タンパク質が細胞内に存在すると、有酸素状態の細胞でも HIF-1 転写活性が見られるようになり、がんの悪性化に関与する遺伝子の発現が誘導される。

III HIF-1 活性の可視化

以上のように、固形腫瘍内の HIF-1 活性は、がん治療、特に難治性のがんにおいて、極めて重要な因子であり、抗がん治療効果を高め、再発・悪性化を予防するためには、固形腫瘍内の HIF-1 活性の分布を明確にするモニター手法が望まれている。現在、腫瘍内 HIF-1 活性をモニターするために、前述した HIF-1 結合

DNA 配列 HRE を含んだレポーターベクターを用いる方法がとられている。レポーター遺伝子としては、蛍光タンパク質や化学発光をおこすルシフェラーゼタンパク質をコードしている遺伝子が用いられている¹¹⁾。我々は、5 個の HRE を持つプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーターを組み込んだヒトがん細胞を用いて HIF-1 活性をモニターする系を構築した¹²⁾ (図 4 A)。レポーターを組み込んだヒトがん細胞をヌードマウスに移植すると、形成した腫瘍内の低酸素環境にตอบสนองしてルシフェラーゼタンパク質が発現され (図 4 B) 基質であるルシフェリンを投与後一定期間、発光反応を起こす。この化学発光を、冷却高感度 (CTD) カメラを搭載したイメージング機器 in vivo imaging system (IVIS) を用いて可視化することができる (図 4 C)。つまり、このシステムを用いることにより、同一担がんマウスの固形腫瘍内低酸素領域の変化を定量的に、リアルタイムで、何度でも経時的に観察することが可能である¹³⁾。しかも発光シグナルを定量化することにより、低酸素がん細胞の増減を数量化したデータとして推移を観察することができる。この系が確かに腫瘍内の低酸素状態をモニターしていることを確認する目的で、腫瘍を形成した下肢を縛ることで血行を悪くして、物理的に低酸素領域を増やす操作を行った (図 4 C)。腫瘍内のルシフェラーゼ発現を IVIS で経時的に観察したところ、HIF-1 活性が時間とともに上昇し、低酸素領域が増加していることが確認できた¹⁴⁾。

