

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 H

I F-1 α と呼ばれ、転写因子 H I F-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 H I F-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、H I F-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

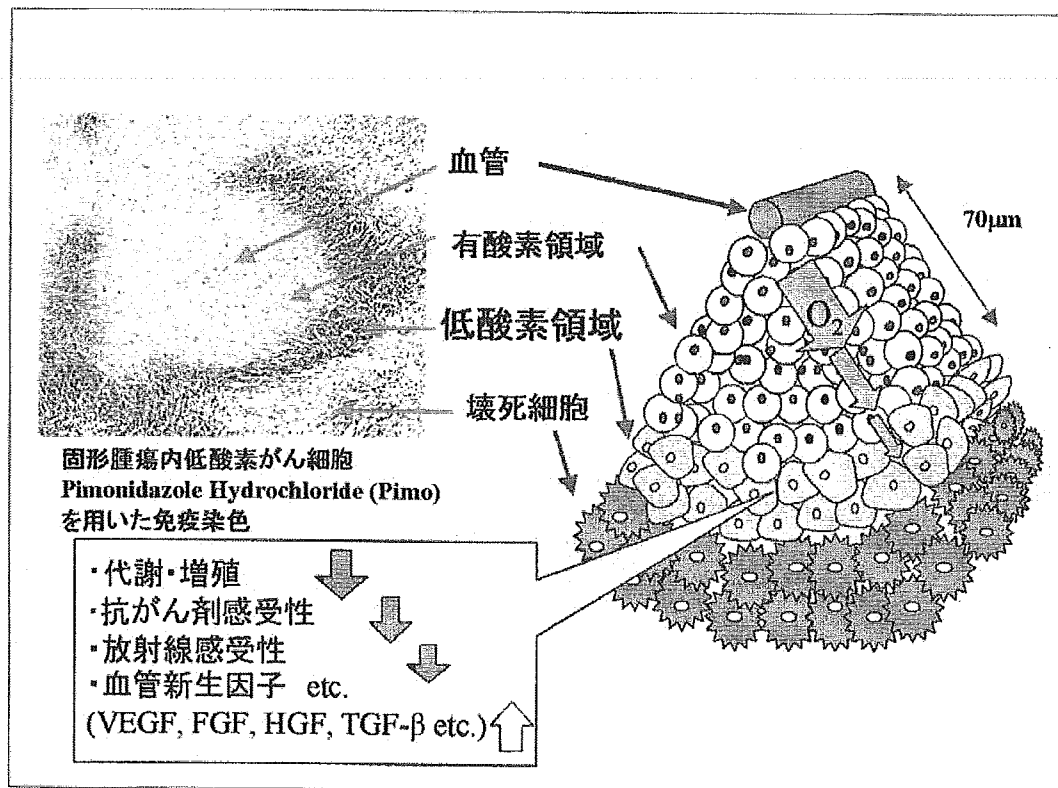


図1 固形腫瘍内低酸素領域

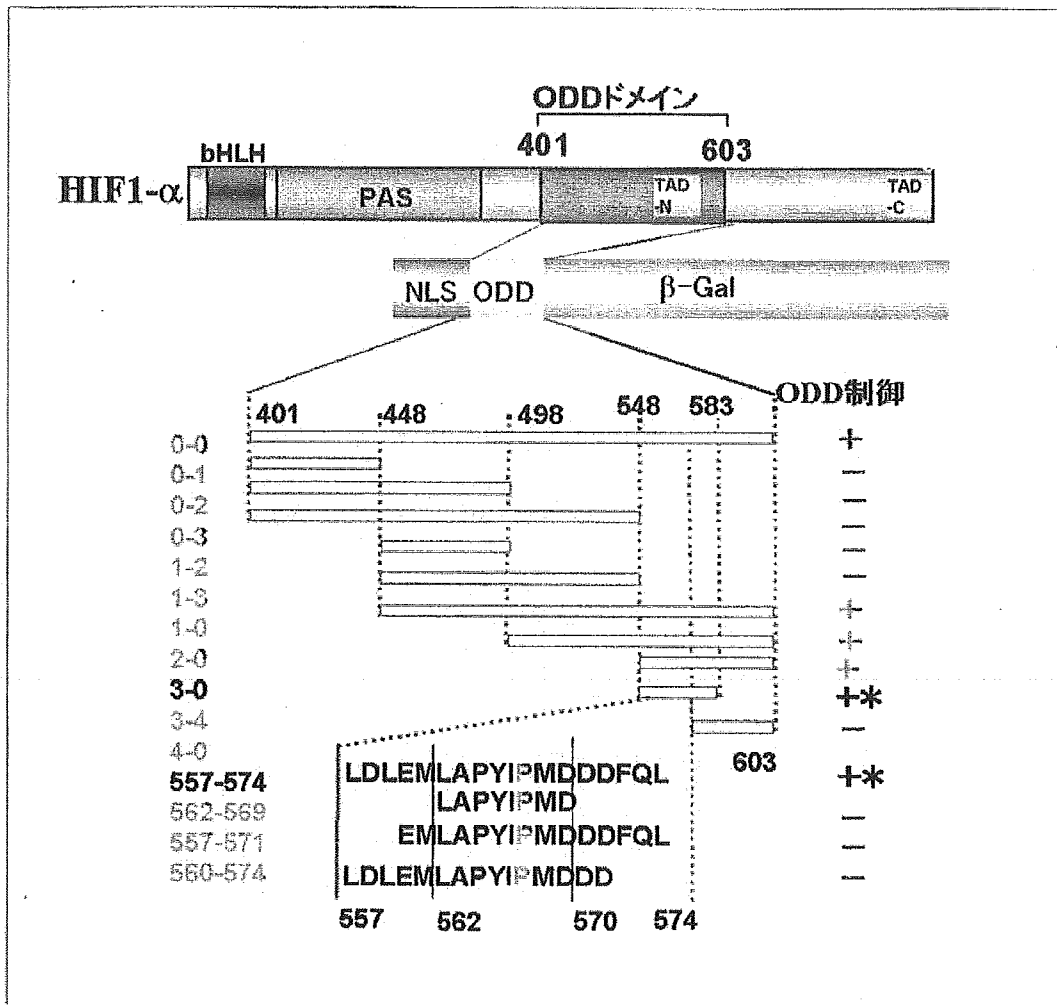


図2 ODD融合タンパク質のODD制御

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ゾ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。

