

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

がんの超早期診断・治療のための高感度分子イメージングプローブの開発

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 佐治 英郎

平成18年(2006)年 4月

目 次

I. 総括研究報告		
がんの超早期診断・治療のための高感度分子イメージングプローブの開発		
佐治 英郎	-----	1
II. 分担研究報告		
1. 製剤学的アプローチによる高感度分子プローブの開発に関する研究		
久下 裕司	-----	11
2. 病態生理学的アプローチによる高感度分子プローブの開発		
平岡 眞寛・近藤 科江	-----	13
3. PETイメージングに関する研究	-----	23
福山 秀直		
4. PETイメージングに関する研究	-----	25
中本 裕士		
5. PETイメージングに関する研究・近接撮像型フレキシブル分子イメージング装置の開発	-----	27
村山 秀雄		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	31
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	35
V. NEDO報告 (参考)		
近接撮像型フレキシブル分子イメージング装置の開発		
株式会社島津製作所	-----	179
高野 純・清水 公治・北村 圭司・小田 一郎		
天野 昌治・渡部 勝憲・小関 英一		

がんの超早期診断・治療のための高感度分子イメージングプローブの開発

主任研究者 佐治 英郎 京都大学薬学研究科教授

研究要旨：がんの発生、転移の分子機構を標的として、病態生理学的観点と製剤学的観点の両面を統合したアプローチにより、微小がんを超高感度で検出する分子イメージングプローブの開発を計画し、①病態生理学的観点からがんの発生・転移・浸潤に密接に関わる分子としてHypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) を選択し、これを標的とする分子イメージングプローブの設計、②製剤学的な観点からプローブ内に複数の放射性同位元素 (RI) を導入するシグナル増幅法とプレターゲットティング法の設計を行い、プローブの高感度化を目指した。HIF-1を標的とする分子プローブの開発では、HIF-1の酸素依存的分解に関与する融合タンパク質の作製に成功した。また、この融合タンパク質が低酸素下で安定化されること、プレターゲットティングにより低酸素細胞へのプローブ集積が上昇することを明らかにし、HIF-1を母体とする本融合タンパク質による低酸素を指標とするがんのイメージングの可能性を示した。一方、高感度プローブの開発では、イメージングのために、体内でプローブタンパク質に結合するデンドリマーへのビオチン及びキレート部位の導入に成功し、デンドリマー表面アミノ基の化学修飾による高感度化の可能性を示した。

分担研究者：

久下 裕司	京都大学・助教授	北村 圭司	株式会社島津製作所
平岡 眞寛	京都大学・教授		・主任
近藤 科江	京都大学・特任助教授	小田 一郎	株式会社島津製作所
福山 秀直	京都大学・教授		・主任研究員
中本 裕士	京都大学・助手	天野 昌治	株式会社島津製作所
村山 秀雄	放射線医学総合研究所		・主任技師
	・室長	渡部 勝憲	株式会社島津製作所
高野 純	株式会社島津製作所		・課長
	・部長	小関 英一	株式会社島津製作所
清水 公治	株式会社島津製作所		・主幹研究員
	・課長		

A. 研究目的

微小がんをより早期に、高感度で特異的に検出することができれば、外科的手術・放射線等による治療の適応対象拡大や治療の最適化が可能となり、患者に優しいがん治療を実現するとともに、医療経済効果をあげることができる。しかし、現在の診断技術では、直径数mmあるいはそれ以下の微小がんの検出は困難である。

そこで、本研究では、がんの発生、転移の超早期から腫瘍細胞特異的に発生あるいは存在する分子をイメージングの標的とする病態生理学的観点と、標的に出来るだけ多くの放射能を集積させる製剤学的観点との両面を統合したアプローチにより、微小がんを超高感度で検出しようとする分子イメージングプローブの開発を行い、がんの超早期診断・治療に資することを計画した。さらに、本研究では、開発した分子プローブを、NEDO側を中心に開発する高解像力、高感度の近接撮像型フレキシブル分子イメージング装置と組み合わせることにより従来の100倍以上の感度を達成し、1mm以下の腫瘍の検出、診断を可能とすることを目指す。

今回、これらの目的を達成するため、図1に示すように、病態生理学的観点から、微小環境因子として、がんの発生、転移の超早期から形成される低酸素環境に密接に関連するHypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)を選択し、製剤学的観点から、プレターゲティング法による標的指向性の向上と、デンドリマーを用いてプローブ内に複数の放射性同位元素(RI)を導入するシグナル増幅法による高感度化を試みた。さらに、これらのプローブ開発研究に加え、微小がんの検出を目指して、臨床イメージングに関する研究、及び近接撮像型フレキシブル分子イメージング装置の開発に関する検討

を行った。以下に、これらの研究成果の概要を述べる。

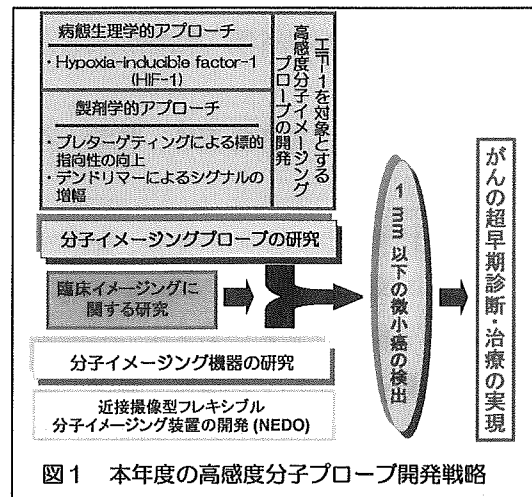


図1 本年度の高感度分子プローブ開発戦略

B. 研究方法

(I) プレターゲティング法によるHIF-1 イメージングプローブの開発

Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α)は、がんの発生、転移の超早期から形成される低酸素環境において、腫瘍の増殖や転移に関与する様々な遺伝子の発現を増加させる分子で、低酸素状態では安定であるが、正常酸素領域では分解される。そこで、HIF-1 α と同様に酸素依存的分解を受ける化合物は正常酸素領域では酸素依存的分解を受けるが低酸素部位では分解を受けず安定に滞留すると考えられることから、この化合物を分子プローブとして用いることにより、低酸素状態の検出を介して、発生、転移の超早期の微小がんのイメージングを行うことを計画した。また、検出の感度を高めるために、まず、低酸素状態のみ存在するHIF-1 α 様化合物を腫瘍部位に分布させるとともに、正常酸素領域である非標的部位で本化合物が分解された後、この化合物に特異的に結合する放射性化合物を投与することによって腫瘍をイメージ

