1. HIF-1 を利用した低酸素がん細胞のイメージング・ターゲティング

近 藤 科 江 平 岡 眞 寛

京都大学医学研究科 放射線腫瘍学・画像応用治療学

Imaging and Targeting of Hypoxic Tumor Cells by Use of HIF-1

Shinae KIZAKA-KONDOH and Masahiro HIRAOKA

*Department of Radiation Oncology and Image-applied Therapy,
Kyoto University Graduate School of Medicine*

Summary

Tumor hypoxia is a potential therapeutic problem because it is closely associated with resistance to anti-cancer therapies and with the phenomenon of malignant progression. Therefore, although hypoxic tumor cells account for a very limited area in a solid tumor, conquering tumor hypoxia is crucial for treatment of malignant tumors. To image hypoxic tumor cells *in vivo*, we isolated a transfectant clone HeLa/5HRE-Luc, whose luciferase activity under hypoxic conditions was more than 100-fold of the one under aerobic conditions, and monitored the luciferase activity in HeLa/5HRE-luc xenografts with an *in vivo* real-time imaging system. To target tumor hypoxia, we recently constructed a fusion protein POP33, which is composed of the protein transduction domain (PTD), a part of HIF-1 α ODD and the dormant form of caspase-3, procaspase-3. PTD fusion proteins are previously demonstrated to be delivered to every cell in the whole body. POP33 did not affect well-oxygenized cells but efficiently increased caspase-3 activity and induced cell death to hypoxic cells *in vitro*. To investigate if POP33 can target hypoxic tumor cells *in vivo*, we monitored the luciferase activity in orthotopically transplanted human pancreatic cancer cells during POP33 treatment. The metastasis of the pancreatic cancer was significantly suppressed and their luciferase activity was reduced during the sequential administration of POP33. These data demonstrate that POP33 specifically targets tumor hypoxia and provide direct evidence that hypoxic tumor cells play a crucial role in the metastasis of pancreatic cancers.

はじめに

医学の進歩に伴い、がんの診断・治療技術も年々進歩してきている一方で、高齢化ががん増加の第一要因になっている。我が国では、世界のどの国も経験したことのない速度で人口の高齢化が進行しており、2020年には、1年間に84万人ががんになると試算されている。特定の「がん」に特徴的な分子を標的にした治療薬、いわゆる分子標的治療薬の研究開発は、がん治療に大いに貢献している。一方で、どこに存在するかわからない「がん」を早期に発見・治療するためには、がんに共通して存在し、かつ正常組織には存在しない特徴を標的にする必要がある。固形がんにも共通して存

在する『腫瘍特異的微小環境』は、正常組織には存在しないため、最適な標的と考えられる。特定の分子を標的にする『分子標的』に対して、我々の標的は『環境標的』といえる。悪性度の高いがんにより多く含まれているとされる低酸素領域は、1 mm以下の微小ながんにも存在するといわれており、初期のがんや転移がんの早期発見のための良い標的になる。我々は、低酸素細胞で活性化される HIF-1 の特性を利用して、腫瘍内微小環境にあるがん細胞を特異的にイメージング・ターゲティングする研究を行っている。

がんの微小環境

Fearon-Vogelstein のクローナル理論¹⁾に基づく

と、腫瘍は遺伝子変異を受けた1つのがん細胞が無秩序に増殖して形成される。従って腫瘍は、培養された細胞集団のように均一ながん細胞の集団で形成されるべきものであるが、実際は、ある一定以上のおおききになると、がんは増殖するために血管や基盤が必要になる。腫瘍内血管は、正常組織血管のように秩序正しく、均一に張り巡らされる訳ではなく、太さも分岐も極めて不均一で、無秩序な分布をしている。そのために、血管から供給される酸素や栄養が十分行き届かない領域ができ、腫瘍特異的微小環境が形成される。その領域にあるがん細胞は、環境に対応して性格が変化

