

ンパク質を構築した (図 3 A)。具体的には、HIF-1 α タンパク質のほぼ中央にある酸素依存的分解ドメイン (oxygen-dependent degradation domain : ODD) 内のコアになるアミノ酸配列を任意のタンパク質に融合させると、そのODD 融合タンパク質は、HIF-1 α と同様に、有酸素状態の細胞では速やかに分解され、低酸素状態の細胞では安定に存在する⁷⁾⁸⁾。つまり、ODD を融合させることによって、タンパク質がもつ機能を酸素依存的に制御できるようになる。酸素依存的な融合タンパク質が構築できても、生体で使えなければ意味がない。通常、タンパク質を生体に投与しても、細胞内に運ばれることはないため、たとえ血流に乗って全身に運ばれることがあったとしても、細胞内に取り込まれることは期待できない。そこで、融合タンパク質に細胞膜を通過するための膜透過ドメイン (protein transduction domain : PTD) を融合させた。当初は、研究報告が多い AIDS ウイルスの TAT タンパク質が有する PTD (TAT-PTD) を融合させた。TAT-PTD は、融合したタンパク質を、脳を含む全身の組織細胞にデリバリーさせることができると報告されている⁹⁾。実際、PTD-ODD 融合タンパク質を用いて、腫瘍内の HIF-1 活性を示す低酸素標識をほぼ根絶させることに成功している⁽¹⁷⁾¹⁰⁾。

現在、より高い膜透過性を有する PTD を独自に開発して、PTD-ODD 融合タンパク質をつくり、さらに、種々の機能を PTD-ODD に融合させることで、生体に応用できる融合タンパク質を構築している。例えば、融合するタンパク質に、細胞死を誘導するような機能をもつタンパク質を融合することで低酸素癌細胞を死滅させる融合タンパク質が、イメージング機能をもたせることにより低酸素細胞をイメージングするプローブをつくることができる (図 3 B)。

5 蛍光プローブによる低酸素細胞のイメージング

低酸素イメージング用の PTD-ODD 融合タンパク質は、光イメージングを用いて評価している。操作が簡単で、経済的な光イメージングは、構築したプローブが臨床応用できるか否かを、簡単に評価するには

大変有用である。また研究者にとっても、より容易にプローブの構築・評価に臨むことができるため、トライ・アンド・エラーによる改良が短期間にできる。われわれは、PTD-ODD 融合タンパク質に組織透過性の高い近赤外蛍光標識をつけたプローブを構築し、低酸素癌細胞特異的プローブの評価を行っている。これまでの結果はきわめて良好で、3 mm 程度の小さい皮下腫瘍を、6 時間以内に可視化することができている。現在放射線同位元素で標識する方法も共同研究で行っており、PET プローブとして臨床応用に向けた研究も進んでいる。今後、さらに改良を重ねて、より腫瘍に特異的なプローブの開発を行うことにより、目標とする早期診断につながるようなプローブの構築を目指して研究を続けている。

□ おわりに

HIF-1 α タンパク質の酸素依存的分解は、酸素センサーであるプロリル水酸化酵素により制御されている。われわれの体を構成する組織がもつ至適酸素濃度は、組織ごとに異なるため、「低酸素」といっても、一律に決まった酸素濃度があるわけではない。10 mmHg というきわめて低い酸素濃度を正常値にもつ組織細胞はないため、その濃度で反応する化合物を用いることにより「超低酸素」状態にある細胞を検出・治療する研究もなされている。われわれのプローブは、「超低酸素」を見つけるものではなく、細胞にとって至適酸素濃度を、ストレスを受ける程度に下回った低酸素状態、つまり「病的低酸素」状態を検出するものである。腫瘍のみでなく、虚血性疾患でも、HIF-1 活性は重要なシグナルとなっている。細胞からの SOS シグナルともいえる HIF-1 活性をいち早く検出できるプローブは、三大死因となっている疾患を早期に見つける鍵になると確信している。

謝辞

本研究は、独立行政法人科学技術振興機構から指定を受けた京都市地域結集型共同研究事業 (URL : <http://www.astem.or.jp/kyotokessyu/>) の一部として、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 平岡真寛先生をグループリーダーとする「ナノテク材料による医療

用イメージングとターゲティング技術の開発」研究の一環として実施された研究の成果である。

13) 近藤科江, 平岡真寛: 病理と臨床, Vol.25, No.6: 539-545, 文光堂, 2007

文献

- 1) Semenza, G. L. & Wang, G. L.: Mol. Cell. Biol. 12: 5447-5454, 1992
- 2) Semenza G. L.: Nature Rev. Cancer, 3: 721-732, 2003
- 3) Harris, A. L.: Nature Rev. Cancer, 2: 38-47, 2002
- 4) Kizaka-Kondoh, S. et al.: Cancer Sci, 91: 1021-1028, 2003
- 5) O'Rourke, J. F. et al.: Oncol. Res., 9: 327-332, 1997
- 6) Harada, H. et al.: Mol. Imaging, 4: 182-193, 2005
- 7) Harada, H. et al.: Cancer Res., 62: 2013-2018, 2002
- 8) Harada, H. et al.: FEBS Lett., 580: 5718-5722, 2006
- 9) Schwarze, S. R. et al.: Science, 285: 1569-1572, 1999
- 10) Harada, H. et al.: Oncogene, in press (2007)
- 11) 近藤科江 他: 放射線科学, Vol.49, No.12: 436-441, 実業公報社, 2006
- 12) 近藤科江 他: バイオテクノロジージャーナル, Vol.6, No.2: 234-237, 羊土社, 2006

Profile

総頭行者プロフィール

近藤科江: 1981年攻巣薬科大学卒業。免疫療法に興味をもち、卒業後、米ニューヨーク州オーバニー医科大学大学院に留学。修士修了後、大阪大学大学院医学研究科博士課程入学。微生物病研究所で癌研究に没頭。その後、学長研究員、新技術事業団研究員、京都大学助手を経て、2004年に京都大学大学院医学研究科21世紀COE准教授に担任後、低酸素イメージング研究を開始。低酸素研究の推進に貢献すべく、'04年に井上正宏先生(大阪府立成人病センター研究所)と「がんとハイポキシア研究会」(平岡真寛先生代表)を立ち上げる。第2回日本分子イメージング学会プログラム委員として日本のイメージング研究推進にも参加。基礎医学研究と臨床の架け橋になることが目標。

医学・生命科学の最新手法、バイオイメージングのプロトコルを網羅!

染色・バイオイメージング 実験ハンドブック

細胞や組織の形態・遺伝子・タンパク質を
観るための染色法と顕微鏡観察のすべて

編/高田邦昭(群馬大学大学院医学系研究科生体構造解析学分野)
齋藤尚亮(神戸大学バイオシグナル研究センター分子薬理分野)
川上速人(香林大学医学部解剖学教室)

基本的手法から、最新のイメージング技術までを網羅!
オールカラーの写真とイラストが満載!

