

and the sections of normal brain showed expression in a few perivascular macrophages. Western-blot analysis revealed a band of 18 kDa in both extracts corresponding to the known molecular weight of the PBR. Signal seen in brain tissue was much weaker than signal in adrenal gland.

Pathological findings

Both tumours were diagnosed as anaplastic astrocytoma (grade III, WHO classification) [26] by two independent neuropathologists. They were composed of astrocytic cells with fibrillary cytoplasm and moderate to severe nuclear pleomorphism. Mitotic activity was brisk in both cases. No necrosis and, vascular and endothelial proliferation was seen (Fig. 3a). As seen with the immunoreaction for MHCII, both tumours contained a substantial number of activated microglial cells and macrophages that accounted for ~40% of the total number of cells (Fig. 3b). The anti-

PBR antibody demonstrated expression in a few tumour cells and no expression in microglia (Fig. 3c) PBR-positive lymphocytes were observed within the vessels and leptomeninges (Fig. 3d). Leptomeningeal arteries showed PBR expression in endothelium and smooth muscle cells of the tunica media whereas normal vessels entrapped with tumours vessels showed weak expression. In both cases, some microglial cells expressed CD80 and CD86. TNF- α was present in a few microglial cells mainly located in the subpial tissue whereas iNOS and COX-2 were only observed in a few neoplastic cells.

The three cases of MS showed intense PBR expression in activated microglial cells surrounding active plaques as well as in microglia and macrophages within areas of demyelination (Fig. 4a). Strong expression of PBR was also seen in activated microglia in the substantia nigra of the three PD cases (Fig. 4b). In all the samples examined we observed PBR expression in the wall of several medium

Fig. 3 The tumour in patient 1 shows the features of an anaplastic fibrillary astrocytoma (a; HE staining; $\times 10$). The immunoreaction for the MHC class II antigen demonstrates a considerable number of activated microglia (b, $\times 10$). PBR is expressed in a few tumour cells but it is undetectable in microglia (c; patient 1 $\times 25$). PBR expression is observed in the leptomeningeal lymphocytes and leptomeningeal vessels (d, patient 1, $\times 4$)

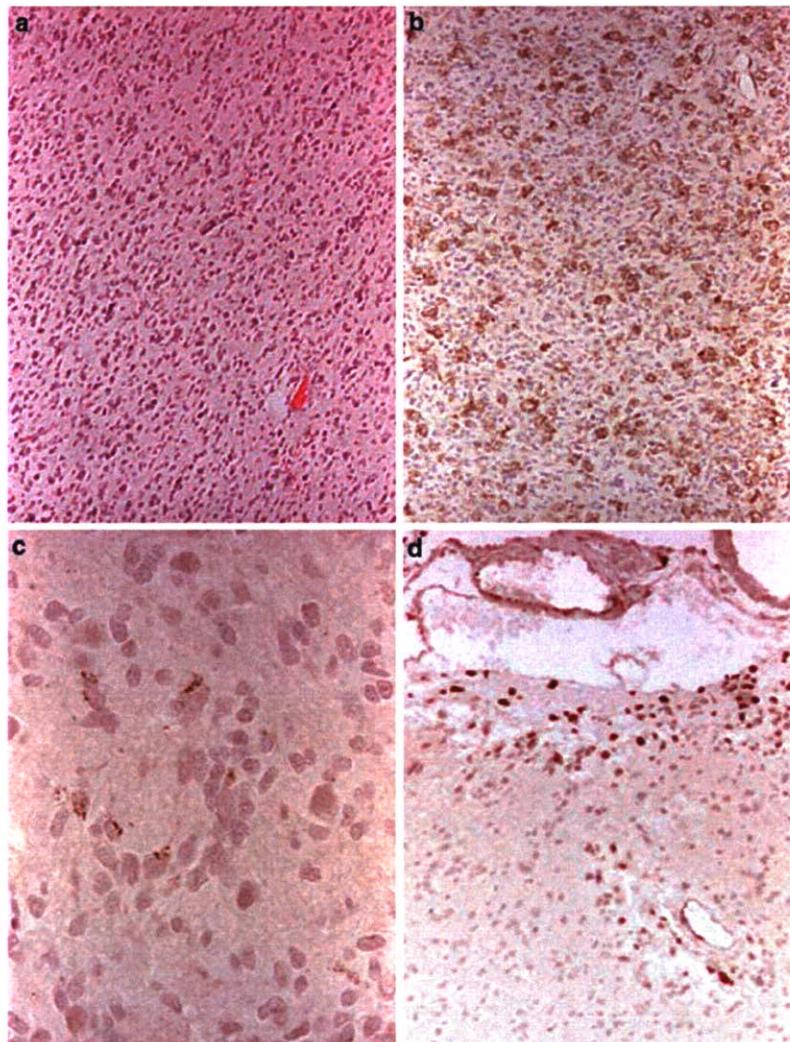
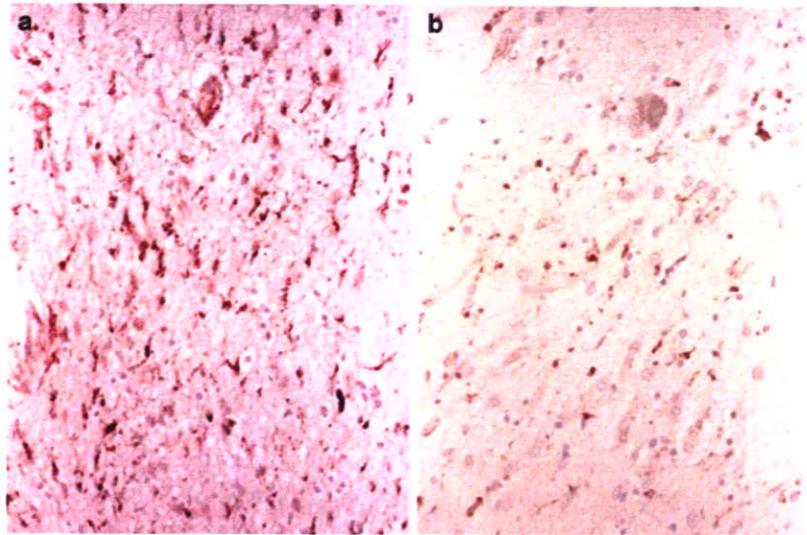


Fig. 4 Intense expression of PBR is seen in activated microglia in an active MS plaque (a) and Parkinson's disease (b, nigra) (ABC/ peroxidase)



sized and small arteries. Both MS and PD cases featured expression of CD86, TNF-alpha, iNOS and COX-2 in microglial cells.

Evaluation of microarray datasets

Immunohistochemical stains for MHCII revealed a diffuse microglial infiltrate in the four anaplastic astrocytomas used for microarrays analysis compared to normal control tissue. The PBR was expressed in tumour cells and in a few microglial cells. Notably, all the tumours showed a considerably high number of MHCII-positive microglial cells than PBR-positive and COX-2 positive microglia. Expression analysis of anaplastic astrocytomas showed levels of PBR as low as control brains. Expression of MHCII, CD86 and TLRs 4 and 5 in anaplastic astrocytomas were significantly higher than normal brains ($P < 0.1$) whereas CD80 and CD40 were high but expression values did not reach significance. TNF-alpha receptor 1 was only mildly elevated and TLRs 1–3, 6–8 and 10 were as low as normal brain. In the substantia nigra of PD cases, the expression of PBR, TLRs 4 and 5 and TNF-alpha 1 receptor were increased compared to normal nigra ($P < 0.1$); MHCII, CD40, CD80 and CD86 showed borderline levels compared to controls. All values of expressions were normalised to the respective control tissue (Fig. 5).

Discussion

We observed that activated microglial cells infiltrating two cases of anaplastic astrocytoma do not express PBR. This finding is interesting because it differs from all imaging

studies with [^{11}C](R)-PK11195 [11], microarray studies [5], studies in vitro [27, 28], animal model [3, 29, 30] and post-mortem brains [22] that showed high expression of PBR in activated microglia in a variety of inflammatory, degenerative, infective and vascular CNS disorders. Our approach of combining the evaluation of PBR using [^{11}C](R)-PK11195 PET-scan and immunohistochemistry offered the advantage of studying the binding capacity of this molecule *in vivo* and, on tissues its distribution in the cell types constituting the two astrocytomas without the

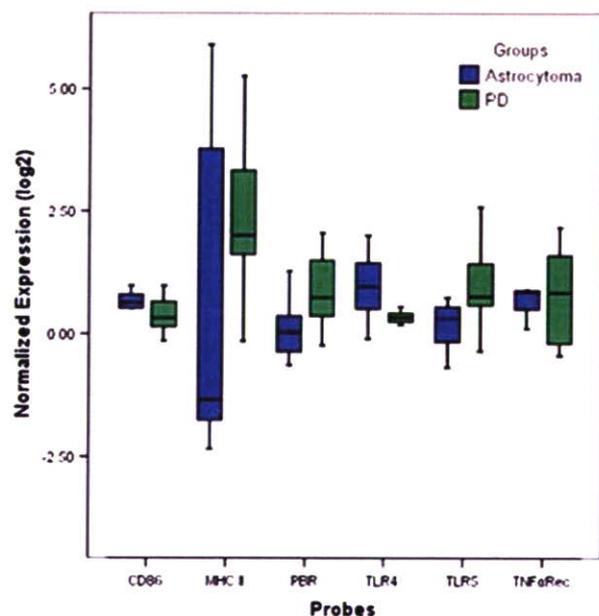


Fig. 5 This diagram demonstrates the expression of mRNA of PBR, MHCII, CD86, TLR4 and 5 and TNF alpha receptor 1 in anaplastic astrocytomas (blue) and PD (green). Expression is normalised to the control tissue

changes that may occur examining microglia in vitro, outside the complexity of interactions with other cell types [5]. In addition, these two cases represented a rare opportunity and an excellent model to investigate microglial PBR because they showed low-PBR expression in neoplastic cells and minimal contrast enhancement indicating minimal disruption of the blood brain barrier and therefore little presence of blood-borne macrophages within tumour tissue.

We first excluded that the lack of PBR in glioma-infiltrating microglia depended on the techniques used. Time activity curves showed good perfusion of the radioligand indicating that low BP seen in PET studies did not depend on reduced blood flow within tumours. The dose of unlabelled PK11195 injected for PET imaging along with the labelled ligand was too low to saturate binding sites. Positive immunohistochemical reactions obtained with adrenal gland, MS and PD confirmed that the anti-PBR antibody 8D7 is suitable for routinely processed tissue and the search in protein Blast/Fasta, and Western-blot analysis confirmed its specificity. Finally, PBR immunolabelling in tumour cells and intravascular and leptomeningeal mononuclear inflammatory cells that normally produce PBR [13, 23] indicated good preservation of the antigen in tumour samples. Taken altogether, these findings confirmed that the very low-PET signal and the lack of immunolabelling in tumour tissue were consistent with a very low expression of PBR in tumour tissue.

