

# 『低酸素癌細胞』を標的とした 癌のイメージング・ターゲティング

近藤科江, 原田 浩, 平岡真寛

生体イメージングは、同一個体での癌の進行や治療効果を経時的に観察することを可能にし、治療のうえでのポイントとなる時期の決定を容易にしてくれる。経済性に優れ、動物にも優しい手法である。癌研究では、癌細胞を可視化し、位置や大きさといった物理的情報を得ることが多いが、さまざまな遺伝子発現プロモーターを用いることにより、質的情報も得ることができる。われわれは、癌の悪性度の指標とされる腫瘍内低酸素癌細胞を化学発光で可視化する系を構築し、癌の早期発見・早期治療のために開発中のイメージング・ターゲティング材料の標的特異性評価に用いている。

## はじめに

ルシフェラーゼのレポーターとしての有用性は、培養細胞への一過性発現実験によって示されており、転写因子研究において頻用されてきた。小動物のイメージング機器が開発されて、ルシフェラーゼ活性を個体レベルで測定することが可能になり、培養細胞を用いて行っていた実験が個体レベルで可能な時代になった。具体的には、ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を安定に保持する細胞株を構築し、それをマウスに移植し、移植した細胞から産生される微弱な光（ルミネッセンス）を超高感度 CCD カメラにより捉え、さらにソフトウェアによりデジタル処理して可視化する装置を用いて観察する。従来の培養細胞を用いた実験同様、ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子につなぐプロモーターを変えることで移植した細胞からさまざまな情報を得ることができる。さらに、特定の遺伝子のプロモーターの下流にルシフェラーゼをつないだレポーター遺伝子を、全身の体細胞にもつトランスジェニックマウスを構築して、生体における特定の遺伝子の発現する時期や組織・量を調べる研究も行われており、この手法による研究の飛躍的な発展が期待できる。

## 生体の光イメージング

ルシフェラーゼを用いた化学発光は、組織透過性に富む光の条件である波長 600 nm 以上の光を発生することができ、1 cm を超える透過性をもつため、マウスでは、深い組織内の腫瘍でも、量の推移を経時的に観察することができ、同所移植モデルのように外部からは観察が不可能な癌の研究に有効である（図1）。化学発光イメージングの利点は、高感度性、迅速性および定量性に加えて、何よりも特殊な技術を必要とせず、誰にでも、短時間にイメージを撮ることができる簡便

性にある。蛍光物質を用いたイメージングでは、蛍光物質の光安定性や蛍光の組織透過性の問題からリアルタイムで連続的に観察することは難しく、さらに自家蛍光などによるバックグラウンドの高さから、現行の冷却型 CCD カメラを用いたイメージング装置では、蛍光観察に定量性をもたせることは困難である。その一方で、蛍光物質は、ルシフェラーゼのように基質を必要とせず、常時可視化できる点は、一過性の活性を可視化しているルシフェラーゼよりも測定上の誤差が少ない。

現在、蛍光の退色時間を自動的に算出することにより、蛍光を発している細胞

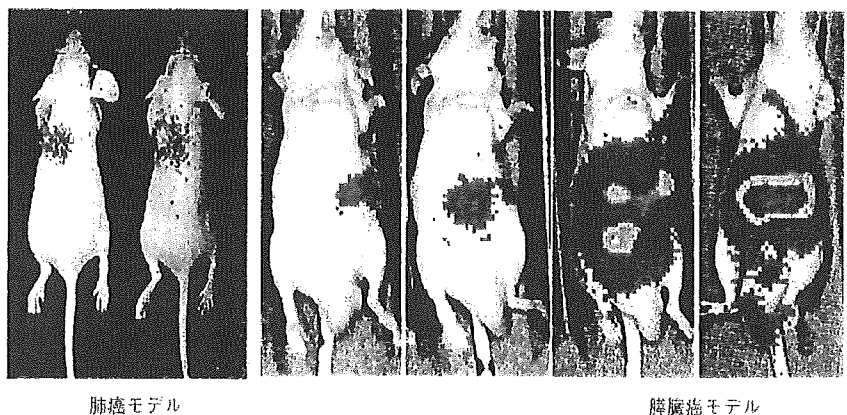


図1 ●癌の同所移植モデル

(左) ヒトの肺癌細胞をマウスの肺に移植して、肺で増殖した癌細胞を観察 (右) ヒトの肝癌細胞をマウスの臓器に移植し、癌が臓器から腹腔播種に移行する様子を観察 (化学発光が強いところは赤色に、少なくなるにつれて黄・緑・青・紫に表示される (IVIS<sup>®</sup>200にて撮影))

