

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

がんの超早期診断・治療のための高感度分子イメージングプローブの開発
に関する研究

平成17年度～19年度 総合研究報告書

主任研究者 佐治 英郎

平成20(2008)年 4月

目 次

I. 総合研究報告	
がんの超早期診断・治療のための高感度分子イメージングプローブの開発に関する研究	
佐治 英郎	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 27
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 35

がんの超早期診断・治療のための高感度分子イメージングプローブの開発に関する研究

主任研究者 佐治 英郎 京都大学薬学研究科 教授

研究要旨： がんの発生、転移の分子機構を標的として、病態生理学的観点と製剤学的観点の両面を統合したアプローチにより、微小がんを超高感度で検出する分子イメージングプローブの開発を計画し、①病態生理学的観点からがんの発生・転移・浸潤に密接に関わる分子としてHypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) を選択し、これを標的とする分子イメージングプローブの設計、②製剤学的な観点からプローブ内に複数の放射性同位元素 (RI) を導入するシグナル増幅法とプレターゲティング法の設計を行い、プローブの高感度化を目指した。

HIF-1存在領域を標的とする分子プローブの開発では、HIF-1分子内の酸素依存的分解に関与するペプチド (ODDドメイン) に種々の修飾を加えた融合タンパク質プローブ (PTD-CasS-ODD-SAV: PCOS) を開発し、通常酸素条件下で分解され、低酸素条件下で安定に存在することをインビトロ・インビボで確認した。また、RI標識ビオチン誘導体を開発し、その安定性およびPCOSとの結合性を確認した。そこでプレターゲティング法の検討を行ったところ、撮像時間の短縮とS/N比の改善に有効であることが明らかとなり、プレターゲティング法を利用することで、小動物用高解像度・高感度PET装置による投与早期からの腫瘍のインビボ核医学イメージングに実際に成功した。さらにPCOSの腫瘍内局在を詳細に検討したところ、低酸素マーカーであるピモニダゾールの局在する領域およびその近傍にPCOSが集積することを認めた。また、PCOS類似の酸素依存的分解タンパク質と蛍光色素を用いる光イメージングに対する検討もを行い、プレターゲティング法を用いることで、投与早期の時点で微小がんの光イメージングに成功した。

プローブの放出シグナル増強に関しては、 dendromerの表面アミノ基にビオチンやキレート部位などを複数導入する化学修飾を加え、さらにポジトロン標識 dendromerの開発を行った。その体内動態を検討したところ、血液クリアランスは速やかでイメージングの妨げにならないこと、腫瘍への集積性を有することが明らかとなった。また、イメージング用タンパク質・抗体との結合性を確認し、高感度化につながる技術を開発した。

これらの結果は、HIF-1存在領域を標的とする高感度分子イメージング法の実現を示すものであり、NEDO側を中心に開発する高解像力・高感度の近接撮像型フレキシブル分子イメージング装置と組み合わせることにより、がんの超早期診断・治療のための高感度分子イメージングが可能となりうる。

分担研究者：

久下 裕司 京都大学・准教授
(平成19年9月まで)
北海道大学・教授
(平成19年10月以降)
平岡 眞寛 京都大学・教授
近藤 科江 京都大学・特任助教授
福山 秀直 京都大学・教授
中本 裕士 京都大学・助教
村山 秀雄 放射線医学総合研究所
・チームリーダー

(株式会社島津製作所)：

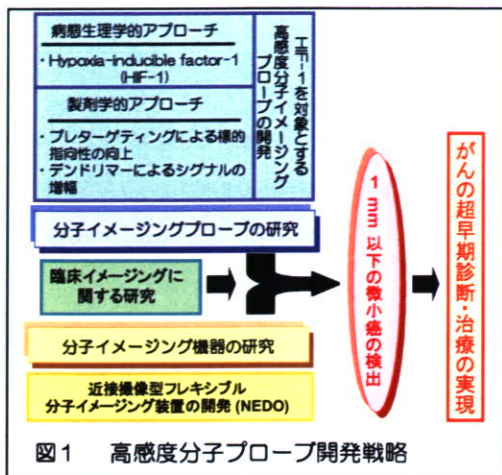
高野 純 部長
清水 公治 部長
小関 英一 主幹研究員
北村 圭司 主査
小田 一郎 主任研究員
天野 昌治 主任技師
渡部 勝憲 副参事
河野 理 主任
熊澤 良彦 主任研究員
大井 淳一 主任
戸波 寛道 主任
伏見 良治 主任
山原 亮 副主任
齊木 秀和 研究員
原 功 副主任
矢嶋 敦 研究員
樋爪 健太郎 研究員

A. 研究目的

微小がんをより早期に、高感度で特異的に検出することができれば、外科的手術・放射線等による治療の適応対象拡大や治療の最適化が可能となり、患者に優しいがん治療を実現するとともに、医療経済効果をあげることができる。しかし、現在の診断技術では、直径数mmあるいはそれ以下の微小がんの検出は困難である。

そこで、本研究では、がんの発生、転移の超早期から腫瘍細胞特異的に発生あるいは存在する分子をイメージングの標的とする病態生理学的観点と、標的に出来るだけ

多くの放射能を集積させる製剤学的観点との両面を統合したアプローチにより、微小がんを超高感度で検出しうる分子イメージングプローブの開発を行い、がんの超早期診断・治療に資することを計画した。さらに、本研究では、開発した分子プローブを、NEDO側を中心に開発する高解像力、高感度の近接撮像型フレキシブル分子イメージング装置と組み合わせることにより従来の100倍以上の感度を達成し、1 mm以下の腫瘍の検出、診断を可能とすることを目指す。



本研究の具体的な概要を図1に示す。病態生理学的観点から、微小環境因子として、がんの発生、転移の超早期から形成される低酸素環境に密接に関連する Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) を選択し、製剤学的観点から、プレターゲティング法による標的指向性の向上と、デンドリマーを用いてプローブ内に複数の放射性同位元素 (RI) を導入するシグナル増幅法による高感度化を試みる。

さらに、これらのプローブ開発研究に加え、微小がんの検出を目指して、臨床イメージングに関する研究、及び近接撮像型フレキシブル分子イメージング装置の開発に関する検討を行った。以下に、これらの研究成果の概要を述べる。

B. 研究方法

(I) 酸素依存的分解プローブPCOSの開発とプレターゲティング法の評価、インビボ核医学イメージングに関する研究

Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α)は、がんの発生、転移の超早期から形成される低酸素環境において、腫瘍の増殖や転移に

関与する様々な遺伝子の発現を増加させる分子で、低酸素状態では安定であるが、正常酸素領域では分解される。そこで、HIF-1 α と同様に酸素依存的分解を受ける化合物は、正常酸素領域では酸素依存的分解を受けるが低酸素部位では分解を受けず安定に滞留すると考えられることから、この化合物を分子プローブとして用いることにより、低酸素状態の検出を介して、発生、転移の超早期の微小がんのイメージングを行うことを計画した。