In the present two cases only a minority of neoplastic cells expressed PBR. The presence of a limited number of PBR-positive tumour cells was essential to our study because it allowed us for a better evaluation of its expression in microglial cells. Previous studies that investigated PBR in human astrocytomas using autoradiography with [³H] PK11195 [31–38] or immunohistochemistry [18, 39–41] observed that the great majority of glioblastomas have high-PBR expression whereas anaplastic astrocytomas show variable expression with some lesions showing PBR levels as high as low-grade examples and normal brain [39]. The function of PBR in tumour cells is still unclear but some authors suggested that this molecule may have a role in inducing proliferation and regulating apoptosis [41]. Interestingly, none of these studies reported intra-tumoural microglial cells and macrophages to be a source of PBR. Using autoradiography, Benavides et al. [32] examined PBR expression in glioblastomas, MS, brain infarct and normal brains. They observed a considerable increase in PBR expression in all lesions and a spatial correlation between increased expression of PBR and accumulation of macrophages in MS plaques and infarcts but not in glioblastomas where PBR expression was reportedly limited to tumour cells.

Our results obtained with the two cases studied with PET-scan combined with the results of expression microarrays

showed that glioma-infiltrating microglia in anaplastic astrocytomas express very low levels or no PBR and that glioma-infiltrating microglia have impaired cytotoxic activity (lack of TNF-alpha, COX-2 and iNOS) although they retain antigen presenting functions, at least in some cells (expression of CD86 and TLRs 4 and 5). In addition, we demonstrated that microglial response in anaplastic astrocytomas substantially differs from the response in non-neoplastic conditions such as MS and PD. These findings elicit an intriguing hypothesis on the role of PBR in microglial immune functions. The PBR is one of the most common molecules expressed by microglial cells during activation but its role in these cells is unknown and the molecular pathway linking the functions of PBR to microglial response has not been elucidated [5]. In a mouse model, Banati et al. [42] showed that PBR is up-regulated at the early stages of activation when microglial cells still show a ramified morphology and suggested that PBR may be a key molecule in microglial immune response. Recent in vitro studies demonstrated that binding of PBR with the antagonist PK-11195 can suppress lipopolysaccharide-induced expression of TNF-alpha and COX-2 [16] and that PK-11195 may block store-operated channels mediated Ca²⁺ influx and the production of COX-2 induced by platelet-activating factor [43]. These results indicate that PBR may exert a pro-inflammatory activity and suggest a correlation between modulation of mitochondrial PBR and cellular inflammatory response with store-operated channels acting as the molecule that links the two pathways. In human glioblastomas, Hussain et al. [6] observed that glioma-infiltrating microglia and macrophages separated from tumour cells up-regulate MHCII and TLRs 1, 2, 3 and 4, show very low levels of CD86 and lack of CD80 and TNF-alpha, even after stimulation with lipopolysaccharide. Finally, previous studies in glial tumours did not document expression of COX-2 and iNOS in glioma-infiltrating microglia although they showed expression in tumour cells and their increase with tumour grade [44, 45]. If these and our results are considered altogether, we may speculate that down-regulation of PBR in anaplastic astrocytomas can interfere with the immune response of glioma-infiltrating microglia by suppressing cytotoxic activity. Interestingly, He et al. [46] documented very low expression of TNF-alpha and iNOS in activated microglia surrounding brain metastatic non-small cell lung carcinomas suggesting that mechanisms that lead to impairment of microglial anti-tumour activity may be common in primary and secondary CNS tumours.

Positron emission tomography studies performed here showed that [¹¹C] (R) PK11195 binding in both astrocytomas was markedly lower than in the contralateral grey matter. Turkheimer et al. [47] recently reported that normal brains show a baseline up-take of [¹¹C] (R) PK11195 due to the presence of PBR in the *tunica media* and endothelium of

intra-parenchymal arteries. In the current study, immunohistochemical stains demonstrated lack of microglial PBR in normal vessels entrapped within neoplastic tissue but still preserved expression in leptomeningeal vessels. Such reduction of the baseline expression of PBR in vessels justifies a binding of [¹¹C] (R) PK11195 in astrocytomas lower than normal grey matter. In addition, absent expression of PBR in microglia, low expression in neoplastic cells and intra-tumoural vessels might suggest that molecules present in tumour microenvironment can down-regulate PBR.

Two previous studies have investigated PBR expression in human gliomas by using [¹¹C](R)-PK11195 PET [48, 49]. Junck et al. [48] examined three low-grade and three anaplastic astrocytomas, three glioblastomas and one case defined as indeterminate grade. They observed detectable signal in eight lesions but only 60 and 80 min after injection and not in the early images. In addition, tumour/grey matter ratio, tumour/white matter ratio and tumour radioactivity did not correlate with tumour grade. Their findings are not comparable to ours because these authors did not use the R-enantiomer of PK11195, which exhibits maximum contrast at ~10 min after injection approaching the equilibrium thereafter. Moreover, many lesions investigated in their study showed contrast enhancement and therefore damage of the blood brain barrier. Disruption of the blood brain barrier allows blood-borne mononuclear cells to infiltrate tumour tissue and such a recruitment of haematogenous cells that highly express PBR may give confounding results. The results obtained by Pappata et al. [49] were in keeping with the known kinetic properties of [¹¹C](R) PK-11195 but a parallel with our findings is also difficult because they studied a case of glioblastoma, hence a lesion with significant damage of the blood brain barrier.

In conclusion, we have shown that activated microglial cells infiltrating anaplastic astrocytomas may not express PBR as they do in neuroinflammatory, neurodegenerative, vascular and infective CNS diseases. Our results suggest that PBR has an important role in modulating the inflammatory microglial response against tumour cells and highlight the complexity of the in vivo response of microglia in astrocytic tumours. Absence of PBR in microglial cells and in the wall of intra-tumoural vessels suggests that tumour microenvironment may contain molecules capable of inducing down-regulation of PBR. Further studies are required to elucidate the role of PBR in microglial immune response and the causes leading to its suppression in high-grade astrocytomas.

Acknowledgements This study was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas (17022023) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan. Dr. Roncaroli's research is partly supported by the Charity BRTC. We thank Dr. Nobuhiro Mikuni from the Department of Neurosurgery

at the Kyoto University Graduate School of Medicine for recruiting the patients, Ms. Lynne Christian from the Department of Neuropathology at the Imperial College in London for critically reviewing the manuscript, Professor Graeber and Dr. Moran, Department of Neuropathology, Imperial College for kindly making available their dataset generated with cases of Parkinson's Disease.

References

1. Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312–318
2. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314–1318
3. Schwartz M, Butovsky O, Bruck W et al (2006) Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends Neurosci* 29:68–74
4. Gebicke-Haerter PJ (2005) Microarrays and expression profiling in microglia research and in inflammatory brain disorders. *J Neurosci Res* 81:327–341
5. Hussain SF, Yang D, Suki D et al (2006) The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumour immune responses. *Neurooncology* 8:261–279
6. Roggendorf W, Strupp S, Paulus W (1996) Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumours. *Acta Neuropathol (Berl)* 92:288–293
7. Tran CT, Wolz P, Egensperger R et al (1998) Differential expression of MHC class II molecules by microglia and neoplastic astroglia: relevance for the escape of astrocytoma cells from immune surveillance. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24:293–301
8. Schartner JM, Hagar AR, Van HM et al (2005) Impaired capacity for upregulation of MHC class II in tumour-associated microglia. *Glia* 51:279–285
9. Town T, Nikolic V, Tan J (2005) The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. *J Neuroinflammation* 2:24
10. Watters JJ, Schartner JM, Badie B (2005) Microglia function in brain tumours. *J Neurosci Res* 81:447–455
11. Banati RB (2002) Visualising microglial activation in vivo. *Glia* 40:206–217
12. Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR et al (2006) Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* 27:402–409
13. Veenman L, Gavish M (2006) The peripheral benzodiazepine receptor and the cardiovascular system. Implications for drug development. *Pharmacol Ther* 110:502–524
14. Gavish M, Bachman I, Shoukrun R et al (1999) Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacol Rev* 51:629–650
15. Bribes E, Carriere D, Goubet C et al (2004) Immunohistochemical assessment of the peripheral benzodiazepine receptor in human tissues. *J Histochem Cytochem* 52:19–28
16. Choi HB, Khoo C, Ryu JK et al (2002) Inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2, tumour necrosis factor- α and [Ca²⁺]_i responses in human microglia by the peripheral benzodiazepine receptor ligand PK11195. *J Neurochem* 83:546–555
17. Farges RC, Torres SR, Ferrara P et al (2004) Involvement of steroids in anti-inflammatory effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands. *Life Sci* 74(11):1387–1395
18. Han Z, Slack RS, Li W et al (2003) Expression of peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in human tumours: relationship to breast, colorectal, and prostate tumour progression. *J Recept Signal Transduct Res* 23:225–238

