

FIG. 2. Analysis of TLIMP expression: tissue distribution of TLIMP (A) and TBP-2 (B). RNA blots containing poly(A)⁺ RNA from multiple human tissues or cancer cell lines were hybridized with full-length TLIMP or TBP-2 cDNA as a probe. Human β -actin was used as a control to determine the relative amount of RNA from each of the tissues or cells.

sion of TBP-2 has been shown to suppress the reducing activity of TRX (14), and the effect of TLIMP on this activity was examined in an insulin-reducing assay. TRX-reducing activity was not significantly changed in cellular extracts transiently expressing TLIMP, whereas it was significantly suppressed in cellular extracts transfected with TBP-2 (Fig. 3C). These results indicate that TRX interacts with TBP-2 but not with TLIMP.

Intracellular localization of TLIMP

To determine the intracellular distribution of TLIMP, Flag-tagged TLIMP (TLIMP-Flag) was expressed in HeLa S3, 293, COS7, and CHO cells. The cellular distribution of TLIMP-Flag is shown in Fig. 4A. Immunofluorescent analysis using anti-Flag antibody showed that TLIMP is present in the plasma membrane and small vesicular structures scattered throughout the cytoplasm. As reported previously, TBP-2 was detected mainly in the nucleus and partly in the cytoplasm in COS7 cells (19). To determine whether TLIMP is expressed on the inner or outer side of the plasma membrane, TLIMP-Flag was expressed in HeLa S3 cells and stained by Nonidet P-40 without permeabilization. TLIMP-Flag was not stained in the nonpermeabilized cells but significantly

stained in the permeabilized cells, indicating that TLIMP is expressed on the inner side of the plasma membrane (Fig. 4B). The vesicular pattern of TLIMP protein expression in cytoplasm is similar to that of endosomes or lysosomes. To analyze whether TLIMP is present in the cellular compartments, we examined the distribution of EGFP-tagged TLIMP with Alexa633-conjugated transferrin and LysoTracker Blue, which are markers for endosomes and lysosomes, respectively. As shown in Fig. 4C, TLIMP-EGFP showed a similar distribution to TLIMP-Flag, and the fluorescence merged with that of transferrin or LysoTracker in intracellular vesicular structures. Merging of all three fluorescent signals was observed in several areas. Whereas internalized transferrin is predominantly recycled to the plasma membrane through recycling of endosomes, low-density lipoprotein (LDL) is internalized and transported into lysosomes. To validate whether TLIMP is present in the lysosomal pathway, the cellular localizations of TLIMP and LDL were examined. As shown in Fig. 4D, the fluorescence of internalized LDL partly merged with TLIMP. These results suggest that TLIMP expression is associated with the plasma membrane, endosomes, and lysosomes during endocytosis.

FIG. 1. The TBP-2 protein family. A, ClustalW alignment of the amino acid sequences of the human TBP-2 family. The numbers on the left refer to the amino acids of each protein. B, Intron-exon structures of the TBP-2 gene family. The coding exons of the proteins are depicted as boxes. Upper numbers indicate the order of each exon. The signatures on the right indicate the cyto band of each protein. The scale below defines the proportional length of the genomic sequences. C, Alternatively spliced form of TLIMP. The amplified cDNA of TLIMP was subcloned into pCMV-Tag2 (Stratagene, La Jolla, CA) and the length of the insert was checked by restriction enzyme (*Hind*III) digestion. A DNA marker is shown in lane M. D, Summary of the two spliced isoforms. The shorter isoform, TLIMPs, lacks 148 bp corresponding to exon 3 (underlined), with a translational stop codon after a short 24-amino-acid C-terminal tail.

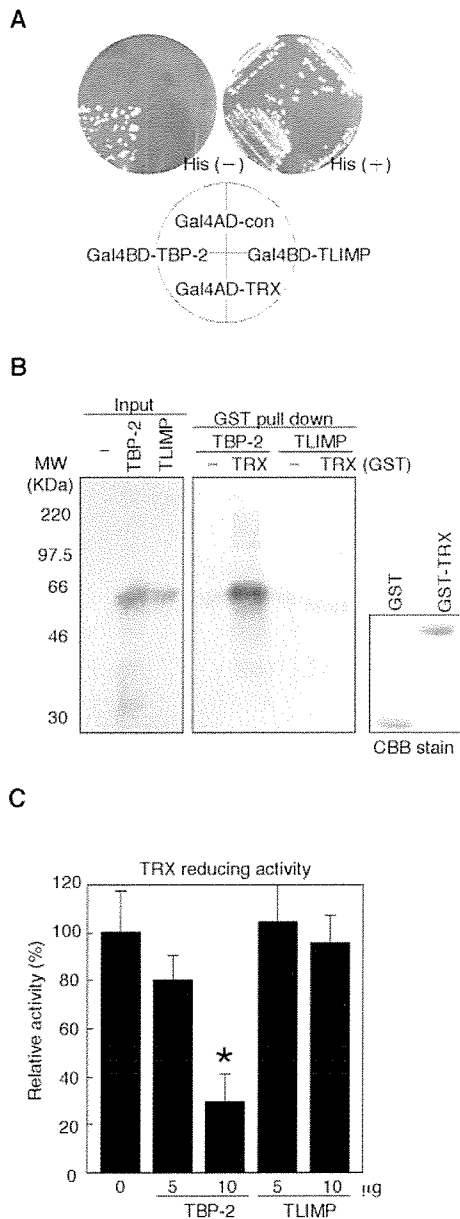


FIG. 3. TLIMP did not associate with TRX. **A**, Yeast two-hybrid analysis of the interaction of TLIMP or TBP-2 with TRX. pGBKT7-TLIMP or pGBKT7-TBP-2 was introduced into the yeast strain AH109 with either pACT2 or pACT2-TRX. The growth of the yeast transformants on a selective synthetic medium with or without histidine is shown. **B**, GST pull-down analysis of the interaction of TLIMP or TBP-2 with TRX. 35 S-labeled TLIMP or TBP-2 precipitated with GST-TRX or GST immobilized on GSH beads. The right panel shows that equal amounts of GST-fusion proteins were used in the pull-down assay, as determined by Coomassie Brilliant Blue staining. **C**, The effect of TRX activity on TLIMP expression. The TRX activity of the extract of COS7 cells transiently transfected with the indicated amount of expression vector for GFP-TBP-2 or GFP-TLIMP fusion proteins was determined in an insulin reducing assay. Expression vectors (10 μ g/plate) were introduced into cells cultured in 10-cm dishes. The total DNA concentration was kept constant using pEGFP-C1. Activities of samples are shown relative to the control value (lane 1), which is taken as 100%. The results are shown as the mean \pm SD of three samples.

Regulation of TLIMP expression

Because TBP-2 was first identified as a gene, the expression of which was induced by VD3 in HL-60 cells, TLIMP expression in VD3-treated HL-60 cells was examined. Expression of TLIMP was also induced when HL-60 cells were cultured in the presence of VD3, in a time- and dose-dependent manner (Fig. 5A). The effects of retinoic acid (RA) and PMA on the expression of TBP-2 and TLIMP were then tested. RA and PMA are known to induce differentiation of HL-60 cells into granulocytes and macrophage-like cells, respectively. As shown in Fig. 5B, specific morphological changes in HL-60 cells were observed on treatment with RA, VD3, and PMA. RA did not induce TBP-2 or TLIMP expression, whereas PMA significantly induced the expression of TLIMP but not TBP-2. The extent of induction of TLIMP expression by PMA was less than that by VD3. TRX expression decreased in cells treated with VD3, RA, and PMA.

PPAR γ has been implicated in the regulation of cell growth and differentiation of cells or tissues, such as adipose tissues, breast, and colon (28). Similarly to VD3, PPAR ligands induce monocytic differentiation and concomitantly inhibit cell proliferation in HL-60 cells (29, 30). These findings led us to hypothesize that members of the TBP-2 family have a role in the biological responses elicited by not only VD3 but also PPAR ligands. Therefore, the effects of PPAR ligands on the expression of TBP-2 and TLIMP were examined in HL-60 cells. Troglitazone, a selective PPAR γ agonist, significantly induced both TBP-2 and TLIMP expression in a time- and dose-dependent manner (Fig. 5C). These genes were also up-regulated by pioglitazone, another PPAR γ agonist. Clofibrate, a selective PPAR α agonist, markedly induced TBP-2 expression but had no effect on TLIMP expression. These results suggest that TBP-2 and TLIMP are both up-regulated by PPAR γ ligands but differentially regulated by PPAR α ligands. TRX expression was decreased with all the PPAR agonists tested, showing a reciprocal pattern to TBP-2 expression (Fig. 5D). To further study the effect of PPAR ligands on the expression of these genes, we examined the effects of L165,041, a PPAR β/δ ligand, and prostaglandin J2, an endogenous ligand of PPAR γ , on the levels of TLIMP and TBP-2 expression (31). As shown in Fig. 5E, both TLIMP and TBP-2 are up-regulated by prostaglandin J2 but not L165,041. Collectively, the above results indicate that both TLIMP and TBP-2 are downstream regulatory proteins of VD3 and PPAR γ .

