

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
に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 佐治 英郎

平成19（2007）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に関する研究 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	----- 13
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に関する研究 平岡 眞寛・近藤 科江	----- 15
3. PETイメージングに関する研究 福山 秀直	----- 25
4. PETイメージングに関する研究 中本 裕士	----- 27
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 装置の開発に関する研究 村山 秀雄	----- 29
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 35
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 39
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	----- 133
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・河野 理 熊澤 良彦・大井 淳一・戸波 寛道	

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に関する研究

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、昨年度構築に成功した酸素依存的分解融合タンパク質 (PCOS) の細胞内移行性に関して、従来のTatペプチド由来のものより透過力に優れる膜透過ドメインの配列を新たに作製した。またインビボでの移行性に関しては、蛍光標識した酸素依存的分解タンパク質を用いて、腫瘍低酸素イメージングの予備検討を行うとともに、RI標識PCOSが腫瘍内でも安定に存在することを確認した。さらにこの結果に基づいて、PCOSをプレターゲティングし、その後RI標識プローブを投与することにより、RI標識PCOS自身を投与する場合に比べて、撮像時間の短縮とS/N比の向上の可能性が示され、プレターゲティング法の有効性を示した。また、プローブの放出シグナル増強に関しては、RI標識 dendrimer の体内動態を評価し、血液クリアランスが速やかに血中放射能がイメージングの妨げとならないことを確認した。

分担研究者：

(株式会社島津製作所)

久下 裕司 京都大学・助教授
平岡 眞寛 京都大学・教授
近藤 科江 京都大学・特任助教授
福山 秀直 京都大学・教授
中本 裕士 京都大学・助手
村山 秀雄 放射線医学総合研究所
・チームリーダー

高野 純 部長
清水 公治 主幹技師
北村 圭司 主査
小田 一郎 主任研究員
天野 昌治 主任技師
渡部 勝憲 副参事
小関 英一 主幹研究員
河野 理 主任
熊澤 良彦 主任研究員
大井 淳一 主任
戸波 寛道 主任

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、1 mm以下の腫瘍の検出、診断を可能とすることを旨とする。

本研究の具体的な概要を図1に示す。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、プレターゲットング法による標的指向性の向上と、 dendritomer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る。

昨年度に達成したプローブ開発に係る成果は、HIF-1 α の酸素依存的分解に関与する配列を母体とし、低酸素環境においてHIF-1 α と同じメカニズムで安定化される

融合たんぱく質プローブPCOSを設計・構築したこと、PCOSが低酸素細胞で安定化されることを確認したこと、インビトロでプレターゲットング法の有効性を明らかにしたこと、 dendritomerの表面アミノ基に化学的修飾を加え、複数のRI導入部位の構築の可能性を示したことである。

そこで今年度は、PCOSの細胞内移行性の向上、酸素依存的分解の亢進に寄与するペプチド配列の検討、PCOSと同様のメカニズムで安定化される蛍光標識融合タンパク質を用いたインビボイメージングの基礎検討、インビボにおけるプレターゲットング法の有効性の検討、RI標識 dendritomerの体内挙動の検討を行った。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。

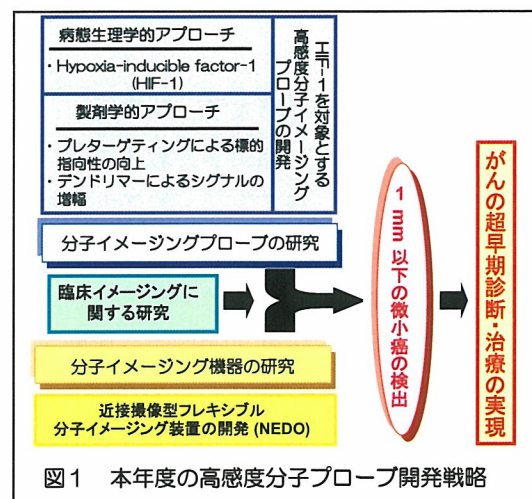


図1 本年度の高感度分子プローブ開発戦略

B. 研究方法

(I) HIF-1イメージングプローブPCOS内の各ドメインの有効性の検討

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。

その目的を達成するため、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; PTD)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PCOSを昨年度に開発済みである。

そこで今年度は、各ドメインの有効性を検討し、必要に応じて最適化を図ることを計画した。

(1) PTDに関する検討

膜透過配列(PTD)としては正電荷を有することが重要であり、これまでにHIV Tatペプチドなどいくつかのものが報告されている。本研究では、酸素依存的分解に関与するユビキチン化酵素の標的となり、かつ正電荷を有するポリリジンを主体とする新規配列PTD3を用いていることから、その配列の有用性をTatペプチド由来のPTD1と比

較した。モデルタンパク質として蛍光タンパク質EGFPと融合させたPTD1-EGFP、PTD3-EGFPを作製し、HeLa細胞への取り込みをフローサイトメトリーによって評価した。

(2) ODDに関する検討

近年、Paltoglouらによって、HIF-1 α のアミノ酸配列中の532、538、547番目のリジン残基がユビキチン化されることが報告された(Oncogene. 2007; 26(4): 604-9.)。そこで、PTD3-ODD配列の酸素依存的分解のさらなる向上を目的として、547番目のリジン残基の位置にリジンが配置されるように、PTD3-ODDにスペーサーとしてGGKを挿入した新たな配列を設計し、EGFPとの融合タンパク質を構築した。従来のPTD3-ODD-EGFPおよび新規のPTD3-ODD-GGK-EGFPをODDの分解を抑制するCoCl₂存在下、細胞に1時間処置し、その後CoCl₂の存在下と非存在下で3時間インキュベートした時の細胞内の蛍光の変化をフローサイトメトリーによって評価した。

(II) 酸素依存的分解蛍光標識タンパク質を使用したインビボイメージング

PCOSと同様、ODDを母体とし、酸素依存的に分解される融合タンパク質を蛍光色素で標識し、インビボ光イメージングの基礎検討を行った。

(III) PCOSの体内動態、インビボプレタージェティングに関する検討

本研究では、検出の感度を高めるために、図2に示すようなプレタージェティング法の概念に基づくイメージングを行う。すなわち、まず低酸素状態でのみ安定に存在するPCOS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ングするという方法である。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体(^{124}I]IBB)を設計し、昨年度に合成法・標識法を確立した。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。