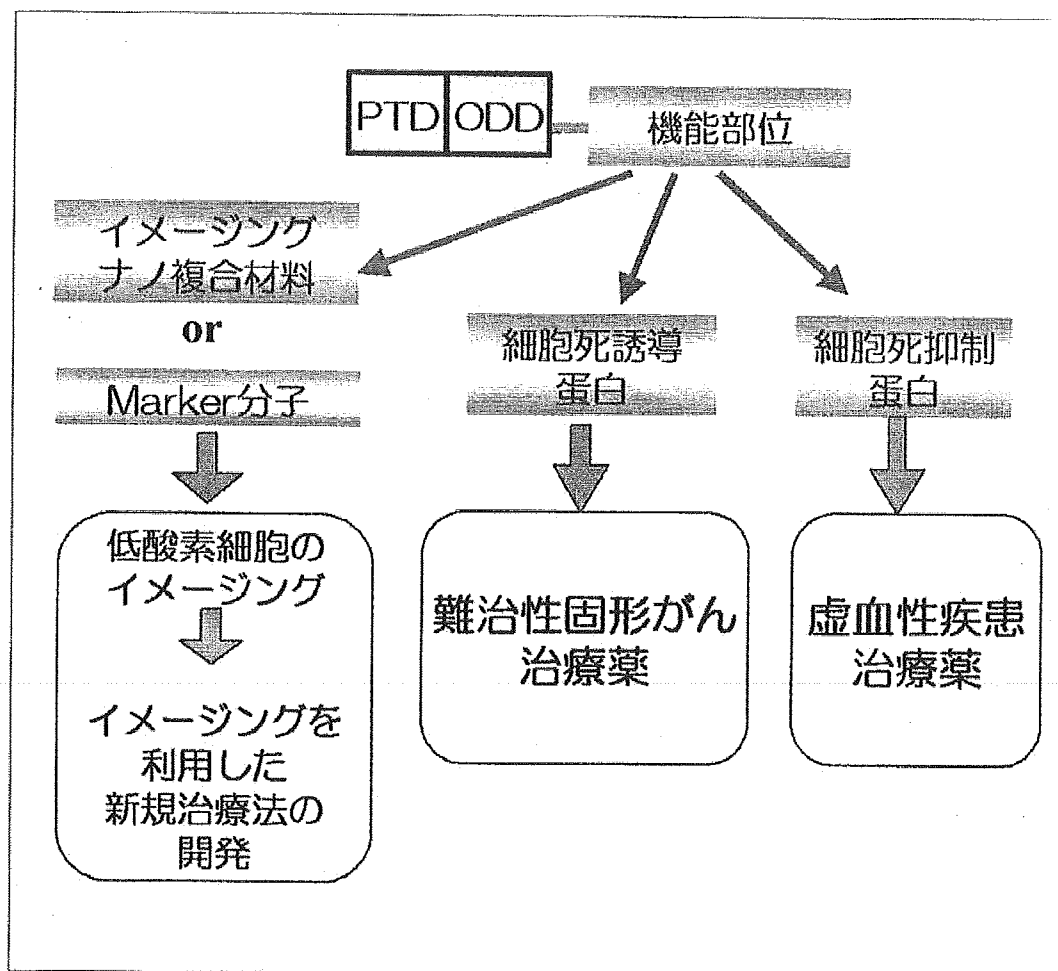


図3 PTD-ODD融合タンパク質の利用例

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

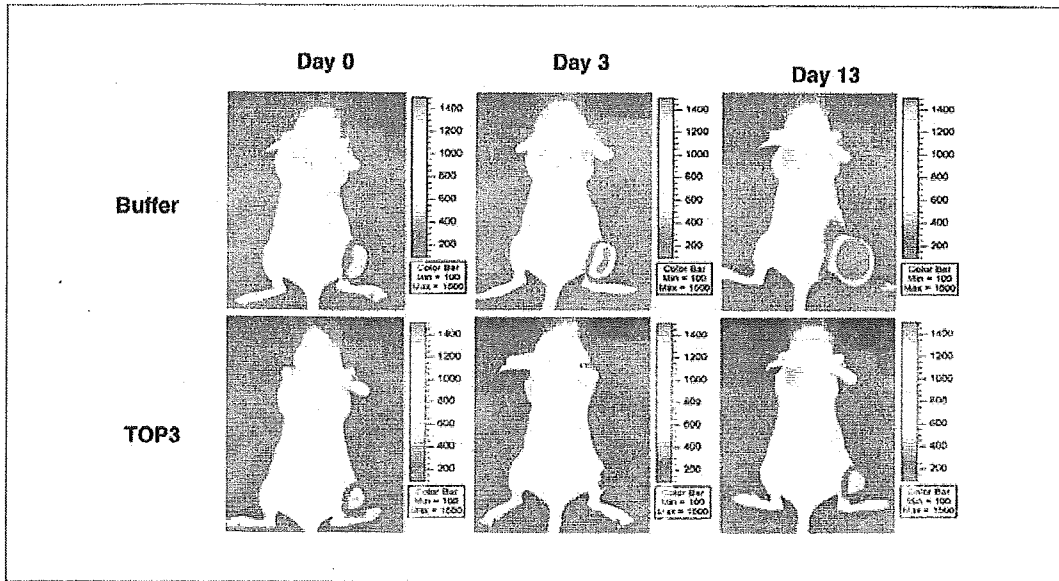


図4 TOP3による抗がん効果
光イメージングにより低酸素領域を可視化する系で同一マウス大腿部腫瘍内の低酸素がん細胞の量を経時的にモニターした。TOP3の投与は20mg/Kg, day0, 5, 10の3回。

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

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。ヒト臍臓がん細胞をネズミの皮下に移植した実験で、無処置群で腫瘍体積が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、小さな癌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。

I. 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 (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 COE 助教授

