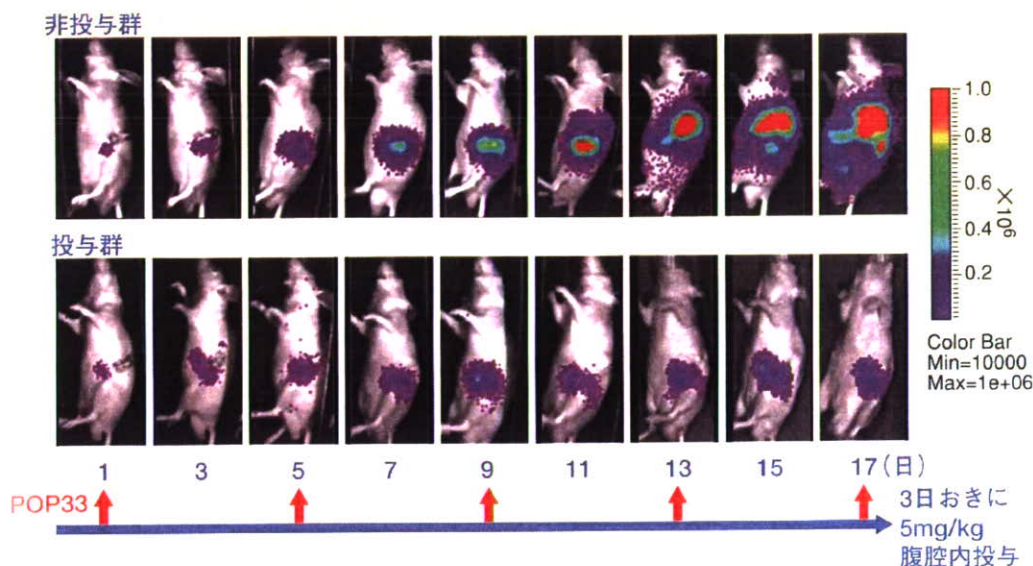


図6



低酸素がん特異的抗がんタンパク質製剤による膵臓がん転移抑制

図5aと同様のレポーター遺伝子を組み込んだヒト膵臓がん細胞株SUIT-2をヌードマウスの膵臓に同所移植すると、上段のように、膵臓から徐々に周囲、さら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膵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の投与実験をおこなうと(下段)、低酸素がん細胞の転移が抑えられ、膵臓に局在し続けることが確認できた。

Profile

こんどう・しなえ

1981年岐阜薬科大学卒業。免疫学療法に興味をもち、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、大阪大学微生物病研究所にて博士課程に入学し、がん化シグナルの研究を開始。その後、新技術事業団研究員、京都大学助手を経て、2004年に京都大学医学研究科21世紀COE特任准教授に就任し、低酸素イメージング研究を開始。腫瘍内低酸素領域のイメージング・ターゲティング研究を診断・治療に活かすための研究をおこなっている。

参考文献

- [1] Harris AL: "Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth" *Nat Rev Cancer* 2(2002)38-47
- [2] Brown JM & Wilson WR: "Exploiting tumor hypoxia in cancer treatment" *Nat Rev Cancer* 4(2004) 437-447
- [3] Kizaka-Kondoh S, Inoue M, Harada H & Hiraoka M: "Tumor hypoxia: A target for selective cancer therapy" *Cancer Sci* 94(2003)1021-1028
- [4] Semenza GL: "Targeting HIF-1 for cancer therapy" *Nat Rev Cancer* 3(2003)721-732
- [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(1992) 5447-5454
- [6] Padhani AR, Krohn KA, Lewis JS & Alber M: "Imaging oxygenation of human tumors" *Eur Radiol* 17(2007)861-872
- [7] Epstein AC et al: "C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation" *Cell* 107(2001)43-54
- [8] Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y & Poellinger L: "Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway" *J Biol Chem* 274(1999)6519-6525
- [9] Harada H, Hiraoka M & Kizaka-Kondoh S: "Antitumor effect of TAT-oxygen-dependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells" *Cancer Res* 62(2002)2013-2018
- [10] Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A & Dowdy SF: "In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse" *Science* 285(1999)1569-1572
- [11] 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(2007)64490Y1-64490Y8
- [12] Harada H, Kizaka-Kondoh S & Hiraoka M: "Optical imaging of tumor hypoxia and evaluation of efficacy of a hypoxia-targeting drug in living animals" *Mol Imaging* 4(2005)182-193
- [13] 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(2006) 5718-5722
- [14] Inoue M, Mukai M, Hamanaka Y, Tsubota M, Hiraoka M & Kizaka-Kondoh S: "Targeting hypoxic cancer cells with a protein prodrug is effective in experimental malignant ascites" *Int J Oncol* 25(2004) 713-720

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おこなう虚血性疾患治療薬開発(右)の三つがある。いずれも動物実験では、有効な結果を得ており、現在臨床応用に向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京都市地域結集型共同研究事業(URL: <http://www.wastem.or.jp/kyotokessyu/>)の一部として、京都大学医学研究科・放射線腫瘍学・画像応用治療学、平岡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。

概論

日進月歩で進むイメージング技術の 癌診断への応用—「形態を観る」時代から 「機能を診る」時代へ

21世紀は、形態を観る「形態画像」から、機能を診る「生体画像」へ画像診断が進化する時代である。20世紀に起こった技術革新は、各種の画像診断技術を急速に進化させ、生体内部の微細な構造までも鮮明に描出することに成功した。21世紀は、さらに、形態情報に機能情報を加えた「機能を画像化する時代」である。形態画像の中心であるMRI、PET、CTといったモダリティに加えて、「光」がマルチモダリティの1つとして加わることで、「機能の画像化」は、小動物レベルで加速度的に進んでいる。画像診断において「光」のできることは、現時点では限られているが、「光」の多様性を生かすことで、イメージングにまた革命が起こるかもしれない。

はじめに

20世紀は、画像診断が診断の中核として位置するようになった時代である。X線CT（コンピュータ断層撮影）の登場により人類は初めて体に傷をつけずに、体の断層像の撮影に成功した。さらに、MRI（磁気共鳴画像）の登場により、電離放射線を使用せずに、X線CTと同様に体内を見ることができた。「実際に物を見ること」の説得力やインパクトの大きさは、何百というデータをもってしても代え難い。人類のイメージングに対する驚愕と期待の大きさを反映して、これらのイメージング技術の発明に対して、ノーベル賞が与えられた。イメージングは、それ以降もすさまじい勢いで進歩し続け、超音波診断機器や、SPECT（単一光子放射断層撮影）、PET（ポジトロン断層撮像法）という核医学診断機器も、画像診断に大きなブレイクスルーをもたらし、日常診療になくしてはならないものになっている。これらの研究は、多くの知識や技術が結集されて成し遂げられており、今やイメージング研究は、臨床・基礎医学、機械、工学、情報、物理、化学、薬学、あらゆる領域の英知を結集しないと進んでいけない学際的研究分野となっている。

本章では、癌診断を中心に、イメージングの現状を、臨床の現場で画像診断をされておられる先生や、機器開発やプローブ開発を最先端で研究されている先生方に解説していた

【キーワード】

MRI, PET, SPECT, CT, US, 光

Ever-progressing imaging technology for cancer diagnosis : From 'morphology imaging' to 'function imaging'
Shinae Kizaka-Kondoh : Department of Radiation Oncology and Image-applied Therapy, Kyoto University Graduate School of Medicine (京都大学医学研究科放射線腫瘍学画像応用治療学)

だいた、現状と問題点を明確にさせていただくことで、これから研究を担っていく若い研究者の方々に、イメージング研究に関心をもってもらいたいと同時に、すでに確立された研究を行っておられる研究者の方々にも、イメージングを研究に取り入れるきっかけにしたいと願うものである。

1. 癌の画像診断の現状

わが国では、世界のどの国も経験したことがない速度で人口の高齢化が進行しており、2020年には、1年間に84万人が癌になると試算されている。一方で、癌と診断されてから5年以上生存する割合（5年相対生存率）は、約半数にのぼる。すなわち、癌の治療を終え、治った約40万人が、その後再発と転移の不安を抱えながら、長い人生を歩む時代がやってくることになる。