また、検出の感度を高めるために、まず、低酸素状態でのみ存在するHIF-1 α 様化合物を腫瘍部位に分布させるとともに、正常酸素領域である非標的部位で本化合物が分解された後、この化合物に特異的に結合する放射性化合物を投与することによって腫瘍をイメージングするという、プレターゲティング法を用いることとした。図2に本アプローチ法の概念を示した。

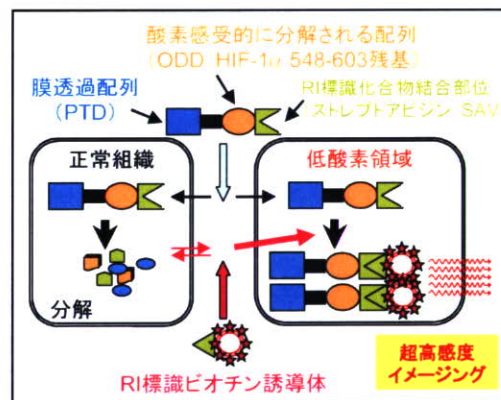


図2 プレターゲティング法によるHIF-1イメージングプローブの開発

その目的を達成するため、HIF-1分子内の酸素依存的分解に関与するペプチド (ODDドメイン) を母体とし、これに細胞膜透過性に有効な部位 (塩基性ペプチド配列部位; PTD) と放射性プローブ結合部位 (放射性ビオチンが結合できるストレプトアビ

ジン部位 ; SAV) を導入した融合タンパク質PTD-CasS-ODD-SAV (PCOS) とそれに結合するRI標識ビオチン誘導体を開発し、両者の性質、体内動態、プレターゲティング法、インビボ核医学イメージングに関する検討を行った。

(i) PTD-CasS-ODD-SAV (PCOS) の作製

pGEX-6P-3 ベクターに、PCOSのアミノ酸配列をコードするcDNAを挿入した。発現ベクターを大腸菌(BL21(DE3)pLysS)に導入後、Isopropyl-1-thio- β -D-galactosideで誘導することにより、Glutathione S-transferase (GST) 融合タンパク質として発現させた後、GSTを切断して、PCOSを作製した。

(ii) RI標識ビオチン誘導体の合成

ビオチン誘導体として、 ^{18}F FBBおよび ^{124}I IBBを設計した。 ^{124}I IBBに関しては、 ^{124}I の入手の問題から、イメージング研究では ^{123}I IBBを、基礎研究では ^{125}I IBBを使用した。どちらの化合物も安息香酸の活性エステル体を ^{18}F 、 ^{123}I あるいは ^{125}I で標識し、トリエチルアミン存在下 (pH 9)、ノルビオチナミンと反応させ、逆相HPLCにて精製することで得た。

(iii) PCOSとRI標識ビオチン誘導体との結合性評価

PCOSに ^{125}I IBBあるいは ^{18}F FBBを加え、 37°C で30分間インキュベートした後、サイズ排除HPLC及び限外ろ過法によって、結合率を算出した。

(iv) 培養細胞への取り込みの検討

12 well plateにMM1細胞を播種し、通常酸素条件下及び低酸素条件下で、18時間プレインキュベートした。 ^{125}I 標識PTD-CasS-

ODD-SAVを添加後、それぞれ同様の条件下でさらにインキュベートし、経時的に細胞に取り込まれた放射能を測定した。

プレターゲティング法の検討では、12 well plateにMM1細胞を播種し、通常酸素条件下及び低酸素条件下で、18時間プレインキュベートした。PCOSを添加後、それぞれ同様の条件下でさらにインキュベートし、24時間後に培地を除去し、 ^{125}I IBBを添加して1時間後細胞に取り込まれた放射能を測定した。

(v) PCOSの腫瘍集積性の検討

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

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

(vi) インビボプレターゲティングの検討

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

^{18}F FBBを用いた検討では、担がんマウスにPCOSあるいは溶媒のみを投与し、24

時間経過後に $[^{18}\text{F}]\text{FBB}$ を投与して、0.5、1、3、6時間後に屠殺、腫瘍を含む関心臓器に集積した放射能をガンマカウンタで測定し、PCOSの投与の有無による腫瘍集積性の違いについて検討した。

(vii) インビボ核医学イメージング

PCOS投与24時間後に $[^{18}\text{F}]\text{FBB}$ あるいは $[^{123}\text{I}]\text{IBB}$ を投与し、0.5、1、3、6時間後に($[^{123}\text{I}]\text{IBB}$ に関してはそれに加え、24時間後も追加) インビボ核医学イメージングを行った。

(viii) PCOS の腫瘍内局在の詳細検討

$[^{125}\text{I}]\text{IBB}$ と結合させたPCOSを投与後、低酸素マーカーであるピモニダゾールを投与したMDA-MB-231乳がん細胞移植マウスから腫瘍を摘出して20 μm 厚の切片を作製し、オートラジオグラムを得るとともに同一切片でピモニダゾールに対する免疫染色、HE染色を行った。

(II) PCOS の各ドメインの最適化に関する研究

(i) PTDに関する検討

HIF-1活性を有する細胞内で特異的に安定化するODD融合たんぱく質を、より効率よく血流の悪い腫瘍内の低酸素領域にも分布させることが出来る膜透過配列(PTD)の候補を決定するため、種々のPTDを設計・構築し、その比較を行った。PTDとしては正電荷を有することが重要であり、これまでにHIV Tatペプチドなどいくつかのものが報告されている。本研究では、酸素依存的分解に関与するユビキチン化酵素の標的となり、かつ正電荷を有するポリリジンを中心とする新規配列PTD3を設計し、その配列の有用性をTatペプチド由来のPTD1

と比較した。モデルたんぱく質として蛍光たんぱく質EGFPと融合させたPTD1-EGFP、PTD3-EGFPを作製し、HeLa細胞への取り込みをフローサイトメトリーによって評価した。また、動物実験で脳内輸送についても検討を行った。

(ii) ODDに関する検討

近年、Paltoglouらによって、HIF-1 α のアミノ酸配列中の532、538、547番目のリジン残基がユビキチン化されることが報告された(Oncogene. 2007; 26(4): 604-9.)。そこで、PTD3-ODD配列の酸素依存的分解のさらなる向上を目的として、547番目のリジン残基の位置にリジンが配置されるように、PTD3-ODDにスペーサーとしてGGKを挿入した新たな配列を設計し、EGFPとの融合たんぱく質を構築した。従来のPTD3-ODD-EGFPおよび新規のPTD3-ODD-GGK-EGFPをODDの分解を抑制する CoCl_2 存在下、細胞に1時間処置し、その後 CoCl_2 の存在下と非存在下で3時間インキュベートした時の細胞内の蛍光の変化をフローサイトメトリーによって評価した。

