

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21240049

研究課題名（和文） 病的低酸素を可視化するバイオイメーシングプローブの構築

研究課題名（英文） Development of in vivo imaging probe specific for hypoxic diseases

研究代表者

近藤 科江（KONDOH SHINAE）

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：40314182

研究成果の概要（和文）：

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。したがって、低酸素状態を感度良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。本研究では、我々が独自に開発した低酸素細胞内で特異的に安定化する融合タンパク質 PTD-ODD を用いて低酸素領域を持つ腫瘍を非侵襲的に検出する診断用プローブを開発する目的で、PET/SPECT プローブの開発を手掛け、臨床応用への可能性を検討したので報告する。

研究成果の概要（英文）：

A tumor-specific microenvironment is characterized by hypoxia. The hypoxic status of various solid tumors has been attributed as an indicator of adverse prognosis due to tumor progression toward a more malignant phenotype with increased metastatic potential and resistance to treatment. We have been developing a fusion protein that is specifically stabilized in hypoxic tumors. In this study, we had attempted to construct PET/SPECT probes with the fusion protein and explored the possibility of clinical application.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	17,700,000	5,310,000	23,010,000
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	33,100,000	9,930,000	43,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオイメーシング、低酸素、PETS、PECT

1. 研究開始当初の背景

「病的低酸素」に関連する疾患として血流の停止によって起こる脳梗塞や心筋梗塞、中年以降の男性に多い閉塞性動脈硬化症といった虚血性疾患が代表的なものであるが、腫瘍内にも低酸素領域が存在する（図1）。臨

床研究では、低酸素領域の多い腫瘍は、治療に耐性で、悪性である傾向が大きいことが報告されている。つまり、「病的低酸素」は、日本の三大死因である「脳血管障害、心疾患、がん」の重要なシグナルであり、これをいち早く捉え、評価することは、早期診断、早期

治療という観点からいっても非常に重要である。

図1 病的低酸素に関連する疾患



2. 研究の目的

我々はこれまで、低酸素の生理的变化にตอบสนองして、低酸素細胞内に特異的に安定化する融合たんぱく質 PTD-ODD-X を構築し、がんの低酸素領域をターゲットにした抗がん剤や、虚血性疾患の予後を改善するための治療薬の開発を行ってきたが、X に付加する機能にイメージング機能をもたせ、世界初のバイオプローブの開発を目的とした研究を遂行する。

3. 研究の方法

1) POH 融合タンパク質の構築

まず、PTD-ODD 融合タンパク質のプローブとしての適性を評価するために、実験動物を用いた評価系の構築および、近赤外蛍光色素で標識した PTD-ODD 融合タンパク質のプローブの構築を計画した。

1-1) 近赤外蛍光プローブの構築

我々は、HIF-1 の酸素依存的制御機構に着想を得て、HIF が活性化した細胞内で特異的に安定化する PTD-ODD 融合タンパク質を開発している(図2)。PTD-ODD 融合タンパク質は、膜透過ドメイン (PTD: Protein Transduction Domain)、ヒト HIF-1 \cdot から単離した ODD ドメインより構成されている。

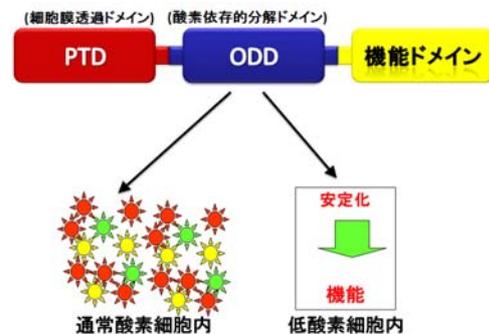


図2 PTD-ODD 融合タンパク質

PTD は、Dowdy らによって、HIV 由来の TAT ペプチドを用いることで全身の組織にタン

パク質分子を輸送できることが示されて以来、DDS に広く応用されている。

我々は独自に決定したアミノ酸配列による PTD を使用しており、TAT などよりも高効率に細胞内に融合タンパク質を導入できることを確認している。PTD によって細胞内に輸送されたプローブは、ODD によって細胞内の酸素分圧依存的に制御される。また、ヒト HIF-1 \cdot が PHD によって水酸化修飾を受ける 564 番目のプロリンを含む ODD ドメイン内の配列を検討した結果、546-603 アミノ酸配列を結合した融合タンパク質が、有酸素下において、ユビキチン-プロテアソーム系によって最も効率的に分解制御されることを確認している。一方、HIF が活性化する低酸素下では、プロテアソーム分解を逃れ、細胞内で安定化することで、HIF 活性特異的な蛍光シグナルを得ることができる。