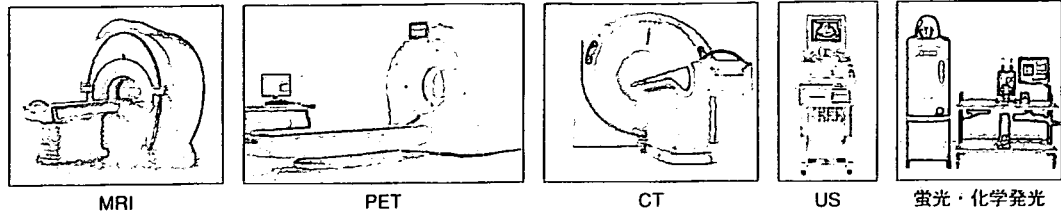
定期的なモニターによる癌の早期発見は、このようなハイリスク群のみならず、通常の検診で癌の早期発見を望んでいる予備群に対しても重要であることはいうまでもない。再発の多くは転移であり、また、組織特異性の高い腫瘍マーカー陽性の患者でも、腫瘍の位置を特定することは容易ではない。早期治療のための早期発見は、最終的には画像診断に頼らざるをえないのが現状であろう。つまり最低でも120万余の人が精密な画像診断を必要とすることになる。現在PET撮影を行っている施設は全国で121施設、MRI台数は約5,000台と報告されている。フル稼働しても十分な数とはいえない。需要と供給のギャップを埋めるために、「空間分解能」「感度」「定量性」「簡便性」の高いモダリティ（診断装置）の開発と検出感度を上げるためのプローブ開発が切望されている。

1) 画像診断の多様なモダリティ

現在臨床で用いられているモダリティについて、画像診断機器に必要な「空間分解能」「感度」「定量性」「簡便性」に注目して、図1に簡単にまとめた。臨床の現場では、PET、SPECT、MRI、CTが主流であるが、PET-CTのようにモダリティを組合わせて、欠点を補い、長所をより活かす方法がとられている（第4章-4）。簡便性・経済性・特に安全性に優れており、産婦人科にはなくてはならない超音波装置を用いて、「組織弾性」をイメージングすることにより、癌の診断に応用する研究も注目されている（第4章-2）。最近小動物での研究が急速に進んでいる光は、その簡便性、経済性、安全性、多様性を活かして、画像診断研究分野でも注目され始めている（第4章-5、6）。実際に、術中で蛍光標識した癌組織の完全除去の試行や、MRIとの融合による研究も進んでいる（第4章-3）。各モダリティを組合わせて、長所を活かした複合機の開発研究に期待が集まっている¹⁾。

2) 形態画像診断

MRIやCTを使った画像診断では、基本的に正常組織との違い（異常）を探し出すことで、癌を検出する手法（読影）がとられるため、小さな癌を見つけるためには、かなりの知識と経験が求められる。上述の画像機器の不足に加えて、さらに深刻なのは、「読影」ができる専門医の不足である。現在の画像診断は、例えば、全身撮像でだいたいの癌の場所が特定されたとしても、詳細な位置を決めるためには、断面画像、つまり体を輪切りにし



モダリティ	線源など	空間分解能	感度	定量化	簡便性	問題点
PET	高エネルギーγ線	低い	高い	高い (代謝の定量化: FDG-PET他)	低い (放射線使用による規制)	トレーサに短半減期のラジオアイソトープを利用, 生成にサイクロトロンが必要
SPECT	低エネルギーγ線	低い	高い (PETの1/10~1/100程度)	あり	低い (放射線使用による規制)	トレーサの半減期はPETより長い保存期間は限られる
MRI	電磁波	高い	低い	なし	低い (磁場利用)	CTと比較して, 画像取得に時間がかかる
CT	X線	高い	主に形態情報	あり (CT値)	低い (放射線使用による規制)	MRIと比較して, 軟組織のコントラストが低い
US	超音波	高い (表層)	主に形態情報	なし	高い	骨や肺のイメージは能力が限られる
光	蛍光 化学発光	高い (蛍光・表層) 低い (化学発光)	高い (表層)	低い (蛍光<化学発光)	高い	組織透過性が悪い (1~2cm程度), 臨床では内視鏡のみ

図1 生体イメージングに用いられているモダリティの特徴 (文献2から引用改変)

た面を画像にしたものを1枚ずつ「読影」して、「異常な形態=癌」を特定する必要がある。例えば、腹部に腫瘍があるかもしれない患者の断層写真を5 mm 間隔で150枚撮るとすると、150枚もの画像から、「正常と違う形態」ということだけを頼りに癌の位置や形状を決定することが期待されるわけである。したがって、癌の発見は、読影する医師の経験と能力と熱意に支えられているといっても過言ではない。もちろん、機器開発も研究が進み、機器の精度は日々向上している。しかし、機械の精度が上がっても、必ずしも医師の負担は減るわけではなく、5 mm 間隔だったものが、1 mm 間隔になれば、より正確な情報が得られ、より精度の高い治療につながるが、むしろ読影する医師の負担は増えることになる。

3) 生体画像診断

形態情報以外の生体情報、例えば代謝の情報を可視化することによって得られる生体画像は、画像診断に「特異性」をもたらしてくれた。PET/SPECTは空間分解能や簡便性が他のモダリティに劣るものの、感度や特異性で優れているため、癌治療のうえでは欠かせない診断技術になっている。特に2002年にFDG-PETが保険適用されてから、PETの導入施設は増加している。さらにPET/SPECTの空間分解能を上げるための機器開発研究や、より特異性を上げるためのプローブ開発におおいに期待が集まっている (第4章-1)。

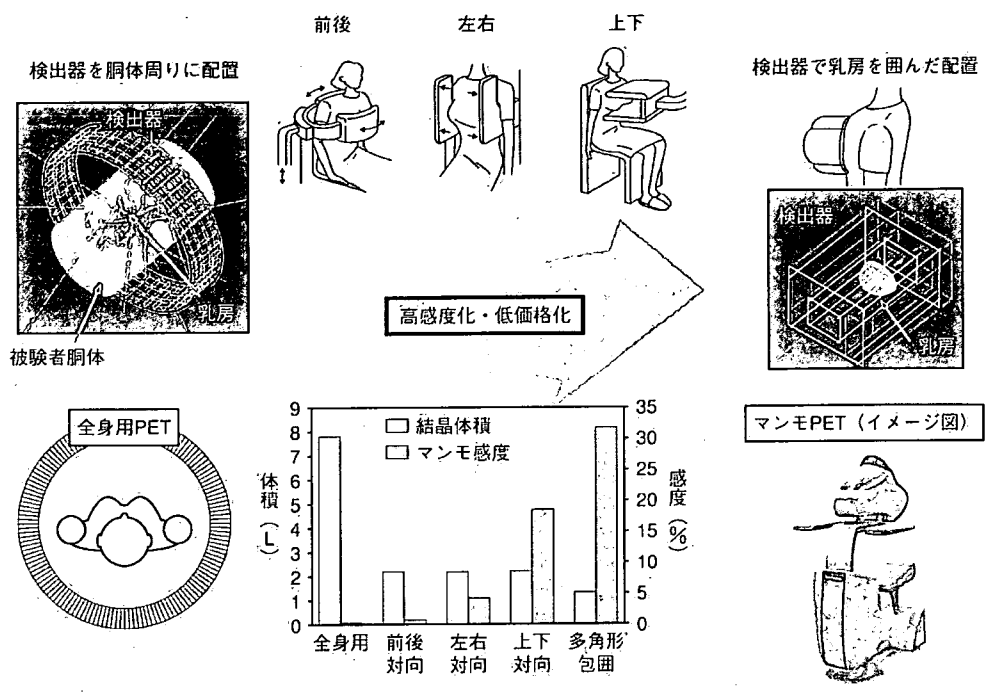


図2 近接撮像型PET装置 (マンモ用PET)
 島津製作所、放射線医学総合研究所、東京大学、京都大学が共同開発している乳癌診断用PET装置。光分配方式の多層DOI検出器を採用した世界初の臨床用PET装置を開発し、高感度と高解像度を両立させたマンモ用部位別PETの実現を目指している (提供：島津製作所、清水公治氏)

京都大学・NEDOの分子イメージング研究開発では、乳癌の感度をより高めた近接撮像型PET装置 (マンモ用PET) の開発が行われている (図2)。形態画像に特化していると思われるMRIも造影法や造影用薬剤の開発が進み、「特異性」という要素をもつことが可能になりつつある (第4章-3)。さらに、次に述べる「分子イメージング」の導入により生体画像は、生体機能画像として大きく飛躍する分野として特に注目されている。

2. 分子イメージング

上述したような読影する専門医不足と、限られた医療機関でしか画像診断が受けられない現状では、急増する需要に、とても追いつくことができない。そのためにも誰が見ても明らかに癌の存在を示唆できるような鮮明な画像を提供できる手法が切望されている。そこで、「分子イメージング」という手法が注目されている²⁾。分子イメージングとは「生体内で起こっている生理的または病的な生命現象を、体外から細胞レベル/分子レベルで捉えて画像化する手法」である。つまり、細胞レベル、分子レベルで明らかに周囲の正常組織とは異なる特徴を指標としてイメージングする手法である。分子イメージングのために、遺伝子解析およびケミカルライブラリーのデータをもとに、新規標的分子を探索・選択し、その標的分子を対象とした分子プローブを設計・開発することが求められている。