し、腫瘍は極めて不均一な細胞の集団から構成されている(図1)。

非常に小さながん(数ミリ以下)でも通常ではありえないような低酸素状態が存在する。がんの由来組織や細胞の種類により多少の差はあるものの、がんの微細環境は、正常組織には存在しない異常な低酸素・低pH・低グルコースによって特徴づけられる。そのような領域にある細胞は、栄養や酸素が不足しているため、増殖を停止したり、解糖系代謝を行ったりして、周辺で活発に増殖している有酸素状態のがん細胞に比べると「死ぬべき運命にある弱ったがん細胞」である。しかしながら、この「死ぬべき運命にある弱ったがん細胞」が、実は固形腫瘍全体の悪性度を高めている極めて「悪質ながん細胞集団」であることが最近の研究からわかってきたのである。これらのがん細胞(低酸素がん細胞)は、がん治療に対して抵抗性である。血流にのって運ばれる抗がん剤は、血管から遠い低酸素がん細胞までは効率よく運ばれないため、低酸素がん細胞において有効な濃度に達する機会が少ない。また、多くの抗がん剤は、分裂している細胞を標的にしているため、増殖を停止している低酸素がん細胞では有効に作用しない。更に、酸素分子により細胞障害性が増強される放射線やある種の抗がん剤では、その治療効果が十分に発揮されない。従って、放射線や抗がん剤治療の後に、周辺の活発に分裂していたがん細胞が死滅しても、低酸素がん細胞は生き残る場合があり、治療不良・再発の原因となることが示唆されている^{2~4)}。

転写因子 HIF-1

低酸素がん細胞は、「瀕死状態」ではあるが、その劣悪な環境に適応しようと努力している。その努力の一翼を担っているのが低酸素応答転写因子として単離された HIF-1 である。通常の酸素濃度にある細胞内では活性が認められない HIF-1 は、低酸素条件下で速やかに活性化され、糖代謝や糖輸送に関与する遺伝子の発現を誘導したり、血管新生因子や増殖因子の産生を促したりして、栄養環境の改善を図る。アポトーシスの回避や、遺伝子変異を誘導する遺伝子の発現を誘導して、死を免れようとする。その一方で、転移や浸潤に関わる遺伝子の発現を誘導して、自ら新天地を切り開こうとする。このような一連の「生き残り」のための行動が、実はがん全体の悪性化に繋がっていたのである。HIF-1 によって直接発現が誘導される遺伝子の同

低酸素がん細胞 を可視化

図1 がんの微小環境。腫瘍内の低酸素領域にあるがん細胞(低酸素がん細胞)を緑色蛍光タンパク質(EGFP)を発現させて可視化した。低酸素がん細胞を背景にして黒く浮きでて見える腫瘍内の血管は、分布が不規則で、分岐や太さが不均一である。その血管から一定の距離を置いて低酸素がん細胞が局在しているのがわかる。

図 2 HIF-1 転写活性と HIF-1 α の酸素依存的分解機構。HIF-1 は、HIF-1 α と HIF-1 β の 2 つのサブユニットからなり、HIF-1 α タンパク質の安定性は酸素依存的に制御されている。低酸素細胞内では、HIF-1 は、標的遺伝子のプロモーター、エンハンサー領域にある低酸素応答配列 (HRE) に結合して低酸素依存的転写活性を誘導する。その結果、下図でしめしたようながんの悪性化や解糖系代謝にかかわる様々な遺伝子の発現が誘導される。一方、有酸素状態の細胞では、プロリン水酸化酵素 (PHD) により ODD ドメインのプロリン残基が水酸化され、それを目指してユビキチン付加酵素 E3 複合体が VHL を介して結合し、HIF-1 α のユビキチン化を誘導し、プロテアソームに運ばれて分解される。この酸素依存的分解は、非常に速やかで、有酸素状態の細胞内では、HIF-1 α は数分以内に分解される。

定が盛んに行われ、現在までに既に 60 以上が報告されている⁵⁾。これらの遺伝子は、プロモーター、エンハンサー領域に HIF-1 結合配列 hypoxia responsive element (HRE) を持っており、HIF-1 が p300/CBP とユニットを作って HRE に結合し転写を促す。

HIF-1 は、 $\alpha\beta$ の 2 つのサブユニットからなる (図 2)。 β サブユニット (HIF-1 β) は恒常的に発現しているが、 α サブユニット (HIF-1 α) の発現量は翻訳後修飾と翻訳レベルで厳密に制御されている^{5,6)}。従って HIF-1 の活性は HIF-1 β に結合できる HIF-1 α の発現量に依存している。HIF-1 α の翻訳後修飾による制御は、酸素依存的なプロリン水酸化酵素 (PDHs) により主になされている。転写活性制御は酸素依存的なアスパラギン酸水酸化酵素 (FIH) による抑制と、mitogen-activated protein kinase (MAPK) を介する活性化が