の位置や大きさをほぼ正確に、光で画像化するノドを搭載しているイメージング機器。日本発を波長の違いで画像処理し、バックグラウンドをほぼ完全に除いてイメージングする装置が開発されている。また、700 nmを超え近赤外に近い波長をもつ蛍光プローブも開発されており、将来的には多種多様にある蛍光タイプのプローブを使い分けて、多重染色により一つの腫瘍から複数の情報を同時に得ることが可能になると考えられる。

個体レベルで癌細胞を画像化する方法としては、放射線同位元素を用いたPETや磁性体を用いたMRIなどの方法が主流であるが、少なくともマウスにおいては、光イメージングが簡便性と経済性において、PETやMRIよりも優れており、これからブローブが多彩になっていくことにより、得られる情報量もPETやMRIを凌ぐものになると思われる。ただし、現状では、光プローブには透過性に限界があり、大型動物やヒトへの応用は現時点では難しく、臨床への応用は、体表に近い癌や、術中観察に限定されると思われる。

### 微小環境標的

癌に対する治療は、特定の癌に特徴的な分子を標的にした治療薬、いわゆる「分子標的治療薬」の研究開発により、大きな成果をあげている。一方で、どこまでできるかわからない癌を早期に発見・治療するためには、癌に共通して存在し、かつ正常組織には存在しない特徴を標的にする必要がある。固形癌に共通して存在する低酸素領域は、正常組織には存在しないため、最適な標的と考えられる。特定の分子を標的にする「分子標的」に対して、われわれの標的は「微小環境標

