

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790868  
 研究課題名(和文)：  
 放射線治療抵抗性に関わる腫瘍内微小環境のイメージングと時空間的解析  
 研究課題名(英文)：  
 Spatiotemporal Analysis of Tumor Microenvironments Relating to  
 Radioresistance of Tumor Cells  
 研究代表者：  
 原田 浩 (HARADA Hiroshi)  
 京都大学・大学院・医学研究科 講師  
 研究者番号：80362531

**研究成果の概要：**

**【背景】**腫瘍細胞の無秩序な増殖と代謝によって、固形腫瘍内部には血管から十分な酸素が供給されない“低酸素領域”という微小環境が生じる。低酸素環境に曝されたがん細胞は HIF-1 という転写因子を活性化し、環境への適応を図る。HIF-1 の活性化はがんの転移、浸潤、血管新生、放射線治療抵抗性を誘導することが報告されていることから、「腫瘍増殖過程や放射線治療期間中に HIF-1 活性が如何に変動するのか?」、「HIF-1 陽性細胞が如何に挙動するのか?」が重要な研究課題となっている。

**【目的】**本研究では、固形腫瘍内の HIF-1 活性をリアルタイムに可視化するシステムを確立し、腫瘍増殖過程、および放射線治療後の HIF-1 陽性細胞の挙動をイメージングし、時空間的に解析することを目指した。そして、次世代の高精度放射線照射技術(強度変調放射線治療:IMRT)で線量を集中すべき治療標的の挙動を捉えることを目指した。

**【結果】**1) 以前より我々が開発を進めてきた「HIF-1 依存的にルシフェラーゼを発現する *5HREp-luc* レポーター遺伝子」に改良を加え、低酸素応答性を約 47000 倍にまで高め、よりリアルタイムに HIF-1 活性の変動を感知するレポーター遺伝子 *5HREp-ODD-luc* を構築することに成功した。2) 当該レポーター遺伝子を安定に導入した移植腫瘍に対して放射線(γ線)を照射し、その後の HIF-1 活性を光イメージングした。その結果、放射線照射 6 時間後に腫瘍内 HIF-1 活性が VHL 依存的に一過的に減少し、逆に照射 24 時間後には PI3K/Akt 系依存的に亢進することが明らかになった。これは、放射線の分割照射プロトコルを確立する上で重要な知見である。3) 有酸素環境下で緑色蛍光を発し、低酸素環境下で赤色蛍光を発する遺伝子組み換え癌細胞を樹立した。当該細胞を免疫不全マウスに移植して腫瘍増殖過程における HIF-1 陽性領域のダイナミクスをマイクロレベルでイメージングすることに成功した。HIF-1 陽性細胞は日ごとにその局在を変え、常に血管から数 10~100 ミクロメートル程度離れた位置に存在していた。当該マイクロイメージングにより、血管から HIF-1 陽性領域までの距離が当該血管の径に逆相関する事が明らかになり、血管造影像を基に HIF-1 陽性領域の局在をシュミレーションするための予備データを取得することに成功した。以上の結果をもって、「腫瘍増殖過程、および放射線照射後の HIF-1 活性のダイナミクスを解明する」という当初の計画を完遂することができた。

**交付額**

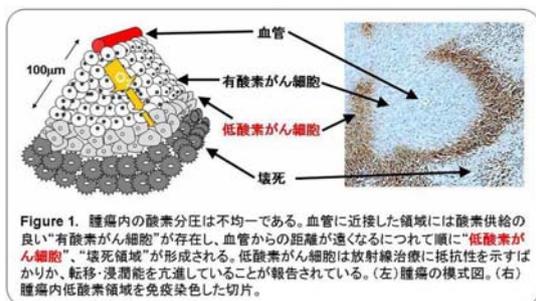
(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	240,000	2,240,000

研究分野： 医歯薬学  
 科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・放射線科学  
 キーワード： 放射線治療学

