

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¹⁾。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で、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目に値しないのであるが、これらの細胞はがん治療の

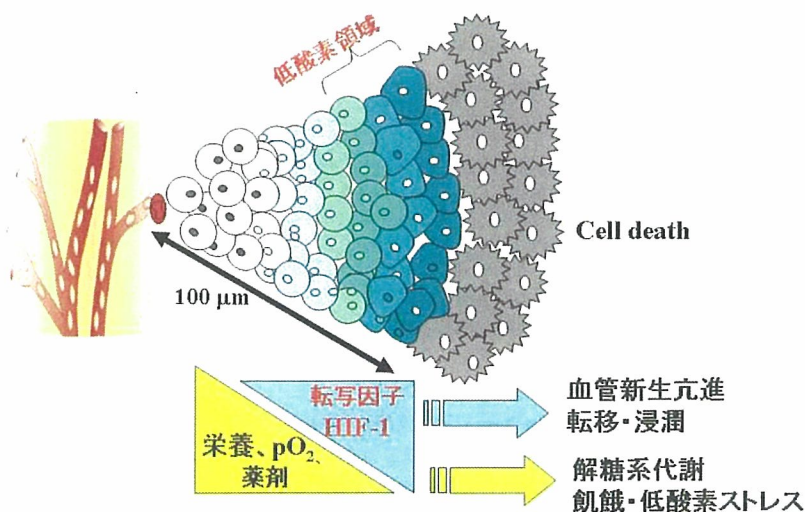


図1 がんの微小環境

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^{2,3)}。更に、生き延びるために様々な因子(例えばVEGF, TGF- β , 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 α 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⁴⁾。HIF-1 α 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

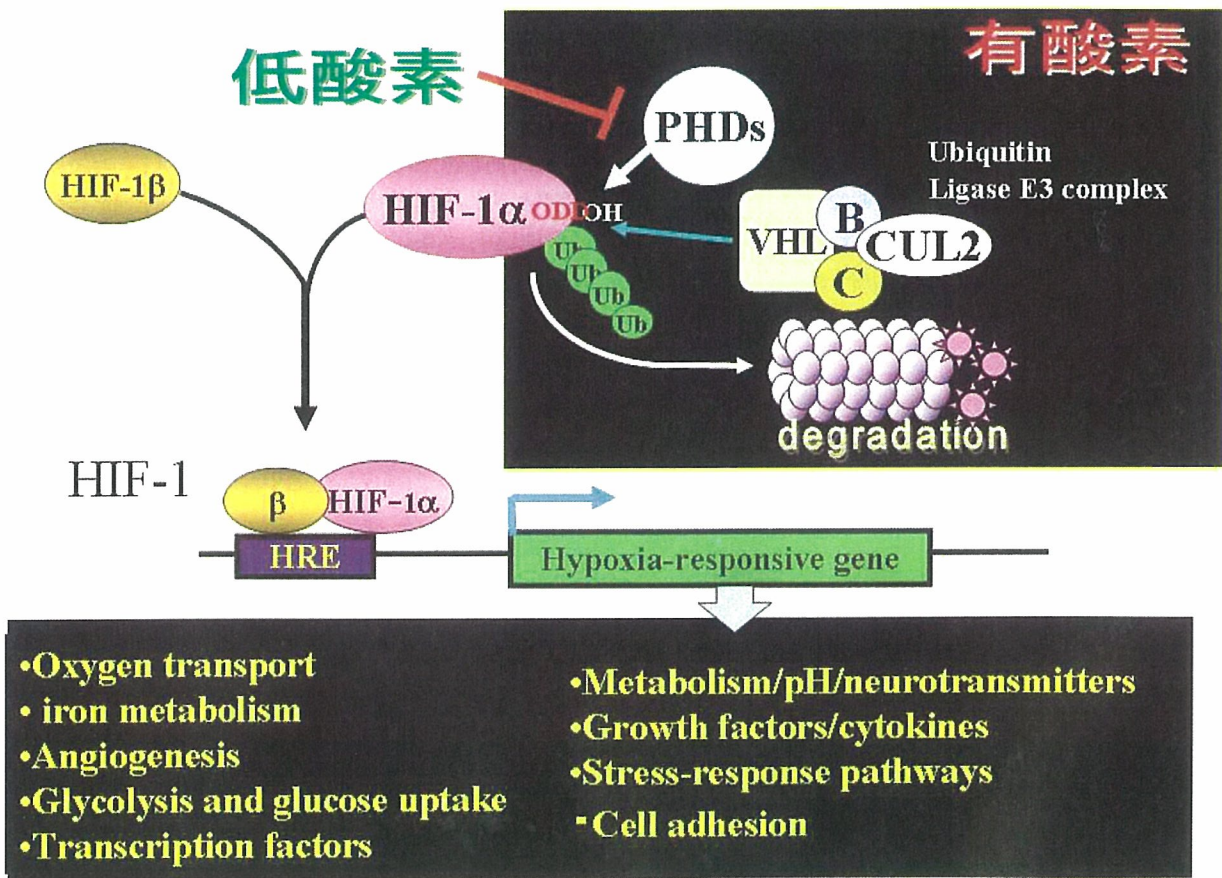


図2 HIF-1転写活性とHIF-1 α の酸素依存的分解機構

HIF-1は、HIF-1 α とHIF-1 β の2つのサブユニットからなり、HIF-1 α 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、それを目指し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 α 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 α 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⁵⁾。

我々は、HIF-1 α 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)がクローニングされ⁶⁾、詳細な分子制御機構が解明されている⁵⁾。即ち、プロリン水酸化酵素が、HIF-1 α タンパク質の中央付近にあるODDドメイン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 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 α は、

有酸素にすると数分以内に分解される。この極めて厳密なODD制御機構を応用して、低酸素がん細胞特異的イメージング・ターゲティング材料の構築が始まった。

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 α 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 α 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、