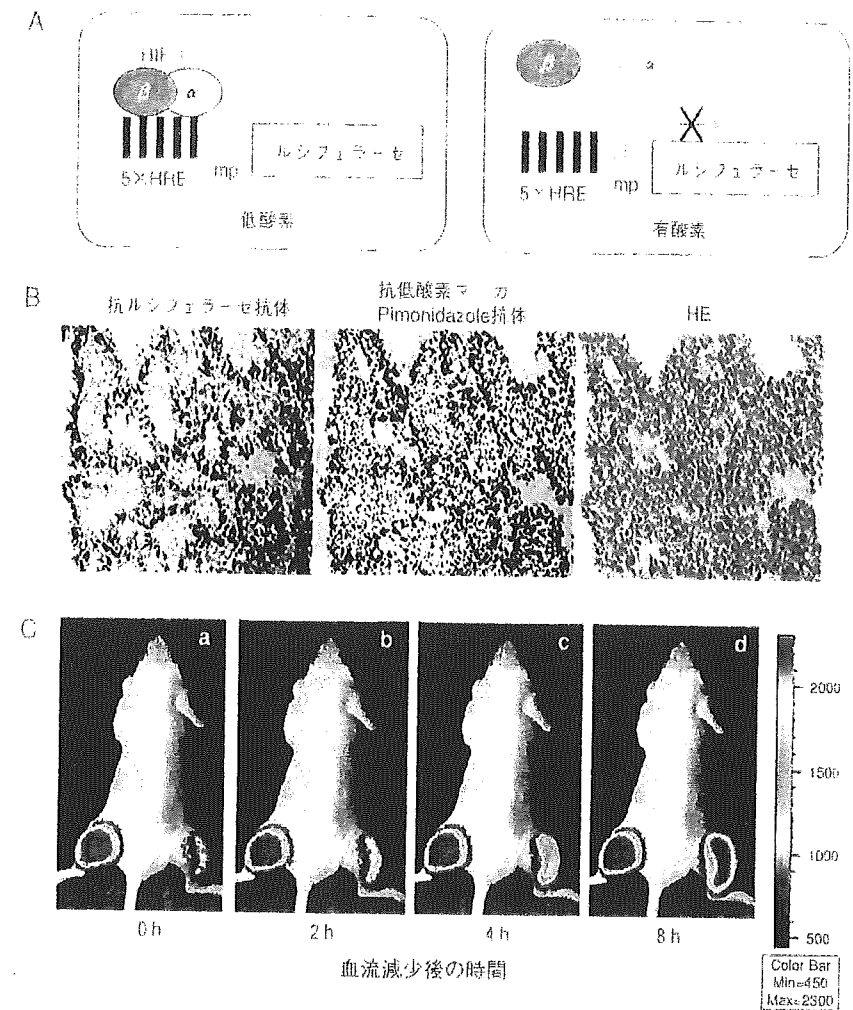


図2●ルシフェラーゼによる化学発光を用いた低酸素癌細胞の可視化

A) 5HRE-ルシフェラーゼレポーターフラズミドを体細胞DNAに安定に組み込んだヒト癌細胞（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）が、有酸素状態の細胞では、HIF-1 $\alpha$ 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） mp: minimum promoter) B) Aで示した癌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（紫色）と死細胞（棕色）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（ともに濃い紫色）と一致しており、ルシフェラーゼの発現領域が低酸素癌細胞であることが確認できた。C) Aの癌細胞を移植して作った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、ルシフェラーゼの発現を経時的（結紮直後、2、4、8時間後）に調べた。左足の腫瘍は、イメージング操作の誤差を防ぐためのコントロール。左足のイメージが実験を通して一定になるように画像処理をした。

的」といえる。悪性度の高い癌でより多く含まれているとされる低酸素領域は、1 mm以下の微小な癌にも存在するといわれており、初期の癌や転移癌の早期発見のための良い標的になりうる。われわれは、「微小環境標的」のための基礎的材料を、まず光イメージングを用いて開発・評価し、PETやMRIといった臨床応用可能なものの開発に繋げる計画である。

### 低酸素癌細胞とHIF-1

腫瘍内部には、酸素も栄養も枯渇して壊死した細胞領域がある。その周辺の癌細胞は、栄養や酸素が不足しているため、増殖を停止したり、解糖系代謝を行ったりして、何とか生きているが「死ぬべき運命にある弱った癌細胞」である。これ

らの癌細胞（低酸素癌細胞）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。その努力の翼を担っているのが低酸素応答転写因子 HIF-1 である。通常の酸素濃度にある細胞内では活性が認められない HIF-1 は、低酸素条件下ですみやかに活性化され、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産生を促したりして、栄養環境の改善を図る。アポトーシスの回避や、遺伝子変異を引き起こす遺伝子の発現を誘導して、死を免れようとする。その一方で、転移や浸潤にかか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「連日の「生き残り」のための行動が、実は癌全体の悪性化に繋がっていたのである」。

### 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、癌治療、特に難治性の癌において、きわめて重要な因子であり、抗癌治療効果を高め、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ことが重要である。HIF-1 によって活性化される遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域には、HIF-1 が直接結合する配列 HRE (hypoxia responsive element) が存在する。われわれは、5 個の HRE をもつプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポータープラスミド (5HRE-Luciferase) <sup>1)</sup> を安定に保持するヒト癌細胞株を樹立している (図 2A)。

これらの癌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領域でルシフェラーゼタンパク質が発現され (図 2B)、基質であるルシフェリンを投

