

23-B-23 治療抵抗性がんの克服に向けた腫瘍内低酸素環境および  
がん悪性度診断の新規分子イメージング法の開発

独立行政法人国立がん研究センター東病院 臨床開発センター 機能診断開発部 梅田 泉

## 研究の分類・属性

内科系

## 研究の概要

固形腫瘍の病巣内には低酸素領域が常在し、放射線治療や化学療法に対する抵抗性の原因となっている。従って腫瘍内低酸素領域の可視化はがん治療の最適化に必須で、がん画像診断の重要な課題である。これまで低酸素イメージングプローブとして FMISO、FAZA、Cu-ATSM などが開発されてきたが、これらが描画するのは重篤な低酸素領域であり、治療抵抗性はそれより“軽度”な低酸素領域で既に起きている。一方この軽度低酸素環境では低酸素応答転写因子 HIF1 が活性化し、固形腫瘍における血管新生、糖代謝、転移、浸潤等に関与する 100 余の遺伝子発現を誘導する。常酸素環境では HIF1 は速やかに代謝されて存在しないため、HIF1 陽性領域は“軽度”低酸素領域であり、かつその誘導能からがん悪性度の高い領域とも考えられる。

本研究は、核医学を中心に分子イメージング技術を駆使し、この HIF1 活性を指標として、“軽度”低酸素環境を可視化できる新しい画像診断法を開発し、革新的ながん悪性度診断法を確立することを目的とする。

最近 HIF1 が p53 や NF- $\kappa$ B を介して化学療法感受性を制御するといった報告も多く見られるようになり、HIF1 活性を指標としたがん悪性度診断は、放射線治療のみならず、化学療法の治療効果予測にも貢献できる。本研究では日常がん治療にあたる臨床医も参画し、常に臨床応用を念頭に置きながら、治療成績向上に大きな貢献が期待できる新しい画像診断法の開発に臨む。

## 研究経費

5,000 千円

## 研究班の組織

梅田 泉 (主任研究者)	室長	<ul style="list-style-type: none"><li>分子イメージングプローブ分子設計、合成・品質評価</li><li>細胞・実験動物を用いた評価</li><li>体内動態等の検討、至適化</li><li>生理・薬理学的動態解析</li><li>研究全体の統括</li></ul>
藤井博史 (研究分担者)	部長	<ul style="list-style-type: none"><li>MRI/核医学融合画像への展開</li><li>臨床画像診断へのトランスレーション</li><li>放射線治療の効果判定、新規治療計画、評価</li><li>研究全体のスーパーバイズ</li></ul>
吉野孝之 (研究分担者)	外来・病棟医長	<ul style="list-style-type: none"><li>化学療法の効果判定、効果予測、治療計画、</li><li>臨床の観点からの研究展開</li><li>新薬臨床開発の見地からのスーパーバイズ</li></ul>
近藤科江 (研究分担者)	教授	<ul style="list-style-type: none"><li>HIF1 <math>\alpha</math> ミミック関連融合たんぱく質の供給</li><li>HIF活性との相関の検討 (HER-Luc遺伝子導入細胞調製、HIF活性発現測定、KO、KI動物作成等)</li></ul>

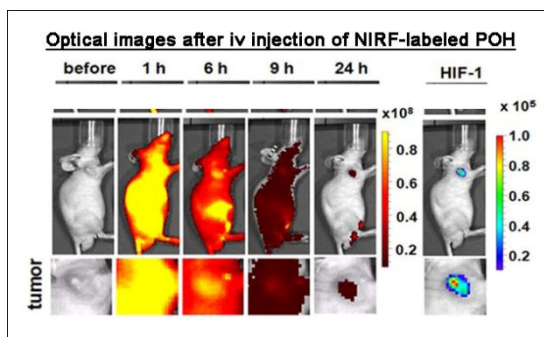
## 研究の目的と到達目標及び実績要点

### 全期間

#### (研究の背景と目的) :

固形腫瘍の病巣内には低酸素領域が常在し、放射線治療や化学療法に対する抵抗性の原因となる。従って腫瘍内低酸素領域の可視化は、がん治療の最適化に必須で、がん画像診断の重要な課題である。これまで低酸素イメージングプローブとして FMISO、FAZA、Cu-ATSM などが開発されてきたが、これらが描画するのは重篤な低酸素領域であり、治療抵抗性はもっと“軽度”な低酸素領域で既に起きている。一方、この軽度低酸素環境では、低酸素応答転写因子 HIF1 が活性化し、固形腫瘍における血管新生、糖代謝、転移、浸潤等に関与する 100 余の遺伝子発現を誘導する。常酸素環境では HIF1 は速やかに代謝されて存在しないため、HIF1 陽性領域は“軽度”低酸素領域であり、かつその誘導能からがん悪性度の高い領域とも考えられる。

