



展 TENBO 望

がんの再発機構が示す PET イメージングの方向性



原田 浩

Harada Hiroshi

(京都大学 生命科学系キャリアパス
形成ユニット 放射線腫瘍生物学)

1 はじめに

1895年にX線が発見されてからわずか17年後の1912年、Swartzらによって“細胞が低酸素条件下で放射線抵抗性を示すこと”が指摘された。その約40年後の1955年、R.H. ThomlinsonとL.H. Grayによって“悪性固形腫瘍の内部には腫瘍血管が点在し、そこから約70~100 μm 程度離れた領域には血管から十分な酸素が供給されない領域が局在すること”が報告された。これを機に低酸素と放射線治療抵抗性とが強く関連付けられたが、がんの再発を引き起こす“源”の正体は不明であった。このような背景の下、我々は最新の分子イメージングと分子生物学的技術を駆使して、“低酸素領域の中に潜み、がんの再発を直接的に引き起こすがん細胞”を同定することに成功し、放射線腫瘍学・放射線生物学分野における最大の謎の1つを解明した。また、それら細胞群が放射線抵抗性を獲得し、がんの再発を導くメカニズムを明らかにした。本稿では、“①これらの研究成果の詳細”を紹介するとともに、そこから見えてくる“②今後のがん放射線治療の方向性”を紹介する。そして“③放射線治療法の革新の中でPETイメージングに何が求められているか”を論じたい。

2 腫瘍内低酸素領域とは

がん原遺伝子やがん抑制遺伝子の機能異常により、がん細胞の増殖制御機構は破綻を来し、腫瘍の増殖速度と腫瘍血管系の構築速度の間にアンバランスが生じる(図1)¹⁾。結果、腫瘍血管の周りに存在するがん細胞には十分な酸素が供給され、活発に分裂を繰り返す(有酸素環境: Normoxia)。一方、腫瘍血管から約70~100 μm 程度離れた領域には慢性的に酸素と栄養源が行き渡らない低酸素領域が生じる(hypoxia)。さらに血管から離れた領域には十分な酸素と栄養素が供給されない壊死領域が存在する(Necrosis)。

3 低酸素がん細胞ががんの再発を導くメカニズム

3.1 放射線化学的メカニズム

がん治療で広く使われているX線などの電離放射線は、がん細胞の中で e_{aq}^- や $\cdot\text{H}$ ラジカル、あるいはDNAなどの有機ラジカルを発生させることにより、細胞のゲノムDNAに大きな損傷を与える²⁾。これらラジカルが酸素と反応してスーパーオキシドや過酸化水素になるこ