知られている。翻訳レベルの制御は酸素非依存的で、増殖因子等による phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) や MAP-K を介するシグナル伝達系の活性化が関与している。

酸素依存的タンパク質分解機構

我々は、HIF-1 α タンパク質の『低酸素環境で安定化し、通常の酸素環境下 (有酸素環境) で速やかに分解される』酸素依存的分解 (Oxygen-dependent degradation: ODD) 機構に着目した。この制御機構の詳細は 2001 年にプロリン水酸化酵素 (ヒトでは 3 種類 PHD 1~3) がクローニングされ⁷⁾、詳細な分子制御機構が解明されている⁸⁾。即ち、プロリン水酸化酵素が、HIF-1 α タンパク質の中央付近にある ODD ドメイン内のプロリン残基を水酸化し、これを目印にして結合するユビキチン連結酵素複合体 E3 により、HIF-1 α はユビキチン化されプロテオソームに運ばれて分解される (図 2)。このプロリン水酸化酵素が機能する際に、酸素を含んだ鉄分子を必要とすることが酸素依存性の本質であった。この ODD 制御は極めて厳密で、低酸素下で安定化した HIF-1 α は、有酸素にすると数分以内に分解される。この極めて厳密な ODD 制御機構を応用して、低酸素がん細胞特異的イメージング・ターゲティング材料の構築が始まった。

PTD-ODD 融合タンパク質の構築

任意のタンパク質の安定性を HIF-1 α 同様に、酸素濃度依存的に制御することができれば、任意のタンパク質の機能を酸素依存的に制御できる。すなわち、低酸素がん細胞を特異的にターゲティングしたり、イメージングしたりすることができることになる。これが、PTD-ODD 融合タンパク質を作ることになった動機である。最初に検証したのが、HIF-1 α の ODD ドメインを任意のタンパク質に融合させることで、『低酸素環境で安定化し、通常の酸素環境下 (有酸素環境) で速やかに分解される』融合タンパク質を作れるか否かであった。ODD ドメイン全体 (約 200 アミノ酸) を付加すると、全体の分子量がかなり大きくなるので、最小のアミノ酸配列を決定するために ODD ドメインを部分的に β -galactosidase に融合させ、 β -galactosidase 活性の酸素濃度依存性を調べた。その結果、少なくとも 18 個のアミノ酸があれば、任意のタンパク質の活性を ODD 制御できること、最適な ODD 制御のためには、約 50 個のアミノ酸配列からなる ODD ドメインが必要であることがわかった⁸⁾。

図 3 ODD 融合タンパク質の腫瘍内局在. PTD-ODD- β -galactosidase 融合タンパク質を担がんマウスの腹腔内に投与し、2 時間後に低酸素マーカーピモニダゾールも投与、4 時間後に腫瘍を摘出し、連続切片を β -galactosidase 抗体（左上）および低酸素マーカー検出抗体（右上）を用いて免疫染色した。染色パターンは似通っているものの、常に PTD-ODD 融合タンパク質が局在するところは、ピモニダゾールで確認される場所よりも幅広い。ピモニダゾールが 10 mmHg 以下という極めて低酸素で反応する化合物であり、PTD-ODD 融合タンパク質が、HIF-1 α とほぼ同様のタンパク質安定性制御を受けていることを考えると、ピモニダゾールで染色されている低酸素領域と HIF-1 が活性化する領域が必ずしも同一していないことを示唆している。実際に、多重染色すると（左下）、ピモニダゾールで染色されている低酸素領域よりも HIF-1 が活性化している領域がやや血管に近い領域である（左下）ことがわかる。

ODD 制御できるタンパク質が作れても、細胞内に導入できなければ、細胞内で行われる ODD 制御を受けることができない。そこで我々は、タンパク質に膜透過性を付加する膜透過ドメイン(PTD)を ODD 融合タンパク質に付加することにより、培養細胞を用いた実験でほぼ 100% の細胞にタンパク質を導入し、酸素依

