

低酸素イメージング・発光イメージング

近藤科江*
平岡真寛*

はじめに

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

I. 化学発光

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

*京都大学医学研究科放射線腫瘍学・画像応用治療学

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

II. 化学発光による生体イメージング

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

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

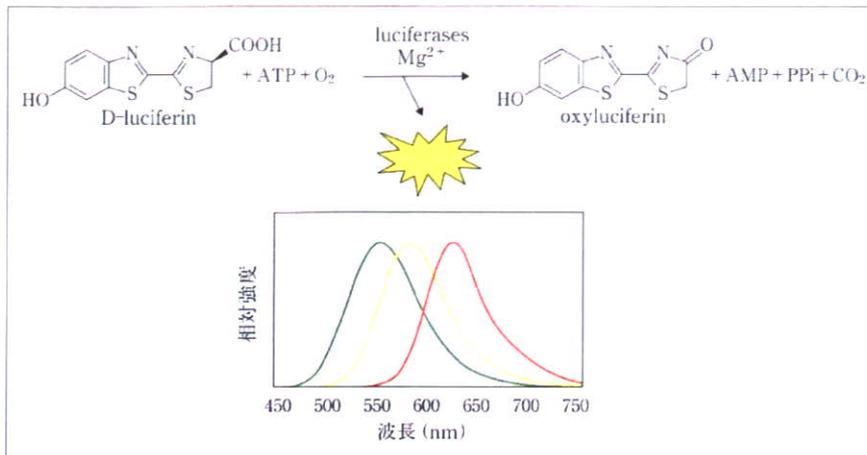


図1 化学発光イメージング ホタルルシフェラーゼは、D-ルシフェリンを基質として化学反応を起こすが、ルシフェラーゼを改変することにより、現在同じD-ルシフェリンを基質として、波長の異なる光を発することができる。

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

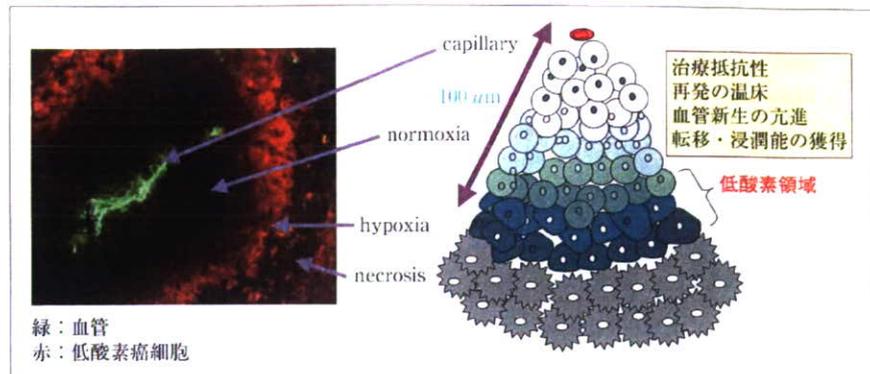
Ⅲ. 蛍光による生体イメージング

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

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

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

図2 腫瘍内低酸素癌細胞 腫瘍切片を血管(緑)と低酸素癌細胞(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 μ m程度離れた領域に、壊死領域を取り囲むように帯状に存在することがわかる(左図)。低酸素癌細胞は、抗癌剤が届きにくいように増殖が抑えられているため薬剤耐性であり、放射線にも抵抗性である。また、低酸素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。



緑：血管
赤：低酸素癌細胞

IV. 環境標的としての低酸素癌細胞

癌に対する治療は、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』の研究開発により、大きな成果を上げている。一方で、どこにできるかわからない原発(または再発)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。固形癌に共通して存在する低酸素領域は、正常組織には存在しないため、最適な標的と考えられる。特定の分子を標的にする『分子標的』に対して、我々の標的は『環境標的』と言える。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ことが動物実験で確認されており、初期の癌や転移癌の早期発見のためのよい標的になりうる。

我々は、『環境標的』のためのプローブ開発の段階として、まず光イメージングを用いてプローブの特異性、体内動態等を評価・検討して、基礎データを集めたうえで、PETやMRIといった臨床応用可能なプローブ開発につなげる計画である。

V. 低酸素癌細胞と転写因子HIF-1

腫瘍内部には、酸素も栄養も枯渇して壊死した細胞領域がある。正常組織では、細胞の増殖に合わせて血管新生が秩序正しく行われるため、酸素や栄養が届かないような領域ができることはありえないが、癌組織では無秩序な増殖により、血管新生が追いつかなかつたり、血管組織が未熟で不完全なため、十分な血流を保持できなかつたりする。その結果、血管からの十分

な酸素や栄養が届かない領域ができ、さらに壊死領域が形成される(図2)。壊死領域周辺の癌細胞は、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、何とか生きているが「死ぬべき運命にある弱った癌細胞」である。

これらの癌細胞(低酸素癌細胞)は、「瀕死状態」ではあるが、その劣悪な環境で生き延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hypoxia-inducible factor-1(HIF-1)である³⁾。通常の酸素濃度にある細胞内では活性が認められないHIF-1は、低酸素条件下で速やかに活性化され、糖代謝や糖輸送に関与する遺伝子の発現を誘導したり、血管新生因子や増殖因子の産生を促したりして、栄養環境の改善を図る。アポトーシスの回避や、遺伝子変異をひき起こす遺伝子の発現を誘導して、死を免れようとする。その一方で、転移や浸潤に関わる遺伝子の発現を誘導して、自ら新天地を切り拓こうとする。このような低酸素癌細胞の一連の「生き残り」のための行動が、実は癌全体の悪性化につながっていたのである⁴⁾⁶⁾。

VI. HIF-1活性の可視化

上述したように、固形腫瘍内のHIF-1活性は、癌治療、特に難治性の癌において、極めて重要であり、癌の治療効果を高め、再発・悪性化を防ぐためには、固形腫瘍内のHIF-1活性をモニターすることが重要である。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 responsive element: 5'-TACGT-3')が存在する。

我々は、5個のHREをもつプロモーターの下流に

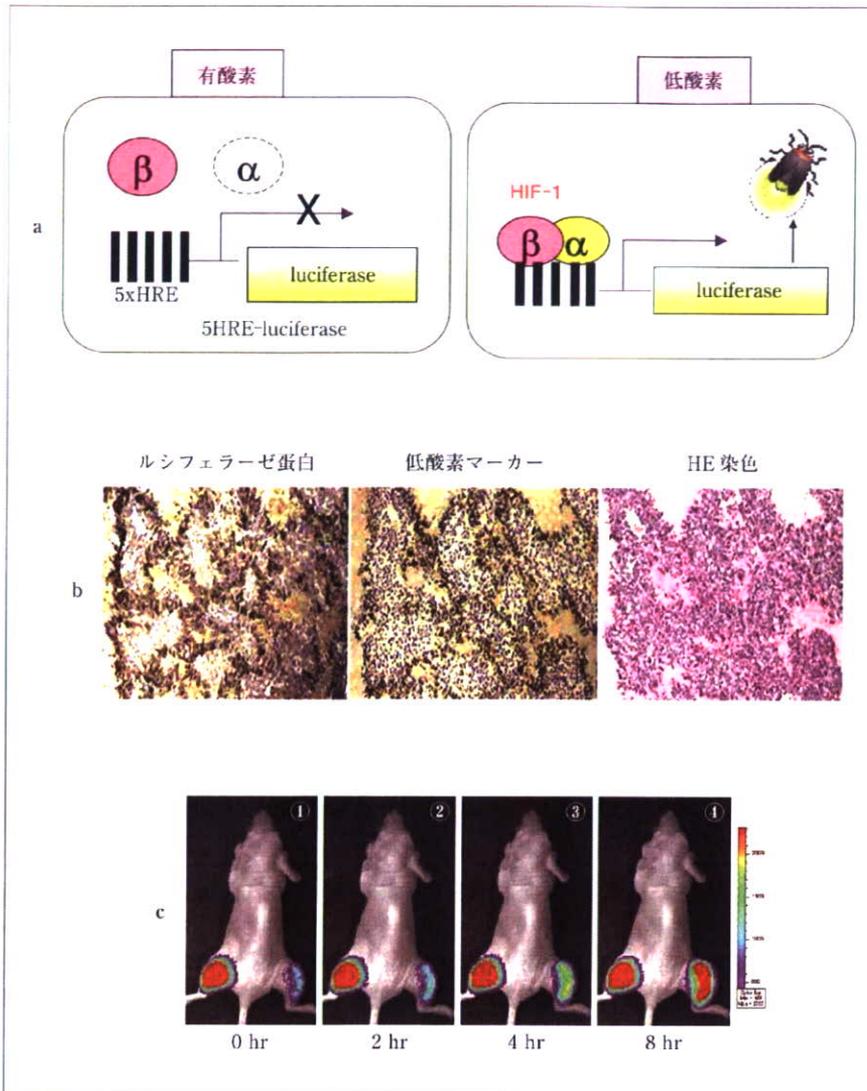


図3 低酸素応答レポーター5HRE-luciferaseを用いた低酸素癌細胞の可視化

a: 図2で述べた低酸素応答配列HREをもつプロモーターの下流に化学発光酵素ルシフェラーゼ (luciferase) をつないだレポータープラスミド (5HRE-luciferase) を安定に保持するヒト癌細胞を構築した。

b: aで示した癌細胞株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、ルシフェラーゼ蛋白の局在(左)が低酸素マーカーヒモニダ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、生細胞とネクrosis領域の境目であることがHE染色(右)でわかる。

c: 固形腫瘍がある右足の付け根をひもでしばって血流を下げることで、物理的に腫瘍内の低酸素領域を増やし、ルシフェラーゼの発現変化を *in vivo* イメージングシステムで経時的(結紮直後、2、4、8時間後)に調べた。化学発光は、時間が経過するにつれて増加(デジタル画像で photon countが増えると紫から赤に移行)し、低酸素領域が増えていることを示している。