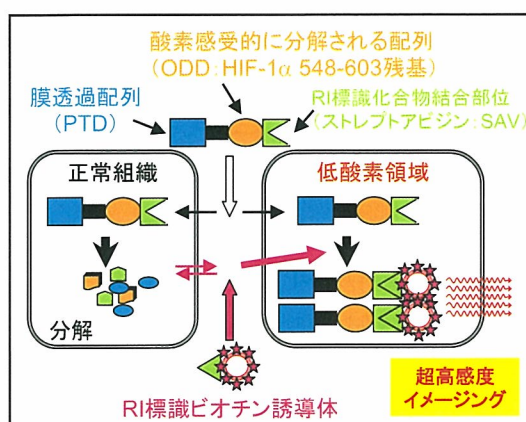


図2 プレターゲティング法によるHIF-1イメージングプローブの開発

(1) PCOSの腫瘍集積性の検討

FM3A乳がん細胞を雌性C3H/Heマウス(5週齢)の大腿部皮下に移植し、約2週間飼育して腫瘍の大きさが約1 cmになった個体を実験に用いた。

まず、 ^{125}I]IBB単独あるいは ^{125}I]IBBと結合させたPCOS(^{125}I]IBB-PCOS)を投与し、1、3、6、24時間後に屠殺、臓器を摘出し、重量と放射能を測定した。次に、 ^{125}I]IBB-PCOSの投与量を0.05-30 μg に変化させ、投与タンパク量の違いによる体内動態の変化に関して、上述の臓器摘出法により検討を行った。

(2) インビボプレターゲティングの検討

(1)での検討をふまえ、担がんマウスにPCOS 30 μg を投与し、24時間後に ^{125}I]IBBを投与し、さらに1、3、6、24時間後に屠殺、臓器を摘出し、重量と放射能を測定した。同じタイムポイントでの ^{125}I]IBB-PCOSの腫瘍集積や腫瘍/血液比と比較することで、プレターゲティング法の有効性について検討した。

(IV) 高感度分子プローブの開発

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、昨年度は、第6世代PAMAM dendrimer(G6)を出発原料として化学修飾を加え、ビオチン化 dendrimerおよびDTPA(金属キレート部位)導入 dendrimerを開発した。

今年度はビオチン化 dendrimerの表面DTPAの ^{111}In 標識を行うとともに、その体内動態を検討する目的で、雄性ddYマウス(6週齢)に尾静脈投与し、1、3、6、24時間後に屠殺、臓器を摘出し、重量と放射能を測定した。

(V) 既存PETプローブとの比較研究

既存PETプローブに関する知見を得るため、がん患者を対象に臨床PETイメージングを行った。非侵襲的に腫瘍の増殖能を評価できることが期待されている ^{18}F 標識フルオロチミジンを用いたFLT-PETを昨年度より引き続き施行し、FLT-PETとFDG-PETで集積に乖離が見られた場合にどちらが病態を正確に反映しているのかを、原発巣およびリンパ節転移を対象に比較検討した。

またそれ以外の比較対照用プローブとして、低酸素イメージング剤である ^{18}F]FMISO、核酸合成イメージング剤であ

る^[11C]Thymidine、末梢型ベンゾジアゼピン受容体イメージング剤である

^[11C]PK-11195の合成検討を行った。

さらに^[11C]PK-11195に関しては神経膠腫（グリオーマ）患者を対象にPET撮像を行い、神経膠腫に浸潤するミクログリアに発現する末梢型ベンゾジアゼピン受容体を評価することで、神経膠腫の早期発見や炎症性疾患との鑑別が達成できるかどうか検討を行った。

(VI) 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装置用検出器であるDOI（Depth of interaction）検出器に関して、これまでの4層から8層へと発展させ、結晶構造の異なる2つの検出器（LSLS型とLLSS型）を試作して性能の比較を行った。

（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。被験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。

組換えDNAを使用する実験は「組換えDNA実験指針」に基づき、本学で承認されているP1レベルの実験室で行った。

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) HIF-1イメージングプローブPCOS内の各ドメインの有効性の検討

(1) PTDに関する検討

PTD1-EGFPを細胞に処置したところ、未処置の細胞に比べて細胞内の蛍光は4倍に

増加した。さらにPTD3-EGFPでは8倍に増加し、PTD3の方が細胞内移行性が高いことが示された。またPTDのついていないEGFPを処置した時には、細胞内の蛍光は未処置細胞と差が見られなかった。

次に、タンパクを細胞に処置して12時間後までの範囲で、取り込みの時間依存性に関して検討を行った。PTD1-EGFPの取り込みは処置3時間後までに飽和し、12時間後でも1時間後の2倍にしか細胞内の蛍光が増加しなかったが、PTD3-EGFPの場合は12時間後まで取り込みが増加し、12時間後の細胞内の蛍光は1時間の10倍に拡大した。

(2) ODDに関する検討

ODDの分解を抑制するCoCl₂存在下、細胞に融合タンパク質を1時間処置し、その後3時間をCoCl₂の存在下と非存在下で培養して、細胞内の蛍光を測定することにより、ODDの分解を比較した。GGKを挿入してHIF-1αの547残基目に相当する位置にリジンを組み込んだPTD3-ODD-GGK-EGFPでは、CoCl₂存在下と比較して、非存在下で有意な蛍光の減少が認められ、所期の通り、PTD3-ODD-EGFPよりも分解速度が速まった結果が示された。

(II) 酸素依存的分解蛍光標識タンパク質を使用したインビボイメージング

プローブ投与1時間後ではマウス体内全体に蛍光が分布していたが、正常組織の蛍光は時間とともに消失し、投与1日後では腫瘍でのみ選択的に蛍光が観察された。

(III) PCOSの体内動態、インビボプレートゲティングに関する検討

(1) PCOSの腫瘍集積性の検討

まず^[125I]IBB単独の体内動態を検討した

ところ、 ^{125}I IBBは腸に高集積を示した。腫瘍へは集積せず、腫瘍／血液比も常に1未満であった。一方、 ^{125}I IBB-PCOSでは、投与6時間後で1.5 %ID/g と腫瘍への集積性が認められ、さらに投与24時間後で腫瘍／血液比は1.6となった。

PCOSが腫瘍集積性を示したため、対血液比が1を上回った投与24時間後において、投与タンパク量の違いによる腫瘍集積、体内動態の変化について検討を行った。その結果、検討した中での最大投与量である30 μg 投与群において、腫瘍集積1.4 %ID/g、腫瘍／血液比5.1と最も高い値を示した。