【定価(本体6,900円+税)】|B5判|335頁
【オールカラー】|ISBN978-4-7581-0804-1



発行 羊土社

分子イメージングへ応用する ナノキャリアの開発

木村俊作¹・近藤科江²・平岡眞寛²

1 京都大学大学院工学研究科, 2 京都大学大学院医学研究科

がん組織の早期発見が可能になると治癒の可能性が飛躍的に高くなることから、1～2 mm 程度のがんを検出できる分子イメージング技術の開発が望まれている。このレベルでの検出には、従来の組織形態学的な異常を検出する手段では十分な結果を得ることが困難であり、「疾患状態において生体内に分子・細胞レベルで生じた事象の非侵襲的画像化(分子イメージング¹⁾)」の手法が必要となる。このためには、標的組織、細胞への高選択的ターゲティングが必須であり、またこれが可能になれば、イメージング診断と標的治療を同時に行えると期待される。

本誌(2006年10月号)の「分子イメージング最前線」というタイトルの特集で、分子イメージングに用いられるモダリティや造影剤などの開発における最新動向が紹介されており、分子イメージングの全体像についてはそちらをご覧ください²⁾。その特集のなかで、高分子型造影剤が血管からの漏れを軽減し、バックグラウンドシグナルを下げる効果があることが指摘されている。ここでは高分子の代わりにナ

ノキャリアを用いる方法を紹介したい。ナノキャリアを用いると、高分子型造影剤の特色を保持しながら、ナノキャリアに薬剤を担持したり、表面の化学修飾によりターゲティング能力を効率よく向上させることが比較的容易になるため、次世代の多機能化分子イメージング剤に繋がると期待される。

高分子担体とナノキャリア

高分子をプラットフォームにして、ターゲティング、イメージングとして機能するユニットや薬剤などを担持することでDDS(ドラッグデリバリーシステム)へ応用展開する考えは、すでにRingsdorfによって1975年に提案されている³⁾。一方、ペプチドホルモンを高分子に多数担持した多価リガンドを筆者らは1991年に調製し、細胞表面に存在するレセプター親和性の向上を図った。この基本的な考えは、Schwyzerが1978年に提案している⁴⁾。細胞表面上で隣接するレセプター間に適合する距離で複数のリガンドをキャリアに固定化すると、レセプターへの親和性が高分子リガンドと細胞表面との多点結合により向上し、また細胞サイドにたてば、リガンドの局所濃度が高いと感じてリガンドによるシグナルが増強されることが期待される。

しかしながら、キャリアとなる高分子鎖が柔軟であり球状構造をとると、結合したリガンドが複合体の内部に埋もれ、細胞表面への接触が阻害されてしまう場合がある(図1a)⁵⁾。この点を解決するため、筆者らはリポソームをキャリアに用い、その表面にリガンドを露出するかたちで固定化する多価リガンドを提案した^{6,7)}。このような球状の分子集合体をキャリアとする多価リガンドにより、リガンドユニットあ

木村俊作(きむら しゅんさく)

<所属>京都大学教授(大学院工学研究科)。<出身大学>京都大学大学院工学研究科(1981年修了)。<研究テーマ>生体関連科学。<趣味>篆刻

近藤科江(こんどう しなえ)

<所属>京都大学 COE 准教授(大学院医学研究科)。<出身大学>岐阜薬科大学。<研究テーマ>光イメージング。分子腫瘍学。<趣味>ガーデニング

平岡眞寛(ひらおか まさひろ)

<所属>京都大学教授(大学院医学研究科)。<出身大学>京都大学。<研究テーマ>放射線腫瘍学。画像応用治療学。<趣味>囲碁、ゴルフ

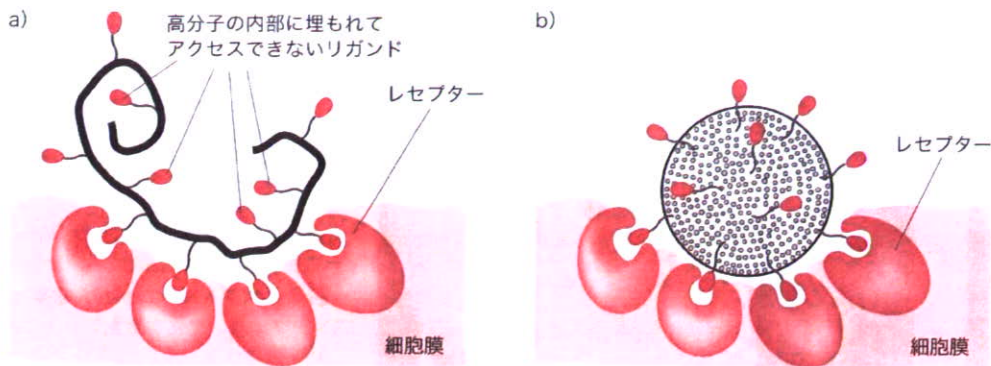


図1 キャリアに固定化したリガンドがレセプターに結合する様子

a) 高分子担持型多価リガンド, b) ナノキャリア担持型多価リガンド. 細胞膜中のレセプター間の距離に適合する間隔でリガンドをキャリアに固定化することで, キャリアと細胞膜とのあいだで多点結合を形成し, リガンドの親和性を向上させる. ナノキャリアに固定化されたリガンドは, すべてがレセプターにアクセス可能となり, 高分子型よりもキャリアとして優れる.

たりのレセプター親和性がフリーな場合よりも向上することを示すことができた(図1b)⁸⁾. このリポソームをナノキャリアに用いる手法の長所の一つは, リポソームに担持するリガンドの量を変えることで, リガンド間の平均距離を調節できることである. つまり, 相互作用する相手の状態(細胞膜中のレセプター間の平均距離など)に, リガンドの分散状態を合わせることが容易であり, その結果, 親和性の最適化が合理的に行える. また球状集合体のなかでも, とくにベシクルは内部に親水性の薬剤などを内包できるので, 多様な用途に応用できる. これらのことから, ベシクルをプラットフォームにする分子システムは, DDS や分子イメージングに非常に有用であると予想される. また, 100 nm の粒径をもつナノキャリアはがん組織へ集積されやすい(EPR 効果)ことから, がん組織のイメージングへの適用が考えられた.

ベシクル型ペプチドキャリアの調整

粒径 100 nm のベシクルの典型例はリポソームである. しかしながら, 単純な脂質で構成されるリポソームは物理的強度が十分ではなく, 血中滞留時間がそれほど長くない. 重合性脂質を用いて, 脂質分子どうしを重合により架橋して強度を増すこともできるが, 重合膜の不均一性から生じる欠陥や透過性の増大, また重合脂質という抗原性のリスクは避けたい. この両者を解決する方法として, PEG (ポリエチレングリコール) 化脂質を用いたステルスリポソームが開発され

た⁹⁾. ここで用いられている PEG は, イオンをもたない水溶性の合成高分子である. 合成高分子であるにもかかわらず, 生体親和性が高いことから薬剤や医用材料において利用されつつある. しかし, PEG 鎖の末端が酸化されヒドロキシ基

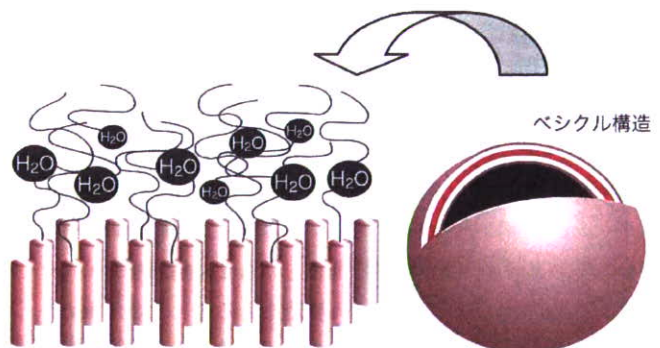
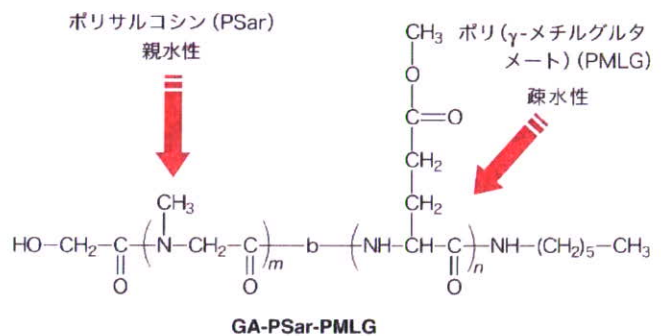


図2 両親媒性ブロックポリペプチドによるベシクル型分子集合体“ペプトソーム”

ベシクルを構成するペプチド薄膜の構造を拡大して左図に示す. PSar への水合がベシクルを安定化する.