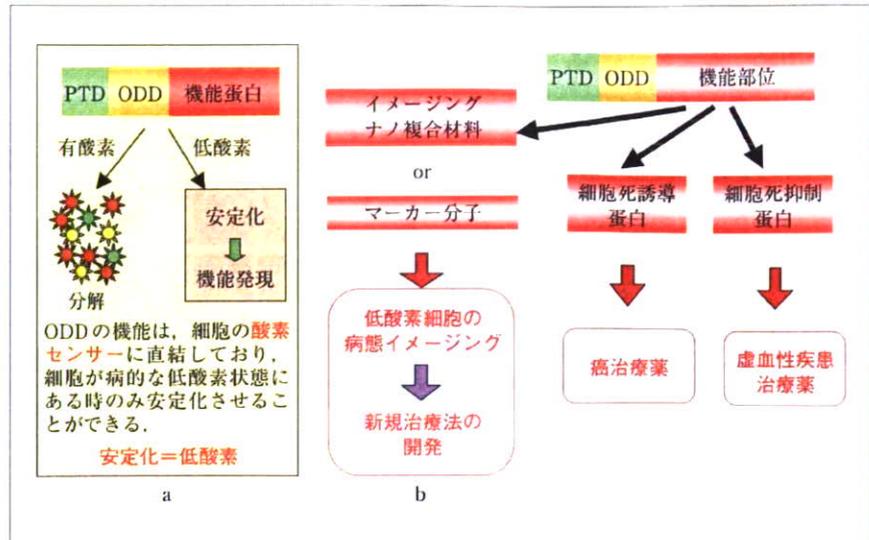
ルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポータープラスミド (5HRE-luciferase) を安定に保持するヒト癌細胞株を樹立している⁷⁾ (図3a)。これらの癌細胞をヌードマウスに移植すると、形成した腫瘍内の低酸素領域でルシフェラーゼ蛋白が発現され(図3b)、基質であるルシフェリンを投与後一定期間、発光反応を起こす。ルシフェラーゼの発光反応は酸化反応で酸素を必要とするが、我々がターゲットとしている低酸素領域は、無酸素ではないため、発光には十分な酸素分子があると思われる。この化学発光を、上述した超高感度冷却CCDカメラを搭載したリアルタイム *in vivo* イメージ

ング装置を用いて可視化している。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である⁷⁾。しかも発光シグナルを定量化することにより、低酸素癌細胞の増減を数量化して推移をデータ化することができる。この系が腫瘍内の低酸素状態をモニターしていることを確認する目的で、腫瘍を形成した下肢をしばり血行を悪くして、物理的に低酸素領域を増やす操作をすると、腫瘍内のルシフェラーゼ発現は、結紮時間が経過すると共に上昇した(図3c)。この結果は、HIF-1が活性化している

図4 PTD-ODD融合蛋白の利用例

a: PTD-ODD融合蛋白は、細胞膜透過ドメイン(PTD)、低酸素制御ドメイン(ODD)と機能ドメインの3つから成る。ODDは低酸素特異性を融合蛋白に付与する。つまり正常酸素濃度の細胞内では速やかに分解し、低酸素の細胞内では安定化して機能を発現する。

b: PTDは生体内でのデリバリー機能をもち、低酸素領域に融合蛋白を効率よく運ぶ。機能ドメインには、低酸素特異的に機能させたい蛋白をつけることができる。イメージングのための機能をつけることにより、低酸素特異的イメージングプローブをつくること(左)。細胞死誘導機能をつけることにより、低酸素癌細胞特異的抗癌剤を開発できる(中央)。細胞死抑制機能をつけることにより、虚血性疾患の治療薬を開発することができる(右)。



細胞を可視化することにより、我々のイメージングターゲティングのための『環境標的』を可視化できていることを意味している。

Ⅶ. 低酸素特異的融合蛋白の構築

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、酸素依存性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⁸⁾。HIF-1が活性化している細胞を特異的にとらえるために、我々は、HIF-1の低酸素依存性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蛋白を構築した。具体的には、HIF-1 α 蛋白のほぼ中央にある酸素依存性分解ドメイン oxygen-dependent degradation domain (ODD) 内のコアになるアミノ酸配列を任意の蛋白に融合させると、そのODD融合蛋白は、HIF-1 α と同様に、有酸素状態の細胞では速やかに分解され、低酸素状態の細胞では安定に存在する⁹⁾。つまり、ODDを融合させることによって、蛋白がもつ機能を酸素依存的に制御できるようになる(図4a)。酸素依存性融合蛋白が構築できても、生体で使えなければ意味がない。通常、蛋白を生体に投与しても、細胞内に運ばれることはないため、たとえ血流に乗って全身に運ばれることがあったとしても、細胞内に取り込まれることは期待できない。

そこで、融合蛋白に細胞膜を通過するための膜透過

ドメイン (protein transduction domain: PTD) を融合させた。当初は、研究報告が多いAIDSウイルスのTAT蛋白が有するPTD (TAT-PTD) を融合させた。TAT-PTDは、融合した蛋白を脳を含む全身の組織細胞にデリバリーさせることができると報告されている¹⁰⁾。現在、種々の機能をPTD-ODDに融合させることで、生体に応用できる融合蛋白を構築している。例えば、細胞死を誘導するような機能をもつ蛋白を融合させることで、低酸素癌細胞をターゲティングする融合蛋白が、イメージング機能をもつ蛋白を融合させることにより、低酸素細胞をイメージングするプローブをつくること(図4b)。

Ⅷ. 薬剤スクリーニング系としての化学発光イメージング

ルシフェラーゼによる化学発光を用いて、より臨床に近い癌の評価モデルとしての同所移植モデルでの、癌の進行経過や治療効果の評価は、皮下移植モデルと同様に、同一動物で経時的に観察することが可能になった。我々は、低酸素癌細胞が多いことが知られている膵臓癌の同所移植モデルを用いて、移植した癌での低酸素癌細胞の状況を調べた。低酸素癌細胞は、移植後3週間までにはイメージングが可能なサイズとなり、さらに3週間で腹膜まで広がり、腹膜播種と腹水を伴い死亡するまでの経過を追うことができた(図5)。

我々は、上述した低酸素癌細胞特異的抗癌剤の効

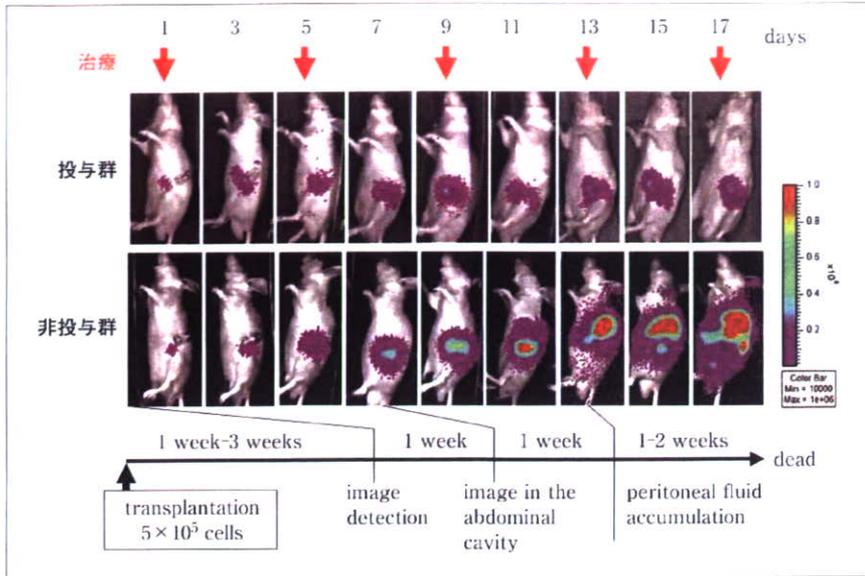


図5 低酸素癌細胞のターゲッティング 低酸素特異的にルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子を組み込んだヒト膵臓癌細胞を、ヌードマウスの膵臓に移植して、ルシフェラーゼ発現を観察した。臨床における膵臓癌の進行経過を反映する腹膜播種への移行が観察された。また、低酸素癌細胞特異的PTD-ODD-procaspase-3融合蛋白を3日おきに投与することにより、膵臓癌における低酸素癌細胞の広がりを押さえることができた。

果を、この膵臓癌同所移植モデルを用いて評価を試みた。PTD-ODDに、強力なアポトーシス誘導能を有するcaspase-3の前駆体procaspase-3を融合した、caspase-3は、さまざまなアポトーシスシグナルで活性化される最も下流に位置するcaspaseであるが、procaspase-3の状態で過剰発現させても細胞死を誘導しない、ODD-procaspase-3の形で正常細胞内に蓄積されることがあったとしても、それだけでは細胞死を引き起こさないためである。最初に構築した蛋白製剤PTD(TAT)-ODD-procaspase-3(TOP3)は、PTDによるDDS機能とODDによる低酸素細胞特異性を有する抗癌剤として、培養細胞では低酸素特異的に細胞死を誘導し⁹⁾、動物実験でも投与後12時間で細胞死を誘導していることを示すデータを得ている⁷⁾。長期的観察では、抗腫瘍効果を発揮しており^{6,7,11,12)}、その効果は、低酸素癌細胞を死滅させることにより、HIF-1活性を抑え、その結果HIF-1に発現誘導される血管新生や腫瘍増殖を促す因子が抑えられたことを示唆するものである。上述した低酸素癌細胞をイメージングする膵臓癌同所移植モデルを用いて、第2世代の低酸素特異的抗癌蛋白製剤POP33(PTD3-ODD-Procaspase-3)の効果を検証した結果、POP33治療群では、顕著に低酸素癌細胞からの発光シグナルが局所にとどまり、腹膜播種が抑えられていることが確認できた(図5)。