(III) 酸素依存的分解プローブを用いたインビボ光イメージングに関する研究

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

次に、融合たんぱく質を担がんマウスに前投与し、後からそれに結合する蛍光色素を投与するプレターゲティング法を利用するインビボ光イメージングの検討を行った。

(IV) 高感度分子プローブの開発

プローブ一分子中に多くの放射性同位元

素(RI)を導入することによって、イメージングの高感度化を目指した。すなわち、多数のRIを結合できるとともに、融合タンパク質と結合できるビオチン化デンドリマーを設計し、第6世代PAMAMデンドリマー(G6)を出発原料に、ビオチン化デンドリマーを得た。次いで、アビジンとの親和性を確認した後、デンドリマーにDTPA(金属キレート部位)を導入した。

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

最後に、デンドリマーをPETイメージングに展開するため、デンドリマーのポジトロン放出核種による標識、担がんマウスでの体内動態の検討、および、がん中存在する標的分子を認識する抗体とデンドリマーとの複合体の合成を行った。

(V) 臨床イメージングに関する研究

既存PETプローブに関する知見を得るため、がん患者を対象に臨床PETイメージングを行った。非侵襲的に腫瘍の増殖能を評価できることが期待されている¹⁸F標識フルオロチミジンを用いたFLT-PETを施行し、FLT-PETとFDG-PETで集積に乖離が見られた場合に、どちらが病態を正確に反映しているのかということ、原発巣およびリンパ節転移を対象に比較検討した。さらに、神経膠腫(グリオーマ)患者を対象に¹¹C]PK-11195によるPET撮像を行い、神経膠腫に浸潤するミクログリアに発現する末梢型ベンゾジアゼピン受容体を評価することで、神経膠腫の早期発見や炎症性疾患との鑑別が達成できるかどうか検討を行った。

それ以外の比較対照用プローブとして、低酸素イメージング剤である¹⁸F]FMISO、核酸合成イメージング剤である¹¹C]Thymidineおよび¹¹C]5FUの合成検討を行い、担がん動物でのイメージングの検討を行った。

さらにMRIを用いた研究では、頭頸部がん患者にFDG-PETを施行し、MR画像と融合させることで診断精度が向上するかどうかの検討を行い、また、PCOSを含め、これらのPET用プローブの比較検討の精度向上を目的として、¹⁸F]FDGのラット脳画像をモデルに選択し、個々の画像を解剖学的に標準化して同一の標準画像上で評価する方法の開発について基礎的に検討した。

(VI) 近接撮像型フレキシブル分子イメージング装置の開発に関する検討

高感度かつ高解像度を達成するためのPET装置用検出器を研究開発すると共に、分子イメージング画像の定量性を向上する測定法の開発を目的に、光分配方式のみによる4層DOI(Depth of interaction)検出器に関する検討を行った。

次に、これまでの4層から8層へと発展させ、結晶構造の異なる2つの検出器(LSL型とLLSS型)を試作して性能の比較を行った。

最後にDOI検出器に関して、低価格化の可能性を検討するため、2x2受光素子を用い、ライトガイドの代わりに薄い反射材を結晶と受光素子の間に挿入する方法を考案し、その評価を行った。

(倫理面への配慮)

臨床研究は、医学研究科・医の倫理委員会の承認を得て行った。被験者に研究内容を口頭及び文書、又は文書にて十分に説明

し、同意を得て、検査を施行した。

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

動物実験は事前に所属施設の動物実験委員会の承認を受け、当該施設の動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

(I) 酸素依存的分解プローブPCOSの開発とプレターゲティング法の評価、インビボ核医学イメージングに関する研究

(i) PTD-CasS-ODD-SAV (PCOS) の作製

GSTカラムおよびその後の透析により精製後、SDS-PAGE法で分析したところ、37 kDaの分子量マーカーの近傍にバンドが確認され、融合タンパク質PCOS (34 kDa) の生成が確認できた。

(ii) RI標識ビオチン誘導体の合成

[¹²⁵I]IBBを合成、精製した結果、放射化学的収率65%以上、放射化学的純度94%以上で得られた。同様に、[¹²³I]IBBは放射化学的収率29%、放射化学的純度95%以上で、[¹⁸F]FBBは放射化学的収率23%、放射化学的純度95%以上で得られた。

(iii) PCOSとRI標識ビオチン誘導体との結合性評価

作製したPCOSを、[¹²⁵I]IBBとインキュベートし、サイズ排除HPLCにて分析したところ、高分子量画分に放射能が見られたことから、[¹²⁵I]IBBがPCOSに結合することが示された。また、この結合はD-biotinの添加により濃度依存的に阻害された。

また、[¹⁸F]FBBをPCOSとインキュベートし、限外ろ過法により分析したところ、高

分子量画分に90%以上の放射能が認められた。この結合は過剰量のD-ビオチンの添加により20%以下に消失した。

(iv) 培養細胞への取り込みの検討

放射性ビオチン誘導体と結合させた融合タンパク質の培養細胞への集積・滞留は、低酸素条件下で通常酸素条件下よりも2倍高かった。また、あらかじめ融合タンパク質処置を行った後に放射性ビオチン誘導体を処置する、いわゆる、プレターゲティング条件下での培養細胞へのプローブ集積・滞留は、低酸素条件下で通常酸素条件下よりも5倍高かった。

(v) PCOSの腫瘍集積性の検討

まず[¹²⁵I]IBB単独の体内動態を検討したところ、[¹²⁵I]IBBは腸に高集積を示した。腫瘍へは集積せず、腫瘍/血液比も常に1未満であった。一方、[¹²⁵I]IBB-PCOSでは、投与6時間後で1.5 %ID/gと腫瘍への集積性が認められ、さらに投与24時間後で腫瘍/血液比は1.6となった。

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

(vi) インビボプレターゲティングの検討

PCOS 30 μgをプレターゲティングし、24時間後に[¹²⁵I]IBBを投与して、各臓器への放射能集積を調べた。その結果、[¹²⁵I]IBB投与6時間後の腫瘍への放射能集積は1.6 %ID/g、腫瘍/血液比は4.3であり、どちらの値もPCOS-[¹²⁵I]IBB投与24時間後の値と同等で

あった。また、 ^{125}I IBB投与24時間後では、腫瘍への放射能集積は0.6 %ID/gと減少したものの、腫瘍/血液比は13と顕著に増加した。

次に、PCOSを前投与していない担癌マウスに ^{18}F FBBを投与しその体内分布を調べたところ、 ^{18}F FBB投与3時間後で放射能の腫瘍集積量は0.34% ID/gとなり、腫瘍への特異的な集積は認められなかった。一方、PCOSを24時間前に前投与したマウスでは、 ^{18}F FBB投与3時間後で放射能の腫瘍集積量は4.9% ID/gとなり、腫瘍への顕著な放射能集積が認められた。また、PCOSを前投与したマウスに、ビオチン投与後、 ^{18}F FBBを投与した場合、腫瘍集積量は57%以上有意に抑制されたことから、生体内でも ^{18}F FBBはPCOSのストレプトアビジン部位に結合して集積していることが示された。

