

表 市販されている主な近赤外蛍光物質

種類	販売元	励起波 (nm)	蛍光波長 (nm)
ICG	SIGMA	775	845
Cy 5.5	GE Healthcare	675	694
Alexa Fluor 680	Molecular Probes	684	707
IRDye 800	LI-COR	778	806
ATTO 680	ATTO-TEC	680	702
DY-680	DYOMICS	690	709
Qdot 705	invitrogen	-	705

蓄積されており、現在培養細胞で用いられている観察技術を、将来的には個体レベルに発展させることが比較的容易にできると考えられる。たとえば、分子間相互作用を *in vivo* FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) として見る事ができるかもしれない。このような利点から、*in vivo* 蛍光イメージングは薬物スクリーニングやプローブの体内動態観察による最適化などハイスループットな研究に適している。

一方で、現在の光イメージング（蛍光・化学発光）における問題点は、①光の生体透過性が低く（～10mm）深部観測に向かない②吸収拡散が生じ定量的な観測が難しい点である。さらに蛍光イメージングでは、③内在性の蛍光物質（ヘモグロビン等）に由来する自家蛍光が観測の障害となる。これらの問題を解決するため、励起・検出に近赤外波長（650-900nm）を用いる工夫がなされている。近赤外波長域では、生体内での主な光吸収の原因であるヘモグロビンによる影響が最小となるため、透過性が向上し観察に都合が良い（図1）。現在用いられている主な近赤外蛍光物質を表

にまとめた。

## 2. *In vivo* 蛍光イメージングの方法

### 1) 蛍光物質の分類と特徴

蛍光物質の選択はイメージングにおいて最も重要なプロセスである。蛍光物質は①内在性②外来性③遺伝子発現というように区分できる（図2-1）。

内在性の蛍光物質には、ビタミンやポルフ

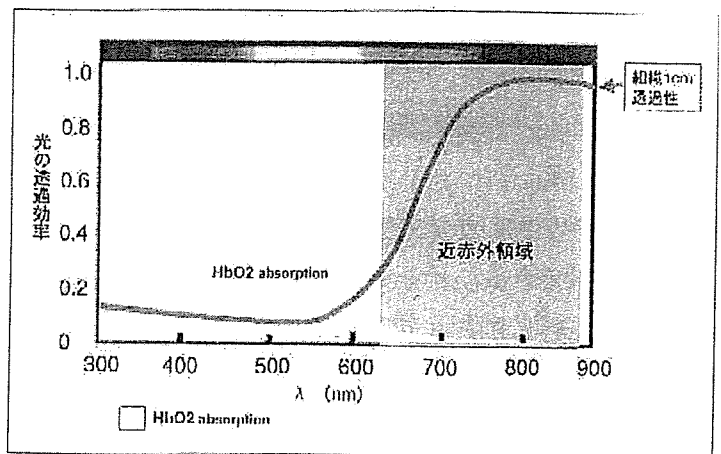


図1 生体の光透過性と波長の関係  
光の透過効率（実線）とヘモグロビン(HbO2)の吸収波長域を示した

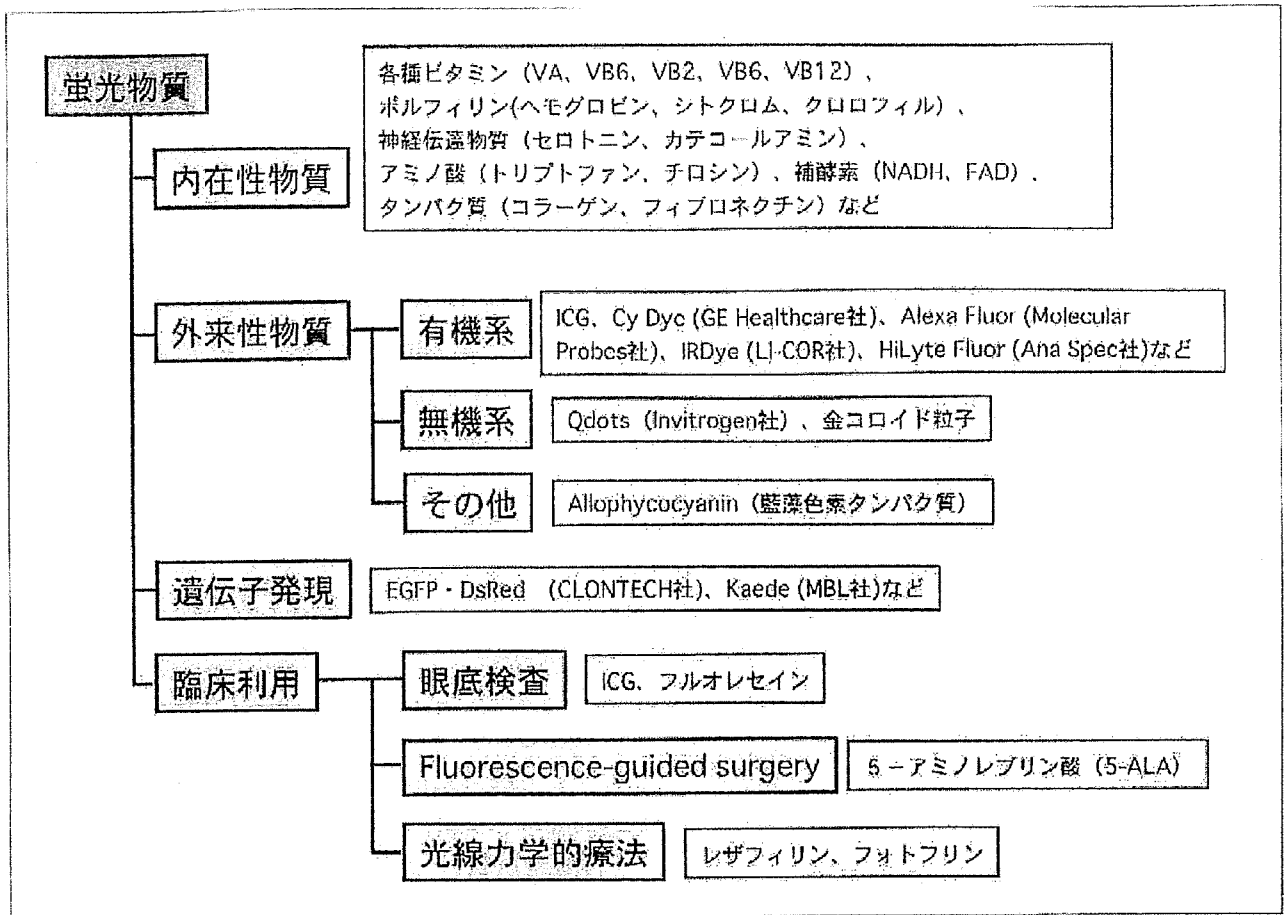


図2-1 *In vivo*イメージングに関する蛍光物質の分類

イリンなど多くが挙げられ、バックグラウンドの原因となっている。内在性分子は外来性の蛍光物質に比べ微量であるため検出が困難であるものが多く、蛍光イメージングの報告例は少ない。フラビンタンパク質の蛍光を指標とした脳神経活動のイメージングが行われている<sup>1)</sup>。

外来性の蛍光物質は有機化合物と無機物に分類できる。インドシアニングリーン(ICG)は近赤外に励起・蛍光波長を持つ有機化合物である(励起775nm, 蛍光845nm)。極めて低毒性であり、眼底検査薬として既に40年以上使用されている(図2-2)。これまでにICGを

骨格とした分子量1000程度の様々な蛍光物質が合成されており、多くの場合反応基を介してタンパク質など任意の標的分子に連結される。血中半減期は数分~数十分であり、水溶性の違いで腎あるいは肝臓に捕捉され、代謝・排泄される。有機系の蛍光物質は現在の主流を占めるが、①厳密な励起・蛍光波長が要求される②標的分子との結合比率が低い③pHなど溶媒環境に影響を受けやすいという課題を持つ。また励起光の照射により次第に蛍光強度の減弱(消光)がおきるため、保存の際に適切な管理が必要である<sup>2)</sup>。

無機蛍光物質(Quantum dots: QD)は、有機

系蛍光物質の課題を克服するものである。一般的にQDは直径3-30nmの球状の粒子で、セレン化カドミウムなど金属製の核にイオウ化亜鉛(ZnS)の被覆層をもち、さらに外側に有機系の被覆層を持つという3層構造をとる(図2-2)。水への溶解度は有機層により決定される。標的分子への連結は有機層の反応基を用いて行われる。物理的に非常に安定であり、消光を起こしにくい。また有機層に多数の標的分子を連結することが可能である。蛍光波長はQDの直径により任意に決定される。QDは特定の励起波長を持たないため、複数種のQDを用いた場合、1つの励起波長照射で複数の蛍光波長を同時に観察することが可能である。課題として、粒子サイズが大きい場合腎での捕捉が行われにくく、バックグラウンドが高くなることが挙げられる(血中半減期:数時間以上)。また、有機系の蛍光剤が一般に低毒性であるのに対し、QDの排泄機構や組織蓄積などは明らかでなく、毒性に関する調査は途上にある<sup>2),3)</sup>。