我々は高分解能 SPECT 装置（分解能 1mm 程度）を用いて、これまで困難であった腫瘍内部性状の高分解能イメージングに取り組んでいる。また、9.4T 小動物用 MRI 装置を用いた腫瘍イメージング、さらに SPECT/MRI 融合画像診断の開発にも着手している。一方、近藤（分担者）は、HIF1 中の酸素依存的分解ドメインに着目し、HIF1 $\alpha$  ミミックとして HIF 陽性低酸素領域で特異的に安定化される融合タンパク質を開発している。先端部に細胞膜透過性ドメインを導入し、細胞到達性も高い。本研究ではそのひとつである POH を使い、新規 SPECT プローブを開発し、さらに分子イメージングの最先端技術を駆使することで、腫瘍内低酸素環境およびがん悪性度の評価する新規画像診断法の開発を目指すものである。



近赤外蛍光色素で標識したPOHタンパク質による腫瘍のイメージング：腫瘍は右肩胛下あり、投与24時間後透明に描画された。右カラムはがん細胞で導入されているHIF-1の活性をリンフェラーゼ活性で確認したもの。

↓  
しかしながら、光イメージングはせいぜい5mm程度までの深さの情報しか得られず、また、定量性も乏しい。

↓  
核医学イメージングによって臨床応用を図る。

#### (到達目標)

- 1 HIF1 ミミックを土台として、イメージングプローブを設計、合成する。
- 2 培養細胞系および担がん動物を用いて評価を行い、組織化学的手法、薬物動態解析などにより、至適化を図る。
- 3 腫瘍内に不均等に分布する HIF1 陽性領域の高精度可視化技術を確立する。
- 4 放射線治療、化学療法の治療抵抗性予測に関する検討を開始する。

#### (研究終了時点の実績要点)

### 第1年次（追加採択のため、8月より研究開始）

#### (到達目標)

- 1 HIF1 ミミックを土台として、イメージングプローブを設計、合成する。

HIF1 $\alpha$  が活性化する機序に着目し、HIF 陽性低酸素領域で特異的に安定化される融合タンパク質 POH と、これに特異的かつ極めて強固に結合する低分子化合物 HaloTag ligand (HL) を土台として HIF 陽性領域を可視化する新しい核医学 SPECT プローブの設計し、これを実際に合成する。

1-1. POH と HaloTag ligand (HL) の極めて強い結合性を利用した SPECT プローブの分子設計を行う。

1-2. この設計に従い、HL に放射性核種を導入するためのプローブを合成する（複数種類を予定）

1-3. 上記への放射性核種の導入、ならびに、POH タンパク質との結合に関する検討を実施し、目的とするプローブを得る。

#### (年次評価時点の実績要点)

- 1-1. SPECT 核種である  $^{111}\text{In}$  を POH に導入するために、HL に  $^{111}\text{In}$  に対する配位子錯体を導入することを企画し、いくつかの錯体構造を候補として分子設計を行った。

なお、この設計は POH に対して、HL を介して SPECT 核種のみでなく、蛍光色素あるいは MRI 造影剤など様々なイメージングモダリティ用のプローブを自在に結合させることを可能にするものであり、HIF 陽性低酸素領域のマルチモダリティイメージングを目指している。

1-2. この設計に基づき、まず HL を有機化学的に修飾し、配位子錯体を導入した化合物を 3 種類合成し、次にこれを SPECT 核種のひとつである  $^{111}\text{In}$  で標識するための至適条件を求めた。

1-3. この低分子化合物と融合タンパク質 POH を結合させるための至適条件を検討し、目的とするプローブを得た。

## 研究成果と考察

### 第 1 年次評価時点

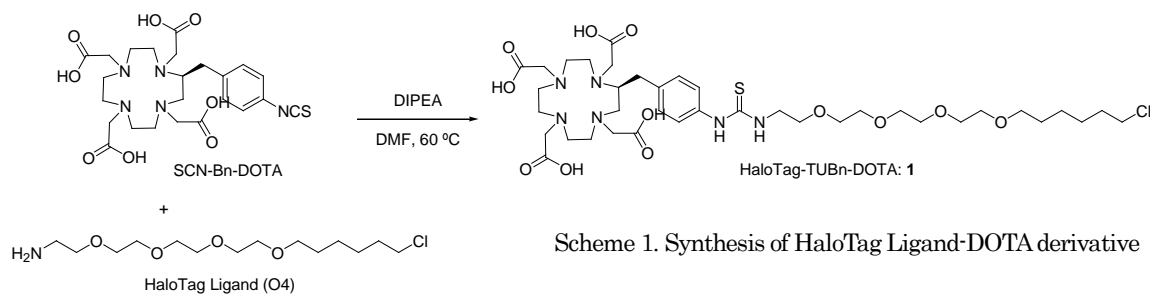
#### HIF1 $\alpha$ ミミックタンパク質と HaloTag システムを利用した SPECT イメージングプローブの合成