このように、発光イメージングを用いることによ

り、薬剤効果の評価を実験動物を経時的に解剖することなく、調べることができることは、研究者の負担を軽減するのみでなく、経済的で、動物に優しい方法である。

IX. 蛍光プローブによる低酸素癌細胞のイメージング

別稿でも詳細に記載されているように、近赤外の窓の領域に波長をもつ蛍光色素を用いることにより、小動物では蛍光プローブを生体イメージングに応用できる。操作が簡単で、経済的な光イメージングは、構築したプローブが臨床応用できるか否かを、簡単に評価するには大変有用である。研究者にとっても、より容易にプローブの構築・評価に臨むことができるため、トライ・アンド・エラーによる改良が短期間にできる。我々も、PTD-ODD融合蛋白に近赤外標識をつけたプローブを構築している。現在、PTD-ODD融合蛋白に近赤外蛍光色素で標識したプローブを構築し、低酸素癌細胞特異的プローブの評価を行っている。近赤外蛍光標識化合物は、市販されているものの種類も多いが、蛋白と融合させた場合の体内動態についてのデータは、まだ少なく、トライ・アンド・エラーを繰り返しながら最適化を行っている。まだ、最適化された状態ではないものの、低酸素癌をとらえることができるまでできている(図6)。

おわりに

20世紀にX線CTが登場して、人類は初めて体を傷つけずに、体の中の構造を可視化し、その後、MRIの登場により、電離放射線を使用せずに体の断層像の撮影に成功した。また、超音波診断機器、SPECT、PET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、画像診断が診断の中核として位置している。鉄の塊を空に浮かべ、無重力・無酸素の宇宙に行って帰ってこることができた人類の英知をもってすれば、『透過性』という厚い壁も、『散乱』という難題も乗り越えて、簡便・安全・安価な「光」を使った「どこでも画像診断」という夢を実現させる日も、そう遠くないかもしれない。

謝辞：紹介した研究の一部は、京都大学医学研究科放射線腫瘍学画像応用治療学 原田 浩氏、田中正太郎氏による成果である。また、本稿で紹介した生体イメージング機器IVIS200TMおよび研究の一部は、京都市地域結集型共同研究事業の支援によるものである。

文 献

- 1) Miwa, K., Serikawa, M., Suzuki, S. et al. : Conserved expression profiles of circadian clock-related genes in two lemna species showing long-day and short-day photoperiodic flowering responses. *Plant Cell Physiol* 2006, 47 : 601-612
- 2) Seliger, H.H., McElroy, W.D. : Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence. *Arch Biochem Biophys* 1960, 88 : 136-141
- 3) Semenza, G.L., Wang, G.L. : A nuclear factor induced by hypoxia via *de novo* protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992, 12 : 5447-5454
- 4) Semenza, G.L. : Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003, 3 : 721-732
- 5) Harris, A.L. : Hypoxia—A key regulator factor in tumor growth. *Nature Rev Cancer* 2002, 2 : 38-47
- 6) Kizaka-Kondoh, S., Inoue, M., Harada, H. et al. : Tumor hypoxia: A target for selective cancer therapy. *Cancer Sci* 2003, 94 : 1021-1028
- 7) Harada, H., Kizaka-Kondoh, S., Hiraoka, M. :

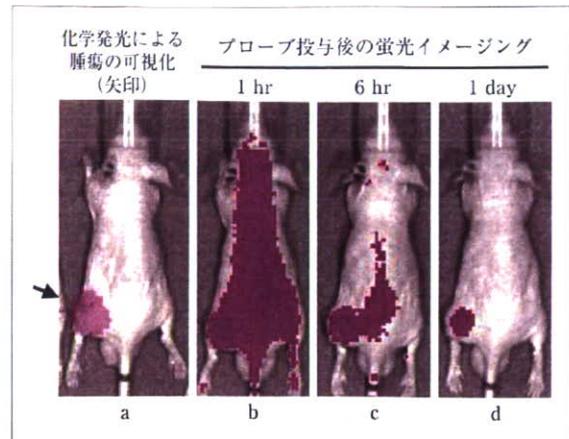


図6 蛍光イメージングプローブを用いた腫瘍低酸素細胞のイメージング a: マウス左後肢大腿部皮下にルシフェラーゼを恒常的に発現するHeLa細胞を移植し腫瘍を形成し化学発光で可視化した。b~d: 蛍光標識したPTD-ODD融合蛋白プローブを投与後、経時的に蛍光を観察。投与後直後は、全身にプローブが分布。時間と共に、正常組織でのプローブのクリアランスが進むのに対し、腫瘍内での蛍光プローブは残留し、腫瘍内低酸素細胞が可視化される。

Optical imaging of tumor hypoxia and evaluation of efficacy of a hypoxia-targeting drug in living animals. *Mol Imaging* 2005, 4 : 182-193

- 8) Wang, G., Semenza, G.L. : Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995, 270 : 1230-1237
- 9) Harada, H., Kizaka-Kondoh, S., Hiraoka, M. : Mechanism of hypoxia-specific cytotoxicity of procaspase-3 fused with a VHL-mediated protein distraction motif of HIF-1 α containing Pro564. *FEBS Lett* 2006, 580 : 5718-5722
- 10) Schwarze, S.R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. et al. : In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 1999, 285 : 1569-1572
- 11) Harada, H., Hiraoka, M., Kizaka-Kondoh, S. : Antitumor effect of TAT-oxygen-dependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells. *Cancer Res* 2002, 62 : 2013-2018
- 12) Inoue, M., Mukai, M., Hamanaka, Y. et al. : Targeting hypoxic cancer cells with a protein prodrug is effective in experimental malignant ascites. *Int J Oncol* 2004, 25 : 713-720

1. 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

近藤科江 平岡真寛

京都大学医学研究科 放射線腫瘍学・画像応用治療学

Imaging and Targeting of Hypoxic Tumor Cells by Use of HIF-1

Shinae KIZAKA-KONDOH and Masahiro HIRAOKA

Department of Radiation Oncology and Image-applied Therapy,
Kyoto University Graduate School of Medicine

Summary

Tumor hypoxia is a potential therapeutic problem because it is closely associated with resistance to anti-cancer therapies and with the phenomenon of malignant progression. Therefore, although hypoxic tumor cells account for a very limited area in a solid tumor, conquering tumor hypoxia is crucial for treatment of malignant tumors. To image hypoxic tumor cells *in vivo*, we isolated a transfectant clone HeLa/5HRE-Luc, whose luciferase activity under hypoxic conditions was more than 100-fold of the one under aerobic conditions, and monitored the luciferase activity in HeLa/5HRE-luc xenografts with an *in vivo* real-time imaging system. To target tumor hypoxia, we recently constructed a fusion protein POP33, which is composed of the protein transduction domain (PTD), a part of HIF-1 α ODD and the dormant form of caspase-3, procaspase-3. PTD fusion proteins are previously demonstrated to be delivered to every cell in the whole body. POP33 did not affect well-oxygenized cells but efficiently increased caspase-3 activity and induced cell death to hypoxic cells *in vitro*. To investigate if POP33 can target hypoxic tumor cells *in vivo*, we monitored the luciferase activity in orthotopically transplanted human pancreatic cancer cells during POP33 treatment. The metastasis of the pancreatic cancer was significantly suppressed and their luciferase activity was reduced during the sequential administration of POP33. These data demonstrate that POP33 specifically targets tumor hypoxia and provide direct evidence that hypoxic tumor cells play a crucial role in metastasis of pancreatic cancers.

はじめに

医学の進歩に伴い、がんの診断・治療技術も年々進歩してきている一方で、高齢化ががん増加の第一要因になっている。我が国では、世界のどの国も経験したことのない速度で人口の高齢化が進行しており、2020年には、1年間に84万人ががんになると試算されている。特定の「がん」に特徴的な分子を標的にした治療薬、いわゆる分子標的治療薬の研究開発は、がん治療に大いに貢献している。一方で、どこに存在するかわからない「がん」を早期に発見・治療するためには、がんに共通して存在し、かつ正常組織には存在しない特徴を標的にする必要がある。固形がんに共通して存

在する「腫瘍特異的微小環境」は、正常組織には存在しないため、最適な標的と考えられる。特定の分子を標的にする【分子標的】に対して、我々の標的は【環境標的】といえる。悪性度の高いがんにより多く含まれているとされる低酸素領域は、1 mm 以下の微小ながんにも存在するといわれており、初期のがんや転移がんの早期発見のための良い標的になる。我々は、低酸素細胞で活性化される HIF-1 の特性を利用して、腫瘍内微小環境にあるがん細胞を特異的にイメージング・ターゲティングする研究を行っている。

がんの微小環境

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つのがん細胞が無秩序に増殖して形成される。従って腫瘍は、培養された細胞集団のように均一ながん細胞の集団で形成されるべきものであるが、実際は、ある一定以上のおおきになると、がんは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訳ではなく、太さも分岐も極めて不均一で、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。その領域にあるがん細胞は、環境に対応して性格が変化

し、腫瘍は極めて不均一な細胞の集団から構成されている(図1)。

非常に小さながん(数ミリ以下)でも通常ではありえないような低酸素状態が存在する。がんの由来組織や細胞の種類により多少の差はあるものの、がんの微小環境は、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。そのような領域にある細胞は、栄養や酸素が不足しているため、増殖を停止したり、解糖系代謝を行ったりして、周辺で活発に増殖している有酸素状態のがん細胞に比べると「死ぬべき運命にある弱ったがん細胞」である。しかしながら、この「死ぬべき運命にある弱ったがん細胞」が、実は固形腫瘍全体の悪性度を高めている極めて「悪質ながん細胞集団」であることが最近の研究からわかってきたのである。これらのがん細胞(低酸素がん細胞)は、がん治療に対して抵抗性である。血流によって運ばれる抗がん剤は、血管から遠い低酸素がん細胞までは効率よく運ばれないため、低酸素がん細胞において有効な濃度に達する機会が少ない。また、多くの抗がん剤は、分裂している細胞を標的にしているため、増殖を停止している低酸素がん細胞では有効に作用しない。更に、酸素分子により細胞障害性が増強される放射線やある種の抗がん剤では、その治療効果が十分に発揮されない。従って、放射線や抗がん剤治療の後に、周辺の活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²⁻⁴⁾。