マウスを主とするトランスジェニック法の普及に伴い、蛍光タンパク質を用いた遺伝子発現や分子動態の観察が広く行われている。GFP(図2-2)などの蛍光タンパク質は、任意の遺伝子の発現レポーターとして、また遺伝子導入のマーカーとして用いられている。GFPの励起・蛍光波長は近赤外領域よりも短いため(EGFP:励起488nm, 蛍光507nm)、生体内での透過性が低く(~1mm)自家蛍光も伴う。このため、特に成体を観察する場合に、GFPを強く発現する系統の取得、体毛の除去あるいはヌードマウスの使用、場合によっては組織の露出が必要となる。赤色蛍光タンパク質(RFP)は励起・蛍光波長が近赤外波長域に

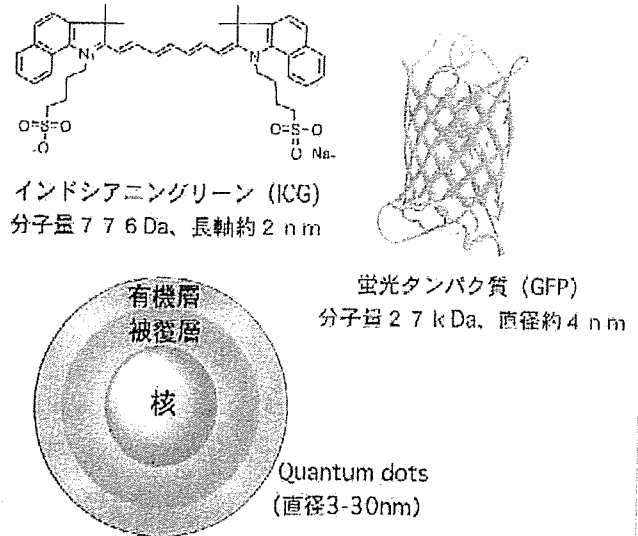


図2-2 代表的な蛍光物質(模式図)

近く(DsRed:励起558nm, 蛍光583nm)、これらの問題をある程度軽減している<sup>4)</sup>。

## 2) *In vivo* 蛍光イメージングの実際

有機系蛍光物質を用いたマウスでの観測例として、著者らが現在進めている、腫瘍内低酸素領域に特異的に集積するPTD-ODD融合タンパク質<sup>5)</sup>を用いた蛍光プローブを紹介する。*In vivo* イメージングには、化学発光と蛍光の両方のイメージングが可能なIVIS200(Xenogen社製)を用いている。

固形腫瘍では、細胞の旺盛な増殖に血管新生が追いつかず、生体内では通常生じることのない低酸素領域が内部に構成される。この領域にあるがん細胞は、治療不良・悪性化の原因となるため、これらのがん細胞を可視化することは、がんの治療に重要な情報を与える。我々は、この領域にのみ蛍光が集積するイメージングプローブの開発を目指し、低酸

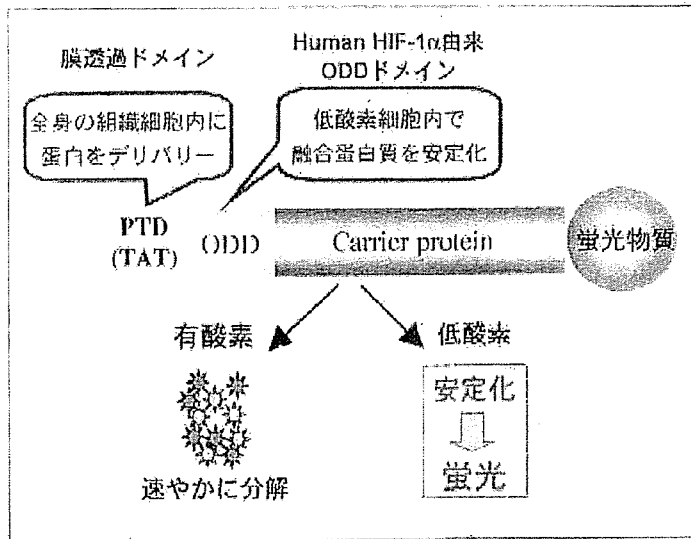


図3-1 低酸素細胞特異的に安定化する蛍光プローブ

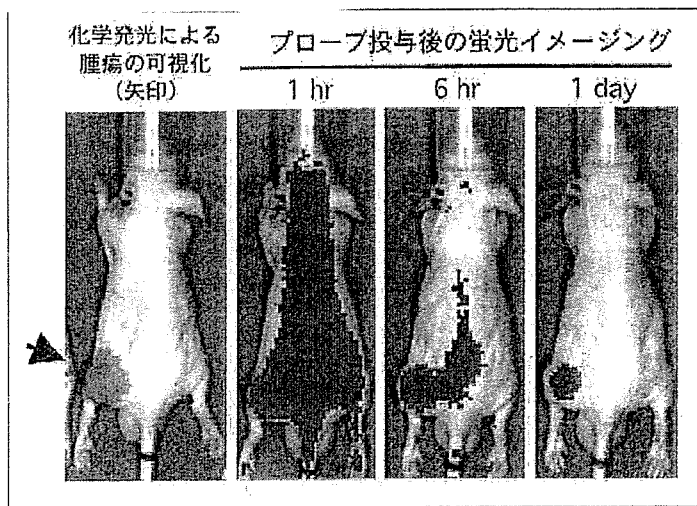


図3-2 マウスを用いた腫瘍低酸素細胞の *in vivo* 蛍光イメージング  
化学発光 (左端) およびプローブに由来する蛍光シグナル (他) をマウス背面からの撮影写真に重ねて表示した

素環境にある細胞内で安定化する転写制御因子 HIF-1 $\alpha$  の酸素濃度依存的分解ドメイン (ODD) に、膜透過性ペプチド (PTD)、キャリアータンパク質および近赤外蛍光物質を連結した (図3-1)。プローブは PTD の機能によって全身の細胞内にデリバリーされる。通常、酸素濃度環境にある細胞では、プローブは ODD の機能により迅速に分解され、蛍光物質

は拡散する。これに対し腫瘍内の低酸素がん細胞ではプローブは安定化するため、蛍光物質は腫瘍内に滞留する。結果として、滞留時間の差に起因する腫瘍特異的な蛍光コントラストが観測されることが考えられる。

ヒトがん由来の株化細胞を異種移植するため、実験にはヌードマウスを用いる。恒常的にルシフェラーゼを発現するよう遺伝子導入を施したがん細胞を移植し、大腿部皮下に腫瘍を作成しておく。蛍光イメージング装置は、光学フィルタ交換などの操作が自動化されており、ハイスループットな検出が可能である。蛍光プローブをマウスの尾静脈より投与し、イソフルラン吸引による連続的な麻酔処置の元、遮光された観察チャンバー内に配置する。観察チャンバー内の上方にレーザー光源および検出器である高感度冷却 CCD カメラが設置されており、光学フィルタを介することで、任意の照射/検出 (撮影) 波長域が選択される。通常撮影は数十ミリ秒から数秒程度の露光で行う。図3-2 に得られたイメージを示した。移植腫瘍細胞のルシフェラーゼに由来する化学発光イメージ (左端のマウス) と、プローブに由来する蛍光イメージ (それ以外) を比較することで、プローブの腫瘍への集積を確認する。プローブに由来する蛍光が腫瘍以外の領域では迅速に減衰し、結果として腫瘍の蛍光強度が明瞭化している様子がわかる (未発表データ)。光イメージングの画像解析能は、3D 画像処理ソフトの開発等で改善されつつあるものの、現在の段階では蛍光プローブの組織内分布を外部から確認することは不可能である。我々のプローブにおいても、腫瘍内低酸素領域への集積は、最終的に免疫組織学的手法を用いて確認する必要がある。

### 3. *In vivo* 蛍光イメージングの現状

#### 1) 基礎研究

蛍光観察はその利便性と透過性の問題から、基礎研究での利用が盛んである。マウス等小動物を用いた薬物スクリーニングや体内動態の観察、イメージングプローブの開発、遺伝子発現の観察において、蛍光イメージングは有用性を発揮している。

蛍光物質は、単体では血管のマッピングや組織への浸透速度の観察に用いられる。蛍光物質を標識した分子のイメージングは、特にがん研究の分野で盛んである。がん細胞特異的な受容体に対する抗体やペプチドリガンドへ蛍光標識を行い、腫瘍のイメージングプローブとする。またリポソームに蛍光物質を内包し、EPR効果による腫瘍への集積を観察する。バックグラウンド低減のための一手法として、近接する蛍光分子間で生じる消光効果(クエンチング)が利用される<sup>6)</sup>。また、がん細胞表面の膜タンパクに特異的に結合するペプチドを用いた腫瘍イメージングプローブが作成されている<sup>7)</sup>。腫瘍への特異的集積能の向上、検出時間の短縮が課題となっている。

QDを用いた*in vivo* 蛍光イメージングは近年急速に発展した。*In vivo*の実験系では、QDがリンパ節へ迅速に取込まれる性質を利用し、腫瘍センチネルリンパ節の造影剤としての有効性が示されている<sup>8)</sup>。またQDはEPR効果により腫瘍に蓄積されるため、腫瘍イメージングプローブとして検討されている。QDの表層に、精巣特異的な膜抗原を標的とした抗体を連結したプローブでは、精巣がん特異的な集積が確認された<sup>9)</sup>。

がん研究分野において、GFPを高発現する腫瘍細胞を用いた研究が多く報告されている。GFP発現腫瘍細胞をモデル動物に移植することで、腫瘍の増殖を蛍光強度の変化として非侵襲的に観測することが可能である。また、GFP発現腫瘍細胞を静脈に注入することで、接着や浸潤、毛細血管内の移動など、腫瘍細胞の血管内動態を克明に観察することができる。全身的にGFPを高発現するトランスジェニックマウスに、GFPと異なる色調の蛍光タンパク質を発現している腫瘍細胞を移植することで、腫瘍の増殖や転移の状況が観察できる<sup>10)</sup>。