低酸素応答転写因子 (HIF) 中の酸素依存的分解ドメイン (ODD) を中心に、その片端に細胞膜透過性ドメイン (PTD) を、また反対端に低分子リガンド (HL) と特異的な共有結合を形成するタグタンパク質 (HaloTag<sup>®</sup>) を結合させた融合タンパク質 POH を合成し、これをイメージングプローブの土台とした。POH タンパク質は、PTD によってすべての細胞の中にとりこまれた後、ODD によって常酸素状態では酵素的に分解され、HIF が機能する低酸素状態でのみ安定し、細胞内にとどまることが期待される。さらに、HaloTag<sup>®</sup> タンパク質と HL が特異的かつ極めて強固に結合することを利用し、HL を有機化学的に修飾し、SPECT 核種結合部位を導入した化合物を合成することで、POH に SPECT 核種を結合するシステムの構築を目指した (Fig. 1)。なおこの設計は、HL の修飾基を換えることで、POH タンパク質そのものの性質を変えずに、簡便に異なる機能分子を付加できるようにすることを想定したもので、SPECT 核種のみでなく、蛍光色素あるいは MRI 造影剤など様々なイメージングモダリティ用のプローブを結合させることを可能である。これによって、HIF 陽性低酸素領域のマルチモダリティイメージングを目指している。

本年度はこの HaloTag システムを利用した  $^{111}\text{In}$  標識 POH プローブの合成を行った。まず、HL を有機化学的に修飾して SPECT 核種結合部位を導入した化合物を合成し、次にこれを  $^{111}\text{In}$  で標識し、最後に  $^{111}\text{In}$  標識 HL 誘導体を POH に結合させるという 3 段階を踏んで、プローブを合成した。以下にそれぞれの段階での検討結果を記す。

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<sup>1</sup>。

本研究ではプローブ標識核種として SPECT 核種である Indium-111 ( $^{111}\text{In}$ ) を用いての検討を進めた。 $^{111}\text{In}$  は金属核種であり、DTPA や DOTA 等の配位子と錯体を形成する。そこでプローブ合成の第 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、 $^{111}\text{In}$  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。ここでは thioureabenzyl 基をもつ DOTA を用いた結果を示す。



DOTA 環上に thioureabenzyl 型のスペーサーを導入したリガンド、HaloTag-TUBn-DOTA: 1 の合成を行った

(Scheme 1)。塩基や温度に関する条件を検討した結果、塩基として DIPEA、溶媒に DMF を用いて、室温にて反応を行った場合、効率よく目的の化合物、**1** を得ることに成功した。生成物は HPLC にて精製した。得られた生成物の MS スペクトルを測定したところ、 $m/z = 863.5$  ( $M + H^+$ ) であったことから、その構造が **1** であることが確認された (Fig. 2a)。さらに、HPLC の再分析を行ったところ、**1** はおおむね良好な収率・純度で得られたと考えられる (Fig. 2b)。