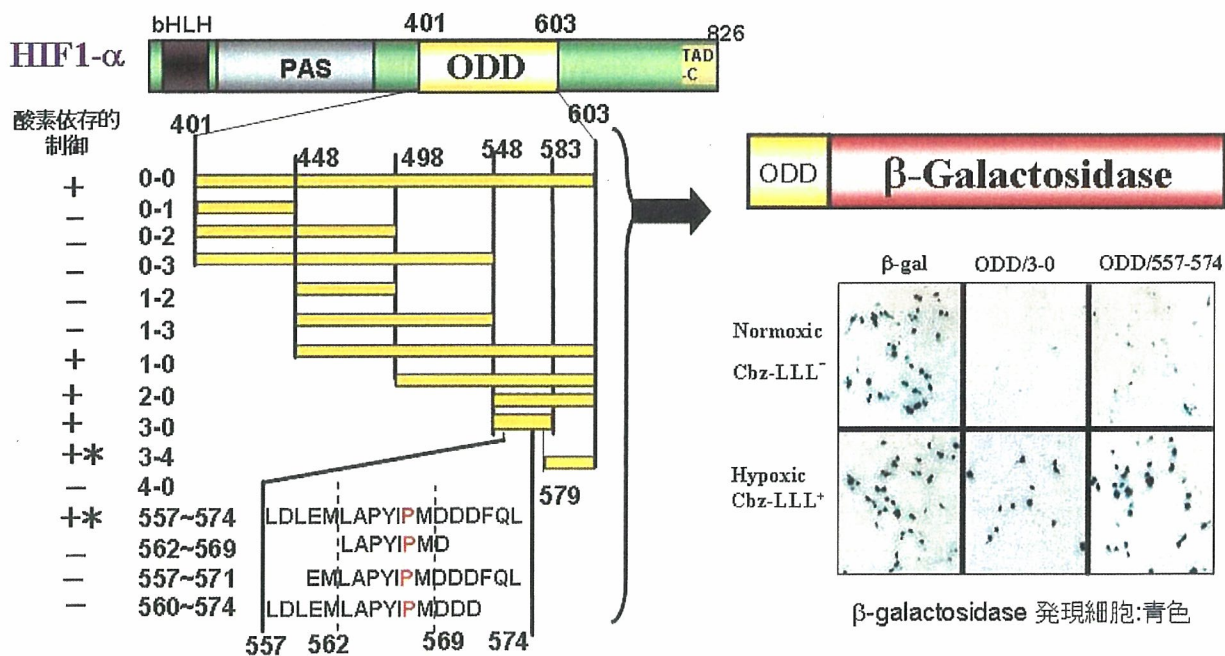


図3 酸素依存的分解能を有する融合タンパク質の構築

HIF-1 α の酸素依存的分解制御を利用するために、HIF-1 α ODDドメインをレポーター(この場合 β -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、ODD₃₋₀とODD₅₅₇₋₅₇₄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、ODD₃₋₀とODD₅₅₇₋₅₇₄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⁷⁾。

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⁸⁾。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)

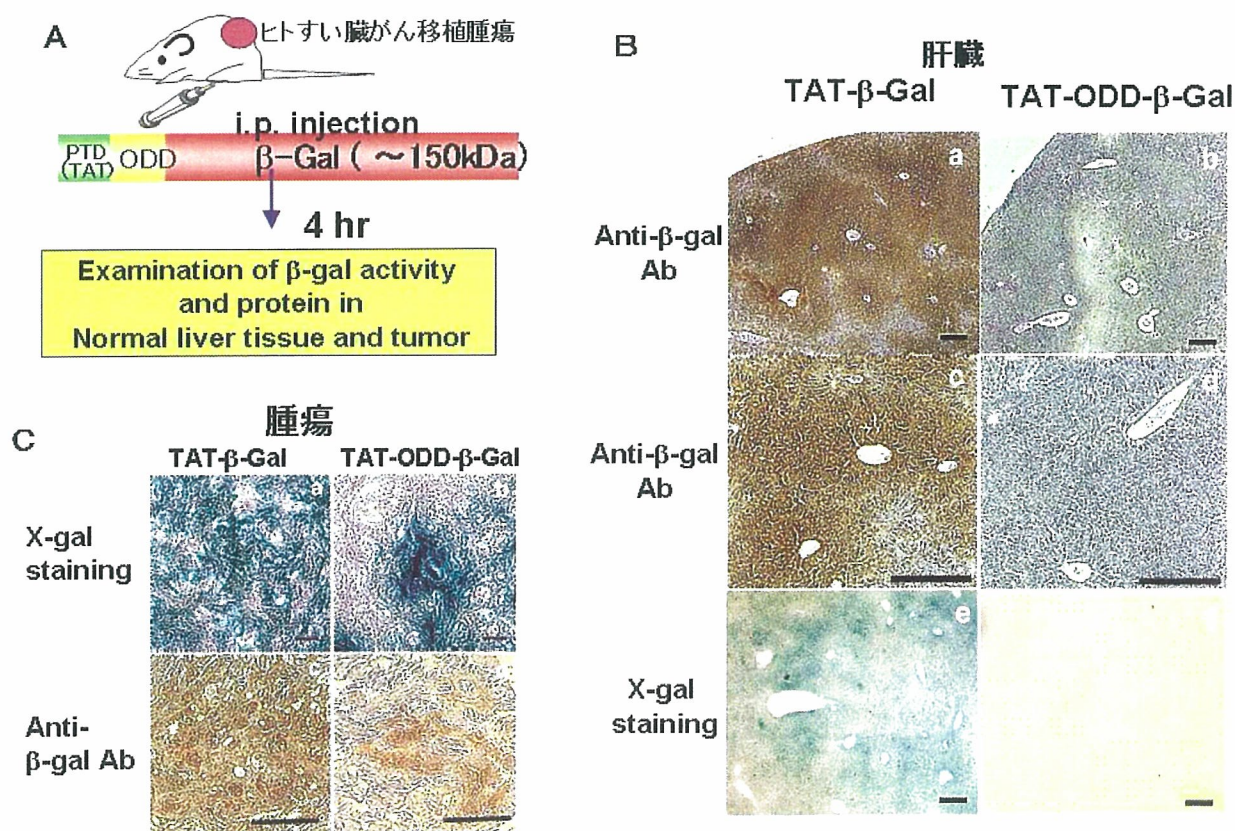


図4 PTD-ODD融合タンパク質の生体内低酸素がん特異性

A) PTD-ODD- β -galactosidaseとPTD- β -galactosidaseタンパク質をそれぞれ担がんヌードマウスの腹腔内に投与し、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。