グするという、プレターゲティング法を用いることとした。図2に本アプローチ法の概念を示した。

本検討では、HIF-1分子内の低酸素依存的分解に関与するペプチド(ODDドメイン)を母体とし、これに細胞膜透過性に有効な部位(塩基性ペプチド配列部位)と放射性プローブ結合部位(放射性ビオチンが結合できるストレプトアビジン部位)を導入した融合タンパク質(PTD-CasS-ODD-SAV)を設計した。また、プレターゲティング後に投与する放射性プローブとしては、ストレプトアビジンに対して高い親和性を有し、放射性ヨウ素を導入したビオチン誘導體($[^{125}\text{I}]$ IBB)を設計した。なお、本研究での基礎実験には ^{124}I に代わり、半減期が長く取り扱いの容易な ^{125}I を用いた。

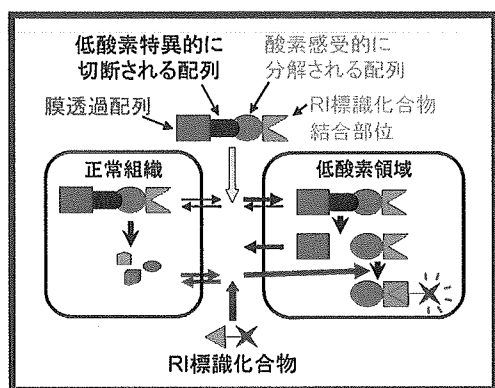


図2 プレターゲティング法によるHIF-1イメージングプローブの開発

(1) PTD-CasS-ODD-SAVの作製

pGEX-6P-3ベクターに、PTD-CasS-ODD-SAVのアミノ酸配列をコードするcDNAを挿入した。発現ベクターを大腸菌(BL21(DE3) pLysS)に導入後、Isopropyl-1-thio- β -D-galactosideで誘導することにより、Glutathione S-transferase (GST)融合タンパク質として発現させた後、GSTを切断して、

PTD-CasS-ODD-SAVを作製した。

(2) 放射性プローブ ($[^{125}\text{I}]$ IBB) の合成

N-succinimidyl-3-(tributylstannyl) benzoateに Na^{125}I とN-chlorosuccinimideを加え、室温で30分間反応させsodium hydrogen sulfiteを添加後留去し、norbiotinamineを混合し、triethylamineによってpH 9~10、室温で2時間反応させ、逆相HPLCを用いて精製した。

(3) PTD-CasS-ODD-SAVと $[^{125}\text{I}]$ IBBとの結合

PTD-CasS-ODD-SAVに $[^{125}\text{I}]$ IBBを加え、 37°C で30分間インキュベートした後、サイズ排除HPLC及び限外ろ過法によって、結合率を算出した。

(4) 培養細胞への取り込みの検討

12 well plateにMM1細胞を播種し、通常酸素条件下及び低酸素条件下で、18時間プレインキュベートした。 ^{125}I 標識PTD-CasS-ODD-SAVを添加後、それぞれ同様の条件下でさらにインキュベートし、経時的に細胞に取り込まれた放射能を測定した。

プレターゲティング法の検討では、12 well plateにMM1細胞を播種し、通常酸素条件下及び低酸素条件下で、18時間プレインキュベートした。PTD-CasS-ODD-SAVを添加後、それぞれ同様の条件下でさらにインキュベートし、24時間後に培地を除去し、 $[^{125}\text{I}]$ IBBを添加して1時間後細胞に取り込まれた放射能を測定した。

(II) HIF-1イメージングプローブ:

細胞膜透過性に関する検討

腫瘍細胞内部により効率よくデリバリーすることが可能なPTDの設計・構築・デリバリー能の検証を行い、HIF-1活性を有する細

胞内で特異的に安定化するODD融合たんぱく質を、より効率よく血流の悪い腫瘍内の低酸素領域にも分布させることが出来るPTDの候補を決定するための研究を行った。すなわち、複数のPTDを設計し、モデルタンパク質を構築するとともに、培養細胞を用いてPTD融合タンパク質の細胞内輸送能の検証を行った。また、動物実験で脳内輸送について検討した。

(III) 高感度分子プローブの開発

プローブ一分子中に多くの放射性同位元素(RI)を導入することによって、イメージングの高感度化を目指した。すなわち、多数のRIを結合できるとともに、融合タンパク質と結合できるビオチン化デンドリマーを設計し、第6世代PAMAMデンドリマー(G6)を出発原料に、ビオチン化デンドリマーを得た。次いで、アビジンとの親和性を確認した後、デンドリマーにDTPA(金属キレート部位)を導入した。

(IV) 臨床イメージングに関する研究

フッ素-18標識フルオロチミジンを用いたポジトロン断層法 (FLT-PET) は、腫瘍の増殖能を非侵襲的に評価可能と期待されている。原発性脳腫瘍の診断におけるFLT-PETの有用性を、FDG-PETと比較検討した。また、MRIを用いた検討も行った。

(V) 近接撮像型フレキシブル分子イメージング装置の開発に関する検討

高感度かつ高解像度を達成するためのPET装置用検出器を研究開発すると共に、分子イメージング画像の定量性を向上しうる測定法の開発を目的に、光分配方式のみによる4層DOI (Depth of interaction) 検出器に関する検討を行った。

(倫理面への配慮)

臨床研究は、医学研究科・医の倫理委員会の承認を得て行った。被検者に研究内容を口頭及び文書、又は文書にて十分に説明し、同意を得て、検査を施行した。

動物実験は事前に所属施設の動物実験委員会の承認を受け、当該施設の動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

(I) プレターゲティング法によるHIF-1イメージングプローブの開発

(1) PTD-CasS-ODD-SAVの作製

融合タンパク質 (PTD-CasS-ODD-SAV) の生成が確認された。

(2) 放射性プローブ ($[^{125}\text{I}]$ IBB) の合成

$[^{125}\text{I}]$ IBBを合成、精製した結果、放射化学的収率65%以上、放射化学的純度94%以上で得られた。

(3) PTD-CasS-ODD-SAVと $[^{125}\text{I}]$ IBBとの結合

作製したPTD-CasS-ODD-SAVを、 $[^{125}\text{I}]$ IBBとインキュベートし、サイズ排除HPLCにて分析したところ、高分子量画分に放射能が見られたことから、 $[^{125}\text{I}]$ IBBがPTD-CasS-ODD-SAVに結合することが示された。また、この結合はD-biotinの添加により濃度依存的に阻害された。

(4) 培養細胞への取り込みの検討

放射性ビオチン誘導体と結合させた融合タンパク質の培養細胞への集積・滞留は、低酸素条件下で通常酸素条件下よりも2倍高かった。また、あらかじめ融合タンパク質処置を行った後に放射性ビオチン誘導体を処置する、いわゆる、プレターゲティン