転写因子 HIF-1

低酸素がん細胞は、「瀕死状態」ではあるが、その劣悪な環境に適応しようと努力している。その努力の一翼を担っているのが低酸素応答転写因子として単離された HIF-1 である。通常の酸素濃度にある細胞内では活性が認められない HIF-1 は、低酸素条件下で速やかに活性化され、糖代謝や糖輸送に関与する遺伝子の発現を誘導したり、血管新生因子や増殖因子の産生を促したりして、栄養環境の改善を図る。アポトーシスの回避や、遺伝子変異を誘導する遺伝子の発現を誘導して、死を免れようとする。その一方で、転移や浸潤に関わる遺伝子の発現を誘導して、自ら新天地を切り開こうとする。このような一連の「生き残り」のための行動が、実はがん全体の悪性化に繋がっていたのである。HIF-1 によって直接発現が誘導される遺伝子の同



低酸素がん細胞
を可視化

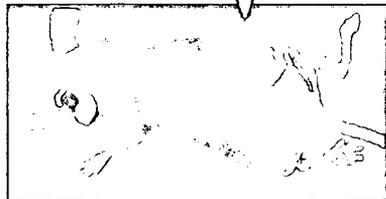


図1 がんの微小環境。腫瘍内の低酸素領域にあるがん細胞(低酸素がん細胞)を緑色蛍光タンパク質(EGFP)を発現させて可視化した。低酸素がん細胞を背景にして黒く浮きでて見える腫瘍内の血管は、分布が不規則で、分岐や太さが不均一である。その血管から一定の距離を置いて低酸素がん細胞が局在しているのがわかる。

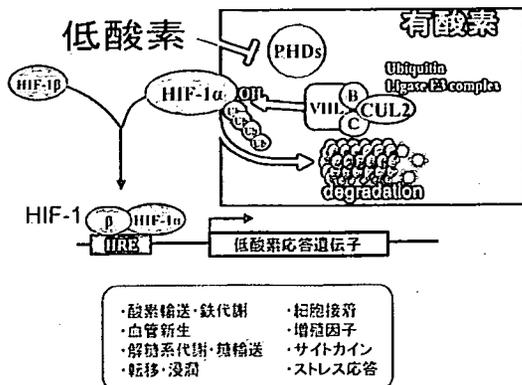


図2 HIF-1 転写活性と HIF-1 α の酸素依存的分解機構。HIF-1 は、HIF-1 α と HIF-1 β の2つのサブユニットからなり、HIF-1 α タンパク質の安定性は酸素依存的に制御されている。低酸素細胞内では、HIF-1 は、標的遺伝子のプロモーター、エンハンサー領域にある低酸素応答配列 (HRE) に結合して低酸素依存的転写活性を誘導する。その結果、下図で示したようながんの悪性化や解糖系代謝にかかわる様々な遺伝子の発現が誘導される。一方、有酸素状態の細胞では、プロリン水酸化酵素 (PHD) により ODD ドメインのプロリン残基が水酸化され、それを狙ってユビキチン付加酵素 E3 複合体が VHL を介して結合し、HIF-1 α のユビキチン化を誘導し、プロテアソームに運ばれて分解される。この酸素依存的分解は、非常に速やかで、有酸素状態の細胞内では、HIF-1 α は数分以内に分解される。

定が盛んに行われ、現在までに既に 60 以上が報告されている³⁾。これらの遺伝子は、プロモーター、エンハンサー領域に HIF-1 結合配列 hypoxia responsive element (HRE) を持っており、HIF-1 が p300/CBP とユニットを作って HRE に結合し転写を促す。

HIF-1 は、 $\alpha\beta$ の2つのサブユニットからなる (図2)。 β サブユニット (HIF-1 β) は恒常的に発現しているが、 α サブユニット (HIF-1 α) の発現量は翻訳後修飾と翻訳レベルで厳密に制御されている^{5,6)}。従って HIF-1 の活性は HIF-1 β に結合できる HIF-1 α の発現量に依存している。HIF-1 α の翻訳後修飾による制御は、酸素依存的なプロリン水酸化酵素 (PHDs) 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、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 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、増殖因子等による phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) や MAP-K を介するシグナル伝達系の活性化が関与している。

酸素依存的タンパク質分解機構

我々は、HIF-1 α タンパク質の「低酸素環境で安定化し、通常の酸素環境下 (有酸素環境) で速やかに分解される」酸素依存的分解 (Oxygen-dependent degradation: ODD) 機構に着目した。この制御機構の詳細は 2001 年にプロリン水酸化酵素 (ヒトでは 3 種類 PHD 1~3) がクローニングされ⁷⁾、詳細な分子制御機構が解明されている⁸⁾。即ち、プロリン水酸化酵素が、HIF-1 α タンパク質の中央付近にある ODD ドメイン内のプロリン残基を水酸化し、これを目印にして結合するユビキチン連結酵素複合体 E3 により、HIF-1 α はユビキチン化されプロテオソームに運ばれて分解される (図2)。このプロリン水酸化酵素が機能する際に、酸素を含んだ鉄分子を必要とすることが酸素依存性の本質であった。この ODD 制御は極めて厳密で、低酸素下で安定化した HIF-1 α は、有酸素にすると数分以内に分解される。この極めて厳密な ODD 制御機構を応用して、低酸素がん細胞特異的イメージング・ターゲティング材料の構築が始まった。

PTD-ODD 融合タンパク質の構築

任意のタンパク質の安定性を HIF-1 α 同様に、酸素濃度依存的に制御することができれば、任意のタンパク質の機能を酸素依存的に制御できる。すなわち、低酸素がん細胞を特異的にターゲティングしたり、イメージングしたりすることができることになる。これが、PTD-ODD 融合タンパク質を作ることになった動機である。最初に検証したのが、HIF-1 α の ODD ドメインを任意のタンパク質に融合させることで、「低酸素環境で安定化し、通常の酸素環境下 (有酸素環境) で速やかに分解される」融合タンパク質を作れるか否かであった。ODD ドメイン全体 (約 200 アミノ酸) を付加すると、全体の分子量がかなり大きくなるので、最小のアミノ酸配列を決定するために ODD ドメインを部分的に β -galactosidase に融合させ、 β -galactosidase 活性の酸素濃度依存性を調べた。その結果、少なくとも 18 個のアミノ酸があれば、任意のタンパク質の活性を ODD 制御できること、最適な ODD 制御のためには、約 50 個のアミノ酸配列からなる ODD ドメインが必要であることがわかった⁹⁾。