(vii) インビボ核医学イメージング

PCOSをプレターゲットティングしたマウスに対し、小動物用高解像度・高感度PET装置を用いてイメージングを行ったところ、 ^{18}F FBB投与3時間後で明瞭に腫瘍を描出することができた。同様に ^{123}I IBBを用いた検討でも、 ^{123}I IBB投与6時間後で腫瘍の描出に成功した。腫瘍および反対側の肢に関心領域を設定して放射能の集積量を測定したところ、両化合物とも、反対側の肢に比べて腫瘍に2倍以上高い集積を認めた。

(viii) PCOS の腫瘍内局在の詳細検討

^{125}I IBB-PCOSの集積と低酸素マーカーの局在を組織学的に検討したところ、ピモニダゾール染色の認められる領域、すなわち低酸素領域の近傍に放射能集積が認められた。また、HE染色の結果と比較したところ、ネクロシス領域にはPCOSの集積は認

められなかった。

(II) PCOS の各ドメインの最適化に関する研究

(i) PTDに関する検討

PTD1-EGFPを細胞に処置したところ、未処置の細胞に比べて細胞内の蛍光は4倍に増加した。さらにPTD3-EGFPでは8倍に増加し、PTD3の方が細胞内移行性が高いことが示された。またPTDのついていないEGFPを処置した時には、細胞内の蛍光は未処置細胞と差が見られなかった。

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

また、このPTDを使った融合たんぱく質をマウスに投与したところ、効率よく血管脳関門を通過し、脳にまでデリバリーされることを見いだした。

(ii) ODDに関する検討

ODDの分解を抑制する CoCl_2 存在下、細胞に融合タンパク質を1時間処置し、その後3時間を CoCl_2 の存在下と非存在下で培養して、細胞内の蛍光を測定することにより、ODDの分解を比較した。GGKを挿入してHIF-1 α の547残基目に相当する位置にリジンを組み込んだPTD3-ODD-GGK-EGFPでは、 CoCl_2 存在下と比較して、非存在下で有意な蛍光の減少が認められ、所期の通り、PTD3-ODD-EGFPよりも分解速度が速まった結果が示された。

(Ⅲ) 酸素依存的分解プローブを用いたインビボ光イメージングに関する研究

酸素依存的分解タンパク質に蛍光色素を結合させたプローブを担がんマウスに投与し、IVISでイメージングを行ったところ、プローブ投与1時間後ではマウス体内全体に蛍光が分布していたが、正常組織の蛍光は時間とともに消失し、投与1日後では腫瘍でのみ選択的に蛍光が観察された。

さらに、改良を加えた融合タンパク質を用いてプレターゲティング法を行ったところ、融合タンパク質を投与して1時間後に蛍光色素を投与し、その2時間後に腫瘍への特異的な色素集積が認められた。

(Ⅳ) 高感度分子プローブの開発

デンドリマーのビオチン化(1.2 ± 0.2 個)、及び金属キレート部位(178 ± 9 個)の導入に成功した。また、導入したビオチンはアビジンとの親和性を保持していた。

次に、キレート部位に金属RIである ^{111}In を導入して体内動態の検討を行った。 ^{111}In 標識デンドリマーは、肝臓、脾臓に対してやや高く集積したものの、血中放射能は投与3時間後には $0.1\% \text{ID/g}$ 以下となり、血液クリアランスが非常に速やかであることが明らかとなった。

さらに、ポジトロン放出核種である ^{18}F による標識を行い、 ^{18}F 標識デンドリマーを放射化学的収率87%で得た。担がんマウスにおいて ^{18}F 標識デンドリマーは血中から速やかに消失し、腫瘍へ高く集積したことから、イメージングの指標となる腫瘍血液比は45と高い値を示した。また、サイズ排除クロマトグラフィー法およびSDS-PAGE法により、抗体デンドリマー複合体の生成が確認できた。

(Ⅴ) 臨床イメージングに関する研究

がん患者にFLT-PETおよびFDG-PETを施行したところ、FLT-PETの方がコントラスト良く腫瘍を描出可能で、腫瘍内の集積の不均一性もより明瞭であったものの、原発性脳腫瘍の悪性度診断能においては両者の間に大きな差異を認めなかった。一方、リンパ節転移に関する感度はFLT-PETが47%、FDG-PETが53%であり、FLTとFDGの集積に乖離が見られた4病変のうち、3病変はFDG-PETが正診していた。さらに $^{[11\text{C}]}\text{PK-11195}$ を用いた神経膠腫患者のPET撮像および理組織検査により、神経膠腫組織に集積するミクログリアにおいて、末梢型ベンゾジアゼピン受容体がほとんど発現していないことを見出した。

比較対照用のプローブとして標識検討を行った3種類のプローブに関しては、標識法を確立し、安定供給に成功した。その中から、担がんラットに $^{[18\text{F}]}\text{FMISO}$ を投与して体内分布を検討したところ、腎臓、肝臓のほか、脳、腫瘍に比較的高い集積を示し、かつ腫瘍内の分布は不均一であった。また、 $^{[18\text{F}]}\text{FMISO}$ の腫瘍集積は腫瘍重量の増大とともに増加した。

さらに、MR画像にPET画像を融合させることの臨床的意義について検討を行ったところ、術前病期診断では、MR画像のみの場合とMR+PET融合画像の場合で診断に差は認められなかった。一方、再発診断については、MR単独では感度67%であったが、融合画像診断では92%で、8病変は融合画像によってのみ再発病変を指摘できた。また、解剖学的標準化の検討では、まず同一ラットの $^{[18\text{F}]}\text{FDG}$ PET画像とT2 MRI画像を重ね合わせた後、MRI画像をPaxios space に標準化されたラット脳テンプレートにnon rigid にて標準化し、得られたパラメーター

を用いて ^{18}F FDG PET画像の標準化を行ったところ、細部にいたるまでの重ね合わせが可能となった。

(VI) 近接撮像型フレキシブル分子イメージング装置の開発に関する検討

光分配方式のみによる4層DOI方式が成功し、一種類のシンチレータ素子で4層DOI検出器が構成できるようになった。また、2つの受光素子に跨るシンチレータについて基礎研究を行い、2層DOIが可能であることを示した。これにより、8層DOI方式が可能であることを基礎的に実証した。