グ条件下での培養細胞へのプローブ集積・滞留は、低酸素条件下で通常酸素条件下よりも5倍高かった。

(II) HIF-1イメージングプローブ:

細胞膜透過性に関する検討

新規に構築したPTD 3 配列が細胞内への移行効率がよいことがわかった。また、このPTDを使った融合たんぱく質をマウスに投与したところ、効率よく血管脳関門を通過し、脳にまでデリバリーされることを見いだした。

(III) 高感度分子プローブの開発

dendリマーのビオチン化(1.2 ± 0.2 個)、及び金属キレート部位(178 ± 9 個)の導入に成功した。また、導入したビオチンはアビジンとの親和性を保持していた。

(IV) 臨床イメージングに関する研究

FLT-PETとFDG-PETでは、原発性脳腫瘍の悪性度診断能において大きな差異を認めなかったが、FLT-PETの方がコントラスト良く腫瘍を描出可能で、腫瘍内の集積の不均一性もより明瞭であった。

(V) 近接撮像型フレキシブル分子イメージング装置の開発に関する検討

光分配方式のみによる4層DOI方式が成功し、一種類のシンチレータ素子で4層DOI検出器が構成できるようになった。また、2つの受光素子に跨るシンチレータについて基礎研究を行い、2層DOIが可能であることを示した。これにより、8層DOI方式が可能であることを基礎的に実証した。

D. 考察

作製した融合タンパク質(PTD-CasS-

ODD-SAV)を、 $[^{125}\text{I}]$ IBBとインキュベートし、サイズ排除HPLCにて分析したところ、高分子量画分に放射能が見られたことから、 $[^{125}\text{I}]$ IBBがPTD-CasS-ODD-SAVに結合することが示された。また、この結合はD-biotinの添加により濃度依存的に阻害された。したがって、 $[^{125}\text{I}]$ IBBは融合タンパク質のSAVドメインと結合していることが示された。

一方、 ^{125}I 標識PTD-CasS-ODD-SAVががん細胞に取り込まれたことから、PTD配列の導入が高分子量の融合タンパク質の細胞内への移行性を向上させることが示された。また、PTDに関する詳細な検討から、PTD3が優れた膜透過性を示すことも明らかとなった。

さらに、がん細胞にHRE-Luciferaseを導入した細胞を各酸素条件で培養したところ、低酸素条件下、通常酸素条件と比較して20倍以上の発光を示したことから、低酸素条件下でのHIF-1の発現が確認できた。同様の条件で ^{125}I 標識PTD-CasS-ODD-SAVを添加後、24時間後の細胞内における放射性化合物の集積を検討した結果、低酸素条件下で通常酸素条件と比較して2倍以上の放射能の集積が見られた。このことから、本融合タンパク質の低酸素条件下での安定化が示唆された。さらに、プレターゲティング条件下での培養細胞へのプローブ集積・滞留は、低酸素条件下で通常酸素条件下よりも5倍高く、プレターゲティング法の有用性が示された。

これらの研究成果は、HIF-1分子内の低酸素依存的分解に関与するペプチド(ODDドメイン)を母体とする分子プローブ設計法の妥当性を示すとともに、本分子プローブを用いることにより、HIF-1 α が存在する低酸素状態の腫瘍をイメージングできる可能性を示すものである。

高感度プローブの開発では、イメージングのために、体内でプローブタンパク質に結合するデンドリマーへのビオチン及びキレート部位の導入を試み、これに成功した。この結果は、デンドリマー表面アミノ基の化学修飾による高感度化の可能性を示している。

他方、臨床イメージングに関する研究ではFDG及びFLTの腫瘍描出能に関する知見が得られ、近接撮像型フレキシブル分子イメージング装置の開発ではNEDO側との協力で光分配方式のみによる4層DOI方式に成功した。これらの結果は、高感度分子プローブの開発における有用な基礎的情報を提供するとともに、プローブと装置の組み合

わせによる腫瘍の高感度検出のための基盤的技術となる。

E. 結論

本年度の研究成果概要を図3に示した。本研究では、HIF-1の酸素依存的分解に関与する融合タンパク質の作製に成功し、この融合タンパク質が低酸素下で安定化されること、プレターゲティングにより低酸素細胞へのプローブ集積が上昇することを明らかにし、本融合タンパク質による低酸素状態の腫瘍のイメージングの可能性を示した。次年度以降、これらの知見をさらに発展させ、本分子プローブを最適化することにより、微小がんを超高感度で検出する分子