Because PPAR γ plays an important role in differentiation in adipocytes as well as monocytes, the expression levels of TLIMP and TBP-2 were examined during differentiation of adipocytes *in vitro*. As shown in Fig. 6, both TLIMP and TBP-2 are strongly expressed in adipocytes, compared with preadipocytes, indicating that these genes are up-regulated in association with differentiation of adipocytes. Expression of TLIMP and TBP-2 was also detected in brown and white adipose tissues *in vivo* (Fig. 6B), and collectively these results suggest that both TLIMP and TBP-2 play a role in the differentiation and function of adipocytes.

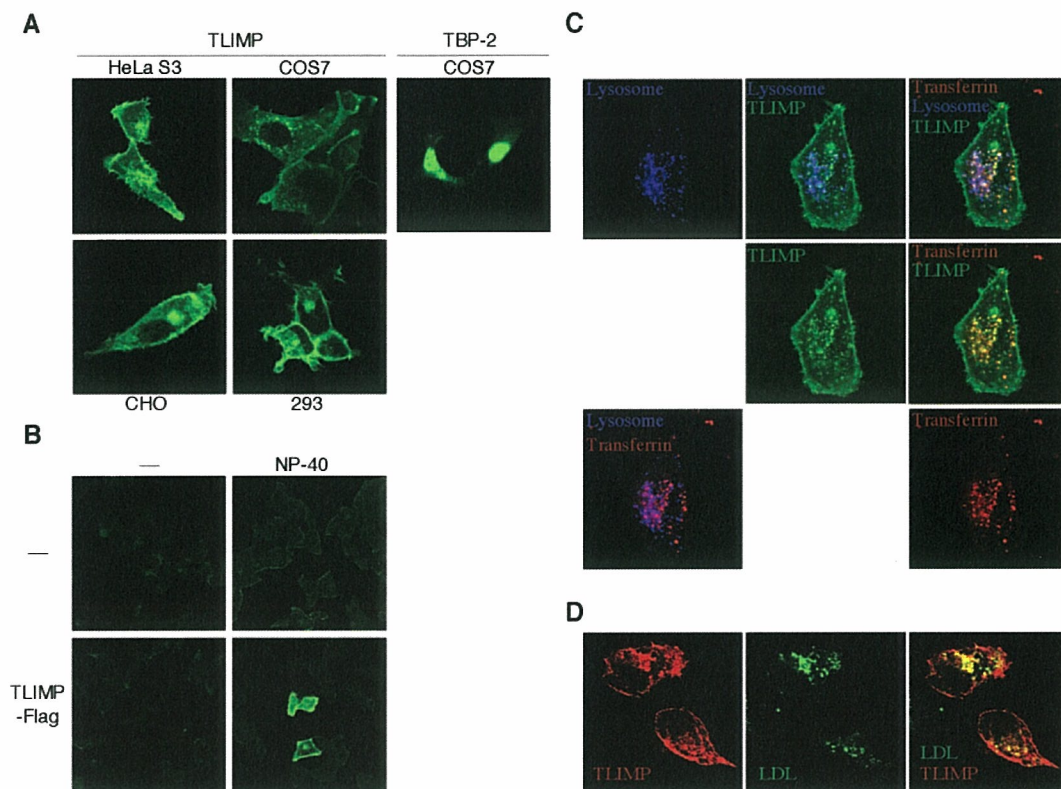


FIG. 4. Cellular localization of TLIMP. A, Expression of TLIMP. Flag epitope-tagged TLIMP was transiently expressed in HeLa S3, 293, COS7, and CHO cells. C-terminal Myc epitope-tagged TBP-2 was transiently expressed in COS7 cells. The cells were permeabilized by 1% Nonidet P-40 and then immunostained using anti-Flag or anti-Myc antibody, and FITC-conjugated antimouse IgG, as described in *Materials and Methods*. B, Detection of TLIMP protein in permeabilized cells. HeLa S3 cells transfected with TLIMP-Flag were immunostained after permeabilization with 1% Nonidet P-40 or after no permeabilization. A and B, The fixed and immunostained cells were analyzed using confocal microscopy. C, Colocalization of TLIMP, transferrin, and LysoTracker. HeLa S3 cells expressing C-terminal EGFP-tagged TLIMP were incubated with 50 nM LysoTracker Blue for 1 h and then 20 μ g/ml Alexa633-labeled transferrin for 15 min. All combinations of merged colors are indicated. D, Colocalization of TLIMP and LDL. HeLa S3 cells expressing C-terminal Flag-tagged TLIMP were incubated with 50 μ g/ml BODIPY FL-labeled LDL for 1 h and then immunostained using anti-Flag antibody and Alexa 568-conjugated antimouse IgG, as described in *Materials and Methods*. Merged colors are indicated.

Suppression of cell growth by TLIMP

VD3 and PPAR ligands are known to have strong cell growth-inhibitory activity in HL-60 cells, and previous reports have shown that TBP-2 also inhibits cell proliferation (18, 19). To investigate whether TLIMP also has this inhibitory activity, the effect of overexpression of TLIMP on cell proliferation was examined. In TLIMP transfectants, TLIMP was mainly detected in the Triton X-100-insoluble fraction (Fig. 7A, upper panel), indicating that the majority of TLIMP was localized in the detergent-insoluble membrane fraction. CHO cells transiently overexpressing TLIMP showed retardation of cell growth (Fig. 7A). It has been reported that TBP-2 suppresses anchorage-dependent and anchorage-independent cell growth (32), and to test the role of TLIMP in anchorage-independent cell growth, the growth of TLIMP-overproducing HeLa S3 cells was examined in culture in a semisolid medium. The number and size of foci was reduced in TLIMP- and TBP-2-transfected cells (Fig. 7B). These results demonstrate that both TLIMP and TBP-2 suppress anchorage-dependent and -independent cell growth.

TLIMP suppresses ligand-induced PPAR γ activation

We next hypothesized that up-regulation of TLIMP by PPAR γ ligands plays a role in PPAR γ signaling through feedback regulation. To test this hypothesis, we analyzed the effect of overexpression of TLIMP on PPAR γ transactivation in NIH3T3 cells, with a reporter assay using a GAL4-fused PPAR γ 2 expression vector and a luciferase reporter plasmid containing GAL4 binding sites in the promoter region. As shown in Fig. 8, troglitazone-induced reporter activation was suppressed by overexpression of TLIMP, suggesting that TLIMP negatively regulates ligand-induced PPAR γ activation.

PPARs induce the expression of responsive target genes such as FABP4 and LPL through direct binding to the peroxisome proliferator-responsive element in their promoter regions (33, 34). To investigate the effect of TLIMP on PPAR γ -induced endogenous gene expression, the levels of FABP4, LPL, TLIMP, and TBP-2 were examined in cells overexpressing PPAR γ and TLIMP. As shown in Fig. 8B, expression of the target genes in cells expressing PPAR γ increased with treatment with troglitazone. The induction of expression was