今回、標識に用いる化合物の種類によって、光イメージング、PET/SPECT に用いる事ができるように、PTD-ODD 融合タンパク質にリガンドを介して、自由に標識する化合物がつけ変えられる様に Tag タンパク質をつけることにした。まずは市販されている HalotagTM (Promega, WI, USA) を PTD-ODD に融合させた POH タンパク質をコードした cDNA を構築し、大腸菌で発現・精製した後、標識用の化合物を付加した Halotag ligand と Halotag との結合を介して POH を近赤外蛍光色素や RI 標識化合物を用いて標識し、プローブを作成する(図3)。

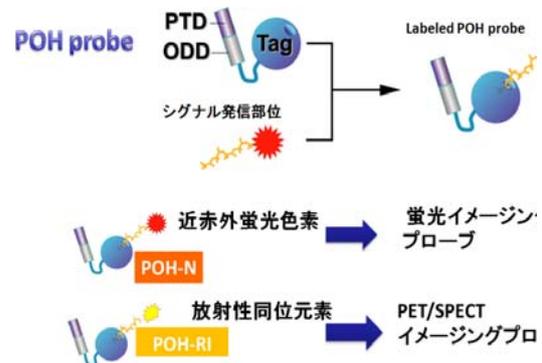


図3 POH を用いた光、PET/SPECT プローブの構築

1-2) 光イメージングを用いたプローブ評価系の構築

がんモデルマウスや虚血性疾患モデルを構築することで、開発されたプローブの有効性や特異性の評価を行った。腫瘍内 HIF 活性は、がん細胞に HIF の転写活性特異的に発現が誘導される発光ルシフェラーゼ酵素をコードするレポーター遺伝子を導入し、生体蛍光イメージングを行う事で、標的となる HIF 活性を有する低酸素領域を可視化する。全て

の動物実験は、各研究機関で適切な審査の上、承認を受けて行われた。

1 - 3) POH-N 近赤外光蛍光プローブの構築

POH タンパク質を大腸菌で発現・精製した後、近赤外蛍光色素を付加した Halotag ligand と Halotag との結合を介して POH を近赤外蛍光色素で標識し、近赤外光蛍光プローブ POH-N を構築した。

1 - 4) POH-N 近赤外光蛍光プローブを用いた腫瘍内 HIF 活性部位の可視化

皮下腫瘍モデルマウスに POH-N 近赤外光蛍光プローブを投与後、経時的に蛍光イメージングを撮ることで、プローブの動態および標的特異性の評価を行った。移植する腫瘍には、上記 1 - 2 で構築した評価系を用いた。

1 - 5) POH-N 近赤外光蛍光プローブを用いた脳梗塞モデルにおける虚血部位の可視化

片側虚血脳梗塞モデルマウスに POH-N 近赤外光蛍光プローブを投与後、経時的に蛍光イメージングを撮ることで、プローブの動態および標的特異性の評価を行った。

2) PET プローブの開発

PTD-ODD 融合タンパク質の PET プローブ化を目指して、非放射性フッ素およびヨウ素を用いた効率的合成条件の検討を行った。既に開発され動物実験を行っている近赤外蛍光色素標識 PTD-ODD 融合タンパク質のデザインを参考に、ドラッグデザインとその妥当性について、腫瘍移植モデルマウスを用いたインビボ基礎評価を行った。全ての動物実験は、東北薬科大学で適切な審査の上、承認を受けて行われた。

2 - 1) 非放射性フッ素およびヨウ素標識プローブの構築

短寿命核種である ^{18}F または ^{123}I による放射標識を想定した効率的合成条件を見出すために、まずは非放射性同位元素を用いた PTD-ODD 標識化を検討した。