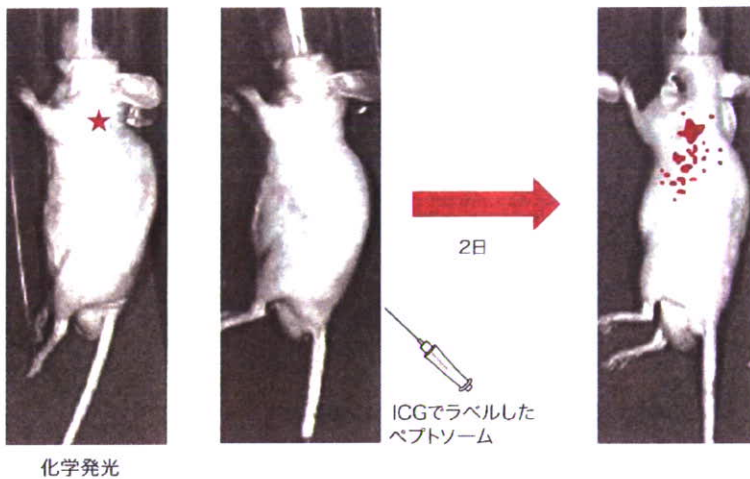


図3 ペプトソームががん組織へ集積する様子
ルシフェリンで化学発光したところ(星印)にがん
が移植されている。近赤外プローブ(ICG)でラ
ベルしたペプトソーム(色の部分)が、接種して2
日後に移植したがん組織の位置へ集積しているこ
とがわかる。

になると、補体系(生体に侵入した病原体を破壊する生体防御システム)を活性化することが指摘されている¹⁰⁾。実際、急性アレルギー反応を比較的高い頻度で引き起こすことも報告されている¹¹⁾。そこで、天然由来の高分子で、PEGに代わるイオンをもたない水溶性高分子を用いることで、PEGを生体系に適用するリスクを軽減することを考えた。筆者らは、そのような水溶性高分子として、ポリサルコシン(ポリペプチド)を選んでベシクル調製を検討した。また、分子集合体の物理的安定性を増すため、脂質ではなく疎水性のポリペプチドを膜の疎水性部に用いることにした。

ペプトソームの血中滞留性とターゲティング

図2に、親水性(ポリサルコシン)と疎水性〔ポリ(γ-メチルグルタメート)〕をもつブロックポリペプチドの構造式を示す。親水性と疎水性とのバランスを選ぶことにより、このポリペプチドは水中でベシクル構造の分子集合体を形成した。ベシクル構造であることは、水溶性モデル化合物がペプチド集合体に内包されることで示すことができた。また、疎水性部は同じで、親水性部の長さが異なる2種類のポリペプチドの比率を変えることで粒径を調整することが可能であり、動的光散乱(DLS)測定にて流体力学的直径が100nmのベシクルを調製できた。このベシクルでは、薄膜の疎水性部を構成するポリペプチドが規則正しいらせん構造をとっており、一般的な高分子がランダム構造をとるのと大きく異なる。ペプチドを薄膜の疎水性領域の構成要素に用いて、明確に構造を規定できる薄膜でベシクル構造を形成しているものを筆者らはリポソームに対して「ペプトソーム」と命名している^{12)~15)}。ペプトソームを形成するペプチドとしてはさま

ざまなバリエーションが可能であり、いくつかのペプチドの水分散液をクライオTEM(低温透過型顕微鏡)で観察することにより、ベシクル状に閉じたペプチド薄膜の観察にも成功している。

粒径100nmのペプトソームをラットの尾静脈から接種して血中滞留性を評価したところ、ドキシソルビシン塩酸塩をPEG化リポソームに内包した抗悪性腫瘍剤「ドキシル_®」と同じく、半減期が22時間(ドキシル_®は26時間)と長いことが示された。このことは、ペプトソームの物理的安定性、体内でのステルス性を意味するものであり、ポリサルコシンはPEGに代わって同等の機能を果たすことが示唆された。

ペプトソームのがん組織への集積を調べるため、ペプトソームを近赤外プローブでラベル化し、担がんマウスに適用して蛍光イメージを観察した。この担がんマウスではがん組織においてルシフェラーゼが分泌されており、ルシフェリンの発光を観察することでがん組織を検出できる。これにより、外的所見からは形態学的にがんを検知することが困難な初期の状態において、分子イメージング材料の能力を評価できる。図3に見られるように、ペプトソームを接種して2日後に、ペプトソームのがん組織に集積していることが確認できた。ペプトソームをイメージングプローブのキャリアに用いることで、がん組織がまだ小さい段階での検出が可能であったことは、EPR効果による分子イメージングの有用性を意味するものであり、今後、MRI造影剤を内包したペプトソームのMRIへの応用が期待される。

ペプトソームはリポソームと同様に、疎水性化合物、親水

性化合物の両者を薄膜の疎水性領域と内水相にそれぞれ取り込むことができる。リポソームに比べて高分子であるため物理的安定性に優れ、またペプチドであることから化学修飾が容易であり、ターゲティングの機能賦与ができる。一方、ブロックポリペプチドの疎水性領域を構成するアミノ酸には天然アミノ酸だけでなく官能基を導入した人工アミノ酸も利用できてバリエーションが豊富であり、安定性を調節することができると思われる。

ここで紹介したエステル基を側鎖にもつアミノ酸ユニットは、体内にてエステラーゼによる加水分解を受けてベシクル構造が壊れることで、内包物の放出を狙ったものである。さまざまな分子設計が、生体親和性が高いと予想されるポリペプチドで可能となることから、ペプトソームは生体系での多機能性ナノキャリアとして今後の展開が期待される。