19. Turkheimer FE, Aston JA, Banati RB et al (2003) A linear wavelet filter for parametric imaging with dynamic PET. *IEEE Trans Med Imaging* 22(3):289–301
20. Logan J, Fowler JS, Volkow ND et al (1996) Distribution volume ratios without blood sampling from graphical analysis of PET data. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:834–840
21. Dussossoy D, Carayon P, Ferat D et al (1996) Development of a monoclonal antibody to immuno-cytochemical analysis of the cellular localization of the peripheral benzodiazepine receptor. *Cytometry* 24:39–48
22. Banati RB, Newcombe J, Gunn RN et al (2000) The peripheral benzodiazepine binding site in the brain in multiple sclerosis: quantitative in vivo imaging of microglia as a measure of disease activity. *Brain* 123:2321–2337
23. Cahard D, Canat X, Carayon P et al (1994) Subcellular localization of peripheral benzodiazepine receptors on human leukocytes. *Lab Invest* 70:23–28
24. Turkheimer FE, Roncaroli F, Hennuy B et al (2006) Chromosomal patterns of gene expression from microarray data: methodology, validation and clinical relevance in gliomas. *BMC Bioinformatics* 7:526–544
25. Duke DC, Moran LB, Turkheimer FE et al (2004) Microglia in culture: what genes do they express? *Dev Neurosci* 26:30–37
26. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW et al (2002) The WHO classification of tumours of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:215–225
27. Wilms H, Claasen J, Rohl C et al (2003) Involvement of benzodiazepine receptors in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases: evidence from activated microglial cells in vitro. *Neurobiol Dis* 14:417–424
28. Moran LB, Duke DC, Turkheimer FE et al (2004) Towards a transcriptome definition of microglial cells. *Neurogenetics* 5:95–108
29. Kuhlmann AC, Guilarte TR (2000) Cellular and subcellular localization of peripheral benzodiazepine receptors after trimethyltin neurotoxicity. *J Neurochem* 74:1694–1704
30. Chen MK, Baidoo K, Verina T et al (2004) Peripheral benzodiazepine receptor imaging in CNS demyelination: functional implications of anatomical and cellular localization. *Brain* 127:1379–1392
31. Olson JM, Junck L, Young AB et al (1988) Isoquinoline and peripheral-type benzodiazepine binding in gliomas: implications for diagnostic imaging. *Cancer Res* 48:5837–5841
32. Benavides J, Cornu P, Dennis T et al (1988) Imaging of human brain lesions with an omega 3 site radioligand. *Ann Neurol* 24:708–712
33. Ferrarese C, Appollonio I, Frigo M et al (1989) Benzodiazepine receptors and diazepam-binding inhibitor in human cerebral tumours. *Ann Neurol* 26:564–568
34. Black KL, Ikezaki K, Santori E et al (1990) Specific high-affinity binding of peripheral benzodiazepine receptor ligands to brain tumours in rat and man. *Cancer* 65:93–97
35. Broaddus WC, Bennett JP Jr (1990) Peripheral-type benzodiazepine receptors in human glioblastomas: pharmacologic characterization and photoaffinity labeling of ligand recognition site. *Brain Res* 518:199–208
36. Cornu P, Benavides J, Scatton B et al (1992) Increase in omega 3 (peripheral-type benzodiazepine) binding site densities in different types of human brain tumours. A quantitative autoradiography study. *Acta Neurochir (Wien)* 119:146–152
37. Takada A, Mitsuka S, Diksic M et al (1992) Autoradiographic study of peripheral benzodiazepine receptors in animal brain tumour models and human gliomas. *Eur J Pharmacol* 228:131–139
38. Miyazawa N, Hamel E, Diksic M (1998) Assessment of the peripheral benzodiazepine receptors in human gliomas by two methods. *J Neurooncol* 38:19–26
39. Miettinen H, Kononen J, Haapasalo H et al (1995) Expression of peripheral-type benzodiazepine receptor and diazepam binding inhibitor in human astrocytomas: relationship to cell proliferation. *Cancer Res* 55:2691–2695
40. Brown RC, Degenhardt B, Kotoula M et al (2000) Location-dependent role of the human glioma cell peripheral-type benzodiazepine receptor in proliferation and steroid biosynthesis. *Cancer Lett* 156:125–132
41. Vlodayvsky E, Soustiel JF (2007) Immunohistochemical expression of peripheral benzodiazepine receptors in human astrocytomas and its correlation with grade of malignancy, proliferation, apoptosis and survival. *J Neurooncol* 81(1):1–7
42. Banati RB, Myers R, Kreutzberg GW (1997) PK ('peripheral benzodiazepine')-binding sites in the CNS indicate early and discrete brain lesions: microautoradiographic detection of [3H]PK11195 binding to activated microglia. *J Neurocytol* 26:77–82
43. Hong SH, Choi HB et al (2006) Mitochondrial ligand inhibits store-operated calcium influx and COX-2 production in human microglia. *J Neurosci Res* 83:1293–1298
44. Shono T, Tofilon PJ, Bruner JM et al (2001) Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: Prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res* 61:4375–4381
45. Hara A, Okayasu I (2004) Cyclooxygenase 2 and inducible nitric oxide synthase in human astrocytic gliomas: correlation with angiogenesis and prognostic significance. *Acta Neuropathol* 108:43–48
46. He BP, Wang JJ et al (2006) Differential reactions of microglia to brain metastases of lung cancer. *Mol Med* 12:161–170
47. Turkheimer FE, Edison P et al (2007) Reference and target region modelling of [¹¹C]-(*R*)-PK11195 brain studies. *J Nucl Med* 48:158–167
48. Junck L, Olson JM et al (1989) PET imaging of human gliomas with ligands for the peripheral benzodiazepine binding site. *Ann Neurol* 26:752–758
49. Pappata S, Cornu P et al (1991) PET study of carbon-11-PK 11195 binding to peripheral type benzodiazepine sites in glioblastoma: a case report. *J Nucl Med* 32:1608–1610

特集

第37回放射線による制癌シンポジウム—基礎と臨床との対話—
放射線治療の治療効果増強についての新しい展開

低酸素細胞イメージングと放射線治療

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—

久下裕司^{*1,2} 上田真史^{*3} 趙松吉^{*2} 工藤 喬^{*1}
近藤科江^{*3} 田中正太郎^{*3} 玉木長良^{*2} 平岡真寛^{*3}
佐治英郎^{*1}

PET/SPECT Probes to Assist Radiation Therapy—Imaging of Hypoxic Tumor Tissues—: Kuge Y^{*1,2}, Ueda M^{*3}, Songji Z^{*2}, Kudo T^{*1}, Kondo S^{*3}, Tanaka S^{*3}, Tamaki N^{*2}, Hiraoka M^{*3} and Saji H^{*1} (*1Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, *2Graduate School of Medicine, Hokkaido University, *3Graduate School of Medicine, Kyoto University)

In order to provide biological basis for utilizing ¹⁸F-FDG-PET to assist radiation therapy, we determined the intratumoral distribution of ¹⁸F-FDG by autoradiography (ARG) and compared it with the regional expression levels of glucose transporters Glut-1 and Glut-3 and hexokinase-II (HK-II) in a rat model of malignant tumor. On the other hand, we constructed a fusion protein, which enables us image hypoxic tumors where HIF-1 is active, based on the mechanism of oxygen-dependent degradation of hypoxia-inducible factor-1 alpha. In this paper, the outlines of these studies are described.

Key words: Molecular imaging, PET/SPECT, Radiation therapy, Hypoxia, FDG

Jpn J Cancer Clin 54(2): 105~108, 2008

はじめに

近年、がん細胞の増殖・悪性化に関与するさまざまな“分子機構”が明らかとなってきた。これら“がんの分子機構”を標的とする治療法の開発が急速に進んでいる。他方、放射線治療においても、“癌の個性”に応じて精密に照射線量・照射

部位を設定する“Precision Radiation Therapy”の役割が高まっている。これらの新しい治療戦略を真に有効なものとするためには、“がんの分子機構”や“がんの個性”を的確に把握することが重要である。

これらの観点から、最近、放射線治療の治療計画や効果判定における、核医学イメージングの役割が注目されている。核医学イメージングのひとつである¹⁸F-FDG-PETでは、腫瘍の糖代謝に基づいた腫瘍の質的診断が可能である。他方、固形腫瘍では、活発な細胞増殖が行われているため、血管からの酸素供給が不十分になり、正常組織と比較して酸素分圧の低い低酸素領域が存在す

*1 京都大学大学院薬学研究科病態機能分析学分野

*2 北海道大学大学院医学研究科トレーサー情報分析学分野・核医学分野

*3 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

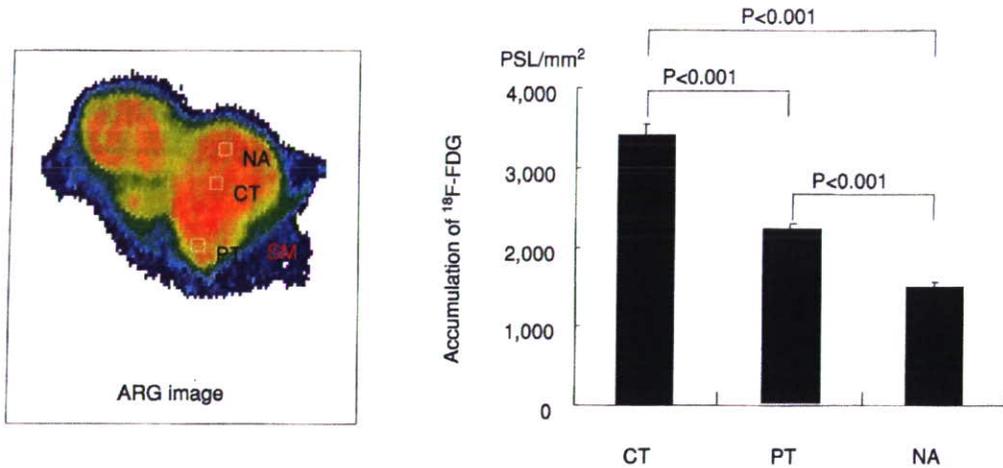


図1 ¹⁸F-FDGの腫瘍内分布

る。この低酸素領域は腫瘍の悪性度を高め、放射線治療や抗癌剤に対して低感受性であることから、低酸素領域のイメージングは放射線治療の部位の決定、効果予測、抗癌剤の選択などに有用な情報を提供すると考えられている。

これらの背景の下、われわれは、核医学イメージングを放射線治療に応用することを目的として、担がん動物における¹⁸F-FDGの腫瘍内分布とその取り込み機構を検討した¹⁾。また、最近では、低酸素応答因子(HIF-1)の活性化(安定化)を利用した低酸素イメージングを可能にする放射性(RI)プローブの開発を試みている。本稿では、これらの研究成果の概略を紹介する。

1. ¹⁸F-FDGの腫瘍内分布と取り込み機構の検討

¹⁸F-FDG-PETを放射線治療の治療計画や効果判定に応用するための基礎的データを得るため、担がんラットにおける¹⁸F-FDGの腫瘍内分布とその取り込み機構を検討した。すなわち、雄性Wistar系ラットの左ひ腹筋にラット肝癌細胞(KDH-8)を移植し、2週間後に一晩絶食させ、¹⁸F-FDGを静脈内投与した。¹⁸F-FDG投与1時間後、全採血致死させ、腫瘍組織を摘出してオートラジオグラフィ(ARG)、HE染色、およびGlut-1、Glut-3、Hexokinase-II(HK-II)、HIF-1 α の免疫染色を行なった。腫瘍組織のHE染色に

より、ネクロシス領域(NA)、および中心部(CT)と周辺部(PT)のviableな腫瘍組織を選定し、これらに対応する関心領域をARG上に設定して放射能分布を測定した。

その結果、ARGにより、¹⁸F-FDGの腫瘍内分布が不均一であることが示された。¹⁸F-FDGの集積は腫瘍の中心部(CT)で最も高く、その集積は腫瘍の周辺部(PT)およびネクロシス領域(NA)領域のそれぞれ1.6倍、2.3倍であった(図1)。腫瘍の中心部(CT)のHIF-1 α 、Glut-1、Glut-3、およびHK-II発現は、腫瘍の周辺部(PT)での発現より顕著に強かった(図2)。

このように、¹⁸F-FDGの腫瘍内分布は、HIF-1、Glut-1、Glut-3、およびHK-II発現とよく対応していることが明らかとなった。これらの結果は、低酸素(HIF-1 α)により誘導されたGlut-1、Glut-3、Hexokinase-IIの発現が、中心部のviableな腫瘍組織における高い¹⁸F-FDG集積を引き起こす重要な因子である可能性を示唆している。

2. HIF-1の活性化を利用した放射性(RI)プローブの開発

低酸素応答因子(Hypoxia Inducible Factor-1 α , HIF-1 α)は、低酸素環境において、腫瘍の増殖や転移に関与するさまざま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

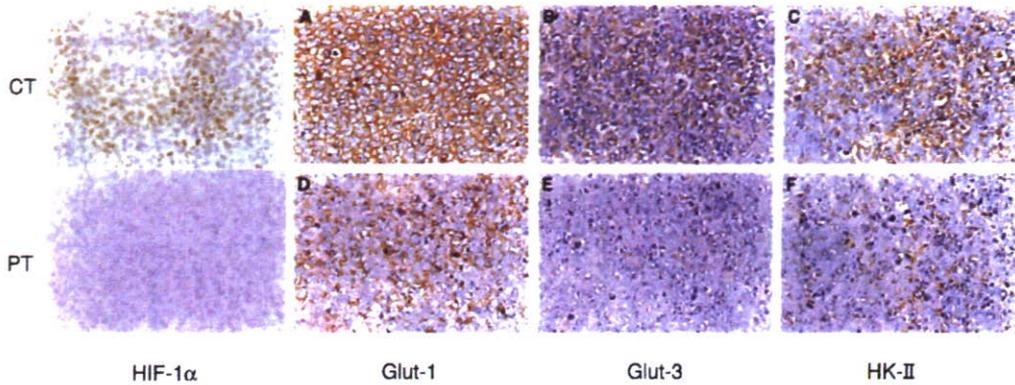


図2 HIF-1, Glut-1, Glut-3, および HK-II 発現

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、HIF-1 α の安定化に基づいた低酸素状態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3)。すなわち、HIF-1分子内の低酸素依存的分解に関与するペプチド(ODDドメイン)を母体とし、これに細胞膜透過性に有効な部位(塩基性ペプチド配列部位)と放射性プローブ結合部位(放射性ビオチンが結合できるストレプトアビジン部位)を導入した融合タンパク質(PCOS)を作製した²⁾。また、プレターゲティング後に投与する放射性プローブとしては、ストレプトアビジンに対して高い親和性を有し、放射性ヨウ素を導入したビオチン誘導體(¹²⁵I)IBB)を用いた。