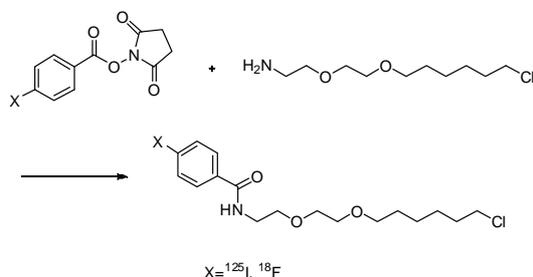


図 4 標識 Halotag リガンド

放射性核種の導入位置については、PTD-ODD の各ドメインに標識化合物が付加されると機能が損なわれる事が予想されたため、PTD-ODD の構造変化を伴わないように

機能性タンパク質に標識化合物を特異的に付加する標識 Halotag リガンドを合成し、そして PTD-ODD に融合させる行程を計画した。したがって標識プローブの構築は、図 4 のような構築行程で行うことにした。

2 - 2) 放射性ヨウ素標識プローブの合成

非放射性核種で見出した合成法に準じて、放射性同位元素を用いた標識 Halotag リガンドの合成を行い、PTD-ODD 融合タンパク質に連結した。PTD-ODD 融合タンパク質への連結や、動物モデルを用いた放射能分布実験による基礎評価のため、 ^{125}I による標識合成を採用した。 ^{125}I 標識体を用いた標識合成や融合タンパク質への連結条件は、同じハロゲンとしての化学的性質をもつ PET 核種 ^{18}F または SPECT 核種 ^{123}I への適用が可能であり、またイメージング評価のための基礎的な情報をもたらすものである。

2 - 3) 放射性標識プローブのイメージングプローブとしての基礎評価

イメージングプローブの基礎評価として、マウス腫瘍モデル(皮下移植)を作成し、構築した PET プローブを投与後、経時的に主要臓器の放射線量を測定する事で、PET プローブをの特異性および安定性を評価した。動物モデルには、マウス大腸がん細胞を皮下移植したものを作成した。

3) SPECT プローブの構築

POH を用いた SPECT プローブを構築するにあたり、まずは SPECT プローブ標識に汎用されている streptavidin - Biotin 系を用いて、PTD-ODD 融合タンパク質の SPECT プローブとしての評価を行い、その結果をうけて POH を用いた SPECT プローブの開発を計画した。

3 - 1) PTD-ODD - streptavidin の構築と評価

PTD と ODD domain、streptavidin の融合タンパク質に ^{125}I 標識 3-iodobenzoyl norbiotinamide (IBB) を結合させた ^{125}I 標識 IPOS を用いた。高空間分解画像を得るため、高比放射能および高放射能濃度を有するプローブの調製方法を予め検討、至適化した。

このプローブをマウス乳癌細胞 FM3A を移植した C3H/He マウスに投与し、小動物用 SPECT/CT 装置 (NanoSPECT/CT, Bioscan, Washington, D.C.) を用いて、全身および腫瘍部を in vivo SPECT 撮像した。腫瘍部に関しては、自作の共通ベッドを用いて体部を固定した後、SPECT 撮像と 3.0T 高磁場 MRI 装置による撮像を行い、SPECT-MRI 融合画像を作成した。

撮像後、臓器および腫瘍組織の放射能測定、腫瘍組織の autoradiography を行い、in vivo 画像と比較検討し、SPECT/CT 画像や

SPECT-MRI 融合画像の腫瘍内 HIF 活性の可視化の有用性を検証した（全ての動物実験は、各研究期間で適切な審査の上、承認を受けて行われた）。

3 - 2) POH SPECT プロープの構築と評価

過去の報告に従い、POH をコードしたプラスミドを調製し、細胞 (BL21-CodonPlus cells) に導入し、GST-tag タンパク質として融合タンパク質を発現させた。タンパク質を GST-column で回収・精製した後に、GST-タグを precision protease により選択的に除き、融合タンパク質を得た。

本研究ではプロープ標識核種として SPECT 核種である Indium-111 (111In) を用いての検討を進めた。111In は金属核種であり、DTPA や DOTA 等の配位子と錯体を形成する。そこでプロープ合成の第 1 段階として HaloTag Ligand (HL) に DOTA 誘導体を有機化学的に導入することを試みた。DOTA 誘導体にはいくつかの種類があり、また HL への結合方法もチオエステル型、アミド型などいくつかの候補が挙げられる。これらの違いは、HL-DOTA 誘導体合成の難易度に影響するだけでなく、111In の標識効率や、体内からの排泄経路や量にも影響を及ぼす可能性がある。そこで数種類の HL-DOTA 誘導体の合成を行った

