

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791187

研究課題名（和文） 代謝捕捉の概念に基づくHIF-1活性化低酸素腫瘍の高感度イメージング法の開発

研究課題名（英文） Development of the high-sensitive imaging method for HIF-1-active hypoxic tumors based on the metabolic trapping approach

研究代表者

上田 真史 (Ueda Masashi)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40381967

研究成果の概要（和文）：腫瘍の悪性化、治療抵抗性に関与する低酸素誘導因子（HIF-1）の酸素依存的分解に関与するアミノ酸配列に、膜透過配列と1型単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼを結合させた融合タンパク質（POTK）を構築し、それによってリン酸化されて細胞内に蓄積する基質プローブ（ ^{123}I ）FIAU）を利用することで、代謝捕捉の概念に基づく腫瘍内HIF-1存在低酸素腫瘍の高感度イメージングの可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) plays an important role in malignant tumor progression and in the development of resistance to radiotherapy. I designed a novel fusion protein (POTK) consisting of a protein transduction domain, herpes simplex virus type 1 thymidine kinase, and an essential part of the oxygen-dependent degradation domain of HIF-1 α that confers the same oxygen-dependent regulation as HIF-1 α on POTK. I demonstrated that POTK and ^{123}I FIAU, which is metabolized by POTK and trapped intracellularly, is potential probes for high-sensitive imaging of HIF-1-active regions in tumors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：放射性医薬品、分子イメージング、低酸素、HIF-1、代謝捕捉

1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍に存在する低酸素領域では放射線治療や抗癌剤に抵抗性を示すことが知られている。したがって、低酸素領域のイメージングができれば、腫瘍の悪性度の診断や治療法の選択、効果予測に有用な情報を得られると考えられる。低酸素領域に特徴的な生体内事象として Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) の存在が挙げられる。HIF-1 は酸素

依存的に分解を受け通常酸素条件下では速やかに分解し、低酸素条件下では安定に存在するという性質を有しており、この性質は HIF-1 に存在する Oxygen dependent degradation (ODD) ドメインにより制御されていることが明らかとなっている。申請者はこれまでに、この ODD ドメインを母体とし、細胞膜透過性に有効な塩基性ペプチド配列 (Protein transduction domain: PTD) と放射

標識ビオチン誘導体が結合できるストレプトアビジン単量体部位 (Streptavidin: SAV) を導入した融合タンパク質 PTD-ODD-SAV (POS) を開発し、POS と放射標識ビオチン誘導体を用いることで、腫瘍内 HIF-1 存在領域のイメージングが可能であることを明らかにした (Kudo T, Ueda M, *et al.*, J Nulc Med. 50:942-9, 2009)。本申請課題ではその研究成果を基盤として、代謝捕捉の概念に基づく HIF-1 存在領域の高感度イメージングのためのプローブ開発を計画した。

2. 研究の目的

本申請課題では、アビジン・ビオチン反応に代わり、外因性タンパク質である単純ヘルペスウイルス 1 型チミジンキナーゼ (Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase: HSV1TK) とそれによって選択的に代謝される放射標識アシクログアノジン・ウラシル誘導体を利用することで、放射標識ビオチン誘導体の腸への生理的集積の回避、代謝捕捉による放射性プローブの腫瘍集積増加、腫瘍/非標的組織比の向上を目指した。すなわち、PTD-ODD に HSV1TK を導入した融合タンパク質 PTD-ODD-HSV1TK (POTK) を設計し、それに代謝捕捉される 2'-fluoro-2'-deoxy-1- β -D-arabinofuranosyl-5-[¹²³I]iodouracil ([¹²³I]FIAU) を用いた HIF-1 存在領域の高感度イメージングの可能性を評価した。

3. 研究の方法

(1) 融合タンパク質の作製

pGEX-6P-3 ベクターに、POTK および HSV1TK の前半 25 残基を消失させた PTD-ODD- Δ HSV1TK (PO Δ TK) のアミノ酸配列をコードする cDNA を挿入した。発現ベクターを BL21 (DE3) pLysS に導入後、isopropyl-1-thio- β -D-galactoside で誘導することにより、Glutathione S-transferase (GST) 融合タンパク質として発現させた後、GST を切断して、POTK および PO Δ TK を得た。