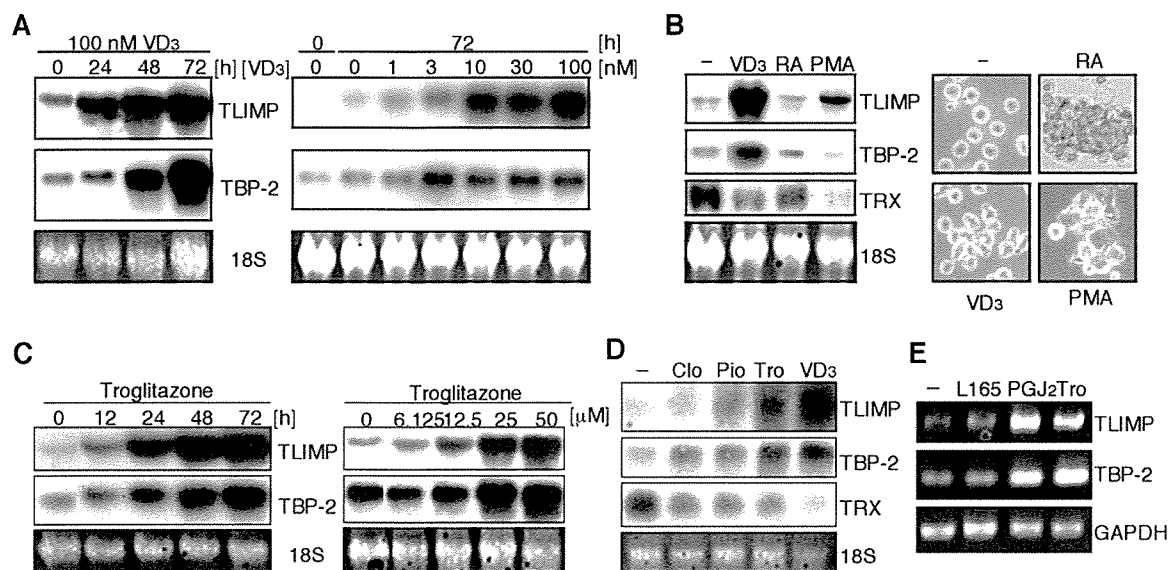


FIG. 5. The effect of inducers of differentiation on TLIMP expression. A, Expression of TLIMP and TBP-2 in VD3-stimulated HL-60 cells. At the indicated time points, total RNA was isolated from cells treated with 100 nM (left) or various concentrations (right) of VD3. B, Expression of TLIMP, TBP-2, and TRX in HL-60 cells treated with VD3, RA, PMA. Cells were cultured with 100 nM VD3, 10 μ M RA, and 100 ng/ml of PMA for 76 h. Morphological changes of the HL-60 cells are shown in the photographs on the right. C, Expression of TLIMP and TBP-2 in troglitazone-stimulated HL-60 cells. At the indicated time points, total RNA was isolated from cells treated with 50 μ M (upper) or various concentrations (lower) of troglitazone for 72 h. D, Expression of TLIMP, TBP-2, and TRX in HL-60 cells treated with troglitazone, pioglitazone, and clofibrate. Cells were cultured with 100 μ M clofibrate (Clo), 50 μ M pioglitazone (Pio), 50 μ M troglitazone (Tro), and 100 nM VD3 for 72 h. The isolated total RNA (20 μ g/lane) was fractionated and transferred to a nylon membrane, as described in *Materials and Methods*. The same membrane was hybridized with a [32 P]-labeled probe using cDNA encoding TLIMP, TBP-2, or TRX. E, Expression of TLIMP and TBP-2 in HL-60 cells treated with L165,041 and prostaglandin J2. Cells were cultured with 10 μ M L165,041 (L165), 10 μ M prostaglandin J2 (PGJ2), or 50 μ M troglitazone (Tro) for 72 h. The expression levels of TLIMP and TBP-2 were determined by RT-PCR using cDNA prepared using RNA from the cells.

suppressed by overexpression of TLIMP, suggesting that TLIMP negatively regulates PPAR γ -dependent gene activation.

Discussion

In the present study, we found that there are four familial TBP-2 genes, TBP-2/VDUP1, TLIMP, AF193051, and DRH1 in humans. Members of the human TBP-2 protein family share some common features but also have different features. TBP-2 and AF193051 were predominantly concentrated in the nucleus (20) (Tan, A., S. Oka, M. Mochizuki, H. Masutani, and J. Yodoi, unpublished observation), whereas TLIMP was

found in the plasma membrane, lysosomes, and endosomes. The cellular distribution of DRH1 is similar to that of TLIMP; EGFP-tagged DRH1 has been found to be predominantly distributed in small vesicular structures at the periphery of the nucleus in COS7 cells (26), suggesting the localization in endosomes and/or lysosomes. TBP-2 familial proteins may coordinately regulate common cellular functions in different subcellular compartments. TBP-2 proteins have remote homology to the arrestin family of proteins, which play an important role in the internalization of G protein-coupled receptors and transforming growth factor- β , thereby quenching their signal transduction (35, 36). Based on the structural homology, TLIMP may have a similar biological role such as protein trafficking during endocytosis as well as scaffold or adaptor function similar to arrestin (37). Indeed, overexpression of TLIMP suppressed the uptake of transferrin (data not shown). It could be also postulated that TLIMP itself is associated with endocytosis of VD3 or endogenous ligands of PPAR γ .

Expression levels of TLIMP and TBP-2 were significantly up-regulated by VD3 and PPAR γ agonists, rather than by RA and PMA, in HL-60 cells (Fig. 5). These results indicate that the induction of TLIMP and TBP-2 expression in HL-60 cells is specifically associated with differentiation of monocytes and not with granulocytes. In addition, TLIMP and TBP-2 were up-regulated in association with differentiation of adipocytes (Fig. 6), indicating that these genes play an important role in PPAR γ -mediated adipogenesis or lipid metabolism.

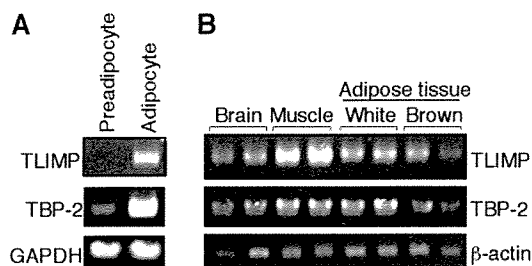


FIG. 6. Expression of TLIMP and TBP-2 in adipose cells and tissues. A, Expression of TLIMP and TBP-2 in association with differentiation of adipocytes. The expression levels of TLIMP and TBP-2 were determined by RT-PCR using cDNA prepared using RNA from human adipocytes and preadipocytes. B, Expression of TLIMP and TBP-2 in brown and white adipose tissues *in vivo*. RT-PCR was performed using cDNA prepared using RNA from the indicated tissues in C57BL/6 mice.

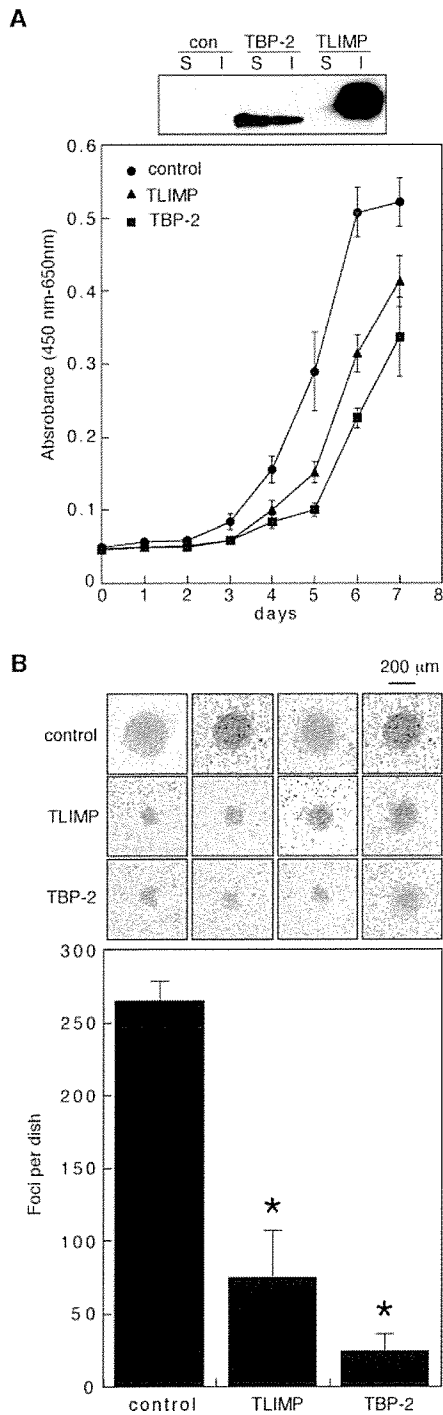


FIG. 7. Cell growth suppressive effect of TLIMP. A, Suppression of cell proliferation by TBP-2 and TLIMP. The cell proliferation rate was analyzed in CHO cells transiently transfected with pEF-BSR, pEF-BSR-TBP-2-Flag, or pEF-BSR-TLIMP-Flag vectors. B, Suppression of anchorage-independent cell proliferation by TBP-2 and TLIMP. Blastidicin-resistant expression vectors, pEF-BSR, pEF-BSR-TBP-2-Flag, and pEF-BSR-TLIMP-Flag, were used to transiently transfect HeLa S3 cells. A colony formation assay was performed as described in *Materials and Methods*. The results are shown as the mean \pm SD of triplicate cultures. Foci are shown in the upper photographs.