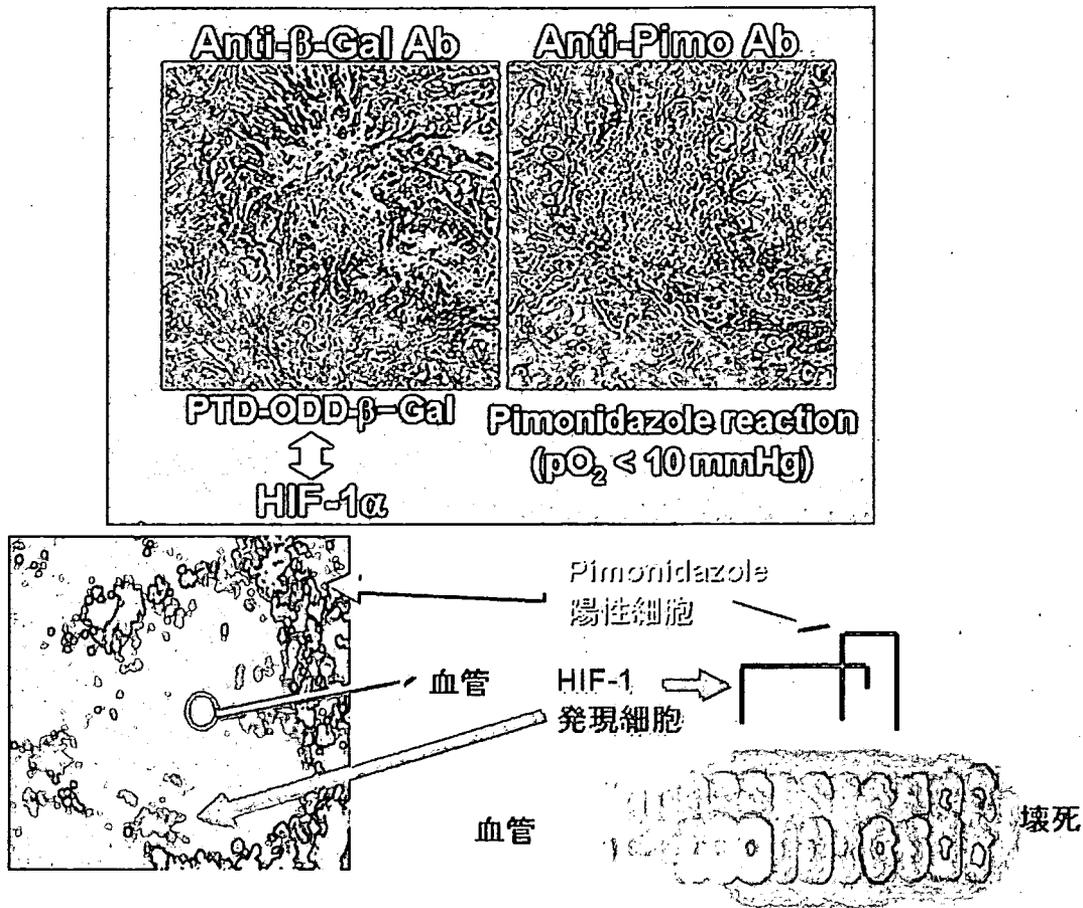


図3 ODD融合タンパク質の腫瘍内局在. PTD-ODD- β -galactosidase融合タンパク質を担がんマウスの腹腔内に投与し、2時間後に低酸素マーカーピモニダゾールも投与、4時間後に腫瘍を摘出し、連続切片を β -galactosidase抗体(左上)および低酸素マーカー検出抗体(右上)を用いて免疫染色した。染色パターンは似通っているものの、常にPTD-ODD融合タンパク質が局在するところは、ピモニダゾールで確認される場所よりも幅広い。ピモニダゾールが10 mmHg以下という極めて低酸素で反応する化合物であり、PTD-ODD融合タンパク質が、HIF-1 α とほぼ同様のタンパク質安定性制御を受けていることを考えると、ピモニダゾールで染色されている低酸素領域とHIF-1が活性化する領域が必ずしも同一していないことを示唆している。実際に、多重染色すると(左下)、ピモニダゾールで染色されている低酸素領域よりもHIF-1が活性化している領域がやや血管に近い領域である(左下)ことがわかる。

ODD制御できるタンパク質が作れても、細胞内に導入できなければ、細胞内で行われるODD制御を受けることができない。そこで我々は、タンパク質に膜透過性を付加する膜透過ドメイン(PTD)をODD融合タンパク質に付加することにより、培養細胞を用いた実験でほぼ100%の細胞にタンパク質を導入し、酸素依

存的に機能させることに成功した。しかもこのPTDは、マウスを用いた実験で、腹腔内に融合タンパク質を注射すると、脳を含む全身の組織細胞に融合タンパク質をデリバリーできることが報告されている⁹⁾。そこで我々は、PTD-ODD- β -galactosidase融合タンパク質を構築し、それを腹腔内に投与し、この融合タン

タンパク質の体内分布と β -galactosidase 活性を調べた。その結果, ODD を付加していないタンパク質を投与した場合, 正常肝組織と腫瘍組織全体で, タンパク質と活性が確認できたのに対し, ODD を付加したタンパク質を投与した場合は, 正常組織ではタンパク質も活性も確認できず, 腫瘍組織でも一部のみタンパク質と活性が確認できた。つまり, 正常組織や腫瘍の大部分は酸素が十分にある状態 (有酸素状態) にあり, 腫瘍の一部のみ低酸素細胞が存在することを示唆していた。そのことを確認するために, 低酸素マーカーとして知られている化合物ピモニダゾール (pimonid-

azole) を用いて腫瘍切片を染色したところ, 低酸素マーカーと同一のところに, β -galactosidase タンパク質が存在していることがわかった (図3)。これらの結果は, 我々の設計通り, PTD-ODD 融合タンパク質は酸素濃度依存的制御を受け, 低酸素ががん細胞特異的に分布・機能することを示しており, 低酸素ががん細胞特異的イメージング・ターゲティングが可能であることを示している。

HIF-1 活性細胞と低酸素細胞

図3の免疫染色された部分を比較すると, PTD-ODD 融合タンパク質が分布している腫瘍内領域は,

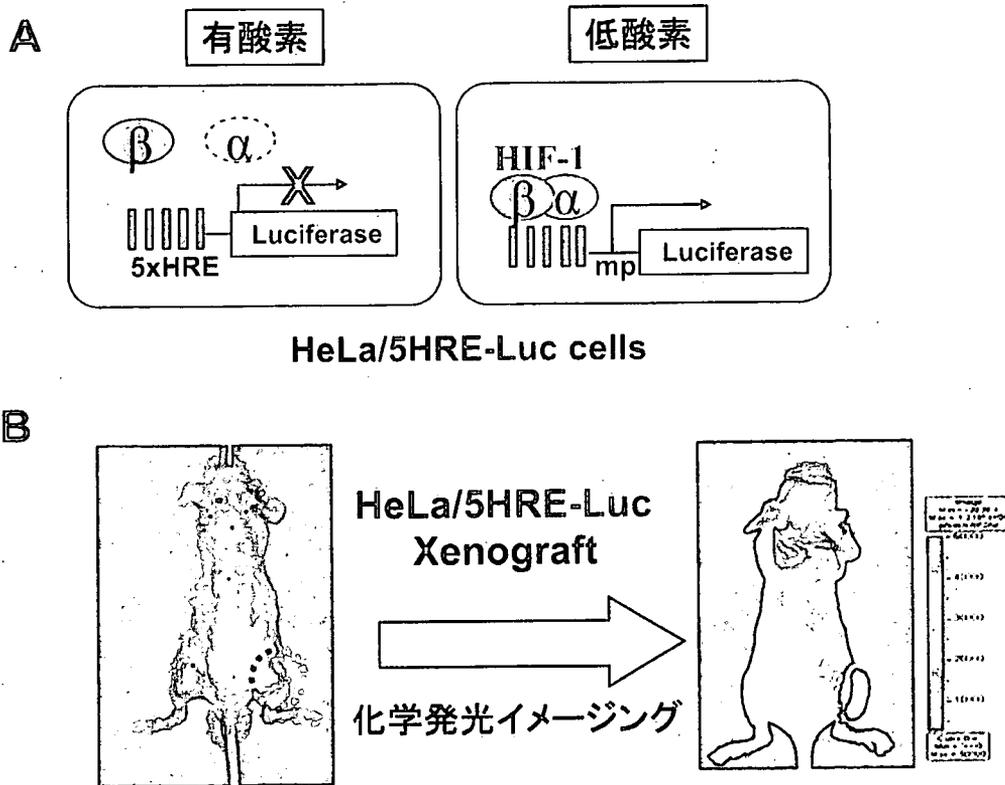
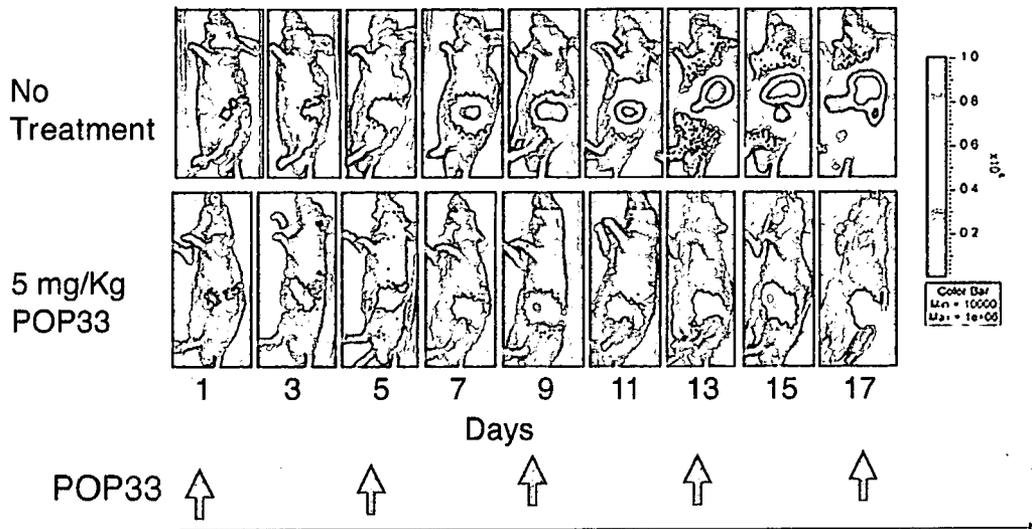


図4 移植腫瘍内低酸素がん細胞のイメージング。A) 図2で述べた低酸素応答配列 HRE をもつプロモーターの下流に化学発光酵素ルシフェラーゼ (Luciferase) をつないだレポータープラスミド (5HRE-Luciferase) を安定に保持するヒトがん細胞を構築した。B) A のがん細胞株をヌードマウスに移植し, 腫瘍を形成した後, ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを投与し, 生体イメージング機器 (IVIS200) を用いて観察すると, 右下のような画像が得られる。この右足に見えるシグナルは, 低酸素がん細胞で発現しているルシフェラーゼからの発光であり, したがって, イメージは低酸素がん細胞を見ていることになる。このシステムを用いることにより, 腫瘍内の低酸素がん細胞が生きのまま, 何度でも経時的に観察することができる。



治療開始時期: イメージが
 $\sim 5 \times 10^5$ photon counts 達した時

3日おきにPOP33投与
 1日おきにイメージング

図5 低酸素がん特異的抗がん蛋白製剤によるすい臓がん転移抑制. 図4Aと同様のレポーター遺伝子を組み込んだヒトすい臓がん細胞株 SUI2 をヌードマウスの腹腔に同所移植すると, 上パネルのように, 膵臓から徐々に周囲, 更に腹部全体にがんが広がり, 腹水が溜まり死亡するという臨床に近いすい臓がんモデルにおいて, 低酸素がん細胞のイメージを観察することができた. このモデルに低酸素特異的抗がん蛋白製剤 POP33 を投与すると (下パネル), 低酸素がん細胞の転移が抑えられ, すい臓に局在し続けることが確認できた.