IV がん治療の標的としての HIF-1

HIF-1 α の過剰発現が、HIF-1 転写活性の増強に繋がり、がんの悪性化に関与する遺伝子の発現を誘導することにより、がんによる死亡率を上げることにな

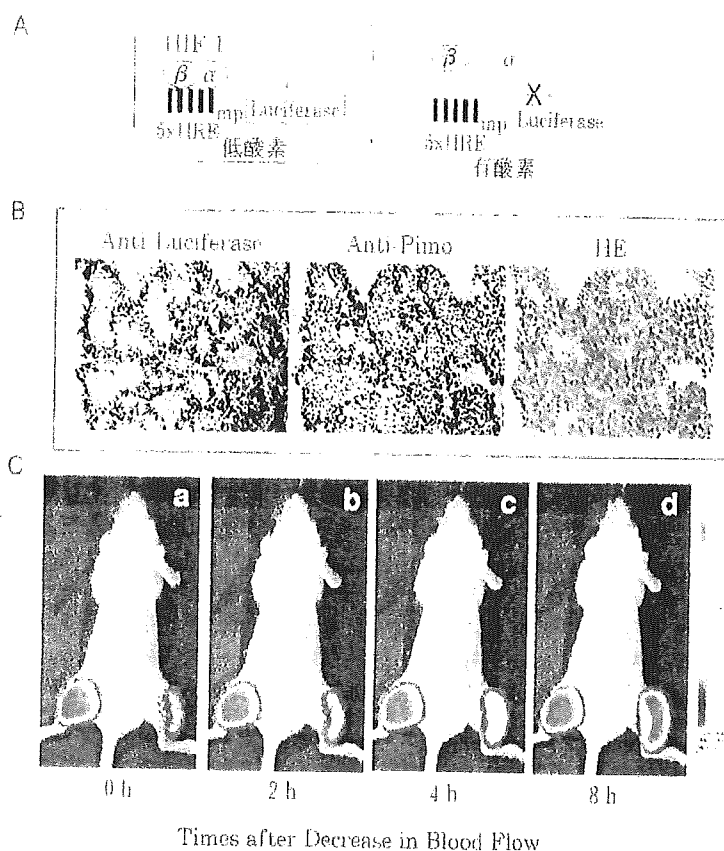


図4 ルシフェラーゼによる化学発光を用いた低酸素がん細胞の可視化

A: 低酸素応答プロモーター 5HRE は、VEGF 遺伝子の低酸素応答エンハンサー(HRE)を並列に5個つなげた配列に、哺乳動物細胞で転写活性を有するプロモーターの最小単位(mp: minimum promote)を組み合わせた構造をしており、5HREの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポータープラスミドを体細胞DNAに安定に組み込んだヒトがん細胞を樹立した。低酸素状態の細胞では、転写因子HIF-1がHRE配列に結合してルシフェラーゼが発現する(左)。有酸素状態の細胞では、HIF-1 α が分解されるためHIF-1が形成されずルシフェラーゼの発現は起こらない(右)。

B: Aで示したがん細胞をヌードマウスに移植して形成した固形腫瘍の連続切片を抗ルシフェラーゼ抗体(左)、抗低酸素マーカー-pimonidazole抗体(中央)で免疫染色した。生細胞と死細胞を識別するためにHE染色(右)を行ったところ、ルシフェラーゼの発現している領域が低酸素マーカーで染色された領域(ともに濃い茶色)がほぼ一致し、更に生細胞と死細胞の境界領域に位置しており、ルシフェラーゼの発現領域が低酸素がん細胞であることが確認できた。

C: Bの固形腫瘍がある右足の付け根を紐でしばって血流を下げることで、腫瘍内の低酸素領域を増やした場合のルシフェラーゼの発現増加過程をしらべるために、ルシフェリンとの反応による化学発光を*in vivo*イメージングシステムで経時的(結紮直後、2、4、8時間後)に調べた。

る。事実、ヒトがんから採取された生検サンプルを、抗HIF-1 α モノクローナル抗体を用いた免疫染色を行うことで、脳腫瘍、乳がん、中咽頭がん、子宮頸がん、卵巣がん、子宮がんを含む大多数のヒトがんにおいて

HIF-1 α が過剰発現しており、HIF-1 α の過剰発現と患者の死亡率に相関関係があることが報告されている(文献5、6参照)。病理的な解析で進行癌のステージが低くても、HIF-1 α の発現が高い場合は、死亡率が

高いという報告もある。腫瘍内の HIF-1 α の過剰発現を引き起こす要因としては、低酸素、遺伝子変異、増殖因子等が挙げられる。したがって、HIF-1 の活性を抑制することで、がんの増殖を抑制し、悪性度を下げることができると考えられ、これまでに様々な試みが行われており、動物実験レベルでも HIF-1 活性を抑えることが抗がん治療に非常に有効であることが報告されている。

1.2.1 シグナル伝達阻害剤

現在 HIF-1 α の発現レベルを抑える作用がある抗がん剤として挙げられているのは、前述した HIF-1 α 翻訳レベルを上昇させる PI3K-AKT-mTOR や RAF-MEK-ERK シグナル伝達阻害剤である(図 3, 文献 5, 6 参照)。BAY 43-9006(RAF), Gleevec[®] (TKI), OSI-779(mTOR), Celebrex[®] (COX2), PD98059 (MEK), Herceptin[®] (Tyrosine kinase), Trastuzumab[®] (Tyrosine kinase), Gefitinib[®] (Tyrosine kinase) が例として挙げられる。しかしながらこれらの抗がん剤は、標的が HIF-1 α 以外であるため結果的に HIF-1 α の翻訳レベルが低下しているが、そのことがこれらの抗がん効果にどれくらい貢献しているかの評価は難しい。