謝 辞

ペプトソームを用いた分子イメージングの成果は、独立行政法人科学

技術振興機構(文部科学省所管)から指定を受けた地域結集型共同研究事業の一部として実施された研究に基づくものである。

参考文献

1) 藤林靖久, 日本臨床, **65**, 199 (2007). 2) 特集「分子イメージング最前線」, 化学, **61** (11), 12 (2006). 3) H. Ringsdorf, *J. Polymer Sci. Symposium*, **51**, 135 (1975). 4) V. M. Kriwaczek, A. N. Eberle, M. Muller, R. Schwyzer, *Helv. Chim. Acta.*, **61**, 1232 (1978). 5) Y. Sasaki-Yagi, S. Kimura, H. Ueda, Y. Imanishi, *Int. J. Peptide. Protein Res.*, **43**, 219 (1994). 6) S. Tetsui, J. Zhao, S. Kimura, Y. Imanishi, *ibid.*, **48**, 95 (1996). 7) J. Zhao, S. Kimura, Y. Imanishi, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1282**, 249 (1996). 8) S. Kimura, Y. Imanishi, *Vitamins and Hormones*, **59**, 133 (2000). 9) A. L. Klivanov, K. Maruyama, V. P. Torchilin, L. Huang, *FEBS Lett.*, **268**, 235 (1990). 10) Y. Arima, Dissertation for Doctor degree (2007). 11) S. M. Moghimi, J. Szebeni, *Prog. Lipid Res.*, **42**, 463 (2003). 12) K. Fujita, S. Kimura, Y. Imanishi, *Langmuir*, **15**, 4377 (1999). 13) S. Kimura, D. H. Kim, J. Sugiyama, Y. Imanishi, *ibid.*, **15**, 4461 (1999). 14) S. Kimura, Y. Muraji, J. Sugiyama, K. Fujita, Y. Imanishi, *J. Colloid and Interface Sci.*, **222**, 265 (2000). 15) H. Nishikawa, T. Morita, J. Sugiyama, S. Kimura, *ibid.*, **280**, 506 (2004).

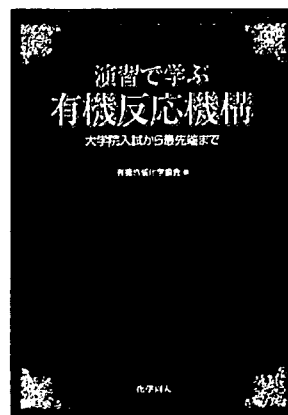
演習で学ぶ有機反応機構

大学院入試から最先端まで

有機合成化学協会 編・B5判・280頁・定価 3990円(税込)

有機合成の反応機構を学ぶ一番の方法は、電子の流れを忠実にたどることによって、種々の反応を統一的に理解することである。真の反応機構は何かと悩むよりも、論理的に反応機構を考えられるようになることが重要である。本書は、この有機電子論を基本的な考え方として、初級(学部の教科書レベル)、中級(大学院入試レベル)、上級(論文から精選した研究者レベル)の問題をバランスよくまとめた好個の演習書である。精選された問題を一つ一つ解くことによって、大学4年生から大学院生、さらには現場の研究者まで有機合成の実力が身につく。大学院入試にも役立つ。電子の流れと、丁寧な解説のついた解答もこの本の大きな特徴である。

- ◎問題編 初級(78問)、中級(128問)、上級(109問)
- ◎解答編 初級、中級、上級
- ◎付 録 有機反応の反応機構を考えるために 電気陰性度と酸性度定数
- ◎和文索引と欧文索引



化学同人

〈総説〉

HIF-1を利用した腫瘍内低酸素がん細胞のイメージング

京都大学医学研究科・放射線腫瘍学・画像応用治療学
近藤科江*、平岡真寛

1. はじめに

固形腫瘍内部には慢性的な低酸素状態にあるがん細胞（低酸素がん細胞）が存在する。低酸素がん細胞は、治療不良の原因・再発の温床となっていることが示唆されてから半世紀以上が経過しているが、未だに根本的な解決に至っていない。1992年にHIF-1が低酸素応答転写因子として報告されて以来、低酸素がん細胞の研究は加速度的に進み、HIF-1により低酸素がん細胞内で発現が誘導される様々な遺伝子の機能が、腫瘍全体の悪性化に深く関与することが分かってきた。従って、固形腫瘍内の低酸素がん細胞が、がん治療とくに難治性のがんにおいて、極めて重要な治療対象であり、抗がん効果を高め、再発・悪性化を予防するためには、固形腫瘍内の低酸素分画の情報を得、的確な治療を行うことが非常に重要であると考えられる。我々は、HIF-1活性をイメージングすることで、がんの悪性化を診断するためのプローブの開発を行っている。

2. がんの微小環境とHIF-1

固形腫瘍内部には正常組織とは全く異なった微細環境が存在する（図1）。がん由来組織や細胞の種類により多少の差はあるものの、がんの微細環境は、正常組織には存在しない異常な低酸素・低pH・低グルコースに特徴づけられる(1-3)。それは、腫瘍細胞の無秩序な増殖と血管新生との不均衡や未熟な血管構造によって、血管からの栄養や酸素が十分に供給されない領域が固形腫瘍内に生ずるためである。低酸素領域の物理的な要因で、低酸素がん細胞は、がん治療に対して抵抗性である(1-4)。血流によって運ばれる抗がん剤は、血管から遠い低酸素がん細胞までは効率よく運ばれないため、低酸素がん細胞において有効な濃度に達する機会が少ない。また、多くの抗がん剤は、分裂している細胞を標的にしているため、増殖を停止している低酸素がん細胞では有効に作用しない。更に、酸素分子により細胞障害性が増強される放射線やある種の抗がん剤では、その治療効果が十分に発揮されない。従って、放射線や抗がん剤治療の後に、周辺の活

*〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54

TEL:075-751-4242 FAX:075-751-4242 e-mail:skondoh@kuhp.kyoto-u.ac.jp

キーワード：HIF-1、低酸素、がん微小環境、光イメージング、バイオプローブ

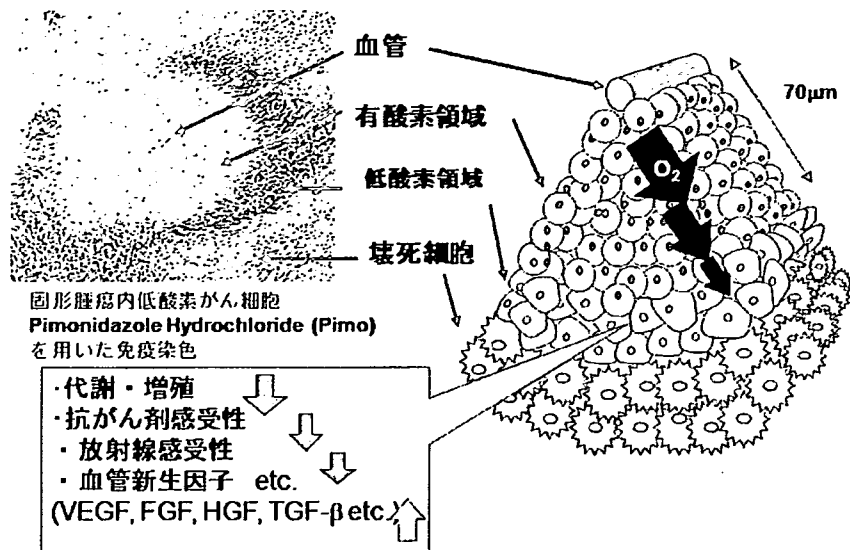


図1 がんの微小環境

腫瘍切片を低酸素マーカー (Pimonidazole) を用いて免疫染色すると、低酸素領域は、血管から100µm程度離れた領域に、壊死領域を取り囲むように帯状に存在することがわかる (左上図)。低酸素がん細胞は、抗がん剤が崩れにくい上に増殖が抑えられているため薬剤耐性であり、放射線にも抵抗性である。また、低酸素がん細胞で活性化されるHIF-1により誘導される遺伝子の機能により、腫瘍の増殖・悪性化に貢献している。