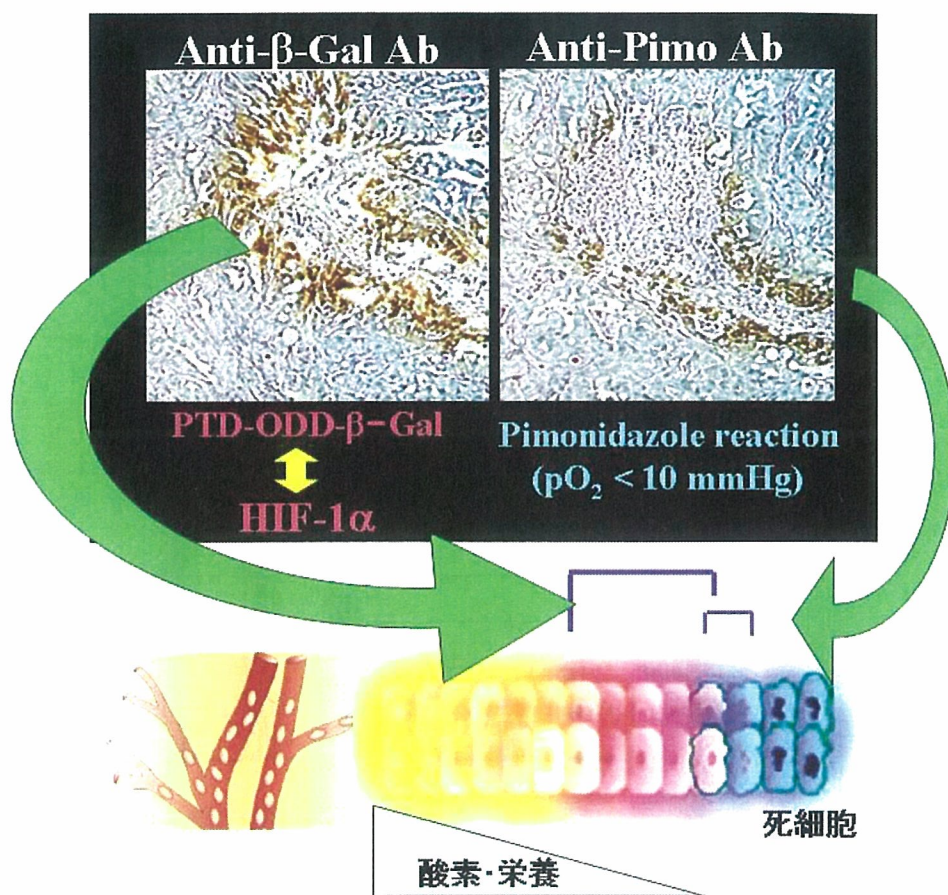


図5 ODD融合タンパク質の腫瘍内局在

PTD-ODD- β -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 β -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 α 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、 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、 β -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 α 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

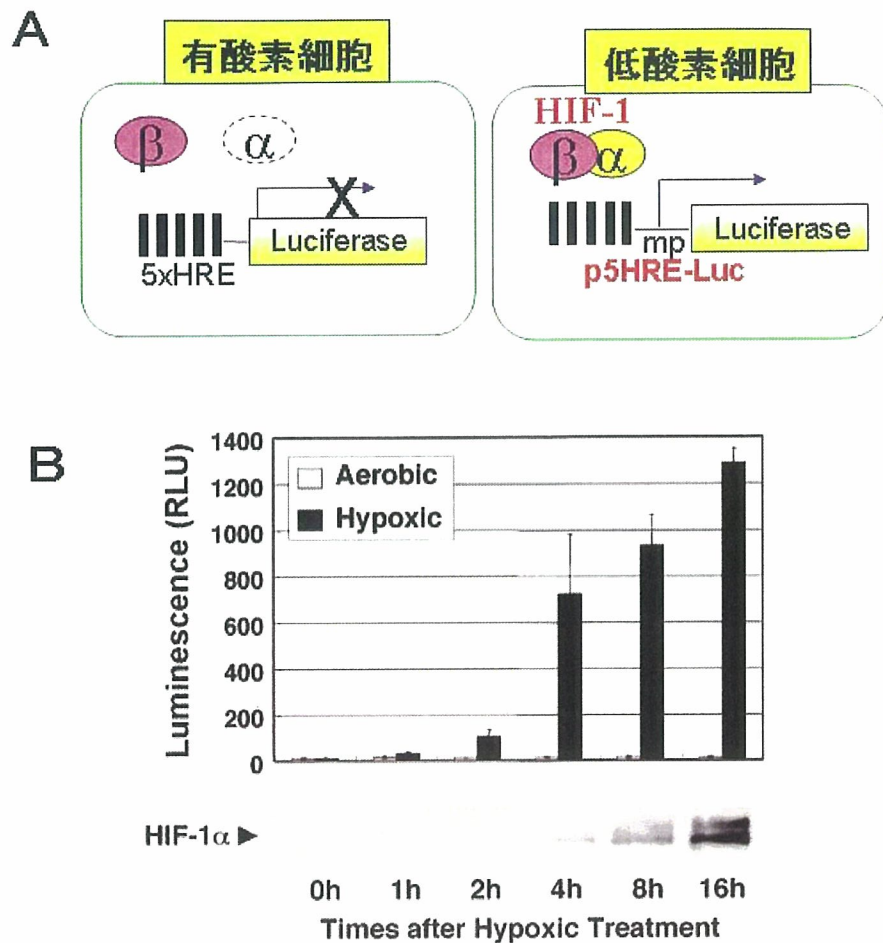
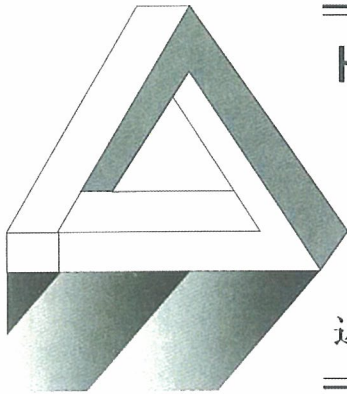


図6 低酸素応答レポーターを有するヒトがん細胞株の構築

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 α 蛋白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 α 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⁹⁾。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 α 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』はもちろんあるものの、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²

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5HREの下流にルシフェラーゼを繋いだプラズミドp5HRE-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反応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)。

* 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

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¹⁰⁾。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型になると、死刑執行