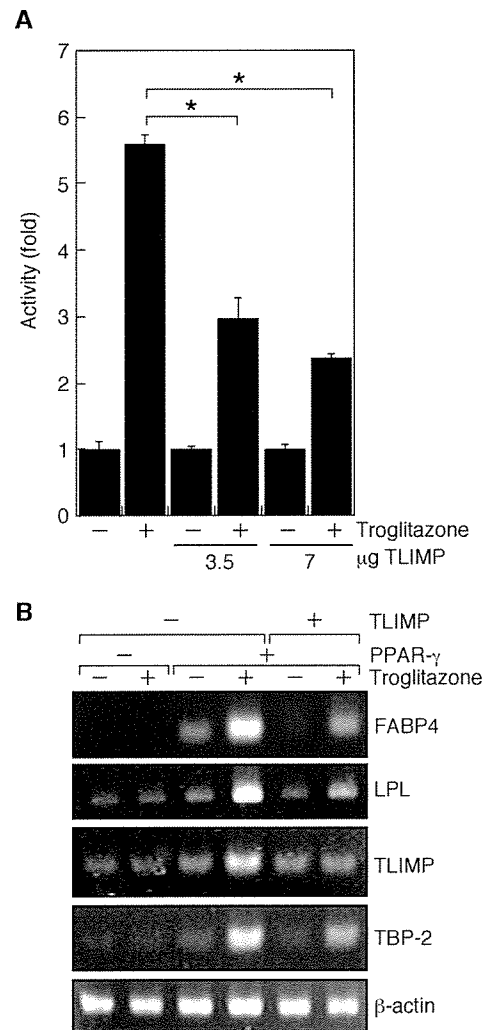


FIG. 8. TLIMP suppresses troglitazone-induced PPAR γ activation. A, PPAR γ -dependent transactivation is suppressed by overexpression of TLIMP. NIH3T3 cells were cotransfected with 1 μ g pGAL4-luciferase reporter plasmid (pGAL4-luc) and 2 μ g of plasmid expressing PPAR γ 2 fused to the GAL4 DNA binding domain (pM-PPAR γ 2) with or without the indicated amount of Flag-tagged TLIMP expression plasmid (pEF-BSR-TLIMP-Flag). Twenty-four hours after transfection, cells were treated with 10 μ M troglitazone and cultured for 18 h. Luciferase activities were then measured. B, TLIMP inhibits PPAR γ -dependent gene expression. NIH3T3 cells were transfected with 2 μ g HA-tagged expression plasmid (pcDNA3-HA-PPAR γ 2) with or without 2 μ g of Flag-tagged TLIMP expression plasmid (pEF-BSR-TLIMP-Flag). Twenty-four hours after transfection, the cells were treated with 10 μ M troglitazone and cultured for 18 h. The expression levels of the indicated genes were determined by RT-PCR.

The promoter regions of the TLIMP and TBP-2 genes do not have a classical VDR or PPAR response element. The mechanism of the regulations should be further investigated.

We have several pieces of evidence that the expressions of TBP-2 familial genes are differentially regulated. VD3 and PPAR γ agonists failed to induce the expression of both AF193051 and DRH1 in HL-60 cells (data not shown). In addition, suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase

inhibitor, induced expression of TBP-2 expression but not TLIMP in HeLa S3 cells (supplemental Fig. 2, published as supplemental data on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://endo.endojournals.org>), although a nuclear factor-Y-binding site is conserved in the TLIMP and TBP-2 promoter regions. It is reported that suberoylanilide hydroxamic acid induces the expression of TBP-2 through activation of nuclear factor-Y (17).

TLIMP and TBP-2 suppressed both anchorage-dependent and -independent cell proliferation (Fig. 7). These activities may contribute to the growth-suppressive effects of VD3 and PPAR agonists, which also inhibit anchorage-dependent and -independent cell growth (38, 39).

The mechanism of TLIMP-induced growth inhibition is currently unclear. Inhibition of the TRX-reducing activity or an effect on the nuclear compartment has been suggested as a mechanism of TBP-2-induced cell growth inhibition (20, 40). However, it is unlikely that TLIMP suppresses cell growth through inhibition of TRX-reducing activity because it failed to bind to TRX or inhibit its reducing activity (Fig. 3). There are many important cell growth-regulating molecules including receptor tyrosine kinases, nonreceptor tyrosine kinases, and (small) G-proteins in the plasma membrane, whose endocytosis leads to a quenching of the signal transduction elicited by the molecules (41). VD3 modulates signal transduction proximal to the plasma membrane for phospholipase C, protein kinase C, and calcium channels (1). In addition, it is reported that 15-deoxy- Δ -12, 14-prostaglandin J₂, a natural ligand for PPAR γ , prevents cell proliferation through inhibition of ErbBs, a receptor tyrosine kinase family (42). It is possible that TLIMP suppresses cell growth through the modulation of signal transduction in the plasma membrane and/or endosomes. On the other hand, TLIMP suppresses ligand-induced PPAR γ activation (Fig. 8), suggesting the negative feedback loop between TLIMP and PPAR γ . In addition to ligand binding, PPAR γ activity is modulated by MAPK through direct phosphorylation (43). TLIMP may modulate the activity of PPAR γ through the regulation of up-stream signaling of these kinases in proximal plasma membrane. The mechanism of the effect of TLIMP in cell proliferation and PPAR γ activation requires further study.

In conclusion, we have shown that TLIMP, a VD3 or PPAR γ target protein, regulates cell proliferation and PPAR γ activation. The cellular localization associated with endocytotic membrane trafficking suggests that TLIMP is a molecule connecting the PPAR γ signal and endosomal functions, providing a novel mechanism of regulation by VD3 or PPAR γ signals.

Acknowledgments

We thank Drs. Kimishige Ishizaka, Toshiro Tsukamoto, Yasuyuki Ishii, and Takayuki Ohshima and Hajime Nakamura and Yoshihiro Ohmiya for helpful discussions; Ms. Yoko Kanekiyo for secretarial help; Drs. Masaki Tanito and Yong-Chul Kim for technical help; and Drs. Kenji Kasuno and Kaimul Md. Ahsan for generously providing some of the experimental materials.

Received June 6, 2005. Accepted October 25, 2005.

Address all correspondence and requests for reprints to: Hiroshi Masutani, Department of Biological Responses, Institute for Virus Re-

search, Kyoto University, 53 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo, Kyoto 606-8507, Japan. E-mail: hmasutan@virus.kyoto-u.ac.jp.

This work was supported by a grant-in-aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan and the Research and Development Program for New Bio-Industry Initiatives. S.O. was supported by the New Energy and Industrial Technology Development Organization Fellowship Program. W.L. is a postdoctoral fellowship and recipient of a grant-in-aid from the Japan Society for the promotion of Science. D.W. has been supported by the 21st Century Centers of Excellence Program of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

References

1. Norman AW, Okamura WH, Bishop JE, Henry HL 2002 Update on biological actions of 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ (rapid effects) and 24R,25(OH)₂-vitamin D₃. *Mol Cell Endocrinol* 197:1–13
2. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM 1999 PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4:585–595
3. Dreyer C, Keller H, Mahfoudi A, Laudet V, Krey G, Wahli W 1993 Positive regulation of the peroxisomal β -oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Biol Cell* 77:67–76
4. Peters JM, Hennuyer N, Staels B, Fruchart JC, Fievet C, Gonzalez FJ, Auwerx J 1997 Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor α -deficient mice. *J Biol Chem* 272:27307–27312
5. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Kameda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Nagai R, Tobe K, Kitamura S, Kadowaki T 1999 PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 4:597–609
6. Bronner F 2001 Extracellular and intracellular regulation of calcium homeostasis. *Scientific World Journal* 1:919–925
7. Vazquez M, Silvestre JS, Prous JR 2002 Experimental approaches to study PPAR γ agonists as antidiabetic drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 24:515–523
8. Tanaka H, Teitelbaum SL 1990 Vitamin D regulates transferrin receptor expression by bone marrow macrophage precursors. *J Cell Physiol* 145:303–309
9. Selvaraj P, Chandra G, Jawahar MS, Rani MV, Rajeshwari DN, Narayanan PR 2004 Regulatory role of vitamin D receptor gene variants of *BsmI*, *Apal*, *TaqI*, and *FokI* polymorphisms on macrophage phagocytosis and lymphoproliferative response to mycobacterium tuberculosis antigen in pulmonary tuberculosis. *J Clin Immunol* 24:523–532
10. Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, Rando F, Andersson LP, Altshuler D, Milstone DS, Mortensen RM, Spiegelman BM, Freeman MW 2001 The role of PPAR γ in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med* 7:41–47
11. Fitzgerald ML, Moore KJ, Freeman MW 2002 Nuclear hormone receptors and cholesterol trafficking: the orphans find a new home. *J Mol Med* 80:271–281
12. Holmgren A 1985 Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 54:237–271
13. Masutani H, Yodoi J 2002 Thioredoxin. Overview. *Methods Enzymol* 347: 279–286
14. Nishiyama A, Matsui M, Iwata S, Hirota K, Masutani H, Nakamura H, Takagi Y, Sono H, Gon Y, Yodoi J 1999 Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J Biol Chem* 274:21645–21650
15. Chen KS, DeLuca HF 1994 Isolation and characterization of a novel cDNA from HL-60 cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Biochim Biophys Acta* 1219:26–32
16. Ikarashi M, Takahashi Y, Ishii Y, Nagata T, Asai S, Ishikawa K 2002 Vitamin D₃ up-regulated protein 1 (VDUP1) expression in gastrointestinal cancer and its relation to stage of disease. *Anticancer Res* 22:4045–4048
17. Butler LM, Zhou X, Xu WS, Scher HI, Rifkin RA, Marks PA, Richon VM 2002 The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11700–11705
18. Han SH, Jeon JH, Ju HR, Jung U, Kim KY, Yoo HS, Lee YH, Song KS, Hwang HM, Na YS, Yang Y, Lee KN, Choi I 2003 VDUP1 upregulated by TGF- β 1 and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits tumor cell growth by blocking cell-cycle progression. *Oncogene* 22:4035–4046
19. Nishinaka Y, Nishiyama A, Masutani H, Oka S, Ahsan KM, Nakayama Y, Ishii Y, Nakamura H, Maeda M, Yodoi J 2004 Loss of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D₃ up-regulated protein 1 in human T-cell leukemia virus type I-dependent T-cell transformation: implications for adult T-cell leukemia leukemogenesis. *Cancer Res* 64:1287–1292
20. Nishinaka Y, Masutani H, Oka S, Matsuo Y, Yamaguchi Y, Nishio K, Ishii Y, Yodoi J 2004 Importin α 1 (Rch1) mediates nuclear translocation of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3)-up-regulated protein 1. *J Biol Chem* 279:37559–37565