低酸素マーカー Pimonidazole で染色される領域より血管に近い方に広がっていることがわかる. この場合は, β -galactosidase であるが, 別のタンパク質が融合された場合も同様な結果が得られた. 最近の報告では, HIF-1 α が分布する HIF-1 活性をもつ低酸素細胞は, 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 minHg 以下のより低酸素な) 領域は同一でないことがわかった¹⁰⁾. HIF-1 転写因子により発現する遺伝子群の機能が, がんの悪性化に大きく寄与していることから, 「HIF-1 活性をもつ低酸素細胞」をイメージング・ターゲティングすることは意義がある. この「還元酵素が機能する領域」は, 放射線増感剤等の研究で既にターゲティングの対象としては, 長い歴史がある. この領域をターゲティングすることが, これまで放射線治療に期待されたほど大きな貢献をもたらすことができなかった理由は, ターゲティングが十分に行えていなかったのではなく, こ

の領域をターゲティングする「必要」はもちろんあるものの, 放射線治療を補うには「十分」ではなかった可能性が高い.

低酸素がん細胞の光イメージングによる可視化

蛍光や化学発光を観察する方法は, 細胞レベルから個体レベルに適応範囲が広がりつつある. 上述した低酸素特異的転写因子 HIF-1 は, 低酸素条件下で活性化されるので, その活性をモニターすることにより, 腫瘍内の低酸素がん細胞を可視化することができる. 具体的には, 低酸素特異的転写因子 HIF-1 の結合塩基配列 (hypoxia responsive element; HRE) を含む低酸素応答プロモーターの制御下に蛍光タンパク質 GFP や, 化学発光酵素ルシフェラーゼの遺伝子を繋いだレポーターベクターを構築し, これを安定に組み込んだがん細胞株を樹立する. この細胞を移植して形成した腫瘍の低酸素がん細胞では, 低酸素応答プロモーターからのレポーター遺伝子の発現が誘導され, レポーター

タンパク質の蓄積が起こる。我々は、HREを5個タンダムに繋いだ配列を持つ低酸素応答プロモーター5HREの下流にルシフェラーゼを繋いだプラスミドp5HRE-luciferaseを組み込んだヒトがん細胞を樹立した(図4A)。これをヌードマウスに移植すると、形成した腫瘍内の低酸素環境に反応してルシフェラーゼタンパク質が発現され(図4B)基質であるルシフェリンを投与後一定期間、発光反応を起こす。この化学発光を、冷却高感度CCDカメラを搭載したイメージング機器 *in vivo* imaging system (IVIS) を用いて可視化することができる(図4B)。つまり、このシステムを用いることにより、同一担がんマウスの固形腫瘍内低酸素領域の変化を定量的に、リアルタイムで、何度でも経時的に観察することが可能である¹¹⁾。しかも発光シグナルを定量することにより、低酸素がん細胞の増減を数値化して推移を観察することができる。たとえば、ヒト由来のすい臓がん細胞SUIT-2に5HRE-Luciferase レポーター遺伝子を組み込んだSUIT-2/5HRE細胞を構築し、膵臓に同所移植すると、移植後7週間までに、移植されたマウスは腹膜播種と腹水を伴って100%死亡する。その間、膵臓に移植したがん細胞が増殖し、転移し、腹部に広がっていく様子が、経時的に観察できる(図5)。

低酸素がん細胞のターゲティング

低酸素がん細胞を特異的に殺すため、ODDに融合するタンパク質として、強力なアポトーシス誘導能を有するcaspase-3の前駆体procaspase-3を選択した。Procaspase-3は、過剰発現しても細胞死を誘導することはないが、上流のカスベース等により切断されて活性型になると、死刑執行人と称されるほど、強力に細胞死を誘導する。従って、たとえODD-procaspase-3融合タンパク質が、正常細胞内で安定化するようなことがあっても、安定化しただけでは、細胞死は誘導されない。上述したように、低酸素がん細胞は、「死ぬべき運命にある弱ったがん細胞」であり、低いレベルではあるが、アポトーシスを引き起こすシグナルが活性化されている。従って、低酸素がん細胞で安定化したODD-procaspase-3は、切断されて活性型のCaspase-3となり、アポトーシスシグナルを増強する(図5)。低酸素依存的な融合タンパク質の安定化とアポトーシス誘導は培養細胞を用いた *in vitro* 実験と移植腫瘍内で確認することができた^{3,11-13)}。前述したPTDは、単に血流によって受動的に運ばれるだけでなく、濃度

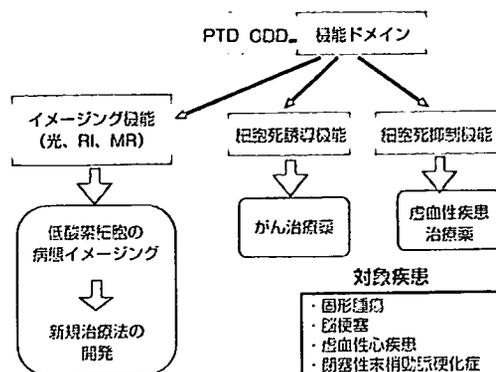


図6 PTD-ODDプロジェクト。PTD-ODD融合タンパク質は、機能ドメインに付加した機能を低酸素環境にある細胞で発揮し、有酸素環境にある細胞では機能しない。現在進めているプロジェクトでは、イメージング機能を付加して低酸素環境にある細胞を可視化する診断薬開発(左)、細胞死誘導機能を付加してがんの微小環境にあるがん細胞を特異的に死滅させる抗がん剤開発(中央)、および細胞死抑制機能を付加して虚血性疾患の治療を行う虚血性疾患治療薬開発(右)の3つがある。いずれも動物実験では、有効な結果を得ており、現在臨床応用に向けての開発を進めている。

勾配を利用して自ら分散する能力を融合タンパク質に付加するため、ODD-procaspase-3融合タンパク質を血流の悪い腫瘍内低酸素領域までデリバリーさせることができる。我々は、最近TATPTDよりも約5倍膜透過性が高いPTDアミノ酸配列を用いて、タンパク質製剤POP33(PTD3-ODD-Procaspase-3)を構築した。上述した同所移植すい臓がんモデルで、POP33の治療実験を行ったところ、POP33投与群では、低酸素がん細胞の腹部への拡大が有意に抑えられ、有意な延命効果をもたらすことがわかった。また、電極型酸素分圧測定器を用いて、腹腔内の酸素分圧を測定したところ、イメージの腹部への広がりにつれて、酸素分圧が低下することが確かめられた。

おわりに

HIF-1活性を持つ低酸素がん細胞をイメージング・ターゲティングすることは、腫瘍の悪性化をいち早く見つけ、治療するということを意味している。HIF-1の活性を抑えることは重要であり、現在多くのHIF-1活性抑制剤が開発されている。しかし、HIF-1活性抑

制剤が、HIF-1 活性を抑えても HIF-1 が活性化される環境はそのままである。たとえば、低酸素は低酸素のまま残されており、依然として放射線や抗がん剤に抵抗性である。我々は、環境標的により、がん細胞を悪性化しているがんの微小環境そのものを根こそぎ除く治療を実現するためのターゲティング研究を進めている。現在 PTD-ODD 融合タンパク質を用いたプロジェクト (図 6) は、1) 上記の低酸素がん細胞をターゲットとした抗がん剤開発の他に、2) 低酸素イメージング用プローブ開発、3) 虚血性疾患における低酸素細胞の細胞死抑制剤開発を行っている。PTD-ODD 融合タンパク質を用いたイメージングのためのプローブ開発は、臨床応用を目指して、現在光イメージングでプローブの特異性や体内動態評価を行っている。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。一日も早く臨床に應用できる診断薬・治療薬を開発することで、治療に貢献したい。

文 献

- 1) Fearon, ER. and Vogelstein BA genetic Model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61, 759-767.
- 2) Thomlinson, RH. and Gray, L.H. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 1955; 9: 539-549.
- 3) Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 38-47.
- 4) Brown JM and Wilson WR. Exploiting tumor hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 437-447.
- 5) Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-732.
- 6) Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 5447-5454.
- 7) Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, et al. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001; 107: 43-54.
- 8) Harada H, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S. Antitumor effect of TAT-oxygen-dependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells. *Cancer Res* 2002; 62: 2013-2018.
- 9) Schwarze, SR, Ho, A, Vocero-Akbani, A and Dowdy, S.F. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 1999; 285: 1569-1572.
- 10) Sobhanifar S, Aquino-Parsons C, Stanbridge EJ, Olive P. Reduced expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in perinecrotic regions of solid tumors. *Cancer Res* 2005; 65: 7259-7266.
- 11) Harada H, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M. Optical imaging of tumor hypoxia and evaluation of efficacy of a hypoxia-targeting drug in living animals. *Mol Imaging* 2005; 4: 182-193.
- 12) Kizaka-Kondoh S, Inoue M, Harada H, Hiraoka M. Tumor hypoxia: A target for selective cancer therapy. *Cancer Sci* 2003; 94: 1021-1028.
- 13) Inoue M, Mukai M, Hamanaka Y, Tatsuta M, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S. Targeting hypoxic cancer cells with a protein prodrug is effective in experimental malignant ascites. *Int J Oncol* 2004; 25: 713-720.
- 14) Harada H, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M. Antitumor protein therapy; application of the protein transduction domain to the development of a protein drug for cancer treatment. *Breast Cancer* 2006; 13: 16-26.
- 15) 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* 2006; 580: 5718-5722.