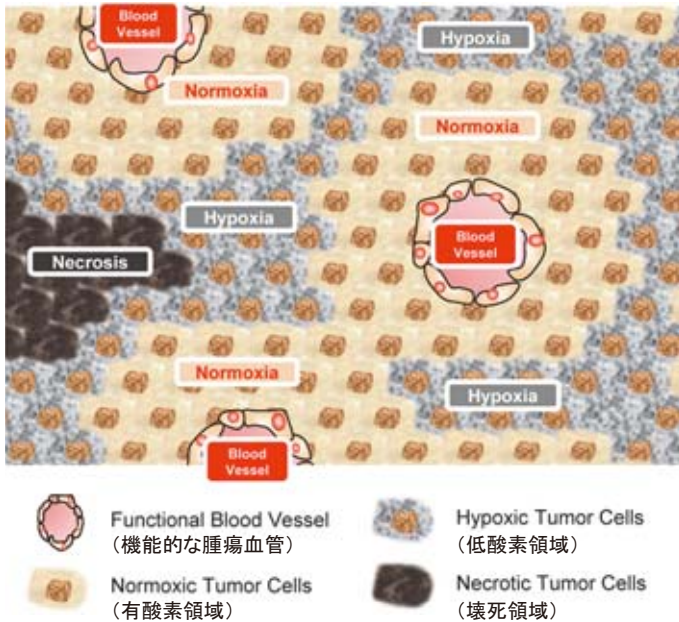


図1 腫瘍内酸素環境の模式図

とで長寿命化し、長期間にわたって DNA に損傷を与え続ける²⁾。また、元々は修復可能であった軽微な DNA 損傷に酸素分子が作用することで、より複雑かつ修復不能な致死的染色体切断が形成される²⁾。このような理由から、腫瘍血管近傍で十分な酸素が供給されているがん細胞は放射線に高感受性を示し、逆に腫瘍血管遠位に存在する低酸素環境下では細胞の放射線感受性は著しく低下する（放射線抵抗性が亢進する）。

3.2 放射線生物学的メカニズム

低酸素環境下で活性化、若しくは不活性化する遺伝子群の作用によって細胞周期や DNA 損傷修復能が調節され、結果的に細胞が放射線抵抗性を獲得するメカニズムが明らかになった。細胞の低酸素応答で重要な機能を果たすことで知られる低酸素誘導性因子 1 (hypoxia-inducible factor 1: HIF-1) が、そのような生物学的メカニズムに関わっていることは従来から示唆されてきたが、その作用メカニズムは非常に巧妙であり、かつ驚くべきものであることが明らかに

なった。その詳細を紹介する前に、HIF-1 活性の制御機構 (3.2.1) と低酸素領域の腫瘍内局在 (3.2.2) を紹介する。

3.2.1 HIF-1 活性の制御と細胞の低酸素応答

HIF-1 は HIF-1 α と HIF-1 β で構成されるヘテロ 2 量体の転写因子で、その活性は主に HIF-1 α の翻訳後修飾を介して制御されている³⁾。HIF-1 α 内のプロリン残基 (P₅₆₄) は prolyl hydroxylases (PHDs) によって酸素依存的に水酸化される。これを合図に HIF-1 α はユビキチン-プロテアソーム系によって速やかに分解され、結果として細胞内の HIF-1 活性は著しく低下する。一方、酸素分子の欠如した低酸素環境においては PHDs 活性

が劇的に低下するため HIF-1 α タンパク質は安定化し、HIF-1 β と結合して HIF-1 を形成する。そして hypoxia-response element (HRE) と呼ばれるエンハンサー配列に結合し、その制御下にある一連の遺伝子発現を誘導、そして低酸素環境への適応（酸化的リン酸化から嫌気呼吸へのエネルギー代謝経路の転換）や低酸素環境の改善（血管新生の誘導）、更には低酸素環境からの回避（転移、浸潤）を図る。

3.2.2 ピモニダゾール陽性低酸素領域と HIF-1 陽性低酸素領域の腫瘍内局在

各種の抗体を用いた免疫組織染色実験によって、低酸素領域の腫瘍内局在は詳細に解明されている。例えば抗 HIF-1 α 抗体を用いることで、HIF-1 活性化細胞が存在する生物学的な低酸素領域が腫瘍血管遠位に存在することが確認されている。一方、ニトロイミダゾール系の化合物であるピモニダゾールはおよそ 10 mmHg を下回る低酸素環境下で還元されて細胞内に蓄積する特性を持つため⁴⁾、その投与後に腫瘍切片を摘出して抗ピモニダゾール抗体で染色すること

で、絶対的な低酸素領域を簡便に検出できる⁴⁾。これら2つの染色法を組み合わせることで、P.L. Oliveらの研究グループは“抗HIF-1 α 抗体で検出される生物学的低酸素領域”と“ピモニダゾールで検出される絶対的低酸素領域”の両方が共に腫瘍血管遠位に存在するものの、隣り合った異なる細胞群であることを示した(図2)⁵⁾。担がんマウスにグルカゴンを持続投与して血糖値を増加させた場合にピモニダゾール陽性低酸素領域においてHIF-1 α の発現が誘導されることから、血管から供給されるグルコース量が不十分であることが当該領域におけるHIF-1 α 発現量の減少を招いていることが分かっている⁶⁾。

