

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791184

研究課題名（和文）：

HIF-1 活性の光イメージングによる化学放射線療法プロトコルの最適化

研究課題名（英文）：

Optical Imaging of Intratumoral HIF-1 activity to Optimize Treatment Regimens for Chemoradiotherapy

研究代表者：

原田 浩（HARADA HIROSHI）

京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユニット・講師

研究者番号：80362531

**研究成果の概要（和文）：**

腫瘍内の HIF-1 活性を可視化する手法を利用して、“HIF-1 活性に影響を及ぼす薬剤（血管新生阻害剤や低酸素標的薬）と放射線”との併用プロトコルを最適化することを目指し、以下の成果を得た。

1. 抗 VEGF 中和抗体 Bevacizumab を担がんマウスに投与した 1 日後、腫瘍血管正常化に伴って低酸素分画が劇的に減少することを確認した。逆に Bevacizumab 投与 3 日後には、腫瘍内低酸素分画の増加に伴って HIF-1 活性が亢進することを見出した。前者のタイミングで放射線治療を施すことで、放射線治療効果を劇的に増強させ得ることを見出した。
2. 放射線照射後に亢進する HIF-1 活性を HIF-1 阻害剤で抑制することにより、最も高い併用効果が得られることを見出した。

**研究成果の概要（英文）：**

Here, I and my colleagues performed a series of optical imaging experiments to visualize intratumoral HIF-1 activity, and optimized some combination of radiation with antitumor drugs, which could modulate HIF-1 activity, such as a VEGF neutralizing agent, bevacizumab, and a HIF-1 inhibitor, YC-1.

1. Optical imaging experiments showed that administration of a VEGF-neutralizing agent, bevacizumab, temporally induced vascular normalization and decreased hypoxic fraction in tumor xenografts 1 day after the treatment. When radiation treatment was given in this timing, the combined treatment significantly delayed tumor growth compared to radiation therapy alone.
2. We found that administration of a HIF-1 inhibitor, YC-1, suppressed radiation-induced activation of intratumoral HIF-1 activity, and then significantly delayed the growth of recurrent tumor after radiation therapy.

**交付決定額**

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

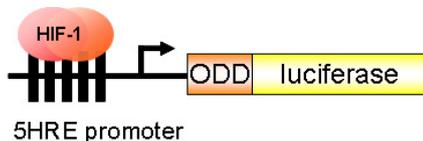
キーワード：放射線、腫瘍（がん）、低酸素、微小環境、光イメージング

## 1. 研究開始当初の背景と目的

がん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“低酸素性細胞”が存在する。この細胞群は放射線治療に抵抗性を示すことから、放射線治療医にとって大きな懸念材料である。低酸素性細胞が放射線抵抗性を示す理由は多岐にわたるが、近年、『放射線照射によって腫瘍内部で hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) が活性化し、放射線抵抗性を亢進する』というメカニズムが明らかにされてきた。これを機に HIF-1 活性を阻害する薬剤 (YC-1 など) の開発に弾みがついた。申請者も“新規タンパク質製剤 (TOP3)”や“HIF-1 標的遺伝子治療法”の開発を進め、それらが放射線治療の効果を増強することを確認してきた。その一方で申請者らは近年、『HIF-1 阻害剤の投与タイミングを誤ると、HIF-1 阻害剤によって増加した低酸素性細胞が、放射線治療の効果を減弱させてしまう』ことを見出した。これは『HIF-1 阻害剤と放射線治療の併用効果を最大限に得るためには、HIF-1 活性を指標として併用プロトコルを最適化することが必須である』ことを示している。

申請者らは、HIF-1 依存的にルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子を構築し、世界に先駆けて固形腫瘍内の HIF-1 活性を“光”としてイメージングすることに成功していた (Figure 1)。また、HIF-1 活性に依存して色を変える細胞株 (緑色蛍光[不活性化] ⇄ 赤色蛍光[活性化]) を樹立することにも成功し、HIF-1 が活性化している領域をマイクロの単位で解析する準備を整えていた。これら独自の評価系を利用して、“放射線と化学療法剤”との併用プロトコルを最適化する本研究を着想するに至った。

Figure 1



## 2. 研究の目的

申請者の持つ「移植腫瘍内 HIF-1 活性をリアルタイムにイメージングする技術」に関し、その定量性と空間分解能を改善し、高精度のイメージング手法を確立する。そして、“放射線と HIF-1 阻害剤”、および“放射線と HIF-1 活性に影響を及ぼす抗がん剤 (血管新生阻害剤など)”との併用プロトコルを最適化し、将来の化学放射線療法の礎を築くことを目指す。