** Masahiro Hiraoka, 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¹⁾ 教授

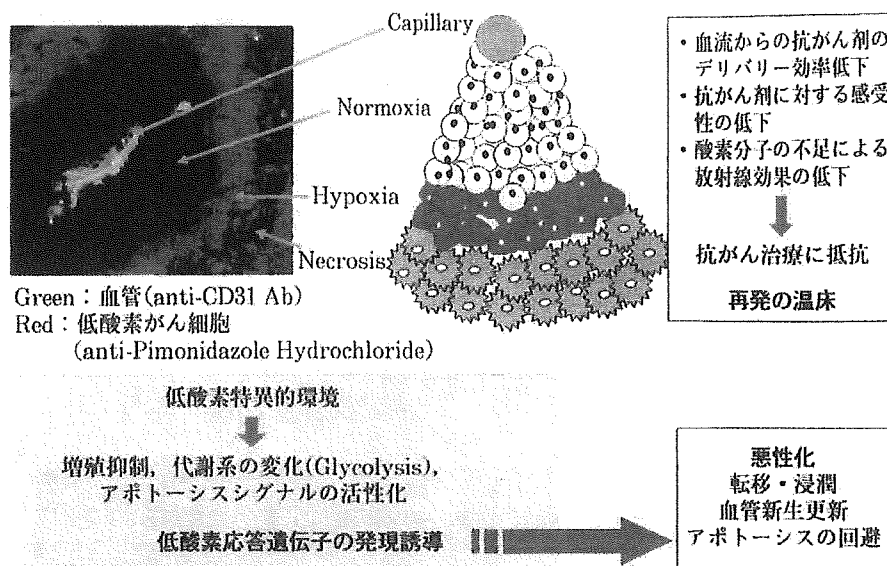


図1 がんの微小環境

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される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。このような一連の「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⁵⁻⁷⁾。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⁷⁾。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^{6, 7)}。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。

II. 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⁸⁾、1995年に単離・精製されて⁹⁾以来、分子レベルの研究が加速的に進み、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