(2) 融合タンパク質の酵素活性の検討

POTK、PO Δ TK と [³H]ganciclovir を 30°C で 4 時間インキュベートした後、diethylaminoethyl cellulose filter を用いてリン酸化型 [³H]ganciclovir を分離し、その放射能を測定した。

(3) Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 750 標識 POTK の作製

POTK に Alexa Fluor 488 C5-maleimide, Alexa Fluor 750 C5-maleimide を加え、遮光下室温で 2 時間反応させた後、サイズ排除クロマトグラフィー法により精製し、Alexa

Fluor 488, Alexa Fluor 750 標識 POTK を得た。

(4) [¹²⁵I]POTK の作製

POTK 溶液 (1 mg/mL) 100 μ L に Na¹²⁵I およびクロロミン T 溶液を順に加え、室温で 10 分間反応させた。亜硫酸水素ナトリウムを添加後、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) で平衡化したサイズ排除カラムクロマトグラフィー法により精製し、[¹²⁵I]POTK を得た。放射化学的収率及び純度は PD-10 desalting column にて測定した (放射化学的収率:61.3%、放射化学的純度:90%以上)。

(5) [^{123/125}I]FIAU の合成

2'-fluoro-2'-deoxy-1- β -D-arabinofuranosyl-5-(tri-n-butyltin)-uracil メタノール溶液に Na¹²⁵I あるいは NH₄¹²³I および 30% H₂O₂/酢酸 (1/3) 混合溶液を順に加え、室温で 30 分間反応させた。その後亜硫酸水素ナトリウムを添加し、メタノールを減圧留去後、逆相 HPLC を用いて精製を行った。逆相 HPLC は Cosmosil 5C₁₈-AR-II (i. d. 4.6 x 150 mm) を用い、移動層は水:メタノール (90:10 (0 min) \rightarrow 10:90 (20min)) とし、流速 1.0 mL/min、検出波長 254 nm とした。放射化学的純度は逆相 HPLC、または TLC (酢酸エチル:エタノール = 90:10) にて測定した ([¹²³I]FIAU の放射化学的収率:36.5%、放射化学的純度:94%以上、[¹²⁵I]FIAU の放射化学的収率:93.6%、放射化学的純度:99%以上)。

(6) 細胞培養

腫瘍細胞は C6 ラットグリオーマ細胞および HIF-1 依存的にルシフェラーゼを発現する HeLa/HRE-Luciferase ヒト子宮頸癌細胞を用い、10% Fetal Bovine Serum 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下にて培養した。

(7) 培養細胞への取り込みの検討

24 ウェルプレートに C6 細胞を播種し、37°C、5% CO₂ 条件下でプレインキュベートした後、0.2 mM CoCl₂ 含有 DMEM 中で Alexa Fluor 488 標識 POTK を添加して 1 時間後に FACS にて細胞に取り込まれた蛍光を測定した。12 ウェルプレートに C6 細胞を播種し、通常酸素 (20% O₂) 条件下及び低酸素 (0.1% O₂) 条件下で 6 時間プレインキュベートした。POTK を添加後、それぞれ同様の条件下でさらにインキュベートし、18 時間後に培地を除去し、[¹²⁵I]FIAU を添加して 6 時間後細胞に取り込まれた放射能を測定した。

(8) 培養細胞における POTK の分解の検討

12 ウェルプレートに C6 細胞を 1.0 x 10⁵ cells/mL/well で播種し、低酸素条件下で 18

時間培養した。その後 111 kBq の [¹²⁵I]POTK (0.5 μg) を添加し、24 時間後に細胞を PBS で 2 回洗浄し、さらに通常酸素条件下、低酸素条件下で培養し、1、3、6、12 時間後に培地中に排出された放射能について検討した。