21. Bodnar JS, Chatterjee A, Castellani LW, Ross DA, Ohmen J, Cavalcoli J, Wu C, Dains KM, Catanese J, Chu M, Sheth SS, Charugundla K, Demant P, West DB, de Jong P, Lusis AJ 2002 Positional cloning of the combined hyperlipidemia gene *Hyp1p1*. *Nat Genet* 30:110–116
22. Hui TY, Sheth SS, Diffley JM, Potter DW, Lusis AJ, Attie AD, Davis RA 2004 Mice lacking thioredoxin-interacting protein provide evidence linking cellular redox state to appropriate response to nutritional signals. *J Biol Chem* 279:24387–24393
23. Oka S, Liu W, Masutani H, Hirata H, Shinkai Y, Yamada SI, Yoshida T, Nakamura H, Yodoi J, Impaired fatty acid utilization in Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2)-deficient mice: a unique animal model of Reye syndrome. *FASEB J*, published online Oct 27, 2005
24. Ohshima T, Koga H, Shimotohno K 2004 Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor γ is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 279:29551–29557
25. Kim YC, Yamaguchi Y, Kondo N, Masutani H, Yodoi J 2003 Thioredoxin-dependent redox regulation of the antioxidant responsive element (ARE) in electrophile response. *Oncogene* 22:1860–1865
26. Yamamoto Y, Sakamoto M, Fujii G, Kanetaka K, Asaka M, Hirohashi S 2001 Cloning and characterization of a novel gene, DRH1, down-regulated in advanced human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 7:297–303
27. Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF, Zeeberg B, Buetow KH, Schaefer CF, Bhat NK, Hopkins RF, Jordan H, Moore T, Max SI, Wang J, Hsieh F, Diatchenko L, Marusina K, Farmer AA, Rubin GM, Hong L, *et al.* 2002 Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16899–16903
28. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM 1999 PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue *in vivo* and *in vitro*. *Mol Cell* 4:611–617
29. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM 1998 PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93:241–252
30. Pizzimenti S, Laurora S, Briatore F, Ferretti C, Dianzani MU, Barrera G 2002 Synergistic effect of 4-hydroxynonenal and PPAR ligands in controlling human leukemic cell growth and differentiation. *Free Radic Biol Med* 32:233–245
31. Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD 2005 An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res* 51:85–94
32. Joguchi A, Otsuka I, Minagawa S, Suzuki T, Fujii M, Ayusawa D 2002 Overexpression of VDUP1 mRNA sensitizes HeLa cells to paraquat. *Biochem Biophys Res Commun* 293:293–297
33. Lee CH, Olson P, Evans RM 2003 Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology* 144:2201–2207
34. Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ 2002 Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* 43:1997–2006
35. Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ 2002 Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and β -arrestin proteins. *Prog Neurobiol* 66:61–79
36. Chen W, Kirkbride KC, How T, Nelson CD, Mo J, Frederick JP, Wang XF, Lefkowitz RJ, Blobel GC 2003 β -Arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF- β receptor and down-regulation of its signaling. *Science* 301:1394–1397
37. Luttrell LM, Lefkowitz RJ 2002 The role of β -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115:455–465
38. Haussler CA, Marion SL, Pike JW, Haussler MR 1986 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the clonogenic growth of transformed cells via its receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 139:136–143
39. Sasaki T, Fujimoto Y, Tsuchida A, Kawasaki Y, Kuwada Y, Chayama K 2001 Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ inhibits the growth of human pancreatic cancer. *Pathobiology* 69:258–265
40. Nishinaka Y, Masutani H, Nakamura H, Yodoi J 2001 Regulatory roles of thioredoxin in oxidative stress-induced cellular responses. *Redox Rep* 6:289–295
41. Teis D, Huber LA 2003 The odd couple: signal transduction and endocytosis. *Cell Mol Life Sci* 60:2020–2033
42. Pignatelli M, Cortes-Canteli M, Lai C, Santos A, Perez-Castillo A 2001 The peroxisome proliferator-activated receptor γ is an inhibitor of ErbBs activity in human breast cancer cells. *J Cell Sci* 114:4117–4126
43. Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W 2005 Kinase signaling cascades that modulate peroxisome proliferator-activated receptors. *Curr Opin Cell Biol* 17:216–222

Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

論文

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

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 近藤科江
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 平岡真寛

はじめに

三大死因である「がん」「心疾患」「脳血管疾患」の全死因における割合は、1935年には17.6%だったものが1970年には54.7%、1990年には61.6%に急増している¹⁾。これらの疾患に共通するキーワードが『低酸素』である。生体内に潜む異常な低酸素状態を確実に、感度良くイメージするプローブを開発することができれば、上記三大疾患の早期発見を可能にし、早期治療や、新規治療法の開発に貢献できる。心筋梗塞・脳梗塞などの虚血性疾患における『低酸素』は、広く知られている。梗塞部位周辺の組織細胞が低酸素状態にあるうちに発見し、治療することができれば、死亡率を減らすことができると共に、予後を大幅に改善できる。がんにおける『低酸素』は、あまり知られていないが、固形がんには低酸素領域が存在し(図1)、悪性度の高

いがんにより多く含まれていることが臨床で報告されている。また、1mm以下の微小ながんにも、低酸素領域が存在することが、動物実験で示されており、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。特定の臓器がんの特徴的な分子を標的にする『分子標的』は、特定のがんを治療する上では、非常に有効で、臨床上也大きな成果をあげつつある。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。もう一步進めて、人間ドックのような集団検診で『低酸素』を調べることができるようイメージングプローブを開発できれば、上記三大疾病を同時に検査することが可能になるかもしれない。我々は、そのようなイメージングプローブの開発をめざし、低酸

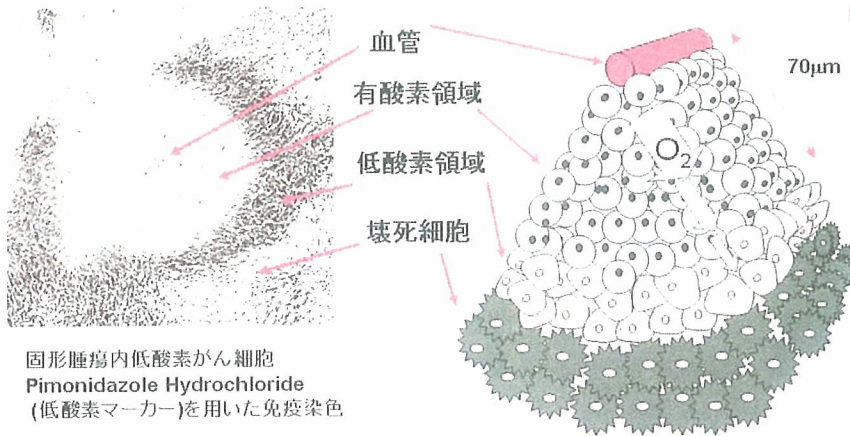


図1 固形腫瘍内低酸素領域

左は、腫瘍切片を低酸素マーカー-pimonidazoleを用いて免疫染色し、腫瘍内低酸素領域(茶色)を染めた。右は、腫瘍の構造を模式的に示した。血管からの距離が大きくなるにつれて、酸素や栄養濃度が低くなり、pimonidazoleで認識されるような低酸素状態となり、それを越えると酸素も栄養も枯渇して細胞は死んでしまう。