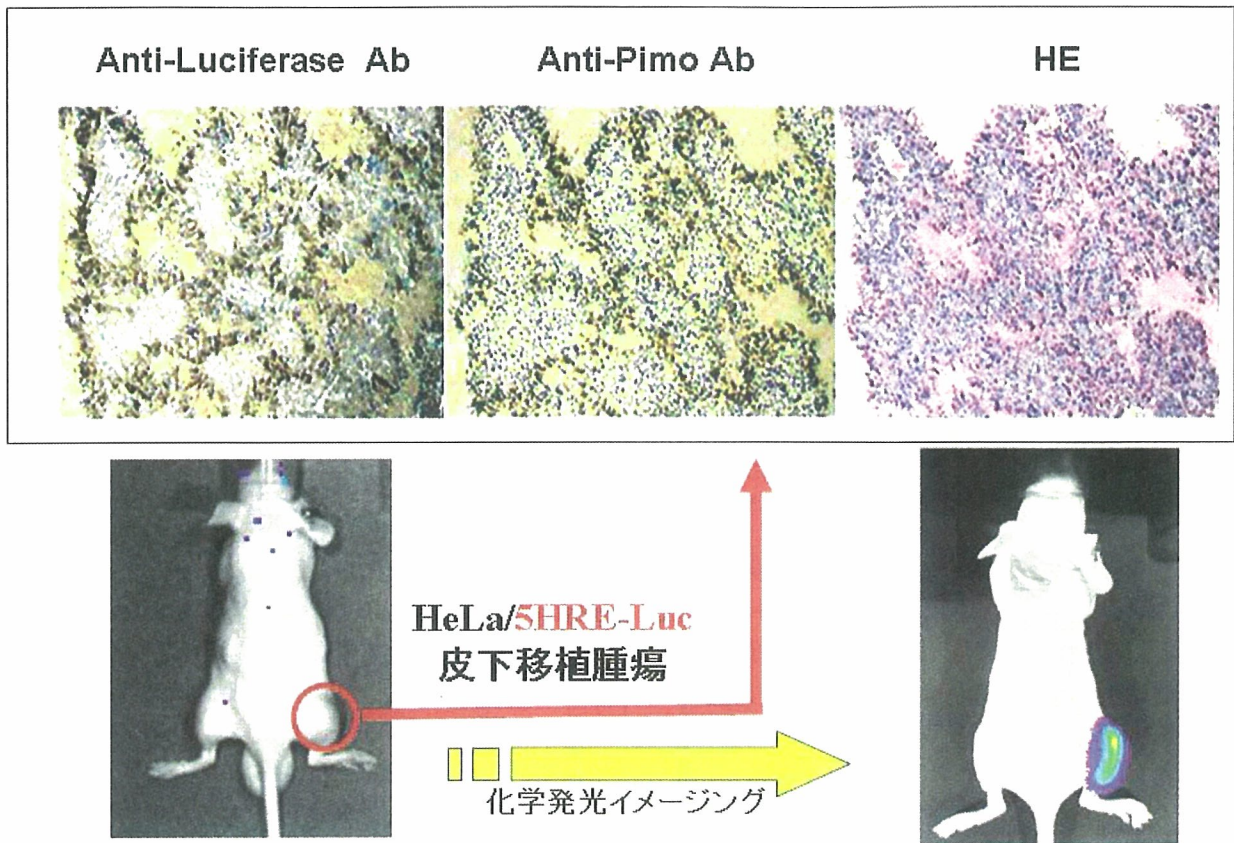


図7 低酸素がん細胞の生体イメージング

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)が低酸素マーカーピ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、ピ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、しがたって、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たまま、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、単に血流にの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-Procaspase-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^{7,10-13)}。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

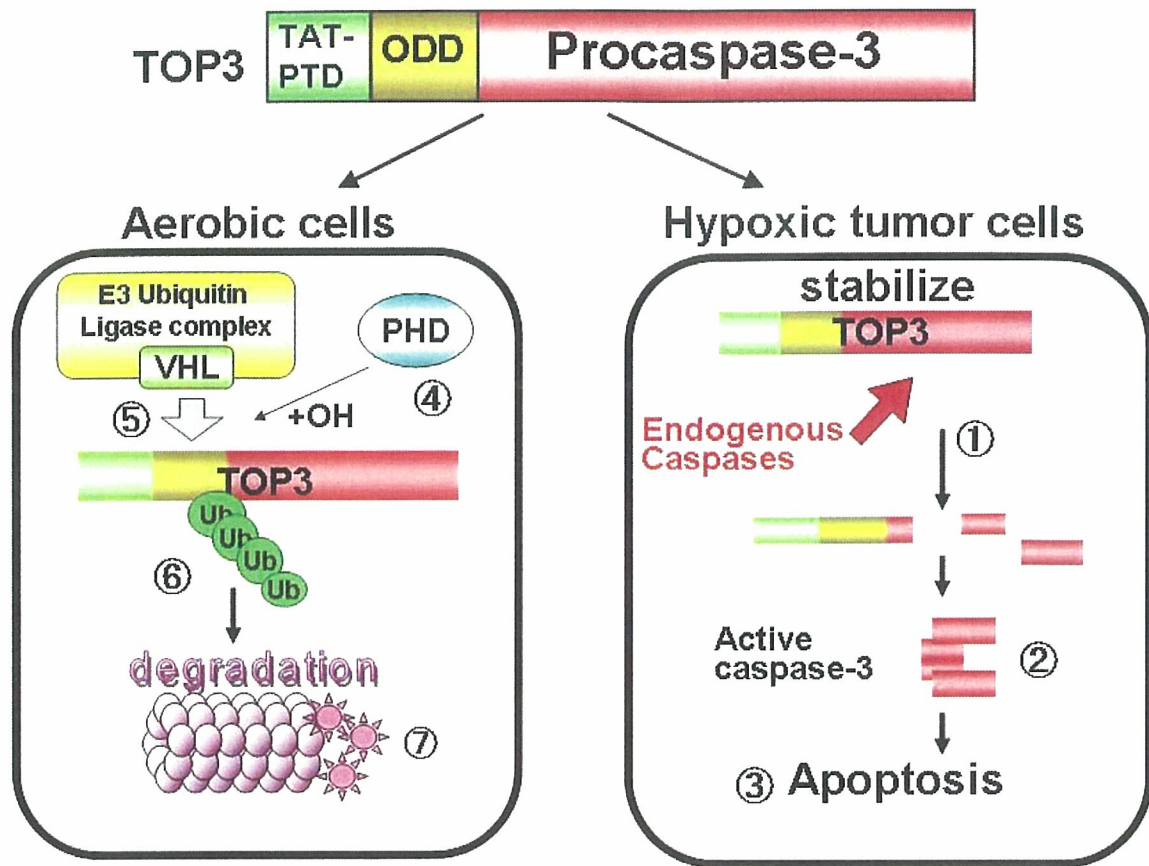


図8 低酸素がん特異的抗がん蛋白製剤TOP3

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¹⁰⁾。

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¹⁰⁾。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