1.2.2 HIF-1 活性抑制

HIF-1 の活性を抑制している薬剤としては、2-methoxyestradiol (2ME2), YC-1, topoisomerase I inhibitors, 17-AAG, thioredoxin inhibitors が挙げられる(図 3, 文献 5, 6 参照)。2ME2 は microtubule polymerization を壊す作用があり、YC-1 は guanylate-cyclase 活性を促進する作用があることがわかっているが、HIF-1 α の活性が何故抑制されるのかは解明されていない。Topoisomerase I inhibitor も HIF-1 α 抑制機構についてはわかっていない。17-AAG は、ER で HIF-1 α に結合するシャペロン分子である HSP90 に直接結合して HSP90 の機能を阻害することが分かっており、結果 HIF-1 α はユビキチン-プロテアソーム系による分解とは関係なく分解することが分かっている。Thioredoxin は HIF-1 転写複合体の一員と示唆されている Ref-1/Apc の制御を介して HIF-1 α の発現を促進する作用があり¹⁴、thiore-

doxin inhibitor はそれを阻害することで HIF-1 活性を下けている。これらは、いずれも HIF-1 α の発現および腫瘍の増殖を抑える作用が報告されている。これらの HIF-1 活性抑制剤もシグナル伝達阻害剤と同様に、HIF-1 に対する特異性という点では明確でなく、上記シグナル伝達阻害剤と同様に HIF-1 活性阻害が、どれくらい抗がん作用に貢献しているかを評価するのは難しい。

1.2.3 低酸素特異的抗がん剤 (HIF-1 阻害剤)

上記 HIF-1 阻害剤や活性抑制剤は、“分子標的アプローチ”であるのに対し、我々は、いわば“微細環境標的アプローチ”といえる手法を用いて HIF-1 のターゲットに挑んだ。すなわち HIF-1 α と同様の酸素依存的制御を受ける細胞死誘導タンパク質を構築し、低酸素がん細胞を特異的に死滅させるという方法である¹⁵。任意のタンパク質に、HIF-1 α の酸素濃度依存的分解 (ODD) ドメイン (PHDs により水酸化される P564 を含む) を任意のタンパク質に融合させると、その融合タンパク質は、HIF-1 α と同様の PHDs による翻訳後修飾による制御を受けるようになる(図 5 A)。低酸素がん細胞を特異的に殺すため、ODD に融合するタンパク質として、強力なアポトーシス誘導能を有する caspase-3 の前駆体 procaspase-3 を選択した。Procaspase-3 は、過剰発現しても細胞死を誘導することはないが、上流のカスパーゼ等により切断されて活性型になると、死刑執行人と称されるほど、強力に細胞死を誘導する。ODD-procaspase-3 融合タンパク質を血流の悪い腫瘍内低酸素領域までデリバリーさせるために、AIDS ウイルスの TAT タンパク質が有する膜透過ドメイン PTD を融合させた。TAT-PTD は、融合したタンパク質を脳を含む全身の組織細胞にデリバリーさせることができる¹⁶。最終的に構築したタンパク質製剤 TOP3 (TAT_{PTD}-ODD-Procaspase-3) は、PTD による DDS 機能と ODD による低酸素細胞特異性を有する抗がん剤として、培養細胞では低酸素特異的に細胞死を誘導し、動物実験でも抗腫瘍効果を発揮した^{17,18,19,20}。上述した低酸素がん細胞をイメージングする方法を用いて、実際に *in vivo* で低酸素がん細胞を標的にしているか否かを検証した結果、TOP3 治療群