4. 研究成果

1) 光イメージングを用いたプロープの構築

1 - 1) 近赤外蛍光プロープの構築

POH タンパク質を大腸菌で発現・精製した。色素は、ICG, Cy5.5, AlexaFluor680, Alexafluor750, IR-800 など 700~800nm 付近に蛍光波長をもつ数種類を用意し、Halotag ligand に結合させて、色素-Halotag ligand を作製した。

1 - 2) POH-N の体内動態および標的特異性の解析

構築した POH-N を蛍光イメージングにより HIF 活性を可視化できる評価系を用いて、POH-N の体内動態および in vivo での標的特性の評価実験を行った。

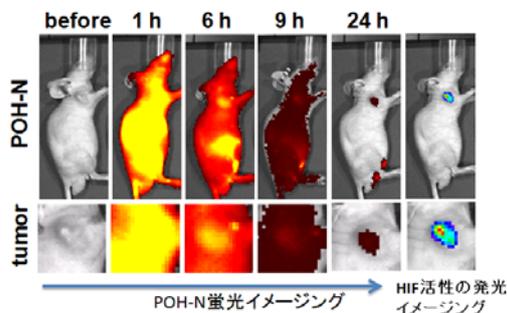


図5 POH-N の蛍光イメージング

まずは、皮下移植モデルマウスを用いて、尾静脈から POH-N を投与して経過的に光イメージングを行いプロープの動態を観察した

ところ、POH-N は投与後速やかに全身に分布し、その後、腫瘍への集積が観察されるが、非特異的に分布したプロープの影響で特異的シグナルが得られるまで約 24 時間を要した(図 5)。

24 時間後に得られた蛍光イメージングは、HIF 活性を示す発光イメージングと良く相関しており、POH-N が腫瘍内 HIF 活性部位をイメージングしている事が示唆された。

POH-N は、主に肝臓を介して徐々にクリアランスされ、T/B 比が 2 を超えるまでに 16 時間を要した。

これらの結果は、POH-N が標的特異性を有する事を示しており、図 5 で得られた腫瘍特異的イメージは、構築した POH-N が HIF 活性を有する腫瘍領域に特異性を持っており、近赤外蛍光色素の代わりに、放射性同位元素を用いて標識することで、PET/SPECT プロープとして開発できる可能性を強く示唆していた。

1 - 4) POH-N 近赤外光蛍光プロープを用いた脳梗塞モデルでの虚血部位の可視化

腔内中大脳動脈閉塞を 1 時間行う事により片側脳に梗塞を起こし、POH-N を投与したところ、6 時間後に梗塞部位と思われる所に特異的なシグナルを観察した。そこで、頭皮を除去し、梗塞を起こした脳側にシグナルがある事を確認し、脳の切片を蛍光イメージングで観察した所、虚血部位からのシグナルを確認した(図 6)。

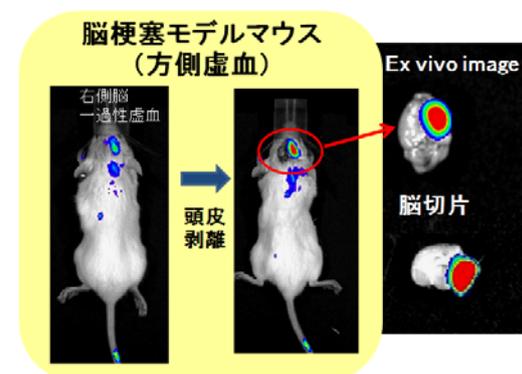


図6 POH-N による脳梗塞モデルマウスでの虚血部位可視化

2) PET プロープの開発

2 - 1) 放射性ヨウ素標識プロープの合成

PET 核種にも同じ手法が応用できる放射性ヨウ素 125 を用いた効率的合成条件の検討として、¹²⁵I-SIB の Halotag Amine への導入およびモデルたんぱく質への導入反応を行った。

精製した標識リガンドは 46%以上の標識率で POH に組み込まれていることが確認できた。単離収率としては ¹²⁵I 標識 POH は放射化学的

収率 3%以上で得られた。以上より、PET 核種に応用可能な放射性ハロゲン標識 PTD-ODD 融合タンパク質(POH)合成法を確立した。

2 - 3) 放射性標識プローブのイメージングプローブとしての基礎評価

モデルマウスに ^{125}I 標識 POH 投与し、3 時間後に安楽死させ、血液および各組織を摘出、それぞれの湿重量および放射能を測定した。今回の動物実験の結果では、腫瘍への放射能集積性が低かった。腫瘍筋肉比、腫瘍血液比もともに低く腫瘍への特異的集積性を認めなかった。また、投与後 3 時間までに速やかに尿排泄された。以上のことは、PET 核種である ^{18}F 標識体であっても同様の生体内における安定性の低さが予想される。