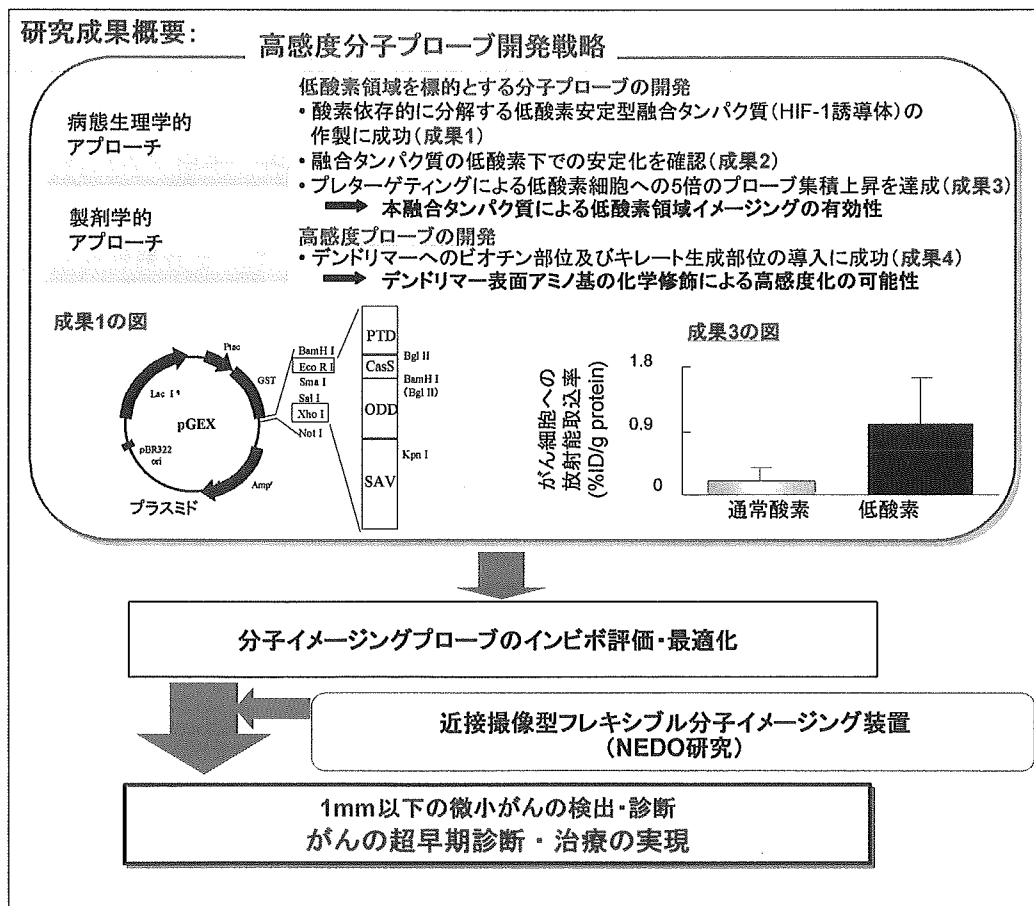


図3 本年度の研究成果の概要と次年度への展望

イメージングプローブの開発が実現するものと期待される。さらに、NEDO側を中心に開発する高解像力、高感度の近接撮像型フレキシブル分子イメージング装置と組み合わせることにより従来の100倍以上の感度を達成し、1mm以下の腫瘍の検出、診断を可能としたい。

F. 健康危険情報

臨床研究において、本研究に起因すると思われる副作用を経験していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- “Development of a ^{111}In -labeled peptide derivative targeting a chemokine receptor, CXCR4, for imaging tumors”
Nucl Med Biol. In press.
- “Suppression of VEGF transcription in renal cell carcinoma cells using pyrrole-imidazole hairpin polyamides targeting the hypoxia responsive element.”
Acta Oncologica. In press.
- “Antitumor protein therapy; application of the protein transduction domain to the development of a protein drug for cancer treatment.”
Breast Cancer, 2006;13:16-26.
- “Synthesis and evaluation of radioiodinated cyclooxygenase-2 inhibitors as potential SPECT tracers for cyclooxygenase-2 expression.”
Nucl Med Biol. 2006;33(1):21-7
- “A tumor-specific gene therapy strategy targeting dysregulation of the VHL/HIF pathway in renal cell carcinomas.”
Cancer Sci, 2005, 96:288-94.
- “Real-time imaging of hypoxia-inducible factor-1 activity in tumor xenografts.”
J Radiat Res (Tokyo), 2005, 46:93-102.
- “Optical imaging of tumor hypoxia and evaluation of efficacy of a hypoxia-targeting drug in living animals.”
Mol Imaging, 2005, 4:182-93.
- “Development of a rhenium-186-labeled MAG3-conjugated bisphosphonate for the palliation of metastatic bone pain based on the concept of bifunctional radiopharmaceuticals.”
Bioconjugate Chem. 2005;16(4):751-7.
- “Basic characterization of ^{64}Cu -ATSM as a radiotherapy agent.”
Nucl Med Biol. 2005;32(1): 21-8.
- “Enhanced apoptotic reaction correlates with suppressed tumor glucose utilization after cytotoxic chemotherapy: use of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Annexin V, ^{18}F -FDG, and histologic evaluation.”
J Nucl Med. 2005;46(5):794-9.
- “Biologic correlates of intratumoral heterogeneity in ^{18}F -FDG distribution with regional expression of glucose transporters and hexokinase-II in experimental tumor.”
J Nucl Med. 2005;46(4):675-82.
- “Depth-of-interaction recognition using optical filters for nuclear medicine imaging.”
IEEE Trans. Nucl. Sci., 2005;52(1), 4-7.
- “Three-dimensional array of scintillation crystals with proper reflector arrangement for a depth of interaction detector.”
IEEE Trans. Nucl. Sci., 2005;52(1), 8-14.
- “Performance of a 256ch Flat Panel PS-PMT with small crystals for a DOI PET detector.”
IEEE Trans. Nucl. Sci., 2005;52(1), 15-20.
- “A block detector for a multislice ,

- depth-of-interaction MR-compatible PET.”
IEEE Trans. Nucl. Sci., 2005;52(1), 33-37.
- “Transaxial system models for jPET-D4 image reconstruction.”
Phys. Med. Biol., 2005;50, 5339-5355.
2. 学会発表
- 「 dendrogram を用いた MRI 用機能分子造影剤の開発に関する基礎的検討」
(日本薬学会第126年会。2006年3月、仙台)
 - 「低酸素特異的安定化タンパク質を利用した新規低酸素イメージング剤の開発に関する基礎的検討」
(第45回日本核医学会総会。2005年11月、東京)
 - 「マトリックスメタロプロテアーゼ-2を標的とする新規腫瘍診断用ペプチド放射性医薬品の開発」
(第45回日本核医学会総会。2005年11月、東京)
 - 「腫瘍及び炎症組織における³H-FLTの集積」
(第45回日本核医学会総会。2005年11月、東京)
 - “Optical Imaging of HIF-1 activity in malignant solid tumors for evaluation of cancer therapies” Forth Annual Meeting, Cologne, Germany, Sep, 2005
 - “The jPET-D4: Transaxial imaging performance of a novel 4-layer depth-of-interaction.” The 4th Japan-Korea Joint Meeting on Medical Physics and the 5th Asia-Oceania Congress of Medical Physics, Kyoto, Sept.-Oct., 2005.
 - “Four-layer depth-of-interaction detectors for the jPET-D4.” The 4th Japan-Korea Joint Meeting on Medical Physics and the 5th Asia-Oceania Congress of Medical Physics, Kyoto, Sept.-Oct., 2005.
 - “DOI detection capability of 3D crystal array standing over two PMTs.” The 4th Japan-Korea Joint Meeting on Medical Physics and the 5th Asia-Oceania Congress of Medical Physics, Kyoto, Sept.-Oct., 2005.
 - “8-layer depth-of-interaction encoding of 3-dimensional crystal array.” The 4th Japan-Korea Joint Meeting on Medical Physics and the 5th Asia-Oceania Congress of Medical Physics, Kyoto, Sept.-Oct., 2005.
 - “Resolution measurements of a four-layer DOI prototype detector for jPET-RD.” The 4th Japan-Korea Joint Meeting on Medical Physics and the 5th Asia-Oceania Congress of Medical Physics, Kyoto, Sept.-Oct., 2005.
 - “Calibration and evaluation of DOI detector for jPET-D4.” The 4th Japan-Korea Joint Meeting on Medical Physics and the 5th Asia-Oceania Congress of Medical Physics, Kyoto, Sept.-Oct., 2005.
 - “Accuracy measurement with a high-precision solid marker for PET head motion correction.” The 4th Japan-Korea Joint Meeting on Medical Physics and the 5th Asia-Oceania Congress of Medical Physics, Kyoto, Sept.-Oct., 2005.
 - “Low-dimensional semiconducting materials in developing ultra-fast scintillators.” The 4th Japan-Korea Joint Meeting on Medical Physics and the 5th Asia-Oceania Congress of Medical Physics, Kyoto, Sept.-Oct., 2005.
 - “Feasibility study on a noninvasive