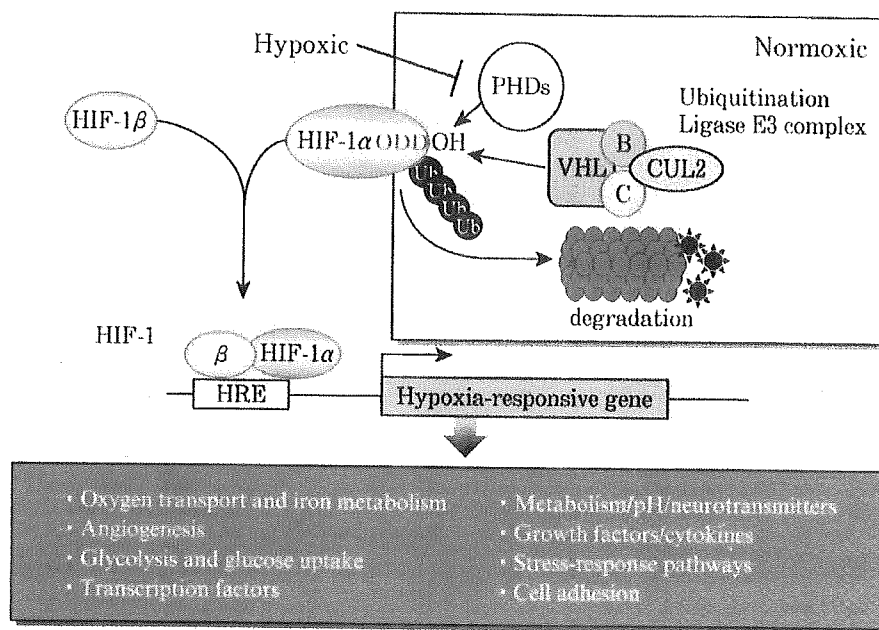


図2 HIF-1αの酸素依存的分解制御

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⁵⁾。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 (PDHs) 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¹⁰⁾。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。

1. プロリン水酸化酵素を介する HIF-1α タンパク質制御

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¹¹⁾。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。この目印をめがけて 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

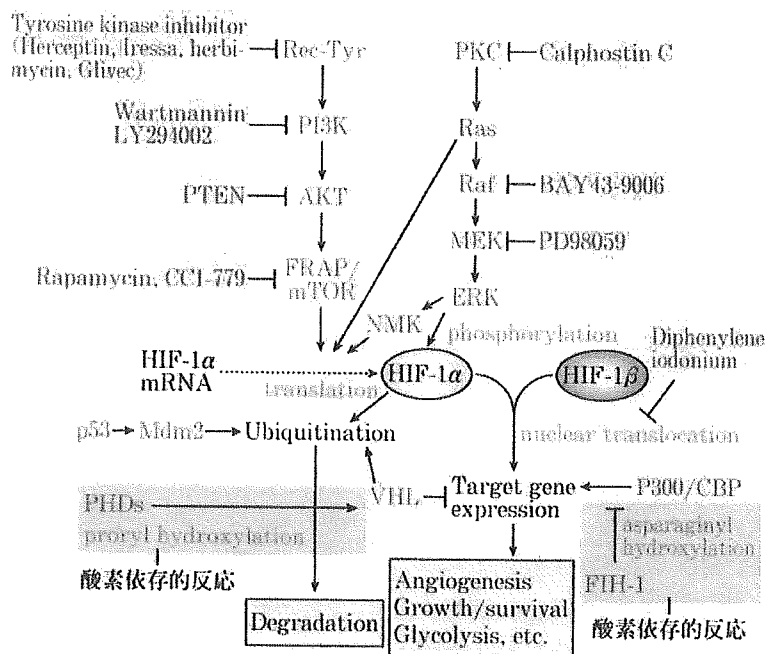


図3 HIF-1の発現・活性の制御機構と阻害物質
 HIF-1の制御に関わる因子を青字で、それらの阻害物質を赤字で示してある。
 詳細は本文参照。

表1 HIF-1活性の制御機構

タンパク質分解	プロリン水酸化酵素 P53-Mdm2	↓ ユビキチン化 ↓ ユビキチン化	酸素依存的 / 細胞非特異的 酸素非依存的 / 細胞特異的
転写活性抑制	アスパラギン酸水酸化酵素	↓ C末転写活性	酸素依存的 / 細胞非特異的
転写活性上昇	Raf-MEK-ERK 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	PI3K-Akt-mTOR シグナル	↑ eIF-4E 活性	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

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¹³⁾、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¹²⁾。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%に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だ」とPHDsが察知した時に機能していると考えられる。

2. アスパラギン酸水酸化酵素を介する転写活性制御

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¹³⁾(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¹³⁾。

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
FIH1	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

3. 翻訳レベル制御

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^{14, 15)}。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¹⁶⁾ (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 CCD 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¹⁶⁾。しかも発光シグナルを定量することにより、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¹⁶⁾。