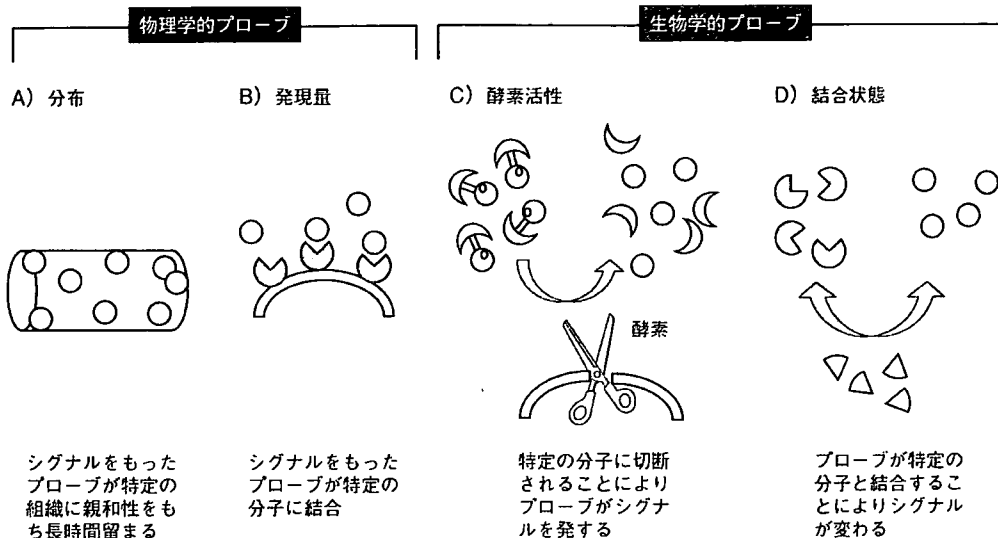


図3 分子プローブによるイメージング

物理学的プローブ：A) 組織を可視化するプローブ、B) 特定の分子に結合し、その分子の発現の位置・量・質の情報を可視化するプローブ。生物学的プローブ：C) 酵素の活性状態を可視化するプローブ→例えば、特定の配列を切断することで発光するようなプローブ、D) 因子の結合状態を可視化するプローブ→例えば、特定の因子に結合することで発光状態が変化するプローブ

このような背景の下、生体イメージングも、血流や組織環境といった臓器、組織レベルから、酵素、受容体などを含む情報伝達・生体調節に関するタンパク質、遺伝子という分子レベルへと研究が進展されつつあり、非侵襲的に疾患を分子レベルで画像として把握できるようになることが強く期待されている。このことは疾患の早期診断に結びつくとともに、個々の患者で、疾患の生物学的特性を分子レベルで明らかにすることも可能にする。将来的には、治療効果の予測、さらには個別化医療に有効な情報提供の手法としても期待されている。さらに、分子生物学を中心とした基礎研究が新しい分子プローブの開発に結びつけられて、その成果が臨床に活かされるとともに、臨床データが基礎研究の推進を促し、それらによって、相乗的により有効な分子プローブの開発につながれば、理想的なトランスレーショナルリサーチになる。

分子プローブの開発では、光プローブが一番進んでいる³⁾。それは、光が多様性と簡易性に富んでいるからであり、光プローブで解析できる小動物を用いた研究報告がイメージングで急速に増えていることにもつながっている。まず、光プローブで有用性の評価を行い、臨床応用できる他のモダリティに使えるもの開発していくという方向性もある。あるいは筆者のように、未来の光イメージングに大きなブレイクスルーが起こり、将来臨床に応用できるようになるのではないかという「夢」をもっている研究者も少なくない。

分子プローブを機能的に大別すると、物理的情報を得るためのプローブと、生物的情報をつかむためのプローブに分けられる(図3)。

1) 物理的分子プローブ

物理的特長を捉えるためのプローブ(図3A)は、例えばMRリンパ造影、血管造影(第4章-3)により、より詳細に病変周辺の形態情報を与えてくれる。最近では、形態情報を得ることが難しいと思われていた光イメージングでも形態情報を得るための分子プローブが開発されている(第4章-6)。しかし、前述したように、形態情報のみでの診断には限界があるため、分子プローブ研究で最も盛んに研究されているのは、標的細胞に存在する特定分子に結合するプローブである。特定の癌には「腫瘍マーカー」と称される分子の発現が高いものがある。それが細胞表面であれば、抗体や抗体に類するもの、分子に親和性の高いペプチドや化合物を用いて特異的に結合するプローブをつくり、目的の分子の存在情報(位置・量・質)を得ることができる(図3B)。特異性の高い分子プローブをつくることできれば、画像診断に画期的な進歩をもたらすことができる。また、これらのプローブは標識する材料を磁性体、放射性化合物、近赤外蛍光化合物に変えることで、それぞれMRI、PET、光とモダリティも多様に使うことができるため、新たな機器開発の方向性を示すことにもつながる。

2) 生物学的分子プローブ

生物学的情報をつかむためのプローブは、生体機能に付随する現象を分子レベルで可視化するためのものである(図3C、D)。多様性に富んだ光イメージングでは、蛍光タンパク質や消光現象を利用して、特定の因子(例えばタンパク質分解酵素、タンパク質リン酸化酵素、シグナル伝達因子)の生物学的活性の変化を、発光現象のON/OFFとリンクさせることができる基質プローブが開発されている^{41)~61)}。それら基質プローブを用いて、生体内での生物学的現象(例えば、アポトーシス、血管新生、転移)を可視化できることが、マウスを用いた生体イメージング実験で報告されている^{31)~51)}(第4章-6)。今後、これらのプローブがより臨床に近い形に開発されていくことが望まれている。

3. 未来の画像診断

1) 理想的な画像診断

現在癌の画像診断が目指している理想は、「癌がなければ画面にはなにも写らず、イメージとして画面に映し出されたら、そこに癌がある」というきわめて簡単な画像診断を提供でき、しかも癌の組織特異性に左右されず、どのような癌でも早期に感度よく検出が可能なものである。実現すれば、コンピュータに判定をまかせておけるため、「読影」のストレスから解放され、画面を凝視する必要もない。画面上にある一定以上のシグナルが出た時点で、コンピュータが自動的にチェックして知らせてくれる。また、必要に応じて画像を三次元構築して、実際の状況に合った形で示してくれる。夢のような光景である。分子プローブ開発研究がそれを可能にする鍵を握っている。

2) 「空間分解能」「感度」「定量性」重視の画像診断機器

一方で、上述した画像診断の需要と供給のギャップを埋めるためには、機器開発研究も必須である。機器開発には、大きな流れとして、3つの方向性が必要であろう。1つは全

身診断を前提とした精度の高い機器開発である。精度の高い治療につなげるためには、上述した「空間分解能」「感度」「定量性」を兼ね備えた画像機器で、詳細で正確な画像診断を行うことが求められる。精度の高い機器開発は、マルチモダリティの方向にあり、現状では、大型機器に頼るしかない。したがって、「簡便性」は課題として残されることになる。一方で、上述の高性能のマノモ用PET（図2）のように、精度の高い機能を備えたまま、特定の癌に特化した診断機器の小型化による「簡易性」の向上も当然重要であり、2つ目の方向性といえる。

3) 「感度」「簡便性」重視のユビキタス画像機器

しかし、これまで述べてきたように、転移を含め、どこにあるかわからない癌を診断する必要がある多数の患者の需要にこたえるためには、「感度」と「簡便性」に富んだ機器で対応する必要がある。3つ目の方向性は、集団検診で使用可能な、「どこでも、いつでも、簡単に、安く」使用できるポータブルなユビキタス機器の開発である。精度の高い画像機器を有効に使うためにも、精度の高い画像診断を必要とする患者を正確に絞り込む必要がある。例えば、離島でも遠隔地でも、簡単に運びこめ、操作に高い専門性を有さず、「癌の有無」と「おおまかな位置」の情報を正確に与えてくれる「特異性の高い」機械の開発が必要である。「有」と判定された人のみが、大型機器のある病院に出向き、病変の正確な位置や病状を診察することで、効率よく画像診断を早期診断、早期治療につなげることができる。「ポータブルで、ベッドサイドでも使える」ユビキタス医用画像診断機器開発も、目指すべき方向性の1つであることは間違いない。