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞の無秩序な増殖によって、固形腫瘍内部には血管から十分な酸素が供給されない“低酸素領域”という腫瘍特異的な微小環境が存在する (Figure 1)。低酸素微小環境にあるがん細胞は放射線治療に抵抗性を示し、治療後の腫瘍再増殖 (再発) の主因であることが報告されていた。また、低酸素微小環境は がん細胞の転移・浸潤能を亢進する環境因子であることも報告されていた。これらの理由から、腫瘍内の低酸素領域は、高精度放射線照射技術 (強度変調放射線治療: IMRT) で線量を集中すべき治療標的であると認識されていた。がんを征圧するためには敵を理解することが肝要であり、低酸素微小環境の量・局在・性質に関して詳細なデータを取得する事が求められていた。



### 2. 研究の目的

本研究では、固形腫瘍内の HIF-1 活性をリアルタイムに可視化するシステムを確立して、腫瘍増殖過程、および放射線治療後の HIF-1 陽性細胞の挙動をイメージングし、時空間的に解析することを目指した。そして、次世代の高精度放射線照射技術 (強度変調放射線治療: IMRT) で線量を集中すべき治療標的の挙動を捉えることを目指した。

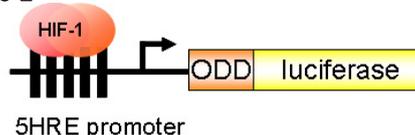
### 3. 研究方法と研究成果

#### 3-1. 5HREp-ODD-luc レポーター遺伝子の構築

HIF-1 は  $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットからなるヘテロダイマーで、その活性は主に  $\alpha$  サブユニットの“安定性”と“修飾”に依存している。この HIF-1  $\alpha$  タンパク質の安定性は、HIF-1  $\alpha$  上のポリペプチド Oxygen-dependent degradation domain (ODD

domain) に強く依存していることが知られている。低酸素環境下で安定化した HIF-1  $\alpha$  タンパク質は、 $\beta$  サブユニットと結合して、hypoxia-responsive element (HRE) と呼ばれるエンハンサー配列に結合し、VEGF や GLUT1 をはじめとする様々な遺伝子の発現を誘導する。我々は ODD domain と HRE を組み合わせることによって、「HIF-1 依存的にルシフェラーゼを発現する新たなレポーター遺伝子 (5HREp-ODD-luc) を構築した (Figure 2)。

Figure 2



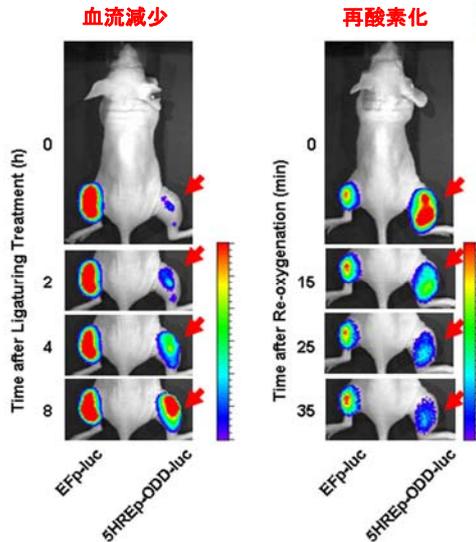
そして当該レポーター遺伝子が低酸素環境下で、有酸素環境下の 47000 倍ものルシフェラーゼ活性を誘導することを確認した。本レポーター遺伝子に由来するバックグラウンド (有酸素環境下での発現量) が無視出来る程低い点は特筆すべきである。また、従来のレポーター遺伝子 (5HRE-luc 等) と比較して、外界環境変化への即時応答性が向上した点も特筆すべき手ある。(参考文献 4-⑩: Harada et al. BBRC 2007)

#### 3-2. 腫瘍内 HIF-1 活性のリアルタイム光イメージング

上述の 5HREp-ODD-luc レポーター遺伝子をヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLa に安定に導入し、HIF-1 依存的にルシフェラーゼを発現する細胞株を樹立した。これを免疫不全マウス (BALB/c nu/nu) の右下肢大腿部皮下に移植し、固形腫瘍を形成させた。当該担癌マウスにルシフェリン (ルシフェラーゼの基質) を投与した後、In vivo 発光イメージング装置 (IVIS-200 および IVIS-SPECTRUM) に供することによって、移植腫瘍内 HIF-1 活性をルシフェラーゼ発光としてイメージングする系を確立した。移植腫瘍への血流を物理的に欠如させたところ、移植腫瘍が発する光が強くなった (次頁 Figure 3 左)。逆に、移植腫瘍への血流量を増加させた場合に、わずか数分の間に発光量が劇的に減少した (次頁 Figure 3 右)。5HREp-ODD-luc レポーター遺伝子を利