## 3. 研究の方法と研究成果

### 3-1. 光イメージング技術の高精度化

我々は、HIF-1 依存的にルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子 (5HREp-ODD-luc) を構築してきた (Figure 1)。

このレポーター遺伝子を安定に導入したヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLa 細胞を、免疫不全マウス (BALB/c nu/nu) の右下肢大腿部皮下に移植して固形腫瘍を形成させ、ルシフェリンを投与した後に *in vivo* 光イメージング装置 (IVIS-SPECTRUM) に供することで、移植腫瘍内 HIF-1 活性をルシフェラーゼ発光としてリアルタイムにイメージングする系を確立してきた。しかしながら、当該実験系の定量性には問題があり、微細な HIF-1 活性の変動を捉えることが不可能であった。

そこで本研究では、基質 (ルシフェリン) の投与に当たって小型浸透圧ポンプを用いる手法を取った。結果的に、浸透圧ポンプを担がんマウス皮内に埋め込んだ後、1 週間に亘って体内ルシフェリン濃度が一定に保たれ、極めて定量性の高い光イメージングが可能になることを見出した。また、発光蛋白質の代わりに、より空間分解能に優れた蛍光蛋白質を利用することで、1 細胞レベルのイメージングが可能な空間分解能を得ることに成功した。

### 3-2. 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

3-1 にて高精度化した発光イメージング系を用いて、放射線照射後に腫瘍内 HIF-1 活性が如何に変動するのかを解析した。 $\gamma$ 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。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 活性の低下、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。

### 3-3. 放射線治療と HIF-1 阻害剤の併用プロトコルの最適化

放射線照射後に腫瘍内 HIF-1 活性が劇的に変動するという事実と、HIF-1 が血管内皮細胞を放射線障害から防護するという作用をあわせて考えると、HIF-1 阻害剤と放射線の併用効果はプロトコルに大きく左右され

ることが予想できる。事実、担癌マウスを対象とした実験で放射線照射直後に HIF-1 阻害剤を投与した場合、放射線による HIF-1 の活性化が有意に抑制され、良好な増殖遅延効果が得られることを見出した。逆に HIF-1 阻害剤を放射線に先立って投与した場合、HIF-1 阻害剤が VEGF 発現の抑制、腫瘍血管密度の減少、さらには低酸素領域の増加を次々と誘導し、結果として放射線の治療効果を減少させてしまうことが明らかになった。これらの結果は、放射線による HIF-1 の活性化を HIF-1 阻害剤で抑制することで、最も良好な併用効果が得られることを示している。

### 3-4. 放射線治療と VEGF 阻害剤 (アバスタン) の併用プロトコルの最適化

光イメージング実験により、腫瘍内 HIF-1 活性が Bevacizumab 投与 2 日後より有意に亢進し、その変化が免疫組織染色による低酸素マーカー (ピモニダゾール) 陽性領域の増加と同期していた。Bevacizumab 投与 1 日後、または 3 日後に放射線治療を併用したところ、1 日後の併用では放射線治療効果の増強が、3 日後の併用では逆に放射線治療効果の低減が見られた。Bevacizumab 治療後の腫瘍内低酸素領域の増加は HIF-1 活性の亢進時期と一致し、かつ放射線治療効果の低減とも一致していた。以上の結果は、放射線治療と Bevacizumab の組み合わせにおいて、最適な併用時期を知るために HIF-1 活性のイメージングが有用であることを示唆している可能性がある。