(2) インビボプレターゲティングの検討

PCOS 30 μg をプレターゲティングし、24時間後に ^{125}I IBBを投与して、各臓器への放射能集積を調べた。その結果、 ^{125}I IBB投与6時間後の腫瘍への放射能集積は1.6 %ID/g、腫瘍／血液比は4.3であり、どちらの値もPCOS- ^{125}I IBB投与24時間後の値と同等であった。また、 ^{125}I IBB投与24時間後では、腫瘍への放射能集積は0.6 %ID/gと減少したものの、腫瘍／血液比は13と顕著に増加した。

(IV) 高感度分子プローブの開発

^{111}In 標識デンドリマーは、肝臓、脾臓に対してやや高く集積したものの、血中放射能は投与3時間後には0.1 %ID/g以下となり、血液クリアランスが非常に速やかであることが明らかとなった。

(V) 既存PETプローブとの比較研究

がん患者に施行したFLT-PET、FDG-PETともに原発巣に対する診断成績は同じであった。一方、リンパ節転移に関する感度はFLT-PETが47%、FDG-PETが53%であり、

FLTとFDGの集積に乖離が見られた4病変のうち、3病変はFDG-PETが正診していた。

また、今回標識検討を行った3種類のプローブに関しては、標識法を確立し、安定供給に成功した。

さらに ^{11}C PK-11195を用いた神経膠腫患者のPET撮像および理組織検査により、神経膠腫組織に集積するミクログリアにおいて、末梢型ベンゾジアゼピン受容体がほとんど発現していないことを見出した。

(VI) 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

光電ピークの相対値とエネルギー分解能については、LSLS型とLLSS型で大きな相違はなく、エネルギー分解能は全層でほぼ均一であった。しかしながら、LLSS型での2Dポジションヒストグラムにおける端の結晶識別の悪さが検出器全体の性能に最も寄与すると考えられるため、その改善方法が見つからない限りはLSLS型の方が有効であると考えられた。

D. 考察

PTDの細胞膜透過能に関する検討を行ったところ、Tatペプチド由来のPTD1よりもポリリジンを主体とするPTD3の方が透過能が高く、またそれが飽和しにくいことが示されたことから、PTD3の有用性が示された。PTD1はカチオン性ペプチドであるが、PTD3はポリリジンに由来するカチオン部とトリプトファンなどに由来する疎水部からなるペプチドで、両親媒性である。他の両親媒性PTDに関して、疎水部が細胞膜と相互作用してリン脂質の間隙を広げることで細胞内への移行率が増加するメカニズムが報告されたことから、PTD3に関してもカ

チオン部と細胞膜上のヘパラン硫酸などとの結合以外に、疎水部と細胞膜との相互作用があり、結果的にPTD1よりも細胞内移行性が高まった可能性が考えられる。

次に、PCOSと同様、ODDを母体とし、酸素依存的に分解される融合タンパク質を蛍光色素で標識し、インビボ光イメージングを行ったところ、投与1日後で腫瘍の描出に成功した。またPCOSをRI標識して担がんマウスに投与したところ、腫瘍への滞留性が認められた。どちらの結果もODDを母体とするタンパク質が腫瘍低酸素領域で安定に存在している可能性を示す結果であり、検出器に応じてRIや蛍光といった標識分子を変えることで、マルチモダリティプローブとして高い汎用性に繋がる可能性が示された。

PCOSに腫瘍移行性が認められたことから、インビボでプレターゲティングの有効性について検討を行った。その結果、 $[^{125}\text{I}]\text{IBB-PCOS}$ （直接結合体）投与24時間後と同等の腫瘍集積と腫瘍/血液比が、PCOS 24時間プレターゲティングでは $[^{125}\text{I}]\text{IBB}$ 投与6時間で達成できた。これはプレターゲティング法を採用することによって、撮像開始までの時間短縮が可能であることを意味している。また、プレターゲティングで $[^{125}\text{I}]\text{IBB}$ 投与24時間後の腫瘍/血液比は、直接結合体投与24時間後の値の2.5倍以上であり、コントラストの改善も可能であることが明らかとなった。これらの研究成果により、インビボでプレターゲティング法を利用することで、所期の通り、標的志向性の向上が達成できることが実証できた。

高感度プローブの開発では、RI標識 dendriマーの血液クリアランスが非常に速やかであることを見出した。微小がんの超高感度イメージングにおいて、プロ

ーブの速やかな血液クリアランスは極めて重要な要件であり、本実験結果は、RI標識ビオチン化 dendriマーによる高感度化の可能性を示すものである。また、 dendriマーのサイズ（世代数）を小さくすることで、肝臓、脾臓への非特異的集積の減少およびさらなる血液クリアランスの向上が期待できる。

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、PCOSの比較対照となる数種のイメージング用プローブの標識合成法を確立することができた。また、神経膠腫に対する新たな知見を得ることに成功した。

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DOI検出器を8層に発展させ、それに適した結晶構造を検討した。8層DOI検出器の構造が検出器性能に及ぼす影響の分析結果は、今後の多層DOI検出器の開発指針に有益な情報を与えるものと考えられた。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。本年度の検討により、HIF-1 α の酸素依存的分解に関連する融合タンパク質プローブPCOSが既存の膜透過配列よりも優れた細胞内移行性を示すこと、インビボにおいても腫瘍に集積して安定化されることを見出し、また、プレターゲティングによって撮像時間の短縮およびS/N比の向上が可能であることが明らかとなった。これらのことから、PCOSのプレターゲティングと標識