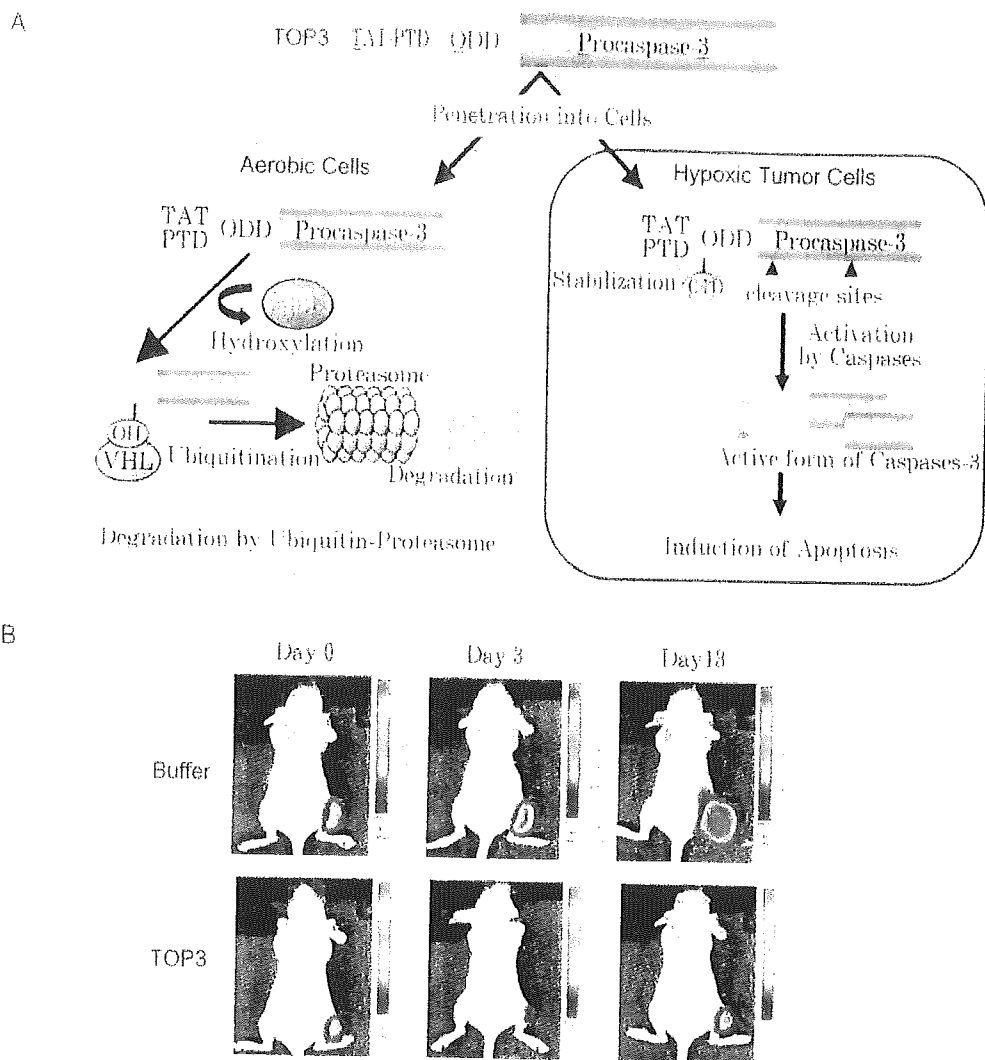


図5 TOP3の作用機序とTOP3処理による低酸素がん細胞の推移

A: TOP3の作用機序を模式的に示した。TOP3は、TAT-PTDの機能により細胞膜を通過して細胞内に入り(上)、有酸素状態ではHIF-1 α と同様にユビキチン-プロテアソーム系(図2)で分解される(左)が、低酸素状態では分解されず、低酸素ストレスにより活性化されている内在性のカスパーゼによってProcaspase-3が切断されて活性型Caspase-3になって細胞死を誘導する(右)。

B: 下段に図4Aのレポーターを有する細胞の移植腫瘍を持つ担がんマウスを、TOP3またはBufferで処理して、低酸素がん細胞で発現しているルシフェラーゼの活性を*in vivo*イメージングシステムで毎日観察し、化学発光量(photons/sec/ROI)を計測した。データのうち、day0、3、13における代表的な観察図を示した。

では、顕著に低酸素がん細胞からの発光シグナルが抑えられていることが確認でき、TOP3の*in vivo*での低酸素がん細胞特異的抗がん作用を強く示唆する結果を得た(図5B)。また、経時的に腫瘍の切片を作成して、免疫組織染色法にて固形腫瘍内の低酸素領域を調べた結果、TOP3投与後48時間以内に低酸素領域が顕著に減少していることが確認できた。さらに、TUNNEL

アッセイを行って切片におけるアポトーシスをTOP3投与後12時間で観察したところ、TOP3投与群の腫瘍では、有意に高いTUNNEL陽性反応が、生細胞と壊死領域の境界領域に存在し、TOP3は、固形腫瘍内でも低酸素がん細胞にアポトーシスを誘導していることが示唆された¹⁴⁾。

