

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791412

 研究課題名（和文）：腫瘍内 HIF-1 存在低酸素領域の特異的描出を目的とした
低分子放射性プローブの開発

 研究課題名（英文）：Development of a radioactive low-molecular weight probe
for the specific imaging of HIF-1-active hypoxic tumors

研究代表者

上田 真史 (UEDA Masashi)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

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を母体としたペプチドプローブ（¹²³I-DKOP30）を開発した。¹²³I-DKOP30は通常酸素条件で培養した細胞より低酸素条件で培養した細胞に高く集積し、体内分布実験では腫瘍イメージングに成功した。腫瘍内のHIF-1発現部位に¹²³I-DKOP30の集積を認めたことから、¹²³I-DKOP30がHIF-1存在低酸素領域のイメージングプローブとして有効であることが示された。

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. To image HIF-1-active tumors, a peptide probe (¹²³I-DKOP30) was designed and synthesized that contains an essential sequence of the oxygen-dependent degradation of HIF-1 α . ¹²³I-DKOP30 showed higher accumulation in hypoxic cells than normoxic cells. Biodistribution analysis showed ¹²³I-DKOP30 accumulation in tumors. The tumors were clearly visualized by *in vivo* imaging, and intratumoral distribution of ¹²³I-DKOP30 coincided with the HIF-1 α -positive hypoxic regions. Thus, ¹²³I-DKOP30 is a useful peptide probe for the imaging of HIF-1-active tumors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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、がん、低酸素、HIF-1

1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍には、活発な細胞増殖に血管形成が追いつかず血管からの酸素供給が不足した領域（低酸素領域）が存在する。近年、この低酸素領域で発現が亢進する転写因子 HIF-1 によって腫瘍の増殖性や転移性、さらに放射線治療や薬物療法など様々な癌治療に対する抵抗性が高まることが明らかとなってきた。そのため、腫瘍の低酸素領域

の中でも HIF-1 の存在する領域を体外から非侵襲的に検出・定量することができれば、腫瘍の性状を直接的に評価することが可能となり、治療方針決定に有用な情報となり得ると考えられる。

しかしながら、既存の HIF-1 存在領域イメージングプローブは融合タンパク質を母体としたものであり、免疫原性・遅い血液クリアランスなど、タンパク質プローブに共通する問題点を有する可能性があることから、臨

床応用は困難である。臨床適合性の高いプローブはいまだ開発されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、臨床応用性の高い腫瘍内 HIF-1 存在領域イメージングプローブを開発することである。これを達成するため、HIF-1 α の酸素依存的分解に必須かつ最短のアミノ酸配列を選別し、それを母体とするペプチドプローブを開発する。これにより、プローブを純化学的に合成することが可能になるとともに、タンパク質プローブに固有の問題点も克服でき、臨床への展開を視野に入れたプローブ開発が推進できる。

3. 研究の方法

(1) ペプチド合成

HIF-1 α 中 547-574 残基のアミノ酸配列の C 末にグリシルシステイン (GC) を付加した OP30、OP30 の N 末 9 残基のアミノ酸を L-リジンおよび D-リジンで置換した KOP30 および DKOP30、DKOP30 に含まれる 2 つのプロリン残基をアラニンで置換した mDKOP の 4 種類のプローブを設計した。

それぞれのペプチドは自動合成機を用いて Fmoc 固相合成法により合成した。スカベンジャーを加えたトリフルオロ酢酸を加えて 2 時間攪拌し、脱樹脂と脱保護を同時に行った後、逆相 HPLC を用いて精製した。化合物の分子量は MALDI-MS にて測定した。

OP30: calculated for $C_{150}H_{228}N_{35}O_{51}S_3$
(M+H⁺); m/z, 3432.55; found, 3432.75.

KOP30: calculated for $C_{160}H_{270}N_{41}O_{44}S_3$
(M+H⁺); m/z, 3566.93; found, 3567.56.

DKOP30: calculated for $C_{160}H_{270}N_{41}O_{44}S_3$
(M+H⁺); m/z, 3566.93; found, 3567.37.

mDKOP: calculated for $C_{156}H_{266}N_{41}O_{44}S_3$
(M+H⁺); m/z, 3514.90; found, 3514.38.

(2) 標識合成

放射性ヨウ素標識試薬として、1-(3-[^{123/125}I]iodophenyl)maleimide (^{123/125}I-IPM) を既報に従って合成した。4 種類のペプチドそれぞれを pH 7.0 のリン酸緩衝液に溶かし、^{123/125}I-IPM のアセトニトリル溶液と混和して 15 分間攪拌し、逆相 HPLC を用いて精製した。

(3) ペプチドプローブの分解検討

HIF-1 分解を評価する Fraction II HeLa Degradation Kit を用いてペプチドプローブの分解をインビトロで評価した。キットに含まれる細胞溶解液にプローブを処置して 1 時間 37°C でインキュベートし、トリクロロ酢

酸を添加して反応を停止後、上清を逆相 HPLC で分析した。

(4) 腫瘍細胞への放射能取り込み実験

HeLa 細胞を低酸素条件下 (0.1%O₂ 以下) で 18 時間培養し、¹²⁵I-OP30、¹²⁵I-KOP30、¹²⁵I-DKOP30 を加えてさらに 1 時間培養し、各プローブの細胞移行性を評価した。

次に、HeLa 細胞を通常酸素条件下 (20%O₂) および低酸素条件下で 18 時間培養し、¹²⁵I-KOP30、¹²⁵I-DKOP30 を加えて同様の酸素分圧条件下で 15、30、60、120 分間培養して取り込みの経時変化を調べた。

(5) 担がんマウス体内分布動態実験

すべての動物実験は事前に京都大学の動物実験委員会の承認を受けた上で、京都大学の動物実験指針を遵守して行った。イソフルラン麻酔下、C3H/He 雌性マウスの右下肢に FM3A 細胞を 5×10⁶ 個移植した (FM3A 腫瘍マウス)。FM3A 腫瘍マウスに ¹²⁵I-KOP30、¹²⁵I-DKOP30 (18 kBq) を尾静脈より投与して、15 分、1 時間、2 時間後に各臓器の重量および集積した放射能を測定した。

(6) in vivo イメージング

FM3A 腫瘍マウスに ¹²³I-DKOP30 (37 MBq) を投与し、投与 2 時間後に、2.5%イソフルラン麻酔下、低エネルギー高分解コリメータ (ウインドウ幅 30%、エネルギーピーク 160 keV、フォーマット 128×128) を装着したガンカメラにて平面画像を 10 分間収集することによりシンチグラムを得た。

(7) ex vivo オートラジオグラフィ・免疫組織学的検討

FM3A 腫瘍マウスに低酸素マーカーであるピモニダゾール (1.3 mg) を腹腔内へ投与し、2 時間後に ¹²⁵I-DKOP30 (18 MBq) を尾静脈投与し、さらに 2 時間後に断頭して屠殺した。腫瘍を摘出後に凍結し、切片を作製してイメージングプレートに 4 日間露光させ、オートラジオグラムを得た。隣接切片について、HIF-1 α に対しては抗 HIF-1 α 一次抗体と Alexa Fluor568 標識二次抗体を用いて、ピモニダゾールに対しては FITC 標識抗ピモニダゾール抗体を用いて免疫組織染色を行った。

(8) 腫瘍集積と HIF-1 転写活性の比較実験

イソフルラン麻酔下、HIF-1 依存的にルシフェラーゼを発現する Suit2/HRE-Luciferase 細胞を BALB/c nu/nu 雌性マウスの両下肢に 2×10⁶ 個移植した (HRE-Luc 腫瘍マウス)。HRE-Luc 腫瘍マウスに ¹²⁵I-DKOP30 あるいは ¹²⁵I-mDKOP (25 kBq) を尾静脈より投与し、1 時間 40 分後にルシフェリン (2 mg) を腹腔内へ投与した。さらに 20 分後にマウ

スをイソフルラン麻酔下で生体発光イメージングシステムを用いてルシフェラーゼ発光を撮像した。撮像後、腫瘍を摘出し、放射能を測定した。

4. 研究成果

(1) 標識合成

^{125}I 標識ペプチドプローブは放射化学的収率約 70%、 ^{123}I 標識ペプチドプローブは放射化学的収率 24% で得た。いずれのプローブも放射化学的純度は 97% 以上であった。

(2) ペプチドプローブの分解検討

HIF-1 α の酸素依存的分解に必須のプロリン残基を含む ^{125}I -OP30、 ^{125}I -KOP30、 ^{125}I -DKOP30 では、1 時間インキュベート後に未変化体のピークはほとんど消失した。未変化体の残存率は ^{125}I -OP30 : 5% \pm 1%、 ^{125}I -KOP30 : 12% \pm 1%、 ^{125}I -DKOP30 : 27% \pm 12% であった。プロテアソーム阻害剤である MG-132 を添加することで、 ^{125}I -DKOP30 の分解は有意に抑制された (75% \pm 6%、 $P < 0.05$)。一方、プロリン残基を置換した ^{125}I -mDKOP は分解を受けず、未変化体の存在率は 77% \pm 13% であった。

(3) 腫瘍細胞への放射能取り込み実験

分解が確認できた 3 種類のペプチドプローブを低酸素条件下で細胞に処置したところ、 ^{125}I -OP30 は取り込みが認められなかったが、 ^{125}I -KOP30、 ^{125}I -DKOP30 処置群では細胞への放射能集積が認められた (図 1A)。この結果はリジン残基の細胞膜透過能によるものだと考えられる。さらに、 ^{125}I -KOP30、 ^{125}I -DKOP30 処置群の細胞内放射能は、評価したすべてのタイムポイントで通常酸素条件下に比べ低

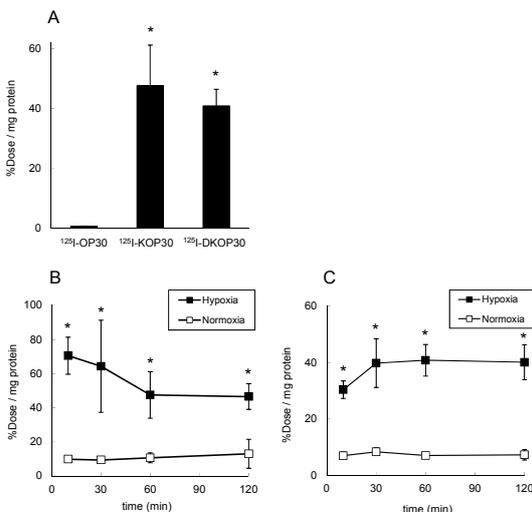


図 1 ^{125}I -OP30、 ^{125}I -KOP30、 ^{125}I -DKOP30 の細胞内取り込み (* $P < 0.05$)

酸素条件下で有意に高い値を示し、 ^{125}I -KOP30、 ^{125}I -DKOP30 が低酸素条件下で安定化されることが示された (^{125}I -KOP30 : 図 1B、 ^{125}I -DKOP30 : 図 1C)。

(4) 担がんマウス体内分布動態実験

^{125}I -KOP30、 ^{125}I -DKOP30 について体内分布を検討した結果、どちらのプローブも腫瘍集積性が認められた。しかしながら、 ^{125}I -KOP30 では血中放射能が高く、画像コントラストの低下が予想された (表 1)。一方、 ^{125}I -DKOP30 は ^{125}I -KOP30 に比べて高い腫瘍筋肉比、腫瘍血液比を示し、腫瘍血液比は投与 2 時間後に 1 を上回った (表 2)。既存の融合タンパク質プローブの場合、腫瘍血液比が 1 を上回るのは投与 24 時間後であったことから (J Nucl Med. 50: 942-9, 2009)、ペプチドプローブ化による動態の改善が達成された。

表 1 ^{125}I -KOP30 の体内分布

臓器	投与後の時間 (分)		
	15	60	120
血液	9.40 \pm 1.18	1.89 \pm 0.17	1.04 \pm 0.14
腫瘍	3.51 \pm 0.74	1.41 \pm 0.11	0.73 \pm 0.16
筋肉	3.08 \pm 0.39	0.70 \pm 0.20	0.37 \pm 0.12
腫瘍血液比	0.37 \pm 0.05	0.75 \pm 0.12	0.71 \pm 0.14
腫瘍筋肉比	1.13 \pm 0.11	2.17 \pm 0.79	2.08 \pm 0.59

表 2 ^{125}I -DKOP30 の体内分布

臓器	投与後の時間 (分)		
	15	60	120
血液	8.88 \pm 1.02	3.15 \pm 0.19	1.53 \pm 0.30
腫瘍	3.96 \pm 0.75	2.48 \pm 0.18	1.68 \pm 0.42
筋肉	2.47 \pm 0.45	0.97 \pm 0.23	0.43 \pm 0.12
腫瘍血液比	0.44 \pm 0.04	0.79 \pm 0.03	1.11 \pm 0.19
腫瘍筋肉比	1.61 \pm 0.25	2.70 \pm 0.75	4.12 \pm 1.21

(5) in vivo イメージング

投与 2 時間後にプランナー画像を撮像したところ、腫瘍非移植側の筋肉に比べて腫瘍移植側に高い放射能集積を認め、 ^{123}I -DKOP30 は腫瘍を明瞭に描出した (図 2)。

(6) ex vivo オートラジオグラフィー・免疫組織学的検討

投与 2 時間後における ^{125}I -DKOP30 の腫瘍内放射能局在は不均一であり、HIF-1 α の染色部位や低酸素領域マーカーであるピモニダゾール (PIMO) の集積部位と一致したことから、 ^{125}I -DKOP30 が HIF-1 の存在する低酸素領

域を反映した集積を示すことを認めた(図3)。

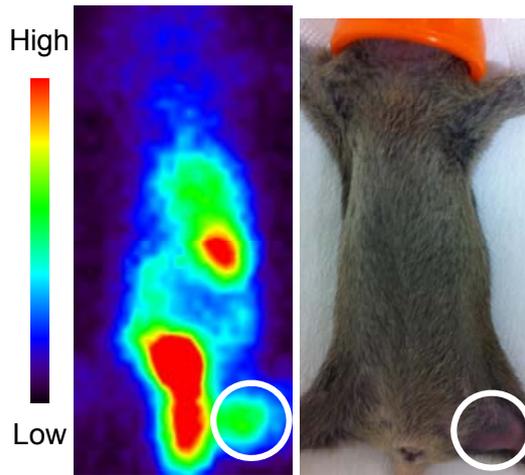


図2 ^{123}I -DKOPのプランナー画像(白円内が腫瘍)

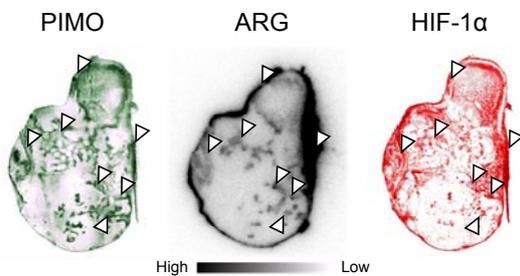


図3 ^{125}I -DKOP30の腫瘍内局在(ARG)とHIF-1 α およびPIMOの免疫染色との比較
(白矢印が3つのシグナルの共局在部位)

(7) 腫瘍集積とHIF-1転写活性の比較実験
投与2時間後における ^{125}I -DKOP30の腫瘍集積はルシフェラーゼ発光、すなわちHIF-1転写活性と有意な正の相関を示した(図4A、相関係数 $R=0.72$ 、 $P<0.01$)。一方、 ^{125}I -mDKOPでは相関は認められなかった(図4B、相関係数 $R=0.35$ 、 $P=0.26$)。

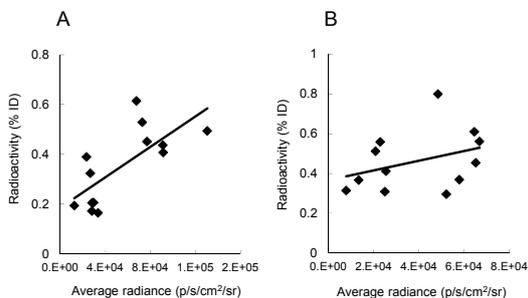


図4 ^{125}I -DKOP30 (A) および ^{125}I -mDKOP (B) の腫瘍集積とHIF-1転写活性の相関

本研究では、HIF-1 α の酸素依存的分解に関与する最短の配列を基にしたペプチドプローブ $^{123/125}\text{I}$ -DKOP30を設計・合成した。本プローブは、HIF-1 α 同様プロテアソーム依存的に分解を受け、低酸素細胞に高く集積した。体内分布実験でも腫瘍集積性を示し、腫瘍の明瞭な描出に成功した。腫瘍集積とHIF-1との関連を調べたところ、腫瘍内局在はHIF-1 α 存在領域と一致し、HIF-1転写活性とも相関を認めた。HIF-1 α の分解に関与するプロリン残基を含まないネガティブコントロールプローブ(^{125}I -mDKOP)では、HIF-1転写活性との相関を認めなかった。以上の結果は、 ^{123}I -DKOP30のHIF-1存在低酸素領域のイメージングプローブとしての有効性を示すものである。

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1件)

- ① Ueda M, Ogawa K, Miyano A, Ono M, Kizaka-Kondoh S, Saji H. Development of an oxygen-sensitive degradable peptide probe for the imaging of hypoxia-inducible factor-1-active regions in tumors. *Mol Imaging Biol.*, in press. (査読有)

[学会発表](計4件)

- ① 上田真史、他. HIF-1 α のODDドメインを母体とする核医学イメージング用ペプチドプローブの開発. 第10回がんとハイポキシア研究会. 2012年12月7日、横浜開港記念館(神奈川県).
- ② 上田真史、他. 腫瘍内HIF-1存在領域の核医学イメージングを目的とした酸素依存的分解ペプチドプローブの開発. 第52回日本核医学会. 2012年10月12日、ロイトン札幌(北海道).
- ③ 小川京、上田真史、他. 低酸素腫瘍イメージングを目的とした低酸素特異的安定型ペプチドプローブの開発に関する基礎的検討. 第51回日本核医学会. 2011年10月28日、つくば国際会議場(茨城県).
- ④ 小川京、上田真史、他. HIF-1酸素依存的分解配列を利用した低酸素腫瘍イメージングペプチドプローブの開発. 第9回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム. 2011年9月12日、ホテル箱根アカデミー(神奈川県).

〔図書〕（計1件）

- ① Ueda M, Saji H. Nova Science Publishers, Inc. Visualization and Treatment of the HIF-1-Active Microenvironments in Tumors: Drug Design and Application of Oxygen-dependent Degradable Probes for Molecular Imaging of HIF-1-active Microenvironments. In: Hypoxia: Causes, Types and Management, Dirk Vordermark (Ed.). 2013 : 223-236.

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：放射性ヨウ素により標識された
標識化合物
発明者：佐治英郎、小野正博、上田真史、
関育也
権利者：国立大学法人京都大学、
日本メジフィジックス株式会社
種類：特許
番号：特願 2012-181652
出願年月日：平成 24 年 8 月 20 日
国内外の別：国内

〔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)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准
教授
研究者番号：40381967