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1cmになった個体を実験に用いた。まず、¹²⁵I)IBB単独あるいは¹²⁵I)IBBと結合させたPCOS(¹²⁵I)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、¹²⁵I)IBB-PCOSの投与量を0.05~30 μ g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を検討した。プレターゲティング法に関する検討では、担がんマウスにPCOS 30 μ gを前投与し、24時間後に¹²⁵I)IBBを投与した。¹²⁵I)IBB投与1, 3, 6, 24時間後に、各臓器を摘出し、重量と放射能を測定した。同じタイムポイントでの¹²⁵I)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。

その結果、¹²⁵I)IBBとPCOS-¹²⁵I)IBBの投与24時間後の血中放射能は0.025, 0.18(%ID/g)であり、¹²⁵I)IBBが血中から速やかにクリアランスされることが示された。また、¹²⁵I)IBB投与24時間後の腫瘍/筋肉比は1.0であり、腫瘍への集積性が認められなかったのに対し、PCOS-¹²⁵I)IBB投与24時間後の腫瘍/筋肉比は10と高く、PCOSは腫瘍に集積することが示された。さらに、その腫瘍集積量はPCOSの投与量に依存して変化し、0.5 μ g/マウス群における投与24時間後の腫瘍/筋肉比、腫瘍/血液比がそれぞれ10, 1.5であったのに対し、30 μ g/マウス群の値はそれぞれ14, 5.1に上昇し、投与量を最適化することにより腫瘍への集積性を改善することに成功した。そこで、PCOS-¹²⁵I)IBBを30 μ g/マウスの割合で投与したところ投与24, 48時間後において、明瞭な腫瘍のイメージが得られた。他方、プレターゲティングに関する検討では、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

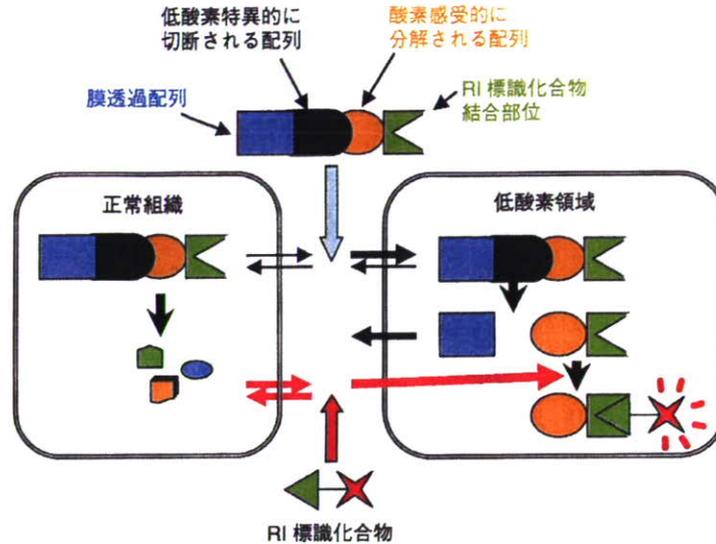


図3 プレターゲティング法によるHIF-1イメージングプローブの開発

これらの値もPCOS-[¹²⁵I]IBB投与24時間後の値と同等であった。また、[¹²⁵I]IBB投与24時間後には、腫瘍への放射能集積は0.6%ID/gと減少したが、腫瘍/血液比は13と顕著に増加した。これらの結果はプレターゲティング法によって、撮像開始までの時間短縮が可能であることを示している。また、プレターゲティングにより、コントラストの改善も可能であることが示唆された。

このように、われわれは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、放射性標識PCOSの低酸素腫瘍イメージング剤としての可能性を示した。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示された。これらの結果は、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イメージングが可能であることを示している。

まとめ

核医学イメージングを放射線治療に応用することを目的として、担がん動物における¹⁸F-FDGの腫瘍内分布とその取り込み機構を検討すると

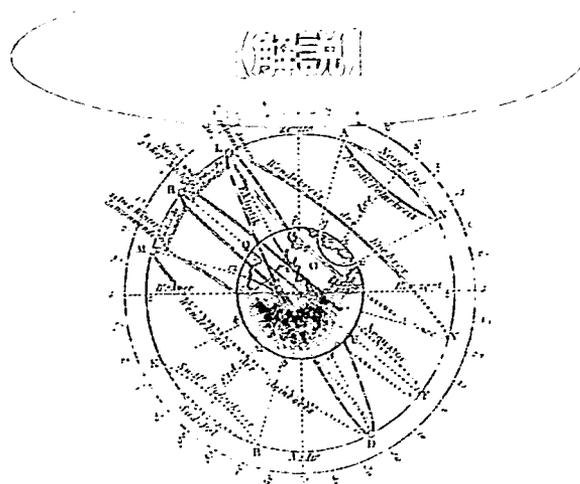
もに、低酸素応答因子(HIF-1)の活性化(安定化)を利用した低酸素イメージングを可能にする放射性(RI)プローブの開発を試みた。これらの研究成果が、核医学イメージングを放射線治療の治療計画や効果判定に応用するための基盤を築くとともに、放射線による制癌の一助になれば幸いである。

謝辞

本研究は、日本学術振興会による科学研究費補助金、および厚生労働省による厚生労働科学研究費補助金の助成を受けて実施いたしました。ここに感謝の意を表します。

文献

- 1) S Zhao, et al: Biologic correlates of intratumoral heterogeneity in ¹⁸F-FDG distribution with regional expression of glucose transporters and hexokinase-II in experimental tumor. *J Nucl Med* **46**: 675-682, 2005
- 2) H Harada, et al: 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
- 3) M Ueda, et al: Development of a hypoxia-targeting probe based on the mechanism of oxygen-dependent degradation of hypoxia-inducible factor-1 α . *J Nucl Med* **48** (suppl 1), 2007



新しいナノキャリア “ペプトソーム” 次世代 DDS への期待

神崎達也*1, 牧野 顕*1, 木村俊作*1†,
近藤科江*2, 平岡真寛*2, 小関英一*3

癌組織のイメージングや DDS に利用できるナノキャリアを開発した。このナノキャリアは、ステルスリポソームと同様の長い血中滞留性を示す。ナノキャリアを構成する両親媒性ブロックポリマーは、従来利用されてきた合成高分子 PEO ではなく、非イオン性の親水性ポリペプチドを親水性部にもち、また疎水性部はらせん形成ポリペプチドあるいはポリ乳酸から成る。EPR 効果により癌組織に集積し、小さな癌を近赤外蛍光イメージングできる。これまでに例のない、表面の親水性ブラシ構造とらせん形成分子がパッキングした膜が新規ナノキャリアの特性を生んでいる。

ホルモンなどの生体機能を調節する生理活性物質や抗癌剤をはじめとする薬剤を、目的とする生体部位に、必要量を必要時期だけに送達するドラッグデリバリーシステム (DDS) の技術は目まぐるしく進歩している。その技術プラットフォームの一つにナノキャリアを用いる分子搬送システムがある。ナノキャリアを用いることで、薬剤を酵素分解などから保護し、尿排泄を回避し、標的部位に効率よく送達することで副作用を抑制できる。ナ

ノキャリアとして高分子を用いる考えは、古く 1975 年に Ringsdorf によって提案されており⁽¹⁾、薬剤を切断可能なリンカーで高分子に結合し、ターゲティングのためのリガンドを高分子に結合することで標的機能を賦与したり、目的に応じた疎水性・親水性の調整を可能とする。さらに、Schwyzer は、タバコモザイクウイルス (TMV) をペプチドホルモンキャリアに用いることで、TMV 上の複数のリガンドが細胞膜の複数のレセプターと結合する多価リガンド効果により、レセプター親和性が向上したスーパーホルモンの調製を示している⁽²⁾。

このように、薬剤などをナノキャリアと組み合わせることで様々な機能の付加やシナジー効果を期待できるが、ナノキャリアとして具体的には何を用いるのが良いであろうか。もちろん、標的部位をどこに定め、どのような機能を要求するかにより状況は変わるが、本稿では、粒径 100 nm 程度のベシクル状キャリアを取り上げる。ベシクル状キャリアでは、表面修飾、疎水性化合物の膜への分配、親水性化合物の内水相への内包など、多様な機能化が可能であり、単純なポリマーやポリマーミセルよりもハイエンドキャリアとなるポテンシャルを有する。

Novel Nano-Carrier “Peptosome”: Coming Materials for the Next Generation DDS

Tatsuya KANZAKI, Akira MAKINO, Shunsaku KIMURA, Shinae KIZAKA-KONDOH, Masahiro HIRAOKA, Ei-ichi OZEKI, *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, *3(株)島津製作所基盤技術研究所, †連絡先

表1 □ 水中でベシクル状の分子集合体を形成する化合物の分類表 (既略)

Niosome (分子量<~1000)	膜流動性	liposome non-phospholipid liposome	stealth liposome Doxil® Novasome™
	非流動性	polymerized liposome cerasome	
Peptosome (~1000<疎水性ブロックの分子量 <~3000) らせん構造	膜流動性	peptosome lactosome	
	非流動性	polymersome glycosome PICsome virosome ferritin	

両親媒性化合物の疎水性ブロックに基づく分類

ベシクル状分子集合体

現在報告されているベシクル状分子集合体は実に多彩である(表1)。古くは、赤堀によるランダムポリペプチドが形成する球状粒子、オパーリンによるコアセルベート形成などに起源を求めることができるが、Banghamによる脂質二分子膜が形成するリポソームが、構造を明確に規定したベシクルの最初であろう⁽³⁾。その後、脂質と同程度の分子サイズを有する中性の両親媒性化合物を用いて、ベシクル構造形成の研究が展開され、これらは“niosome”と名づけられた⁽⁴⁾。たとえば、エチレンオキシドのオリゴマーを親水性部に、長鎖アルキル鎖を疎水性部に有する化合物が、ベシクルを形成し、ペプチド薬剤の送達への応用が検討された⁽⁵⁾。これらのベシクルの中で、ポリ(エチレンオキシド)(PEO)を親水性部に有する両親媒性化合物をリポソームに混合した場合、表面に位置するPEOがベシクル構造を安定化し、細網内皮系への取り込みも抑制されることから⁽⁶⁾、ステルスリポソームとしてDDSへ実際に応用されるまで開発が進んでいる⁽⁷⁾。たとえば、抗悪性腫瘍剤であるドキソルビシン塩酸塩を封入した「ドキシル®」は多くの国で抗癌剤としてすでに承認されている。