おわりに

今回は触れなかったが、分子プローブ開発と機器開発の他に、得られた莫大な量の画像データを処理するソフトウェアの開発も、画像診断の大きな鍵を握っている。これらの分野の研究者の英知を集めれば、そう遠くない未来に、画像診断の部屋から、液晶画面とにらめっこしてドライアイに悩まされる医師の姿はなくなり、医師は「より正確な診断に基づく、よりの確な治療」という本来の使命に専念することができるようになるであろう。そればかりでなく、よりよいイメージングのための情報提供や、新規プローブ・新規画像診断機器を評価する研究に時間を割くことが可能になる。この情報提供や研究は、すべての開発研究の要であり、効率のよい研究開発には必須である。分子イメージング研究は、まだ始まったばかりである。日本では2006年5月に、日本分子イメージング学会（藤林靖久会長）が設立され、ようやく土台ができつつある若い研究分野である。これからの若い研究者の力を得て発展していくことを期待したい。

文献

- 1) Cherry, S. R. : Annu. Rev. Biomed. Eng., 8 : 35-62, 2006
- 2) Massoud, T. F. & Gambhir, S. S. : Genes Dev., 17 : 545-580, 2007
- 3) Rao, J. et al. : Curr. Opin. Biotechnol., 18 : 17-25, 2007
- 4) Jiang, T. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101 : 17867-17872, 2004
- 5) Weissleder, R. et al. : Nat. Biotechnol., 17 : 375-378, 1999

6) Massoud, T. F. et al.: Curr. Opin. Biotechnol., 18: 31-37, 2007

<著者プロフィール>

近藤科江：1981年岐阜薬科大学卒業。免疫学療法に興味をもち、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、大阪大学微生物病研究所にて博士課程に入学し、がん化シグナルの研究を開始。その後、新技術事業団研究員、京都大学助手を経て、2004年に京都大学医学研究科21世紀COE特任准教授に着任し、低酸素イメージング研究を開始。腫瘍内低酸素領域のイメージング・ターゲティング研究を診断・治療に生かすための研究を行っている。

5. 腫瘍の悪性度を可視化する 低酸素イメージング

近藤科江, 田中 正太郎, 平岡眞寛

より小さい癌の画像化が、早期診断の要であり、早期治療にとって重要である。現在の画像診断は、「位置と大きさ」という物理的情報に重点が置かれている。もう一步踏み込んで、検出された癌がどのような癌であるかという質的情報を得ることができれば、治療方針を立てるうえで有用である。固形腫瘍に共通して存在する『低酸素』は、正常組織には存在せず、悪性度の高い癌でより多く含まれる。この『低酸素』を感度よくイメージングすることができれば、初期の癌や転移癌の早期発見に貢献できるのみでなく、的確な治療のための情報を提供することができる。

はじめに

特定の癌に特徴的な分子を標的にした治療薬、いわゆる分子標的治療薬の研究開発は、癌治療に大いに貢献している。またイメージングにおいても、分子プローブ開発は、「特定の分子に対するプローブの開発」を意味しており、『分子標的』の概念が主流である。一方で、『低酸素』は、由来する組織に関係なく癌に共通して存在し、1 mm以下の小さい癌にも存在することが実験的にも示されている¹⁾。したがって、感度よくイメージングすることができれば、悪性度の高い

癌や転移癌を早期に発見できると期待される。特定の分子を標的にする『分子標的』に対して、われわれの標的は『環境標的』といえる。

本稿では、『低酸素』を指標とする癌の画像診断について、現在臨床応用が行われている¹⁸F-MISO-PET、Cu-ATSM-PETの知見と、われわれが独自に開発している「悪性化の指標」であるHIF-1活性をイメージングする新規プローブ研究を中心に述べる。

【キーワード&略語】

低酸素, HIF-1, ¹⁸F-MISO, Cu-ATSM, PTD-ODD

¹⁸F-MISO : ¹⁸F-fluoromisonidazole (F-18-フルオロミソニダゾール)

Cu-ATSM : Cu-diacetyl-bis (N¹-methylthiosemicarbazone)

HIF-1 : hypoxia inducible factor-1 (低酸素誘導因子)

HRE : hypoxia responsive element (低酸素応答配列)

ODD : oxygen-dependent degradation (酸素依存的分解)

PTD : protein transduction domain (タンパク質膜透過ドメイン)

Hypoxia imaging as an indicator of malignancy

Shinae Kizaka-Kondoh/Shotaro Tanaka/Masahiro Hiraoka : Department of Radiation Oncology and Image-applied Therapy, Kyoto University Graduate School of Medicine (京都大学医学研究科放射線腫瘍学画像応用治療学)

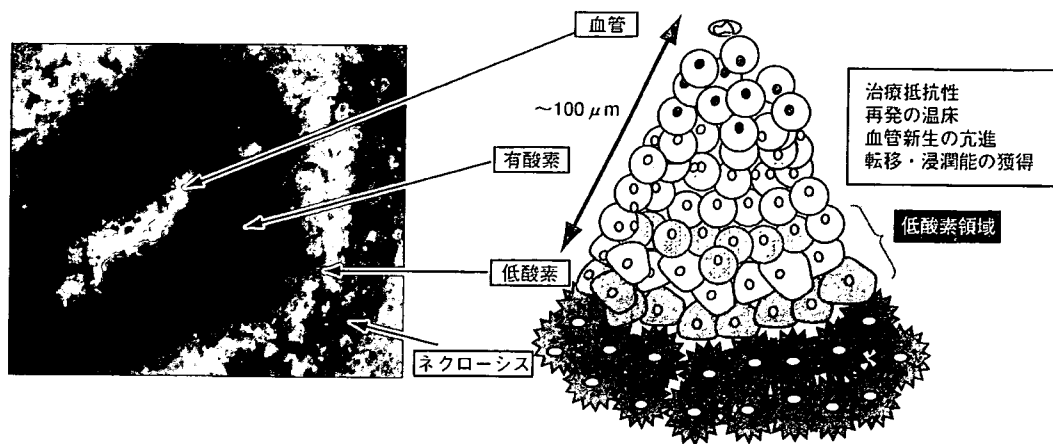


図1 癌の微小環境 (文献14 から転載)

腫瘍切片を血管と低酸素癌細胞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 程度離れた領域に带状に存在することがわかる (左図)。低酸素癌細胞は、抗癌剤治療や放射線治療に抵抗性である。また、低酸素癌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、腫瘍全体の増殖・悪性化を亢進する

癌の微小環境

1) 低酸素領域にある癌細胞の性質

i) 低酸素領域とは

Fearon-Vogelstein のクローナル理論に基づくと、腫瘍は遺伝子変異を受けた1つの癌細胞が無秩序に増殖して形成される。したがって腫瘍は、培養された細胞集団のように均一な癌細胞の集団で形成されるべきものであるが、実際は、ある一定以上の大きさになると、増殖するために血管や基盤が必要になる。腫瘍内血管は、正常組織血管のように秩序正しく、均一に張り巡らされるわけではなく、太さも分岐もきわめて不均一で、無秩序な分布をしている。そのために、血管から供給される酸素や栄養が十分行き届かない領域ができ、腫瘍特異的微小環境が形成される。その領域にある癌細胞は、環境に適応するため異なる性状を示すようになり、腫瘍はきわめて不均一な細胞の集団から構成されている (図1)。

ii) 低酸素癌細胞

非常に小さな癌 (数ミリ以下) でも通常ではありえないような低酸素状態が存在する。癌の由来組織や細胞の種類により多少の差はあるものの、癌の微小環境は、正常組織には存在しない異常な低酸素・低 pH・低グルコースによって特徴づけられる。そのような環

境にある細胞は、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癌細胞に比べると「死ぬべき運命にある弱った癌細胞」である。しかしながら、この「死ぬべき運命にある弱った癌細胞」が、実は癌全体の悪性度を高める「悪質な癌細胞集団」であることが最近の研究からわかってきたのである。

これらの癌細胞 (低酸素癌細胞) は、癌治療に対して抵抗性である。血流にのって運ばれる抗癌剤は、血管から遠い低酸素癌細胞までは効率よく運ばれないため、低酸素癌細胞において有効な濃度に達する機会が少ない。また、多くの抗癌剤は、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癌細胞では有効に作用しない。さらに、酸素分子により細胞傷害性が増強される放射線やある種の抗癌剤では、その治療効果が十分に発揮されない。したがって、放射線や抗癌剤治療の後に、周辺の活発に分裂していた癌細胞が死滅しても、低酸素癌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^{21~23)}。