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

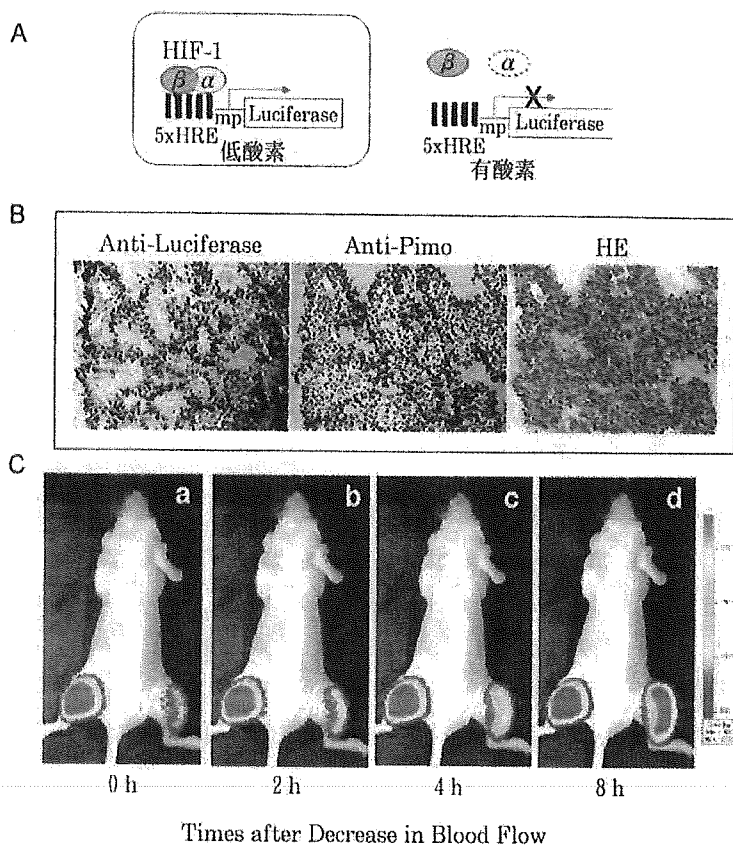


図4 ルシフェラーゼによる化学発光を用いた低酸素がん細胞の可視化

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 promoter) 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) が, 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なされており、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. 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), CCI-779(mTOR), Celebrex[®] (COX2), PD98059 (MEK), Herceptin[®] (Tyrosine kinase), Iressa[®] (Tyrosine kinase), Glivec[®] (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。

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/Ape の制御を介して HIF-1 α の発現を促進する作用があり¹⁷⁾, thiore-

doxin inhibitor はそれを阻害することで HIF-1 活性を下げている。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。

3. 低酸素特異的抗がんタンパク製剤

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 のターゲティングに挑んだ。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¹⁸⁾。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。Pro-caspase-3 は、過剰発現しても細胞死を誘導することはないが、上流のカスベース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、強力で細胞死を誘導する。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¹⁹⁾。最終的に構築したタンパク質製剤 TOP3(TAT_{PTD}-ODD-Pro-caspase-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^{3, 16, 18, 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