固形腫瘍内低酸素がん細胞
Pimonidazole Hydrochloride
(低酸素マーカー)を用いた免疫染色

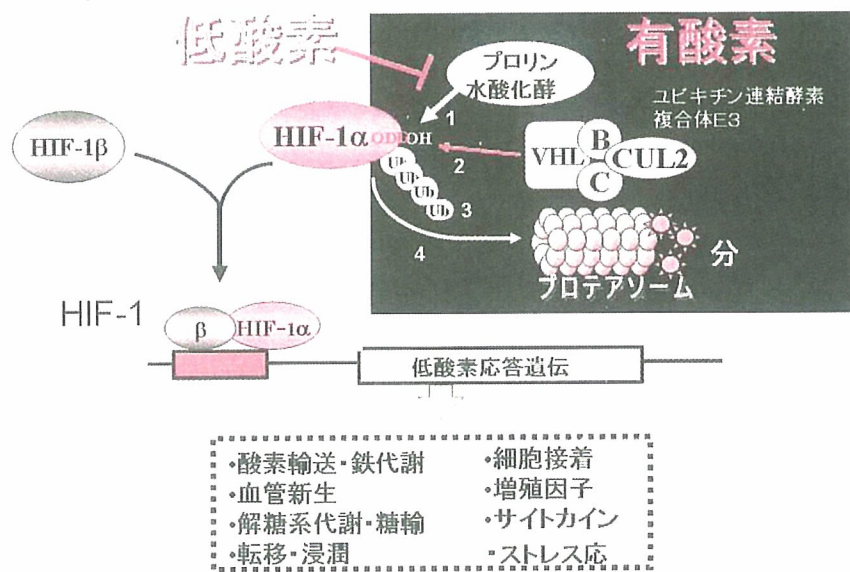


図2 HIF-1αの酸素依存的安全性制御

HIF-1タンパク質は、HIF-1αとHIF-1βの二量体からなる転写因子で、低酸素応答遺伝子の転写制御領域にあるHRE (hypoxia responsive element) に結合して、図(下)に示している様な様々な機能をもつ遺伝子の転写を誘導する。HIF-1αは、低酸素状態の細胞内では安定して存在する(左上)が、有酸素状態の細胞では図内の1~4の反応によって速やかに分解される(右上)。1. プロリン水酸化酵素によりODDドメイン内のプロリン残基が水酸化される。2. その修飾をユビキチン連結酵素複合体E3が認識して、VHLを介して結合し、3. HIF-1αはユビキチン化される。4. ユビキチン化されたHIF-1αは、プロテアソームに運ばれ分解される。

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ・酸素輸送・鉄代謝 ・血管新生 ・解糖系代謝・糖輸 ・転移・浸潤 | <ul style="list-style-type: none"> ・細胞接着 ・増殖因子 ・サイトカイン ・ストレス応 |
|---|---|

素に特異的に安定化する融合蛋白質を応用したイメージングプローブを構築している。

酸素濃度依存的なタンパク質安定性制御機構

低酸素状態にある細胞には、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-1α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、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²⁾。すなわち、HIF-1は低酸素環境下で

特異的に安定化して、転写因子として機能し、一連の低酸素応答遺伝子の発現を誘導する(図2)。それらの遺伝子は、低酸素細胞が過酷な環境に順応するために必要な因子やがんの悪性化に関与する因子をコードしており、現在までに40以上の遺伝子が報告されている³⁾。

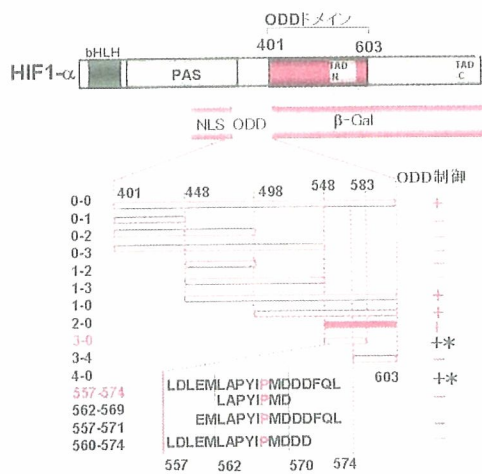
我々は、HIF-1αタンパク質の酸素濃度依存的分解(ODD: oxygen-dependent degradation)機構に着目した。この制御機構は、2001年にプロリン水酸化酵素がクローニングされることによって、ほぼ全貌が解明された⁴⁾。即ち、有酸素状態では、プロリン水酸化酵素が、HIF-1α

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(図2)。このプロリン水酸化酵素が機能する際に、酸素と鉄を必要とする。低酸素状態では、これらが欠如するためプロリン水酸化酵素が機能せず、HIF-1 α は分解されない。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制御機構を応用することから、我々の低酸素特異的イメージングプローブの構築が始まった。

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

図3 ODD融合タンパク質のODD制御領域の同定



HIF-1 α ODDドメインの一部と β -galactosidaseタンパク質の融合タンパク質をコードした遺伝子を構築した。それらを細胞に導入し、有酸素と低酸素状態で培養後 β -galactosidase活性を比較した。低酸素状態の β -galactosidase活性が有酸素状態よりも優位に高い融合タンパク質を(+), 十よりややODD制御が弱い場合を(+*), 制御がみられない場合(-)と判定した。

検証であった。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ドメインの一部を含んだ一連のODDドメイン変異体を構築し、 β -ガラクトシダーゼに融合させて、 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酸素依存的に制御できること、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⁵⁾。

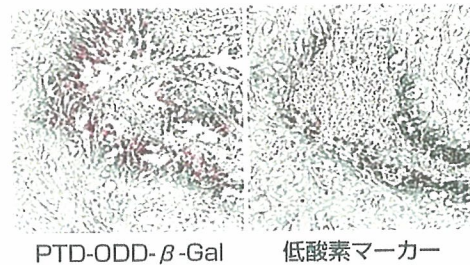
ODD制御できるタンパク質が作れても、細胞内に導入できなければ、細胞内で行われるODD制御を受けることができない。そこで我々は、タンパク質に膜透過性を付加する膜透過ドメイン(PTD)をODD融合タンパク質に付加することにより、培養細胞を用いた実験では、ほぼ100%の細胞にタンパク質を導入し、酸素依存的に機能させることに成功した。しかもこのPTDを融合させたタンパク質は、ネズミを用いた実験で、腹腔内に投与すると、脳を含む全身の組織細胞にデリバリーできることが示されている⁶⁾。そこで我々は、PTD-ODD- β -ガラクトシダーゼを腹腔内に投与し、この融合タンパク質の体内分布と β -ガラクトシダーゼ活性を調べた。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。つまり、PTD-ODD融合タンパク質は、正常組織や腫瘍の大部分の酸素が十分にある状態(有酸素状態)では分解され、腫瘍の低酸素領域でのみ安定化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 (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 (図4)。これらの結果は、我々の設計通り、PTD-ODD融合タンパク質が、全身投与で低酸素細胞がある組織までデリバリーされ、酸素濃度依存的制御を受け、低酸素細胞特異的に分布・機能することを示している。つまり、 β -ガラクトシダーゼの代わりに可視化できる分子をPTD-ODD融合タンパク質とうまく組み合わせることにより、低酸素細胞特異的イメージングが可能になることを示している。

イメージングプローブの開発

現在、PTD-ODD融合タンパク質を用いたイメージングプローブの開発は、PET、MRIによるイメージングに対応できる様に研究を進めているが、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、マウスを用いた光イメージングを行っている。より特異性の高いPTD-ODD融合タンパク質にするための最適化実験を行うと同時に、PTD-ODD融合タンパク質の有効性の検証を行っている。光イメージングプローブの開発は、まずPTD-ODD融合タンパク質に蛍光タンパク質、EGFP (蛍光波長510nm) やRed2 (蛍光波長582nm) を融合させることから始めた。蛍光タンパク質は、種類が豊富で、多重染色が可能なることから、研究の幅を広げてくれるが、光の透過性が極めて悪いことから、小動物の場合でも可視化は極めて難しい。透過性を高めるためには、なるべく波長の長い光を応用することが必要になる。より波長の長い蛍光化合物Cy5.5 (蛍光波長670nm)、Cy7 (蛍光波長

図4 PTD-ODD融合タンパク質と低酸素マーカーの局在比較



PTD-ODD- β -galactosidaseタンパク質を担がんマウスの腹腔内に投与し、4時間後に腫瘍を切除して連続切片を作製した。切片を抗 β -galactosidase抗体(左)と低酸素マーカー(右)を用いて免疫染色し、染色パターンを比較した。

767nm) で融合タンパク質を修飾し、データの収集を行っている。

現在、蛍光の退光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、多重染色法を用いて、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、PETやMRIが主流であるが、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、多彩なプローブを同時に使うことが可能なことから、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の限界があり、大型動物やヒトへの応用は現時点では難しい。光プローブそのものの革新的進歩が無い限り、臨床への応用は、体表面に近いがんの診断や術中利用に限定されると思われる。