2) 転写因子 HIF-1

i) 低酸素癌細胞の死からの回避

低酸素癌細胞は、「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

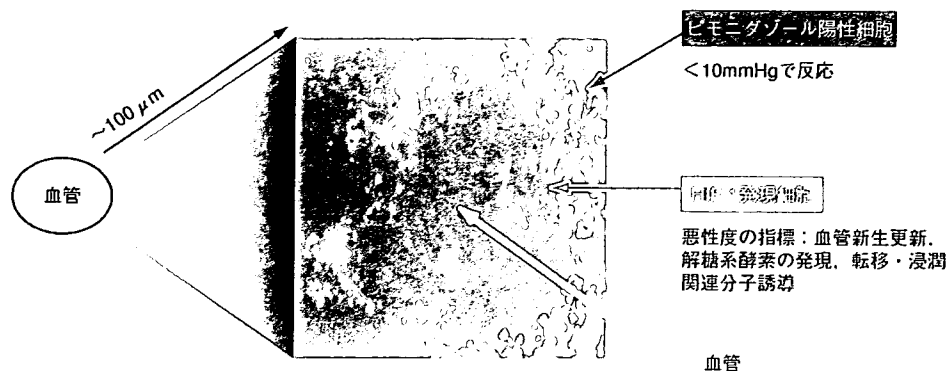


図2 腫瘍内低酸素領域内の分類 (巻頭カラー図11参照)

低酸素領域には、HIF-1が活性化している比較的マイルドな低酸素領域(赤)と10 mmHg未満の極度の低酸素領域(緑)に分けられる

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。正常な環境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の産生を促したりして、栄養環境の改善を図る。また、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、自ら新天地を切り開こうとする。低酸素癌細胞の「生き残り」のための行動が、癌全体の悪性化につながっていたのである。

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行われ、現在までにすでに60以上が報告されている⁵⁾。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〔低酸素応答配列(HRE: hypoxia responsive element)〕をもっており、HIF-1がp300/CBPとユニットをつくってHREに結合し転写を促す。

ii) HIF-1の活性制御

HIF-1は、 α β の2つのサブユニットからなる。 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⁵⁾ ⁶⁾。したがって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(後述)。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。転写活性制御は酸素依存的

なアスパラギン酸水酸化酵素(FIH)による抑制と、MAPキナーゼ(MAPK: mitogen-activated protein kinase)を介する活性化が知られている。翻訳レベルの制御は酸素非依存的で、増殖因子などによるホスファチジルイノシトール3キナーゼ(PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase)やMAPKを介するシグナル伝達系の活性化が関与している。

3) 腫瘍内低酸素領域とHIF-1活性領域

血流によって運ばれる酸素や栄養は、血管から漏れ出て、最終的には拡散によって細胞に運ばれる。酸素濃度や栄養量は、血管に近い細胞により消費され、血管から離れるにつれて、徐々に減少していき、やがて酸素も栄養も枯渇して壊死していく細胞領域ができる。

最近の研究で、これまで漠然と『低酸素』といわれていた領域が、主にHIF-1が活性化している領域と低酸素マーカーとして有名なニトロイミダゾール化合物(ピモニダゾールなど)が反応する領域に分けられることがわかった⁷⁾(図2)。ニトロイミダゾール化合物は、古くから放射線増感剤などに使用されている化合物であり、10 mmHgというきわめて低酸素で、細胞内の還元酵素により還元され、任意のタンパク質やRNAに共有結合する。一方で、HIF-1活性は上述したように、低酸素条件下で安定化するHIF-1 α タンパク質の量により制御されており、HIF-1 α 抗体で認識された領域は、HIF-1活性領域と同一とみなせる(図2)。

② 低酸素イメージングプローブ

現在臨床で使用されている低酸素イメージングプローブは、fluoromisonidazole (^{18}F -MISO) と Cu-diacetyl-bis (N^1 -methylthiosemicarbazone, Cu-ATSM) がPET プローブとして臨床応用の段階に入っている。

1) ^{18}F -MISO

^{18}F -MISO は、分子量の小さい化合物であり、分散で速やかに全身に広がり、細胞内にも自由に入っていく。全身投与2時間後には、腫瘍組織に分布する。上記のニトロイミダゾール化合物であり、細胞内の酸素濃度が10 mmHg未満のときに細胞内のタンパク質やRNAに結合し蓄積する。したがって、 ^{18}F -MISOが蓄積する腫瘍内の領域は、壊死領域に隣接する領域である。 ^{18}F -MISOがどれくらい細胞内に留まるかは、細胞内のニトロ還元酵素(nitroreductase)活性に依存している。つまり、イミダゾール環の NO_2 基がどれくらい還元状態になっているかに依存している(図3A)。 ^{18}F -MISO-PETは、放射線治療中の肺癌における低酸素状態の変化をモニターするのに使用できたとの報告がある⁸⁾。また、肉腫や頭頸部癌において、放射線や抗癌剤による治療不良と ^{18}F -MISOの取り込みに関連があることも報告されている(文献1)のReview参照)。

2) Cu-ATSM

Cu-ATSMは、最初に藤村らによって報告され⁹⁾、腫瘍内の低酸素状態をPETで画像化する方法としては、信頼性の高い試薬である。米国食品医薬品局(FDA: Food and Drug Administration)は、最近 ^{64}Cu -ATSMを癌の低酸素イメージング治療薬として承認した。原理は図3Bに示したように、低酸素細胞内で還元されたCu(I)が可逆的に細胞内にトラップされることによる。Cuの同位元素は種類が多く、 ^{64}Cu の半減期が12.74時間、 ^{62}Cu の半減期は約10分である。したがって、 ^{62}Cu -ATSM撮像後にFDG(^{18}F -fluorodeoxyglucose)を投与すれば、同日検査可能である。図3Cは、同一患者の ^{62}Cu -ATSM-PETとFDG-PET画像を並べたもので、同一の領域にシグナルがみられる。FDG-PETが腫瘍の大きさの情報を与えてくれるとすると、Cu-ATSMは腫瘍内低酸素領域の情報を与えてくれる。肺癌、子宮頸癌を用いた臨床

試験では、治療効果を予測する指標となることが報告されている。

③ HIF-1 活性を指標とした低酸素イメージングプローブの開発

1) 酸素依存的タンパク質分解機構

われわれは、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: PHD1~3)がクローニングされ¹¹⁾、詳細な分子制御機構が解明されている¹²⁾。

すなわち、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アソームに運ばれて分解される。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制御はきわめて厳密で、低酸素下で安定化したHIF-1 α は、有酸素にすると数分以内に分解される。このきわめて厳密なODD制御機構を応用して、低酸素癌細胞特異的イメージング・ターゲティング材料のPTD-ODD融合タンパク質の構築が始まった。

2) PTD-ODD 融合タンパク質の構築

i) PTDとODDの融合

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、任意のタンパク質の機能をHIF-1 α と同様のODD機構で制御することができることを世界で初めて報告し¹³⁾、細胞死を誘導するタンパク質とODDの融合タンパク質がHIF-1活性を有する細胞のターゲティングに有効であることを示してきた^{13)~17)}。通常、タンパク質を全身投与しても、細胞内には入らず、排泄される。ODD融合タンパク質は、生体内で細胞内に入らなければODD制御を受けることができない。したがって、任意のタンパク質を細胞内に輸送することができるタンパク質膜透過ドメイン(PTD: protein transduction domain)を融合させた。マウスを用いた実験で、PTD融合タンパク質を腹腔内に注射すると、脳を含む全身の組織細胞に融合タンパク質をデリバリーできることが報告