存的に機能させることに成功した。しかもこの PTD は、マウスを用いた実験で、腹腔内に融合タンパク質を注射すると、脳を含む全身の組織細胞に融合タンパク質をデリバリーできることが報告されている⁹⁾。そこで我々は、PTD-ODD- β -galactosidase 融合タンパク質を構築し、それを腹腔内に投与し、この融合タン

パク質の体内分布と β -galactosidase 活性を調べた。その結果, ODD を付加していないタンパク質を投与した場合, 正常肝組織と腫瘍組織全体で, タンパク質と活性が確認できたのに対し, ODD を付加したタンパク質を投与した場合は, 正常組織ではタンパク質も活性も確認できず, 腫瘍組織でも一部でのみタンパク質と活性が確認できた。つまり, 正常組織や腫瘍の大部分は酸素が十分にある状態 (有酸素状態) にあり, 腫瘍の一部でのみ低酸素細胞が存在することを示唆していた。そのことを確認するために, 低酸素マーカーとして知られている化合物ピモニダゾール (pimonid-

azole) を用いて腫瘍切片を染色したところ, 低酸素マーカーと同一のところに, β -galactosidase タンパク質が存在していることがわかった (図3)。これらの結果は, 我々の設計通り, PTD-ODD 融合タンパク質は酸素濃度依存的制御を受け, 低酸素がん細胞特異的に分布・機能することを示しており, 低酸素がん細胞特異的イメージング・ターゲティングが可能であることを示している。

HIF-1 活性細胞と低酸素細胞

図3の免疫染色された部分を比較すると, PTD-ODD 融合タンパク質が分布している腫瘍内領域は,

図4 移植腫瘍内低酸素がん細胞のイメージング。A) 図2で述べた低酸素応答配列 HRE をもつプロモーターの下流に化学発光酵素ルシフェラーゼ (Luciferase) をつないだレポータープラスミド (5HRE-Luciferase) を安定に保持するヒトがん細胞を構築した。B) A のがん細胞株をヌードマウスに移植し, 腫瘍を形成した後, ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを投与し, 生体イメージング機器 (IVIS200) を用いて観察すると, 右下のような画像が得られる。この右足に見えるシグナルは, 低酸素がん細胞で発現しているルシフェラーゼからの発光であり, したがって, イメージは低酸素がん細胞を見ていることになる。このシステムを用いることにより, 腫瘍内の低酸素がん細胞が生きたまま, 何度でも経時的に観察することができる。

図 5 低酸素がん特異的抗がん蛋白製剤によるすい臓がん転移抑制。図 4A と同様のレポーター遺伝子を組み込んだヒトすい臓がん細胞株 SUIT-2 をヌードマウスの脾臓に同所移植すると、上パネルのように、脾臓から徐々に周囲、更に腹部全体にがんが広がり、腹水が溜まり死亡するという臨床に近いすい臓がんモデルにおいて、低酸素がん細胞のイメージを観察することができた。このモデルに低酸素特異的な抗がん蛋白製剤 POP33 を投与すると（下パネル）、低酸素がん細胞の転移が抑えられ、すい臓に局在し続けることが確認できた。

低酸素マーカー Pimonidazole で染色される領域より血管に近い方に広がっていることがわかる。この場合は、 β -galactosidase であるが、別のタンパク質が融合された場合も同様な結果が得られた。最近の報告では、HIF-1 α が分布する HIF-1 活性をもつ低酸素細胞は、還元酵素が機能する（すなわちイミダゾール化合物が還元反応を起こす 10 mmHg 以下のより低酸素な）領域は同一でないことがわかった¹⁰⁾。HIF-1 転写因子により発現する遺伝子群の機能が、がんの悪性化に大きく寄与していることから、『HIF-1 活性をもつ低酸素細胞』をイメージング・ターゲティングすることは意義がある。この『還元酵素が機能する領域』は、放射線増感剤等の研究で既にターゲティングの対象としては、長い歴史がある。この領域をターゲティングすることが、これまで放射線治療に期待されたほど大きな貢献をもたらすことができなかった理由は、ターゲティングが十分に行えていなかったのではなく、こ