マウスの遺伝子導入実験において、GFPをはじめとする蛍光タンパク質は、ジーンターゲットイングやトランスジェニックでの遺伝子マーカーとして用いられる。GFPの蛍光をモニタすることで、ターゲット遺伝子の導入状況を確認する。あるいは発現状況を全身的あるいは局所的にイメージングする。発生生物学分野において、GFPは $\beta$ -ガラクトシダーゼと並びレポーター遺伝子として一般的に用いられる。

#### 2) 臨床応用

臨床応用分野での全身的な蛍光イメージングは、光透過性の問題により現在のところ困難である。眼底部や消化器官表層の腫瘍の検査、あるいは外科的に組織を露出した場合など、光透過性の影響が小さい局所的な造影・マーキング方法としての蛍光物質の利用がほとんどである。

ICG及び有機系の蛍光物質であるソルオレセインは、眼底疾患検査の造影剤として使用されている。可視領域の励起・蛍光を持つフ

ルオレセイン (励起495nm, 蛍光519nm) に比べ, 近赤外蛍光色素である ICG は深部の造影が可能であるという点で優れている。食道, 胃, 膀胱など消化器系の腫瘍の検出には, 蛍光検出機能を備えた内視鏡(Auto fluorescence endoscopy)を用いることができる。腫瘍は正常組織に比べ自家蛍光が強いため, 内視鏡検査での良い診断指標となる<sup>11)</sup>。可視光を利用する通常の内視鏡では検出が困難な, 早期がんや前がん病変部の発見に役立てられている。Fluorescence-guided surgery と呼ばれる方法では, 蛍光物質を病変部のマーキングに用い外科的切除の助けとしている<sup>12)</sup>。がん細胞は強いポルフィリン集積能を持つため, 前駆物質である5-アミノレブリン酸を事前に投与することで, ポルフィリン由来の蛍光を腫瘍特異的に集積させることが可能である。最近では, 乳がんのセンチネルリンパ節をQDでイメージングすることで低侵襲的に検出しようとする試みもある(私信)。光線力学的療法(Photodynamic therapy)では, 腫瘍集積性を持つ蛍光物質を治療に用いる。励起された蛍光分子と酸素の反応により強力な酸化作用をもつ一重項酸素が生じ, 腫瘍細胞や腫瘍内血管が直接的な損傷を受けることで抗腫瘍作用が発揮される。赤色レーザーによる励起が必要であるため, 光透過性が障害となりにくい表層的な腫瘍の治療にのみ用いられる<sup>13)</sup>。

### おわりに

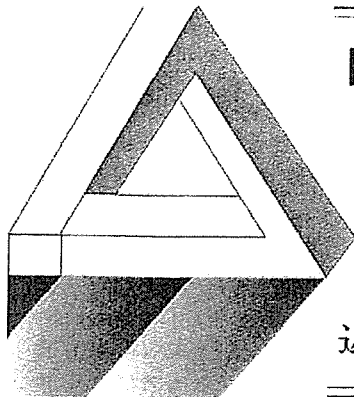
蛍光イメージングの長所は蛍光物質の多様性にある。また抗体製剤などの機能性分子に標識することで, 体内輸送のモニタリングと薬効の検査を兼ねたハイスループットな薬理

試験が可能である。多くの蛍光物質が市販されており, 標的物質への標識も比較的容易であるため, 薬理・医療における基礎研究への小動物を用いた *in vivo* 蛍光イメージングの利用はさらに拡大してゆくものと思われる。より透過性の高い蛍光物質や革新的な蛍光検出機器の開発により, 基礎研究・臨床応用の両分野において *in vivo* 蛍光イメージングが今後益々発展していくことが期待される。

謝辞: 本稿で紹介した腫瘍低酸素細胞特異的な蛍光イメージングプロトコルは, JST 京都市地域結集型共同研究事業(ナノメディシン拠点形成の基盤技術開発)における研究開発の一部である。

### 参考文献

- 1) Shibuki K, Iishida R, Murakami H, et al.: J Physiol. 549(Pt 3):919-927, 2003
- 2) Frangioni JV: Curr Opin Chem Biol. 7(5): 626-634, 2003
- 3) Gao X, Yang L, Petros JA, et al.: Curr Opin Biotechnol. 16(1): 63-72, 2005
- 4) Ikawa M, Yamada S, Nakanishi T, et al.: Curr Top Dev Biol. 44: 1-20, 1999
- 5) 近藤科江, 原田浩, 平岡真寛. BIO Clinica, 20(1): 53-58, 2005
- 6) Bremer C, Tung CH, Weissleder R: Nat Med. 7(6): 743-8, 2001
- 7) Ruoslahti E: Biochem Soc Trans: 32(Pt 3): 397-402, 2004
- 8) Kim S, Lim YT, Soltész EG, et al.: Nat Biotechnol. 22(1): 93-7, 2004
- 9) Gao X, Cui Y, Levenson RM, et al.: Nat Biotechnol. 22(8): 969-76, 2004
- 10) Hoffman RM: Nat Rev Cancer. 5(10): 796-806, 2005
- 11) Kara MA, Peters FP, Ten Kate FJ, et al.: Gastrointest Endosc. 61(6): 679-85, 2005
- 12) Stummer W, Pichlmeier H, Meinel T, et al.: Lancet Oncol. 7(5): 392-401, 2006
- 13) Huang Z: Technol Cancer Res Treat. 4(3): 283-93, 2005



# HIF-1を利用した 腫瘍内低酸素がん細胞の イメージング・ターゲティング-1

近藤 科江\* / 原田 浩 / 田中正太郎 / 平岡 眞寛

## はじめに

腫瘍内には酸素濃度が極めて低い領域があり、それが放射線抵抗性の原因であることが示唆されたのは、今から50年以上も前になる<sup>1)</sup>。それ以来、低酸素がん細胞に由来する問題を解決するために、多くの臨床医・研究者が多大な努力をほらい、数かぎりない挑戦を繰り返してきた。しかし、現在に至るまで、問題を完全に克服するに至っていない。我々は、低酸素がん細胞に対する「飽くなき挑戦者」の一人として、あらたな研究の扉を開いた。それは、低酸素がん細胞の生物学的な特徴を利用することで、低酸素がん細胞を特異的に死滅させる方法である。

## 低酸素がん細胞

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、低酸素領域は、酸素も栄養も枯渇して死滅し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口に値しないのであるが、これらの細胞はがん治療の

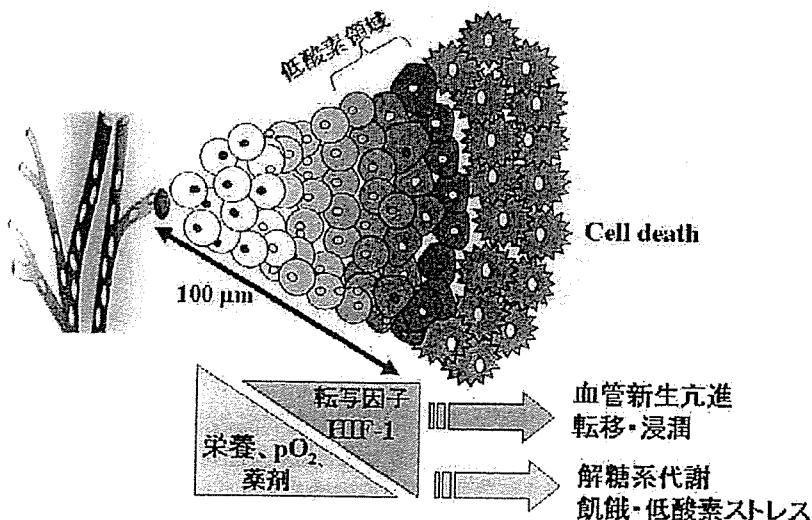


図1 がんの微小環境

腫瘍内では、がん細胞の増殖と血管新生の制御が正常になされないために、栄養や酸素が十分に供給されない領域(低酸素領域)ができる。血管から供給される栄養や酸素が周囲の細胞を維持できる距離は高々100 μm程度であり、血管からの距離が大きくなるにつれて、酸素や栄養の濃度は小さくなり、ついには酸素や栄養が枯渇して死んでしまう領域ができる。低酸素領域にある細胞は、飢餓や低酸素ストレスを受けつつ、省エネルギーのために解糖系代謝を行い、HIF-1の活性を高めて、生き延びるために必要な遺伝子の発現を促す。その結果、血管新生や転移・浸潤能の亢進が起こり、癌の悪性化を引き起こす。

\*Shinae Kizaka Kondoh · Hiroshi Harada · Shotaro Tanaka · Masahiro Hiraoka / 京都大学医学研究科 · 放射線腫瘍学 · 画像応用治療学  
skondoh@kuhp.kyoto-u.ac.jp

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<sup>2,3)</sup>。更に、生き延びるために様々な因子(例えばVEGF, TGF- $\beta$ , FGF, IGF-1)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。

### 酸素濃度依存的制御機構

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 $\alpha$ 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、1970年前半にSemenza博士らによって発見された<sup>4)</sup>。HIF-1 $\alpha$ 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