## 4. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕 (計 18 件)

- Maki T, Ihara M, Fujita Y, Nambu T, **Harada H**, Ito H, Nakao K, Tomimoto H, Takahashi R. Aigogenic roles of adrenomodulin through VEGF induction. *NeuroReport*. in press.
- Makino A, **Harada H**, Okada T, Kimura H, Amano H, Saji H, Hiraoka M, Kimura S. Effective encapsulation of a new cationic gadolinium chelate into apoferritin and its evaluation as a MRI contrast agent. *Nanomedicine*. in press.
- Maki T, Ihara M, Fujita Y, Nambu T, Miyashita K, Yamada M, Washida K, Nishio K, Ito H, **Harada H**, Yokoi H, Arai H, Itoh H, Nakao K, Takahashi R, Tomimoto H. Angiogenic and vasoprotective effects of adrenomedulin on prevention of cognitive decline after chronic cerebral hypoperfusion in mice. *Stroke*. in press.
- Cilek MZ, Hirohata S, Hatipoglu OF, Ogawa H, Miyoshi T, Inagaki J, Ohtsuki T, **Harada H**, Kamikawa S, Kusachi S, Ninomiya Y. AHR, a novel acute hypoxia-response sequence, drives reporter gene under hypoxia in vitro and in vivo. *Cell Biol Int*. 35: 1-8. 2011.
- Kumar D, Kumar NM, Akamatsu K, Kusaka E, **Harada H** and Ito T. Synthesis and biological evaluation of indolyl chalcones as antitumor agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 20: 3916-3919. 2010.
- Komatsu H, **Harada H**, Tanabe K, Hiraoka M, Nishimoto S. Indolequinone-rhodol conjugate as fluorescent probe for hypoxic cells: enzymatic activation and fluorescence properties. *MedChemComm*. 1: 50-53. 2010.
- Harada H**, Hiraoka M. Hypoxia-inducible factor 1 in Tumor Radioresistance. *Current Signal Transduction Therapy*. 5:188-196. 2010.
- Zhao T, **Harada H**, Teramura Y, Tanaka S, Itasaka S, Moriniibu A, Shinomiya K, Zhu Y, Hanaoka H, Iwata H, Saji H, Hiraoka M. A novel strategy to tag matrix metalloproteinases-positive cells for in vivo imaging of invasive and metastatic activity of tumor cells. *J Control Release*. 144: 109-114. 2010.
- Miki K, Oride K, Inoue S, Kuramochi Y, Nayak RR, Matsuoka H, **Harada H**, Hiraoka M, Ohe K. Ring-opening metathesis polymerization-based synthesis of polymeric nanoparticle for enhanced tumor imaging in vivo: Synergistic effect of folate-receptor targeting and PEGylation. *Biomaterials*. 31:934-942. 2010.
- Tanabe K, Komatsu H, **Harada H**, Hiraoka M, Nishimoto S. Monitoring of Hypoxia-selective Enzymatic Reduction of Indolequinone derivative by 19F-NMR. *Photomedicine and Photobiology*. 31:31-32. 2009.
- Harada H**, Itasaka S, Kizaka-Kondoh S, Shibuya K, Moriniibu 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.
- Wakamatsu T, Tanaka T, Oda S, Nishi K, **Harada H**, Daijo H, Takabuchi S, Fukuda K, Hirota K. The intravenous anesthetics barbiturates inhibit hypoxia-inducible factor 1 activation. *Euro J Pharm*. 617:17-22. 2009.
- Harada H**, Itasaka S, Zhu Y, Zeng L, Xie X, Moriniibu 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.