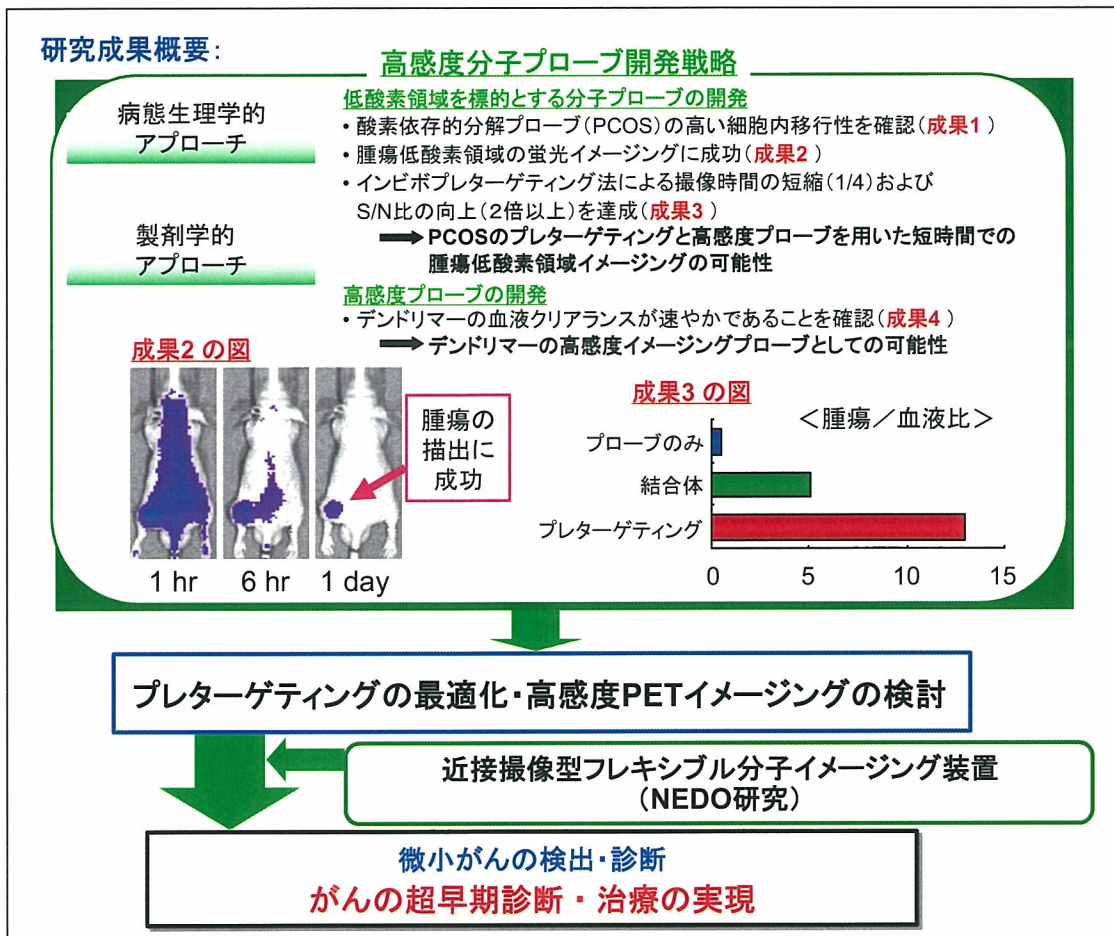


図3 本年度の研究成果の概要と次年度への展望

ビオチン誘導体を利用することで短時間での腫瘍低酸素領域の高感度イメージングの可能性が示された。最終年度はこれらの知見をさらに発展させ、プレターゲティングの最適化と高感度PETイメージングを行うことで、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、1 mm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

- 『低酸素がん細胞』を標的としたがんのイメージング・ターゲティング.
バイオテクノロジージャーナル 6(2), 234-237 (2006) .
- 低酸素を標的とした生体イメージング分子プローブの開発.
未来医学 21, 32-37 (2006) .
- 蛍光の生体イメージングへの応用.

- Bioclinica 21(11), 992-998 (2006) .
- 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 .
放射線科学 49 (11) 399-404 (2006) .
 - 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 2 .
放射線科学 49 (12) 436-441 (2006) .
 - 検出器配置の異なる近接撮影型DOI-PET装置の計算機モデルによる感度・計数率特性の比較.
Med. Imag. Tech., 24, 247-253, (2006) .
 - 近接撮影型DOI-PETの画像再構成における観測系モデルの検討.
Med. Imag. Tech., 24, 300-305, (2006) .
 - “Therapeutic effects of a ¹⁸⁶Re-complex-conjugated bisphosphonate for the palliation of metastatic bone pain in an animal model.”
J Nucl Med. 2007; 48(1): 122-7.
 - “Development of a novel ^{99m}Tc-chelate-conjugated bisphosphonate with high affinity for bone as a bone scintigraphic agent.”
J Nucl Med. 2006; 47(12): 2042-7.
 - “Rhenium-186-monoaminemonoamidedithiol-conjugated bisphosphonate derivatives for bone pain palliation.”
Nucl Med Biol. 2006; 33(4): 513-20.
 - “Development of a ¹¹¹In-labeled peptide derivative targeting a chemokine receptor, CXCR4, for imaging tumors.”
Nucl Med Biol. 2006; 33(4): 489-94.
 - “Photochemical synthesis of polycyclic pyrimidines through the acid catalyzed cycloaddition of 6-chloro-1-methyluracil to methyl substituted benzenes.”
Heterocycles. 2006; 70: 501-508.
 - “A new convenient method for the synthesis of [2-¹¹C]thymine utilizing [¹¹C]phosgene.
Tetrahedron Letters. 2006; 47: 5321-5323.
 - “Development of a novel fluorescent imaging probe for tumor hypoxia by use of a fusion protein with oxygen-dependent degradation domain of HIF-1 α .”
Genetically Engineered and Optical Probes for Biomedical Applications IV,
Proceedings of SPIE Volume 6449,
64490Y (2007).
 - “Mechanism of hypoxia-specific cytotoxicity of procaspase-3 fused with a VHL-mediated protein destruction motif of HIF-1 α containing Pro564.”
FEBS Lett. 2006; 580: 5718-5722.
 - “Suppression of VEGF transcription in renal cell carcinoma cells using pyrrole-imidazole hairpin polyamides targeting the hypoxia responsive element.”
Acta Oncologica. 2006; 45(3): 317-324.
 - “Antitumor protein therapy; application of the protein transduction domain to the development of a protein drug for cancer treatment.”
Breast Cancer. 2006; 13(1):16-26.
 - “Evaluation of primary brain tumors with FLT-PET: usefulness and limitations.”
Clin Nucl Med., 2006; 31(12): 774-80.
 - “Energy spectra analysis of the four-layer DOI detector for the brain PET scanner: jPET-D4.”
Nucl. Instr. Meth.A, 2006; 557, 664-669.
 - “Preliminary evaluation of 4-layer BGO DOI-detector for PET.”
IEEE Trans. Nucl. Sci. 2006; 53(1), 30 -34.
 - “Performance evaluation of a subset of a four-layer LSO detector for a small animal DOI PET scanner: jPET-RD.”