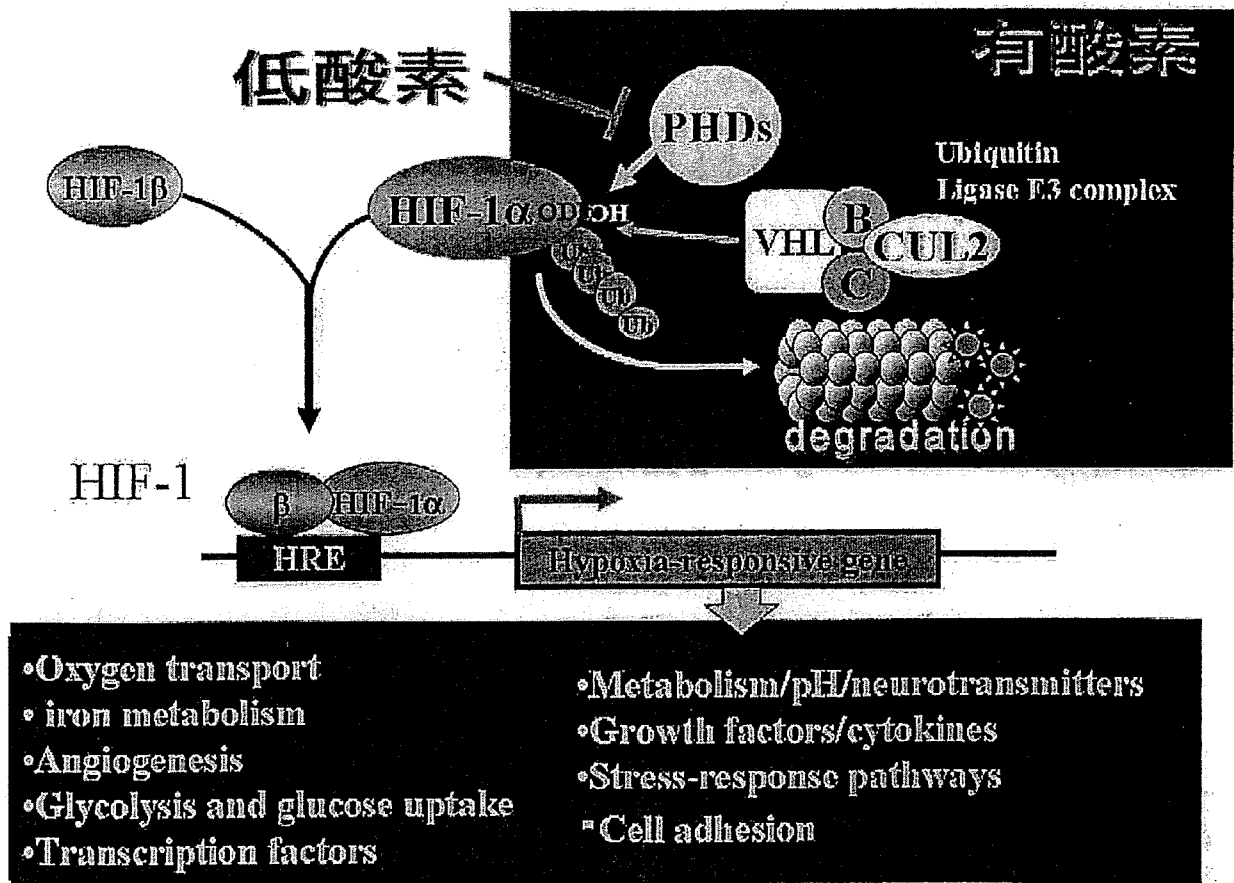


図2 HIF-1転写活性とHIF-1 $\alpha$ の酸素依存的分解機構

HIF-1は、HIF-1 $\alpha$ とHIF-1 $\beta$ の2つのサブユニットからなり、HIF-1 $\alpha$ タンパク質の安定性は酸素依存的に制御されている。低酸素細胞内では、HIF-1は、標的遺伝子のプロモーター、エンハンサー領域にある低酸素応答配列(HRE)に結合して低酸素依存的転写活性を誘導する。その結果、図1で示したようながんの悪性化、解糖系代謝にかかわる様々な遺伝子の発現が誘導される。一方、有酸素状態の細胞では、プロリン水酸化酵素(PHD)によりODDドメインのプロリン残基が水酸化され、それを狙ってユビキチン付加酵素E3複合体がVHLを介して結合し、HIF-1 $\alpha$ のユビキチン化を誘導し、プロテアソームに運ばれて分解される。この酸素依存的分解は、非常に速やかで、有酸素状態の細胞内では、HIF-1 $\alpha$ は数分以内に分解される。



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おり、現在までに60を超える遺伝子が報告されている<sup>5)</sup>。

我々は、HIF 1 $\alpha$  タンパク質の『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』酸素依存的分解(ODD)機構に着目した。この制御機構の詳細は2001年にプロリン水酸化酵素(ヒトでは3種類PHD1-3)がクロニングされ<sup>6)</sup>、詳細な分子制御機構が解明されている<sup>5)</sup>。即ち、プロリン水酸化酵素が、HIF 1 $\alpha$  タンパク質の中央付近にあるODDドメイン内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 $\alpha$  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(図2)。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本質であった。このODD制御は極めて厳密で、低酸素下で安定化したHIF-1 $\alpha$  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。

### PTD-ODD融合タンパク質の構築

任意のタンパク質の安定性をHIF-1 $\alpha$  同様に、酸素濃度依存的に制御することができれば、任意のタンパク質の機能を酸素依存的に制御できる。すなわち、低酸素がん細胞を特異的にターゲティングしたり、イメージングしたりすることができることになる。これが、PTD-ODD融合タンパク質を作ることになった動機である。最初に検証したのが、HIF-1 $\alpha$  のODDドメインを任意のタンパク質に融合させることで、『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』融合タンパク質を作れるか否かであった。ODDドメイン全体(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、

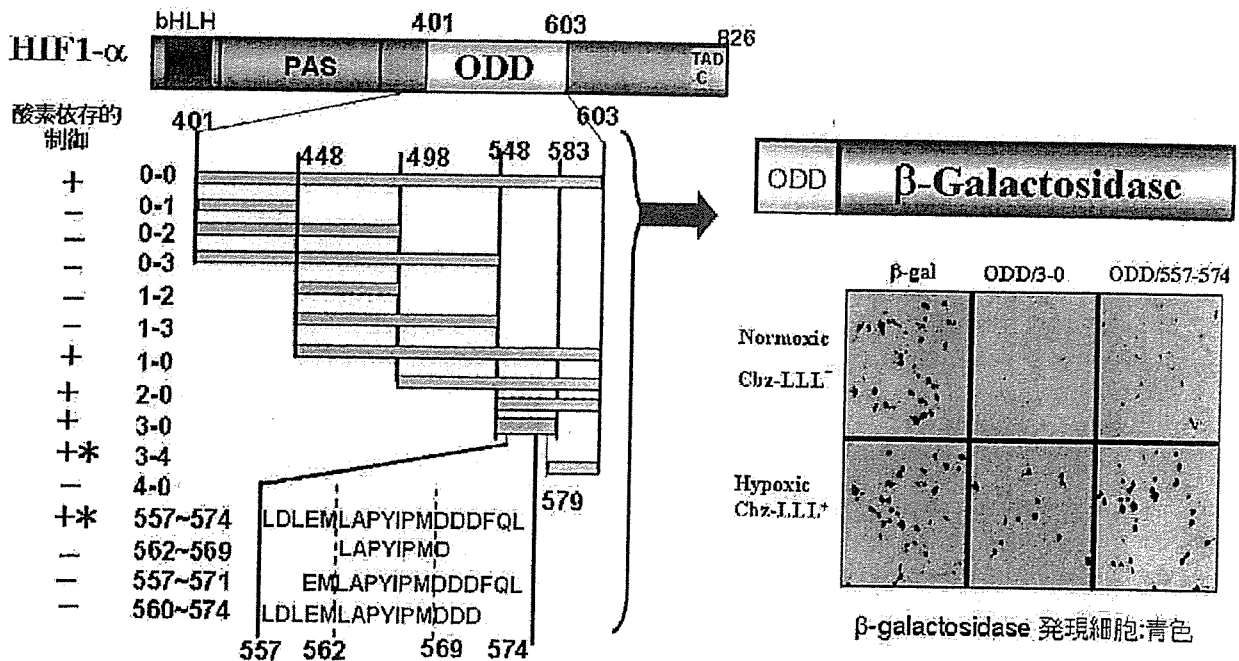


図3 酸素依存的分解能を有する融合タンパク質の構築

HIF-1 $\alpha$  の酸素依存的分解制御を利用するために、HIF-1 $\alpha$  ODDドメインをレポーター(この場合  $\beta$  galactosidase)に融合させてレポータータンパク質の活性(この場合青色染色細胞)を基にスクリーニングを行った結果、右下図にあるように、ODD<sub>3-0</sub>とODD<sub>557-574</sub>領域を融合した時に酸素依存性がみられることがわかった。他のタンパク質もを融合させた場合も、ODD<sub>3-0</sub>とODD<sub>557-574</sub>領域を融合することで同様に酸素依存性を付加することができた。アミノ酸配列内の赤字プロリン残基は、図2で述べたPHDにより水酸化を受けるプロリン。

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3)。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<sup>7)</sup>。