の領域をターゲティングする『必要』はもちろんあるものの、放射線治療を補うには『十分』ではなかった可能性が高い。

低酸素がん細胞の光イメージングによる可視化

蛍光や化学発光を観察する方法は、細胞レベルから個体レベルに適応範囲が広がりつつある。上述した低酸素特異的転写因子 HIF-1 は、低酸素条件下で活性化されるので、その活性をモニターすることにより、腫瘍内の低酸素がん細胞を可視化することができる。具体的には、低酸素特異的転写因子 HIF-1 の結合塩基配列 (hypoxia responsive element; HRE) を含む低酸素応答プロモーターの制御下に蛍光タンパク質 GFP や、化学発光酵素ルシフェラーゼの遺伝子を繋いだレポーターベクターを構築し、これを安定に組み込んだがん細胞株を樹立する。この細胞を移植して形成した腫瘍の低酸素がん細胞では、低酸素応答プロモーターからのレポーター遺伝子の発現が誘導され、レポーター

ータンパク質の蓄積が起こる。我々は、HRE を 5 個タンデムに繋いだ配列を持つ低酸素応答プロモーター 5HRE の下流にルシフェラーゼを繋いだプラズミド p5HRE-luciferase を組み込んだヒトがん細胞を樹立した (図 4A)。これをヌードマウスに移植すると、形成した腫瘍内の低酸素環境に応答してルシフェラーゼタンパク質が発現され (図 4B) 基質であるルシフェリンを投与後一定期間、発光反応を起こす。この化学発光を、冷却高感度 CCD カメラを搭載したイメージング機器 *in vivo* imaging system (IVIS) を用いて可視化することができる (図 4B)。つまり、このシステムを用いることにより、同一担がんマウスの固形腫瘍内低酸素領域の変化を定量的に、リアルタイムで、何でも経時的に観察することが可能である¹¹⁾。しかも発光シグナルを定量することにより、低酸素がん細胞の増減を数量化して推移を観察することができる。たとえば、ヒト由来のすい臓がん細胞 SUIT-2 に 5HRE-Luciferase レポーター遺伝子を組み込んだ SUIT-2/5HRE 細胞を構築し、膵臓に同所移植すると、移植後 7 週間までに、移植されたマウスは腹膜播腫と腹水を伴って 100% 死亡する。その間、膵臓に移植したがん細胞が増殖し、転移し、腹部に広がっていく様子が、経時的に観察できる (図 5)。

低酸素がん細胞のターゲティング

低酸素がん細胞を特異的に殺すため、ODD に融合するタンパク質として、強力なアポトーシス誘導能を有する caspase-3 の前駆体 procaspase-3 を選択した。Procaspase-3 は、過剰発現しても細胞死を誘導することはないが、上流のカスベース等により切断されて活性型になると、死刑執行人と称されるほど、強力に細胞死を誘導する。従って、たとえ ODD-procaspase-3 融合タンパク質が、正常細胞内で安定化するようなことがあっても、安定化しただけでは、細胞死は誘導されない。上述したように、低酸素がん細胞は、「死ぬべき運命にある弱ったがん細胞」であり、低いレベルではあるが、アポトーシスを引き起こすシグナルが活性化されている。従って、低酸素がん細胞で安定化した ODD-procaspase-3 は、切断されて活性型の Caspase-3 となり、アポトーシスシグナルを増強する (図 5)。低酸素依存的な融合タンパク質の安定化とアポトーシス誘導は培養細胞を用いた *in vitro* 実験と移植腫瘍内で確認することができた^{8,11~15)}。前述した PTD は、単に血流によって受動的に運ばれるだけではなく、濃度

図 6 PTD-ODD プロジェクト。PTD-ODD 融合タンパク質は、機能ドメインに付加した機能を低酸素環境にある細胞で発揮し、有酸素環境にある細胞では機能しない。現在進めているプロジェクトでは、イメージング機能を付加して低酸素環境にある細胞を可視化する診断薬開発 (左)、細胞死誘導機能を付加してがんの微小環境にあるがん細胞を特異的に死滅させる抗がん剤開発 (中央)、および細胞死抑制機能を付加して虚血性疾患の治療を行う虚血性疾患治療薬開発 (右) の 3 つがある。いずれも動物実験では、有効な結果を得ており、現在臨床応用にむけての開発を進めている。