このPEOの他、親水性部としてデキストラン⁽⁸⁾を用いてベシクルとした例も報告されている。これらniosomeでは、疎水性部にジアルキル基を用いている場合が多い。このようなリン脂質をベースに用いていないリポソームは酵素分解を受けにくく、“non-phospholipid liposome”として発展し、“Novasome™”として商品化され、これをワクチンの調製に応用することも報告されている⁽⁹⁾。

一方、疎水性部に疎水性ポリマーを用いた両親媒性ブ

ロックポリマーも同様にベシクル状分子集合体を形成することが示され、“polymersome”と呼ばれている⁽¹⁰⁾。たとえば、PEOとポリ(ブタジエン)とのブロックポリマーは水中でベシクル構造を形成し、抗癌剤やタンパク質の内包効率もリポソームに引けをとらないことが示されている⁽¹¹⁾。“glycosome”は、“polymersome”の分類に含まれ、多糖あるいは多糖類似化合物を親水性ブロックとし、疎水性ポリマーとの両親媒性ブロックポリマーで形成される⁽¹²⁾。このような生物学的ユニットと合成ポリマーとを組み合わせた化合物は、分子キメラとして関心がもたれている。同様に広義の分子キメラと考えられるが、PEOとカチオン性ポリペプチドのブロックポリマーとPEOとアニオン性ポリペプチドとを混合することで、ポリイオンコンプレックス形成が起こり、ベシクル構造を形成することが報告されている⁽¹³⁾。これは“PICsome”と名づけられている。polymersomeは膜が丈夫であり、一般的には水の透過も抑制されている。これは、疎水性ブロックのポリマー鎖が疎水性膜領域で絡み合っており、膜厚も厚いことが原因である。このため、脂質膜での特性である膜の流動性は、polymersomeでは一般に低いと考えられる⁽¹⁴⁾。

生体関連化合物によるベシクルはさらに幾つかある。インフルエンザウイルスなどのエンベロープを用いた“virosome”はウイルスの遺伝子化合物を除いたベシクルであり、ワクチンへの応用が期待されている⁽¹⁵⁾。また、フェリチンのように⁽¹⁶⁾自然界にはタンパク質のベシクルが存在することから、タンパク質だけでベシクルを人工的に構築することも可能であろう。しかし、いずれもpolymersomeの一般的な性質である低い膜流動性を示す。

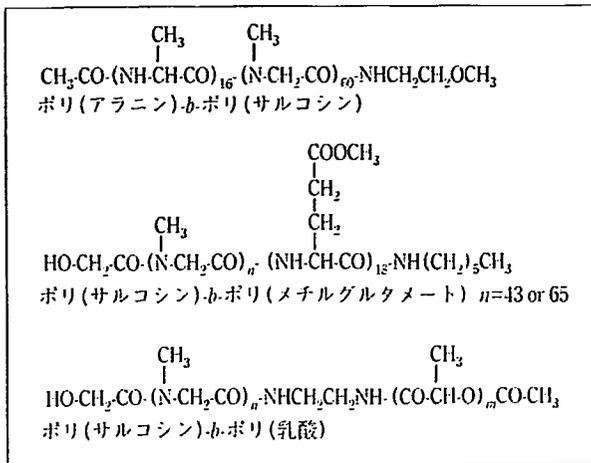


図1 □ ペプチドミセル、ペプトソームやラクトソームを形成する両親媒性化合物

ペプトソームとラクトソーム

リポソームは、Singer と Nicolson の流動モザイクモデルを満たす生体膜モデルとして幅広く研究に用いられてきた。しかし、その膜流動性の故、物理的安定性は高くない。これを改善するために重合性脂質を用いて重合したり、極性部にシラン基を導入して重合したセラソーム⁽¹⁷⁾などが報告されている。しかし、重合法で得た膜では、物理的安定性が得られるものの膜流動性を犠牲にすることになる。一方、polymersome は膜における分子絡み合いにより物理的安定性に優れるものの、膜流動性はやはり低く、この点で生体膜とは大きく異なる。ある程度の膜流動性を保ちながら物理的安定性も兼ね備えるベシクルはできないのであろうか。この問いに対し、筆者らは、polymersome の疎水性ブロックにらせん構造をとるポリペプチドを用いることを考えた。らせん構造をとる分子鎖は、隣接する分子鎖と絡み合いを生じることがなく、膜中で拡散が可能であろう。一方、脂質などの低分子と比較すると、分子間相互作用は大きく物理的安定性に優れると期待される。

筆者らはこのような考えのもとに、疎水性部としてポリ(アラニン)を、親水性部としてポリ(サルコシン)をそれぞれ選んだ両親媒性ポリペプチドを合成し(図1)、水中での分子集合体形成を調べた。各ブロックの鎖長を選ぶことで、ミセルなどの水に分散可能な分子集合体を調製することができた。分子集合体中でのポリ(アラニン)ブロックのコンホメーションは、数平均重合度が16程度の場合 α らせん構造をとっていたが、30に近くなると β シート構造に変化した⁽¹⁸⁾。これは、疎水性ブロックの鎖長が伸びて疎水性相互作用が強くなりすぎると、

隣接する分子がタイトに充填されるため、分子間相互作用が優位に働くようになり、分子内水素結合よりも分子間水素結合の形成が優先し、シート構造になったと考えられる。ポリ(アラニン)(数平均重合度16)とポリ(サルコシン)(数平均重合度60)のブロックポリペプチドは、らせん構造をとった疎水性ブロックが会合することで水中で粒径30 nm程度のみセルを形成した。これをマウスに投与した結果は後ほど説明する。

一方、疎水性部にポリ(アラニン)ではなく、アラニンとらせん構造を安定化する α -アミノイソ酪酸(Aib)との交互配列を有する疎水性8量体ペプチドを用い、親水性部としてラクトースを用いた両親媒性ペプチドを合成した。このペプチドは水に分散し、一枚膜のベシクルを形成することがクライオTEM(透過型電子顕微鏡)観察より明らかとなった⁽¹⁹⁾。Aibを含むペプチド部分からはらせん構造をとっており、ヘリックスどうしが稠密にパッキングすることで、膜は変性剤であるグアニジウム塩酸塩に対して耐性を示した。別の例として、脂質膜に分配してイオンチャンネルを形成するグラミシジンAは、らせん構造をとることが知られている。この疎水性15量体ペプチドと、親水性部としてPEOを結合した両親媒性ペプチドは、水分散液をソニケーションすることで、多重層ベシクルが剥がれて一枚膜のベシクルが形成することがクライオTEM観察より示された⁽²⁰⁾。グラミシジンAはダブルヘリックス構造をとって稠密にパッキングし、この膜は界面活性剤トリトンX-100に耐性を示した。らせん形成ペプチドがパッキングして形成される膜は、いずれも安定性に優れ、また規則正しい構造をとっている。リポソームに対して安定性や規則構造性などの特徴を有することから、ペプトソームと名づけている^(21, 22)。

純粋にペプチドだけからなるペプトソームの調製も可能で、親水性ブロックにポリ(サルコシン)(数平均重合度43および65)、疎水性ブロックにポリ(メチルグルタメート)(数平均重合度18)を用いた両親媒性ブロックポリペプチドの混合物(図1)は、緩衝溶液中で粒径約100 nmの安定なベシクルを形成した。内水相を有するため、水溶性の化合物を内包できることが示されている。また、側鎖のかさ高さのため疎水性部はらせん構造を膜中で保持し、らせんペプチドがバンドル化していることが示された。このペプトソームをマウスに投与した結果は後ほど説明する。

ペプトソームと同じ考え方で、らせん形成ペプチドをらせん形成ポリ(乳酸)に変えてベシクルを作製することが可能である。ポリ(乳酸)は3残基で1周するらせん

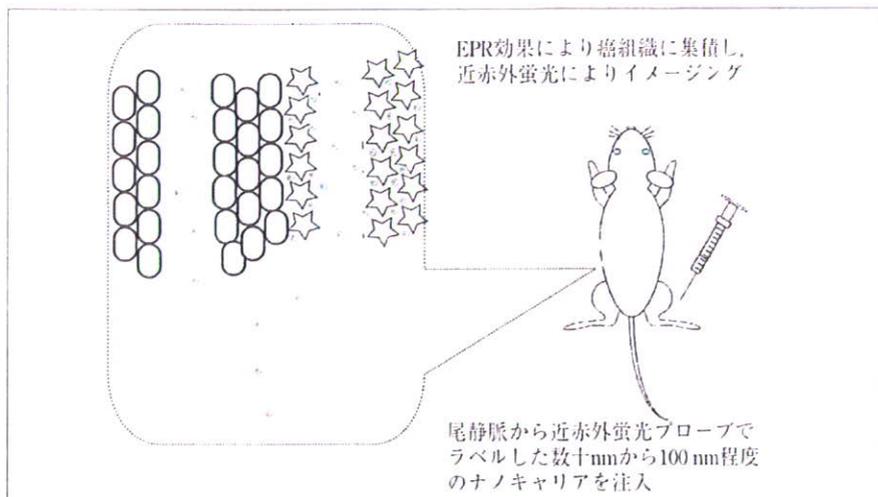


図2 ■ EPR 効果を説明するイラスト図

構造を形成するが、25量体のポリ(乳酸)に150量体のポリ(サルコシン)を結合した両親媒性ブロックポリマー(図1)は、水中で粒径100 nmから200 nmのベシクルを形成する。CD測定より、ポリ(乳酸)ブロックはらせん構造をとっていることが示された。これをラクトソームと名づけている⁽²³⁾。

ペプトソームの血中滞留性

血中に投与された粒径100 nmのナノキャリアは、増殖の速い腫瘍組織の間質腔に、透過性が異常に亢進した毛細血管系より漏出し、リンパ管が未発達なことも手伝って蓄積する(Enhanced Permeation Retention (EPR) 効果)(図2)。前述の「ドキシル®」は、このEPR効果を利用して癌組織への送達を実現している。しかし、ステルスリポソームなどに用いられるPEOは合成高分子であり生分解性はないと考えられ、また擬似アレルギー症状などの急性副作用や亜急性副作用も報告されている⁽²⁴⁾。

一方、上述のように筆者らは両親媒性ポリペプチドやポリ(乳酸)の分子集合体形成を利用して、水中でベシクルを調製できることを示していた。これらのベシクルは粒径が100 nm程度であり、EPR効果により腫瘍組織への送達が期待できる。また、親水性ブロックに利用しているサルコシンは天然に見いだされるアミノ酸であり、生体系ではクレアチンを構成して筋肉中に存在し、リン酸化されてホスホクレアチンとしてエネルギー貯蔵に寄与する。また、サルコシンは内因性のサルコシンデヒドロゲナーゼにより分解され、サルコシン自身には毒性がない⁽²⁵⁾。サルコシンとパーム油からなる界面活性剤は化粧品や歯磨き粉などに利用され、サルコシンを含む化合

