

(論文内容の要旨)

固形腫瘍には、血管からの酸素供給が不足して酸素分圧が低下する低酸素領域が存在する。その領域は薬物療法や放射線治療に対する抵抗性に関与することから、腫瘍の低酸素領域のインビボイメージングを可能とする放射性診断薬の開発が臨床画像診断学の分野で強く望まれている。ところで、この低酸素領域では低酸素応答を促す転写因子である Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)が存在しており、様々なたんぱく質発現を制御して治療抵抗性に深く関与している。この HIF-1 の存在量は、 α サブユニット内に存在する酸素依存的分解ドメイン(ODD)が通常酸素分圧下で分解され、低酸素分圧下では分解されずに残存することで調節されることが報告されている。そこで本研究では、ODD が酸素濃度依存的に分解される性質を利用して、ODD を母体とした腫瘍低酸素領域の核医学画像診断薬の開発を計画した。

まず、ODDの中でも酸素依存的分解に必須である57残基のペプチドを母体として、これに膜透過性を向上させるための膜透過性配列 Protein transduction domain (PTD)を結合させた。このペプチドに、単光子放出断層撮像装置(SPECT)による核医学イメージングに適した放射性核種 ^{123}I を安定に導入できるとともに、ODDの分解後に細胞から排出される可能性のあるビオチン誘導體 (3- ^{123}I iodobenzoyl)norbiotinamide (^{123}I IIBB)を、ストレプトアビジン(SAV)をリンカーとして結合させた PTD-ODD-SAV- ^{123}I IIBB (^{123}I IPOS)を設計した。基礎的な実験には、 ^{123}I の代わりに長半減期で取扱いの容易な ^{125}I を選択した。PTD-ODD-SAV (POS)、 ^{125}I IIBB をそれぞれ作製した後、両者を結合させることにより ^{125}I IPOSを得た。得られた ^{125}I IPOS を腫瘍細胞とインキュベートしたところ、低酸素条件下においては通常酸素条件下よりも有意に高い放射能集積が認められた。FM3A マウス乳癌細胞移植マウス(FM3A 腫瘍マウス)に ^{123}I IPOS を静脈投与し、SPECT を用いて放射能分布のイメージングを行った結果、投与 24 時間後に明瞭に腫瘍が描出された。さらに、HIF-1 依存的にルシフェラーゼを発現する腫瘍細胞を移植した担癌マウス(HRE-Luc 腫瘍マウス)において、 ^{125}I IPOS 静脈投与後の腫瘍への放射能集積はルシフェラーゼの発光量、すなわち HIF-1 活性と相関した。以上の結果より、ODDを母体とする ^{123}I IPOS が所期の通り、HIF-1 が存在する低酸素領域のイメージング剤として必要な性質を有していることが示された。しかし、血液クリアランスが遅く、明瞭な画像が得られるまでに長時間かかるため、用いる放射性核種の半減期の観点から、より早期でのイメージングを可能とする方法の開発が求められた。

そこで、酸素濃度依存的に分解する ODD の性質を利用して、まず POS を投与し、低酸素領域への分布と通常酸素領域での分解が完了後、POS と結合能を有し、かつ速やかに血液中から消失する $[^{123}\text{I}]\text{IBB}$ を投与することにより、放射性化合物の投与後早期に腫瘍のイメージングを可能とするプレターゲティング法を用いることを考えた。FM3A 腫瘍マウスに POS を投与し、その 24 時間後に $[^{125}\text{I}]\text{IBB}$ を投与したところ、腫瘍への高い放射能集積を認めた。その集積はビオチン投与により阻害されたことから、 $[^{125}\text{I}]\text{IBB}$ は生体内において、腫瘍低酸素領域に分布した POS と結合することで腫瘍に集積している可能性が示された。一方、担癌マウスに $[^{125}\text{I}]\text{IBB}$ のみを投与した場合には、放射能は体内から速やかに消失した。さらに、 $[^{123}\text{I}]\text{IPOS}$ 投与 24 時間後と同等の明瞭な腫瘍のイメージが、プレターゲティング法では $[^{123}\text{I}]\text{IBB}$ 投与 6 時間後に得られ、放射性薬剤投与から撮像までの時間を 1/4 に短縮できることが示された。また、HRE-Luc 腫瘍マウスに POS を前投与した際の $[^{125}\text{I}]\text{IBB}$ の腫瘍集積は HIF-1 活性と相関していること、さらに、投与後腫瘍の薄切標本を作製してオートラジオグラフィ及び免疫組織学的検討を行った結果、腫瘍内放射能分布は HIF-1 存在領域と一致していることを認めた。以上の結果より、POS と $[^{123}\text{I}]\text{IBB}$ を用いたプレターゲティング法を行うことで、放射性核種の半減期に応じた、放射性薬剤投与早期での腫瘍における低酸素領域のイメージングの可能性が示された。