次に8層DOIとして、LSLS型とLLSS型の検出器を比較したところ、光電ピークの相対値とエネルギー分解能については、LSLS型とLLSS型で大きな相違はなく、エネルギー分解能は全層でほぼ均一であった。しかしながら、LLSS型での2Dポジションヒストグラムにおける端の結晶識別の悪さが検出器全体の性能に最も寄与すると考えられるため、その改善方法が見つからない限りはLSLS型の方が有効であると考えられた。

最後に、薄い反射材を結晶と受光素子の間に挿入することにより、確立された技術であるライトガイドを用いなくてもそれと同様の光分配制御が可能であることを実証した。

D. 考察

(I) 酸素依存的分解プローブPCOSの開発とプレターゲット法の評価、インビボ核医学イメージングに関する研究

作製した融合タンパク質PCOSを ^{125}I IBBあるいは ^{18}F FBBとインキュベートし、サイズ排除クロマトグラフィー法に

て分析したところ、高分子量画分に放射能が見られたことから、 ^{125}I IBBあるいは ^{18}F FBBがPCOSに結合することが示された。また、この結合はD-biotinの添加により濃度依存的に阻害された。したがって、 ^{125}I IBBあるいは ^{18}F FBBが融合タンパク質のSAVドメインと結合していることが示された。

がん細胞にHRE-Luciferaseを導入した細胞を各酸素条件で培養したところ、低酸素条件下、通常酸素条件と比較して20倍以上の発光を示したことから、低酸素条件下でのHIF-1の発現が確認できた。同様の条件で ^{125}I IBB-PCOSを添加後、24時間後の細胞内における放射性化合物の集積を検討した結果、低酸素条件下で通常酸素条件と比較して2倍以上の放射能の集積が見られた。このことから、本融合タンパク質の低酸素条件下での安定化が示唆された。さらに、プレターゲット条件下での培養細胞へのプローブ集積・滞留は、低酸素条件下で通常酸素条件下よりも5倍高く、プレターゲット法の有用性が示された。これらインビトロにおける研究成果は、HIF-1分子内の低酸素依存的分解に関与するペプチド(ODDドメイン)を母体とする分子プローブ設計法の妥当性を示すとともに、本分子プローブを用いることにより、HIF-1が存在する低酸素状態の腫瘍をイメージングできる可能性を示すものである。

そこでインビボで検討を行った。まず ^{125}I IBB単独の体内動態を検討したところ、 ^{125}I IBBは腸に高集積を示し、腫瘍へは集積しなかった。一方、 ^{125}I IBB-PCOSでは、投与6時間後で1.5 %ID/gと腫瘍への集積性が認められ、さらに投与24時間後で腫瘍/血液比は1.6となった。PCOSに腫瘍移行性が認められたことから、インビボでプレ

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

次に、実際にインビボ核医学イメージングを行った。PCOSを担がんマウスに前投与し、24時間後に $[^{18}\text{F}]\text{FBB}$ および $[^{123}\text{I}]\text{IBB}$ を投与してイメージングを行ったところ、両化合物とも投与早期から腫瘍へ集積し、高コントラストでイメージングが可能であった。 $[^{123}\text{I}]\text{IBB}$ よりも $[^{18}\text{F}]\text{FBB}$ の方がより投与早期でのイメージングが可能であったが、これはヨウ素よりもフッ素の方が脂溶性が低いため、非標的臓器からのクリアランスが早かったためと考えられた。これらの結果から、撮像時間の短縮・コントラストの向上が可能となるプレターゲティング法が、イメージングにおいても有効であることが確認できた。また、PCOS投与後にビオチンを投与してから $[^{18}\text{F}]\text{FBB}$ を投与したところ、腫瘍への放射能集積が有意に抑制されたことから、インビボにおいてもPCOSとの結合性が確認でき、これらの放射能集積がPCOSの分布を反映したものであることが明らかとなった。

PCOSの腫瘍集積性が確認でき、イメージ

ングにも成功したため、その局在が低酸素領域に一致するかどうか検討を行った。低酸素マーカーとしてピモニダゾールを選択し、免疫染色法で検出したピモニダゾールのシグナルとPCOSの放射能集積を比較したところ、ピモニダゾールシグナルの近傍に放射能集積が認められた。ピモニダゾールとHIF-1の局在を比較した文献では、両者は完全には一致せず、HIF-1はピモニダゾールポジティブな領域を含むより広範な部位で存在が確認されている。今回、放射能集積はピモニダゾールポジティブ領域とその近傍で認められたことから、PCOSが所期の通りHIF-1存在領域に集積したことが示唆された。

(II) PCOS の各ドメインの最適化に関する研究

PTDに関する検討では、Tatペプチド由来のPTD1よりもポリリジンを主体とするPTD3の方が透過能が高く、またそれが飽和しにくいことが示され、PTD3の有用性が明らかとなった。PTD1はカチオン性ペプチドであるが、PTD3はポリリジンに由来するカチオン部とトリプトファンなどに由来する疎水部からなるペプチドで、両親媒性である。他の両親媒性PTDに関して、疎水部が細胞膜と相互作用してリン脂質の間隙を広げることで細胞内への移行率が増加するメカニズムが報告されたことから、PTD3に関してもカチオン部と細胞膜上のヘパラン硫酸などとの結合以外に、疎水部と細胞膜との相互作用があり、結果的にPTD1よりも細胞内移行性が高まった可能性が考えられた。

さらに、ODDに関する検討では、GGK配列を挿入して作製したPTD3-ODD-GGK-EGFPでは、PTD3-ODD-EGFPよりも分解速度が速まった結果が示された。これは、

GGKを挿入することで、HIF-1 α の547残基目に相当する位置にリジンが組み込まれ、生体内での分解に関与するアミノ酸配列により近づいたためだと考えられた。

(III) 酸素依存的分解プローブを用いたインビボ光イメージングに関する研究

PCOSと同様、ODDを母体とし、酸素依存的に分解される融合タンパク質を蛍光色素で標識し、インビボ光イメージングを行ったところ、投与1日後で腫瘍の描出に成功した。この結果は、ODDを母体とするタンパク質が腫瘍低酸素領域で安定に存在している可能性を示す結果であり、検出器に応じてRIや蛍光といった標識分子を変えることで、マルチモダリティプローブとして高い汎用性に繋がる可能性が示された。さらに、融合タンパク質を担がんマウスに投与し、1時間後に蛍光色素を投与してインビボ光イメージングを行ったところ、蛍光色素投与2時間後で腫瘍の描出に成功した。この結果により、インビボ光イメージングにおいてもプレターゲティング法が有効であることが明らかとなった。

(IV) 高感度分子プローブの開発

高感度プローブの開発では、イメージングのために、体内でプローブタンパク質に結合する dendritic へのビオチン及びキレート部位の導入を試み、これに成功した。また、そのキレート部位にRIを導入して体内動態を検討したところ、RI標識 dendritic の血液クリアランスが非常に速やかであることを見出した。微小がんの超高感度イメージングにおいて、プローブの速やかな血液クリアランスは極めて重要な要件であり、本実験結果は、RI標識ビオチン化 dendritic による高感度化の可能性を示す