3.2.3 放射線治療後のがんの再発源の同定

前述の通り、半世紀以上にわたる放射線生物学・放射線腫瘍学の歴史の中で、腫瘍内の低酸素領域は放射線治療抵抗性と強く関連付けられてきた。しかしながら、低酸素がん細胞が本当に放射線治療を生き延びて再発を引き起こすのか否か?という問いに明確な回答は得られていなかった。この疑問にアプローチするために我々はHIF-1陽性低酸素がん細胞とピモニダゾール陽性低酸素がん細胞の各々にルシフェラーゼタンパク質による光標識を導入し、これらの細胞群ががんの再発を直接的に導くのか否かを検証する光イメージング実験を行った⁷⁾。まずCre-loxP系を利用してHIF-1陽性低酸素がん細胞にルシフェラーゼ標識を導入し、その直後に放射線治療を施した。そして、腫瘍がいったん消失した後に生じた再発腫瘍の中に、どの程度のルシフェラーゼ陽性細胞が存在するかを定量した。その結果、再発腫瘍内のわずか14%の細胞にしかルシフェラーゼ標識が入っていなかった。一方、ピモニダゾール陽性低酸素がん細胞にルシフェラーゼ標識を導入した後に同様の実験を行ったところ、再発腫瘍内の実に60~70%の細胞にルシフェラーゼ標識が入っていることが明らかになった。これらの結果は、HIF-1陽性低酸素がん細胞と比較してピモニダ

ゾール陽性低酸素がん細胞が有意に放射線治療を生き延び、がんの再発を引き起こすことを直接的に示している(図2)。また我々は、放射線治療を生き延びたピモニダゾール陽性細胞が元々はHIF-1陰性であるものの、放射線照射による腫瘍内微小環境の劇的な変化を受けてHIF-1活性を獲得し、腫瘍血管に向けて遊走することでがんの再発を導くことを見出した(図2)⁷⁾。そしてこのHIF-1依存的な遊走をHIF-1抑制剤で阻害することで、がんの再発率を劇的に低下させ得ることを報告した⁷⁾。この結果は、放射線照射によるHIF-1の活性化を抑制することで腫瘍再増殖を有意に遅延させ得るとの報告を強く支持する^{8,9)}。

3.2.4 HIF-1活性の低下によるピモニダゾール陽性細胞群の放射線抵抗性

それではなぜ、HIF-1陽性低酸素がん細胞と比較してピモニダゾール陽性低酸素がん細胞は放射線治療に抵抗性を示して生き延びることができたのであろうか?ピモニダゾール陽性低酸素がん細胞は腫瘍血管からより遠くに存在するため、より酸素分圧の低い環境に存在することから、前述した放射線化学的なメカニズムが作用していることは容易に想像がつく²⁾。こういった機序とは別に、ピモニダゾール陽性低酸素がん細胞のHIF-1活性が低いことが生物学的な放射線抵抗性の亢進につながることを我々は見出した⁶⁾。

低酸素環境に曝された細胞はHIF-1を活性化することで細胞周期制御因子p21^{Cip1}やp27^{Kip1}の発現を誘導して細胞周期をG₁期で停止させることが従来から知られている。G₁期におけるDNA二重鎖切断の修復は、主に非同源末端結合修復(non-homologous end joining repair [以降、NHEJ修復])に依存する。それは、相同組換え修復(homologous recombination repair [以降HR修復])に必要な姉妹染色分体がG₁期の細胞には存在しないためである。NHEJ修復はHR修復と比較して損傷修復時に誤りが起こりやすいため、G₁期にあるHIF-1陽性低酸素細