物には生体適合性があると考えられている。ポリ(サルコシン)の毒性評価が必要ではあるが、生体に用いることが可能となるプラットフォーム化合物になると期待される。

ペプトソームやラクトソームがEPR効果により腫瘍へ送達されるには、静脈注射した後、正常組織へは漏出せず、血中滞留性が長いこと(ステルス性)が必要である。前述したステルスリポソームは、ラットを用いた血中滞留性試験において減衰係数が約20時間であることが報告されている。ポリ(サルコシン)-ポリ(メチルグルタメート)で調製したペプトソーム(粒径100 nm)を同じ試験に適用したところ、ステルスリポソームと同様に長い減衰係数である22時間であることがわかった。ポリ(メチルグルタメート)ブロックの分子量が2,000を超えることから、分子間相互作用が低分子に比べて大きいことと、らせん構造を形成することで大きなダイポールを有しており、膜中でインターディジテートにより逆平行型で会合し、ダイポール-ダイポール相互作用による安定化も加わっていると考えられる。

また、血中におけるステルス性の原因として、PEO化リポソームの場合、リポソーム表面が水でコーティングされることにより、細網内皮系の単核食細胞系による取り込みが抑制されるためと考えられている。また、PEO鎖の立体障害による血清タンパク質の結合阻害効果もあるとされている。これらの効果が最大となるには、修飾

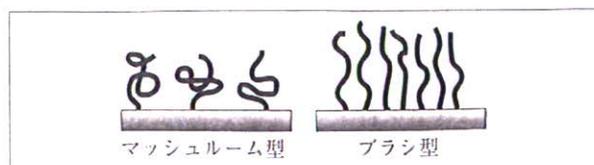


図3 ■ マッシュルーム型とブラシ型のPEO鎖

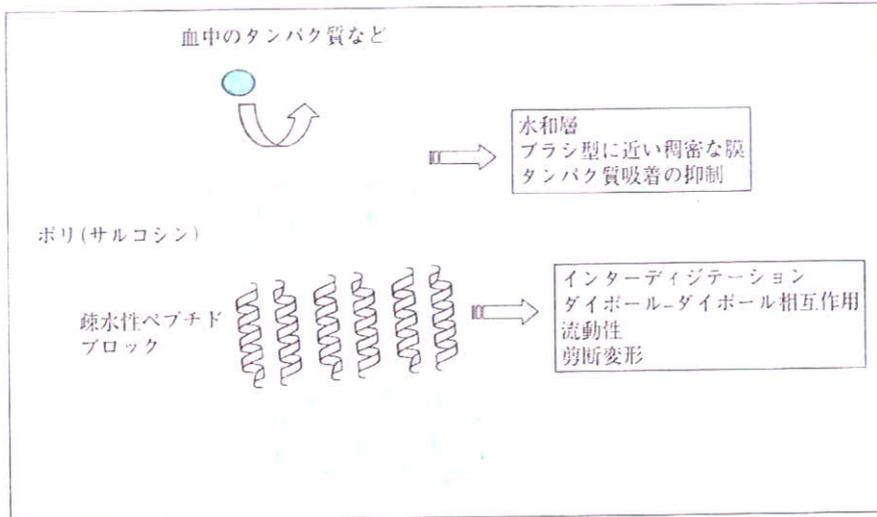


図4 ■らせん形成ペプチドあるいはらせん形成ポリ(乳酸)とポリ(サルコシン)との両親媒性化合物の膜形成とその特性

した PEO 鎖がマッシュルーム型とブラシ型 (図3) の混在する状態でリポソーム表面に存在することが重要であると示唆されている⁽²⁶⁾。このような観点から、表面修飾において PEO 鎖とポリ(サルコシン)鎖とを比較検討すると、同じ非イオン性の水溶性ポリマーであるものの、幾つかの違いがある。PEO 鎖で表面コートしたステルスリポソームの場合、PEO-脂質誘導体の賦与量は脂質量の 2~4 mol% であるのに対し、ペプトソーム調製ではポリ(サルコシン)鎖を親水性ブロックとする両親媒性ペプチドを 100% 用いている。また、ポリ(サルコシン)鎖のほうが PEO 鎖よりも分子鎖の平均断面積が大きい。これらのことは、修飾表面において、ポリ(サルコシン)鎖は主にはブラシ型に近い形で存在せざるをえないことを意味する。一般に、ブラシ型のポリマーで表面を修飾された場合、タンパク質の表面吸着が抑制されることが示されている⁽²⁷⁾。したがって、ポリ(サルコシン)を用いる表面修飾は、水和層形成の他に、運動性は劣るもののブラシ型ポリマーコートによる立体障害がタンパク質吸着を抑制すると考えられ、これらがステルス性の主な原因と考えられる (図4)。

ペプトソームおよびペプチドミセルの分子イメージングへの応用

分子蛍光イメージングとして近赤外プローブが注目されている。近赤外プローブの吸収と発光波長は、生体の窓と呼ばれる 700~1,000 nm の領域に位置し、分光測定において生体系で問題となる赤血球や水の影響を受けにくい。インドシアニングリーン (ICG) は吸収波長が約 800 nm、発光波長が約 840 nm の近赤外蛍光プローブである。ICG は、肝色素代謝能を検査するために生体への適用が臨床検査用色素として認可されており、肝機能が

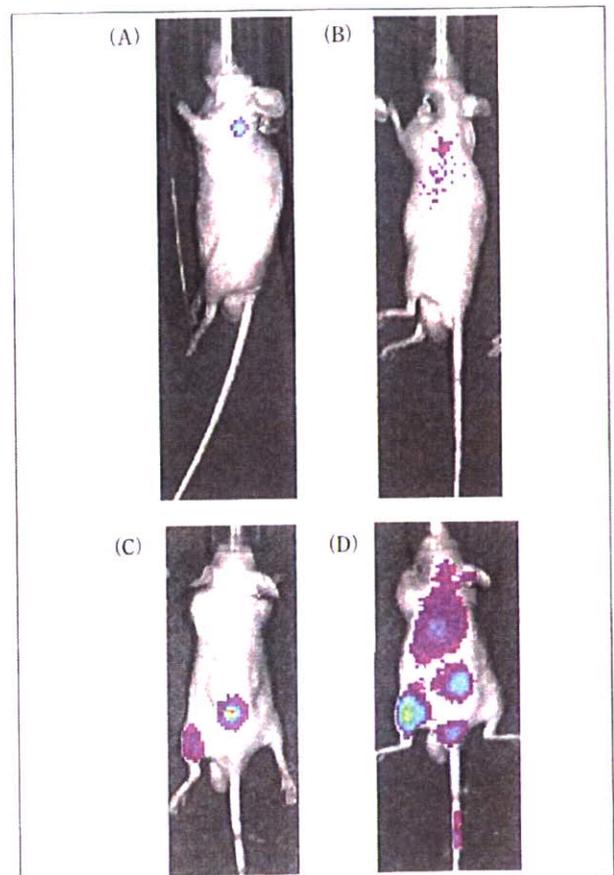


図5 ■ 担癌マウスでのペプトソーム、ペプチドミセルの体内動態

(A) ルシフェリンの化学発光による癌組織の位置 (左肩部)。(B) ICG ラベルしたペプトソーム (ポリ(サルコシン)-ポリ(メチルグルタマート)) を静脈注射した 2 日後の近赤外蛍光イメージ。(C) ルシフェリンの化学発光による癌組織の位置 (左脚と背中)。(D) ポリペプチドミセル (ポリ(サルコシン)-ポリ(アラニン)) を静脈注射した 2 日後の近赤外蛍光イメージ

正常な場合、注射した ICG の 80% 以上が 15 分以内に血中から消失する。

この ICG で標識したペプトソームあるいはペプチドミセルを担癌マウスに静脈注射し、蛍光観察により体内動態を調べた。注射後 2 日で癌組織へのペプトソームおよびペプチドミセルの集積化が明確に示された (図 5)。ペプトソームとペプチドミセルとを比較すると、ペプトソームのほうがバックグラウンドの発光が低く、ペプチドミセルよりも選択的に癌組織に送達されたと考えられる。この主な原因は、ペプトソームの粒径が 100 nm と大きく、血管からの漏出が癌組織に限定されているためと考えられる。また、ペプトソームに親水性の薬剤モデルを封入し、同様に体内動態を調べたところ、薬剤モデルはペプトソームと同じように癌組織に送達されていることが示された。したがって、ペプトソームは、癌組織に対する分子イメージングと DDS との両機能をもつナノキャリアとして有用であることが示された。

ペプトソームの血中滞留性は長いことが示されているものの、細網内皮系への取り込みを検討すると、肝臓への集積が認められる。ところが興味深いことに、疎水性膜をらせん形成ペプチドかららせん形成ポリ(乳酸)に変えたポリ(乳酸)ミセルは、体内動態が変化した。これらのナノキャリアでは、表面においてポリ(サルコシン)鎖がブラシ状に稠密にパッキングしているが、この状態が微妙に異なることで細網内皮系への取り込みも変化することが予想される。今後の進展が期待される。

水中での非イオン性ポリマー分子集合体

上述したように、ナノキャリア表面に存在する親水性ポリマーのコンホメーションや性質が、ナノキャリアの生体適合性をはじめとする諸特性に大きく影響している。ナノキャリアが高い生体適合性を示すには、化合物自身の生体適合性の他に、親水性ポリマーがブラシ型で稠密な薄膜を表面に形成することで、タンパク質などの血液成分の吸着が抑制され、一方毛細血管などを難なく通過するにはシェアに応じた可逆的変形が可能であることも重要と考えている。ペプトソームおよびラクトソームが長い血中滞留性を示したのは、疎水性ブロックがらせん構造をとり、分子鎖の絡み合いがないにもかかわらず稠密な膜を形成することが一つの重要な要因になっていると思われる。これにより、親水性ブロックはブラシ型となり、また剪断応力に対する弾性変形も可能になると説明できる。本稿では、非イオン性ポリマーによるベシクル構造に焦点を当てたが、その他のモルフォロジーも可能であり、ブラシ型親水性表面を有する新しい物性にも繋がることから、多様な応用が期待される。