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はほぼ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は、マウスを用いた実験で、腹腔内に融合タンパク質を注射すると、脳を含む全身の組織細胞に融合タンパク質をデリバリーできることが報告されている<sup>8)</sup>。そこで我々は、PTD-ODD-β-ガラクトシダーゼ融合タンパク質を構築し、それを腹腔内に投与し、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(図4)。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。つまり、正常組織や腫瘍の大部分は酸素が十分にある状態(有酸素状態)

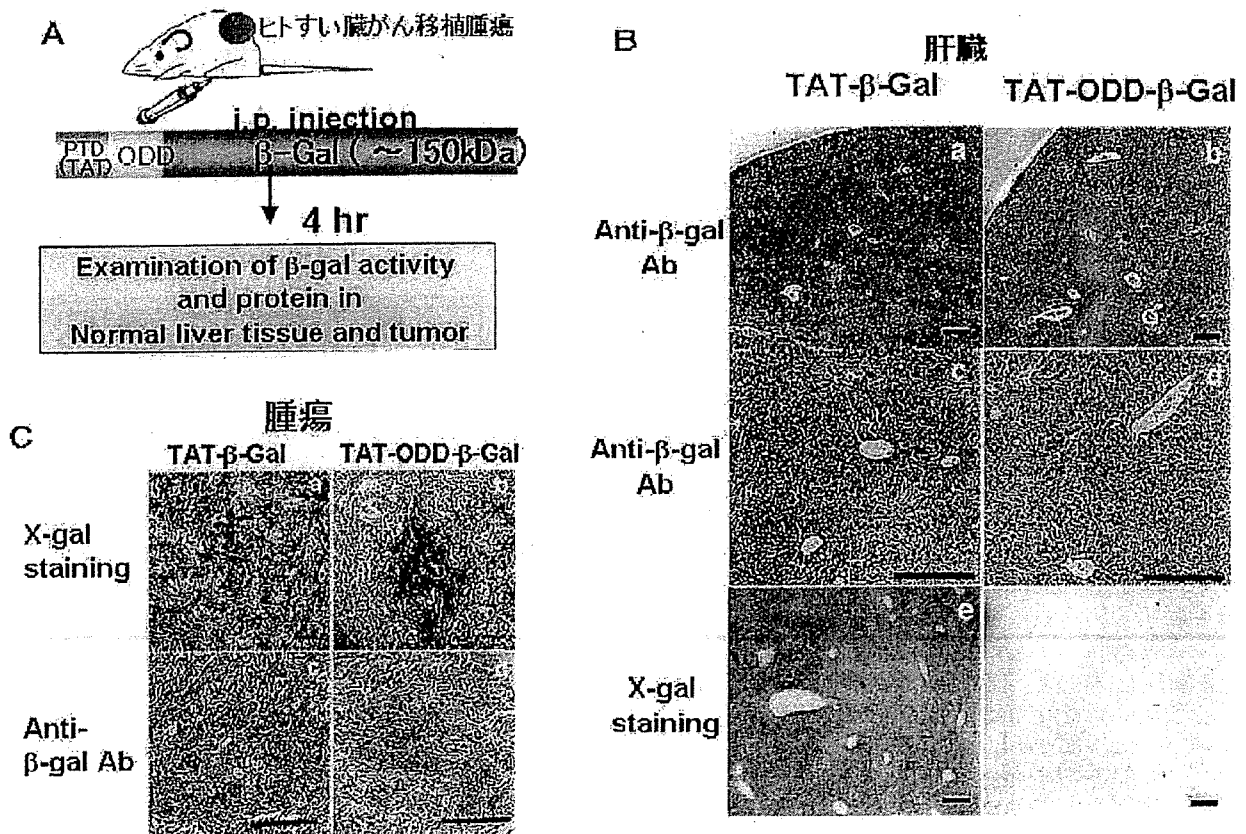


図4 PTD-ODD融合タンパク質の生体内低酸素がん特異性

A) PTD-ODD-β-galactosidaseとPTD-β-galactosidaseタンパク質をそれぞれ担がんマウス腹腔内に投与し、4時間後に肝臓と腫瘍の切片を作成した。B) C) β-galactosidaseのタンパク質と活性をそれぞれ抗体による免疫染色およびX-gal染色により確認した。ODDの融合していないβ-galactosidaseを投与したマウスの肝臓および腫瘍は、切片のほぼ全体にβ-galactosidaseのタンパク質、活性が確認できたが、ODDを融合したβ-galactosidaseは、腫瘍の一部でしか確認できなかった。

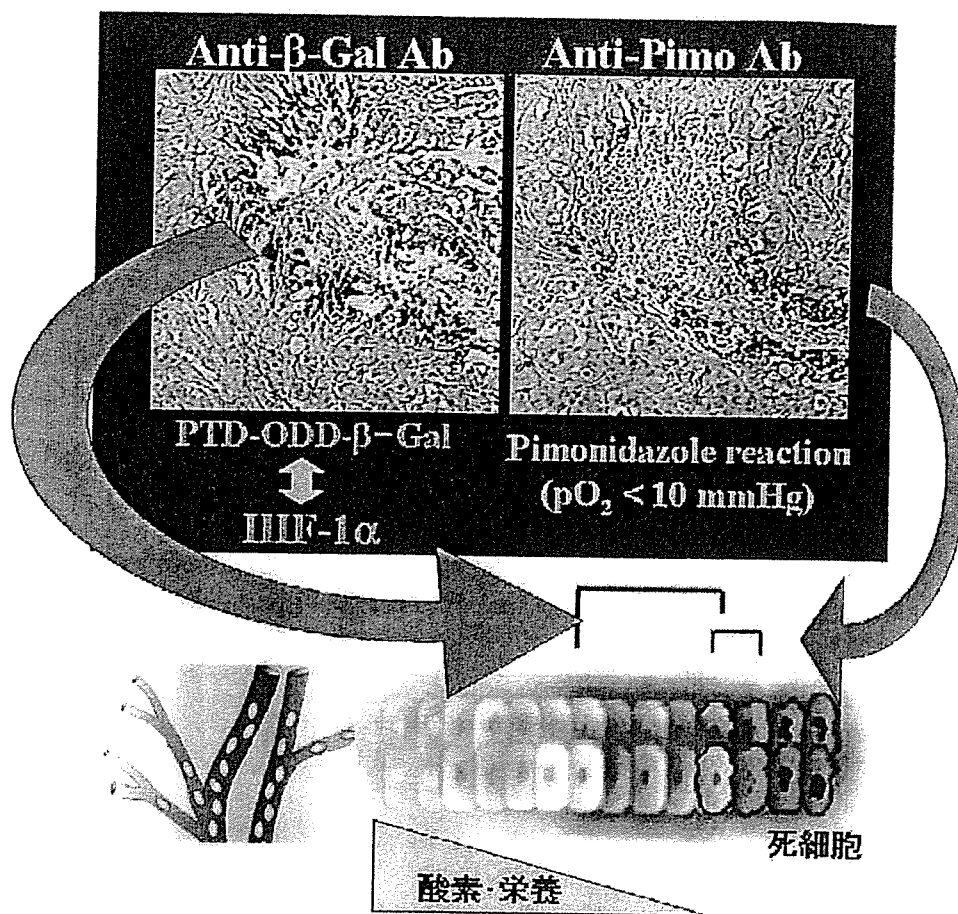


図5 ODD融合タンパク質の腫瘍内局在

PTD-ODD- $\beta$ -galactosidase融合タンパク質を担がんマウスの腹腔内に投与し、2時間後に低酸素マーカーピモニダゾールも投与、4時間後に腫瘍を摘出し、連続切片を $\beta$ -galactosidase抗体(左上)および低酸素マーカー検出抗体(右上)を用いて免疫染色した。同様の場所が染色されるものの、常にODD融合タンパク質が局在するところは、ピモニダゾールで確認される場所よりも幅広い。ピモニダゾールが10mmHg以下という極めて低酸素で反応する化合物であり、ODD融合タンパク質が、HIF-1 $\alpha$ とほぼ同様のタンパク質安定性制御を受けていることを考えると、ピモニダゾールで染色されている低酸素領域とHIF-1が活性化させる領域が必ずしも一致していないことを示唆している。

にあり、腫瘍の一部でのみ低酸素細胞が存在することを示唆していた。その事を確認するために、低酸素マーカーとして知られている化合物ピモニダゾール(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、 $\beta$ -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(図5)。これらの結果は、我々の設計通り、PTD-ODD融合タンパク質は酸素濃度依存的制御を受け、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る。

### HIF-1と低酸素領域

図5の免疫染色された部分を比較すると、PTD-ODD融合タンパク質が分布している腫瘍内領域は、低酸素マーカーPimonidazoleで染色される領域より血管に近い方に広く広がっていることがわかる。この場合は、 $\beta$ -galactosidaseであるが、別のタンパク質が融合された場合も同様な結果が得られた。最近の報告では、HIF-1 $\alpha$ が分布する低酸素領域と還元酵素が機能する(すなわちイミダゾール化合物が還元反応を起こす、より低酸素な)領域では腫瘍内分布が微妙に異なる事がわ