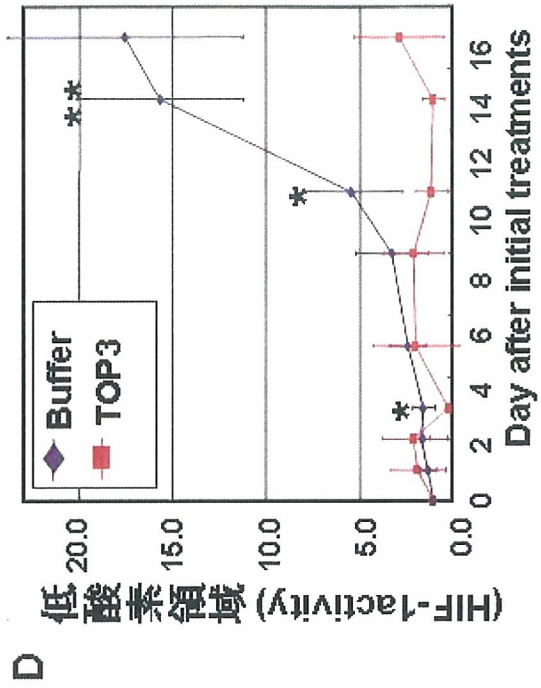
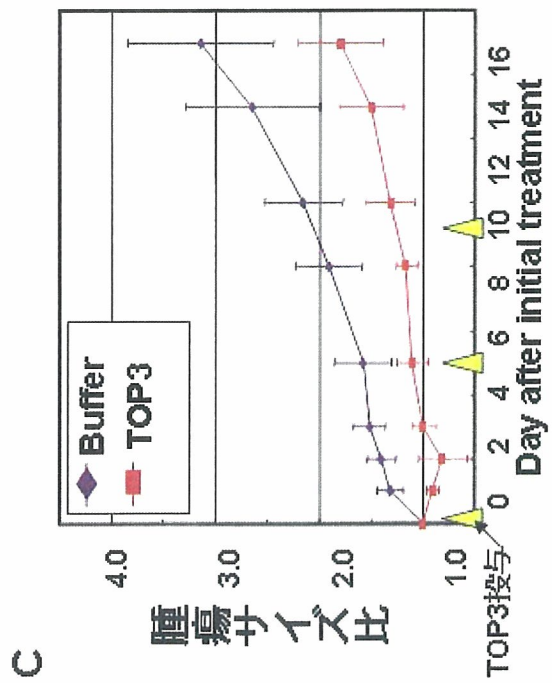
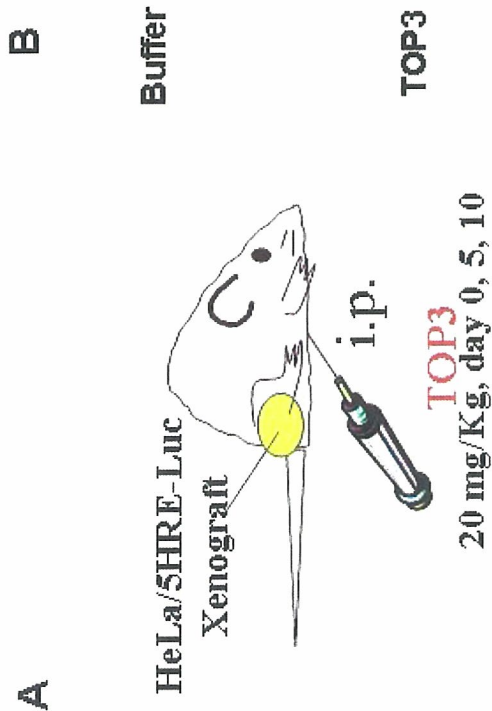
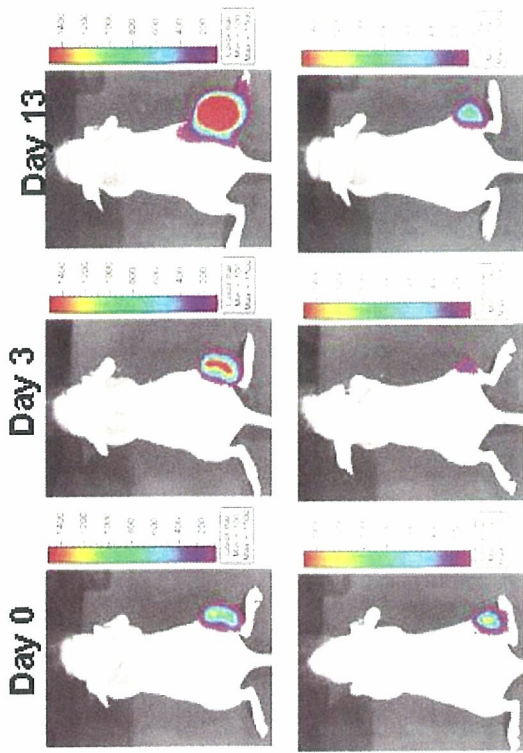


図9 TOP3の抗腫瘍効果
 A) TOP3 (20mg/kg) を一日おきに担がんマウスの腹腔内に投与した。B) 図6と同様にIVIS200で経時的に腫瘍内のルシフェラーゼ活性を測定することで、低酸素がん細胞の相対的变化を観察。C) 腫瘍の大きさをキャリパーで測定して、day 0の腫瘍サイズに対する比を示した。TOP3で治療した腫瘍は、有意に増殖が抑えられた。D) Bのルシフェラーゼの発光は定量化できるため、day 0の発光量に対する比で低酸素がん細胞の推移を示した。TOP3で処理した腫瘍は、低酸素がん細胞が少なくなっていることがわかる。