用することで、非特異的なバックグラウンドを大幅に減少させ、さらに即時応答性を向上させることが出来る点を *in vivo* においても確認することが出来た。(参考文献 4-⑩: Harada et al. BBRC 2007)

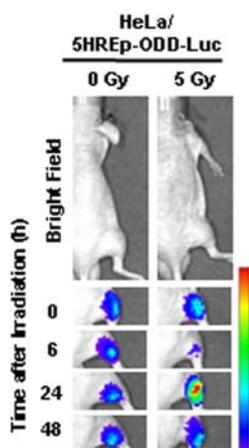
Figure 3



### 3-3. 放射線照射後の腫瘍内 HIF-1 活性の変動とそのメカニズム

新たに確立した腫瘍内 HIF-1 活性のイメージング系を利用して、放射線照射後の腫瘍内 HIF-1 活性の変動をリアルタイムにイメージングした。その結果、 $\gamma$  線照射 (5Gy) の 6 時間後に腫瘍内 HIF-1 活性が一過的に減少し、逆に照射 24 時間後には劇的に亢進することが明らかになった。(参考文献 4-②: Harada et al. Br J Cancer 2009)

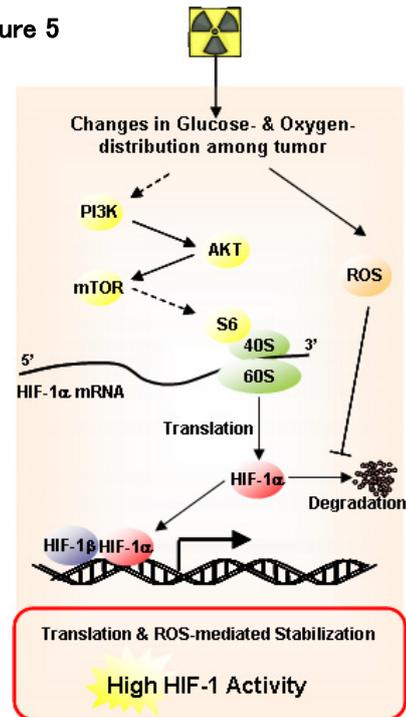
Figure 4



VHL 遺伝子欠損細胞株を用いて同様の実験を実施した場合には、放射線照射 6 時間後の HIF-1 活性の減少が見られなくなった。一方、Akt 遺伝子をノックダウンした場合や、PI3K 抑制剤投与、さらには mTOR

抑制剤を投与した場合に、照射 24 時間後の HIF-1 活性化が見られなくなった。これらの結果から、放射線照射後の HIF-1 活性の減少、および亢進機構として、それぞれ PHD-VHL 系による HIF-1  $\alpha$  タンパク質の分解と、PI3K-Akt-mTOR 系による HIF-1  $\alpha$  タンパク質の翻訳効率向上が重要な役割を果たしていることを明らかにした (Figure 5)。(参考文献 4-②: Harada et al. Br J Cancer 2009、参考文献 4-④: Harada et al. J Biol Chem 2009)