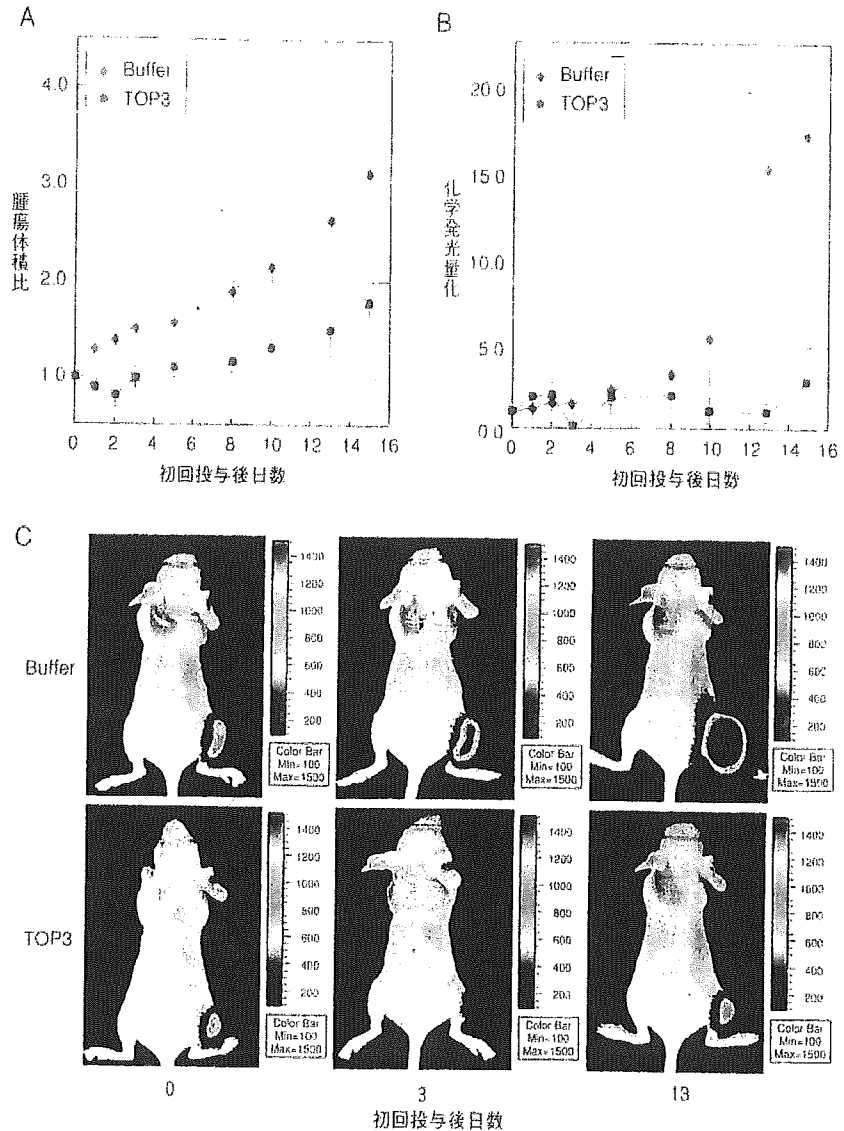


図3 ● 固形腫瘍内低酸素癌細胞の推移と治療効果の検証

A) 図 2-A の固形腫瘍を TOP3 または Buffer で 5 日おき (0 日, 5 日, 10 日) に処理して、腫瘍の大きさを計測し、0 日との大きさの比でグラフに示した。B) A の計測と同時にリアルタイムイメージングシステムで化学発光量 (photons/sec/ROI) を計測し、0 日の化学発光量との比でグラフに示した。C) B のデータのうち、0 日、3 日、13 日における平均的な画像を示した。

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 CCD カメラを搭載したリアルタイム *in vivo* イメージング装置 IVIS™ を用いて可視化している。つまり、このシステムを用いることにより、同一担癌マウスの固形腫瘍内低酸素領域の変化を、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り、しかも発光シグナルを定量することにより、低酸素癌細胞の増減を数量化して推移を観察することができる。この系が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り血行を悪くして、物理的に低酸

素領域を増やす操作をすると、腫瘍内のルシノフィラーゼ発現は、結紮時間が経過するとともに上昇した(図2 C)。この結果は、HIF-1が活性化している細胞を可視化することにより、われわれのイメージング・ターゲティングのための「微小環境標的」を可視化できていることを意味している。