- IEEE Trans. Nucl. Sci. 2006; 53(1), 35 -39.
- “Multichannel CMOS ASIC preamplifiers for avalanche photodiode and microstrip gas chamber readouts.”
IEEE Trans. Nucl. Sci.2006; 53(1), 242-246.
 - “Preliminary resolution performance of the prototype system for a 4-layer DOI-PET scanner: jPET-D4.”
IEEE Trans. Nucl. Sci. 2006; 53(3), 1123-8.
 - “New tracking method for head motion using a single camera and a solid marker.”
Med. Imag. Tech.2006; 24(4), 320-328.
 - “Zr doped GSO:Ce single crystals and their scintillation performance.”
IEEE Trans. Nucl. Sci.2006; 53(5), 2519-22.
 - “8-layer DOI encoding of 3-dimensional crystal array.”
IEEE Trans. Nucl. Sci.2006; 53(5), 2523-8.
 - “Evaluation of static physics performance of the jPET-D4 with Monte Carlo simulations.”
Phys. Med. Biol. 2007; 52, 213-230.
2. 学会発表
- 「低酸素特異的安定化タンパク質を母体とした新規低酸素核医学イメージング剤の開発に関する基礎的検討」
(第1回日本分子イメージング学会総会、2006年5月、京都)
 - 「がんの悪性度診断を目的としたMRI用デンドリマー造影剤の開発に関する基礎的検討」
(第16回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2006)、2006年6月、東京)
 - 「¹¹C-methionine(MET)の腫瘍・肉芽腫への集積性の違い：¹⁸F-FDG及び¹⁸F-FLTとの比較」
(第46回日本核医学会総会、2006年11月、鹿児島)
 - 「低酸素特異的安定化タンパク質を母体とした低酸素核医学イメージング剤の開発に関する基礎的検討；担癌マウスにおける体内挙動の評価」
(日本薬学会第127年会、2007年3月、富山)
 - 「腫瘍低酸素イメージングを目的としたタンパク質放射性薬剤の細胞内移行性向上を目指した膜透過ペプチドの検討」
(日本薬学会第127年会、2007年3月、富山)
 - 「HIF-1を利用したイメージング・ターゲティング」
(BiomarkerとDDS：ナノ技術の多元と諸相、2007年2月15日、神戸)
 - 「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」
(第9回がん治療増感研究シンポジウム、2007年2月10～11日、奈良)
 - 「HIF-1を利用した低酸素細胞のイメージング・ターゲティング」
(第9回日本組織工学会、2006年9月7日8日、京都)
 - 「すい臓がん同所移植モデルを用いた低酸素がん細胞のイメージングとターゲティング」
(第10回がん分子標的治療研究会総会、2006年6月15日～16日、東京)
 - 「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」
(第3回日本癌学会カンファレンス、2006年3月9日～11日、長野県蓼科)
 - 「ドップラーシフトを利用した生体PETの角度揺動測定」
(第43回アイソトープ・放射線研究発表会、2006年)
 - “Inter-crystal scatter identification for a depth-sensitive detector using support vector machine for small animal PET.”
Proc. of EuroMedIm2006, 1st European

- Conf. on Molecular Imaging Technology, Marseille, France, 2006.
- “Detector normalization and scatter correction for the jPET-D4: a 4-layer depth-of-interaction PET scanner.”
Proc. of EuroMedIm2006, 1st European Conf. on Molecular Imaging Technology, Marseille, France, 2006.
 - “Development of depth-of-interaction (DOI) detector for PET and prototype PET scanner.”
Proc. of the six Japan-France workshop on radiobiology and isotopic imaging, June 19-22, 2006, CEA.
 - “Limit of spatial resolution in FDG-PET due to annihilation photon non-collinearity.”
IFMBE Proc. Vol. 14, Proc. of World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006, Seoul.
 - “Recent advantages in PET and the new jPET-D4 system.”
IFMBE Proc. Vol. 14, Proc. of World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006, Seoul.
 - “3D image reconstruction with accurate system modeling for the jPET-D4.”
IFMBE Proc. Vol. 14, Proc. of World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006, Seoul.
 - “Performance evaluation of jPET-RD detector composed of 32 x 32 x 4 LYSO.”
IFMBE Proc. Vol. 14, Proc. of World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006, Seoul.
 - “Inter-crystal scatter identification for a depth-sensitive detector using multi-anode outputs.”
2006 IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag.
 - “A healthy volunteer FDG-PET study on the limit of the spatial resolution due to annihilation radiation non-collinearity.”
2006 IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag.
 - “Comparison of nonlinear position estimators for continuous scintillator detectors in PET.”
2006 IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag.
 - “The jPET-D4: Performance evaluation of four-layer DOI-PET scanner using the NEMA NU2-2001 standard.”
2006 IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag.
 - “Monte Carlo simulation study on detector arrangement for a small bore DOI-PET scanner: jPET-RD.”
2006 IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag.
 - “Spatial resolution measured by a prototype system of two 4-layer DOI detectors for jPET-RD.”
2006 IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag.
 - “Optimization of crystal arrangement on 8-Layer DOI PET detector.”
2006 IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag.
 - “First human brain images of the jPET-D4 using 3D OS-EM with a pre-computed system matrix.”
2006 IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag.
 - “Study of statistical and non-statistical components of energy resolution for position sensitive beta camera.”
2006 IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag.
 - “Evaluation of annihilation radiation non-collinearity in positron emission tomography by measuring the Doppler effect.”
Proc. of the 20th Workshop on Radiation Detectors and Their Uses, KEK Proceedings 2006-7, Nov., 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

- ・北村圭司, 吉澤昌由加, 稲玉直子, 村山秀雄 : マンモグラフィ装置
平成18年3月31日出願
出願番号 : 特願2006-097320
- ・清水成宜, 石橋浩之, 村山秀雄, 津田倫明, 稲玉直子, 山谷泰賀 : 放射線検出器
平成18年4月25日出願
出願番号 : 特願2006-120680
- ・澁谷憲悟, 津田倫明, 錦戸文彦, 稲玉直子, 吉田英治, 山谷泰賀, 村山秀雄 : 陽電子放射断層撮像装置及び放射線検出器
平成18年8月25日出願
出願番号 : 特願2006-229376

2. 特許登録

- ・Murayama, H., Inadama, N., Kitamura, K., Yamashita, T.: Radiation three-dimensional position detector, August 8, 2006.
Patent No.: US 7,087,905 B2 (米国特許庁)
- ・Sumiya, K., Ishibashi, H., Murayama, H., Inadama, N., Yamashita, T., Omura, T. : Depth of interaction with uniform pulse-height, August 15, 2006.
Patent No.: US 7,091,490 B2 (米国特許庁)