発に分裂していたがん細胞が死滅しても、低酸素がん細胞は生き残る場合があり、治療不良・再発の原因となることが示唆されている。一方で、低酸素領域にある細胞は、生物学的な要因で、がんの悪性化に貢献している。低酸素領域にある細胞は、栄養や酸素が不足しているため、増殖を停止したり、解糖系代謝を行ったりして、周辺で活発に増殖している有酸素状態のがん細胞に比べると「死ぬべき運命にある弱ったがん細胞」である。しかしながら、この「死ぬべき運命にある弱ったがん細胞」が、実は固形腫瘍全体の悪性度を高めている極めて「悪質ながん細胞集団」であることが最近の研究から分かってきたのである。これらのがん細胞 (低酸素がん細胞) は、「瀕死状態」ではあるが、その劣悪な環境に適応しようと努力している。その努力の一翼を担っているのが低酸素応答転写因子として単離されたHIF-1である (5)。通常の酸素濃度にある細胞内では活性が認められないHIF-1は、低酸素条件下で速やかに活性化され、糖代謝や糖輸送に関与する遺伝子の発現を誘導したり、血管新生因子や増殖因子を産生したりして、栄養環境の改善を図る。アポトーシスの回避や、遺伝子変異を誘導する遺伝子の発現を誘導して、死を免れようとする。その一方で、転移や浸潤に関わる遺伝子の発現を誘導して、自ら新天地を切り開こうとする。このような一連の「生き残り」のための行動が、実はがん全体の悪性化に繋がっていたのである。

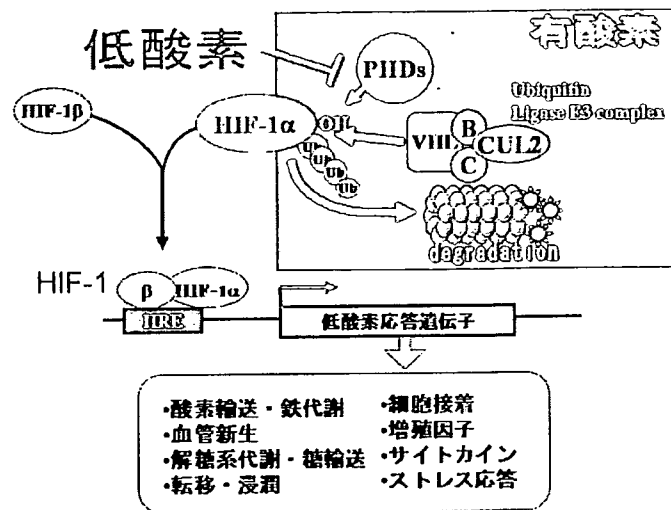


図2 HIF-1転写活性とHIF-1 α の酸素依存的分解機構

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、下図で示したようながんの悪性化や解糖系代謝にかかわる様々な機能を持った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（PHDs）によりODDドメインのプロリン残基が水酸化され、それを狙ってユビキチン付加酵素E3複合体がVHLを介して結合し、HIF-1 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。

HIF-1によって直接発現が誘導される遺伝子の同定が盛んに行われ、現在までに既に60以上が報告されている(4)。これらの遺伝子は、プロモーター、エンハンサー領域にHIF-1結合配列hypoxia responsive element(HRE)を持っており(図2)、HIF-1がp300/CBPとユニットを作ってHREに結合し転写を促す。

3. HIF-1 α の酸素依存的タンパク質分解機構

HIF-1は、 α β の2つのサブユニットからなる(図2)。 β サブユニット(HIF-1 β)は恒常的に発現しているが、 α サブユニット(HIF-1 α)の発現量は翻訳後修飾と翻訳レベルで厳密に制御されている(6, 7)。従ってHIF-1の活性はHIF-1 β に結合できるHIF-1 α の発現量に依存している。HIF-1 α の翻訳後修飾による制御は、酸素依存的なプロリン水酸化酵素(PDHs)により主になされている。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(Oxygen-dependent degradation: 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～PHD3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(7)。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ソ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。

4. 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。つまり、低酸素が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、ODD機能を保持した最小のアミノ酸配列を決定するために、様々な長さのODDペプチドに β -galactosidaseを融合させ、 β -galactosidase活性の酸素濃度依存性を調べた。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を見出した(8)。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）を融合することにより、培養細胞を用いた実験でほぼ100%の細胞にODD融合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PTDを融合したタンパク質を腹腔内投与したマウスを用いた実験では、脳を含む全身の組織細胞内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(9)。そこで我々は、PTD-ODD- β -galactosidase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 -galactosidase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、腫瘍組織でも一部のみタンパク質と活性が確認できた(8)。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）にあり、腫瘍の一部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

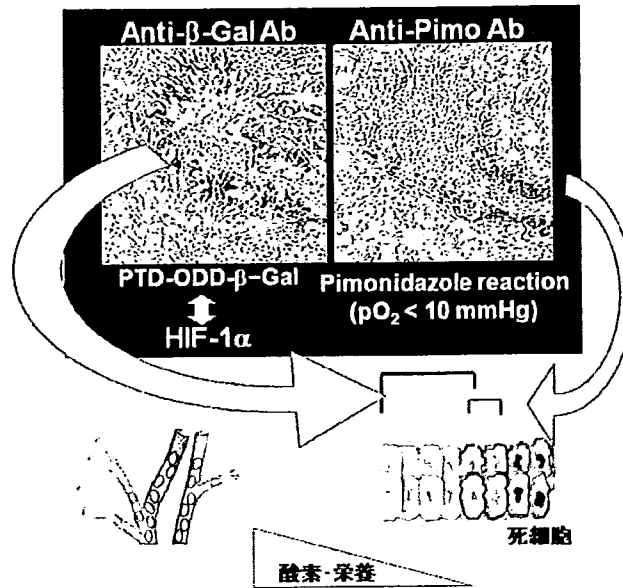


図3 ODD融合タンパク質の腫瘍内局在

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。染色パターンは似通っているものの、常にPTD-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、PTD-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が活性化する領域が必ずしも同一でないことを示唆している。実際に、多重染色すると、ピモニダゾールで染色されている低酸素領域よりもHIF-1が活性化している領域がやや血管に近い領域であることが報告されている。

と同一のところに、 β -galactosidaseタンパク質が存在していることがわかった(図3)。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依存的分解制御を受け、低酸素が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。

5. HIF-1活性細胞と低酸素

図3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HIF-1活性をもつ低酸素細胞は、Pimonidazoleなどのニトロイミダゾール化合物が還元反応を起こす10mmHg以下の細胞が存在する領域とは同一でない事が最近報告された(10)。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活性をもつ低酸素細胞」をイメージング・ターゲティングすることは意義がある。また、Pimonidazoleの様な化合物の機能が10mmHg以下というような絶対酸素濃度によりその機能が規定されているのに対し、HIF-1活性が確認できる酸素濃度は、細胞により異なる。そのことは、HIF-1活性が必要な酸素濃度、つまり「異常な酸素濃度」と細胞が感じる酸素濃度が組織細胞ごとに異なることを示している。例えば、肺の組織のように比較的高い酸素濃度に常にさらされている肺の細胞にとって「異常な酸素濃度」と感じる酸素濃度は比較的高く、そのような酸素下にあっても、骨髄のような常に低い酸素濃度に存在する細胞は、HIF-1活性を必要としない。このような組織細胞ごとの「異常な低酸素」を感度良く認知することは、絶対酸素濃度に応答する化合物では不可能であり、生体反応に応答できるバイオプローブが必要である。