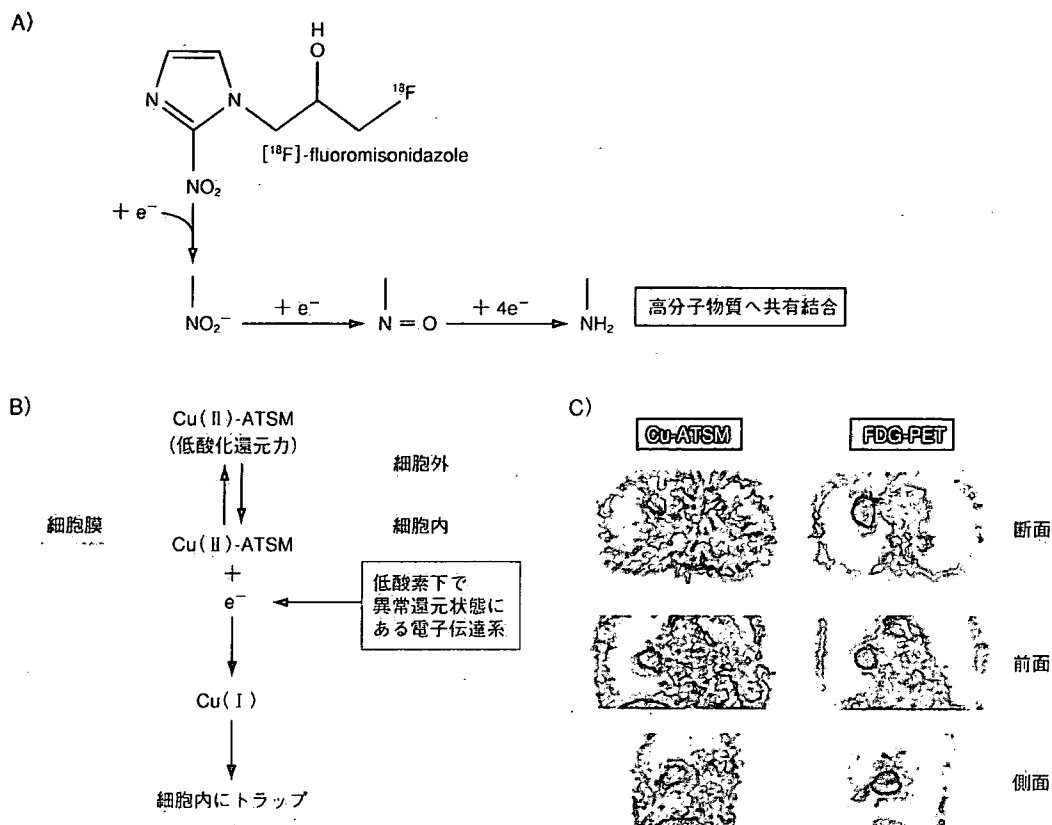


図3 腫瘍内低酸素画像化のためのPET試薬

A) ¹⁸F-MISOの低酸素細胞内での共有結合：ミソニダゾールは、低酸素状態でニトロ基が代謝還元されて、極性の高いアミンとなり、細胞内高分子物質（タンパク質やRNA）と結合することによって細胞内に蓄積する。B) Cu-ATSMの低酸素応答性（資料提供：放射線医学総合研究所：古川貴子博士）：Cu-ATSMは、脂溶性低分子錯体であり、血液脳関門を始めとする生体膜を容易に通過できるが、正常細胞では滞留しない。低酸素状態の細胞内で、ミクロゾーム電子伝達系酵素により、2個の銅が1個の銅に還元され、キレートからはずれて、遊離した1個の銅が細胞内にトラップされる。C) Cu-ATSM画像：右中葉の肺癌像（右上縦隔にリンパ節転移）を認める。FDG-PET（右図）では原発巣、転移巣ともに強い集積を認め、病巣の集積は比較的均一であるが、ATSM-PET（左図）では原発巣に関しては右側下部に強い集積を認め、上部内側は比較的低い集積と、明らかな差を認める（集積の高い部位が低酸素領域であることを示唆）。⁶⁴Cuの半減期は約10分であるので、Cu-ATSM撮像後にFDG投与すれば、同日検査可能（画像提供：福井大学高エネルギー医学研究センター・岡沢秀彦博士）

されている¹⁹⁾。

ii) PTD-ODDの挙動

われわれは、PTD-ODD融合タンパク質の生体内でのデリバリー効率と、低酸素癌細胞への特異性を検証するために、PTD-ODD-β-ガラクトシダーゼ融合タンパク質を構築し、それを担癌マウスの腹腔内に投与し、融合タンパク質の体内分布とβ-ガラクトシダーゼ活性を調べた。その結果、ODDを付加していないタンパク質を投与した場合、正常肝組織と腫瘍組織

全体で、タンパク質とその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、腫瘍切片の一部のみβ-ガラクトシダーゼのタンパク質とその活性が確認できた¹²⁾。

低酸素マーカーとして汎用されているニトロイミダゾール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、ピモニダゾールと似た領域に、β-ガラクトシダーゼタンパク質が存在していることがわかった（図4）。免疫染色された部分を

4
イメーシングによる診断の現状と
診断法開発研究

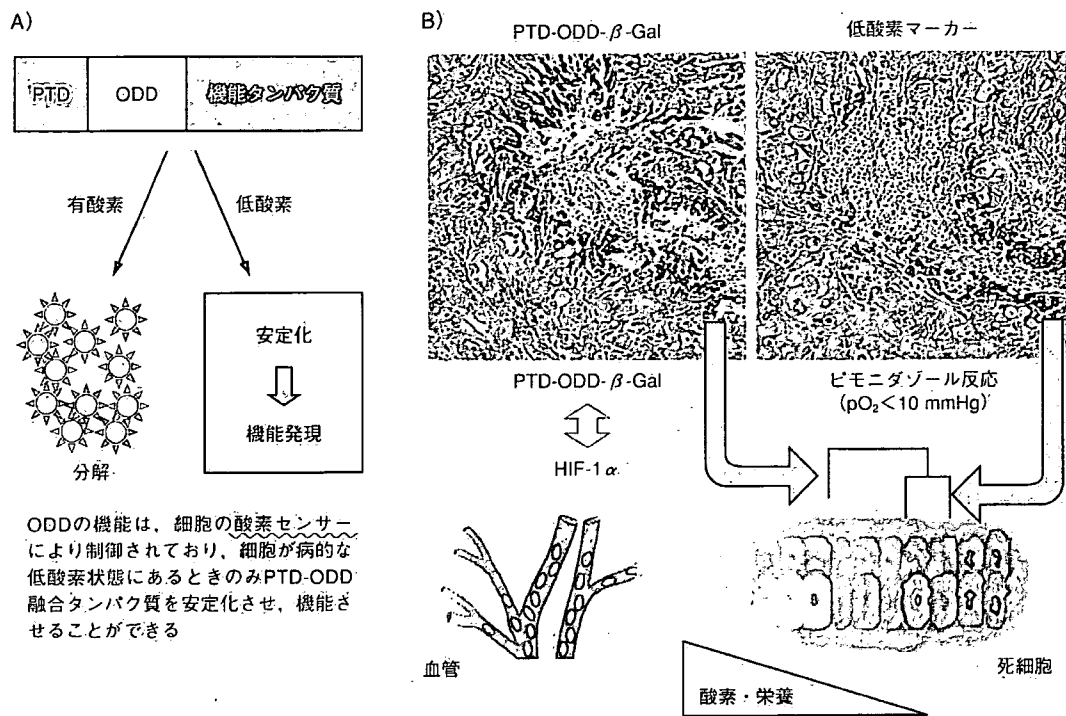


図4 PT-D-ODD融合タンパク質の腫瘍内局在

A) PT-D-ODD融合タンパク質は、有酸素細胞内では速やかに分解され、低酸素細胞内では安定化し機能を発揮することができるように設計されている。B) PT-D-ODD-β-ガラクトシダーゼタンパク質を担瘤マウスの腹腔内に投与し、4時間後に腫瘍を取り出し、腫瘍切片をβ-ガラクトシダーゼタンパク質(左)と低酸素マーカー(ピモニダゾール)(右)に対する抗体で免疫染色した。図2のHIF-1とピモニダゾールの関係のように、β-ガラクトシダーゼタンパク質がある領域は低酸素マーカーが認識する領域よりも血管に近い方に広く分布している(文献12から転載)

比較すると、PT-D-ODD融合タンパク質が分布している腫瘍内領域は、低酸素マーカーのピモニダゾール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。これらの結果は、前述した「HIF-1活性をもつ低酸素細胞は、還元酵素が機能する(すなわちイミダゾール化合物が還元反応を起こす10 mmHg以下)領域とは同一ではない」こととよく一致しており、われわれの設計通り「PT-D-ODD融合タンパク質はHIF-1αと同様のODD制御を受け、HIF-1活性を有する細胞に特異的に分布・機能する」ことを支持している。

3) PT-D-ODD融合タンパク質による低酸素イメージング

われわれはさらにPT-D-ODD融合タンパク質に近赤外(NIR)蛍光標識をつけたプローブを構築してい

る(図5 A)。担瘤マウスにこのプローブを投与して、高感度CCDカメラを搭載した光イメージング装置を用いて、プローブの体内動態を経時的に観察している(図5 B)。また、最適化された状態ではないものの、低酸素腫瘍を捉え、HIF-1活性を有する細胞を可視化することに成功している。また、放射性同位元素をつけたPT-D-ODD融合タンパク質の生体内動態を観察した場合でも、同様に腫瘍特異的イメージを得ることができている。今後さらに、融合タンパク質の生体内動態を、忠実にイメージングできる蛍光標識を選定し、近赤外蛍光イメージングツールとして、動物用の低酸素イメージングプローブ試薬として、また、PETやMRI用の標識を付加することで、臨床応用ができるプローブとして開発していく予定である。