14. Kizaka-Kondoh S, Tanaka S, **Harada H**, Hiraoka M. The HIF-1-active microenvironment: An environmental target for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 61:623-32. 2009.
  15. 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.* 75:463-467. 2009.
  16. Tanabe K, **Harada H**, Narazaki M, Tanaka K, Inafuku K, Komatsu H, Ito T, Yamada H, Chujo Y, Matsuda T, Hiraoka M, Nishimoto S. Monitoring of biological one-electron reduction by <sup>19</sup>F-NMR using hypoxia selective activation of a <sup>19</sup>F-labeled indolequinone derivative. *J Am Chem Soc.* 131:15982-15983. 2009.
  17. 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.
  18. 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.
- 〔学会発表〕（計 19 件）**
1. **原田浩**. 放射線生物学的視点で迫る「腫瘍低酸素・放射線抵抗性・がん再発の時空間関係」. 第 13 回 国際癌治療増感シンポジウム. 奈良. Feb. 11-12. 2011.
  2. **Harada H**. Tracking the dynamics of hypoxic tumor cells during tumor growth and after radiation therapy. The 1st International Symposium for Molecular-targeting Radiation Therapy. Kyoto. Feb. 3-4. 2011.
  3. **原田浩**. 光イメージングで迫る放射線治療後のがん再発メカニズム. 東北大学大学院 医学研究科附属 創生応用医学研究センター 酸素医学コアセンターシンポジウム. 仙台. Nov. 19. 2010.
  4. **原田浩**. 高精度放射線治療法の確立を見据えた低酸素イメージングの方向性. 第 50 回日本核医学会学術総会 シンポジウム:放射線治療計画に貢献する PET/CT の展望. 大宮ソニックシティ. Nov. 12. 2010.
  5. **原田浩**. 放射線治療後のがん局所再発における低酸素がん細胞の動態. 第 53 回日本放射線影響学会. 京都テルサ. Oct. 21. 2010.
  6. **原田浩**. 低酸素がん細胞の腫瘍内ダイナミクスと放射線治療抵抗性. 第 69 回日本癌学会学術総会 シンポジウム#17. 大阪国際会議場. Sep. 23. 2010.
  7. **原田浩**. 低酸素がん細胞の腫瘍内動態解析 ～がんの再発メカニズムの解明～. 群馬大学 Clinical Oncology Research 研究会. 群馬大学. June 3. 2010
  8. **Harada H**. Tracking the Dynamics of Hypoxic Tumor Cells during Local Tumor Recurrence after Radiation Therapy. Fourth Military Medical University Seminar. Xi'an, China. May 24. 2010.
  9. **原田浩**. Reoxygenation, HIF-1, and Radioresistance. 第 12 回癌治療増感研究シンポジウム. Feb. 14. 2010.
  10. **原田浩**. 低酸素誘導性因子-1(HIF-1)による癌の放射線耐性機構の解明とその克服. 第 52 回日本放射線影響学会. 広島. Nov. 13. 2009.
  11. **Harada H**. Peri-necrotic tumor cells cause recurrence after radiotherapy through migration to tumor blood vessels. International Symposium/Retreat, Kyoto University Global COE Program, Center for Frontier Medicine. Nov. 7. 2009.
  12. **Harada H**. Optical Imaging of Tumor Hypoxia, Cell Cycle, pH, and DNA double strand breaks to Analyze the Molecular Mechanism Underlying Tumor Radioresistance. 3rd International Symposium on Nanomedicine. Nov 4th. 2009.
  13. **原田浩**. A Molecular Mechanism Underlying HIF-1-mediated Tumor Radioresistance. 2009 年度日本癌学会. Oct. 3. 2009.
  14. **Harada H**. Optical Imaging of Intratumoral HIF-1 Activity to Elucidate the Mechanism Underlying HIF-1-mediated Tumor Radioresistance. Two Interests Seminars at Gray Institute for Radiation Oncology & Biology, University of Oxford. Oxford. United Kingdom. Sep. 25. 2009.
  15. **原田浩**. HIF-1 の活性化を介した癌の巧妙な放射線耐性機構 ～in vivo 光イメージングによるアプローチ～. 第 41 回日本臨床分子形態学会. 神戸. Sep. 3-5. 2009
  16. **原田浩**. がんの放射線耐性機構の解明と放射線治療への展開 -HIF-1 活性のイメージング研究に基づく提言-. 第 39 回放射線による制癌シンポジウム. 富山. Jul. 11. 2009.
  17. **Harada H**. Tumor Hypoxia: A Microenvironmental Target in Cancer Therapy. Asian Association of Radiation Research (AARR) Award Session in 2nd Asian Congress for Radiation Research (ACRR). Seoul, Korea. May 20th. 2009.
  18. **Harada H**. Optical Imaging of Intratumoral

HIF-1 Activity to Elucidate the Mechanism Underlying HIF-1-mediated Tumor Radioresistance. Symposium #10 (Tumor Microenvironment) in 2nd Asian Congress for Radiation Research (ACRR). Seoul, Korea. May 19th. 2009.

19. **Harada H.** Identification of the source of Tumor recurrence after radiation therapy. Radiation Oncology Seminar in Seoul National University, Seoul. May 18th. 2009.

#### 〔図書〕(計6件)

1. **\*Harada H.** Gene Therapy Strategy for Tumor Hypoxia. Targets in Gene Therapy. in press.
2. **\*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. pp297-319. Springer. 2009.
3. **\*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.
4. **\*原田浩**、平岡真寛. がんの放射線抵抗性機構の解明と放射線治療への展開 - HIF-1 活性のイメージング研究に基づく提言 -. 癌の臨床. 55:847-853. 2009.
5. **\*原田浩**. 2nd Asian Congress of Radiation Research (アジア放射線研究会議)に参加して -世界の放射線科学研究の動向分析-. 放射線生物研究. 44: 360-363. 2009.
6. **\*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.

#### 〔その他〕

##### ホームページ等

<http://www.cp.kyoto-u.ac.jp/Harada/>

#### 5. 研究組織

##### (1) 研究代表者

原田 浩 (HARADA Hiroshi)

京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユニット・講師

研究者番号：80362531