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1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作製し、マウス体内動態を調べた結果、本化合物は速やかな血中クリアランスを示した。この結果はRI標識デンドリマー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1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。昨年度は、多数のRIを結合できるビオチン化デンドリマーの作製とその評価を行い、高感度化への応用可能性を示した。そこで本年度は、本プローブのインビボへの展開を目的として、マウスを用いた体内動態評価を行った。また、この新規高感度プローブとの対比を行うため、既存の低酸素イメージングプローブ(^{18}F -FMISO)、核酸プローブに関する合成検討を実施した。

B. 研究方法

(1) ビオチン化デンドリマーのマウス体内動態：

昨年度に確立した方法に従い、第6世代PAMAMデンドリマー(G6、表面アミノ基256個)を用いてビオチン化および金属キレートDTPAの導入を行い、ビオチン化デンドリマーを得た。その後、 $^{111}\text{InCl}_3$ を用いてビオチン化デンドリマーの表面DTPAの ^{111}In 標識を行った。さらに標識に使われなかったDTPAを非放射性Gdを用いてキレートし、 ^{111}In 標識Gd-DTPA-ビオチン化デンドリ

マーを得た。作製した ^{111}In 標識Gd-DTPA-ビオチン化デンドリマーを、ddY雄性マウスに尾静脈より投与し、経時的（投与5,15分,1,3,6,24時間後）に臓器を摘出し、放射能を測定することで体内動態を調べた。

(2) 既存プローブに関する合成検討：

・ ^{18}F -FMISOの合成

^{18}F -FMISOの合成は、前駆体として(1-(2'-nitro-1'-imidazolyl)-2-O-tetra-hydro-pyran-3-O-toluensulfonyl-propandiol (NITTP)を用い、これに ^{18}F フッ化物イオンを反応させて行った。その後、逆相HPLCにより精製した。

・ ^{11}C -Thymidineの合成

Ethyl- α -formylpropionateと NH_3 とのシッフ塩基を經由し β -アミノメタクリルアミド誘導体を合成した。次いで、照射条件 $10\mu\text{A}$, 10分間で製した ^{11}C phosgeneとの環化反応により、2- ^{11}C Thymineを得た。さらに、酵素法により目的物である、2- ^{11}C Thymidineを合成した。その後、逆相HPLCにより精製した。

C. 研究結果

(1) ビオチン化デンドリマーのマウス体内動態：

肝臓、脾臓においてやや高い放射能集積を認めたものの、血中放射能は投与3時

間後には0.1% dose/g tissue以下となり、非常に速やかな血中クリアランスを示した。

(2) 既存プローブに関する合成検討：

・¹⁸F-FMISOの合成

¹⁸F-標識の前駆体として用いたNITTPと[¹⁸F]フッ化物イオンとの反応により、19%の収率で¹⁸F-FMISOを得た。

・¹¹C-Thymidineの合成

¹¹C-標識の前駆体として用いたβ-アミノメタクリルアミド誘導体は金属塩とすることにより活性化され、¹¹C-ホスゲンとの反応により、362±53MBq (n=3, EOS)の2-¹¹C-チミンを与えた。合成時間は照射終了後わずか16分間であった。

D. 考察

微小がんの超高感度イメージングにおいて、速やかな血中クリアランスは極めて重要な要件であり、本実験結果は、¹¹¹In標識ビオチン化 dendritic による高感度化の可能性を示すものである。また、dendritic のサイズ（世代数）を小さくすることで、肝臓、脾臓への非特異的集積の減少、及び、さらなる血中クリアランスの向上が期待される。

他方、既存プローブの合成検討では、¹⁸F-FMISO、¹¹C-Thymidineの標識合成に成功した。特に、¹¹C-Thymidineの合成では、新規前駆体と¹¹C-ホスゲンとの緩和な反応により、簡便かつ迅速な2-¹¹C-チミン合成を達成することができた。これらの化合物は各々低酸素、核酸代謝イメージングの標準となるボジトロン標識体である。今後、本研究プロジェクトで開発した高感度分子プローブの腫瘍集積性等を、これら既存プローブの場合と比較検討し、高感度分子プローブの最適化に繋げていく予定である。

E. 結論

高感度化を目指して作製したRI標識 dendritic は、マウスにおいて速やかな血中クリアランスを示し、高感度プローブとしての有用性が示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- “Photochemical synthesis of polycyclic pyrimidines through the acid catalyzed cycloaddition of 6-chloro-1-methyluracil to methyl substituted benzenes.” *Heterocycles*. 2006; 70: 501-508.
- “A new convenient method for the synthesis of [2-¹¹C]thymine utilizing [¹¹C]phosgene.” *Tetrahedron Letters*. 2006; 47: 5321-5323.

2. 学会発表

- 「低酸素特異的安定化タンパク質を母体とした新規低酸素核医学イメージング剤の開発に関する基礎的検討」
(第1回日本分子イメージング学会総会。2006年5月、京都)
- 「がんの悪性度診断を目的としたMRI用 dendritic 造影剤の開発に関する基礎的検討」
(第16回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2006)。2006年6月、東京)
- 「¹¹C-methionine(MET)の腫瘍・肉芽腫への集積性の違い：¹⁸F-FDG及び¹⁸F-FLTとの比較」
(第46回日本核医学会総会。2006年11月、鹿児島)
- 「低酸素特異的安定化タンパク質を母体とした低酸素核医学イメージング剤の開発に関する基礎的検討；担癌マウスにおける体内挙動の評価」
(日本薬学会第127年会。2007年3月、富山)
- 「腫瘍低酸素イメージングを目的としたタンパク質放射性薬剤の細胞内移行性向上を目指した膜透過ペプチドの検討」
(日本薬学会第127年会。2007年3月、富山)

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

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

研究要旨：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。昨年度は、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、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 PTD の構築ができたことを報告した。本年度は、HIF-1 活性を有する細胞内で特異的に安定化する ODD 融合たんぱく質の機能を亢進させ、腫瘍内の悪性化に関与する HIF-1 活性化低酸素がん細胞への特異性を高める ODD 配列について検証し、より特異性の高いイメージングプローブの構築をめざす。

A. 研究目的

腫瘍内の血管は、構造が未熟で、分布もきわめて無秩序であるために、血管からの栄養や酸素が十分にいきわたらない領域が生じる。そのような領域では腫瘍特異的な微小環境(microenvironment)が存在し、がん細胞の性質を大きく変え、治療不良や再発の原因になっているのみならず、腫瘍全体の悪性化にも深く関与していることが分子レベルでも明らかになってきた。

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。そのような環境では、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が、結果的にがんの血管新生亢進、アポト