さらに、これまでの結果を基盤として、SPECT よりも定量性に優れ解像度が高い陽電子放出断層撮像装置(PET)による腫瘍内低酸素領域のイメージングの可能性を検討した。PET 核種としては臨床での汎用性に優れている ^{18}F を用いることとし、 ^{18}F 標識ビオチン誘導体、(4- $[^{18}\text{F}]\text{fluorobenzoyl}$)norbiotinamide ($[^{18}\text{F}]\text{FBB}$)を合成した。FM3A 腫瘍マウスに POS を前投与し、24 時間後に $[^{18}\text{F}]\text{FBB}$ を投与した結果、3 時間後において腫瘍を明瞭に画像化することに成功した。また、その集積はビオチン投与によって阻害されたことから、 $[^{18}\text{F}]\text{FBB}$ は生体内において、腫瘍低酸素領域に分布した POS と結合することで腫瘍に集積している可能性が示された。さらに、HRE-Luc 腫瘍マウスに POS を前投与した後、 $[^{18}\text{F}]\text{FBB}$ を投与した場合の腫瘍における放射能集積は、HIF-1 活性と相関していることを認めた。以上の結果より、POS のプレターゲティングと $[^{18}\text{F}]\text{FBB}$ を用いることで、腫瘍における低酸素領域の PET イメージングの可能性が示された。

以上、本研究は、腫瘍における低酸素領域の核医学画像診断のための放射性薬剤開発の可能性を示したものであり、今後の腫瘍の診断、治療法の発展に有益な情報を提供するものと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

固形腫瘍には、血管からの酸素供給が不足して酸素分圧が低下する低酸素領域が存在する。その領域は薬物療法や放射線治療に対する抵抗性に関与することから、腫瘍の低酸素領域のインビボイメージングを可能とする放射性診断薬の開発が臨床画像診断学の分野で強く望まれている。ところで、この低酸素領域では低酸素応答を促す転写因子である **Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)** が存在し、治療抵抗性に深く関与しているが、この HIF-1 の存在量は、 α サブユニット内に存在する酸素依存的分解ドメイン(ODD)が通常酸素分圧下で分解され、低酸素分圧下では分解されずに残存することで調節されることが報告されている。そこで本論文は、ODD が酸素濃度依存的に分解される性質を利用して、ODD を母体とした腫瘍低酸素領域の核医学画像診断薬の開発を計画したものである。

著者は、先ず、ODD の中でも酸素依存的分解に必須である部分のペプチドを母体として、これに膜透過性を向上させるための膜透過性配列 (PTD) および、単光子放出断層撮像装置(SPECT)による核医学イメージングに適した放射性核種 ^{123}I を安定に導入できるとともに、ODD の分解後に細胞から排出される可能性のあるビオチン誘導體 (^{123}I IJB) を、ストレプトアビジン(SAV)をリンカーとして結合させた PTD-ODD-SAV- ^{123}I IJB (^{123}I IPOS) を設計した。基礎的な実験では、 ^{123}I の代わりに長半減期の ^{125}I を用いることとし、PTD-ODD-SAV (POS)、 ^{125}I IJB をそれぞれ作製した後、両者を結合させることにより ^{125}I IPOS を得、これを腫瘍細胞とインキュベートしたところ、低酸素条件下においては通常酸素条件下よりも有意に高い放射能集積を認めた。また、FM3A マウス乳癌細胞移植マウス (FM3A 腫瘍マウス) に ^{123}I IPOS を静脈投与し、SPECT を用いて放射能分布のイメージングを行った結果、投与 24 時間後に明瞭に腫瘍を描出することに成功した。さらに、HIF-1 依存的にルシフェラーゼを発現する腫瘍細胞を移植した担癌マウス(HRE-Luc 腫瘍マウス)において、 ^{125}I IPOS 静脈投与後の腫瘍への放射能集積はルシフェラーゼの発光量、すなわち HIF-1 活性と関連することを見出した。以上の結果より、ODD を母体とする ^{123}I IPOS が HIF-1 が存在する低酸素領域のイメージング剤として必要な性質を有していることを示したものの、血液クリアランスが遅く、明瞭な画像が得られるまでに長時間かかり、核医学イメージングの観点からは問題があることを認めた。

そこで、著者は酸素濃度依存的に分解する ODD の性質を利用して、まず POS を投与し、低酸素領域への分布と通常酸素領域での分解が完了後、POS と結合能を有し、かつ速やかに血液中から消失する ^{123}I IJB を投与することにより、放射性化合物の投与後早期に腫瘍のイメージングを可能とするプレターゲット法を用いることを考えた。FM3A 腫瘍マウ

スに POS を投与し、その 24 時間後に $[^{125}\text{I}]\text{IBB}$ を投与したところ、 $[^{123}\text{I}]\text{IPOS}$ 投与 24 時間後と同等の明瞭な腫瘍のイメージを 1/4 以内の時間内に得ることに成功した。また、放射能の集積と HIF-1 活性との相関していることを認め、プレターゲティング法が短半減期の放射性核種を用いる核医学イメージングに有効な方法であることを示した。

さらに、陽電子放出断層撮像装置(PET)による腫瘍内低酸素領域のイメージングにもプレターゲティング法を用いることを計画し、臨床での汎用性に優れている PET 核種 ^{18}F で標識されたビオチン誘導体 ($[^{18}\text{F}]\text{FBB}$)を合成、POS の前投与後に $[^{18}\text{F}]\text{FBB}$ を投与した結果、放射性化合物投与後撮像までの時間を 1/8 以内に短縮することに成功した。

以上、本研究は、腫瘍における低酸素領域の核医学画像診断のための放射性薬剤開発の可能性を示したものであり、その成果は、今後の腫瘍の診断、治療法の発展に有益な情報を提供するものと評価される。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成21年2月26日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。