本研究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における研究成果の一部を含む。

文献

- 1) H. Ringsdorf: *J. Polymer Sci. Symposium*, **51**, 135 (1975).
- 2) V. M. Kriwaczek, A. N. Eberle, M. Muller & R. Schwyzer: *Helv. Chim. Acta*, **61**, 1232 (1978).
- 3) A. D. Bangham & R. W. Horne: *J. Mol. Biol.*, **8**, 660 (1964).
- 4) A. J. Baillie, A. T. Florence, L. R. Hume, G. T. Muirhead & A. Rogerson: *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 863 (1985).
- 5) H. Yoshida, C.-M. Lehr, W. Kok, H. E. Junginger, J. C. Verhoef & J. A. Bouwstra: *J. Controlled Rel.*, **21**, 145 (1992).
- 6) T. Yuda, K. Maruyama & M. Iwatsuru: *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1347 (1996).
- 7) M. Harrison, D. Tomlinson & S. Stewart: *J. Clin. Oncol.*, **13**, 914 (1995).
- 8) S. Mumtaz, P. C. Ghosh & B. K. Bachhawat: *Glycobiology*, **1**, 505 (1991).
- 9) M. A. Chambers, D. C. Wright, J. Brisker, A. Williams, G. Hatch, D. Gavier-Widen, G. Hall, P. D. Marsh & R. G. Hewinson: *Vaccine*, **22**, 1063 (2004).
- 10) D. E. Discher & A. Eisenberg: *Science*, **297**, 967 (2002).
- 11) J.C.-M. Lee, H. Bermudez, B. M. Discher, M. A. Sheehan, Y.-Y. Won, F. S. Bates & D. E. Discher: *Biotech. Bioeng.*, **73**, 135 (2001).
- 12) L. You & H. Schlaad: *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 13336 (2006).
- 13) A. Koide, A. Kishimura, K. Osada, W.-D. Jang, Y. Yamasaki & K. Kataoka: *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 5988 (2006).
- 14) J.C.-M. Lee, M. Santore, F. S. Bates & D. E. Discher: *Macromolecules*, **35**, 323 (2002).
- 15) A. Huckriede, L. Bungener, T. Stegmann, T. Daemen, J. Medema, A. M. Palache & J. Wilschut: *Vaccine*, **23S1**, S1/26 (2005).
- 16) T. Ueno, M. Suzuki, T. Goto, T. Matsumoto, K. Nagayama & Y. Watanabe: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 2527 (2004).
- 17) K. Katagiri, M. Hashizume, K. Ariga, T. Terashima & J. Kikuchi: *Chem.-Eur. J.*, **13**, 5272 (2007).
- 18) T. Kidchob, S. Kimura & Y. Imanishi: *J. Controlled Rel.*, **51**, 241 (1998).
- 19) S. Kimura, Y. Muraji, J. Sugiyama, K. Fujita & Y. Imanishi: *J. Colloid Interface Sci.*, **222**, 265 (2000).
- 20) S. Kimura, D.-H. Kim, J. Sugiyama & Y. Imanishi: *Langmuir*, **15**, 4461 (1999).
- 21) K. Fujita, S. Kimura & Y. Imanishi: *Langmuir*, **15**, 4377 (1999).
- 22) H. Nishikawa, T. Morita, J. Sugiyama & S. Kimura: *J. Colloid Interface Sci.*, **280**, 506 (2004).
- 23) A. Makino, R. Yamahara, E. Ozeki & S. Kimura: *Chem. Lett.*, **36**, 1220 (2007).
- 24) M. I. Koukourakis, S. Koukouraki, A. Giatromanolaki, S. C. Archimandritis, J. Skarlatos, K. Beroukas, J. G. Bizakis, G. Retalis, N. Karkavitsas & E. S. Helidonis: *J. Clin. Oncol.*, **17**, 3512 (1999).
- 25) G. Tsai, H.-Y. Lane, P. Yang, M.-Y. Chong & N. Lange: *Biol. Psychiatry*, **55**, 452 (2004).
- 26) G. Blume & G. Ceve: *Biochim. Biophys. Acta*, **1146**, 157 (1993).
- 27) C. Yoshikawa, A. Atsushi, N. Ishizuka, K. Nakanishi, A. Kishida, Y. Tsujii & T. Fukuda: *Macromolecular Symposia*, **248**, 189 (2007).

「環境標的」としてのがんの微小環境

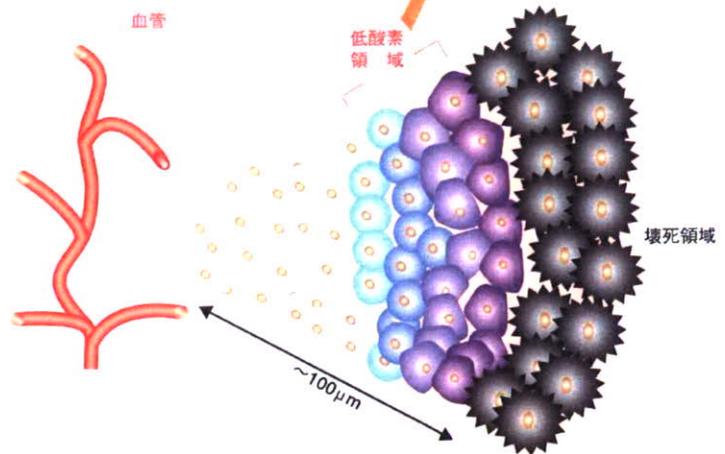
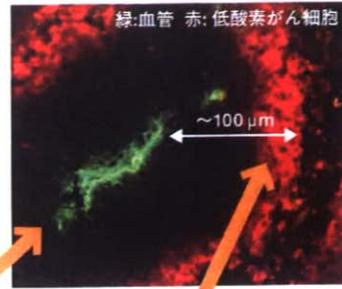
● 近藤科江 田中正太郎 平岡真寛

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

遺伝子やタンパク質分子が「分子標的」として、治療や診断に応用されている。「より小さいもの、より特異性の高い標的へ」という大きな流れのなかで、われわれは、あえて、マクロの雑多な細胞集団で構成される特殊な環境を、「環境標的」として、治療や診断用ツール開発の研究対象としている。なぜいま「環境標的」なのか？

固形腫瘍内部には慢性的な低酸素領域が存在する。この低酸素領域と、治療不良や再発との関連が初めて示唆されてから、半世紀以上が経過している。しかし、いまだに根本的な解決に至っていない。

1990年代前半に低酸素応答転写因子 HIF-1 (Hypoxia-inducible factor-1) が発見され、HIF-1 によって発現が誘導される遺伝子群の機能が、腫瘍全体の悪性化に深く関与することがわかってきた。固形腫瘍内の低酸素領域にある HIF-1 活性を有する細胞は、がん治療、とくに難治性のがんにおいて、きわめて重要な治療対象である。したがって、既存の抗がん治療効果を高め、再発・悪性化を予防するためには、固形腫瘍内の HIF-1 活性を有する細胞の情報を得て、的確な治療をおこなうことが非常に重要である。われわれは、HIF-1 活性を有する細胞を可視化し、がんの悪性度を診断するためのプローブを開発するとともに、がんの微小環境を標的とした治療法の開発をおこなっている。



転写因子
HIF
栄養
pO₂
薬剤

抗がん治療
抵抗性血管
新生亢進
転移・浸潤

図1

がんの微小環境

腫瘍切片を血管（緑）と低酸素がん細胞（赤）を認識する抗体で免疫染色すると、低酸素領域は、血管から100 μm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（写真）。低酸素領域にあるがん細胞は、抗がん剤が届きにくいという増殖が抑制され、さらに解糖系代謝をおこなっているため抗がん剤が有効に作用しにくく、放射線にも抵抗性である。また、低酸素がん細胞で活性化する転写因子 HIF-1 によって誘導される遺伝子の機能は、腫瘍の増殖・悪性化を促進する。

がんの微小環境と HIF-1

腫瘍細胞の無秩序な増殖と未熟な腫瘍血管の不規則な新生によって、固形腫瘍内部には、血管からの栄養や酸素が十分に供給されない領域が生じる。その結果、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がんの微小環境が形成される（図1）⁽¹³⁾。この領域にある細胞は、抗がん剤や放射線によるがん治療に対して抵抗性である⁽¹⁴⁾。したがって、放射線や抗がん剤治療の後に、周囲の活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、栄養や酸素が不足しているため、増殖を停止したり、解

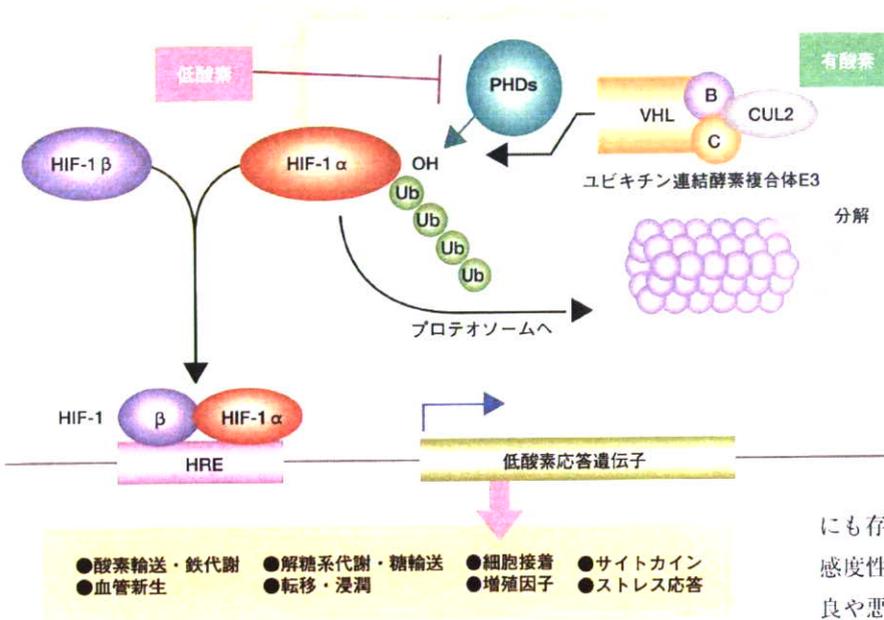


図2

HIF-1 転写活性と HIF-1α の酸素依存的分解機構

HIF-1 は、HIF-1α と HIF-1β の二つのサブユニットからなり、HIF-1α 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さまざま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 (PHDs) によって ODD ドメインのプロリン残基が水酸化され、それをめざ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-1α 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-1α は数分以内に分解される。

糖系代謝をおこなっている。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」は、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⁾。生理的酸素分圧下にある組織細胞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、転移や浸潤にかかわる遺伝子の発現を誘導して、自ら新天地を切り拓こうとする。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るのである。

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おこなわれ、現在までにすでに 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:

低酸素応答配列) をもっており、HIF-1 が HRE に結合し転写を促す (図 2)。

「環境標的」としての腫瘍内微小環境

腫瘍内の微小環境は、(1) 正常組織には存在しない (特異性)、(2) 固形腫瘍であれば、由来組織細胞に関係なく形成される (普遍性)、(3) 1mm 以下の小さい固形腫瘍にも存在することが実験的に示されている (高感受性の担保)⁽⁶⁾、(4) 上述したように治療不良や悪性化に関与している (治療戦略上の重要性)、という特徴をもつ。がんの微小環境に存在して、悪性化に関与しているのは、腫瘍細胞だけでなく、腫瘍血管、腫瘍支持組織、マクロファージなど、がんの微小環境を構成するすべてのものである。つまり、特定の分子で限定することができないため、「分子標的」治療では十分ではなく、環境を構成するさまざまなものを標的にする必要がある。つまり「環境標的」である。

上記の「特異性」、「普遍性」、「高感受性」を活用できれば、どこにできるかわからない原発がんや転移がんの診断や治療に有用である。「環境標的」研究は、診断においては、悪性度の指標として治療方針を決めるための情報提供を目的とし、治療の上では、悪性化の原因となる環境そのものの一掃を目的とする。

HIF-1α の酸素依存的タンパク質分解 (ODD) 制御

がんの微小環境を診断・治療するためのツールとして、われわれは融合タンパク質を用いている。タンパク質は、さまざまな機能をもっており、それに微小環境への特異性をもたせることで、タンパク質の機能をがんの微小環境で特異的に発揮させることができる。微小

環境への特異性をもたせるために、われわれは、HIF-1 α の ODD (oxygen dependent degradation: 酸素依存的タンパク質分解) 制御を利用している。