- measurement system for boron concentration.” The 4th Japan-Korea Joint Meeting on Medical Physics and the 5th Asia-Oceania Congress of Medical Physics, Kyoto, Sept.-Oct., 2005.
- “3D animations for medical physics education and learning.” The 4th Japan-Korea Joint Meeting on Medical Physics and the 5th Asia-Oceania Congress of Medical Physics, Kyoto, Sept.-Oct., 2005.
 - “A 12-channel CMOS preamplifier-shaper-discriminator ASIC for APD and gas counters.” IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag. Conf. 2005.
 - “Quantum confinement effects in semiconducting scintillators.” IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag. Conf. 2005.
 - “8-layer depth-of-interaction encoding of 3-dimensional crystal array.” IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag. Conf. 2005.
 - “Measurement of 32x8x4 LYSO crystal responses of DOI detector for jPET-RD.” IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag. Conf. 2005.
 - “DOI detection capability of 3D crystal array standing over two PMTs.” IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag. Conf. 2005.
 - “Motion correction for jPET-D4: improvement of measurement accuracy with a solid marker.” IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag. Conf. 2005.
 - “Event-by-event random and scatter estimator based on support vector machine using multi-anode outputs.” IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag. Conf. 2005.
 - “The jPET-D4: imaging performance of the 4-layer depth-of-interaction PET scanner.” IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag. Conf. 2005.
 - “The jPET-D4: simple and reliable construction method for 4-layer DOI crystal blocks.” IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag. Conf. 2005.
 - “The jPET-D4: calibration and acquisition system of the 4-layer DOI-PET scanner.” IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag. Conf. 2005.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- 近藤科江、原田浩、平岡真寛、山田秀一：病態の状態をリアルタイムで観察可能なモデル動物とそれを可能にする遺伝子構築物及びその使用，2006年3月10日出願
国際出願番号PCT/JP2006/304701
 - 稲玉直子，村山秀雄，澁谷憲悟，北村圭司，石橋浩之：放射線位置検出方法及び装置，平成17年9月28日出願、
出願番号 特願2005-282866
 - 北村圭司，吉田英治，村山秀雄，木村裕一：放射線同時計数処理方法、放射線同時計数処理プログラム、および放射線同時計数処理記憶媒体並びに放射線同時計数装置およびそれを用いた核医学診断装置，平成17年10月20日出願
出願番号 特願2005-305944
 - 村山秀雄，石橋浩之，山下貴司，内田博，大村知秀：放射線入射位置 3次元検出器の発行位置特定方法，平成17年7月8日登録
特許第3697340号

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

製剤学的アプローチによる高感度分子プローブの開発に関する研究

分担研究者 久下 裕司 京都大学薬学研究科助教授

研究要旨：プローブ分子中に多くの放射性同位元素(RI)を導入することによって、イメージングの高感度化を目指した。多数のRIを結合できるビオチン化デンドリマーを設計し、約200個のRIを結合できるデンドリマーの合成に成功した。この結果は、デンドリマー表面アミノ基の化学修飾による高感度プローブの開発の可能性を示すものである。

A. 研究目的

本研究では、プローブ分子中に多くの放射性同位元素(RI)を導入することによって、標的に出来るだけ多くの放射能を集積させるという観点から、微小がんを超高感度で検出しようとする分子イメージングプローブの開発を計画した。そこで、本年度は主に(1) 多数のRIを結合できるビオチン化デンドリマーの作成とその評価を行った。また、この新規高感度プローブとの対比を行うため、(2) 糖代謝プローブ(^{18}F -FDG)、核酸プローブ(^{18}F -FLT)等の既存プローブによる腫瘍イメージングに関する基礎的検討を実施した。

B. 研究方法

(1) ビオチン化デンドリマーの作成：

第6世代PAMAMデンドリマー(G6)を出発原料に、3等量のSulfo-NHS-LC-biotinと反応させ(1 hr, r.t.)、ビオチン化デンドリマーを得た。HABA-アビジンアッセイを利用して導入数を、固定化アビジンゲルを用いてアビジンとの親和性を確認した。次いで、512等量のp-SCN-Bz-DTPAと反応させて(48 hr, 40°C)、デンドリマーにDTPA(金属キレート部位)を導入した。さらに、基礎評価として単光子放出核種(^{153}Gd 、 ^{111}In)を用いた標識検討を実施した。

(2) 既存プローブに関する基礎的検討：

腫瘍における ^{18}F -FDG、 ^{14}C -Methionine (^{14}C -MET) 及び ^3H -FLT集積を検討し、肉芽腫への集積と比較した。雄性Wistar系ラットの左ひ腹筋にBCGを接種後19日目、或いはラット肝癌細胞(KDH-8)を移植2週間後に、ラットを一晩絶食させた。2種のトレーサ (^{18}F -FDG+ ^{14}C -MET、或いは ^{18}F -FDG+ ^3H -FLT)を尾静脈注射1時間後、屠殺し、病変組織と臓器の放射能(%ID/g/kg)を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は事前に所属施設の動物実験委員会の承認を受け、当該施設の動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

(1) ビオチン化デンドリマーの作成：

デンドリマー分子当たり、 1.2 ± 0.2 個のビオチンの導入が可能であった。また、導入したビオチンはアビジンとの親和性を保持していた。DTPAの導入では、デンドリマー分子当たり、 178 ± 9 個のDTPA導入が可能であった。さらに、標識検討の結果から、全てのDTPAに対して、金属原子の配位が確認された。

(2) 既存プローブに関する基礎的検討：

腫瘍への集積は¹⁸F-FDGが最も高く、¹⁴C-METの2.7倍、³H-FLTの4倍であった。¹⁸F-FDGと³H-FLTは、腫瘍と同程度の肉芽腫集積を示した。腫瘍への¹⁴C-MET集積は肉芽腫への集積より有意に高かった(約2.3倍)。

D. 考察

今回、デンドリマーに導入する金属キレート部位には、ポジトロン放出金属核種の利用を視野に入れ、DTPAを選択した。その結果、ほぼ全ての表面アミノ基へのDTPA導入に成功した。今後、実際にポジトロン放出核種での標識・ビオチンとの結合性の評価等が必要であるが、今回の結果はデンドリマーの表面アミノ基のほぼ全てに化学修飾が可能であることを示唆し、高感度化への応用可能性を支持するものである。