ものである。また、 dendritic のサイズ（世代数）を小さくすることで、肝臓、脾臓への非特異的集積の減少およびさらなる血液クリアランスの向上が期待できる。

さらにポジトロン放出核種¹⁸Fで標識した¹⁸F-dendritic の高収率合成に成功し、本標識体がEPR効果に由来すると考えられる腫瘍への高い集積を示すことを見出した。また、がん中存在する生体分子を認識する抗体との複合体の合成に成功したことから、本 dendritic 誘導体は微小がんの超高感度イメージング実現に向けて有効な手法を提供すると考えられた。

(V) 臨床イメージングに関する研究

臨床イメージングに関する研究ではFDG及びFLTの腫瘍描出能、および神経膠腫に対する新たな知見を得ることに成功した。さらに、MR画像にPET画像を融合させることにより、再発診断において病変の検出能が向上に寄与する可能性が考えられた。

また、PCOSの比較対照となる数種のイメージング用プローブの標識合成法を確立することができた。中でも¹⁸F]FMISOに関しては、腫瘍内の集積が不均一であり、低酸素領域イメージングのコントロールとして使用可能であると考えられた。

解剖学的標準化においては、¹⁸F]FDG PET画像をMRIテンプレート画像に直接重ね合わせる従来法に替わる手法として、同一個体のPET画像とMRI画像をまず重ね合わせた上で、MRI画像をそのテンプレートに標準化し、その時に得られたパラメータを用いてPET画像の標準化を行う新手法を提案し、本法の有用性を明らかにした。この手法を用いることで、プローブの集積部位の同定、集積の差の比較がより高精度に達成できると考えられた。

(VI) 近接撮像型フレキシブル分子イメージング装置の開発に関する検討

近接撮像型フレキシブル分子イメージング装置の開発ではNEDO側との協力で光分配方式のみによる4層DOI方式に成功し、さらにそれを8層に発展させ、それに適した結晶構造を検討した。8層DOI検出器の構造が検出器性能に及ぼす影響の分析結果は、今後の多層DOI検出器の開発指針に有益な情報を与えるものと考えられた。

また、反射材による光分配方式の実現可能性が実証された。この光分配の技術を用いることで、ライトガイドによる光の損失を改善できるため、位置、エネルギー、時間特性の向上が期待できる。さらにライトガイドが不要となるため、低価格な検出器の実現につながる有益な研究成果である。

これらの結果は、高感度分子プローブの開発における有用な基礎的情報を提供するとともに、プローブと装置の組み合わせによる腫瘍の高感度検出のための基盤的技術となる。

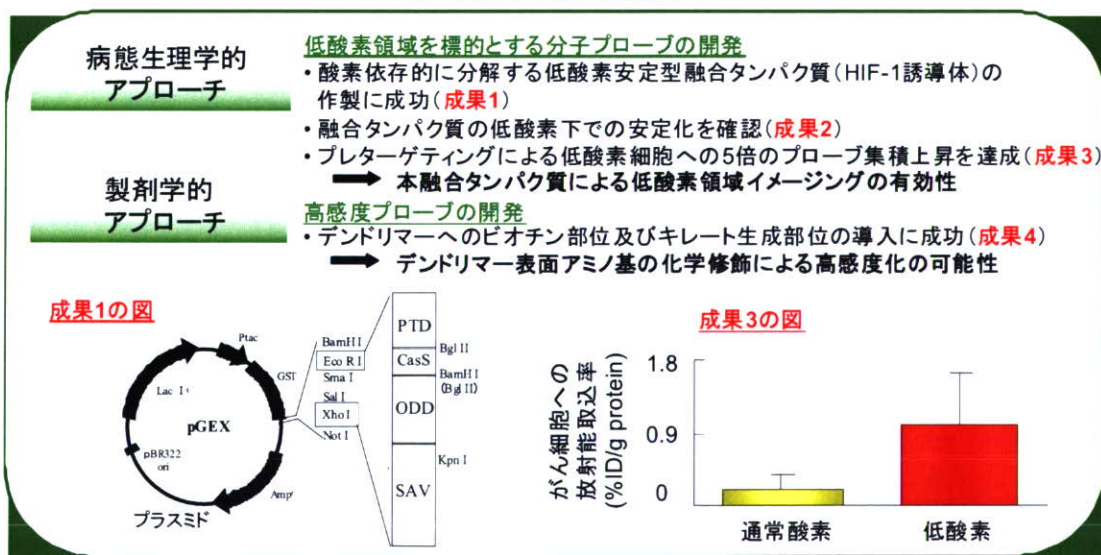
E. 結論

3年間の研究成果概要を図3に示した。まず17年度の成果として、HIF-1の酸素依存的分解に関与する融合タンパク質の作製に成功し、この融合タンパク質が低酸素下で安定化されること、プレターゲティングにより低酸素細胞へのプローブ集積が上昇することを明らかにし、本融合タンパク質による低酸素状態の腫瘍のイメージングの可能性を示した。

次に18年度の成果として、HIF-1 α の酸素依存的分解に関連する融合タンパク質プローブPCOSが既存の膜透過配列よりも優れた細胞内移行性を示すこと、インビボにおいても腫瘍に集積して安定化されることを見出し、また、プレターゲティングによって撮像時間の短縮およびS/N比の向上が可能であることが明らかとなった。これらのことから、PCOSのプレターゲティングと標識ビオチン誘導体を利用することで短時間での腫瘍低酸素領域の高感度イメージングの可能性が示された。

図3 本プロジェクトの研究成果の概要

17年度研究成果概要:



18年度研究成果概要:

病態生理学的アプローチ

製剤学的アプローチ

低酸素領域を標的とする分子プローブの開発

- ・酸素依存的分解プローブ(PCOS)の高い細胞内移行性を確認(成果1)
- ・腫瘍低酸素領域の蛍光イメージングに成功(成果2)
- ・インビボプレタージェティング法による撮像時間の短縮(1/4)およびS/N比の向上(2倍以上)を達成(成果3)

→ PCOSのプレタージェティングと高感度プローブを用いた短時間での腫瘍低酸素領域イメージングの可能性

高感度プローブの開発

- ・ dendリマーの血液クリアランスが速やかであることを確認(成果4)

→ dendリマーの高感度イメージングプローブとしての可能性

成果2の図

1 hr 6 hr 1 day

成果3の図

＜腫瘍／血液比＞

プローブのみ	~1
結合体	~5
プレタージェティング	~13

19年度研究成果概要:

病態生理学的アプローチ

製剤学的アプローチ

低酸素領域を標的とする分子プローブの開発

- ・インビボ核医学イメージング用RI標識ビオチン誘導体を開発(成果1)
- ・プレタージェティング法による投与早期における腫瘍の高感度PETイメージングに成功(成果2)
- ・PCOSの低酸素(HIF-1存在)領域への集積を確認(成果3)
- ・プレタージェティング法による腫瘍低酸素領域の蛍光イメージングに成功(成果4)

高感度プローブの開発

- ・ dendリマーのポジトロン標識を達成し、腫瘍集積性を確認(成果5)

成果2の図

投与3時間後

成果3の図

PCOS集積

低酸素領域

成果4の図

直後 2 hr

蛍光プローブ投与

HIF-1存在領域を対象とする高感度分子イメージング法の実現

近接撮像型フレキシブル分子イメージング装置 (NEDO研究)

微小がんの検出・診断
がんの超早期診断・治療の実現

最終年度である19年度では、PCOSがHIF-1の存在領域に集積し、PCOSのプレターゲティングとインビボ核医学イメージング用のRI標識ビオチン誘導体を用いることで、小動物用高解像度・高感度PET装置による腫瘍の明瞭な描出が投与早期から可能であることが明らかとなった。さらに、PCOS類似の酸素依存的分解タンパク質と蛍光色素を用いる光イメージングに対してもプレターゲティング法を応用し、投与早期の時点で微小がんの光イメージングに成功した。また、プローブの放出シグナル増強に関しては、ポジトロン標識 dendriマーの開発を行い、dendriマーの腫瘍集積性およびイメージング用抗体との結合性を確認し、高感度化につながる技術を開発した。

これらの結果は、HIF-1存在領域を標的とする高感度分子イメージング法の実現を示すものであり、微小がんを超高感度で検出する分子イメージングプローブの開発が達成されたといえる。今後、NEDO側を中心に開発する高解像力・高感度の近接撮像型フレキシブル分子イメージング装置と組み合わせることにより、従来の100倍以上の感度を達成し、1 mm以下の腫瘍の検出、診断が可能となりうる。

F. 健康危険情報

臨床研究において、本研究に起因すると思われる副作用を経験していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- “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.
- “Synthesis and evaluation of radioiodinated cyclooxygenase-2 inhibitors as potential SPECT tracers for cyclooxygenase-2 expression.” *Nucl Med Biol.* 2006;33(1):21-7
- “A tumor-specific gene therapy strategy targeting dysregulation of the VHL/HIF pathway in renal cell carcinomas.” *Cancer Sci*, 2005, 96:288-94.
- “Real-time imaging of hypoxia-inducible factor-1 activity in tumor xenografts.” *J Radiat Res (Tokyo)*, 2005, 46:93-102.
- “Optical imaging of tumor hypoxia and evaluation of efficacy of a hypoxia-targeting drug in living animals.” *Mol Imaging*, 2005, 4:182-93.
- “Development of a rhenium-186-labeled MAG3-conjugated bisphosphonate for the palliation of metastatic bone pain based on the concept of bifunctional radiopharmaceuticals.” *Bioconjugate Chem.* 2005;16(4):751-7.
- “Basic characterization of ⁶⁴Cu-ATSM as a radiotherapy agent.” *Nucl Med Biol.* 2005;32(1): 21-8.
- “Enhanced apoptotic reaction correlates with suppressed tumor glucose utilization after cytotoxic chemotherapy: use of ^{99m}Tc-Annexin V, ¹⁸F-FDG, and histologic evaluation.” *J Nucl Med.* 2005;46(5):794-9.
- “Biologic correlates of intratumoral

- heterogeneity in ^{18}F -FDG distribution with regional expression of glucose transporters and hexokinase-II in experimental tumor.”
J Nucl Med. 2005;46(4):675-82.
- “Depth-of-interaction recognition using optical filters for nuclear medicine imaging.”
IEEE Trans. Nucl. Sci., 2005;52(1), 4-7.
 - “Three-dimensional array of scintillation crystals with proper reflector arrangement for a depth of interaction detector.”
IEEE Trans. Nucl. Sci., 2005;52(1), 8-14.
 - “Performance of a 256ch Flat Panel PS-PMT with small crystals for a DOI PET detector.”
IEEE Trans. Nucl. Sci., 2005;52(1), 15-20.
 - “A block detector for a multislice, depth-of-interaction MR-compatible PET.”
IEEE Trans. Nucl. Sci., 2005;52(1), 33-37.
 - “Transaxial system models for jPET-D4 image reconstruction.”
Phys. Med. Biol., 2005;50, 5339-5355.
 - 「『低酸素がん細胞』を標的としたがんのイメージング・ターゲティング」
バイオテクノロジージャーナル 6 (2), 234-237 (2006) .
 - 「低酸素を標的とした生体イメージング分子プローブの開発」
未来医学 21, 32-37 (2006).
 - 「蛍光の生体イメージングへの応用」
Bioclinica 21(11), 992-998 (2006)
 - 「HIF-1を利用した腫瘍内低酸素がん細胞のイメージング・ターゲティング1」
放射線科学 49 (11) 399-404 (2006).
 - 「HIF-1を利用した腫瘍内低酸素がん細胞のイメージング・ターゲティング2」
放射線科学 49 (12) 436-441 (2006).
 - 「検出器配置の異なる近接撮影型DOI-PET装置の計算機モデルによる感度・計数率特性の比較」
Med. Imag. Tech., 24, 247-253, (2006).
 - 「近接撮影型DOI-PETの画像再構成における観測系モデルの検討」
Med. Imag. Tech., 24, 300-305, (2006).
 - “Therapeutic effects of a ^{186}Re -complex-conjugated bisphosphonate for the palliation of metastatic bone pain in an animal model.”
J Nucl Med. 2007; 48(1): 122-7.
 - “Development of a novel $^{99\text{mTc}}$ -chelate-conjugated bisphosphonate with high affinity for bone as a bone scintigraphic agent.”
J Nucl Med. 2006; 47(12): 2042-7.
 - “Rhenium-186-monoaminomonoamide-dithiol-conjugated bisphosphonate derivatives for bone pain palliation.”
Nucl Med Biol. 2006; 33(4): 513-20.
 - “Development of a ^{111}In -labeled peptide derivative targeting a chemokine receptor, CXCR4, for imaging tumors.”
Nucl Med Biol. 2006; 33(4): 489-94.
 - “Photochemical synthesis of polycyclic pyrimidines through the acid catalyzed cycloaddition of 6-chloro-1-methyluracil to methyl substituted benzenes.”
Heterocycles. 2006; 70: 501-508.
 - “A new convenient method for the synthesis of $[2-^{11}\text{C}]$ thymine utilizing $[^{11}\text{C}]$ phosgene.
Tetrahedron Letters. 2006; 47: 5321-5323.
 - “Development of a novel fluorescent imaging probe for tumor hypoxia by use of a fusion protein with oxygen-dependent degradation domain of HIF-1 α .”
Genetically Engineered and Optical Probes for Biomedical Applications IV, Proceedings of SPIE Volume 6449, 64490Y