転写因子 HIF-1 は、 α 、 β の二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) の発現量は翻訳と翻訳後修飾レベルで厳密に制御されている^(7,8)。したがって HIF-1 の転写活性は 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、おもに酸素依存的なプロリン水酸化酵素 (PHDs) によってなされている。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⁽⁷⁾、この分子制御機構の詳細が解明されている⁽⁸⁾。すなわち、プロリン水酸化酵素 (おもに PHD2) が、有酸素状態では、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する。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、速やかに分解される (図 2)。

PTD-ODD 融合タンパク質の構築

われわれは、HIF-1 α の ODD ドメインの一部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」ODD 制御が可能な融合タンパク質を構築している⁽⁹⁾。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、細胞内でおこなわれる ODD 制御を受けることができない。そこで

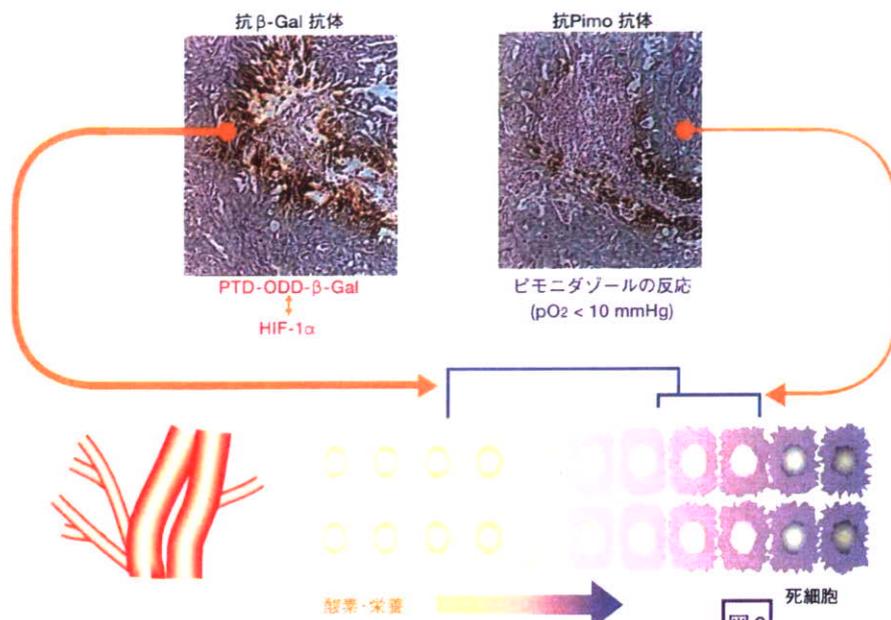


図 3 死細胞

ODD 融合タンパク質の腫瘍内局在

PTD-ODD- β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質を担がんマウスの腹腔内に投与し、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 -ガラクトシダーゼ抗体 (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、つねに 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 以下というきわ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よりも HIF-1 が活性化している領域がやや血管に近いことが報告されている。

タンパク質に、さらに膜透過性を付加する膜透過ドメイン (Protein Transduction Domain: PTD) を融合することによって、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。PTD をもつタンパク質は、生体内で効率よく全身にデリバリーされ、細胞内に入ることができると報告されている⁽¹⁰⁾。

PTD-ODD- β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質を構築し、それを担がんマウスの腹腔内に投与し、この融合タンパク質の体内分布と β -ガラクトシダーゼの酵素活性を調べた。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、腫瘍組織の低酸素領域だけでタンパク質と活性が確認できた (図 3)⁽⁹⁾。これらの結果は、われわれの設計通り、PTD-ODD 融合タンパク質は ODD 制御を受け、HIF-1 活性を有する低酸素細胞に特異的に分布・機能することができることを示している。

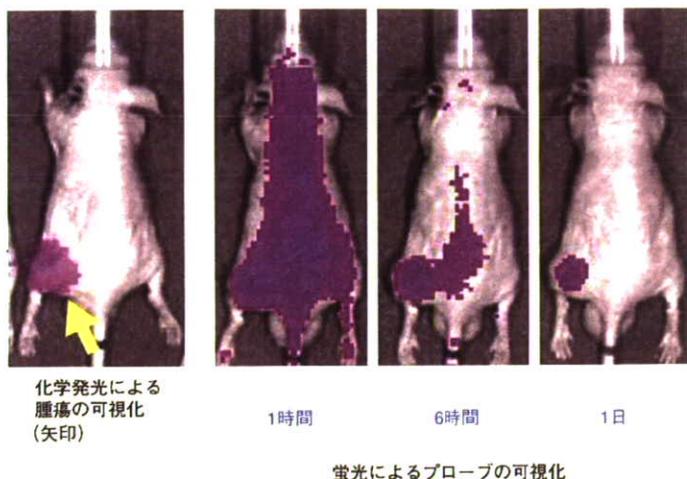


図4

バイオプローブとしてのPTD-ODD融合タンパク質

PTD-ODD融合タンパク質に近赤外蛍光色素で標識し、担がんマウスに投与すると、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内にデリバリーされたプローブは安定化して、がん細胞内に留まる。結果的に、投与後6時間で腫瘍（低酸素領域）がイメージングされる。腫瘍の低酸素領域は、化学発光により確認することができる（左端：方法については図5を参照）。

低酸素がん細胞のためのイメージングプローブの開発

上述したように、PTD-ODD- β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質は、HIF-1 α と同じODD制御を受け、HIF1活性をもつ細胞で安定に存在することができる。 β -ガラクトシダーゼの代わりにイメージング用の材料を付加することで、イメージング用のプローブを作ることが可能であると考えられた。

そこで、まずモデルタンパク質として、PTD-ODD-EGFPに近赤外蛍光色素をつけたプローブを試作した⁽¹¹⁾。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、近赤外蛍光で観察しても、有酸素細胞に比べて有意に高い近赤外蛍光を保持していることが確認できた。

このプローブを、担がんマウスに投与し、高感度CCDカメラを搭載した生体イメージング装置IVIS200で近赤外蛍光を観察すると、プローブの体内動態を経時的に観察することができる（図4）。投与直後は全身にプローブが運搬されるが、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、除去される。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おり、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。投与後約6時間で、がんにはプローブが蓄積しており（図4）、HIF-1活性を有する低酸素細胞にプローブが局在していることを腫瘍切片の免疫染色で確認している。プローブのがんへの集積は ^{125}I でラベルしたPET用PTD-ODDプローブでも同様に観察された。ただし、がんへの集積と同時に非特異的に肝臓や腎臓へのプローブの集積がみられる。これは、キャリアとして用いているEGFPの影響である。肝臓や腎臓で速やかに除去されるタンパク質とEGFPを入れ換えることで、非特異的に内臓に分布するイメージをなくすことに成功している。今後、実用化に向けたプローブの構築をおこなう予定である。

低酸素がん細胞の光イメージングによる可視化とターゲティング

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、治療上のターゲットを明確にすることができる。上述したHIF-1が結合する塩基配列HREをも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つな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5a）。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し、基質であるルシフェリンを投与後一定期間、発光反応をおこす。この化学発光を、IVIS200を用いて可視化することができる（図5b）。このシステムを用いることによって、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ex vivoで確認することもできる（図5c）。

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⁽¹²⁾。たとえば、ヒト由来の膀胱がん細胞SUIT-2に5HRE-ルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入したSUIT-2/5HRE細胞を作製し、膀胱に同所移植すると、移植されたマウスは腹

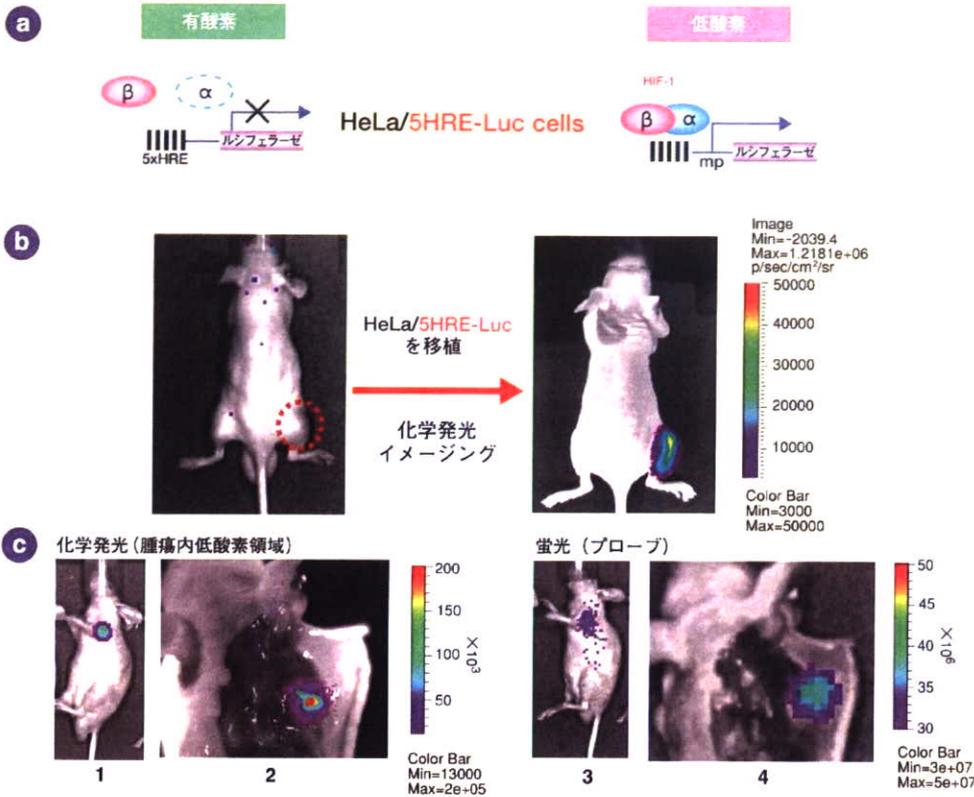


図5

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(p5HRE-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。この右足にみえるシグナルは、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、しがたつて、イメージは低酸素がん細胞を可視化していることになる。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。

(c) (a) と同様ルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞を移植し、化学発光で可視化し、腫瘍の位置を確認している(1)。近赤外蛍光標識したプローブを静脈注射して、プローブが最終的に腫瘍に集積することを確認する(3)。その後、解剖して、*ex vivo*で腫瘍の化学発光(2)とプローブの蛍光(4)の位置が一致していることを確認することができる。

*1

大腸・小腸・膀胱などの臓器の外側の膜や、それら臓器を一括して包んでいる腹膜に発生するがん。種を描いたように広がるので腹膜播種とよばれる。

膜播種*1と腹水をともなって、移植後7週間までに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、臓器に移植したがんの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ようすを、経時的に観察することができる(図6)。PTD-ODDにプログラム細胞死(アポトーシス)を誘導する酵素Procaspase-3を融合させることで、固形腫瘍内のHIF-1活性を有する低酸素細胞を特異的に死滅させることができる^(12,14)。その効果をIVISで観察すると、治療効果がきわめて明確に評価できる(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、同一マウスでの観察が可能のため、データの信頼性も高く、マウスにも優しく、経済性にも優れている。

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の発見を受けて、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。ここ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けの研究である。現在PTD-ODD融合タンパク質を用いたプロジェクト(図7)では、(1)上記の低酸素イメージング用プローブ開発⁽¹¹⁾、(2)低酸素がん細胞をターゲットとした抗がん剤の開発^(3,12,14)、(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おこなっている。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、臨床応用をめざして、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。