他方、既存プローブに関する基礎的検討では、腫瘍への集積は¹⁸F-FDGが最も高く、特異性では¹⁴C-METが優れることを示した。これらの結果は、高感度分子プローブの開発における有用な基礎的情報となる。

E. 結論

本研究成果により、デンドリマー表面アミノ基の化学修飾による高感度プローブの開発の可能性が示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- “Synthesis and evaluation of radioiodinated cyclooxygenase-2 inhibitors as potential SPECT tracers for cyclooxygenase-2 expression”
Nucl Med Biol. 2006;33(1):21-7
- “Enhanced apoptotic reaction correlates with suppressed tumor glucose utilization after cytotoxic chemotherapy: use of ^{99m}Tc-Annexin V, ¹⁸F-FDG, and histologic evaluation”
J Nucl Med. 2005;46(5):794-9.
- “Biologic correlates of intratumoral heterogeneity in ¹⁸F-FDG distribution with regional expression of glucose transporters and hexokinase-II in experimental tumor”
J Nucl Med. 2005;46(4):675-82.

2. 学会発表

- 「デンドリマーを用いたMRI用機能分子造影剤の開発に関する基礎的検討」
(日本薬学会第126年会。2006年3月、仙台)
- 「低酸素特異的安定化タンパク質を利用した新規低酸素イメージング剤の開発に関する基礎的検討」
(第45回日本核医学会総会。2005年11月、東京)
- 「腫瘍及び炎症組織における³H-FLTの集積」
(第45回日本核医学会総会。2005年11月、東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究補助金 (萌芽的先端医療技術推進研究事業)

分担研究報告書

病態生理学的アプローチによる高感度分子プローブの開発

分担研究者 平岡真寛 京都大学医学研究科腫瘍放射線科学・教授

分担研究者 近藤科江 京都大学医学研究科腫瘍放射線科学・COE 特任助教授

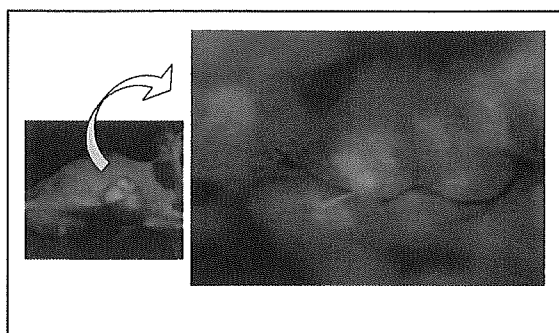
本研究は、膜透過性、酸素依存的安定性を有するポリペプチド (PTD-ODD) を利用して、固形腫瘍内 HIF-1 活性を有する細胞内で特異的に安定化するイメージングプローブを開発する事を目的としている。本年度は、腫瘍細胞内部により効率よくデリバリーすることが可能な PTD の設計・構築・デリバリー能の検証を行い、HIF-1 活性を有する細胞内で特異的に安定化する ODD 融合たんぱく質を、より効率よく血流の悪い腫瘍内の低酸素領域にも分布させることが出来る PTD の候補を決定するための研究を行った。その結果、新規に構築した PTD 配列が細胞内への移行効率がよいことがわかった。また、この PTD を使った融合たんぱく質をマウスに投与したところ、効率よく脳血管関門を通過し、脳にまでデリバリーされることがわかった。この配列を ODD 融合たんぱく質に融合することで、より特異性の高いイメージングプローブが構築をめざす。

A. 研究目的

腫瘍全体の構造的特徴から来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。これらは、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、たかだか 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。この壊死細胞に隣接する瀕死の低酸素がん細胞が、

実はがんの治療抵抗性や悪性化に深く関わっている事が、最近の研究からわかってきた。低酸素がん細胞では、転写因子 HIF-1 が活性化されている。現在までに 60 以上の HIF-1 誘導遺伝子が報告されており、それらの遺伝子は、本来、低酸素がん細胞が生き延びるために誘導される遺伝子群である。たとえば、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。このような一連の低酸素応答遺伝子の機能が、がん全体の悪性化を引き起こしている。従

って、HIF-1 が活性化しているがん細胞を標的にすることは、診断にとっても治療にとっても極めて重要なことであるといえる。



HIF-1 によって活性化されるプロモーターの下流に緑色蛍光色素蛋白 (GFP) をコードする遺伝子を安定に組み込んだがん細胞を移植したマウスの腫瘍を外から蛍光顕微鏡で観察している。緑に見えているのが HIF-1 が活性化したがん細胞。

図1 腫瘍内 HIF-1 活性細胞の可視化

1999年に、Dowdyらは、TAT蛋白質の11アミノ酸を融合した巨大な β -galactosidaseタンパク質(160kDa以上)をマウスの腹腔に注射することで、脳を含めた全身の組織細胞に β -galactosidaseタンパク質を活性を保ったままデリバリー出来ることを報告し、TAT融合タンパク質は、*in vivo*デリバリー手法の一つとして一躍脚光を浴び始めた。このTATタンパク質の11アミノ酸は、塩基性のアミノ酸が多く含まれていることから、塩基性アミノ酸を連ねた poly-Lys, Poly-Arg の融合タンパク質も研究が進み、これら膜透過性を有する短い polypeptide を PTD (protein transduction domain)と総称し、様々な研究に利用されている。これまでの研究でP

TDは、化合物、antisense RNA、DNA といった核酸、ファージ、短いペプチド、大きなタンパク質や40 nmの鉄ビーズに至るまで融合させた物を細胞内に輸送することが報告されている(図2)。最近では、200 nmのリポゾームも細胞膜を通過して細胞内に導入することが出来たという報告があり、かなり大きなものまで輸送できること考えられているが、その細胞膜通過の機構は未だ解明されていない。図2に初期に提示された膜透過機構のモデルを示す。現在は、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる機構が関与しているという報告が出されており、生体内でのPTDを解したデリバリーがどのような機構で行われているのかの解明がひつようである。

本研究は、極めて感度よく癌の低酸素領域をイメージングするためのペプチドプローブを構築する事を目的としている。そのためには、まず、より膜透過性の高いPTDを構築し、生体内で血流のみに依存せず、効率よく、全身にくまなくイメージングプローブをデリバリーさせることが必要である。そのために、まず構築したPTDポリペプチドを培養細胞を用いて膜透過性の効率を調べる必要がある。また、実験動物を用いてPTD融合たんぱく質の生体内のデリバリー効率を検証する必要がある。次に、低酸素がん細胞に特異的にイメージングプローブを留まらせることが必要になる。低酸素特異的を持たせるために、HIF-1を酸素濃度依存的に安定化させるODDポリペプチドを最適化して、PTD-ODD融合たんぱく質の生体内での動態を調べる必要がある。