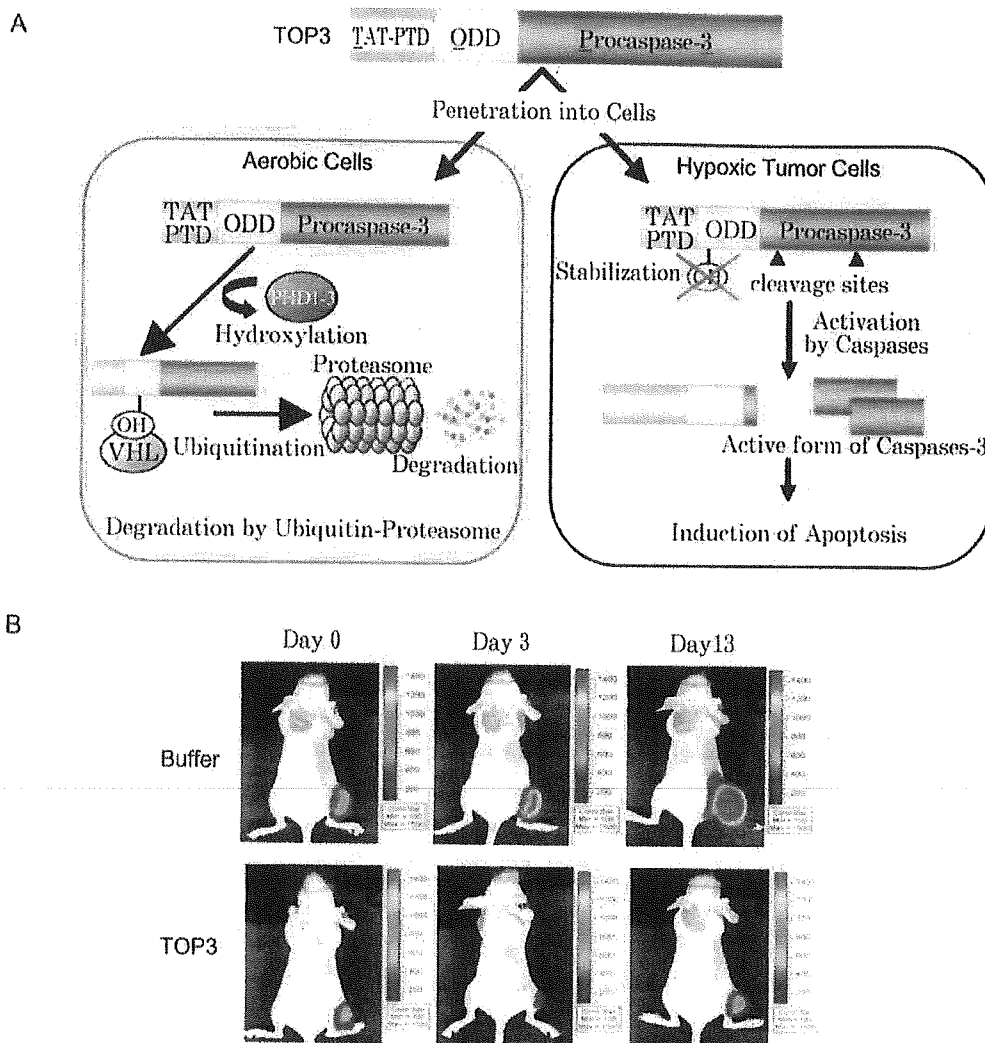


図5 TOP3の作用機序とTOP3処理による低酸素がん細胞の推移

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)、有酸素状態でが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: 下肢に図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、TUNEL

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TUNEL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¹⁰⁾。

TOP3処理で、放射線抵抗性を有する低酸素がん細

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、がんの悪性化に關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

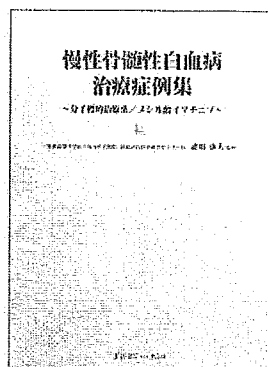
- 1) Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P: Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 49: 6449-6465, 1989
- 2) Harris AL: Hypoxia-A key regulator factor in tumor growth. *Nature Rev Cancer* 2: 38-47, 2002
- 3) Kizaka-Kondoh S, Inoue M, 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 biologi-

cally 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



慢性骨髄性白血病治療症例集 分子標的治療薬／メシル酸イマチニブ

慶應義塾大学医学部内科学教授/同総合医科学研究センター長 池田 康夫 監修

A 4 変型判 72頁 定価 1,575円(本体 1,500円+税 5%)送料実費
ISBN4-7532-2047-8 C3047

◎近年注目を集めているメシル酸イマチニブの有効な使用例をまとめた1冊。

◎第一線で活躍する医師が、図表を多用し詳細に解説。

◎実地にすぐ役立つ情報を収載した専門医必携の症例集。

株式会社 医薬ジャーナル社 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 (振替番号) 06910-1-33353
〒101-0861 東京都千代田区三崎町3丁目3番1号・TKビル 電話 03(3265)7681(代) FAX 03(3265)8369

『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 以上の光を産生することができ、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

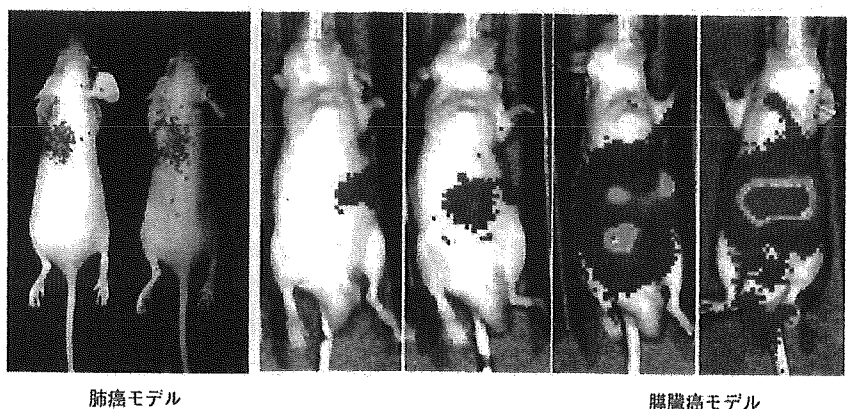


図1 ●癌の同所移植モデル

(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) ヒトの膵臓癌細胞をマウスの膵臓に移植し、癌が膵臓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[®]200にて撮影)

の位置や大きさをほぼ正確に三次元で画像化するソフトを搭載しているイメージング機器や、自家発光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ンパク質を使い分けて、多重染色により1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、これからプ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、体表面に近い癌や、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、どこに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