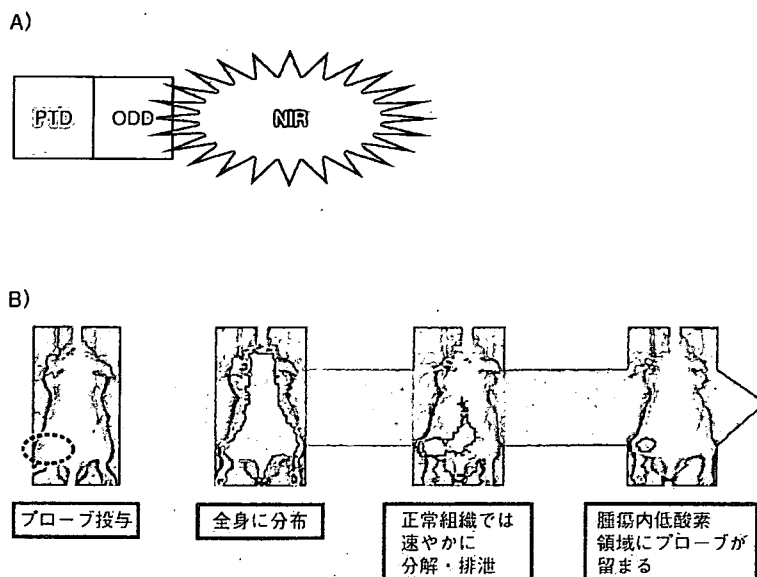


図5 腫瘍低酸素領域の *in vivo* 蛍光イメージング

A) PTD-ODD 融合タンパク質に近赤外 (NIR) 蛍光色素をつけて、光バイオプローブを構築した。B) スードマウス前肢皮下にヒト子宮頸癌細胞 (HIF-1 のレポーター遺伝子ルシフェラーゼを発現) を移植し腫瘍を形成させた。ルシフェラーゼの発光を検出することで、腫瘍内部での HIF-1 活性を確認した (左端写真の [] 印)。低酸素特異的蛍光プローブを静脈投与し経時的に蛍光イメージを撮影した。プローブ投与後 3~6 時間で周辺組織に対する腫瘍の蛍光コントラストは増大し、12 時間程度まで持続した

おわりに

われわれの体を構成する組織は、さまざまな酸素濃度で維持されている。一言で「低酸素」といっても、「これ以下が低酸素」というように、数値で「低酸素」を一律に定義することはできない。例えば、本稿で述べた酸素センサーが「酸素が不足している」と感知する濃度は、各組織細胞で異なるため、HIF-1 活性が確認できる酸素濃度は、細胞によって異なる。プローブの高感度化を図るためには、生体応答を感度よく捉えることが必要である。例えば、「低酸素」という現象に付随する生物学的変化 (低 pH, 低グルコース, 高ラクトースなど) を感知するプローブの開発は有用である。現時点で、特異性が高いが、感度が十分でないバイオプローブでも、将来イメージング機器の開発が進み、生体応答を今の何倍も感度よく観察することができるようになれば、より正確に病態を反映したイメージングができるようになると期待される。

謝辞

ここで紹介したわれわれの研究は、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 (<http://www.astem.or.jp/kyotokessyu/>) の一部として、京都大学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。

文献

- 1) Aadhani, A. R. et al.; Eur. Radiol., 17; 861-872, 2007
- 2) Thomlinson, R. H. & Gray, L. H.; Br. J. Cancer, 9; 539-549, 1955
- 3) Harris, A. L.; Nature Rev. Cancer, 2; 38-47, 2002
- 4) Brown, J. M. & Wilson, W. R.; Nat. Rev. Cancer, 4; 437-447, 2004
- 5) Semenza, G. L.; Nature Rev. Cancer, 3; 721-732, 2003
- 6) Semenza, G. L. & Wang, G. L.; Mol. Cell. Biol., 12; 5447-5454, 1992
- 7) Sobhanifar, S. et al.; Cancer Res., 65; 7259-7266,

- 2005
- 8) Koh, W. J. et al. : Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 33 : 391-398, 1995
- 9) Fujibayashi, Y. et al. : N. Nucl. Med., 38 : 1155-1160, 1997
- 10) Howe, F. A. et al. : NMR Biomed., 14 : 497-506, 2001
- 11) Epstein, A. C. et al. : Cell, 107 : 43-54, 2001
- 12) Harada, H. et al. : Cancer Res., 62 : 2013-2018, 2002
- 13) Harada, H. et al. : Mol. Imaging., 4 : 182-193, 2005
- 14) Kizaka-Kondoh, S. et al. : Cancer Sci., 94 : 1021-1028, 2003
- 15) Inoue, M. et al. : Int. J. Oncol., 25 : 713-720, 2004
- 16) Harada, H. et al. : Breast Cancer, 13 : 16-26, 2006

- 17) Harada, H. et al. : FEBS Lett., 580 : 5718-5722, 2006
- 18) Schwarze, S. et al. : Science, 285 : 1569-1572, 1999

<筆頭著者プロフィール>

近藤科江：1981年岐阜薬科大学卒業。免疫学療法に興味をもち、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、大阪大学微生物病研究所にて博士課程に入学し、がん化シグナルの研究を開始。その後、新技術事業団研究員、京都大学助手を経て、2004年に京都大学医学研究科21世紀COE特任准教授に着任し、低酸素イメージング研究を開始。腫瘍内低酸素領域のイメージング・ターゲティング研究を診断・治療に生かすための研究を行っている。

環境標的としての低酸素細胞の 光イメージング

近藤科江, 田中正太郎

高齢化に伴い増加の一途をたどる本邦の三大死因「癌」「心疾患」「脳血管疾患」の全死因における割合は、1990年にはすでに61.6%に達している。これらの疾患に共通するキーワードが「低酸素」である。生体内に潜む異常な低酸素状態を確実に、感度よく見つけることができれば、上記三大疾患の早期発見を可能にし、早期治療や、新規治療法の開発に貢献できると考えられる。われわれは、そのようなイメージングプローブの開発をめざし、低酸素条件下で選択的に安定化する融合タンパク質プローブを構築している。

キーワード〇 HIF-1, ODD, PTD, 環境標的, 化学発光, 近赤外蛍光色素

はじめに

心筋梗塞・脳梗塞・閉塞性末梢動脈硬化症などの虚血性疾患における「低酸素」は、広く知られている。組織細胞が低酸素状態にあるうちに発見し、治療することができれば、死亡率を減らすことができるとともに、予後を大幅に改善することが期待できる。研究するうえで、虚血性疾患動物モデルは外科的手法で作製されることが多く、評価が難しい。一方、固形癌(腫瘍)は、モデルも多く、比較的簡単に作製できるため、われわれは腫瘍モデルを用いて、低酸素特異的のプローブ開発を行っている。

腫瘍に対するプローブを開発するうえで、特定の「癌」に特徴的な分子を標的にした、いわゆる分子標的研究が主流であり、分子標的癌治療は大きな成果をあげている。一方で、どこにできるかわからない「癌」を早期に発見・治療するためには、癌に共通して存在し、かつ正常組織には存在しない特徴を標的にする必要がある。腫瘍に共通して存在する低酸素は、正常組織には存在しないため、最適な標的と考えられる。特

定の分子を標的にする「分子標的」に対して、われわれの標的は「環境標的」といえる。悪性度の高い癌でより多く含まれているとされる低酸素領域は、1 mm以下の微小な癌にも存在するため、低酸素を感度よく見つけることができれば、初期の癌や転移癌の早期発見のためのよい標的になる。つまり、低酸素特異的のプローブは、「癌」においても重要なプローブとなりうる。

低酸素細胞と転写因子 HIF-1

低酸素状態にある細胞は、栄養や酸素が不足しているため、発現する遺伝子を切りかえて、エネルギー代謝や増殖速度を落として、省エネルギーモードで、なんとか劣悪な環境で生きのび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 HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) である。通常の酸素濃度にある正常組織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、解糖系代謝や糖輸送に関与する遺伝子の発現を誘導した

Imaging of tumor hypoxia

Shinae Kizaka-Kondoh/Shotaro Tanaka : Department of Radiation Oncology and Image-applied Therapy, Kyoto University Graduate School of Medicine (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)