6. 低酸素がん細胞のためのイメージングプローブの開発

HIF-1活性が、「異常な低酸素」のインディケータとして機能し、そのインディケータとしての機能が図2で示したHIF-1 α のODD制御に依存しているならば、HIF-1 α と同じODD制御を受けているPTD-ODD融合タンパク質は、「異常な低酸素」をイメージするバイオプローブとなりうる。上述したように、PTD-ODD- β -galactosidase融合タンパク質は、HIF-1 α が発現している低酸素細胞に共存しており、 β -galactosidaseの代わりにイメージング用の材料を付加することで、イメージング用バイオプローブになる。そこで、まずモデルタンパク質として、PTD-ODD-EGFPに近赤外蛍光色素Cy5.5をつけたプローブを試作した(12)。培養細胞を用いて、この試作品の膜透過性と酸素依存的分解制御について検討したところ、効率よく細胞膜を通過し、酸素依存的に安定性が制御されていることが確かめられた(図4 A B)。このバイオプローブは、がんマウスに投与すると、投与直後は全身にプローブがデリバリーされるが、有酸素状態にある細胞ではプローブは速やかに分解され、速やかにクリアランスされる。一方で、HIF-1活性を有する低酸素がん細胞ではプローブの蓄積が起これ、周囲の有酸素状態にある細胞とのコントラストで、HIF-1活性を有する低酸素がん細胞がイメージングできることになる(図4 C)。現在、この蓄積が低酸素がん細胞に局在しているか否かを免疫染色で確認している。また、非特異的に内臓に分布するイメージを無くす、または特異的分布と差別化することで、実用化に向けての研究を続けている。

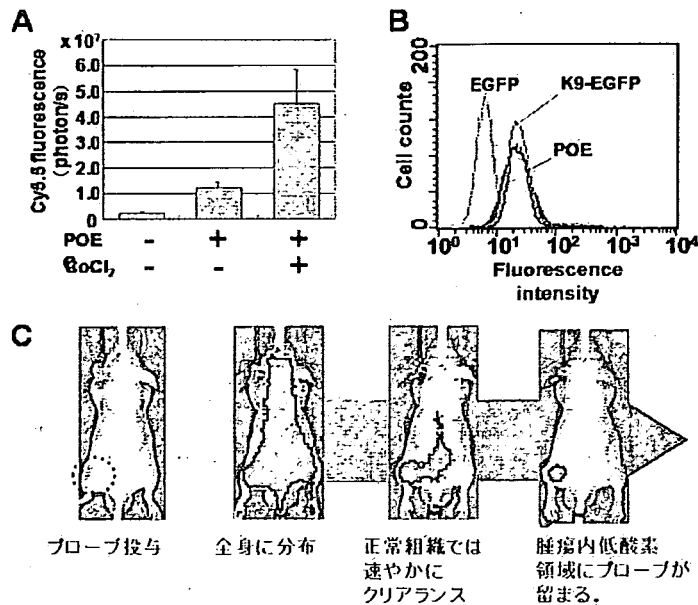


図4 バイオプローブとしてのPTD-ODD融合タンパク質
 A) 培養細胞をCoCl₂の存在下（疑似低酸素条件）と非存在下（有酸素条件）で培養し、培養液にPTD-ODD-EGFP-Cy5.5を添加してたんぱく質を取り込ませた後、細胞をトリブシン処理で回収し、Cy5.5の蛍光強度を測定したところ、CoCl₂の存在下で培養した細胞での蛍光の取り込みが有意に高いことがわかった。B) PTD-ODD-EGFP (POE)、ポリリジン (K9) を融合したEGFP (K9-EGFP)、EGFPのみを培養細胞に添加して30分後に、細胞をトリブシン処理で回収しFACSで取り込まれたEGFPの量をしらべたところ、POEの取り込みは、K9-EGFPと同等であり、POEの膜透過性がポリリジンと同程度に高いことがわかった。C) バイオプローブとしてのPTD-ODD融合タンパク質のイメージングプローブとしてのコンセプトは、投与直後に全身に速やかに分布し、有酸素細胞では分解を受け、速やかにクリアランスされる。一方で、HIF-1活性を有する低酸素がん細胞では、プローブは安定化して、プローブは留まりイメージングされる。

7. 低酸素がん細胞の光イメージングによる可視化

ターゲットであるHIF-1活性を有する低酸素がん細胞を生体レベルで可視化することで、実験するうえでのターゲットを明確にし、上記プローブの生体内局在とターゲットの位置を比較することができる。上述した低酸素特異的転写因子HIF-1が結合する塩基配列 HREを持つ低酸素応答プロモーター5 HREの下流にルシフェラーゼを繋いだレポーター遺伝子を組み込んだヒトがん細胞を樹立した（図5 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、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

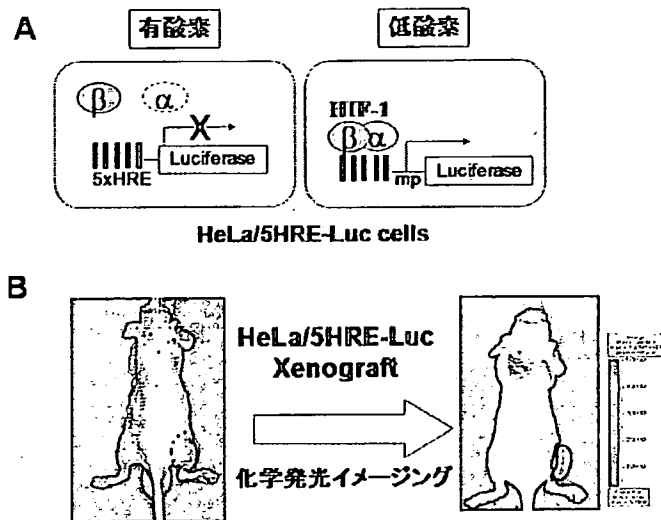


図5 移植腫瘍内低酸素がん細胞のイメージング

A) 図2で述べたHIF-1結合配列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) Aのがん細胞株をヌードマウスに移植し、腫瘍を形成した後、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを投与し、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。この右下に見えるシグナルは、低酸素がん細胞で発現しているルシフェラーゼからの発光であり、したがって、イメージは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。

imaging system (IVIS)を用いて可視化することができる (図5 B)。このシステムを用いることにより、上記イメージングプローブの分布が、HIF-1活性を有する低酸素がん細胞に一致するか否かをリアルタイムで、また、最終的にex vivoで確認できる。また、このシステムは、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を可能にしてくれる (13)。たとえば、ヒト由来のすい臓がん細胞SUIT-2に5 HRE-Luciferaseレポーター遺伝子を組み込んだSUIT-2/5HRE細胞を構築し、膵臓に同所移植すると、移植後7週間までに、移植されたマウスは腹膜播腫と腹水を伴って100%死亡する。その間、外部からは、がんの増殖を観察することは不可能だが、このシステムを用いると、膵臓に移植したがんのHIF-1活性を有する低酸素細胞が増殖し、転移し、腹部に広がっていく様子を、経時的に観察することができる (図6)。これまでの経時的に解剖して観察する方法に比べて、データの信頼性も高く、マウスにも優しく、経済的にも優れている。