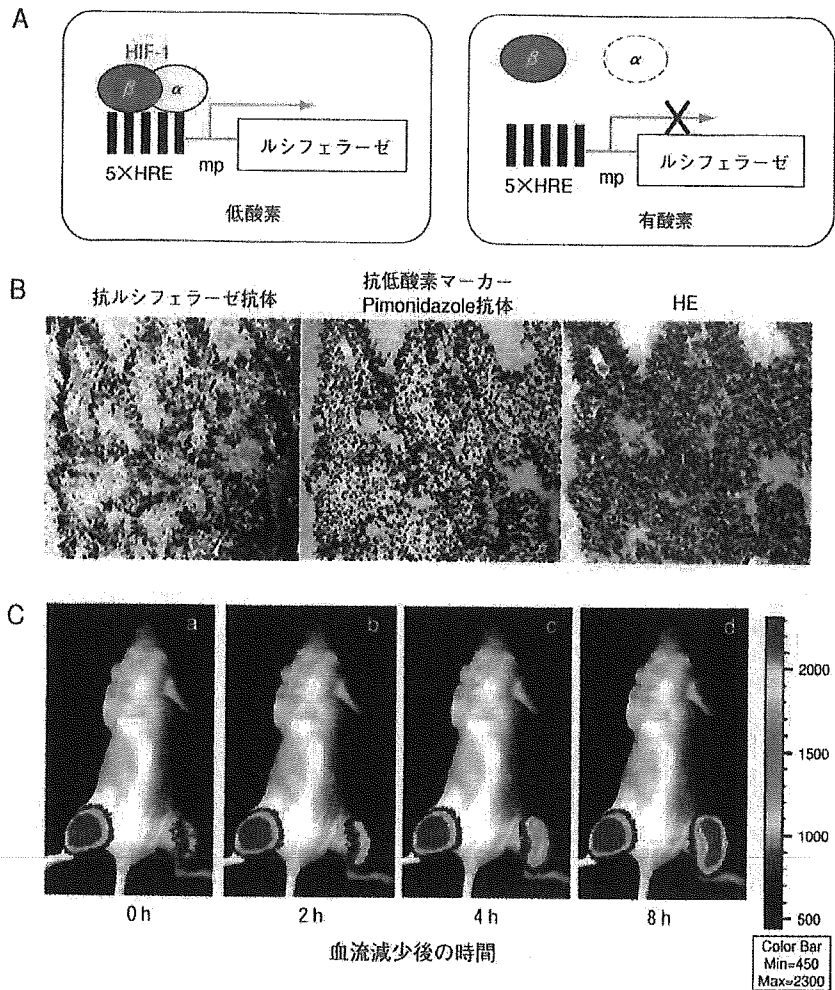


図2 ●ルシフェラーゼによる化学発光を用いた低酸素癌細胞の可視化

A) 5HRE-ルシフェラーゼレポータープラスミドを体細胞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 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)。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(桃色)を識別するためにHE染色(右)を行ったところ、ルシフェラーゼが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)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で、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。その努力の一翼を担っているのが低酸素応答転写因子 HIF-1 である¹⁾。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。このような一連の「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^{1)~3)}。

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)⁴⁾ を安定に保持するヒト癌細胞株を樹立している (図 2-A)。