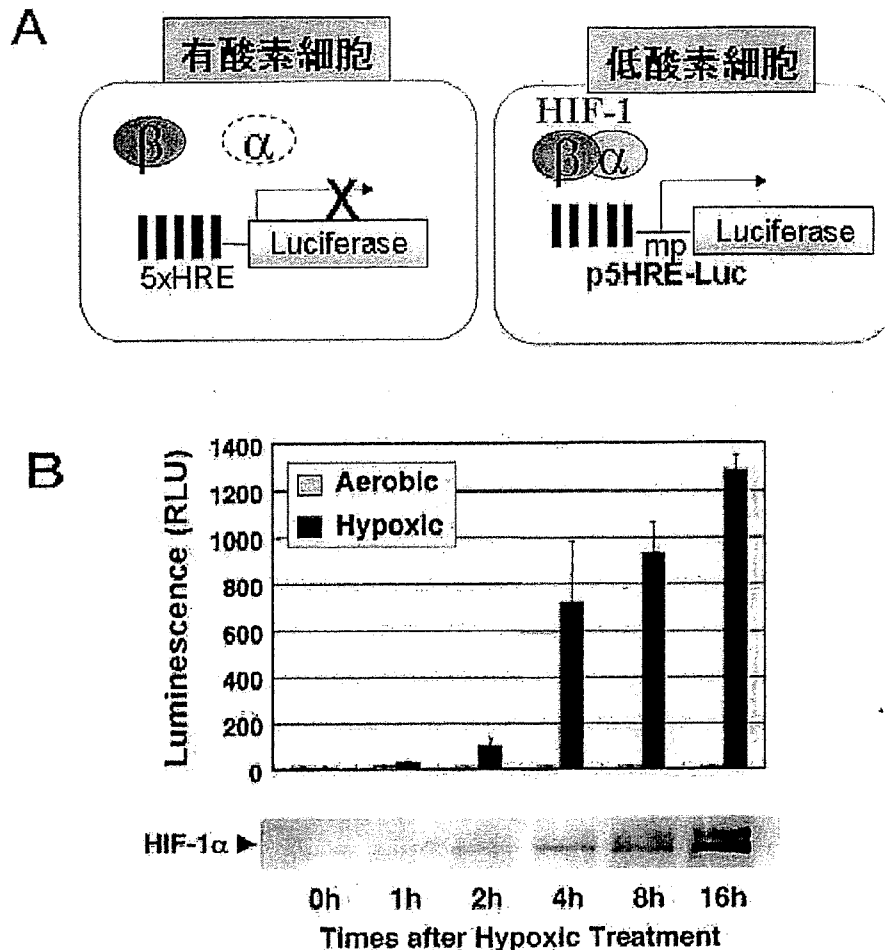
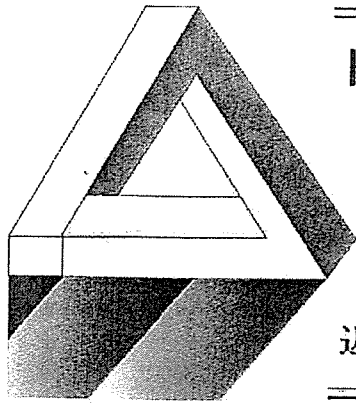


図6 低酸素応答レポーターを有するヒトがん細胞株の構築

A) 図2で述べた低酸素応答配列(HRE)をもつプロモーターの下流に化学発光酵素ルシフェラーゼ(Luciferase)をつないだレポータープラスミド(5HRE-Luciferase)を安定に保持するヒトがん細胞を構築した。B) この細胞を一定時間低酸素状態で培養して、細胞溶解液をつくり細胞内のHIF-1 $\alpha$ 蛋白質量とルシフェラーゼ活性を測定すると、低酸素処理の時間が長くなり、HIF-1 $\alpha$ が安定化する(上: ウェスタンブロット)のに並行してルシフェラーゼ活性が上昇する(下グラフ)。

かった<sup>9)</sup>。HIF-1転写因子により発現する遺伝子群の機能が、がんの悪性化に大きく寄与していることから、『HIF-1 $\alpha$ が分布する低酸素領域』をイメージング・ターゲティングすることは意義がある一方で、『還元酵素が機能するより低酸素な領域』が課題として残されることを常に意識する必要がある。この『還元酵素が機能する領域』は、放射線増感剤等の研究で既にターゲティングの対象

としては、長い歴史がある。この領域をターゲティングすることが、これまで放射線治療に期待されたほど大きな貢献をもたらすことができなかった理由は、ターゲティングが十分に行えていなかったのではなく、この領域をターゲティングする『必要』はもろろあるものの、放射線治療を補うには『十分』ではなかった可能性が高い。(以下次号)



## HIF-1を利用した 腫瘍内低酸素がん細胞の イメージング・ターゲティング<sup>2</sup>

近藤 科江\* / 原田 浩 / 田中正太郎 / 平岡 眞寛

### 低酸素がん細胞の光イメージングによる 可視化

蛍光や化学発光を観察する方法は、細胞レベルから個体レベルに適応範囲が広がりつつある。前述した低酸素特異的転写因子HIF-1は、低酸素条件下で活性化されるので、その活性をモニターすることにより、腫瘍内の低酸素がん細胞を可視化することができる。具体的には、低酸素特異的転写因子HIF-1の結合塩基配列 (hypoxia responsive element; HRE) を含む低酸素応答プロモーターの制御下に蛍光タンパク質GFPや、化学発光酵素ルシフェラーゼの遺伝子を繋いだレポーターベクターを構築し、これを安定に組み込んだがん細胞株を樹立する。この細胞を移植して形成した腫瘍の低酸素がん細胞では、低酸素応答プロモーターからのレポーター遺伝子の発現が誘導され、レポータータンパク質の蓄積が起こる。我々は、HREを5個タンデムに繋いだ配列を持つ低酸素応答プロモーター5HIREの下流にルシフェラーゼを繋いだプラズミドp5HIRE-luciferaseを組み込んだヒトがん細胞を樹立した(前号図6(11月号404頁)参照)。これ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応答してルシフェラーゼタンパク質が発現され(図7)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7)。

\* Shin-ae Kizaka-Kondoh・Hiroshi Harada・Shotaro Tanaka・Masahiro Hiraoka / 京都大学医学研究科・放射線腫瘍学・画像応用治療学

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<sup>10)</sup>。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。現在、蛍光の退色時間を自動的に算出することにより、ほぼ正確に蛍光を発している細胞の深さや大きさを3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もあり、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、多重染色によりひと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。個体レベルでがん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等の方法が主流であったが、少なくともマウスに於いては、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をしのぐものになると思われる。ただし、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い。光プローブの革新的進歩が無い限り、臨床への応用は、体表面に近いがんに限定されると思われる。

### 低酸素がん細胞のターゲティング

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、上流のカスパーズ等により切断されて活性化になると、死刑執行

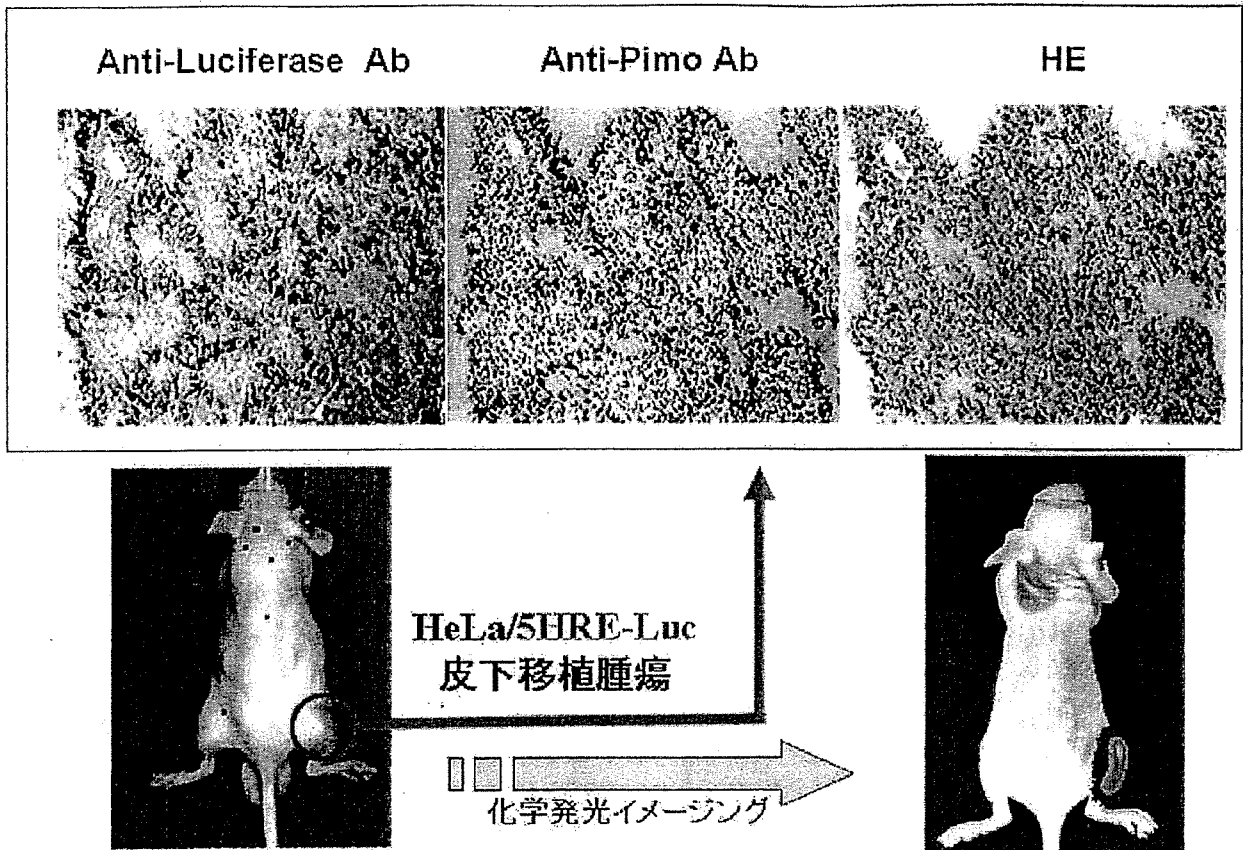


図7 低酸素がん細胞の生体イメージング

図6で構築したがん細胞株をヌードマウスに移植し、形成された腫瘍(左下)の切片を調べると、ルシフェラーゼタンパク質の局在(左上)が低酸素マーカービモニダゾールを用いて免疫染色された領域(上中央)と一致していることがわかる。その領域は、生細胞とネクロシス領域の境目であることがヘマトキシリン・エオジン染色(右上)でわかる。図5と同様に、ルシフェラーゼが局在する領域は、ビモニダゾールを用いて染色した領域より広がっている。このヌードマウスにルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを投与後、生体イメージング機器 (IVIS200) を用いて観察すると、右下のような画像が得られる。この右足にみえるシグナルは、ルシフェラーゼの活性を見ているものであり、したがって、低酸素がん細胞を見ていることになる。このシステムを用いることにより、腫瘍内の低酸素がん細胞が生きのまま、何度でも経時的に観察することができる。