勾配を利用して自ら分散する能力を融合タンパク質に付加するため、ODD-procaspase-3 融合タンパク質を血流の悪い腫瘍内低酸素領域までデリバリーさせることができる。我々は、最近 TATPTD よりも約 5 倍膜透過性が高い PTD アミノ酸配列を用いて、タンパク質製剤 POP33 (PTD3-ODD-Procaspase-3) を構築した。上述した同所移植すい臓がんモデルで、POP33 の治療実験を行ったところ、POP33 投与群では、低酸素がん細胞の腹部への拡大が有意に抑えられ、有意な延命効果をもたらすことがわかった。また、電極型酸素分圧測定器を用いて、腹腔内の酸素分圧を測定したところ、イメージの腹部への広がりにつれて、酸素分圧が低下することが確かめられた。

おわりに

HIF-1 活性を持つ低酸素がん細胞をイメージング・ターゲティングすることは、腫瘍の悪性化をいち早く見つけ、治療するということを意味している。HIF-1 の活性を抑えることは重要であり、現在多くの HIF-1 活性抑制剤が開発されている。しかし、HIF-1 活性抑

制剤が、HIF-1 活性を抑えても HIF-1 が活性化される環境はそのままである。たとえば、低酸素は低酸素のまま残されており、依然として放射線や抗がん剤に抵抗性である。我々は、環境標的により、がん細胞を悪性化しているがんの微小環境そのものを根こそぎ除く治療を実現するためのターゲティング研究を進めている。現在 PTD-ODD 融合タンパク質を用いたプロジェクト (図 6) は、1) 上記の低酸素がん細胞をターゲットとした抗がん剤開発の他に、2) 低酸素イメージング用プローブ開発、3) 虚血性疾患における低酸素細胞の細胞死抑制剤開発を行っている。PTD-ODD 融合タンパク質を用いたイメージングのためのプローブ開発は、臨床応用を目指して、現在光イメージングでプローブの特異性や体内動態評価を行っている。このプロジェクトの対象疾患は、がん、心筋梗塞、脳梗塞といった日本の三大疾患を含んでおり、患者数は今後も増えていくことが予想される。一日も早く臨床に応用できる診断薬・治療薬を開発することで、治療に貢献したい。

文 献

- 1) Fearon, ER. and Vogelstein BA genetic Model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; **61**, 759-767.
- 2) Thomlinson, RH. and Gray, L.H. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 1955; **9**: 539-549.
- 3) Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 38-47.
- 4) Brown JM and Wilson WR. Exploiting tumor hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**: 437-447.
- 5) Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 721-732.
- 6) Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 5447-5454.
- 7) Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzzen E, Wilson MI, Dhanda A, et al. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001; **107**: 43-54.
- 8) Harada H, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S. Antitumor effect of TAT-oxygen-dependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells. *Cancer Res* 2002; **62**: 2013-2018.
- 9) Schwarze, SR, Ho, A, Vocero-Akbani, A and Dowdy, S.F. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 1999; **285**: 1569-1572.
- 10) Sobhanifar S, Aquino-Parsons C, Stanbridge EJ, Olive P. Reduced expression of hypoxia-inducible factor-1 α in perinecrotic regions of solid tumors. *Cancer Res* 2005; **65**: 7259-7266.
- 11) Harada H, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M. Optical imaging of tumor hypoxia and evaluation of efficacy of a hypoxia-targeting drug in living animals. *Mol Imaging* 2005; **4**: 182-193.
- 12) Kizaka-Kondoh S, Inoue M, Harada H, Hiraoka M. Tumor hypoxia: A target for selective cancer therapy. *Cancer Sci* 2003; **94**: 1021-1028.
- 13) Inoue M, Mukai M, Hamanaka Y, Tatsuta M, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S. Targeting hypoxic cancer cells with a protein prodrug is effective in experimental malignant ascites. *Int J Oncol* 2004; **25**: 713-720.
- 14) Harada H, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M. Antitumor protein therapy; application of the protein transduction domain to the development of a protein drug for cancer treatment. *Breast Cancer* 2006; **13**: 16-26.
- 15) Harada H, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M. Mechanism of hypoxia-specific cytotoxicity of procaspase-3 fused with a VHL-mediated protein destruction motif of HIF-1 α containing Pro564. *FEBS Lett* 2006; **580**: 5718-5722.