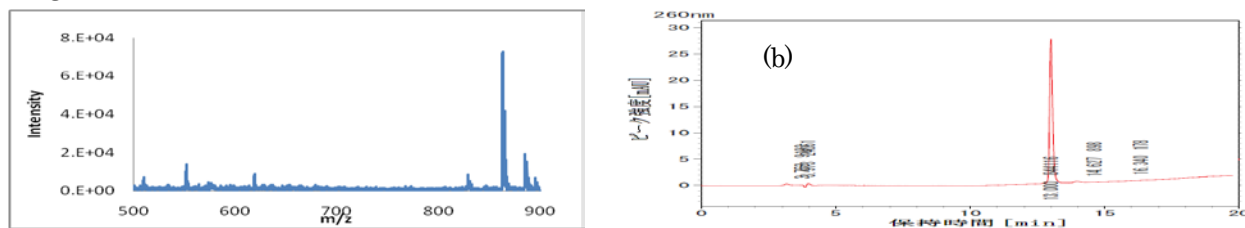
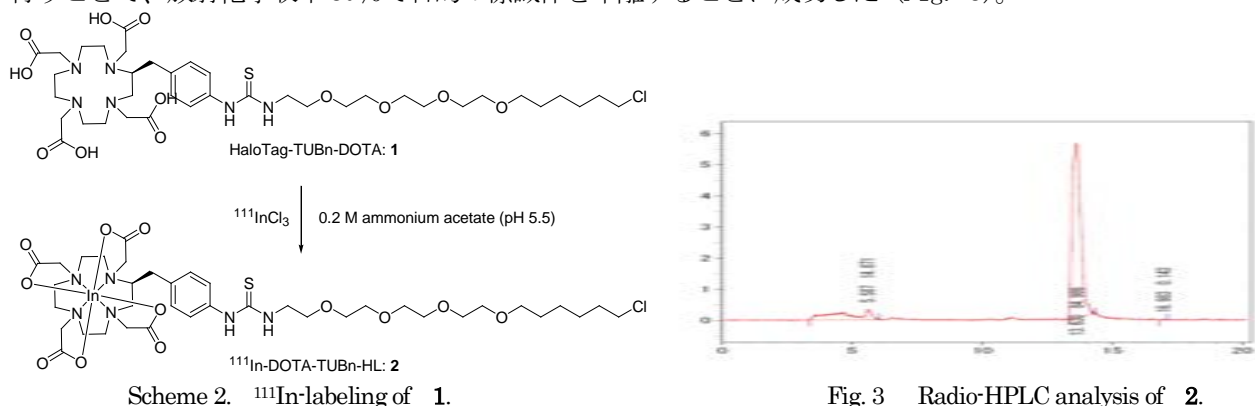


Fig. 2 Analysis of compound **1**. (a) Mass spectrum, (b) HPLC chromatogram.

次に第2段階として、合成した **1** のインジウム標識に関する検討を行った (Scheme 2)。反応溶媒、温度、時間等の標識反応条件を種々検討し、最適化した結果、0.2 M 酢酸アンモニウム溶液中 (pH 5.5) で 60°C、1 時間反応を行うことで、放射化学収率 80% で目的の標識体を単離することに成功した (Fig. 3)。



Scheme 2.  $^{111}\text{In}$ -labeling of **1**.

Fig. 3 Radio-HPLC analysis of **2**.

プローブ合成の最終過程として、これまで合成した **2** と POH との結合に関する検討を行った。タンパク質の不要な分解、純度低下を避けるために、PBS (pH 8.0) 中、4°C でタンパク質標識反応を行った。得られた反応混合物から、未反応の **2** を除き、純粋な  $^{111}\text{In}$ -標識タンパク質として得るために、反応溶液をゲルろ過スピンカラム法により精製し、 $^{111}\text{In}$ -DOTA-TUBn-HL-POH: **3** を 51% の放射化学収率で得た。タンパク質としての回収率は >95% であった。

得られた  $^{111}\text{In}$  標識 POH を SDS-PAGE によって分析した結果、コントロールとして用いた未標識体の POH とほぼ同じ分子量位置に単一バンドとしてタンパク質バンドが確認でき、オートラジオグラフィでは、そのバンドのみに放射活性が検出された。従って、POH は確かに  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TUBn-HL-POH として標識されたことが明らかとなった (Fig. 4)。標識反応後の POH のタンパク質としてのバンドはほぼ単一であり、標識反応中に分解等は起きていない事も確認された。また標識後の POH タンパク質を 4°C で保管し、同様に SDS-PAGE で確認したところ、1 週間は安定であった。

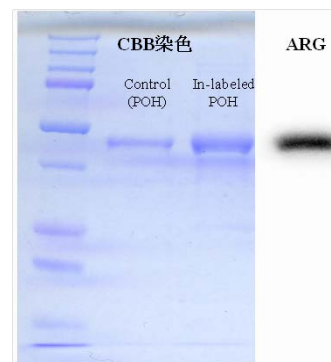


Fig. 4 SDS-PAGE analysis for  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TUBn-HL-POH

以上の結果より、目的とする放射性核種標識プローブである、 $^{111}\text{In}$ -DOTA-TUBn-HL-POH の効率的な合成に成功した。また同様の方法で、DOTA の 4 つのカルボン酸のひとつと HL を直接アミド結合でつなぐ HL-DOTA 誘導体を用いた POH 標識体の調製も成功している。今後はこのプローブが設計通り低酸素領域特異的、HIF 1 活性特異的な集積をしめすかどうかの検討を進め、結果に応じてさらにプローブ分子の改変を行うなどして、至適化を進める予定である。また、POH-HL 結合を利用した蛍光プローブの合成も行っており、SPECT プローブとの挙動の相違を確認の上、マルチモーダルイメージングの可能性も検討する。

## References

1. Kizaka-Kondoh S, Itasaka S, Zeng L, Tanaka S, Zhao T, et al.; Clin Cancer Res (2009)15, 3433.
2. Kuchimaru T, Kadonosono T, Tanaka T, Ushiki T, Hiraoka M, Kizaka-Kondo S; PLoS ONE (2010)5, 12, e15736.