人と称されるほど、強力に細胞死を誘導する。従って、たとえODD-procaspase-3融合タンパク質が、正常細胞内で安定化するような事があっても、安定化しただけでは、細胞死は誘導されない。上述したように、低酸素がん細胞は、「死ぬべき運命にある弱ったがん細胞」であり、低いレベルではあるが、アポトーシスを引き起こすシグナルが活性化されている。従って、低酸素がん細胞で安定化したODD-procaspase-3は、切断されて活性化型のCaspase-3となり、アポトーシスシグナルを増強する(図8)。前述したPTDは、単に血流によって受動的に運ばれるだけでなく、濃度勾配

を利用して自ら分散する能力を融合タンパク質に付加するため、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ことができる。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<sup>7,10,18)</sup>。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治療群では、顕著に低酸素

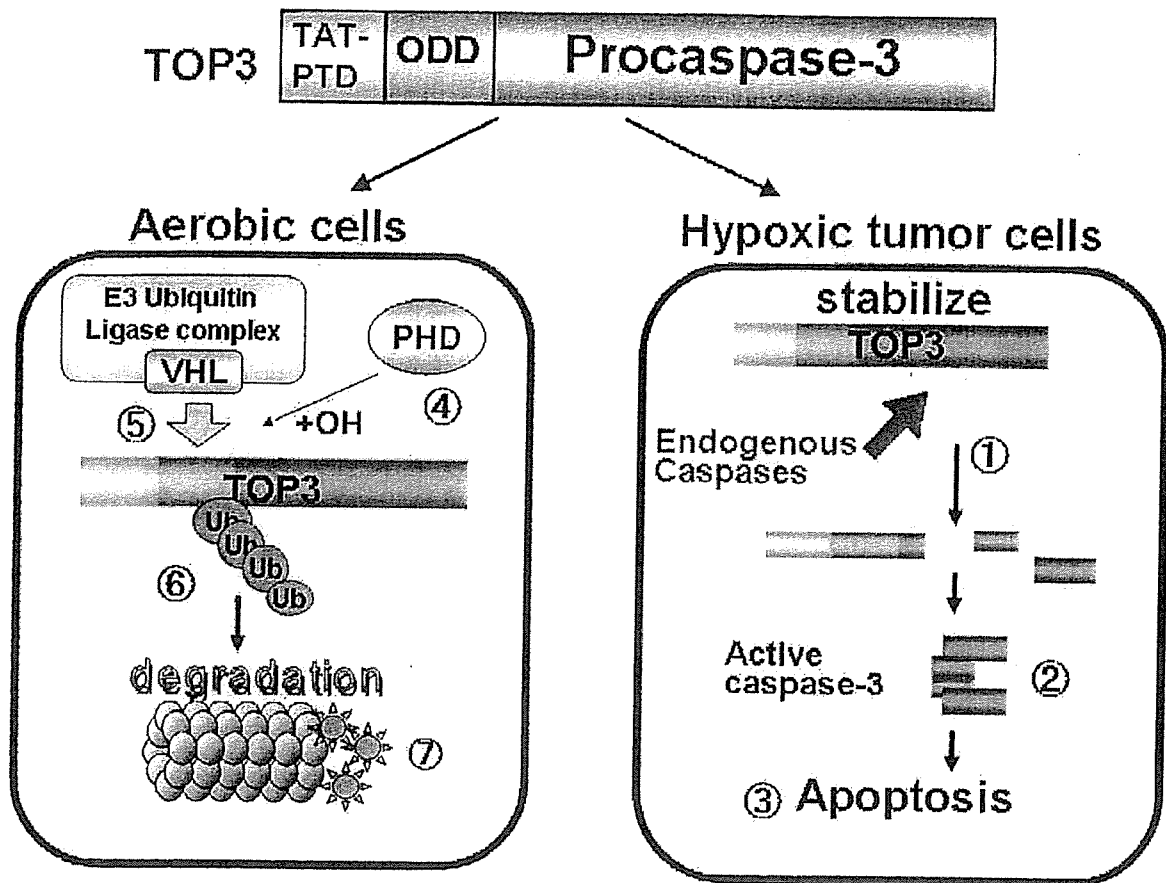


図8 低酸素がん特異的抗がん蛋白質製剤TOP3

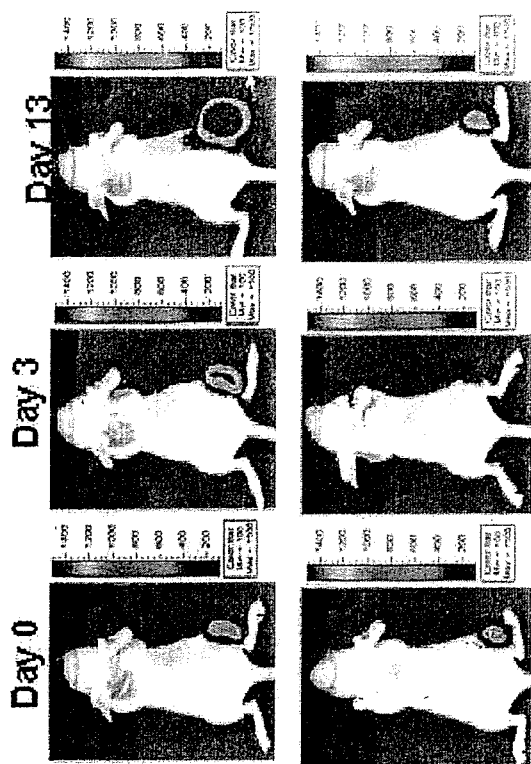
PTD-ODDが融合してあるProcaspase-3は、PTDの機能で細胞内に入ることが出来る。(左)低酸素がん細胞に入ったTOP3は、①低酸素ストレスで活性化されている内在性のカスベース蛋白質切断酵素により切断され、②活性型のCaspase-3(4量体)を形成し、③低酸素がん細胞にアポトーシスを誘導する。(右)一方で、有酸素状態の細胞に入ったTOP3は図2で述べたように④PHDによりODDドメインのプロリンが水酸化され、⑤VHLを介してユビキチン付加酵素が結合し、⑥ユビキチン化され、⑦プロテアソームで分解される。

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がin vivoで低酸素がん細胞特異的抗がん作用を持つことを強く示唆する結果を得た(図9)。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、TOP3投与後12時間後の腫瘍切片を用いてTUNELアッセイを行ったところ、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<sup>10)</sup>。

### TOP3と放射線との併用

最近、放射線によりHIF-1活性が一過性に上昇するという報告がなされた<sup>14)</sup>。上記光イメージング法により検証したところ、確かに放射線照射後HIF-1活性は徐々に上昇し、48時間後にはピークに達して、以後速やかに活性は低下する。TOP3を放射線と併用すると、低酸素に起因するHIF-1活性に加えて、放射線によるHIF-1活性も十分抑さえられる事ができた。放射線とTOP3の併用効果は長期の腫瘍増殖抑制をしめすことがわかった(図

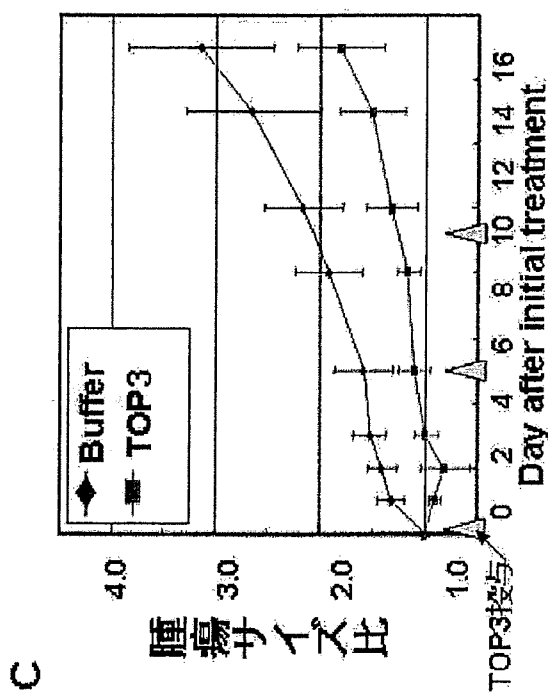
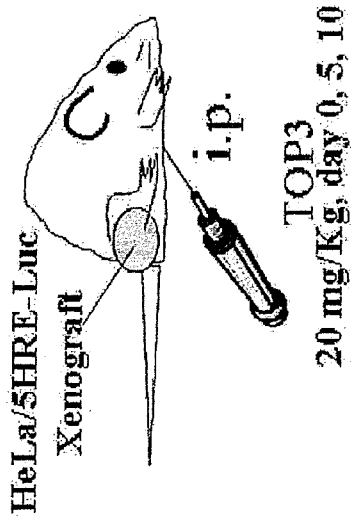