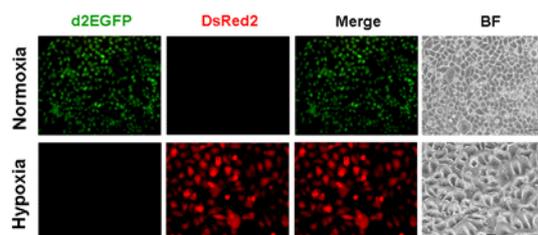
Figure 5



### 3-4. HIF-1 陽性細胞の局在をシュミレーションするための基礎研究

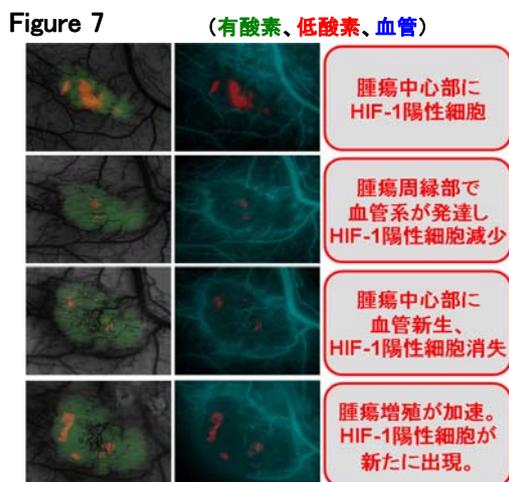
5HREp-ODD-luc レポーター遺伝子のルシフェラーゼを赤色蛍光タンパク質 (DsRed2) に変え、さらに Tet リプレッサーによる遺伝子発現抑制機構を活用することで、有酸素環境下で緑色蛍光を発生し、低酸素環境下で赤色蛍光を発生する遺伝子組み換え癌細胞を樹立した (Figure 6)。(参考文献 4-⑦: Harada et al. BBRC 2008)

Figure 6



当該細胞を免疫不全マウスに移植して腫瘍増殖過程における HIF-1 陽性領域のダイ

ナミクスをマイクロレベルでイメージングすることに成功した。HIF-1 陽性細胞は日ごとにその局在を変え、常に血管から数 10～100 ミクロメートル程度離れた位置に存在していた (Figure 7)。(参考文献 4-⑦: Harada et al. BBRC 2008)



当該マイクロイメージングにより、“血管から HIF-1 陽性領域までの距離”が“当該血管の径”に相関する事が明らかになった ( $y = 1.38x + 19.4$ ,  $R = 0.801$ ) (Figure 7)。(参考文献 4-⑦: Harada et al. BBRC 2008) 血管造影を基に HIF-1 陽性領域の局在をシュミレーションするための予備データを取得することに成功した。

### 3-5. HIF-1 陽性細胞を治療標的とする有効性の検証

我々は以前より「HIF-1 発現細胞のアポトーシスを誘導するタンパク質製剤 (TOP3 と命名)」の開発を進めてきた。TOP3 を利用して、がんの放射線治療抵抗性に HIF-1 が如何に参与しているのかを解析した。そして、HIF-1 は放射線治療後の腫瘍血管新生に必須であり、これを抑制することによって放射線治療後長期にわたって腫瘍血管密度を低く抑え、結果として腫瘍増殖を大幅に遅延させることが可能であることが明らかになった。本研究で構築した低酸素応答遺伝子発現システムを利用し、HIF-1 陽性細胞を標的とする遺伝子治療用ベクター (Ad/5HREp-BCD) を開発した。これが低酸素環境下で自殺遺伝子 BCD (バクテリア・シトシンデアミナーゼ遺伝子) を発現することを確認した。本遺伝子治療ベクターと放射線治療とを併用することによって、相乗的な腫瘍増殖抑制効果が見られることを明らかにし、HIF-1 を治療標的とする意義を改めて確認することが出来た。