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

板坂 聡・原田 浩・近藤科江・平岡真寛

放射線治療抵抗性の重要な要因である腫瘍内低酸素の克服は長年の課題であったが、低酸素応答因子 hypoxia inducible factor -1 (HIF-1) の発見によって新たな展開を示している。われわれは HIF-1 活性化の経路を利用した低酸素イメージングにてマウス実験腫瘍内の低酸素領域の治療に伴う変化を画像化しており、今後の臨床応用に向け研究を継続している。放射線治療において低酸素イメージングは、強度変調放射線治療を用いた低酸素領域への線量増加や集学的治療の際の放射線治療のタイミングの決定など放射線治療の最適化・個別化にいろいろな応用が期待される。

はじめに

近年の放射線治療の技術はコンピュータ技術の革新に伴い加速度的に進歩している。正常組織への不必要な照射を避けることにより副作用を低減するだけでなく、安全に照射線量を増加することによって治療成績の向上にもつながっている。今後の方向性として、個々の腫瘍の性質に応じた放射線治療の個別化治療が模索されている。われわれの教室では、その中でも腫瘍内の低酸素に注目して新しい放射線治療の開発をめざしている。

I. 腫瘍内低酸素について

1. 癌と低酸素細胞

正常組織では低酸素領域は認められないが、固形腫瘍内では腫瘍細胞の速い増殖に血管新生が追いつかず、低酸素領域が出現することがよく知られている。2種類の低酸素細胞に大きく分類され、慢性低酸素細胞は毛細血管より約 70～100 μm の

距離にみられ、酸素が拡散するなかで消費され血管より遠い領域では低酸素状態になることによって形成される(図1)。慢性低酸素細胞のさらに外側では細胞が生育するのに必要な酸素を欠き、壊死巣となる。また、急性低酸素細胞とは腫瘍内の未熟な血管構造により血流が一過性に遮断されることによって形成されるが、血流状態が改善すると速やかに酸素状態が改善し酸素化される。低酸素細胞では酸素だけでなく代謝に必要な栄養分も不足しており、細胞にとって劣悪な環境にあるが、放射線治療や抗痛剤に対して治療抵抗性を示し再発や転移の原因となるため、臨床上重要な問題になっている。

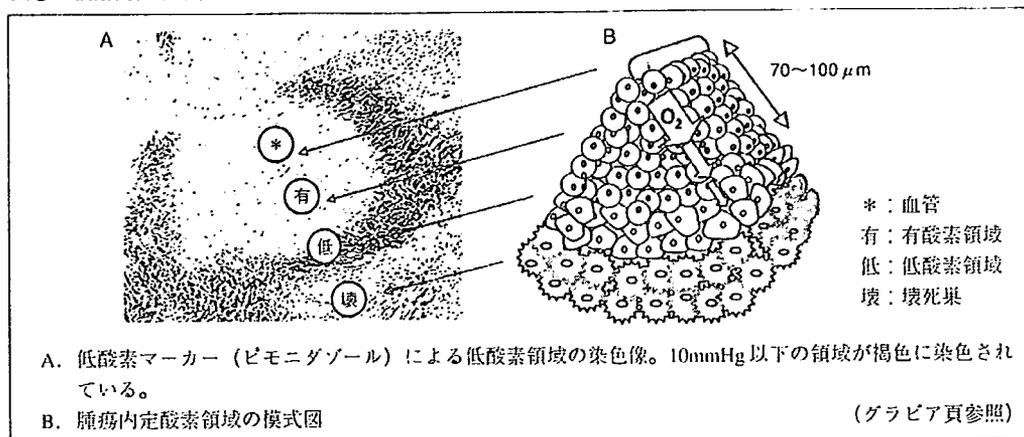
2. 放射線治療と低酸素

放射線治療の殺細胞効果はDNA二重鎖切断からはじまるが、X線では直接のDNA損傷(直接作用)より、酸素の存在下で電離放射線により形成されるラジカルによるDNA損傷(間接作用)の割合が多い。そのため、実際に様々な酸素濃度にて培養

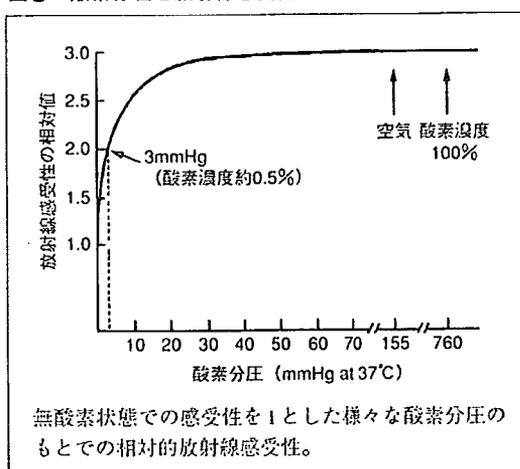
key words

放射線治療、癌、血管新生、低酸素、HIF-1、HRE、
光イメージング、強度変調放射線治療、集学的治療

図① 腫瘍内低酸素細胞



図② 酸素分圧と放射線感受性



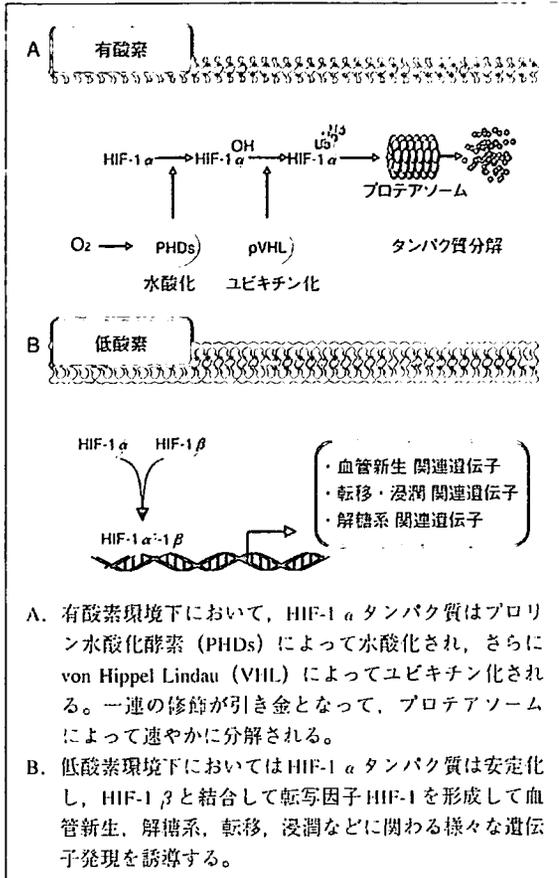
細胞に放射線を照射すると約20mmHgまでは生存率への影響はほとんどみられないが、3mmHg（酸素濃度約0.5%）までの低酸素にいたると放射線感受性は空気中での照射に比べ半減する（図②）。腫瘍内の低酸素領域が実際に存在することは、様々な動物実験腫瘍だけでなく、ヒトの腫瘍でも直接測定やピモニダゾール（pimonidazole）のような低酸素マーカーにて証明されてきた。同時に、ヒトの固形腫瘍内の低酸素領域が多くなると、生命予後の不良につながる事が明らかになってきた。治療成績の向上のため、電子親和性の高いニトロイミダゾール化合物類が低酸素細胞放射線増感剤

として開発に力が注がれてきた。有効性は証明されているが、副作用や増強効果の面から臨床あまり用いられないでいる。

3. 低酸素応答因子-1 (HIF-1)

近年、低酸素で活性化される転写因子の hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) が同定され、HIF-1により VEGFを筆頭とした血管新生にかかわる遺伝子、転移浸潤にかかわる遺伝子や解糖系の遺伝子など様々な遺伝子発現が増強されることがわかってきた。HIF-1は HIF-1 α と HIF-1 β の二量体であるが、その活性は主に HIF-1 α タンパク質の安定性に依存していることが報告されている。すなわち、HIF-1 β が恒常的に発現しているのに対し、HIF-1 α は通常酸素下においてプロリン水酸化酵素にて水酸化され、さらに von Hippel-Lindau (VHL) にてユビキチン化され、プロテアソームにて速やかに分解されるため、ほとんど発現していない。しかし、低酸素状態では α サブユニットは分解されず安定蓄積し、 β サブユニットと二量体を形成、核移行し、プロモーター上の hypoxia responsible element (HRE) に結合し、その下流の様々な遺伝子を発現する（図③）。これらの知見から低酸素が物理的に放射線治療や化学療法に対して治療抵抗性の原因となるだけでなく、腫瘍細胞の生存因子や血管新生、あるいは転移など生物学的に悪性度の促進となるような遺伝子発現の増強することが明らかになってきた。

図④ 低酸素応答因子-1 (HIF-1) による遺伝子発現活性化機構



II. 腫瘍内低酸素細胞に対する標的治療、分子イメージング

1. 低酸素標的における HIF-1 経路

固形腫瘍内の低酸素癌細胞という腫瘍に特異的な環境を標的とした治療に、新しく明らかにされた分子生物学的な知見を利用した治療法が模索されてきた。われわれの教室では、低酸素下で活性化される HIF-1 活性を利用し、低酸素癌細胞のイメージングおよびターゲティング研究に取り組んでいる。

2. 低酸素イメージング

腫瘍内の低酸素領域のイメージングは、癌の原発巣や転移巣の早期発見といった使い方だけでなく、放射線治療計画において照射する標的を決定

するために重要となる。われわれは低酸素刺激下に HIF-1 活性の経路を用いたルシフェラーゼを発現するベクターを作製し、腫瘍細胞に導入することによってマウス腫瘍モデルでの腫瘍内低酸素領域の光イメージングシステムを開発した²⁾。この技術は腫瘍内低酸素の変化を非侵襲的にかつ経時的に観察することを可能にした。当科で開発した低酸素細胞標的タンパク薬剤 (TOP3) と放射線を併用することによって腫瘍内低酸素細胞が減少し、抗腫瘍効果が増強することが確認されている³⁾ (図④)。