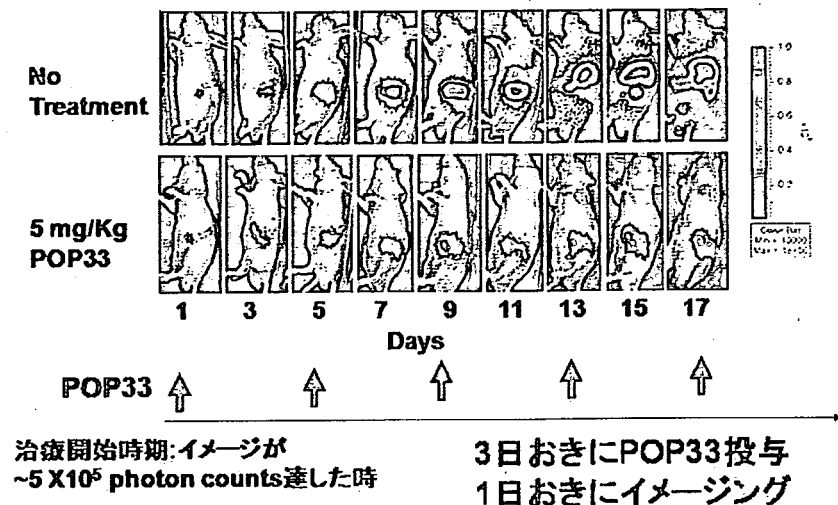


図6 低酸素がん特異的抗がん蛋白製剤によるすい臓がん転移抑制

図5 Aと同様のレポーター遺伝子を組み込んだヒトすい臓がん細胞株SUIT-2をヌードマウスの膵臓に同所移植すると、上パネルのように、膵臓から徐々に周囲、更に腹部全体にがんが広がり、腹水が溜まり死亡するという臨床に近いすい臓がんモデルにおいて、低酸素がん細胞のイメージを観察することができた。このモデルで、低酸素特異的な抗がん作用を示すPTD-ODD融合タンパク質製剤POP33の投与実験を行うと（下パネル）、低酸素がん細胞の転移が抑えられ、すい臓に局在し続けることが確認できた。

8. おわりに

がんの微小環境は、がん研究においてその重要性は認識されていたものの、長い間研究の糸口がみつからない状態が続いていた。HIF-1の発見をうけて、ようやく分子レベルの解明が本格的に始まり、現在世界的な規模で加速度的に研究が進んでいる。本章で紹介した低酸素の可視化や攻略法もHIF-1の機能を応用した先駆的研究である。現在PTD-ODD融合タンパク質を用いたプロジェクト（図7）は、1）上記の低酸素イメージング用プローブ開発の他に、2）低酸素がん細胞をターゲットとした抗がん剤の開発（3, 8, 13-15）、3）虚血性疾患における低酸素細胞の細胞死抑制剤開発を行っている。PTD-ODD融合タンパク質を用いたイメージングのためのプローブ開発は、臨床応用を目指して、現在光イメージングでプローブの特異性や体内動態評価をおこなっている。このプロジェクトの対象疾患は、がん、心筋梗塞、脳梗塞といった日本の三大疾患を含んでおり、患者数は今後も増えていくことが予想される。一日も早く臨床に応用できる診断薬を開発することで、治療に貢献したい。

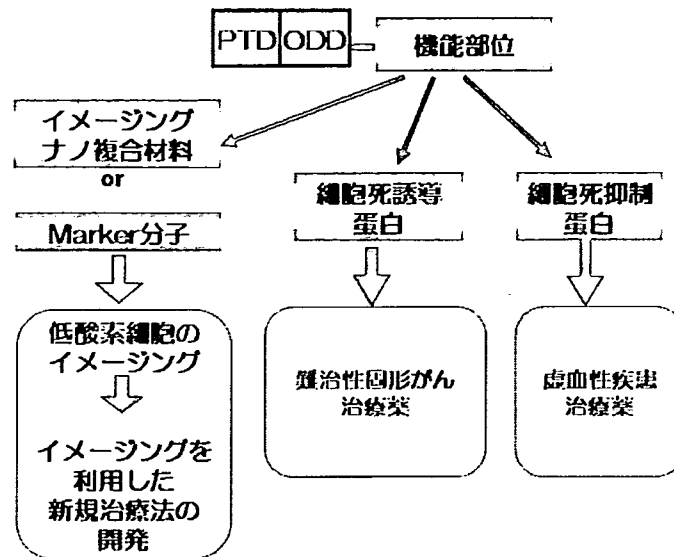


図7 PTD-ODDプロジェクト

PTD-ODD融合タンパク質は、機能ドメインに付加した機能を低酸素環境にある細胞で発揮し、有酸素環境にある細胞では機能しない。現在進めているプロジェクトでは、イメージング機能を付加して低酸素環境にある細胞を可視化する診断薬開発（左）、細胞死誘導機能を付加してがんの微小環境にあるがん細胞を特異的に死滅させる抗がん剤開発（中央）、および細胞死抑制機能を付加して虚血性疾患の治療を行う虚血性疾患治療薬開発（右）の3つがある。いずれも動物実験では、有効な結果を得ており、現在臨床応用にむけての開発を進めている。

謝辞

本研究は、独立行政法人科学技術振興機構から指定を受けた地域結集型共同研究事業の一部として実施された研究の成果であり、本文に記載したデータの一部は財団法人京都高度技術研究所、地域結集共同事業共同研究員田中正太郎博士が行ったものである。

参考文献

1. Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*. 2: 38-47, 2002.
2. Brown JM and Wilson WR. Exploiting tumor hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 4: 437-447, 2004.
3. Kizaka-Kondoh S, Inoue M, Harada H, Hiraoka M. Tumor hypoxia: A target for selective cancer therapy. *Cancer Sci* 2003; 94: 1021-1028.
4. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 721-732, 2003.
5. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 12: 5447-5454, 1992.
6. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O' Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen 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* 107: 43-54, 2001.
7. Kallio PJ, Wilson WJ, O' Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 274: 6519-6525, 1999
8. 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: 2013-2018, 2002.
9. 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, 1569-1572, 1999.
10. Sobhanifar S, Aquino-Parsons C, Stanbridge EJ, Olive P. Reduced expression of hypoxia-inducible factor- α in perinecrotic regions of solid tumors. *Cancer Res*. 65: 7259-7266, 2005.
11. Harada H, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M. Mechanism of hypoxia-specific cytotoxicity of procaspase-3 fused with a VHL-mediated protein destruction motif of HIF-1 α containing Pro564. *FEBS Lett*. 580: 5718-5722, 2006.
12. Tanaka S, Kizaka-Kondoh S, Harada H, Hiraoka M. 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 6449: 64490Y1-64490Y8, 2007.

13. 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: 182-193, 2005.
14. 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: 713-720, 2004.
15. 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*. 13: 16-26, 2006.