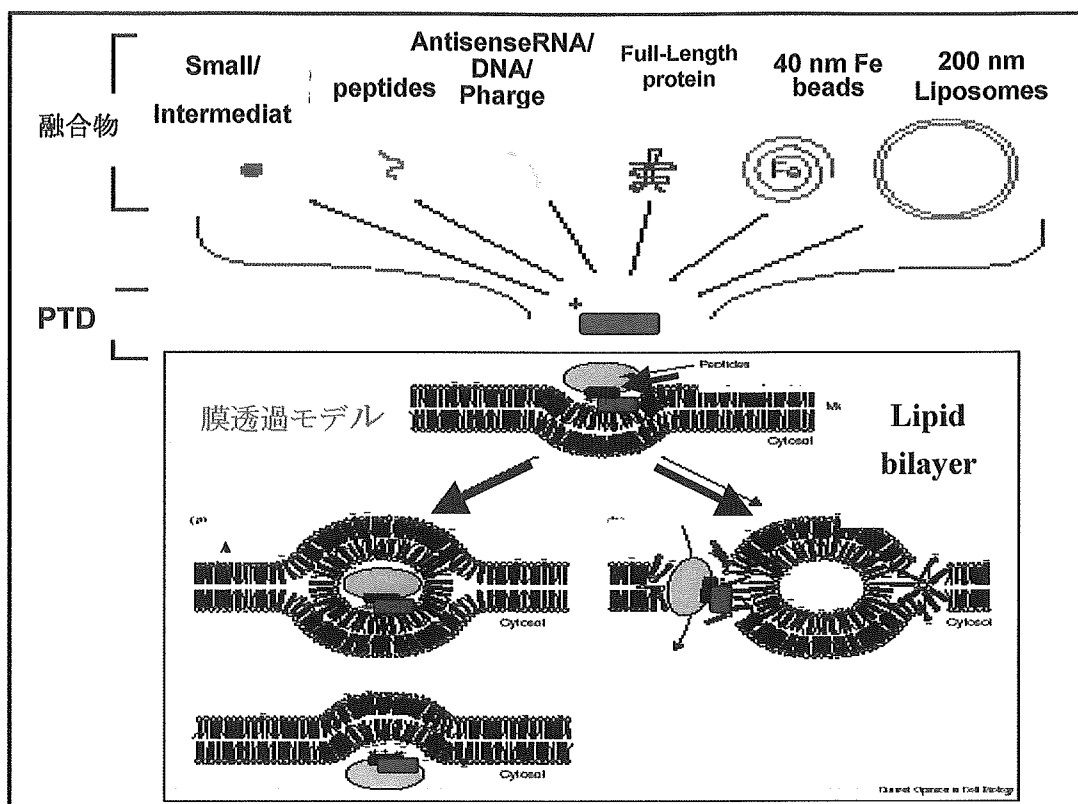


図2 PTDにより細胞内に輸送される融合物

B. 研究方法

1. PTDの設計とモデルタンパク質の構築

PTDは基本的には塩基性のタンパク質を配置することで膜透過性を付与するペプチドを作成することが可能である。これまでもかなりの数の既存のタンパク質や人工ペプチドPTD配列が報告されている(表1)。しかしながら、塩基性の配列を融そこで、いくつかのPTD配列を設計し、Myc タグをつけて細胞への導入効率をけんしょうしたところ、PTD 3と命名した配列が細胞内への導入効率が良いことがわかった。このPTD配列はトリプトファンを

合することでタンパク質全体の極性が著しく偏り、融合タンパク質として合成する際に不都合が生じ、作成が困難になる場合がある。したがって、配列を工夫し、融合タンパク質全体を確実に合成する必要がある。また、融合したタンパク質により、膜透過性の効率が異なってくるため、いくつかのPTDを設計しモデルタンパク質により膜透過性の検証を行う必要がある。リジン、アルギニンと組み合わせた物で、これまで報告されている物とは異なるが、融合タンパク質の安定性の面でもかなり有用であることがわかった。

表1 PTDペプチド

Polymer	Sequence	Uptake efficiency*	# of Arg
HIV-1 Tat51-57	KRRQRR	low	4
HIV-1 Tat49-55	RKKRRQR	low	4
HIV-1 Tat49-56	RKKRRQRR	low	5
Arg ₄	RRRR	low	4
Arg ₅	RRRRR	medium	5
d-Arg ₅	rrrrr	medium	5
Arg ₁₆	RRRRRRRRRRRRRRRR	medium	16
Yeast PRP6 ₁₂₉₋₁₄₄	TRRNKRNRJQEQLNRK	medium	5
φ21 N ₁₂₋₂₉	TAKTRYKARRAELIAERR	medium	5
λ N ₁₋₂₂	MDAQTRRRERRAEKQAQWKAAN	medium	5
FHV coat ₁₅₋₄₉	RRRRNRTRNRNRVR	medium	11
Arg ₆	RRRRRR	medium	6
d-Arg ₆	rrrrrr	medium	6
BMV Gag ₇₋₂₅	KMTRAQRRAAARRNRWTAR	high	7
HTLV-II Rex ₄₋₁₆	TRRQRTRRRARRNR	high	8
HIV-1 Rev ₃₄₋₅₀	TRQARRNRRRWRERQR	high	9
HIV-1 tat ₄₈₋₆₀	GRKKRRQRRRPPQ	high	6
HIV-1 tat ₅₇₋₄₉	RRRQRKKR	high	6
d-HIV-1 tat ₄₉₋₅₇	rkkrqrtr	high	6
Arg ₇	RRRRRRR	high	7
d-Arg ₇	rrrrrrr	high	7
N-Arg ₇	RRRRRRR	high	7
Arg ₈	RRRRRRRR	high	8
d-Arg ₈	rrrrrrrr	high	8
Arg ₉	RRRRRRRRR	high	9
d-Arg ₉	rrrrrrrrr	high	9
Carbamate 9	Guanidine-9 oligocarbamate	high	9 (guanidine)

*Uptake efficiency is a qualitative illustration of relative activities among CPPs from published studies.