低酸素低酸素がん細胞の可視化

プローブの低酸素特異性を生体イメージングで検証するためには、まず標的をイメージング

する必要がある。我々は既に、がんの低酸素領域を可視化することに成功している⁷⁾。上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5HREの下流にルシフェラーゼを繋いだプラスミドp5HRE-luciferaseを組み込んだヒトがん細胞を樹立した(図5のA)。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反応してルシフェラーゼタンパク質が発現され(図5の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5の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。

今後の課題

このように、標的となる低酸素の可視化は、ルシフェラーゼを用いたレポーターシステムにより達成された。標的となる低酸素特異的プローブはPTD-ODD融合タンパク質を光、PET、MRIに対応する修飾を行うことで、より臨床に近いプローブを構築するための研究が進んでいる。既に光プローブは、標的であるがんの低酸素領域に分布することを示唆する結果を予備実験で得ている。低酸素特異的の光イメージングプローブの完成は間近い。PTD-ODD融合タンパク質を用いたプロジェクト(図6)は、イメージングのみに留まらず、機能ドメインに細胞死誘導機能を持つタンパク質に代えることで、抗がん作用を持たせることができる^{8) 9)}。また、細胞死を抑制する機能があるタンパク質に代える

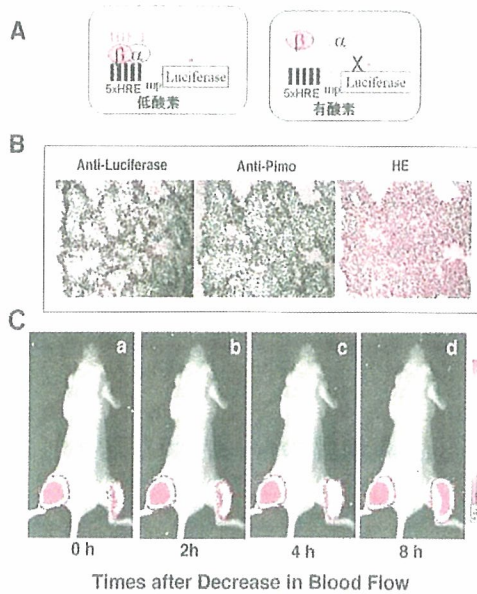
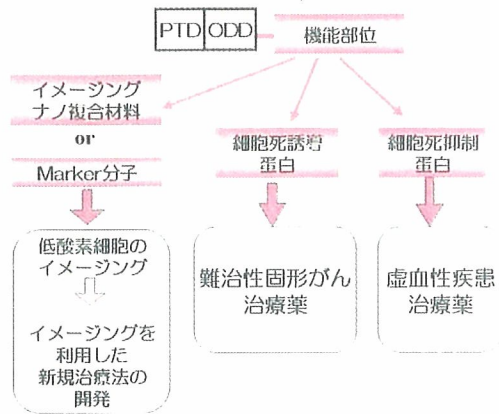


図5. ルシフェラーゼによる化学発光を用いた低酸素がん細胞の可視化。
 A. 5HRE-luciferaseレポータープラスミドを組み込んだヒトがん細胞。低酸素状態の細胞では、転写因子HIF-1がHRE配列に結合してルシフェラーゼが発現する(左)が、有酸素状態の細胞では、HIF-1 α が分解されるためHIF-1が形成されずルシフェラーゼの発現は起こらない(右)。
 B. Aで示したがん細胞をヌードマウスに移植して形成した固形腫瘍の連続切片を抗ルシフェラーゼ抗体(左)、抗低酸素マーカーPimonidazole抗体(中央)で免疫染色した。生細胞(紫色)と死細胞(桃色)を識別するためにHE染色(右)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)が一致しており、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. Aのがん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縛って血流を下げることで、腫瘍内の低酸素領域を人工的に増やし、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。

図6 PTD/ODD融合タンパク質の利用例



PTD-ODD融合タンパク質は、細胞膜透過ドメイン(PTD)、低酸素制御ドメイン(ODD)と機能ドメインの3つからなる。PTDは生体内でのデリバリー機能を持ち、低酸素領域に融合タンパク質を効率よく運ぶ。ODDは低酸素特異性を融合タンパク質に付与する。機能ドメインには、低酸素特異的に機能させたいタンパク質をつけることができる。イメージングのための機能を付けることにより、低酸素特異的イメージングプローブをつくること(左)。細胞死誘導機能を付けることにより、低酸素がん細胞特異的抗がん剤を開発できる(中央)。細胞死抑制機能をつけることにより、虚血性疾患の治療薬を開発することができる(右)。

ことで、虚血性疾患の治療薬としての開発も可能である。つまり、機能ドメインを色々と代えることにより、ターゲティングが可能であり、その研究も進んでいる。

おわりに

我が国では、がんの治療を受け250万人のうち、5年以上15年以内の生存者は約100万人と推定されている。即ち、がんの治療を終え、治った約100万人が、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にあるといえる。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。更に、心筋梗塞、脳梗塞、動脈硬化症といった虚血性疾患を初期段階で発見できるようなプローブを

参考文献

- 1) <http://www.ncc.go.jp/statistics/2005/index.html>
- 2) Semenza GL., Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. Annu Rev Cell Dev Biol. 15, 1999, pp.551-78.
- 3) Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer 2003;3;pp. 721-32.
- 4) Semenza GL. HIF-1, O₂ (2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. Cell 107, 2001, pp.1-3.
- 5) 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 62, 2002, pp.,2013-8.
- 6) Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. and Dowdy, S. F. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. Science. 285, 1999, pp. 1569-72.
- 7) 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 4, 2005, pp.,182-93.
- 8) Kizaka-Kondoh S, Inoue M, Harada H, Hiraoka M. Tumor hypoxia: A target for selective cancer therapy. Cancer Sci 94, 2003, pp.1021-8.
- 9) 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 25, 2004, pp.713-20.

開発できる可能性も十分ある。今、我が国は世界の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中であり、三大疾病の患者の急増も予想されている。早期発見・早期治療が重要であることは言うまでもない。しかし現在の画像診断では、基本的に正常組織との違いを探して『異常』を見つけ出すという手法が取られるため、画像診断の教育を受けた専門医の知識と経験に大きく依存している。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『異常』の存在を示唆できるような特異的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、「異常が無ければ画面にはなにも写らず、イメージとして画面に映し出されたら、そこに異常がある」という極めて簡単な画像診断を提供でき、三大疾患のいずれでも早期に検出が可能であるプローブ、そんな夢のようなイメージングプローブの開発をめざしている。

7 蛍光の 生体イメージングへの 応用

■田中 正太郎¹⁾, 2)

近藤 科江¹⁾, 3)

1) 京都大学医学研究科放射線腫瘍学・画像応用治療学

2) (財)京都高度技術研究所 3) 21世紀COE「病態解明を
目指す基礎医学研究拠点」



田中正太郎
2002年広島大学大学院先端物質
科学研究科修士(工学博士)。同
年、(独)産業技術総合研究所
(第一号非常勤職員)。2003年九
州大学大学院システム生命科学府
(学術研究員)。2005年(財)大
坂バイオサイエンス研究所(受託
研究員)。2006年京都市地域結集
型共同事業推進本部(研究員)。
研究テーマは、腫瘍内低酸素細胞
のイメージング。趣味はドライブ
と観光。

Key words : 光透過性, 自家蛍光, 近赤外波長,
インドシアニンケリオン, Quantum dots, GFP

Abstract

In vivo 蛍光イメージングは、PETやMRI、CTと比較して、低侵襲、簡便、安価、迅速、プローブの多様性という点で優れている。基礎研究分野ではマウスでの全身的なイメージングが行われ、蛍光標識物質の体内動態や腫瘍など病態解明への応用が盛んである。一方臨床分野での蛍光応用は、低透過性や自家蛍光の問題から、術中や表層病変のイメージングに限定されている。現在、自家蛍光の影響を抑えより高い透過性を目指して近赤外蛍光物質の開発が盛んに行われており、臨床応用に向けての研究が注目を集めている。

はじめに

光イメージングはPET、MR、CTと並び *in vivo* イメージングの主要な分野であり、基礎研究を中心に発展している。近年、化学発光を用いた小動物の個体レベルでのイメージング報告が急増しており、蛍光イメージングの個体レベルへの応用にも期待が集まっている。近赤外領域に蛍光波長をもつ蛍光物質を利用することで、蛍光標識プローブの生体内動態が観察可能になりつつあることから、*in vivo* 蛍光イメージングもその特性を生かした

実用化研究の段階に入ったといえる。本稿では *in vivo* 蛍光イメージングの現在について具体例を挙げつつ概説する。また基礎および臨床分野での応用例を紹介する。

1. *In vivo* 蛍光イメージングの特徴

In vivo 蛍光イメージングとは、内在性あるいは外来性の蛍光物質に対し外部から励起光を照射し、生じた蛍光を検出する方法で、標的物質の挙動をモデル生物が生きたままの状態を観察することができる。光を利用する利点として①放射線被爆などを伴わず非侵襲(低侵襲)であり、同一固体に繰り返し処置を行うことが可能である②測定設備が他に比べ安価である③原理が簡易であり観測に高度な技術を要しない④観測結果が迅速に得られる(数秒~数分)⑤遺伝子発現の情報が得られるなどが挙げられる。さらに蛍光イメージングでは蛍光物質の種類が豊富であるため、複数の標識化プローブを用いて、同一個体から複数の生体内情報を同時に収集することが可能である。また、蛍光イメージング分野ではこれまでに *in vitro* 研究での膨大なデータが

Application of fluorescence for *in vivo* Imaging: Shotaro Tanaka, Shinae Kondo, Department of Therapeutic Radiology and Oncology, Kyoto University.