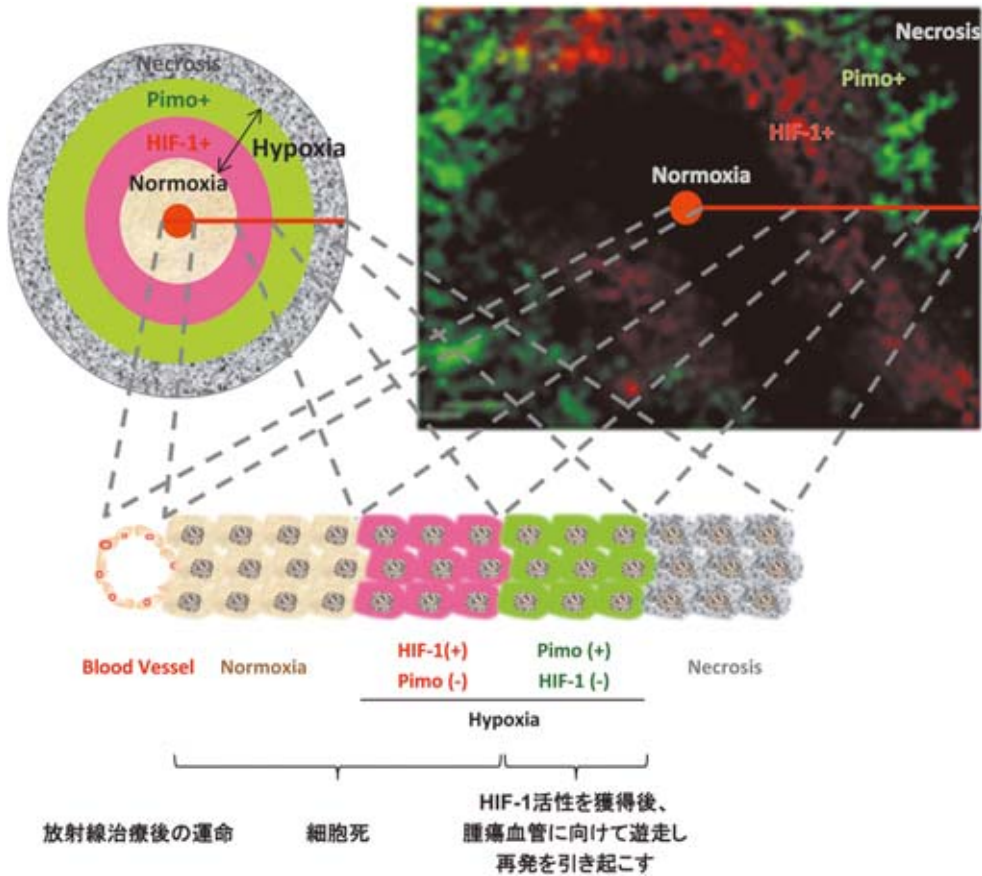


図2 血管を中心とする微小環境の詳細と、各環境における細胞周期制御、細胞の放射線感受性

胞の放射線感受性は比較的高くなる。逆にピモニダゾール陽性領域に存在する HIF-1 活性の低下した細胞群では、HIF-1 活性の低下に伴って p27^{Kip1} の発現量が低下し、細胞周期が S 期に進行することを我々は見出した (図 2)⁶⁾。S 期の細胞内には姉妹染色分体が存在することから、DNA 損傷修復の主役は正確性の高い HR 修復となり、結果としてピモニダゾール陽性 (HIF-1 陰性) 低酸素細胞の放射線抵抗性は亢進する (放射線感受性が低下する)。

ピモニダゾール陽性 (HIF-1 陰性) 低酸素がん細胞の放射線抵抗性が高く、その結果がんの再発を引き起こしやすいという我々の結論は、“腫瘍内の HIF-1 α 発現量と放射線治療後の生