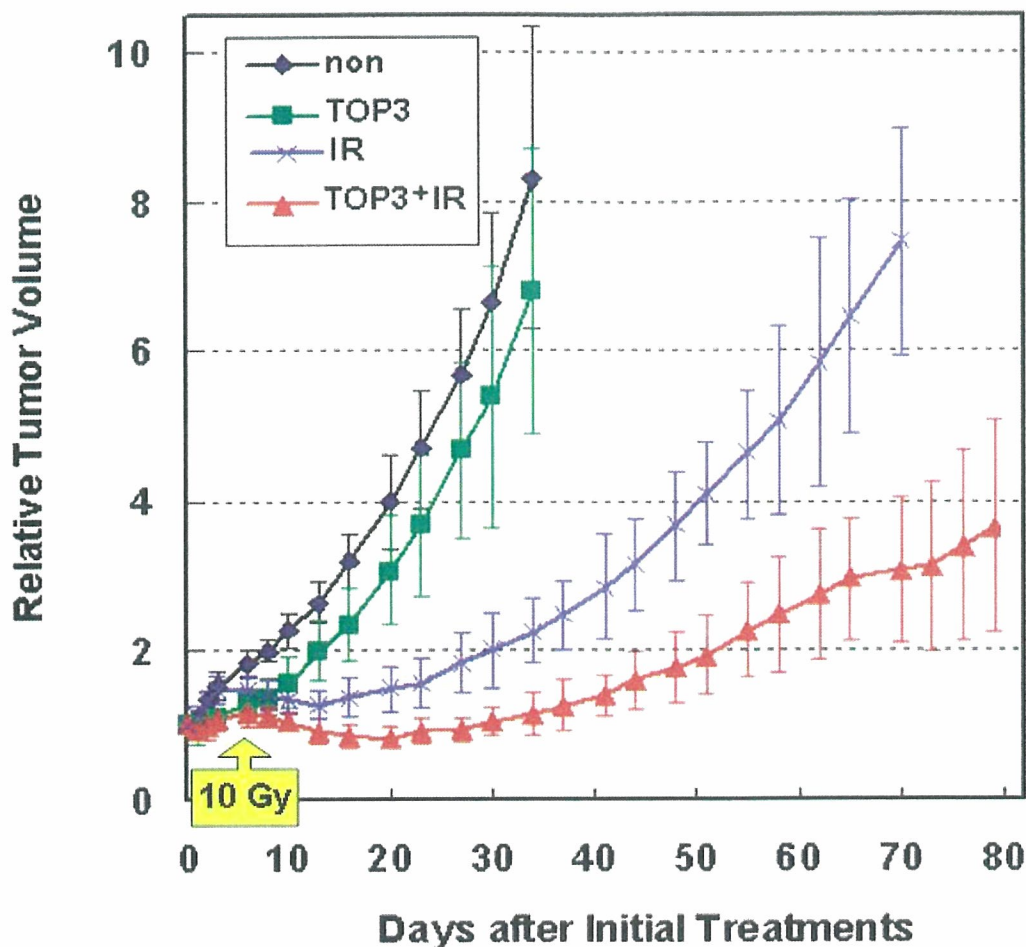


図10 TOP3と放射線との併用実験

ヒト膵臓がん由来細胞株CFPAC-1の皮下移植腫瘍(約200mm³)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いなかったが、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。固形がんにも共通して存在する『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.

平成18年度分中間年報

健康安心プログラム
分子イメージング機器研究開発プロジェクト
悪性腫瘍等治療支援分子イメージング機器研究開発プロジェクト
悪性腫瘍等治療支援分子イメージング機器研究開発に係る先導研究
近接撮像型フレキシブル分子イメージング装置の研究開発に係る先導研究
中間年報

株式会社島津製作所

開発項目 「健康安心プログラム／分子イメージング機器研究開発プロジェクト／悪性腫瘍等治療支援分子イメージング機器研究開発プロジェクト／悪性腫瘍等治療支援分子イメージング機器研究開発に係る先導研究／近接撮像型フレキシブル分子イメージング装置の研究開発に係る先導研究」 平成17年度～平成19年度

のうち平成18年度分中間年報

作成者 株式会社島津製作所 清水 公治

1. 研究開発の内容及び成果等

人体に近接して自由に配置可能な超高分解能3次元放射線検出器(DOI 検出器)、及びこれを用いた部位別がん診断システムを開発するための先導研究として、ガンマ線と光の同時計測が可能な結晶素子を用いた光ガンマ線 DOI 検出器を試作し、ガンマ線と蛍光の同時検出の可能性について検討を行った。さらに、部位別光イメージングに必要な画像再構成方法について、シミュレーションによる評価を実施した。また、検出器配置の自由度をより高めるために、従来の位置検出型光電子増倍管(PS-PMT)に代えてアバランシェ・フォト・ダイオード(APD)を用いたガンマ線 DOI 検出器の特性をシミュレーションで評価するとともに、DOI-APD 検出器を試作し、その性能を評価した。以下、その概要を報告する。

①ガンマ線/光同時検出器の評価

ガンマ線と光の同時計測を高感度に行うためには、検出器を被写体に近接させることで、ガンマ線と光の入射立体角を増大させることが望ましい。その際に懸念されるガンマ線の入射角度による解像度の劣化を防ぐには、検出器の深さ方向の位置が特定できる DOI 検出器が有効である。この DOI 検出器を蛍光用に用いるためには、光が PS-PMT に入射できるよう被検体に面する部分の反射材を取り除く必要があり、さらに自己発光のないシンチレータ結晶を用いる必要がある。そこで、自己放射能がない GSO ($\text{Gd}_2\text{SiO}_5:\text{Ce}$) 結晶を用いたガンマ線と光同時計測用の 4 層 DOI 検出器を試作評価した。

小型シンチレータ結晶(GSO 1.42mm×1.42mm×4.5mm)は 12×12×4 層に配置し、受光素子には、16×16 のマルチアノードが 3.04 mm 間隔で並んでいる 256ch の平板型 PS-PMT を用いた。入射面にはシンチレーション光の波長である 450 nm 付近の領域を反射し、被験体から放出される蛍光の波長である 600 nm 以上を透過するダイクロイックミラーを使用した。GSO 結晶は LYSO 結晶に比べて、発光量が少ないため、各々のシンチレータ結晶の識別にはより困難を伴うが、今回新たに反射材の構造を工夫することで、技術的な課題をクリアした。

さらに、シンチレータ結晶内における光子伝播の振る舞いについてもシミュレーションによる検討を行った。計算で用いたシンチレータの大きさは、試作したガンマ線/光同時検出器と同じジオメトリとし、光子のシンチレータ結晶ブロックへの入射方向はランダムとした(図 1)。モンテカルロシミュレータにより計算された出力分布からシステムマトリクスを生成し、一般化逆行列を適用することで、シンチレータ結晶ブロックの下面分布から上面の蛍光の入射分布を推定できることを示した(図 2)。