3) SPECT プローブの構築

3 - 1) PTD-ODD-streptavidin の構築と評価

HIF1 ミミック融合タンパク質である ^{125}I -IPOS を SPECT プローブとし、マルチピンホールコリメータを装着した小動物専用高空間分解能 SPECT/CT 装置を用いて、*in vivo* の腫瘍内 HIF1 陽性領域可視化を目指した。

FM3A 担がんマウスに ^{125}I -IPOS を投与し、投与 24 時間後に SPECT 画像を得た。

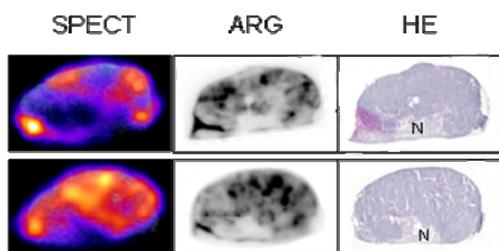


図 7 摘出腫瘍による *ex vivo* SPECT 画像

図 7 には、摘出腫瘍による *ex vivo* SPECT 画像と、撮像後に凍結薄切標本を作製して得たオートラジオグラフィ (ARG) および HE 染色画像を示す。ARG により腫瘍内の ^{125}I -IPOS の不均一な分布が証明された。これに比べて *ex vivo* SPECT 画像は分解能では劣るが、その分布の局在は十分に描画できていることが明らかとなった。

次に、 ^{125}I -IPOS の集積が HIF 1 に確かに相関することを ARG と免疫染色によって確かめた。さらに、それらの相関を定量的に検討するために、画像上に 10 カ所の関心領域 (ROI) を設定し、それぞれの集積の相関を求めた。ARG の結果と HIF 1 免疫染色は画像の比較からもよく相関しており、また、ROI 解析からも良好な正の相関を認めた ($R=0.75$ 、 $P<0.0001$)。従って ^{125}I -IPOS の集積は HIF 1 の分布をよく反映しているものと考えられた。

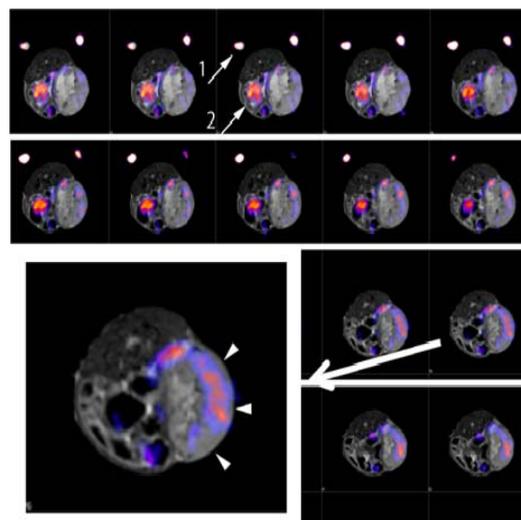


図 8 腫瘍内 ^{125}I -IPOS 分布を可視化した SPECT と MR の融合画像。矢印 1 はマーカー、矢印 2 は膀胱、矢尻は腫瘍を示す。

SPECT/CT 融合画像の CT では腫瘍内部の性状を知ることは難いため、SPECT 撮像と 3.0T 高磁場 MRI 装置による T2 強調画像の撮像を行い、SPECT-MRI 融合画像を作成した。図 8 に axial 軸の連続画像と拡大画像を示す。

腫瘍内で高い MR シグナルが観察されている部位は、がんが壊死を起こしている部位と推察された。 ^{125}I -IPOS はこの部位には集積しておらず、その周辺部に分布していた。SPECT-MRI 融合画像によって、 ^{125}I -IPOS を用いた HIF1 陽性低酸素領域の腫瘍内不均等局在に関して、より多くの情報を得ることができると考えられた。