命予後不良が相関する”という従来の臨床研究の結果¹⁰⁾と矛盾するように聞こえる。しかし、大半の悪性固形腫瘍内でピモニダゾール陽性領域と HIF-1 陽性領域は互いに隣り合い⁵⁾、また時には互いに重なり合って存在するため、ピモニダゾール陽性領域の量を HIF-1 陽性領域のそれとして間接的に捉えていたと考えれば矛盾はない。

4 低酸素イメージングを利用した新たな放射線治療法の確立

がんの放射線治療に対して腫瘍低酸素が及ぼす負の影響を克服するために、放射線照射法の

最適化（多分割照射法など）や、低酸素環境の改善（高圧酸素ガスの吸入など）、更には低酸素がん細胞を標的とする薬剤と放射線との併用が試されてきた。これらと同様に、又はそれ以上に大きな期待を集めているのが“低酸素イメージングと放射線治療の組み合わせ”である¹¹⁾。すなわち、腫瘍内低酸素領域をPETなどで画像化し、そこに高線量の放射線を集中照射するという試みである。PET用の低酸素プローブとしては、¹⁸F-misonidazole (¹⁸F-MISO)への期待が集まっている。これはピモニダゾールと同様にニトロイミダゾール骨格を有しているために酸素分圧の低下による還元環境下で活性化する特性を備えており、絶対酸素分圧の低下を感知することができる。がんの再発源であることが分かったピモニダゾール陽性低酸素細胞を描出できることが期待される。このほか、同様のニトロイミダゾール骨格を持つ¹⁸F-fluoroetanidazole (¹⁸F-FETA) や¹⁸F-RP170や¹⁸F-fluoroerythronitroimidazole、更には¹⁸F-fluoroazomycinarabinofuranoside (¹⁸F-FAZA) や¹⁸F-2-(nitro-1-[H]-imidazole-1-yl)-N-(2,2,3,3,3-pentafluoropropyl)-acetamide (¹⁸F-EF5)なども順次開発が進められてきた。これらのイメージングプローブに共通する問題として、合成や¹⁸F標識の導入の難しさが挙げられる。

5 低酸素イメージングが抱える諸問題と今後の方向性

5.1 ダイナミックな低酸素領域の動態

A.J. van der Kogel らの研究グループは複数の低酸素マーカーを時間差で担がんマウスに投与して免疫組織染色を行い、腫瘍の増殖に伴って絶対的な低酸素がん細胞が劇的に局在を変えることを示した¹²⁾。一方、放射線照射後に低酸素領域やHIF-1陽性細胞の腫瘍内局在が劇的に変化することも報告されている。筆者らは免疫組織染色実験によって、照射以前に腫瘍血管遠位に存在していたピモニダゾール陽性低酸素領域

が、放射線照射後に再酸素化されて消失することを報告している¹³⁾。これらの知見を基に高精度放射線治療法の理想像を考察すると、絶対的低酸素領域のリアルタイムなイメージングを実施して、こまめに放射線治療計画を修正することが必要となると考えられる。その一方で、現在の照射技術、治療計画の再検討に掛かる時間、PET等による低酸素イメージングに係る労力と患者への負担など負の要因を加味すると、長所と短所のバランスから現実的な方法を模索する必要があると考えられる。

5.2 PET イメージングの時間分解能と空間分解能

腫瘍の増殖過程、及び放射線治療後における腫瘍内低酸素領域の局在変化は、およそ6~24時間という時間軸で、100~数100 μm 程度離れた領域で起こる現象であることが、担がんマウスを対象とした分子イメージング研究や免疫組織染色実験で明らかになっている¹³⁾。まずは同様の現象がヒト腫瘍の中でも起きているのか否かを検証する必要がある。その上で、このような極めて微細な変化を描出し得るPET機器の高精度化が求められる。