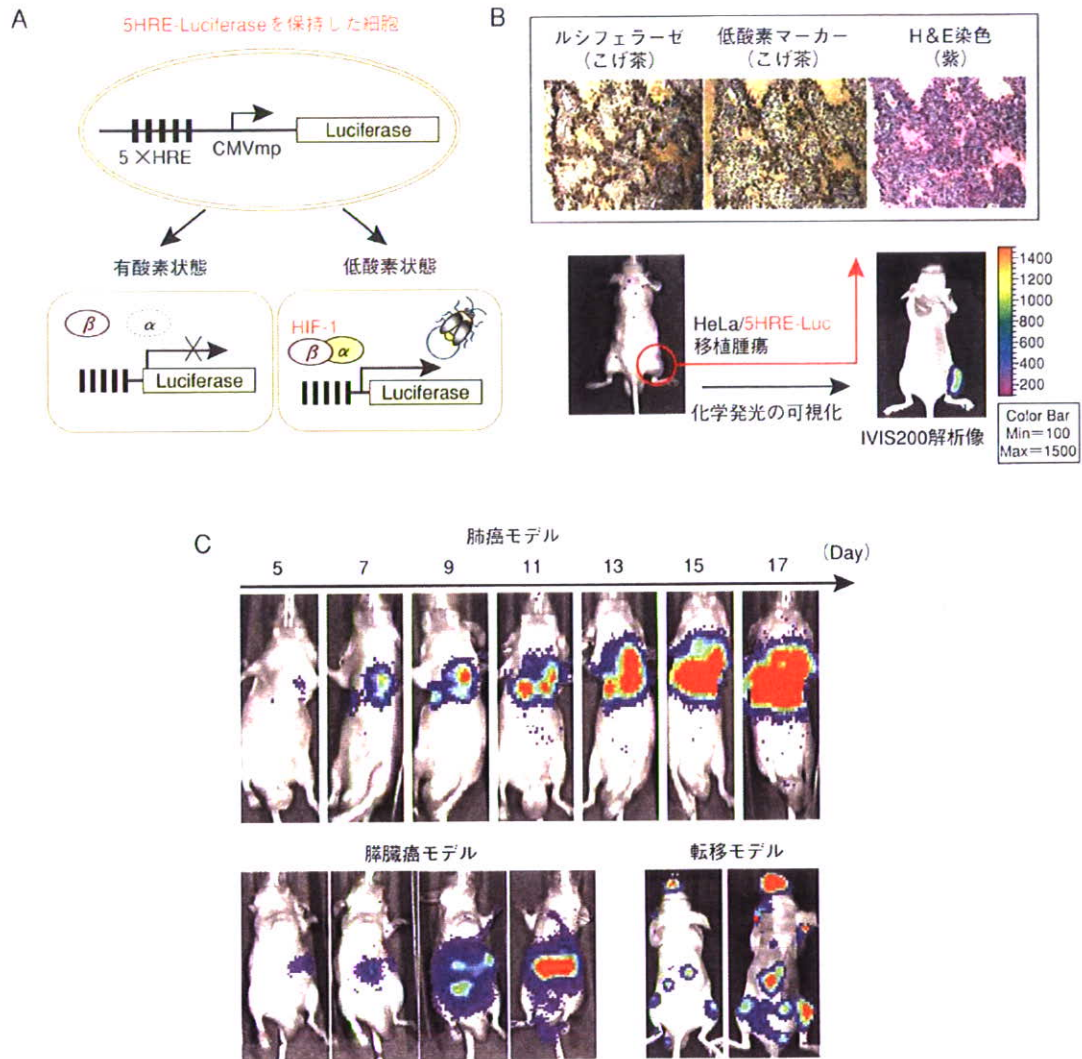


図1 低酸素応答レポーター 5HRE-Luciferase を用いた低酸素細胞の可視化

A) HIF-1 の結合領域である HRE を 5 つ繋いだプロモーターの下流に化学発光酵素ルシフェラーゼ (Luciferase) をつないだ、レポータープラスミド (5HRE-Luciferase) を安定に保持するヒト癌細胞を構築した。この細胞は、有酸素状態では HIF-1 活性がないためルシフェラーゼは発現しないが、低酸素状態ではルシフェラーゼを発現し、基質であるルシフェリンを加えると蛍光と同じ化学発光を発する。B) (A) で示した癌細胞をヌードマウスに移植し、形成された腫瘍の切片を調べると、ルシフェラーゼタンパク質の局在 (左) が低酸素マーカーピモニタゾールを用いて免疫染色された領域 (中央) と一致していることがわかる。その領域は、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色 (右) で紫色に染色された生細胞と無染色のネクローシス領域の境目にあることがわかる (文献 11 より転載)。C) 同所移植することで、より臨床に近い癌の進行を調べることができる。癌細胞をそのまま同所移植した場合、外から観察することができないため、経時的に殺処理して、癌の進行を調べる必要があるが、(A) で示した癌細胞を用いると、同一マウスにおける低酸素癌細胞の様子を経時的に調べることができる。動物にも、環境にも優しく、経済的で、時間や作業の大幅な節約になる方法である (文献 12 より転載)

り、血管新生因子や増殖因子の産生を促したりして、栄養環境の改善をはかる。アポトーシスの回避に関連する遺伝子の発現を誘導して、死を免れようとする。癌組織では、転移や浸潤にかかわる遺伝子の発現を誘導して、自ら新天地を切り開こうとする。このような低酸素細胞の一連の「生き残り」のための行動が、実は癌では悪性化に繋がっていたのである¹¹⁻¹⁴⁾。

② HIF-1 活性の可視化

他稿で述べられているように、HIF-1 活性は、低酸素と深くかかわっており、HIF-1 活性をモニターすることが、低酸素に関与する疾患部位を見つけるうえでも有効である。HIF-1 によって活性化される遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域には、HIF-1 が直接結合する配列 HRE (hypoxia response element : 5'-TACGT-3') が存在する⁵⁾。われわれは、5 個の HRE をもつプロモーターの下流に、蛍光を発する酵素であるルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポータープラスミド (5HRE-Luciferase) を利用して、HIF-1 活性をモニターすることで、低酸素条件下にある細胞を可視化している⁶⁾。具体的には、5HRE-Luciferase レポーター遺伝子を安定に保持するヒト癌細胞株を樹立し (図 1 A)、癌細胞をヌードマウスに移植すると、形成した腫瘍内の低酸素領域で活性化された HIF-1 転写活性によりルシフェラーゼタンパク質が発現され (図 1 B)、基質であるルシフェリンを投与後一定期間、発光反応を起こす。超高感度冷却 CCD カメラを搭載したリアルタイム *in vivo* イメージング装置 IVIS200 [住商ファーマインターナショナル (株)] を用いると、この化学発光の微弱な光をとらえて、デジタル画像として可視化することができる⁶⁾。このシステムを用いることにより、同一担癌マウスの固形腫瘍内低酸素領域の変化を、リアルタイムで、何度でも、経時的に観察することが可能となる。しかも発光シグナルを定量することにより、HIF-1 活性の増減を数値化することができる。図 1 C に示したように、外からの観察が不可能な同所移植モデルの経時的観察も可能になり、より臨床に近い形で、治療効果や薬効評価を行える。

③ 移植癌細胞の酸素環境

前述のシステムを用いることにより、移植癌細胞の酸素環境のモニタリングを行うことができる。ヌードマウスの皮下に 5HRE-Luciferase 癌細胞を移植し、24 時間ごとに HIF-1 活性を調べたところ、移植翌日 (Day1) は低酸素状態であり、HIF-1 活性は 3 日後 (Day3) まで上昇する。その後 HIF-1 活性は減少し、1 週間後頃から再度上昇しはじめる (図 2 A)。この結果から腫瘍内の酸素状態を推測すると図 2 A 下のようになる。すなわち、移植直後は、周辺に血管がないので低酸素状態である。HIF-1 活性は徐々に増え続け、HIF-1 によって誘導される血管新生因子の発現が上昇し、腫瘍に血管が呼び込まれる。この結果、腫瘍内の酸素状態は改善され、HIF-1 活性は減少に転じる。一方で、腫瘍の増殖に伴い、前述したように低酸素領域が形成されるようになり、再び HIF-1 活性が上昇してくる。

この仮説を証明するために、ルシフェラーゼの代わりに緑色蛍光タンパク質 GFP をレポーターとする 5HRE-GFP 癌細胞を用いて、前述の実験と同様に皮下移植して、腫瘍内の GFP の発現を観察すると同時に、血管可視化試薬を用いて、腫瘍内の血管分布を生体蛍光顕微鏡 OV100 [オリンパス (株)] にて観察した。移植後 3 日までは、腫瘍には血管はほとんど観察されなかったが、5、6 日後 (Day5, 6) には、腫瘍は太い血管に覆われ、太い血管が腫瘍内に入り込んでいる様子が観察された (図 2 B)。これらの結果は、転移した癌細胞が、転移先で増殖する際の状況や、再生のために移植された細胞や組織の状況を想像させる。

④ 低酸素特異的融合タンパク質の構築

他稿で詳細に述べられているように、HIF-1 は、 α と β の 2 つのサブユニットから構成されている。HIF-1 α は、酸素依存的なユビキチン化を受けて、有酸素状態の細胞内では、翻訳後速やかに分解される。HIF-1 が活性化している細胞を特異的に捕らえるために、われわれは、HIF-1 の低酸素依存的活性を制御している HIF-1 α と同じ酸素依存性制御を受ける融合タ