TOP3処理で、放射線抵抗性を有する低酸素がん細胞

胞を積極的に腫瘍から排除することにより、放射線治療効果を高めることができるか否かを検証した。TOP3 処理後1日目に 15 Gy の放射線を照射した。放射線処理単独でも顕著な抗がん効果が見られたが、TOP3 と併用することで、明らかに腫瘍の再増殖を遅らせることができた。この結果は、TOP3 処理により固形腫瘍から低酸素がん細胞が除去されたためであり、低酸素がん細胞が放射線治療後の再発に寄与していることを支持すると共に、有酸素がん細胞と低酸素がん細胞をほぼ同時に処理することががん療効果を高めることを示していると言える。

おわりに

動物実験におけるデータであるが、低酸素がん細胞は、腫瘍径が 1 mm 以下でも既に存在することが確認されている。“低酸素あるところには必ず HIF-1 あり”ということであれば、HIF-1 は腫瘍形成の初期から貢献している事になる。分子標的の対象因子と異なり、低酸素は“正常組織には存在しない環境因子”である。従って、HIF-1 の存在する細胞を特異的にイメージング・ターゲティングすることができれば、がんの悪性化に参与する低酸素がん細胞の存在を確認し、攻撃することが可能になる。その点で“環境標的アプローチ”は“HIF-1 の存在する細胞”を標的にするという、極めて特異性の高い、新しい腫瘍へのアプローチを提案しているといえる。

文 献

- 1) Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P : Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors : a review. *Cancer Res* 49 : 6449-6465, 1989
- 2) Harris AL : Hypoxia-A key regulator factor in tumor growth. *Nature Rev Cancer* 2 : 38-47, 2002
- 3) Kizaka-Kondoh S, Inoue M, Harada H, Hiraoka M : Tumor hypoxia : A target for selective cancer therapy. *Cancer Sci* 94 : 1021-1028, 2003
- 4) Höckel M, Schlenger K, Aral B et al : Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 56 : 4509-4515, 1996
- 5) Semenza GL : Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3 : 721-732, 2003
- 6) Giaccia A, Siim BG, Johnson RS : HIF-1 as a target for drug development. *Nat Rev Drug Discovery* 2 : 1-9, 2003
- 7) Brown JM : Exploiting the hypoxic cancer cell : mechanisms and therapeutic strategies. *Mol Med Today* 6 : 157-162, 2000
- 8) Semenza GL, Wang GL : A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12 : 5447-5454, 1992
- 9) Wang G, Semenza GL : Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270 : 1230-1237, 1995
- 10) Ravi R et al : Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 14 : 34-44, 2000
- 11) Epstein AC et al : C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107(1) : 43-54, 2001
- 12) Berra E et al : HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J* 22 : 4082-4090, 2003
- 13) Mahon PC, Hirota K, Semenza GL : FIH-1 : a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 15 : 2675-2686, 2001
- 14) Vordermark D, Shibata T, Brown JM : Green fluorescent protein is a suitable reporter of tumor hypoxia despite an oxygen requirement for chromophore formation. *Neoplasia* 3 : 527-534, 2001
- 15) Serganova I et al : Molecular imaging of temporal dynamics and spatial heterogeneity of hypoxia-inducible factor-1 signal transduction activity in tumors in living mice. *Cancer Res* 64 : 6101-6108, 2004
- 16) Harada H, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M : Optical Imaging of Tumor Hypoxia and Evaluation of Efficacy of a Hypoxia-targeting drug in living animals. *Mol Imaging* : in press
- 17) Ziel KA et al : Ref-1/Ape is critical for formation of the hypoxia-inducible transcriptional complex on the hypoxic response element of the rat pulmonary artery endothelial cell VEGF gene. *FASEB J* 18 (9) : 986-988, 2004
- 18) Harada H, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S : Antitu-

- mor effect of TAT-oxygen-dependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells. *Cancer Res* 62 : 2013-2018, 2002
- 19) Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF : In vivo protein transduction : delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285 : 1569-1572, 1999
- 20) Inoue M, Mukai M, Hamanaka Y et al : Targeting hypoxic cancer cells with a protein prodrug is effective in experimental malignant ascites. *Int J Oncol* 25 : 713-720, 2004
-