### 4. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件、責任著者に\*を付した)

- ① Ou G, Itasaka S, Zeng L, Shibuya K, Yi J, **Harada H**, Hiraoka M. HIF imaging is useful to determine the timing of combining Bevacizumab with radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* in press. (査読あり)
- ② **\*Harada H**, Itasaka S, Zhu Y, Zeng L, Xie X, Morinibu A, Shinomiya K, Hiraoka M. Treatment regimen determines whether a HIF-1 inhibitor enhances or inhibits the effect of radiation therapy. *Br J Cancer.* **100**:747-757. 2009. (査読あり)
- ③ Miki K, Kuramochi Y, Oride K, Inoue S, **Harada H**, Hiraoka M, Ohe K. Ring-Opening Metathesis Polymerization-Based Synthesis of ICG-Containing Amphiphilic Triblock Copolymers for in Vivo Tumor Imaging. *Bioconjugate Chem.* **20**:511-517. 2009. (査読あり)
- ④ **\*Harada H**, Itasaka S, Kizaka-Kondoh S, Shibuya K, Morinibu A, Shinomiya K, Hiraoka M. The Akt/mTOR pathway assures the synthesis of HIF-1 $\alpha$  protein in a glucose- and reoxygenation-dependent manner in irradiated tumors. *J. Biol. Chem.* **284**:5332-5342. 2009. (査読あり)
- ⑤ Hirata N, Fujisawa Y, Tanabe K, **Harada H**, Hiraoka M, Nishimoto S. Radiolytic activation of cytarabine prodrug possessing 2-oxoalkyl group: one-electron reduction and cytotoxicity characteristics. *Org Biomol Chem.* **7**:651-654. 2009. (査読あり)
- ⑥ Zeng L, Ou G, Itasaka S, **\*Harada H**, Xie X, Shibuya K, Kondoh S, Morinibu A, Shinomiya K, Hiraoka M. TS-1 enhances the effect of radiotherapy by suppressing radiation-induced hypoxia-inducible factor-1 activation and inducing endothelial cell apoptosis. *Cancer Sci.* **99**:2327-2335. 2008. (査読あり)
- ⑦ **\*Harada H**, Xie X, Itasaka S, Zeng L, Zhu X, Morinibu A, Shinomiya K, Hiraoka M, (HH and XX contributed equally to this work.). Diameter of tumor blood vessels is a good parameter to estimate HIF-1-active regions in solid tumors. *Biochem Biophys Res Commun.* **373**:533-538. 2008. (査読あり)
- ⑧ Tanabe K, Hirata N, **Harada H**, Hiraoka M, and Nishimoto S. Fluorescence Imaging of Hypoxia: One-Electron Reduction and Fluorescence Emission Characteristics of Indolequinone-Coumarin Conjugate. *ChemBioChem.* **9**: 426-432. 2008. (査読あり)
- ⑨ **Harada H**, Kizaka-Kondoh S, Li G, Itasaka S, Shibuya K, Inoue M and Hiraoka M. Significance of HIF-1-active cells in

- angiogenesis and radioresistance. *Oncogene*. 26:7508-7516. 2007. (査読あり)
- ⑩ Liu J, **\*Harada H**, Ogura M, Shibata T and Hiraoka M. Adenovirus-mediated hypoxia-targeting cytosine deaminase gene therapy enhances radiotherapy in tumor xenografts. *Br J Cancer*. 96: 1871-1878. 2007. (査読あり)
- ⑪ **\*Harada H**, Kizaka-Kondoh S, Itasaka S, Shibuya K, Morinibu A, Shinomiya K, Hiraoka M. The combination of hypoxia-response enhancers and an oxygen-dependent proteolytic motif enables real-time imaging of absolute HIF-1 activity in tumor xenografts. *Biochem Biophys Res Commun*. 360: 791-796. 2007. (査読あり)
- ⑫ **\*原田浩**, 平岡真寛. Hypoxia-inducible Factor-1 (HIF-1)による放射線治療後の腫瘍増殖亢進機構. 放射線生物研究. 44: 60-69. 2009. (査読なし)
- ⑬ **\*原田浩**, 板坂聡, 平岡真寛. 分子イメージングによる放射線治療の新展開. *JSMI Report*. 1: 5-8. 2008. (査読なし)
- ⑭ 板坂聡, **原田浩**, 近藤科江, 平岡真寛. 新しい治療法評価への分子イメージングの応用・放射線治療の分子イメージング. *遺伝子医学MOOK*. 9:279-283. 2008. (査読なし)
- ⑮ **\*原田浩**, 平岡真寛. 腫瘍内 HIF-1 活性の光イメージング -その方法と重要性-. *癌の臨床*. 54:97-103. 2008. (査読なし)