ーシスの回避、転移・浸潤に関与する遺伝子の発現を誘導し、がんの悪性化を引き起こしている。従って、低酸素がん細胞を特異的に検出する分子プローブの開発は、大きな意義があるとして注目を集めている。低酸素がん細胞を検出する試薬として開発されたピモニダゾール（ニトロイミダゾール系化合物）は、10 mmHg 以下の細胞内タンパク質に結合するが、最近 Sobhanifar ら (Cancer Res 65:7259、2005)が、これまで低酸素がん細胞とよばれていた領域では、HIF-1 活性化細胞とピモニダゾールが結合する細胞（ピモニダゾール陽性細胞）は、必ずしも同一でなく、むしろ異なる領域が多く存在することを報告した(図 1)。このことは、ピモニダゾールによる低酸素がん細胞の検出は、必ずしも十分ではないことを意味している。

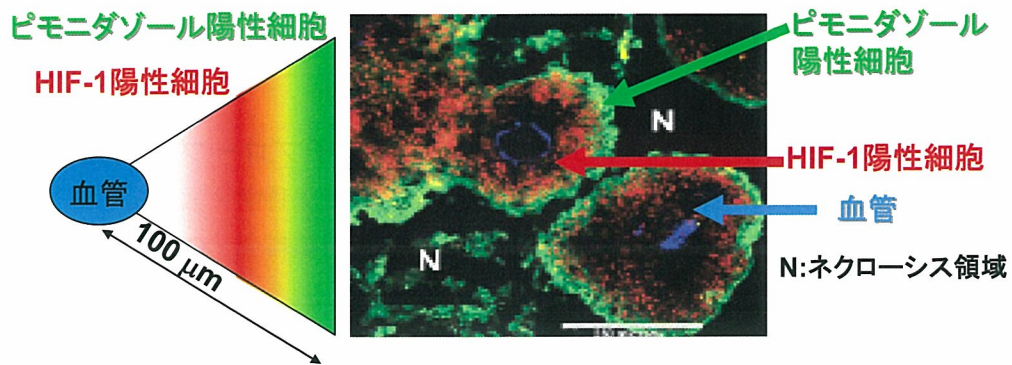


図1 HIF-1 陽性細胞とピモニダゾール陽性細胞の腫瘍内分布

腫瘍切片を HIF-1 抗体とピモニダゾール抗体を用いて免疫染色すると (右)、血管により近い領域に HIF-1 陽性細胞が分布し、ネクローシス領域に近い境界線付近にピモニダゾール陽性細胞が分布する。分布領域を模式的に描くと左のようになる。

我々は、HIF-1 陽性細胞に特異性を持たせるために、HIF-1 のアルファ因子 (HIF-1 α) の酸素依存的分解 (ODD) ドメインの一部をもった融合タンパク質をもつ融合タンパク質を構築し、腫瘍内の低酸素領域にあるがん細胞を特異的にターゲティングすることに成功している。当初 200

アミノ酸と報告されていた ODD ドメイン内の様々な長さ、位置の配列をレポーター遺伝子産物 β -ガラクトシダーゼに融合させ、 β -ガラクトシダーゼの発現の酸素依存性を調べることで、 β -ガラクトシダーゼの発現を酸素依存的に制御することができる ODD 配列の同定を行った (図2)。

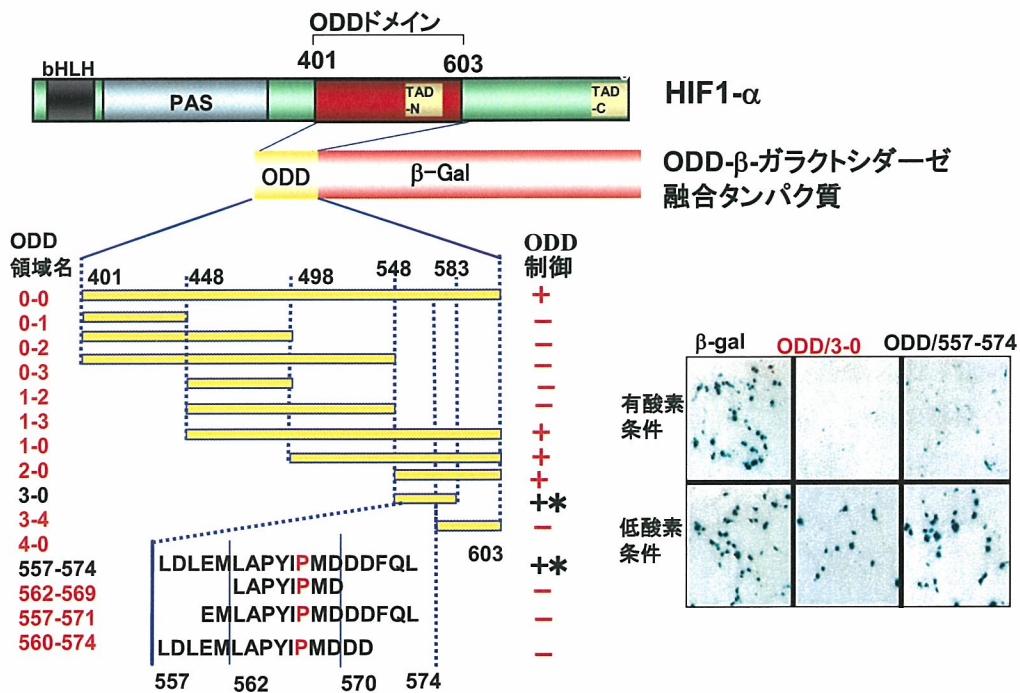


図2 融合タンパク質の酸素依存性を制御する ODD 領域の同定

図2の説明 HIF-1 α の ODD 領域の様々な部分(左図)を β -ガラクトシダーゼに融合させて、培養細胞内での β -ガラクトシダーゼの発現量を有酸素条件と低酸素条件で比較したところ、3-0、557-574 の領域を融合したときに、良好な酸素依存的制御が得られた(右図)。同様のアッセイを図に示した領域を融合させて調べた結果、557-574 の領域を含んだ領域が必須であり、3-0 の領域を用いる方が 557-574 のみよりも ODD 制御が良いことがわかった。

3-0 を融合した PTD-ODD- β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質を担がんマウスに腹腔内投与し、4 時間後に腫瘍を摘出して、腫瘍切片を β -ガラクトシダーゼ抗体を用いて免疫染色し、腫瘍内のプローブの局在を調べると同時に、ピモニダゾール陽性細胞の局在と比較した。PTD-ODD- β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質は生体内でも腫瘍の低酸素領域に局在することが確かめられた(図3)。しかし、ここでも、 β -ガラクトシダーゼの局在がピモニダゾール陽