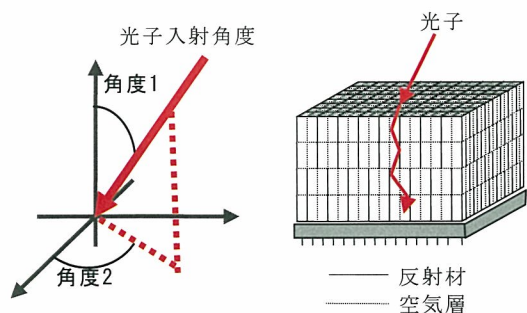


図1 結晶内光伝播のシミュレーションモデル

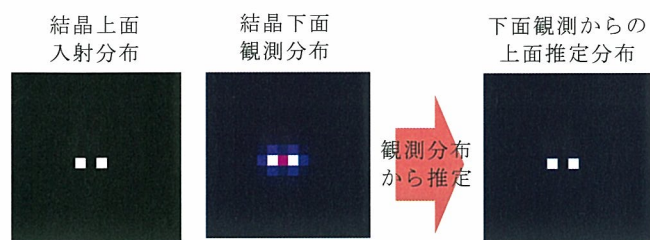


図2 結晶上面の入射分布推定

一方、ガンマ線と光の同時検出では、ガンマ線入射により発生するシンチレーション光と、被験体からの蛍光単光子パルスを弁別する必要がある。この弁別観測の概念を図3に示す。信号の弁別には、適正な Gate 回路と増幅・閾値設定を行うことが不可欠であるため、上記検討に用いたダイクロイックミラー付4層DOI検出器にシンチレーション光と単光子パルスを同時に入射し、両観測信号の波高値および波形の違いを観測した(図4)。

当初、GSO結晶内で発生するシンチレーション光(光子数約5,000)と単光子パルスの波高値とは著しい差が生じると懸念されたが、実際に同一プリアンプを介して観測したオシロスコープ波形では、約9倍程度であることが判明した。この観測結果に基づき、CAMACを用いた同時検出回路の構築し、シンチレーション光と単光子パルスの同時検出が可能であることを示した。

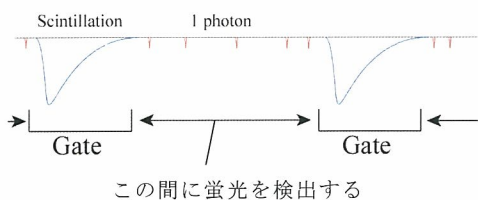


図3 シンチレーション光と単光子パルスの弁別観測(概念図)

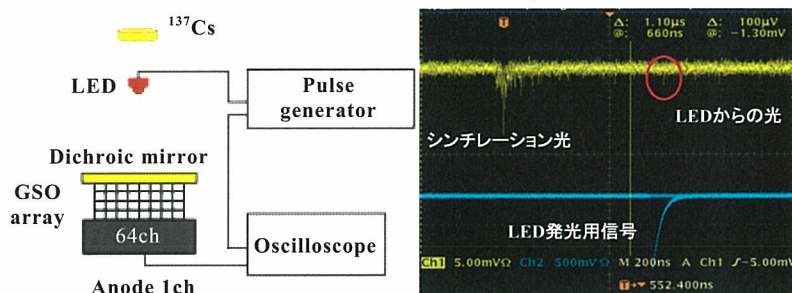


図4 DOI検出器によるシンチレーション光と単光子パルスの同時検出

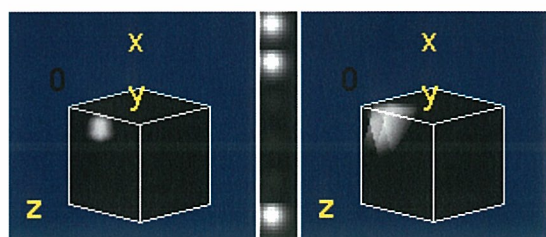
②部位別光イメージングの断層画像アルゴリズムの検討

光は生体内を拡散伝播するため、蛍光や蛍光を用いた断層画像の再構成はPETとは全く異なったアルゴリズムを適用することになる。そこで、立方体モデルで表した被験体の光伝播を拡散方程式で近似し、被験体の周囲で取得した観測データから内部の発光と蛍光の位置を推定する方法として、差分法による光拡散モデル計算法を確立した。

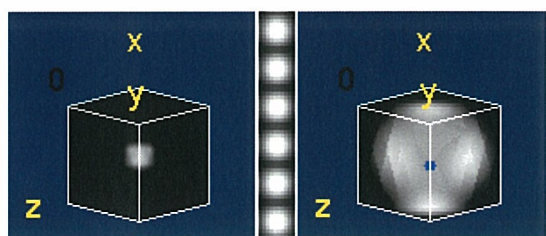
発光のシミュレーションでは、立方体モデル(40×40×40mm)を voxel(8×8×8)に分割し、各 voxelの発光強度を要素とするベクトルによって内部発光分布を表現した。発光観測データから画像再構成を行った結果を図5に示す。発光の位置が立方体モデルの隅、中央ともに、再構成画像の空間分解能は劣化し、特に後者で顕著であった。

一方、蛍光のシミュレーションでは、voxel内で発生する蛍光強度は、励起光のvoxel内フルエンスと蛍光濃度に比例することから、励起光の照射点を変えた観測データが得られる。蛍光

分布を設定し、画像再構成を行った結果を図 6 に示す。この結果から明らかなように発光では推定できなかった中心付近の分布も精度良く推定できることが判明した。

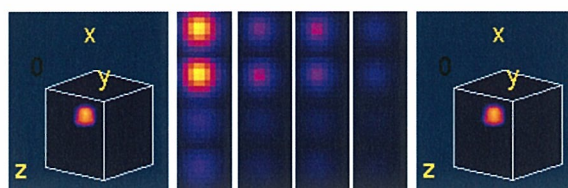


(a) 発光点が立方体モデルの隅にある場合

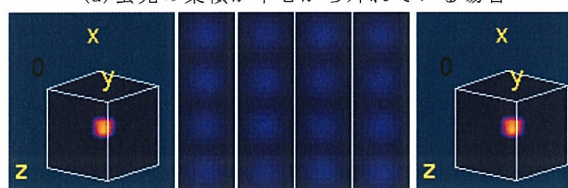


(b) 発光点が立方体モデルの中央にある場合

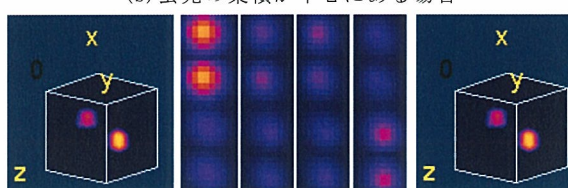
図 5 発光観測による断層画像再構成の結果
左：発光分布
中：観測データ
右：再構成分布