5.3 標的としてのピモニダゾール陽性領域の妥当性

前述のとおり我々は、ピモニダゾール陽性低酸素領域に由来するがん細胞が放射線治療後の再発腫瘍の実に60%以上を占めることを実験的に証明した⁷⁾。しかしながら、再発がんに存在する40%のルシフェラーゼ陰性細胞が、原発腫瘍のどこに由来するのかは明らかになっていない。原発腫瘍内のピモニダゾール陽性領域だけに高線量の放射線を集中して照射するだけではがんの再発を防ぎきれない可能性があり、より一層の基礎研究が必要である。

5.4 低酸素イメージングプローブによる検出閾値と放射線抵抗性の関係

培養細胞を用いた放射線生物学研究によって、酸素分圧が20 mmHgを下回る辺りから細胞の放射線感受性が著しく減少し、およそ3

mmHg で半減することが知られている²⁾。一方、ニトロイミダゾール骨格を持つ¹⁸F-MISO等によって、10 mmHgを下回る低酸素領域を検出できることが*in vitro*の実験で確認されている。しかしながら、移植腫瘍の中で描出された領域にどの程度の線量の放射線を集中して照射すれば治療効果を向上できるのかは不明であり、臨床研究のみならず放射線生物学の基礎研究も含めた解析を行う必要があると考えられる。

以上の課題を克服することにより、がんの治療率を大幅に改善できるオーダーメイド放射線治療が現実のものとなるかもしれない。

【謝辞】

本稿は、最先端・次世代研究開発支援プログラム、独立行政法人 医薬基盤研究所による基礎研究推進事業、科学研究費補助金 若手研究 B、佐川がん研究助成による成果である。

参考文献

- 1) Thomlinson, R.H. and Gray, L.H., The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy, *Br J Cancer*, **9**, 539–549 (1955)
- 2) Hall, E.J. (ed.), *Radiobiology for the Radiologists*, Fourth Edition, J.B. Lippincott Company, Philadelphia (1994)
- 3) Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L., Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension, *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 5510–5514 (1995)
- 4) Raleigh, J.A., *et al.*, Hypoxia and vascular endothelial growth factor expression in human squamous

- cell carcinomas using pimonidazole as a hypoxia marker, *Cancer Res*, **58**, 3765–3768 (1998)
- 5) Sobhanifar, S., Aquino-Parsons, C., Stanbridge, E.J., and Olive, P., Reduced expression of hypoxia-inducible factor-1 α in perinecrotic regions of solid tumors, *Cancer Res*, **65**, 7259–7266 (2005)
- 6) Zhu, Y., *et al.*, Involvement of decreased hypoxia-inducible factor 1 activity and resultant G(1)-S cell cycle transition in radioresistance of perinecrotic tumor cells, *Oncogene*, doi : 10.1038/onc.2012.223 (2012)
- 7) Harada, H., *et al.*, Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumour blood vessels, *Nat Commun*, **3**, 783 (2012)
- 8) Harada, H., *et al.*, Significance of HIF-1-active cells in angiogenesis and radioresistance, *Oncogene*, **26**, 7508–7516 (2007)
- 9) Moeller, B.J., Cao, Y., Li, C.Y., and Dewhirst, M.W., Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules, *Cancer Cell*, **5**, 429–441 (2004)
- 10) Aebbersold, D.M., *et al.*, Expression of hypoxia-inducible factor-1 α : a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer, *Cancer Res*, **61**, 2911–2916 (2001)
- 11) Harada, H., How can we overcome tumor hypoxia in radiation therapy? *J Radiat Res (Tokyo)*, **52**, 545–556 (2011)
- 12) Ljungkvist, A.S., *et al.*, Changes in tumor hypoxia measured with a double hypoxic marker technique, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **48**, 1529–1538 (2000)
- 13) Harada, H., *et al.*, The Akt/mTOR pathway assures the synthesis of HIF-1 α protein in a glucose- and reoxygenation-dependent manner in irradiated tumors, *J Biol Chem*, **284**, 5332–5342 (2009)