低酸素イメージング・発光イメージング

近藤科江*
平岡真寛*

はじめに

生体光イメージングは、経済性、簡便性、安全性、迅速性、多様性の面で、他のモダリティよりも優位な点が多く、単なる実験用ツールとしてではなく、次世代の臨床用画像診断ツールとしても注目され始めている。実験レベルで使われている生体光イメージングでは、ルシフェラーゼを用いた化学発光と蛍光蛋白・蛍光試薬を用いた蛍光によるイメージングが用いられている。共に一長一短があるものの、組み合わせることで、同時に多くの情報を得ることができる。これまで細胞レベルで行われていた光イメージング研究の成果が、生体レベルで検証される段階にきている。また、臨床応用を目指すプローブの生体内評価スクリーニング系として、重要な位置を占めつつある。蛍光イメージングについては、別稿で詳細に述べられているので、本稿では、化学発光を用いた生体イメージングについての現在の知見と、癌の悪性度の情報を得るための、我々の低酸素イメージング研究を紹介したい。

I. 化学発光

エネルギーを電磁波によって与えられるとそれは蛍光や燐光と呼ばれる現象となるが、化学発光では、その多くは酸化反応によってエネルギーが与えられる。生体イメージングに汎用されている化学発光は、ルシフェラーゼという酵素を用いており、ATP (adenosine-5'-triphosphate) と Mg^{2+} により基質であるルシフェリンの酸化反応が起こる (図1)。ルシフェラーゼは、基質特異性を持ち、発光の光の波長 (色) は、ルシフェラーゼによって左右される (図1)。汎用されているホタルルシフェラーゼ firefly luciferase のほかに

*京都大学医学研究科放射線腫瘍学・画像応用治療学

も、クラゲ (*Aequorea*)、ウミシイタケ (*Renilla*)、サンゴ (*Tenilla*)、コメツキムシ (*Pyrophorus plagiophthalmus*)、バクテリア (*Vibrio fischeri*, *V. harveyi*) からルシフェラーゼ遺伝子が単離¹⁾されて研究用に開発されている。蛍光には及ばないものの、酵素や基質を変えることで、同時に複数のルシフェラーゼ反応による波長の違う光をイメージングに利用できるという多様性もある。ホタルルシフェラーゼの場合、化学反応によって得たエネルギーが光に変わるエネルギー変換効率が約90%に達することが報告されている²⁾。現在の発光ダイオードの約30%、電球の約10%、ろうそくの約4%などに比べて非常に効率がよく、究極の高効率発光装置としても注目を集めている。

II. 化学発光による生体イメージング

ルシフェラーゼのレポーターとしての有用性は、培養細胞を用いた発現誘導実験によって示されており、転写因子研究において頻用されてきた。小動物のイメージング機器が開発されて、ルシフェラーゼ活性を個体レベルで測定することが可能になり、培養細胞を用いていた実験が個体レベルで可能な時代になった。

化学発光は、①励起光照射が必要ない、そのため②内在性の蛍光物質の影響を受けない、③化学反応による発光であるため、基質を調整することで反応時間 (発光時間) を調整することが可能、という蛍光にはない利点を有している。一方で、④基質を投与する必要がある、観察する目的の組織に一定量の基質が到達する条件の設定が、定量性に信頼を与えるうえで重要になる。⑤ルシフェラーゼは、蛋白であるため、目的の組織でルシフェラーゼ遺伝子を発現させる必要がある。具体的には、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定に保持する細胞 (または組織: 遺伝子改変動物の場合) を移植する。

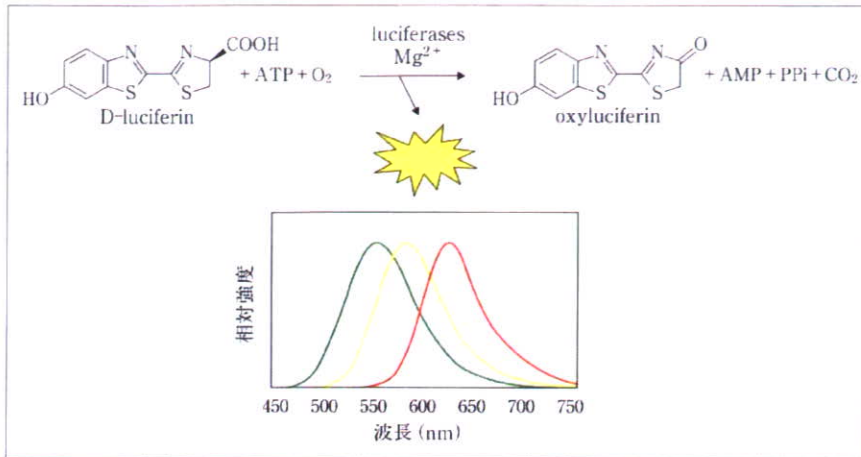


図1 化学発光イメージング ホタルルシフェラーゼは、D-ルシフェリンを基質として化学反応を起こすが、ルシフェラーゼを改変することにより、現在同じD-ルシフェリンを基質として、波長の異なる光を発することができる。

観察時には、麻酔器と超高感度冷却CCD (charge coupled device) カメラを備えたイメージング装置内で、基質との反応時に細胞から放出される微弱な光 (ルミネッセンス) を超高感度冷却CCDカメラによりとらえ、さらにソフトウェアによりデジタル処理して画像化する。従来の培養細胞を用いた実験同様、ルシフェラーゼレポーター遺伝子につなぐプロモーターを変えることで、レポーターを導入した細胞からさまざまな情報を得ることができる。1 cm を超える透過性をもつため、マウスでは、例えば深い組織内の腫瘍の大きさの推移を経時的に観察することができ、これまで経時的に解剖して評価せざるをえなかった同所移植モデルのように、外部からは観察が不可能な移植癌の研究に有効である。さらに、特定の遺伝子のプロモーターの下流にルシフェラーゼをつないだレポーター遺伝子を全身の体細胞にもつトランスジェニックマウスやラットを構築して、生体における特定の遺伝子が発現する時期や組織・量を調べることによって、発生・成長・老化における役割を解明したり、外的刺激応答・免疫応答等の宿主応答を調べたり、薬剤評価する研究も行われており、この手法による研究の飛躍的な発展が期待できる。

Ⅲ. 蛍光による生体イメージング

蛍光物質を用いたイメージングでは、蛍光物質の褪色や励起光の (立体的な対象物に対する) 照射効率といった不確定な要素が大きく、さらに自家蛍光などによるバックグラウンドがあり、現行の冷却型CCDカ

メラを用いたイメージング装置では、蛍光観察に定量性をもたせることは困難である。その一方で、ルシフェラーゼのように基質を必要とせず、測定時間も短く (数秒以内)、いつでも可視化できるという利点がある。現在、蛍光の褪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位置や大きさを三次元で画像化するソフトを搭載しているイメージング機器や、自家発光を波長の違いで画像処理し、バックグラウンドをほぼ完全に除いてイメージングする装置が開発されている。また、700 nm を超える近赤外領域に波長をもつ蛍光化合物も開発されており、将来的には多種多様にある蛍光を使い分けて、多重イメージングにより一細胞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。

癌細胞を画像化する方法としては、放射線同位元素を用いた positron-emission tomography/single photon emission computed tomography (PET/SPECT) や磁性体を用いた magnetic resonance imaging (MRI) 等の方法が主流であるが、少なくともマウスにおいては、光イメージングが簡便性と経済性において、PET/SPECT やMRI よりも優れており、これからプロープが多彩になっていくことにより、得られる情報量もPET/SPECT やMRI をしのぐものになると思われる。ただし、現状では、光プローブの透過性の問題は克服できず、臨床への応用は、体表面に近い組織 (眼、乳房、センチネルリンパ節など) や、術中観察に限定されると思われる。