(9) 担癌モデルの作製

雌性 Balb/c *nu/nu* マウス (5 週齢) に対し、C6 細胞を一匹あたり 4×10^6 cells/100 μl in PBS (-)、あるいは HeLa/HRE-Luciferase 細胞を 5×10^6 cells/100 μl in PBS (-) の濃度で右上肢に皮下移植し、移植後約 2 週間で実験に用いた。腫瘍の大きさは、C6 腫瘍マウスで 221 ± 117 mm³、HeLa/HRE-Luciferase 腫瘍マウスで 284 ± 96 mm³ ((長径) × (短径)²/2) であった。

(10) インビボにおける POTK の腫瘍集積と HIF-1 転写活性の比較

HeLa/HRE-Luciferase 腫瘍マウスに Alexa Fluor 750 標識 POTK (50 μg) を尾静脈より投与し、IVIS Spectrum (XENOGEN 社) を用いて経時的に蛍光撮像を行った (励起波長: 710 nm、蛍光波長: 780 nm)。投与 24 時間後にルシフェリン (2 mg) を腹腔内へ投与して、20 分後にルシフェラーゼ発光の撮像を行った。Living Image 3.0 software package (XENOGEN 社) を用いて腫瘍の蛍光量、発光量を定量し、POTK の腫瘍集積と HIF-1 転写活性を比較した。

(11) 体内分布実験

C6 腫瘍マウスに POTK (50 μg: プレターゲット群) あるいは 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) (vehicle 群) を尾静脈より投与し、3 時間後に [¹²⁵I]FIAU (37 kBq) を投与した。投与 2、4、6 時間後に断頭し、各臓器の重量、放射能を測定した。

4. 研究成果

(1) GST 融合タンパク質の精製

POTK は、GST 融合タンパク質として大腸菌を用いて発現させた。まず、GST 融合 POTK の発現を SDS-PAGE にて確認したところ、IPTG による誘導を行った大腸菌の溶解液では、IPTG による誘導を行っていない大腸菌の溶解液では見られないバンドが分子量約 75 kDa に検出され、GST 融合 POTK の発現が確認された。さらに、GST アフィニティーカラムによる精製を行い、GST を切断した後のタンパク質溶液を同様に確認したところ、約 51 kDa に単一のバンドが検出され、目的の融合タンパク質である POTK が得られたことが確認された。POΔTK も同様の方法で精製した。

(2) 融合タンパク質の酵素活性

HSV1TK の基質である [³H]ganciclovir を用いてチミジンキナーゼ活性を検討したところ、全長の HSV1TK を導入した POTK は、PTD および ODD と融合させていない HSV1TK と同程度の酵素活性を保持していたが、HSV1TK の前半 25 アミノ酸 残基を消失させた POΔTK は HSV1TK の約 5 分の 1 の活性しか示さず (Fig. 1)、配列の消失による活性の低下が示された。

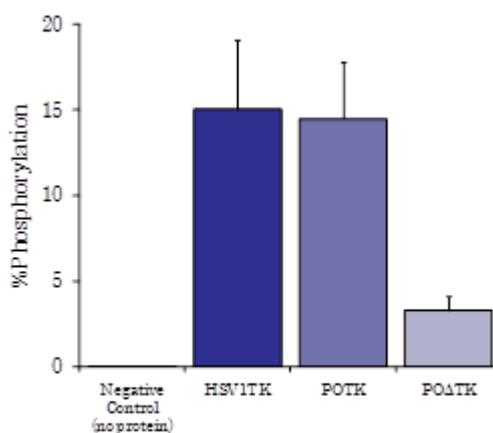


Fig.1 Thymidine kinase activity of HSV1TK, POTK and POΔTK

(3) 培養細胞への POTK の移行性

活性の保持されていた POTK の細胞内への移行性について、種々の細胞株を用いてフローサイトメトリー法により評価したところ、全ての細胞において Fluorescence ratio は 3 以上となり、Alexa Fluor 488 標識 POTK 添加による蛍光強度の増大が認められた。中でも C6 細胞は他の全ての細胞と比較して 8 倍以上高い値を示し、POTK の高い細胞内移行性が示唆された。

そこで、C6 細胞について細胞内の蛍光観察を行ったところ、所期のとおりに、細胞内への内在化が認められた。

(4) 培養細胞における POTK の分解

細胞内での POTK の酸素依存的分解について検討するため、低酸素条件下で [¹²⁵I]POTK を取り込ませた後、通常酸素条件下または低酸素条件下で培養し、経時的に細胞外に排出された放射能について検討した。その結果、通常酸素条件下で培養することで、細胞外に排出された放射能は経時的に増大し、24 時間後には低酸素条件下で培養した場合と比較して約 3 倍高い値となり、またその放射能は 93% 以上が低分子化合物であった。このことから、再酸素化によって細胞内で POTK が酸素依存的に分解され、細胞外に排出されたことが示唆された。

(5) 培養細胞への¹²⁵I]FIAUの取り込み

各酸素条件における POTK による細胞への基質プローブの集積性を評価した。その結果、低酸素条件において通常酸素条件と比較して有意な放射能の集積増加が見られた (Fig. 2)。このことから、所期の通り低酸素条件下で安定化された POTK により、¹²⁵I]FIAU の集積が増加する可能性が示された。一方、POTK を処置していない群においても、10% dose/mg protein 以上の放射能集積が認められた。¹²⁵I]FIAU は³H]ganciclovir に比べ脂溶性が高いことから、それに起因する細胞内への非特異的な取り込み、細胞膜への接着が示唆された。

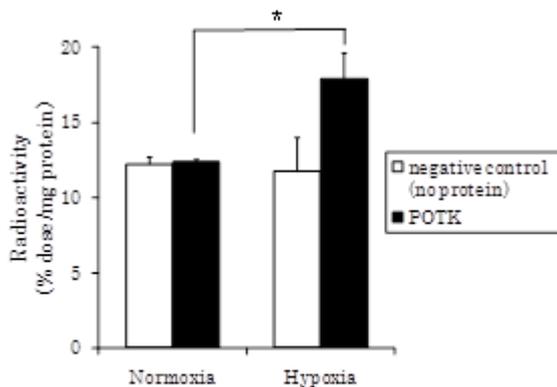


Fig.2 Cellular uptake of ¹²⁵I]FIAU in POTK-pretreated C6 cells under either normoxic or hypoxic conditions. *P<0.05 vs. Normoxia.

(6) POTK の腫瘍集積性

インビボでの POTK の腫瘍集積性を検討し、プレターゲティング法での基質プローブの投与タイミングを決定するため、HeLa 腫瘍マウスに Alexa Fluor 750 標識 POTK を尾静脈投与し、経時的に蛍光撮像を行ったところ、移植反対側の筋肉に比べて腫瘍の蛍光強度は撮像したタイムポイントすべてにおいて高い値を示した。中でも 3、6、12 時間において腫瘍/筋肉比が高く、ほぼ一定の値であったことから、最も腫瘍へのタンパク質の残留量が多い 3 時間を基質プローブの投与ポイントに設定した。

(7) ¹²⁵I]FIAU の体内動態

Vehicle を投与した C6 腫瘍マウス (¹²⁵I]FIAU 単独投与群) 及び POTK を投与したマウス (プレターゲット群) に ¹²⁵I]FIAU を投与しその体内分布を調べた。¹²⁵I]FIAU 単独投与群における投与 6 時間後の腫瘍への放射能集積は 1.59%ID/g となり、肝臓、腎臓などの腹腔臓器と同程度の集積量であった。一方プレターゲット群では、¹²⁵I]FIAU 投与 6 時間後の腫瘍への放射能集積は 5.29%ID/g となり、¹²⁵I]FIAU 単独投与群の 3 倍以上の値

を示し、腫瘍への放射能集積の増加を認めた。また、腫瘍血液比、腫瘍筋肉比も ¹²⁵I]FIAU 単独投与群と比較して高い値を示した。

(8) プラナー画像撮像

POTK を前投与した HeLa 腫瘍マウスに ¹²³I]FIAU を投与し、6 時間後にイメージングを行ったところ、腫瘍が描出され、一方移植対側肢への集積は認められなかった (Fig. 3a)。POS と ¹²³I]IBB を用いた検討では、非標的臓器の肝臓、腸への高い放射能集積が認められたが (Fig. 3b)、POTK と ¹²³I]FIAU を用いることにより、これらの臓器への放射能集積が低減した。一方で、胆のうや甲状腺への集積も認められ、体内で脱ヨウ素化を受けたことが示唆された。更なる S/N 比の向上を目指すには、体内でより安定な基質プローブを選択するなどの改良が必要であると考えられた。

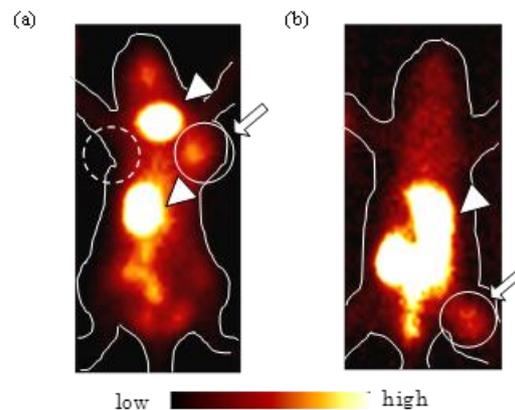


Fig.3 Typical planer images of tumor-implanted mice acquired using POTK and ¹²³I]FIAU (a) and POS and ¹²³I]IBB (b). Images were acquired 6 hr after injection of ¹²³I]FIAU or ¹²³I]IBB. Tumors were clearly visualized in both images (arrow). Arrowheads indicate the gallbladder and thyroid in a and the liver and intestine in b, respectively.

以上、本申請課題で、腫瘍低酸素領域のイメージングを目的とした融合タンパク質として設計・作製した POTK は HSV1TK 酵素活性を保持しており、細胞内への移行性を示した。また、低酸素条件下において通常酸素条件下と比較して有意に高い ¹²⁵I]FIAU の集積を示した。さらに、担癌マウスにおいて腫瘍への集積性を示し、POTK の前投与による ¹²⁵I]FIAU の腫瘍への高い集積が認められ、¹²³I]FIAU を用いて腫瘍のイメージを得ることができた。これらのことから、POTK は腫瘍低酸素領域のイメージングに必要な基本的性質を有していることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① 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 ¹⁸F-labeled biotin derivative.
Mol Imaging Biol. in press (査読有)
- ② Ueda M, Kudo T, Kuge Y, Mukai T, Tanaka S, Konishi H, Miyano A, Ono M, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M, Saji H.
Rapid detection of hypoxia-inducible factor-1-active tumours: pretargeted imaging with a protein degrading in a mechanism similar to hypoxia-inducible factor-1alpha.
Eur J Nucl Med Mol Imaging. 37: 1566-74, 2010. (査読有)

[学会発表] (計5件)

- ① 上田真史、他. HIF-1 存在低酸素腫瘍イメージングのための RI/蛍光デュアル標識タンパク質プローブの開発. 第8回がんとハイポキシア研究会. 2011年1月30日. 札幌.
- ② 上田真史、他. 高精度核医学分子イメージングのための放射性プローブの体内動態の化学制御法の開発: 腫瘍低酸素領域のプレターゲット PET イメージング法. 第60回日本薬学会近畿支部総会・大会. 2010年10月30日. 枚方.
- ③ Ueda M, *et al.*, Pretargeted PET imaging of hypoxia-inducible factor-1-active tumors with an oxygen-dependent degradable streptavidin and a ¹⁸F-labeled biotin derivative. 2010 World Molecular Imaging Congress. September 8, 2010. Kyoto, Japan.
- ④ Ueda M, *et al.*, Tumor pretargeting in mice using an oxygen-dependent degradable streptavidin and a radioiodinated biotin: comparison between autoradiography and hypoxia-inducible factor-1 α -immunohistochemistry. 2010 Society of Nuclear Medicine Annual Meeting. June 6, 2010. Salt Lake City, USA.

- ⑤ 宮野梓、上田真史、他. 腫瘍内 HIF-1 存在領域のイメージング剤の開発: チミジンキナーゼ融合酵素依存的分解プローブに関する検討. 第49回日本核医学学術総会. 2009年10月1日. 旭川.

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/byotai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 真史 (Ueda Masashi)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 40381967