性細胞よりも広い領域に分布していることから、PTD-ODD 融合タンパク質を用いることにより、ピモニダゾールが検出できない HIF-1 陽性細胞を検出できるプローブを構築することが可能であることを示している。これらの既存の研究結果から、ODD の機能をより上げることが、より特異性をもったプローブの構築に必要であると考えられるため、ODD の機能を亢進させるための研究を行ったので報告する。

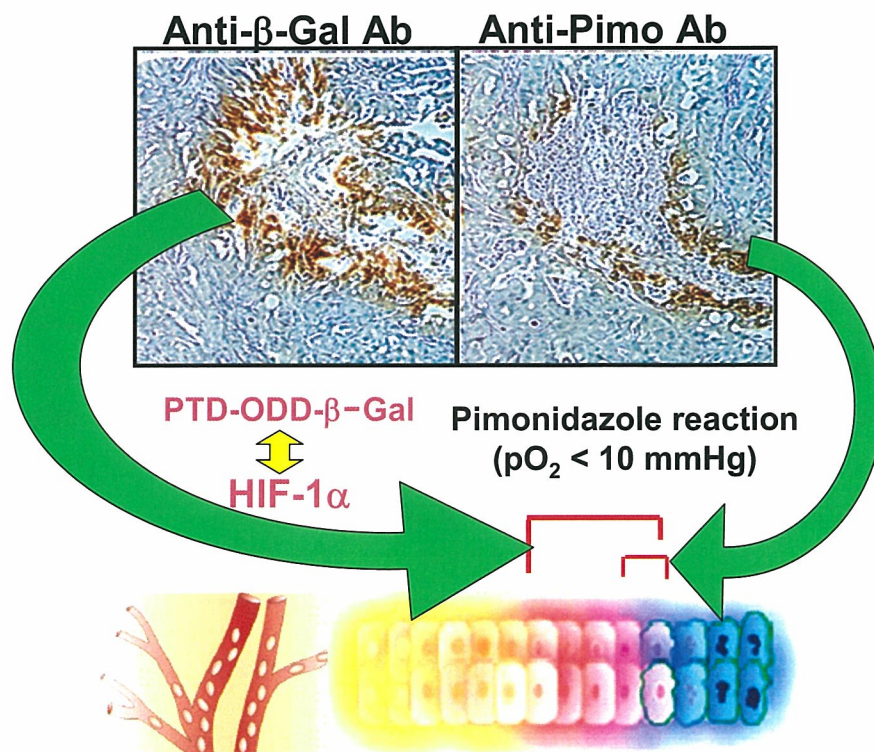


図3 腫瘍内での PTD-ODD 融合タンパク質の局在

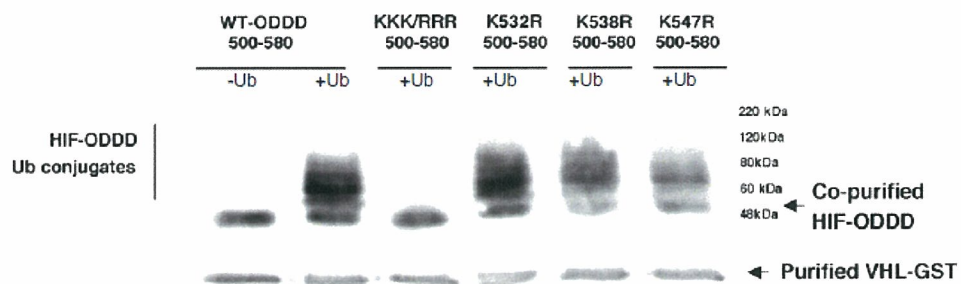
PTD-ODD- β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質を担がんマウスの腹腔内に投与し 4 時間後に腫瘍を摘出して、その切片を抗- β -ガラクトシダーゼ抗体と抗ピモニダゾール抗体で免疫染色したところ、ほぼ同一のところが染まったが(上図)、詳細にみると融合タンパク質の局在がやや血管よりで範囲も広いことがわかった。

B. 研究方法

ODD の設計と酸素依存的タンパク質分解制御機能の亢進

PTD-ODD 融合タンパク質の酸素依存的分解能の効率を上げるためには、上記のように決定した ODD 配列を改変すること

で、分解機構への反応性を向上させる必要がある。最近 Paltoglou らが、HIF-1 α のユビキチン化されるリジン残基の位置を決定した (図 4、Oncogene. 2007、26(4):604-9.)。



HIF-1 α ODD (517-556)

...SEYCFYVDDDMVNEF**K**L**E**L**V**E**K**L**F**A**E**D**T**E**A****K**N**P**F**S**T**Q**D**T**D.....

532

538

547

図 4 ODD 制御に重要なリジン残基の位置

HIF-1 α の ODD 制御はユビキチン-プロテアソーム系により行われており、ユビキチン化が行われるリジン残基として上記 3 個が重要であることが報告された。

我々の構築した PTD-ODD には、532 番目に相当する位置にリジン残基が存在することがわかっている。それは、ユビキチン化のサイトとしてデザインされたリジン残基であったが、他の 2 つのリジン残基の

位置には他のアミノ酸が位置している。そこで、ODD 制御の効率を上げることを目的として、図 4 の 547 番目のリジン残基の位置にリジンが配置されるように PTD-ODD に GGK を挿入した。

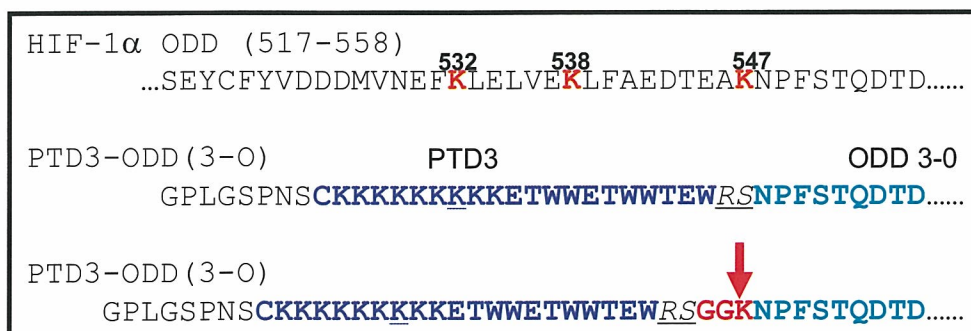


図 5 PTD-ODD 配列の改良