(a) 蛍光の集積が中心から外れている場合



(b) 蛍光の集積が中心にある場合



(c) 蛍光の集積が 2ヶ所ある場合

図 6 蛍光観測による画像再構成の結果
左：蛍光分布
中：励起光照射点を変化させた観測データ
右：再構成分布

また、立方体モデルの発光と蛍光の分布情報がどの程度観測データに伝わっているのかを評価した結果、外部からの励起光照射を必要としない発光観測では、観測方向を増やすことが必ずしも空間分解能の向上に繋がらず、特に被験体中央付近で分解能の劣化が大きいことが判明した。これに対して蛍光観察では、励起光を照射する位置を変えることで、固定された検出器配置でも情報量が増加し、被験体中央においても精度の高い推定が可能であり、断層画像の取得においては、発光観察よりも蛍光観察の方が空間分解能などの点で優位であることをシミュレーションにより実証した。

③アバランシェ・フォトダイオード (APD) を用いたガンマ線 DOI 検出器の評価

近接撮像型部位別 PET 装置の検出器配置の自由度を高めるためには検出器の小型化・薄型化が必要となる。このため、PS-PMT の代わりに APD アレイを用い場合の性能をシミュレーションで評価した。APD の増幅度 (101~102 倍程度) は PMT の増幅度 (105~106 倍程度) と比較して著しく小さいため、回路雑音 (ノイズ) が検出器のエネルギー分解能及び位置弁別能に与える影響が大きい。そこで DOI 検出器の基本性能を達成するために、ノイズレベルをどの程度までに抑える必要があるかを検討した。PS-PMT の量子効率率は 20%、APD アレイの量子効率率は 80% (共に LYSO シンチレータのピーク波長 420nm 付近のデータ) の値を用いた。また、シンチレータ結晶配列と APD 素子配列の幾何学的マッチングおよび光の分散を考慮し、APD アレイの場合はガウス分布のノイズが加わると仮定した場合の位置弁別能をシミュレーションした結果を図 7 に示す。APD アレイに市販のプリアンプ (ノイズ $\sigma = 2.2 \sim 3.9$ p. e. 程度) を接続した場合、鮮明なマッピング表示が

得られることが確認されたが、プリアンプを ASIC 化した場合にはノイズが増大する傾向があるため、ノイズの低減が重要であることが示された。

また、マンモ用 PET 装置の DOI 検出器との互換性を考慮して、 $1.45\text{mm} \times 1.45\text{mm} \times 4.5\text{mm}$ の LYSO シンチレータ結晶素子を $2 \times 2 \times 2$ 層に並べたシンチレータブロックに受光素子として APD アレイ ($4 \times 8 = 32\text{ch}$, $19.5 \times 11.2 \text{ mm}^2$) を組み合わせた DOI-APD 検出器を試作し、マルチチャンネルのプリアンプ及び波形整形アンプ回路を実装、接続した基板において位置弁別の評価を行った。予備実験の結果では位置弁別の可能性が示された。

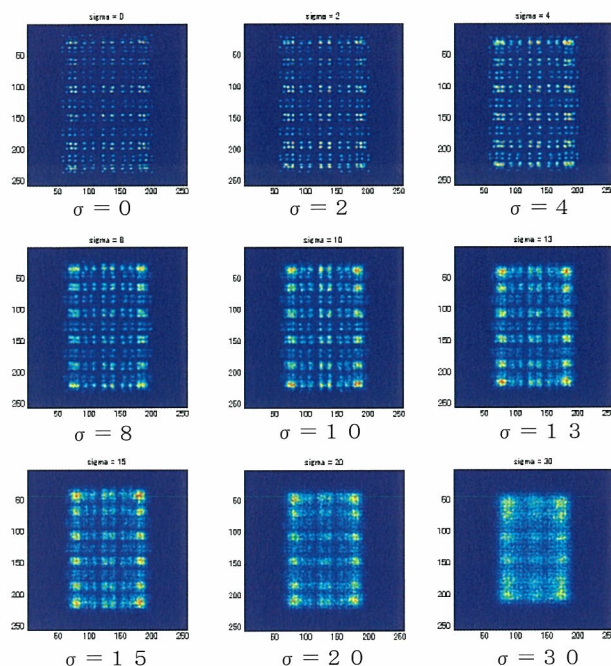


図7 4層 DOI-APD 検出器のシミュレーション結果(マッピング表示)
 - ノイズ σ [p. e.] の影響の検討 -
 (シンチレータ $12 \times 6 \times 4$ 層)

2. 成果 (当該年度分についてのみ記載)

(1) 研究発表・講演 (口頭発表も含む)

発表年月日	発表媒体	発表タイトル	発表者
2006年4月8日	第 91 回日本医学物理学会学術大会 (医学物理, 26巻 Sup. 2, pp. 145-146)	PET・蛍光イメージングの同時撮像が可能なDOI検出器開発の基礎検討	高橋慧, 村山秀雄, 稲玉直子, 山谷泰賀, 北村圭司, 小田一郎, 河合秀幸, 津田倫明

2006年11月11日	第46回日本核医学会学術総会 (核医学, 43(3), p. S 230)	蛍光イメージングとの兼用を目指したDOI-PET検出器の基礎検討	高橋慧, 村山秀雄, 稲玉直子, 山谷泰賀, 吉田英治, 錦戸文彦, 澁谷憲悟, 津田倫明, 小田一郎, 北村圭司, 河合秀幸
-------------	--	----------------------------------	---

(2)特許等

なし

(3) 受賞実績

なし

3. その他特記事項（当該年度分についてのみ記載）

(1) 成果普及の努力（プレス発表等）

なし

(2) その他

なし

契約管理番号	05001549-0
--------	------------