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 2-B)、基質であるルシフェリンを投

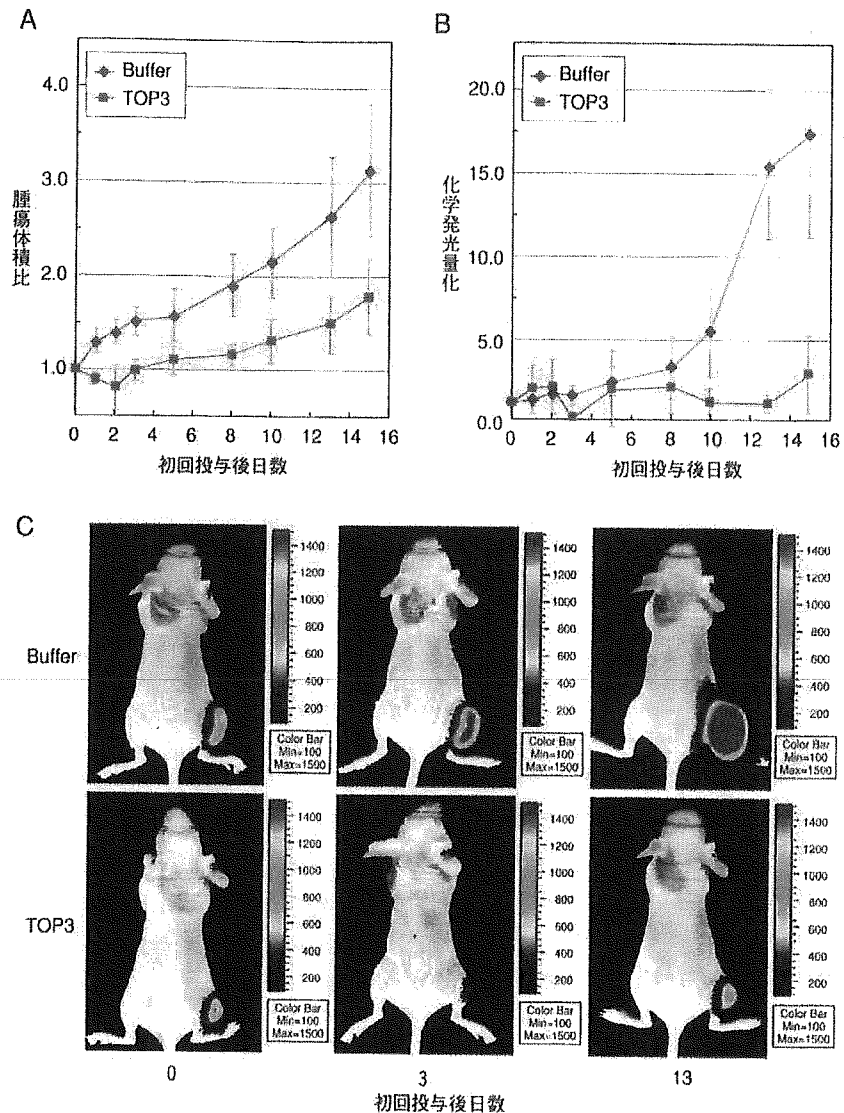


図 3 ● 固形腫瘍内低酸素癌細胞の推移と治療効果の検証

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る⁵⁾。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、腫瘍内のルシフェラーゼ発現は、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、 α と β の2つのサブユニットから構成されている。HIF-1 α 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⁶⁾。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の低酸素依存活性を制御しているHIF-1 α 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 α 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 α 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⁷⁾。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

めに、ODDに細胞死誘導タンパク質として、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⁷⁾。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⁸⁾。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)^{3) 5) 7) 9)}。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: 493-498, 2000
- 5) Harada, H. et al.: Mol. Imaging, 4 (3): 182-193, 2005
- 6) Semenza, G. L.: Cell, 107: 1-3, 2001
- 7) Harada, H. et al.: Cancer Res., 62: 2013-2018, 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。

Diffusion-Tensor Fiber Tractography: Intraindividual Comparison of 3.0-T and 1.5-T MR Imaging¹

Tsutomu Okada, MD
 Yukio Miki, MD, PhD
 Yasutaka Fushimi, MD
 Takashi Hanakawa, MD, PhD
 Mitsunori Kanagaki, MD, PhD
 Akira Yamamoto, MD
 Shin-ichi Urayama, PhD
 Hidenao Fukuyama, MD, PhD
 Masahiro Hiraoka, MD, PhD
 Kaori Togashi, MD, PhD

Purpose: To prospectively evaluate the depiction of brain fiber tracts at 3.0- versus 1.5-T diffusion-tensor (DT) fiber tractography performed with parallel imaging.

Materials and Methods: Institutional review board approval was obtained, and each subject provided written informed consent. Subjects were 30 healthy volunteers (15 men, 15 women; mean age, 28 years; age range, 21–46 years). Single-shot spin-echo echo-planar magnetic resonance (MR) sequences with parallel imaging were applied. Four fiber tracts were reconstructed: corticospinal tract (CST), superior longitudinal fasciculus (SLF), corpus callosum (CC), and fornix. Two neuroradiologists compared 3.0- and 1.5-T tractography in terms of fiber tract depiction by using five depiction scores (scores 0–4) and numbers of reconstructed tract fibers and in terms of lateral asymmetry in the CST by using numbers of reconstructed fibers. The Wilcoxon signed rank test was applied for statistical analysis.

Results: Visual scores for both CST hemispheres ($P < .001$), the right SLF ($P = .005$), the CC ($P = .01$), and the right fornix ($P = .04$) were higher at 3.0-T DT tractography. Larger numbers of CST (right, $P = .008$; left, $P < .001$), SLF (right, $P = .001$; left, $P = .02$), and fornix (bilaterally, $P = .02$) tract fibers were depicted at 3.0 T. The asymmetry index for the CST was lower ($P < .001$) at 3.0 T. Visual scores for the left SLF and the left fornix and numbers of CC tract fibers were not significantly different.

Conclusion: Depiction of most fiber tracts was improved at 3.0-T DT tractography compared with depiction at 1.5-T tractography.

© RSNA, 2006

¹From the Department of Diagnostic Imaging and Nuclear Medicine (T.O., Y.M., Y.F., M.K., A.Y., K.T.) and Department of Therapeutic Radiology and Oncology (M.H.), Graduate School of Medicine, and Human Brain Research Center (T.H., S.U., H.F.), Kyoto University, 54 Kawaharacho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606-8507, Japan. From the 2004 RSNA Annual Meeting. Received December 30, 2004; revision requested March 17, 2005; revision received May 4; final version accepted June 1. Supported in part by grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan (k0800006-01) and the Ministry of Education Culture, Sports, Science and Technology of Japan (C15591270).

© RSNA, 2006