### 低酸素特異的融合タンパク質の構築

HIF-1は、 $\alpha$ と $\beta$ の2つのサブユニットから構成されている。HIF-1 $\alpha$ は、酸素依存的なユビキチン化を受けて、有酸素状態の細胞内では、翻訳後すみやかに分解される<sup>8)</sup>。HIF-1が活性化している細胞を特異的に捕らえるために、われわれは、HIF-1の低酸素依存的活性を制御しているHIF-1 $\alpha$ と同じ酸素依存性をもつ融合タンパク質を構築した。具体的には、HIF-1 $\alpha$ タンパク質のほぼ中央にある酸素依存的分解ドメイン(oxygen-dependent degradation domain: ODD)内のコアになるアミノ酸配列を任意のタンパク質に融合させると、そのODD融合タンパク質は、HIF-1 $\alpha$ と同様に、有酸素状態の細胞ではすみやかに分解され、低酸素状態の細胞では安定に存在する。つまり、ODDを融合させることによって、タンパク質がもつ機能を酸素依存的に制御できるようになる<sup>9)</sup>。例えば、融合するタンパク質にイメージング機能をもたせることにより、低酸素癌細胞をイメージングするプローブを作ることができる。

### 低酸素癌細胞のターゲティング

低酸素癌細胞をターゲティングするた

め、ODDに細胞死誘導タンパク質とし、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。*in vivo*でのデリバリー能をもたせるために、AIDSウイルスのTATタンパク質が有する膜透過ドメイン(PTD)(protein transduction domain)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<sup>8)</sup>。最終的に構築したタンパク質製剤TOP3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癌剤として、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(図3 A)<sup>10,11)</sup>。上述した低酸素癌細胞をイメージングする方法を用いて、実際に*in vivo*で低酸素癌細胞を標的にしているか否かを検証した結果、TOP3治療群では、顕著に低酸素癌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(図3 B, C)。TOP3が*in vivo*で低酸素癌細胞特異的抗癌作用をもつことを強く示唆する結果を得た。現在、低酸素特異的イメージングプローブの作製を行っており、少なくとも光イメージングでは、低酸素癌を捕らえることができるところまで来ている。

### おわりに

光イメージングの簡便性は、将来「ベッドサイドでの画像診断」といった夢のような話を実現させてくれる可能性もっている。それを実現するためには、光の透過性を革新的に高める技術や、機械の感度を上げ、バックグラウンドをなくす機器の開発など、さらなる研究が必要である。より波長の長い蛍光プローブの開発やより強い化学発光基質の探索な

ど、問題解決のための研究は続けられている。機器開発も日進月歩で、多くの研究者の努力が注がれている。夢が現実になる日も、そう遠くないかもしれない。

### 参考文献

- 1) Semenza G L : Nature Rev Cancer 3 : 721-732, 2003
- 2) Harris A L : Nature Rev Cancer 2 : 38-47, 2002
- 3) Kizaka Kondoh S et al : Cancer Sci 94 : 1021-1028, 2003
- 4) Shibata T et al : Gene Ther 7 : 493-496, 2000
- 5) Harada H et al : Mol Imaging 1 (3) : 182-193, 2005
- 6) Semenza G L : Cell 107 : 1-3, 2001
- 7) Harada H et al : Cancer Res 62 : 2018-2018, 2002
- 8) Schwarze S R et al : Science 285 : 1569-1572, 1999
- 9) Inoue M et al : Int J Oncol 25 : 713-720, 2004



近藤科江 (Shinae 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、COE 助教授。1989年に大阪大学微生物病研究所で医学博士課程を修了後、日本学術振興会特別研究員、新技術事業団「岡山細胞変改プロジェクト」研究員、京都大学医学研究科助手を経て、2004年から現職。「癌化機構の解明」のための研究を長年培養細胞で行っていたが、生体イメージングに魅せられて、癌のイメージング・ターゲティング研究に埋没中。

### 原田 浩 (Hiroshi 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、特任助手

### 平岡真寛 (Masahiro Hiraoka)

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

ピンポイントデリバリー用バイオナノキャリアの開発  
とがん遺伝子治療への応用

(H16-ナノ-004)

平成17年度 総括・分担研究報告書

平成18(2006)年3月

編集／発行	主任研究者 近藤 昭彦
所・在・地	神戸大学大学院自然科学研究科
印刷／製本	(有)アロエ印刷
	TEL (078) 371-3831