高比放射能および高放射能濃度を有する ^{125}I 標識 IPOS と高空間分解能 SPECT 装置を用いることで、腫瘍内 HIF 活性の不均一な発現の描出に成功した。また、SPECT と MRI との融合画像は極めて有用な情報を与え得ることが示唆された。本研究課題の目的である病的低酸素を可視化するイメージングプローブの開発に大きな進展を得たと考える。また、SPECT を含む核医学および MRI は、共に臨床ですでに確立されている診断方法であり、本研究での成果から、本プローブの臨床応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 62 件、全て査読有)

1. Ueda M, Kudo T, Mutou Y, Umeda IO, Miyano A, Ogawa K, Ono M, Fujii H, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M, Saji H. Evaluation of ^{125}I -IPOS as a molecular imaging probe for hypoxia-inducible factor-1-active regions in a tumor: Comparison among SPECT/CT imaging,

autoradiography, and immune-histochemistry. Cancer Sci. 102(11):2090-6 (2011).

2. Kudo T, Ueda M, Konishi H, Kawashima H, Kuge Y, Mukai T, Miyano A, Tanaka S, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M, Saji H. PET imaging of hypoxia-inducible factor-1-active tumor cells with pretargeted oxygen-dependent degradable streptavidin and a novel (18)F-labeled biotin derivative. Mol Imaging Biol. 13(5):1003-10 (2011)

〔学会発表〕(計 93 件)

1. 近藤科江、腫瘍の低酸素環境応答とその可視化 千里ライフサイエンスセミナー、2012年2月24日 千里ライフサイエンスセンター、大阪
2. Kizaka-Kondoh S, Takahiro Kuchimaru and Tetsuya Kadonosono. In vivo Imaging of HIF-active Cancers by an Oxygen-Dependent Degradative Probe with an Interchangeable Labeling System. 4th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2010), Nov 29th 2010, Okazaki, Japan
3. Kizaka-Kondoh S, Tanaka S. Imaging probe for tumor malignancy. SPIE 2009 BIOS Biomedical Optics Symposium, Jan 29th, 2009. San Jose, CA, USA

〔図書〕(計 1 件)

1. 小島周二、大久保恭仁 編著 / 加藤真介、工藤なをみ、坂本光、佐々木徹、月本光俊、山本文彦 著、薬学テキストシリーズ 放射化学・放射性医薬品学、朝倉書店 (2011) B5 / 264 ページ / 2011 年 05 月 15 日、ISBN978-4-254-36265-7

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称 : Novel molecular assembly , molecular probe for molecular imaging and molecular probe for drug delivery system using the same, and molecular imaging system and drug delivery system

発明者 : 原 功、山原 亮、小関 英一、木村 俊作、近藤科江、牧野 顕

権利者 : 株式会社 島津製作所、国立大学法人京都大学

種類 : 特許権

番号 : PCT/JP2009060253

出願年月日 : 2011 年 1 月 25 日

国内外の別 : 国外

取得状況 (計 3 件)

名称 : Polypeptide unstablizing protein in cells under aerobic conditions and DNA encoding the same

発明者 : 平岡真寛・近藤科江・原田 浩

権利者 : オリエンタル酵母工業(株)

種類 : 特許権

番号 : 7,700,754

取得年月日 : 2010 年 4 月 20 日

国内外の別 : 米国

名称 : Polypeptide unstablizing protein in cells under aerobic conditions and DNA encoding the same

発明者 : 平岡真寛・近藤科江・原田 浩

権利者 : オリエンタル酵母工業(株)

種類 : 特許権

番号 : 2,449,802

取得年月日 : 2012 年 2 月 7 日

国内外の別 : カナダ

名称 : Polypeptide unstablizing protein in cells under aerobic conditions and DNA encoding the same

発明者 : 平岡真寛・近藤科江・原田 浩

権利者 : オリエンタル酵母工業(株)

種類 : 特許権

番号 : 1,403,365

取得年月日 : 2012 年 2 月 7 日

国内外の別 : 欧州 (仏、英、伊、独)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

近藤科江 (KIZAKA-KONDOH SHINAE)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号 : 40314182

(2)研究分担者

山本文彦 (YAMAMOTO FUMIHIKO)

東北薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 40253471

梅田 泉 (UMEDA O. IZUMI)

国立がん研究センター・臨床開発センター・室長

研究者番号 : 40160791

(H22 年)

近藤 玄 (KONDOH GEN)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号 : 40243258