3. 低酸素イメージングのヒトへの応用

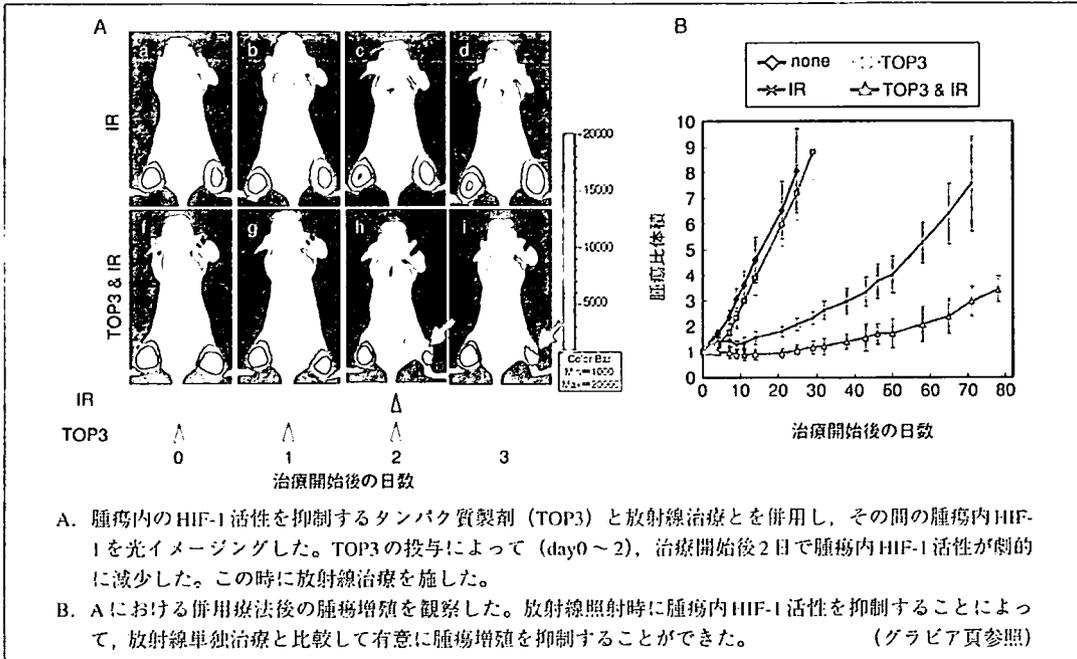
HIF-1 活性の経路を用いた低酸素光イメージングはマウスのような小動物では非常に有用な情報をもたらすことが証明されているが、光の透過性の問題からヒトへの応用までの道りは遠い。そのため、ヒトに応用可能な RI, MRI 製剤への応用についても研究中である。HIF-1 活性の経路を用いた低酸素イメージングの他に、ニトロイミダゾール製剤⁴⁾ や銅製剤 (Cu-ATSM)⁵⁾ を用いた PET イメージングの臨床への応用が始まりつつあり、癌の早期診断や転移診断での役割が期待されている。

III. 放射線治療への応用

1. 強度変調放射線治療

コンピュータ技術および放射線治療機器の急速な進歩は高精度の放射線治療を可能とし、隣接する正常臓器への照射線量を抑え、腫瘍に対して放射線を集中する高精度放射線治療が近年、様々な疾患に用いられるようになってきた。そのなかでも、強度変調放射線治療 (intensity modulated radiation therapy: IMRT) という技術は、放射線強度が不均一な照射野を複数組み合わせることで複雑な線量分布パターンを可能としている。これまで、通常の放射線治療では腫瘍への照射線量は均一になるように治療計画は立案されてきたが、IMRTでは腫瘍内に意図的な線量勾配 (dose painting) を作る標的体積内同時ブースト (SIB: simultaneous inte-

図④ 腫瘍内 HIF-1 のリアルタイムイメージングと放射線治療への展開



A. 腫瘍内の HIF-1 活性を抑制するタンパク質製剤 (TOP3) と放射線治療とを併用し、その間の腫瘍内 HIF-1 を光イメージングした。TOP3 の投与によって (day0~2), 治療開始後 2 日で腫瘍内 HIF-1 活性が劇的に減少した。この時に放射線治療を施した。

B. A における併用療法後の腫瘍増殖を観察した。放射線照射時に腫瘍内 HIF-1 活性を抑制することによって、放射線単独治療と比較して有意に腫瘍増殖を抑制することができた。(グラフィア頁参照)

grated boost) が可能となった。この技術の確立から生物学的標的体積 (BTV: biological target volume) という概念が出現し、腫瘍内でも特に増殖が多い部分や低酸素領域など悪性度の高いと予想される部位への線量増加が検討されている。

BTV を決定するイメージングの 1 つとしてフルオロデオキシグルコース (FDG)、放射性同位元素 (¹⁸F) が結合したブドウ糖の類似物質を利用した FDG-PET (陽電子断層撮影) が最近、治療計画に導入されるようになってきている。FDG は糖代謝が亢進している悪性腫瘍の中によく取り込まれ、PET と CT との画像融合 PET-CT という手法は、形態からだけではなく機能イメージングの組み合わせで、より正確な腫瘍の進展範囲を決定することが可能になると考えられる。すでに PET-CT のイメージングを用いた SIB-IMRT が臨床でも用いられ、腫瘍内でも悪性度の高いと思われる FDG の取り込みが強い部分に線量を増加し、高い抗腫瘍効果を得ようと試みられている (図⑤)。

2. 低酸素と IMRT

放射線抵抗性を克服する方法の 1 つとして、腫

瘍内低酸素領域への線量増加が考えられている。低酸素イメージングが確立すれば、腫瘍の中でも低酸素領域に SIB-IMRT を用いて線量増加を行うことによって治療効果の増強が期待される。しかしながら、腫瘍内低酸素領域を標的とした SIB-IMRT の導入前にはいくつかの解決すべき問題点がある。まず、腫瘍内の低酸素領域は固定されたものではなく、腫瘍が増殖する中で新たな血管新生や治療に伴う変化にてダイナミックに変化していくものである。このことは、われわれの動物モデルにも証明されている (図④)。また、低酸素の領域にどれくらい放射線治療の線量を増加すれば治療効果の向上がみられるかはまだ明らかでない。低酸素イメージングの方法や精度、また腫瘍内低酸素の生物学的検討をさらに加えたのちに、SIB-IMRT を用いた腫瘍内低酸素領域への線量増加は臨床に应用されるべきものであろう。

3. 低酸素イメージングと放射線治療

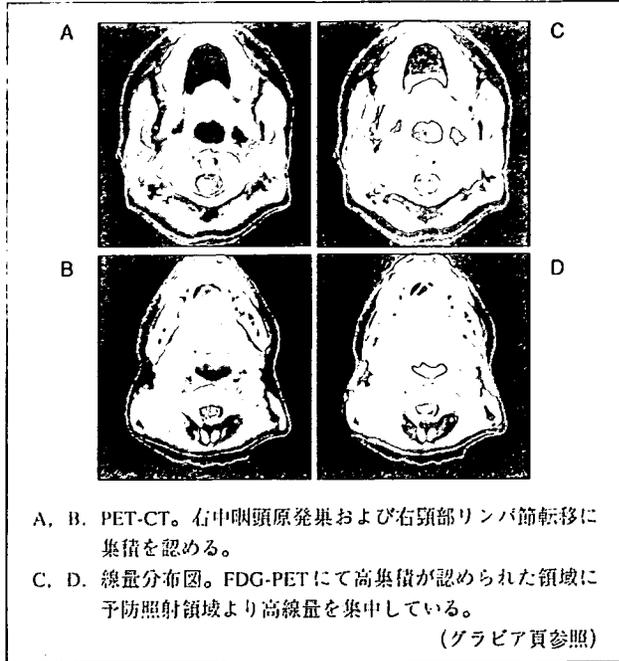
難治癌に対して様々な治療を組み合わせることによってより良い治療効果を得ようという集学的治療がしばしば用いられるが、放射線治療を組み

合わせた集学的治療では放射線治療のタイミングが問題になることが多い。特に、低酸素標的薬剤や抗 VEGF 治療、抗 EGF 治療といった直接あるいは間接的抗血管新生療法は腫瘍内の低酸素に影響を及ぼし、放射線治療のタイミングの決定は大きな課題となる。低酸素イメージングの導入により、特にこれらの分子標的治療を用いた集学的治療の中で、放射線治療が効果的な併用時期を明らかにするという新しい治療の最適化・個別化が可能になることが期待される。

おわりに

腫瘍内低酸素細胞の分子生物学的経路の解明は放射線治療の進歩において新たな可能性を示している。そのなかでも低酸素の分子イメージングは、放射線治療計画の立案において有用な情報を与えてくれるだけでなく、低酸素標的薬剤や抗血管新生剤などを用いた新しい集学的治療の中で、最適な放射線治療の併用時期を明らかにする

図5 頭頸部腫瘍に対する SIB-IMRT



など放射線治療の最適化・個別化で重要な役割を担うことが期待される。

参考文献

- 1) Semenza GL : Annu Rev Cell Dev Biol 15, 551-578, 1999.
- 2) Harada H, Kizaka-Kondoh S, et al : Mol Imaging 4, 182-193, 2005.
- 3) Harada H, Kizaka-Kondoh S, et al : Oncogene [Epub

ahead of print] 2007.

- 4) Kaneta T, Takai Y, et al : Ann Nucl Med 21, 101-107, 2007.
- 5) Tanaka T, Furukawa T, et al : Nucl Med Biol 33, 743-750, 2006.

著者プロフィール

放射線医学講座放射線腫瘍学・画像応用治療学研究紹介
http://www.med.kyoto-u.ac.jp/j/grad_school/introduction/1313/

平岡真寛

1977年 京都大学医学部医学科卒業
1984年 京都大学大学院医学研究科修了
京都大学医学部附属病院放射線科助手
1987年 米国スタンフォード大学放射線腫瘍科客員
助教授
1988年 京都大学医学部放射線医学講師
1992年 同助教授
1995年 京都大学大学院医学研究科放射線医学講座
腫瘍放射線科学教授
2005年 放射線医学講座放射線腫瘍学・画像応用
治療学に研究分野名変更
2006年 京都大学ナノメディシン融合教育ユニット
長(併任)
2007年 京都大学医学部附属病院がんセンター長
(併任)