2. 培養細胞を用いたPTD融合タンパク質の細胞内輸送の検証
 上記の様にいくつかのPTD配列を持った融合タンパク質が細胞内で有効に機能するか否かを検証する目的で、PTDを融合させたGFPたんぱく質を細胞培養液に添加し、30分後に細胞をトリプシン処理で回収してFACS解析したところ、PTD1配列よりもPTD3配列と融合したGFPの方が細胞に多く取り込まれていることがわかった

(図3)。更に、同様の処理をした細胞の溶解液をウエスタンブロット法でたんぱく質の解析を行ったところ、やはりPTD1配列よりもPTD3配列を融合したGFPの方が多く細胞内に取り込まれているという結果を得た(図4)。したがって、in vitroでは、PTD3配列の方がPTD1よりも膜透過性が良いことが示された。

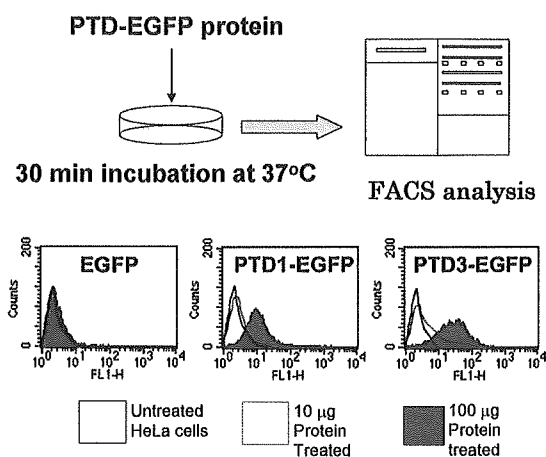


図3 PTD-EGFP を用いた膜透過性の検討 (FACS 解析法)

次に、PTD1とPTD3に、ODD ドメインと低酸素によるアポトーシスを抑える機能をもつタンパク質と融合させた融合タンパク

質を構築し、培養細胞の培地に添加して、低酸素条件下で細胞死をどれくらい抑制できるかという検証をFACS解析法を用いて行った。

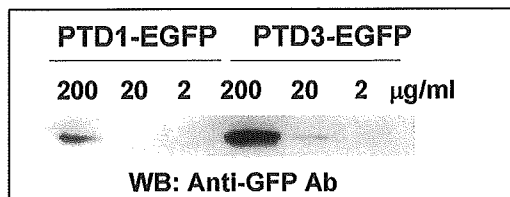


図4 PTD-EGFP を用いた膜透過性の検討 (ウエスタンブロット法)

すなわち、様々な濃度のPTD融合タンパク質を細胞の培養液に添加後、通常培養(20%O₂)と低酸素状態(1%)で培養し、低酸素培養で引き起こされるアポトーシスがどの程度抑えられるかを調べた。

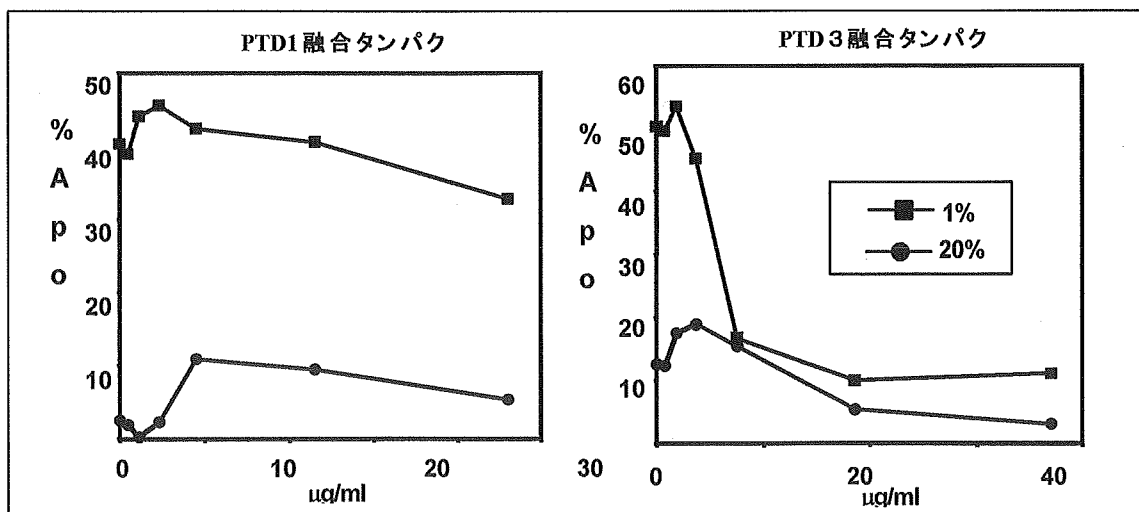
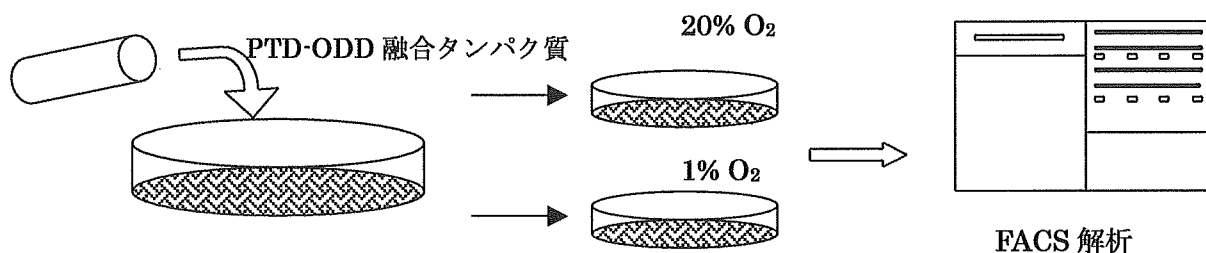


図5 PTD 融合タンパク質のアポトーシス抑制能の比較

その結果、融合しているタンパク質は同じであるにもかかわらず、PTD1はほとんど低酸素によるアポトーシスを抑えなかったが、PTD3は極めて低濃度で有効に低酸素によるアポトーシスを抑制することが分かった(図5)。このことから、イメージングプローブに用いるPTDにはPTD3を用いることが有効であると考えられた。

3. 動物実験での脳内輸送の検討

PTD3融合タンパク質(Mycタグ付加)をマウスに腹腔内投与して脳までの輸送状態を調べた。具体的には50mg/Kgの

PTD3-Mycタンパク質を腹腔内に投与して投与後12時間までに脳を灌流固定しmycタグに対する抗体を用いて免疫染色を行い組織でのPTD3融合タンパク質の脳内分布を調べた。血管床末梢辺縁部(A, B)、皮質(C, D)、CA1(E, F)のいずれにおいてもPTD3融合タンパク質を投与したネズミでは融合タンパク質(濃茶色)が確認された(図3)。これらの結果は、腹腔内投与されたPTD3融合タンパク質が血液脳関門を通過し、脳にまでデリバリーされたことを示している。