## 倫理面への配慮

実験動物を用いた基礎的研究およびトランスレーション研究に関しては、当該機関の動物実験に関する指針およびNIHのガイドラインに従うものとする。

実際の動物実験は当該施設の動物委員会に申請し、承認を得たうえで実施する。

これらの成果を基にした臨床研究を実施する際には、ヘルシンキ宣言ならびに臨床研究に関する倫理指針に十分配慮して研究を立案する。その後、当該機関の倫理審査委員会の承認を得て、研究を実施する。

前向き研究においては、文書による同意を得たうえで研究を実施する。また、蓄積した臨床症例の解析に当たっては、個人情報の匿名化を行い、個人情報の漏洩を防止する。

## 本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

### (雑誌論文)

#### 2011 年度

- Evaluation of [<sup>125</sup>I]IPOS as a molecular imaging probe for hypoxia-inducible factor-1 active regions in a tumor: Comparison among single-photon emission computed tomography/X-ray computed tomography imaging, autoradiography, and immunohistochemistry. Ueda M, Kudo T, Mutou Y, Umeda IO, Miyano A, Ogawa K, Ono M, Fujii H, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M, Saji H. Cancer Sci 102(11):2090-6, 2011
- Synthesis and evaluation of a novel <sup>99m</sup>Tc-labeled bioreductive probe for tumor hypoxia imaging. Kimura S, Umeda IO, Moriyama N, Fujii H. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 21(24):7359-62, 2011
- High resolution SPECT imaging for visualization of intratumoral heterogeneity using a SPECT/CT scanner dedicated for small animal imaging. Umeda IO, Tani K, Tsuda K, Kobayashi M, Ogata M, Kimura S, Yoshimoto M, Kojima S, Moribe K, Yamamoto K, Moriyama N and Fujii F, Ann Nuc Med. 26(1): 67-76, 2012.
- Detection of the onset of ischemia and carcinogenesis by hypoxia-inducible transcription factor-based in vivo bioluminescence imaging. Kadonosono T, Kuchimaru T, Yamada S, Takahashi Y, Murakami A, Tani T, Watanabe H, Tanaka T, Hirota K, Inoue M, Tsukamoto T, Toyoda T, Urano K, Machida K, Eto T, Ogura T, Tsutsumi H, Ito M, Hiraoka M, Kondoh G, Kizaka-Kondoh S. PLoS One. 2011;6(11):e26640. Epub 2011 Nov 10.

### (学会発表)

#### 2011 年度

- Multimodal *in vivo* imaging of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) active tumors by HIF-1 $\alpha$ -mimic oxygen-dependent degradation protein probes with interchangeable labeling system. Umeda IO., Kuchimaru T., Kakishima Y., kimura S., Yanaka A., Kizaka-Kondoh S., Fujii H. 2011 World Molecular Imaging Congress. Sep7-10, 2011. San Diego, California.
- Development of novel <sup>99m</sup>Tc-labeled bioreductive probe for tumor hypoxia imaging. Kimura S., Umeda IO., Fujii H. 2011 World Molecular Imaging Congress. Sep7-10, 2011. San Diego, California.
- Clinical translation of a novel *in vivo* imaging probe for HIF-1 active tumors using multimodality imaging system. Umeda IO., Kakishima Y., Kimura S., Kuchimaru T., Yanaka A., Kizaka-Kondoh S., Fujii H. 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月3-5日、名古屋国際会議場(名古屋市)

・酸素依存的分解ドメインを含む融合タンパク質を利用した HIF-1 $\alpha$  陽性領域可視化 SPECT プローブの開発. 柿島 祐, 梅田 泉, 木村禎亮, 口丸高弘, 近藤科江, 谷中昭典, 藤井博史. 第 51 回日本核医学会学術総会 2011 年 10 月 27-29 日、つくば国際会議場 (つくば市)

腫瘍内 HIF-1 $\alpha$  陽性領域可視化を目指した SPECT プローブの開発 -組織分布の経時的変化と腫瘍内分布の検討-. 柿島 祐, 梅田 泉, 木村禎亮, 口丸高弘, 近藤科江, 谷中昭典, 藤井博史 日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月 30 日 北海道大学 (札幌市)