B

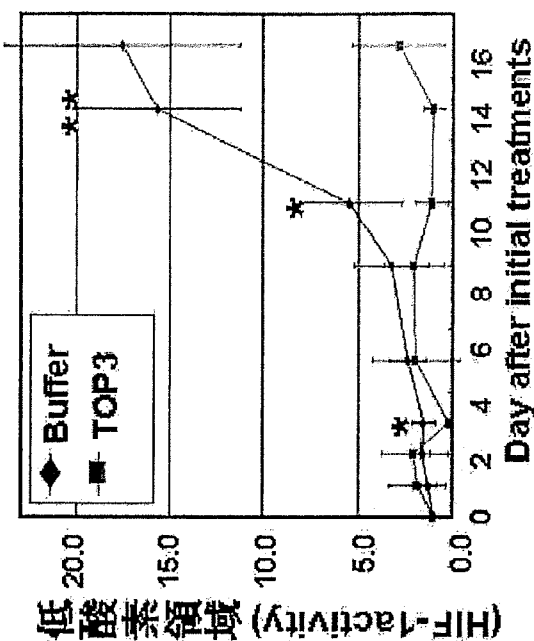
Buffer

TOP3

A



C



D

図9 TOP3の抗腫瘍効果

A) TOP3 (20mg/kg) を一日おきに担がんヌードマウスの腹腔内に投与した。B) 図6と同様にIVIS200で経時的に腫瘍内のルシフレゼ活性を測定することで、低酸素がん細胞の相対的変化を観察。C) 腫瘍の大きさをキャリパーで測定して、day 0の腫瘍サイズに対する比を示した。TOP3で治療した腫瘍は、有意に増殖が抑えられた。D) Bのルシフレゼ活性の発光は定量化できるため、day 0の発光量に対する比で低酸素がん細胞の推移を示した。TOP3で処理した腫瘍は、低酸素がん細胞が少なく推察していることがわかる。



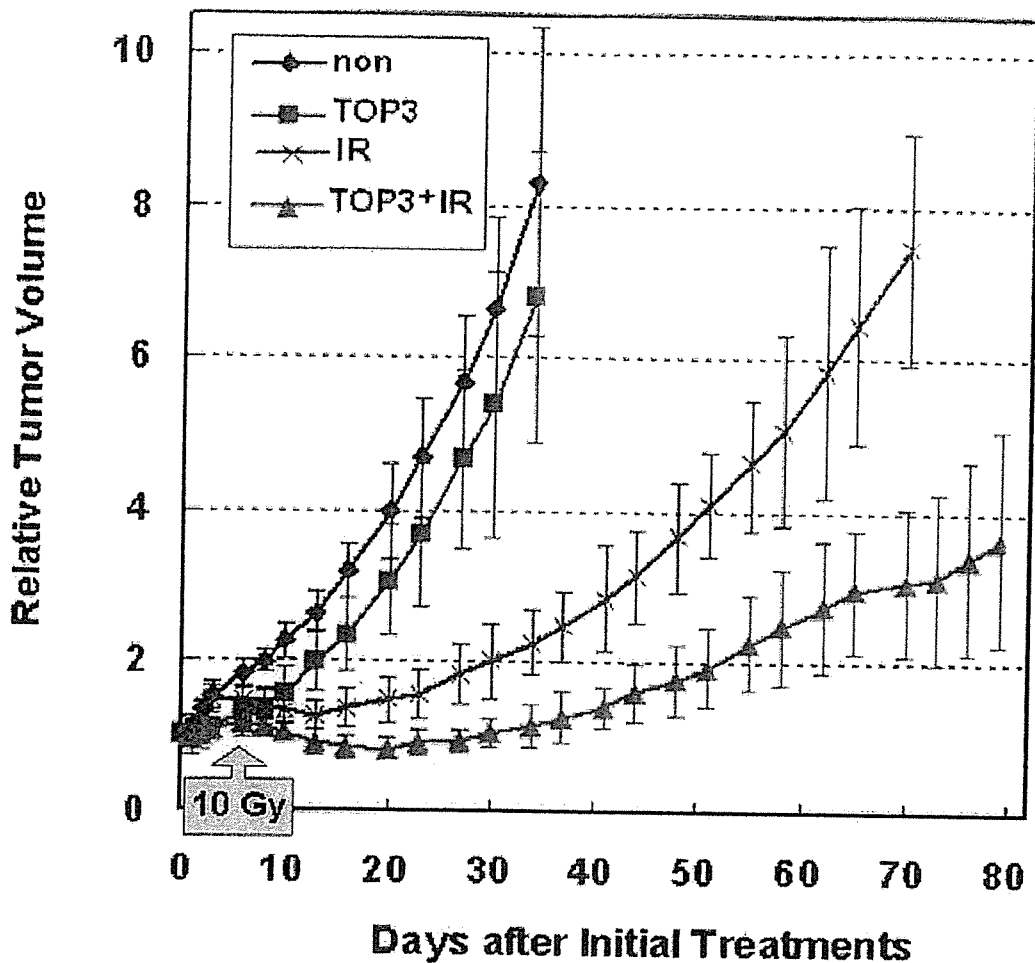


図10 TOP3と放射線との併用実験

ヒト膵臓がん由来細胞株CFPAC-1の皮下移植腫瘍(約200mm<sup>3</sup>)をもったマウスに、TOP3(20mg/kg)をday0, day1, day2に腹腔内投与し、day2に併用実験群のマウス腫瘍に10Gy照射して、経時的に腫瘍サイズの測定を行った。併用治療群の腫瘍は有意に増殖が抑制され、観察終了時の腫瘍は半固形状態でネクローシスが広がっていることが示唆された。day40での切片では、放射線治療群の腫瘍に比べて有意にCD31抗体による染色の数およびサイズが減少しており、血管新生が抑制されていることが示唆された。

10)。TOP3の抗腫瘍効果が一過性であること、放射線が10Gy単回照射であったことから、長期の腫瘍増殖抑制効果は期待してはなかったが、予想を超えて、相加以上の効果をもたらした。この長期腫瘍増殖抑制効果はHIF-1活性を押さえることによる血管新生阻害効果であることを示唆する結果を得た。すなわち、併用治療を行った腫瘍内の血管の数も大きさも、放射線単独、TOP3単独に比べて著しく減っていた。これらの結果は、低酸素や放射線照射によりHIF-1活性が高くなったがん細胞を除去することにより、放射線抵抗性の大きな要因を除き、放射線効果を格段に高める

ことができることを示している。

### おわりに

現在、3.7人に一人ががんで死亡し、2020年には、1年間に84万人ががんにかかる と試算されている。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、世界で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おり、がんが増える第一の要因になっている。年々増え続けている「がん」に対する治療は、特定の「がん」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、

大きな成果を上げている。一方で、どこにできるかわからない「がん」を早期に発見・治療するためには、がんに共通して存在し、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。固形がんに共通して存在する『低酸素』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、我々の標的は『微小環境標的』といえる。悪性度の高いがんにより多く含まれているとされる低酸素領域は、1 mm以下の微小ながんにも存在するといわれており、初期のがんや転移がんの早期発見のための良い標的になる。我々は、PTD-ODD融合タンパク質を用いて、低酸素がん細胞をいかに攻略するかということと平行して、低酸素がん細胞をイメージングする研究を鋭意進めている。

#### 引用文献

- 1) Thomlinson, R. H. and Gray, L. H. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. (1955) *Br. J. Cancer*, 9(4): 539-49.
- 2) Harris AL. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. (2002) *Nat. Rev. Cancer*; 2: 38-47.
- 3) Brown JM and Wilson WR. Exploiting tumor hypoxia in cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer* 2004; 4: 437-447.
- 4) 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.* 1992; 12: 5447-5454.
- 5) Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3: 721-32.
- 6) Epstein AC, Gleadow JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzger E, Wilson MI, Dhanda A, et al. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001; 107: 43-54.
- 7) Harada H, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S. Antitumor effect of TAT-oxygen dependent degradation caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells. *Cancer Res.* 2002; 62: 2013-8.
- 8) Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. and Dowdy, S. F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*. 285, 1569-1572.
- 9) Sobhanifar S, Aquino Parsons C, Stanbridge EJ, Olive P. Reduced expression of hypoxia inducible factor-1alpha in perinecrotic regions of solid tumors. *Cancer Res.* 2005 Aug 15; 65 (16):7259-66.
- 10) 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* 2005; 4: 182-93.
- 11) Kizaka-Kondoh S, Inoue M, Harada H, Hiraoka M. Tumor hypoxia: A target for selective cancer therapy. *Cancer Sci.* 2003; 94: 1021-8.
- 12) Inoue M, Mukai M, Hamanaka Y, Tatsuta M, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S. Targeting hypoxic cancer cells with a protein prodrug is effective in experimental malignant ascites. *Int J. Oncol.* 2004; 25: 713-20.
- 13) Harada H, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M. 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.
- 14) Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* 2004; 5: 429-41.