分子イメージング

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、ビタミンやポルプ

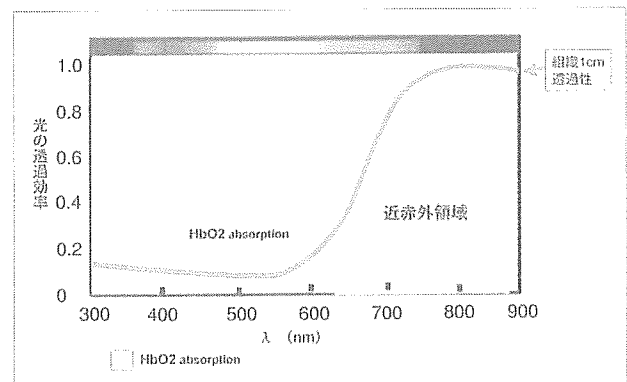


図1 生体の光透過性と波長の関係
光の透過効率(実線)とヘモグロビン(HbO2)の吸収波長域を示した

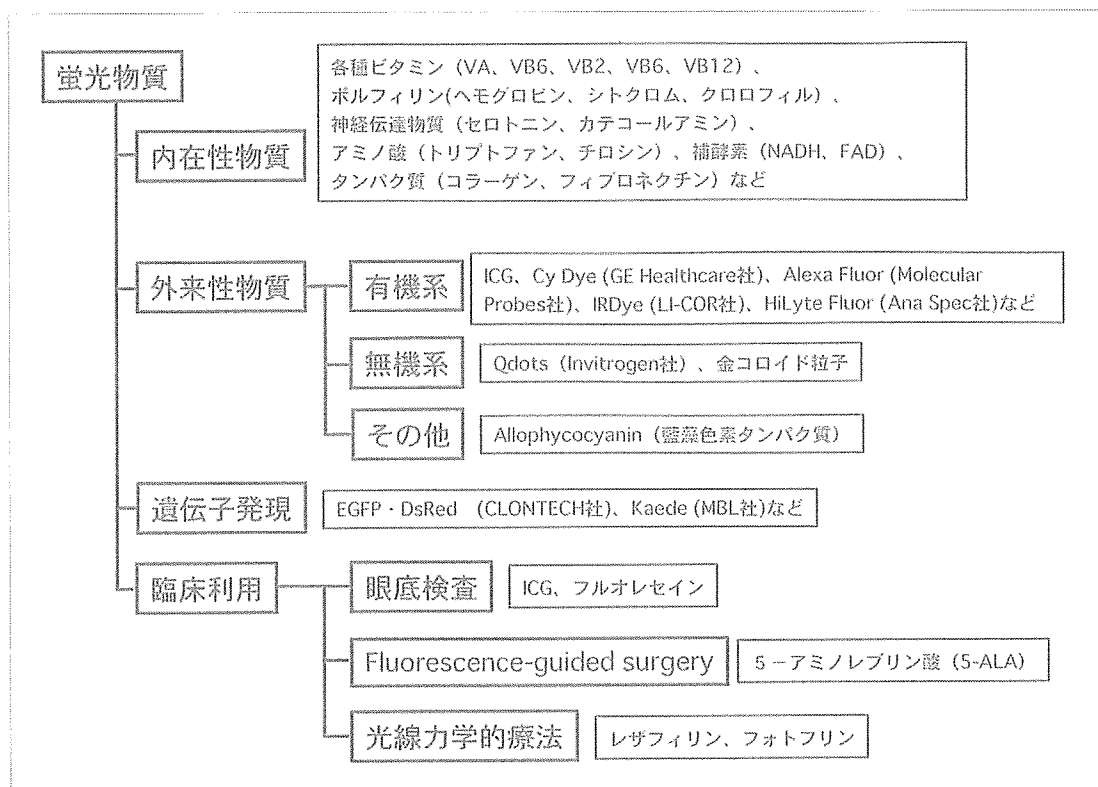


図2-1 *In vivo*イメージングに関する蛍光物質の分類

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。フラビント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¹⁾。

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²⁾。

無機蛍光物質(Quantum dots: QD)は、有機

分子イメージング

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(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^{2),3)}。

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

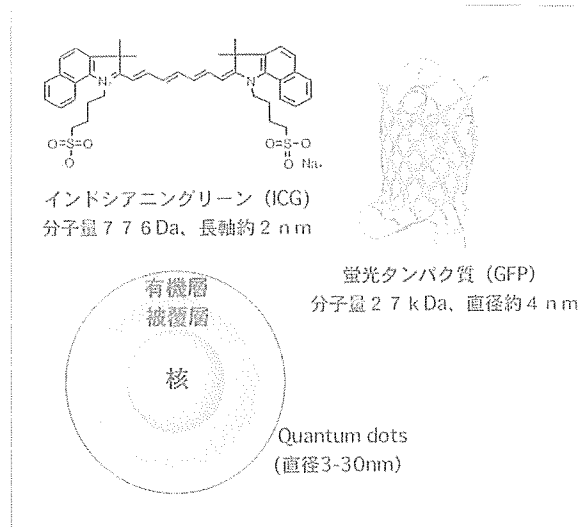


図2-2 代表的な蛍光物質(模式図)

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⁴⁾。

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⁵⁾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

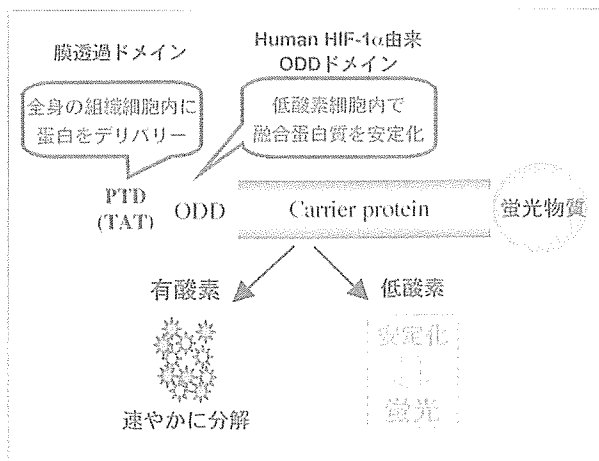


図3-1 低酸素細胞特異的に安定化する蛍光プローブ

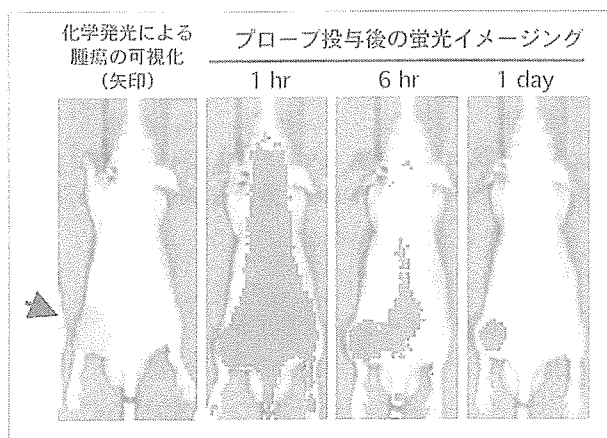


図3-2 マウスを用いた腫瘍低酸素細胞の *in vivo* 蛍光イメージング
化学発光 (左端) およびプローブに由来する蛍光シグナル (他) をマウス背面からの撮影写真に重ねて表示した

素環境にある細胞内で安定化する転写制御因子 HIF-1 α 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。通常の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、腫瘍内定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在

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⁶⁾。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⁷⁾。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⁸⁾。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、精巢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⁹⁾。

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¹⁰⁾。

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の蛍光をモニターすることで、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β-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フルオレセインは、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¹¹⁾。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¹²⁾。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¹³⁾。

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ーブは、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, Hishida 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、平岡眞寛. 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(Pt3): 397-402, 2004
- 8) Kim S, Lim YT, Soltesz 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 U, Meinl T, *et al.*: Lancet Oncol. 7(5): 392-401, 2006
- 13) Huang Z: Technol Cancer Res Treat. 4(3): 283-93, 2005