- (2007).
- “Mechanism of hypoxia-specific cytotoxicity of procaspase-3 fused with a VHL-mediated protein destruction motif of HIF-1 α containing Pro564.”
FEBS Lett. 2006; 580: 5718-5722.
 - “Suppression of VEGF transcription in renal cell carcinoma cells using pyrrole-imidazole hairpin polyamides targeting the hypoxia responsive element.”
Acta Oncologica. 2006; 45(3): 317-324.
 - “Evaluation of primary brain tumors with FLT-PET: usefulness and limitations.”
Clin Nucl Med., 2006; 31(12): 774-80.
 - “Energy spectra analysis of the four-layer DOI detector for the brain PET scanner: jPET-D4.”
Nucl. Instr. Meth.A, 2006; 557, 664-669.
 - “Preliminary evaluation of 4-layer BGO DOI-detector for PET.”
IEEE Trans. Nucl. Sci. 2006; 53(1), 30 -34.
 - “Performance evaluation of a subset of a four-layer LSO detector for a small animal DOI PET scanner: jPET-RD.”
IEEE Trans. Nucl. Sci. 2006; 53(1), 35 -39.
 - “Multichannel CMOS ASIC preamplifiers for avalanche photodiode and microstrip gas chamber readouts.”
IEEE Trans. Nucl. Sci.2006; 53(1), 242-246.
 - “Preliminary resolution performance of the prototype system for a 4-layer DOI-PET scanner: jPET-D4.”
IEEE Trans. Nucl. Sci. 2006; 53(3), 1123-8.
 - “New tracking method for head motion using a single camera and a solid marker.”
Med. Imag. Tech.2006; 24(4), 320-328.
 - “Zr doped GSO:Ce single crystals and their scintillation performance.”
IEEE Trans. Nucl. Sci.2006; 53(5), 2519-22.
 - “8-layer DOI encoding of 3-dimensional crystal array.”
IEEE Trans. Nucl. Sci.2006; 53(5), 2523-8.
 - “Evaluation of static physics performance of the jPET-D4 with Monte Carlo simulations.”
Phys. Med. Biol. 2007; 52, 213-230.
 - 「生体内バリアを回避する低酸素応答性人口たんぱく質の開発」血管医学 印刷中
 - 「ナノメデイシンの基礎と最先端(仮題)」(編集) 宇理須恒雄 オーム社、印刷中
 - 「放射線治療を指向したPET/SPECTプローブの開発 ～低酸素イメージングを中心に～」癌の臨床 54(2): 105-108, 2008
 - 「新しいナノキャリア “ペプトソーム” 次世代DDSへの期待」化学と生物 45(11): 779-784, 2007
 - 「『環境標的』としてのがんの微小環境」Medical Bio 4(7): 24-29, 2007
 - 「日進月歩のイメージング技術のがん診断への応用」実験医学 25(17): 2770-2777, 2007
 - 「腫瘍の悪性度を可視化する低酸素イメージング」実験医学 25(17): 2805-2812, 2007
 - 「環境標的としての低酸素細胞の光イメージング」実験医学 25(14): 2144-2150, 2007
 - 「分子イメージングへ応用するナノキャリアの開発」化学 62: 34-37, 2007
 - 「HIF-1を利用した腫瘍内低酸素がん細胞のイメージング」放射線生物研究 42(2): 162-173, 2007
 - 「低酸素イメージング、発光イメージング」病理と臨床 25(6): 539-545, 2007

- 「HIF-1を利用した低酸素がん細胞のイメージング・ターゲティング」第23回日本疾患モデル学会シンポジウム講演記録 23: 43-50, 2007
- 「新しい分子イメージングの活用 1.新しい治療法評価への分子イメージングの応用 2.放射線治療の分子イメージング」遺伝子医学MOOK 9: 279-283, 2007
- “Chemical design of a radiolabeled gelatinase inhibitor peptide for the imaging of gelatinase activity in tumors.”
Nucl Med Biol. 2007 Jul;34(5):503-10.
- “Usefulness of ^{11}C -Methionine for Differentiating Tumors from Granulomas in Experimental Rat Models: A Comparison with ^{18}F -FDG and ^{18}F -FLT.”
J Nucl Med. 2008; 49(1): 135-141.
- “Extensive ^{18}F -FDG Uptake and Its Modification with Corticosteroid in a Granuloma Rat Model: An Experimental Study for Differentiating Granuloma from Tumors.”
Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2007; 34(12): 2096-105.
- “Comparison of MET-PET and FDG-PET for differentiation between benign lesions and lung cancer in pneumoconiosis.”
Ann Nucl Med. 2007;21(6): 331-337.
- “A novel and efficient synthesis of $[2-^{11}\text{C}]5$ -fluorouracil for prognosis of cancer chemotherapy.”
J Pharm Pharmaceut Sci. 2007; 10(2): 181-185.
- “n-propyl gallate activates hypoxia-inducible factor 1 by modulating intracellular oxygen-sensing systems.”
Biochemical J. *in press*.
- “Near-Infrared Fluorescent Labeled Peptosome for Application to Cancer Imaging.”
Bioconjug Chem. 19(1):109-117, 2008.
- “Emission under hypoxia: one-electron reduction and fluorescence characteristics of an indolequinone-coumarin conjugate.”
Chembiochem, 9(3): 426-432, 2008.
- “Significance of HIF-1-active cells in angiogenesis and radioresistance.”
Oncogene, 26(54):7508-16, 2007.
- “The combination of hypoxia-response enhancers and an oxygen-dependent proteolytic motif enables real-time imaging of absolute HIF-1 activity in tumor xenografts.”
Biochemical and Biophysical Research Communications, 360(4):791-796, 2007.
- “Adenovirus-mediated hypoxia-targeting cytosine deaminase gene therapy enhances radiotherapy in tumour xenografts.”
Br J Cancer, 96(12): 1871-1878, 2007.
- “HIF-1 influences sensitivity to Paclitaxel of human lung cancer cell lines under normoxic conditions.”
Cancer Science, 98(9):1394-1401, 2007.
- “Hypoxia and Hypoxia-inducible factor-1 expression enhance osteolytic bone metastases of breast cancer.”
Cancer Res., 67(9): 4157-4163, 2007.
- “The lack of expression of the peripheral benzodiazepine receptor characterises microglial response in anaplastic astrocytomas.”
J Neurooncol. 2007; 85(1): 95-103.
- “Evaluation of static physics performance of the jPET-D4 with Monte Carlo simulations.”
Phys. Med. Biol. 52, (1), pp. 213-230,