#### 【学会発表】(計 16 件)

- ① 原田 浩、板坂 聡、朱 宇熹、曾 麗華、謝 学軍、森嶋 章代、篠宮 和美、平岡真寛「HIF-1 標的薬の二面性 ～放射線治療効果の“増感”と“減弱”～」第 11 回 国際がん治療増感研究会・シンポジウム
- ② Harada H, Itasaka S, Kondoh S, Shibuya K, Morinibu A, Shinomiya K, Hiraoka M 「The PI3K/Akt/mTOR pathway assures the synthesis of HIF-1 $\alpha$  protein in a glucose- and reoxygenation-dependent manner in irradiated tumors」第 6 回 がんとハイポキシア研究会
- ③ 原田 浩、板坂聡、近藤科江、澁谷景子、平岡真寛「HIF-1 によるがんの放射線耐性メカニズムの解明」第 51 回 日本放射線影響学会総会
- ④ H Harada, S Itasaka, S Kondoh, K Shibuya, M Hiraoka 「PHD/VHL Pathway and PI3K/Akt/mTOR Pathway Function in the Biphasic Profile of Intratumoral HIF-1

- Activity after Ionizing Radiation」第 67 回 日本癌学会総会
- ⑤ H Harada, S Itasaka, S Kondoh, K Shibuya, M Hiraoka 「The PI3K/Akt/mTOR pathway assures the synthesis of HIF-1 $\alpha$  protein in a glucose- and reoxygenation-dependent manner in irradiated tumors」54th Annual Meeting of Radiation Research Society
- ⑥ 原田浩、平岡真寛「HIF-1 によるがんの放射線耐性メカニズムの解明」若手放射線生物研究会・原子炉専門研究会
- ⑦ 原田浩、板坂聡、近藤科江、澁谷景子、森嶋章代、篠宮和美、平岡真寛 「PHD/VHL および PI3K/Akt/mTOR 系に依存した放射線応答機構」第 47 回 日本医学放射線学会生物部会学術大会
- ⑧ H Harada, S Itasaka, S Kondoh, K Shibuya, M Hiraoka 「VHL- and PI3K/Akt/mTOR-dependent pathways function in biphasic profile of intratumoral HIF-1 activity after ionizing radiation」第 14 回 国際がん治療増感研究会
- ⑨ 原田浩、板坂聡、近藤科江、澁谷景子、平岡真寛「HIF-1 陽性低酸素細胞とピモニダゾール陽性低酸素細胞の放射線治療抵抗性」第 13 回放射線治療増感研究会総会
- ⑩ Harada H 「Real-time Imaging of Tumor Hypoxia」Japan-China International Symposium for Cancer Therapy
- ⑪ Harada H, Itasaka S, Kizaka-Kondoh S, and Hiraoka M 「Postirradiation Dynamics of Intratumoral HIF-1 Activity」The 13th International Congress of Radiation Research
- ⑫ 原田浩、板坂聡、近藤科江、澁谷景子、平岡真寛「放射線照射後の腫瘍内 HIF-1 活性のダイナミクス」第 5 回 がんとハイポキシア研究会
- ⑬ Harada H, Itasaka S, Kizaka-Kondoh S, and Hiraoka M 「Real-time Imaging of Tumor Hypoxia as HIF-1-dependent Bioluminescence and Fluorescence」1st International Symposium on Nano-medicine -from basic to applications-
- ⑭ Harada H 「Tumor Hypoxia and HIF-1」International Symposium for Cancer Therapy
- ⑮ 原田浩、板坂聡、近藤科江、澁谷景子、平岡真寛「放射線照射後の腫瘍内 HIF-1

活性のダイナミクス」第 50 回 日本放射線影響学会

- ⑩ 原田浩「低酸素応答因子 (HIF-1) の活性を利用した腫瘍内低酸素領域の光イメージング」低酸素応答因子 (HIF-1) の活性を利用した腫瘍内低酸素領域の光イメージング

#### 【図書】(計2件)

- ① \* **Harada H.** and Hiraoka M. Protein Transduction Domain-mediated Delivery of Anti-cancer Drugs and Proteins. Lu Y and Mahato RI (eds). Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics. Springer. In press. 2009.
- ② \* **原田浩**、平岡真寛. 低酸素がん細胞の光学イメージング. からだと酸素の辞典. 印刷中. 2009.

#### 【産業財産権】

- 出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

#### 【その他】

ホームページ等：

<http://radiotherapy.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>

#### 5. 研究組織

##### (1)研究代表者

原田 浩 (HARADA Hiroshi)  
京都大学・大学院・医学研究科 講師  
研究者番号：8 0 3 6 2 5 3 1

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし