

腫瘍の悪性化に関与する HIF-1 発現低酸素領域の

RI/蛍光デュアル分子イメージング法の開発

京都大学医学部附属病院 放射線部

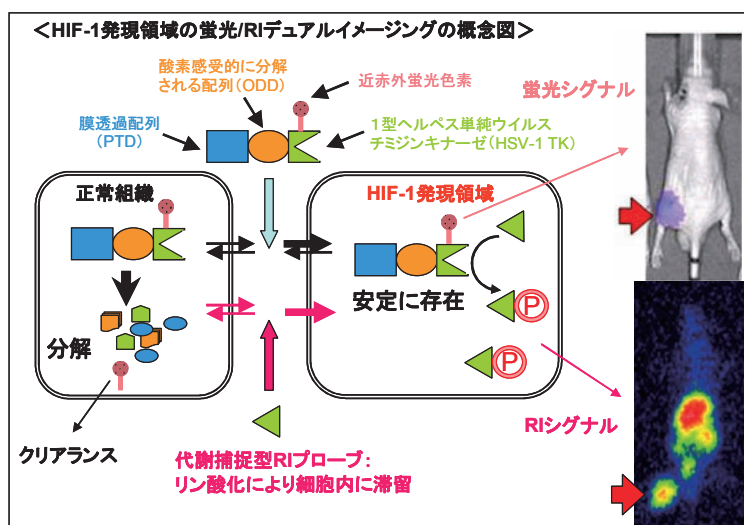
上田 真史

1. はじめに

固形腫瘍内部で形成される低酸素領域は、放射線治療や化学療法に対して抵抗性を示すことが知られている。その領域では、転写因子の一種である低酸素誘導因子（Hypoxia-inducible factor-1: HIF-1）が発現し、糖代謝、血管新生、細胞の浸潤・転移に関与する種々のタンパク質の発現を亢進させることで、腫瘍の悪性化や治療抵抗性につながっている。このため、HIF-1 発現領域が特異的かつ非侵襲的にイメージングできれば、腫瘍の質的診断・性状把握・治療効果予測の面で非常に有用であると考えられる。

HIF-1 には α と β の 2 つのサブユニットが存在するが、 β サブユニットが常時発現しているのに対し、 α サブユニット（HIF-1 α ）は通常酸素環境下で分解され、低酸素環境下でのみ安定に存在して HIF-1 活性を調節している。そこで我々は、HIF-1 α のユニークな性質に着目し、HIF-1 α の酸素依存的分解に関与するアミノ酸配列を母体とする融合タンパク質プローブを開発し、それを用いることで腫瘍内 HIF-1 発現領域のイメージングが可能であることを報告している [1-3]。本研究ではこれまでの成果を基盤として、近年関心が高まっている複数のイメージング手法を組み合わせるマルチモダリティ分子イメージングに着目し、単一のプローブで蛍光と RI の 2 種類のシグナルを放出することで基礎と臨床の橋渡しとなり得るプローブ開発を計画した。

蛍光イメージング用のプローブは、HIF-1 α の酸素依存的分解に関与するアミノ酸配列（Oxygen-dependent degradation domain: ODD）を母体を選択し、膜透過配列（Protein transduction domain: PTD）とヘルペス単純ウイルスチミジンキナーゼ（HSV-1TK）を導入した融合タンパク質プローブを構築し、それを近赤外蛍光色素で標識することにより得た。また RI イメージング用には、代謝捕捉の概念に基づき、HSV-1TK によってリン酸化されることで水溶性が増加して細胞内に蓄積する基質プローブを利用した。両者を用いるデュアルイメージング法の概念は右図に示す通りである。すなわち、蛍光標識融合タンパク質プローブは PTD の作用により、正常組織および HIF-1 発現組織の両方に取り込まれる。正常組織では酸素によってプローブが分解され、蛍光色素はクリアランスされるが、HIF-1 発現組織では分解を受けず、細胞内にタンパク質が蓄積する。そこで、HSV-1TK により代謝捕捉される RI



プローブを投与することで、融合タンパク質からは蛍光シグナルが、代謝捕捉された RI プローブからは RI シグナルが得られ、HIF-1 存在低酸素領域の RI/蛍光デュアルイメージングが達成される。

本研究では、酸素依存的分解近赤外蛍光標識融合タンパク質および HSV-1TK 基質 RI プローブを設計・合成し、それを用いて HIF-1 存在低酸素領域の RI/蛍光デュアルイメージングが可能かどうかを検討した。

2. 方法

プローブの構築

PTD-ODD をコードする DNA 断片 [1] と全長の HSV-1TK をコードする DNA 断片を pGEX-6P-3 (Amersham Bioscience 社) タンパク質発現ベクターにクローニングし、pGEX-PTD-ODD-HSV-1TK 発現ベクターを構築した。発現ベクターを BL21(DE3)pLysS (Novagen 社) に導入し、TB 培地で培養した後、1 mM IPTG を加えて GST 結合 PTD-ODD-HSV-1TK 融合タンパク質 (POTK) の合成を誘導した。その後、Prepacked Gultathione Sepharose 4B (GE Healthcare 社) でアフィニティ精製を行い、PreScission Protease (GE Healthcare 社) で GST を切断して回収した。

[^{123/125}I]FIAU は対応するトリブチルスズ標識前駆体 (ナード研究所) を用いて、スズ-放射性ヨウ素交換反応により合成した。逆相 HPLC を用いて精製を行うことで最終化合物を得、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。

チミジンキナーゼ活性測定

Alexa Fluor 750 C5-maleimide を POTK 溶液 (1 mg/mL) 500 μ L に加え、遮光下室温で 2 時間反応させた後、PD-10 カラムを用いて精製した。この時、Alexa-750 の添加量を変化させることで、POTK 1 分子あたりの蛍光色素導入量が 1 分子、あるいは 2 分子の標識タンパク質を得た。

HSV-1TK、POTK、Alexa 標識 POTK それぞれの溶液 (100 ng/ μ L) 25 μ L に [³H]ganciclovir を含む Reaction Mixture (250 mM Phosphate Buffer, 25 mM ATP, 25 mM Magnesium Acetate) 15 μ L を加え、30°C で 4 時間インキュベートした。反応溶液 10 μ L を氷冷した蒸留水 40 μ L に添加し、100°C で 3 分加熱して反応を止め、4°C、8000 rpm で 2 分遠心した。上清 40 μ L を DE81 diethylaminoethyl cellulose filter (Whatman 社) に添加し、4 mM ammonium formate 溶液 30 mL および蒸留水 10 mL により 37°C、120 min⁻¹ で 10 分間×2 回振盪洗浄した後、フィルター放射能を測定した。

細胞外への放射能排出実験

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 μ g) 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と低酸素条件下でそれぞれ培養し、1、3、6、24 時間後に培地中に排出された放射能の測定および PD-10 カラムを用いて分子サイズの測定を行った。

細胞取り込み実験

12 ウェルプレートに C6 細胞を 1.0 x 10⁵ cells/mL/well で播種し、通常酸素及び低酸素条件下で 6 時間プレインキュベートした。POTK を 0.5 μ g 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、PBS(-) で 2 回洗浄後、[¹²⁵I]FIAU 含有 DMEM 1 mL を加

え、各条件で6時間培養した。培地を除去し、PBS(-)で4回洗浄後、放射能を測定して $[^{125}\text{I}]\text{FIAU}$ の細胞への取り込み量を測定し、BCA法でタンパク定量を行い補正した。

インビボ蛍光イメージング

雌性 Balb/c nu/nu マウス (5 週齢) に対し、HeLa 細胞を一匹あたり 5×10^6 cells/100 μL 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 $265 \pm 157 \text{ mm}^3$ であった。

蛍光標識 POTK (50 μg) を尾静脈より投与し、1、3、6、12、24 時間後に 2.5% イソフルランで麻酔し、IVIS Spectrum System (XENOGEN 社) を用いて蛍光撮像を行った (励起波長: 710 nm、蛍光波長: 780 nm)。画像より Living Image 3.0 software package (XENOGEN 社) を用いて腫瘍および移植対側肢の蛍光量を定量した。

$[^{125}\text{I}]\text{FIAU}$ 体内分布実験

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 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 $532.5 \pm 148 \text{ mm}^3$ であった。

プレターゲット群においては POTK を 50 μg 、 $[^{125}\text{I}]\text{FIAU}$ 単独投与群においては 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) を C6 腫瘍マウス尾静脈より投与し、3 時間後に $[^{125}\text{I}]\text{FIAU}$ (1.85 MBq) を投与した。6 時間後に屠殺し採血後、臓器を摘出しそれぞれの重量と放射能を測定した。

RI/蛍光デュアルイメージング実験

HeLa 腫瘍マウスに POTK 50 μg を尾静脈より投与し、3 時間後に $[^{123}\text{I}]\text{FIAU}$ (33.7 MBq) を投与した。6 時間後に 2.5% イソフルランで麻酔下、低エネルギー高分解コリメータを装着したガンマカメラ (SPECT-2000H スキャナ、日立メディコ社) 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。次いで、上述の方法で同一個体の蛍光画像も取得した。

3. 結果

プローブの構築・合成

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 (Fig.1, IPTG(+)) では、IPTG による誘導を行っていない大腸菌の溶解液 (Fig.1, IPTG(-)) 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 (Fig.1, 精製後)、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。

また、 $[^{123}\text{I}]\text{FIAU}$ を放射化学的収率 37%、放射化学的純度 94% 以上、 $[^{123}\text{I}]\text{FIAU}$ を放射化学的収率 94%、放射化学的純度 99% 以上で得た。

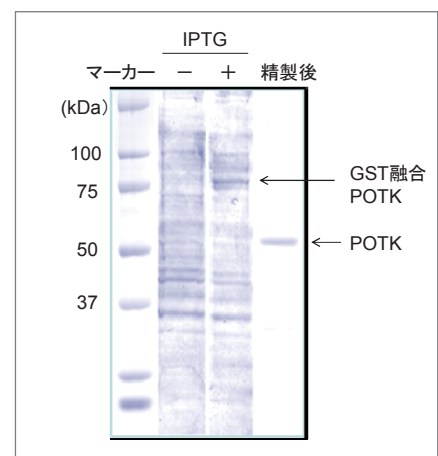


Fig. 1 融合タンパク質の SDS-PAGE

チミジンキナーゼ活性

各融合タンパク質のチミジンキナーゼ活性を評価したところ、POTKはPTDおよびODDと融合させていないHSV-1TKと同程度の酵素活性を示し (HSV-1TK: $24.7 \pm 4.2\%$ 、POTK: $24.8 \pm 3.9\%$)、その活性は1分子のAlexa750を導入しても保持された ($23.2 \pm 5.2\%$)。一方、Alexa750を2分子導入することで、その活性は1/5に低下した ($5.6 \pm 0.3\%$) (Fig. 2)。

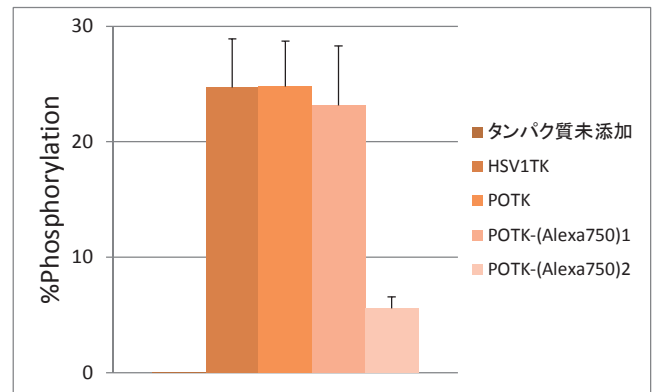


Fig. 2 融合タンパク質プローブのチミジンキナーゼ活性

培養細胞でのPOTKの分解

低酸素条件下で $[^{125}\text{I}]\text{POTK}$ を取り込ませた後、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倍高い値となった (Fig. 3)。またその放射能の化学型をサイズ排除クロマトグラフィーにより分析したところ、93%以上が低分子化合物であった。

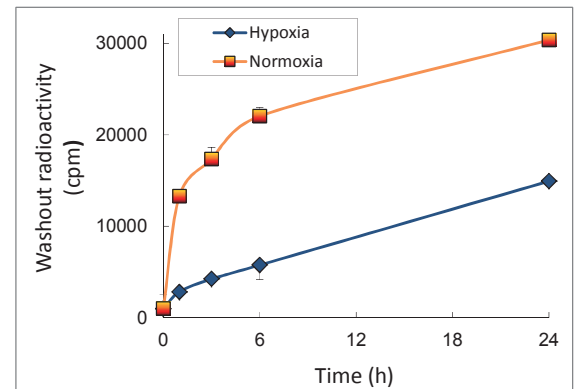


Fig. 3 培養液中に排出された放射能の経時変化

細胞取り込み実験

POTKを処置した後、各酸素条件で培養した細胞で $[^{125}\text{I}]\text{FIAU}$ に取り込みを比較したところ、通常酸素条件下と比較して低酸素条件下において、細胞内放射能の有意な増加を認めた (Normoxia: $12.4 \pm 0.1\%$ dose/mg、Hypoxia: $17.9 \pm 1.7\%$ dose/mg) (Fig. 4)。また、Alexa750を1分子導入したPOTKを処置した場合でも、 $[^{125}\text{I}]\text{FIAU}$ の取り込みは低酸素条件下で有意に高い値であった ($17.9 \pm 3.1\%$ dose/mg)。

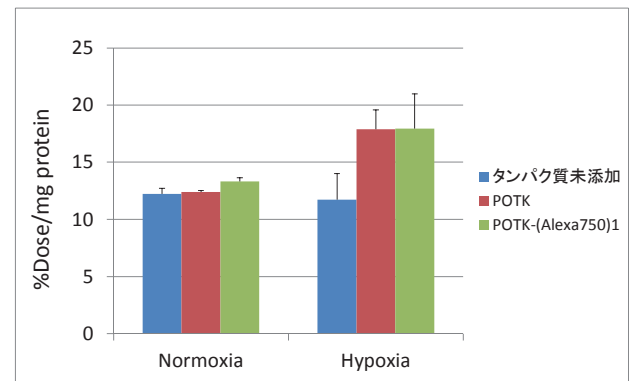


Fig. 4 各酸素条件下における $[^{125}\text{I}]\text{FIAU}$ の細胞内取り込み

インビボ蛍光イメージング

Alexa750を1分子導入した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 (Fig. 5)。腫瘍と筋肉の蛍光シグナル比は投与1時間後では1.5であったが、3時間後以降では2に上昇し、12時間後までプラトーであった。

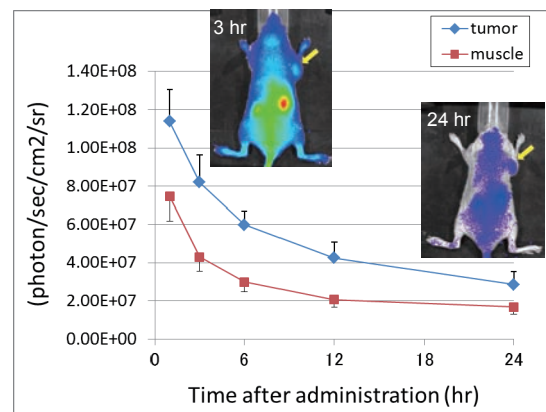


Fig. 5 腫瘍・筋肉の蛍光シグナルの経時変化

[¹²⁵I]FIAU の体内分布

POTK の前投与の有無による [¹²⁵I]FIAU の体内分布変化について調べた結果を Fig. 6 に示す。 [¹²⁵I]FIAU 単独投与群では、投与 6 時間後の腫瘍への放射能集積は $1.59 \pm 0.46\%$ dose/g であり、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、POTK を前投与した群では、 [¹²⁵I]FIAU 投与 6 時間後の腫瘍への放射能集積は $5.29 \pm 0.73\%$ dose/g であり、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、画像コントラストの指標となる腫瘍血液比は、単独投与群： 0.66 ± 0.11 、POTK 投与群： 0.84 ± 0.17 、腫瘍筋肉比は単独投与群： 2.66 ± 1.16 、POTK 投与群： 4.28 ± 0.32 であり、POTK 投与により増加した。

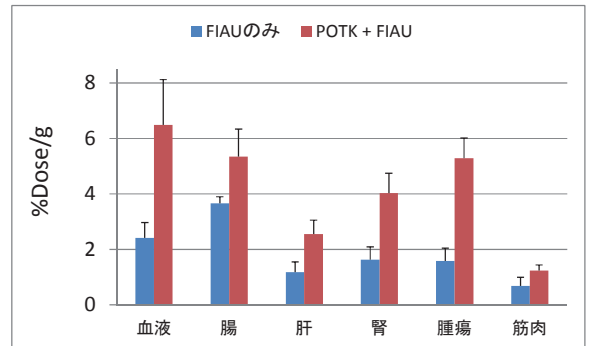


Fig. 6 [¹²⁵I]FIAU の体内分布

同一個体での RI/蛍光デュアルイメージング

Alexa750 を 1 分子導入した POTK を前投与した担がんマウスに [¹²³I]FIAU を投与し、6 時間後に平面画像を収集したところ、腫瘍が描出され (Fig. 7, 矢印で示された実線円)、一方移植対側肢への集積は認められなかった (Fig. 7, 点線円)。また甲状腺や胃と思われる臓器に高い放射能集積を認めた (Fig. 7, 矢じり)。続いて蛍光イメージングを行ったところ、RI 画像の場合と同様、実線円で示された腫瘍からは蛍光シグナルが検出されたが、点線円で示された移植対側肢からは検出されなかった。

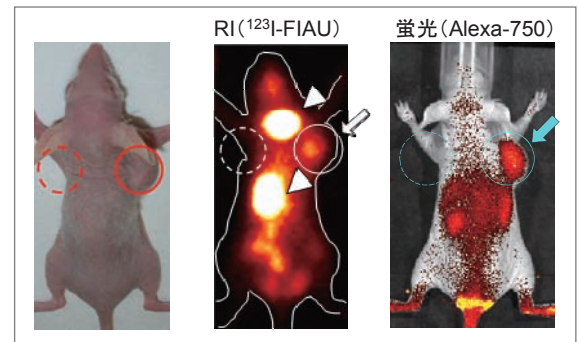


Fig. 7 同一個体での RI/蛍光画像

4. 考察

現在、インビボイメージング法としては、蛍光・発光、放射線、核磁気共鳴、超音波など種々の原理を利用した手法が開発されている。それぞれ、簡便性、定量性、空間・時間分解能、形態・機能情報などの点で特徴が異なっており、すべてにおいて他を凌駕するような完全なモダリティは存在しない。そのため、あるモダリティで不得手な部分を他のモダリティで補うマルチモダリティイメージングに注目が集まっている。そこで本研究では、HIF-1 存在低酸素領域の RI/蛍光デュアルイメージング用プローブの開発を行った。これが達成されれば、蛍光イメージングのメリットである簡便性と RI イメージングのメリットである高感度かつ定量的な情報取得を組み合わせる新たな診断法の構築や基礎・臨床研究で得られた知見の直接比較などが可能となると考えられる。蛍光イメージングのデメリットとして、体深部からのシグナルが検出できないことが挙げられるが、乳がんのように体表に近い部分にできる腫瘍に対しては、マンモグラフィ検査の際に蛍光イメージングでスクリーニングを行い、高リスク者を対象に RI イメージングで精査するといった利用法が考えられる。

今回構築した POTK は由来タンパク質である HSV-1TK と同等のチミジンキナーゼ活性を有し

ており、Alexa750 で標識した後もその活性は保持された。また、POTK を ^{125}I 標識して細胞に処置し、細胞外に排出される放射能を分析したところ、通常酸素条件下で培養した方が排出される放射能が多く、その大部分は低分子化合物であったことから、POTK の酸素依存的な分解が示唆された。さらに、Alexa750 標識 POTK を細胞に処置して通常酸素・低酸素条件下で培養し、その後 ^{125}I FIAU を添加したところ、通常酸素条件下に比べて低酸素条件下で放射能集積が増加したことから、POTK と ^{125}I FIAU を用いるデュアルイメージングがコンセプト通りに機能する可能性をインビトロで実証できたと考えられる。しかしながら、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、 ^{125}I FIAU の脂溶性の高さに起因する細胞内への非特異的な取り込み、細胞膜への接着が存在することが示唆された。

次にインビボの検討を行ったところ、POTK は腫瘍集積性を有することを認めた。また POTK を投与して 3 時間後に ^{125}I FIAU を投与することで、非投与群に比べて腫瘍への放射能集積、腫瘍血液比、腫瘍筋肉比が向上し、インビボで POTK によって ^{125}I FIAU が代謝捕捉された可能性が示された。さらに Alexa750 標識 POTK を投与して 3 時間後に ^{123}I FIAU を投与し、6 時間後に RI/蛍光イメージング撮像を行ったところ、腫瘍からは両者のシグナルが検出された一方、反対側の筋肉からは検出されず、ガンマカメラでも光イメージング装置でも同様の画像を取得することに成功した。これらの成果は、蛍光標識 POTK とそれに代謝捕捉される RI プローブを用いるマルチモダリティイメージングの可能性を示すものであり、今後、両者のシグナルが HIF-1 の存在量や転写活性を反映するかどうか、更なる検討を進める予定である。また、核医学画像上は甲状腺や胃への放射能集積も認められ、体内で ^{123}I FIAU が脱ヨウ素化を受けたことが示唆された。 ^{123}I FIAU の甲状腺への集積は Choi らも報告しており [4]、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。

5. 謝辞

本研究を行うにあたり、多大なるご支援をいただきました財団法人医用原子力技術研究振興財団に対し、心より御礼申し上げます。

6. 発表

上田真史、宮野梓、工藤喬、小川京、小野正博、近藤科江、佐治英郎

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

7. 引用文献

1. Kudo T, Ueda M, Kuge Y, Mukai T, Tanaka S, Masutani M, Kiyono Y, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M, Saji H.
Imaging of HIF-1-active tumor hypoxia using a protein effectively delivered to and specifically stabilized in HIF-1-active tumor cells. *J Nucl Med.* 2009; **50**(6): 942-9.
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*. 2010; **37**(8): 1566-74.
3. 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.
 4. Choi SR, Zhuang ZP, Chacko AM, Acton PD, Tjuvajev-Gelovani J, Doubrovin M, Chu DC, Kung HF. SPECT imaging of herpes simplex virus type1 thymidine kinase gene expression by [¹²³I]FIAU. *Acad Radiol*. 2005; **12**(7): 798-805.