

## 簡便に調製可能な分子標的気泡を用いた超音波分子イメージングの開発 —臨床用超音波造影剤の適応拡大の可能性の検討—

研究代表者 大谷 健太郎 独立行政法人国立循環器病研究センター 再生医療部 研究員

### 研究要旨

超音波分子イメージングは、抗原抗体反応等を利用して超音波造影剤である微小気泡を生体内分子に特異的に集積させ、それを画像化する事で炎症性血管病変・動脈硬化巣・新生血管等を非侵襲的に評価する方法として近年注目されている。先般、我々は肝腫瘍性及び乳房腫瘍性病変の診断目的で既に臨床使用されている超音波造影剤Sonazoidと、アポトーシス細胞の貪食に関わる生体内タンパクであるLactadherinとの複合体(Sonazoid-Lactadherin複合体)が、新生血管及び新鮮血栓に特異的に集積する気泡(分子標的気泡)になり得る可能性を見出した。本研究の目的は、Sonazoid-Lactadherin複合体の分子標的気泡としての実現可能性について、*in vitro*実験および担癌モデルマウス・頸動脈血栓モデルマウスを用いた*in vivo*実験により総合的に評価することである。これまでに、担癌モデルマウスにおけるSonazoid-Lactadherin複合体を用いた超音波分子イメージングの実験系の確立と、頸動脈血栓モデルマウスの確立および超音波分子イメージングの施行可能性の検証を終了した。今後、本事業により確立したこれらの実験系を駆使して、Sonazoid-Lactadherin複合体を用いた新生血管及び新鮮血栓に対する超音波分子イメージングの開発を進めて行く予定である。

### A. 研究目的

造影超音波法は、微小気泡を造影剤として用いる非侵襲的かつベッドサイドで施行可能な造影検査法である。使用する微小気泡は直径が数 $\mu\text{m}$ であり、肺の毛細血管をも通過可能であるため、静脈内への微小気泡の投与により、基本的に全身の血流の評価が可能となる。

静脈内投与された微小気泡は、内包ガスが呼気中へ排泄されるまでの間、血管内を血流に乗って漂い続ける。しかし近年、微

小気泡の表面に生体内抗原に特異的な抗体やペプチド、タンパクを結合させ、生体内の特定の部位に気泡を集積させることにより(分子標的気泡)、炎症性血管病変・新生血管・動脈硬化巣などを標的とした造影超音波法による分子イメージングの開発が試みられている。

微小気泡は超音波造影剤として使用されているが、実は超音波照射に対して非常に脆弱であり、高出力超音波の照射により容易に崩壊することが知られている。超音

波照射によって微小気泡が崩壊すると、マイクロジェット流(物理エネルギー)が発生し、微小気泡の近傍に細胞が存在した場合には、その細胞膜に一時的に可逆的な穴を生じさせることが知られている。近年、この現象を利用して細胞内へ核酸や薬剤を導入する、超音波と微小気泡を併用した細胞内への遺伝子・薬剤導入法が確立されつつある。

また一方、薬剤や核酸を内包、あるいは微小気泡の殻(表面)に薬剤や核酸分子を付与した薬剤・核酸搭載型微小気泡の開発といった、微小気泡を薬剤・遺伝子のキャリア(運び屋)として利用しようとする試みもなされている。

近い将来、これらの方法を統合的に組み合わせることで、体内の特定部位に薬剤・核酸搭載型微小気泡を集積させ、超音波照射により局所選択的に微小気泡を破壊し、薬剤や核酸分子を放出・細胞内導入するといった、今までにない全く新しい Drug Delivery System や Gene Delivery System の開発へとつながる可能性がある。

我々はこれまで、本邦で臨床使用可能な超音波造影剤 Sonazoid を基盤とした、分子標的気泡の作製の可能性について検討してきた (Mol Imaging Biol 2011, Ultrasound Imaging-Medical Applications 2011)。また近年、Sonazoid と生体内タンパク MFG-E8 (Lactadherin)を利用することで、インテグリン $\alpha_v\beta_3$  や GPIIb/IIIa を標的とする分子標的気泡の作製の可能性を見出した。

本研究の目的は、Sonazoid-Lactadherin 複合体の分子標的気泡としての実現可能性について in vitro 及び in vivo 実験系を用いて検討すること、Sonazoid-Lactadherin

複合体のより簡便な作製法を開発することである。

## B. 研究方法

### 腫瘍血管に対する分子標的性の検討

Sonazoid-Lactadherin 複合体の標的分子であるインテグリン $\alpha_v\beta_3$  は血管新生において重要な因子であり、腫瘍血管などでその発現が認められる。そこで、Sonazoid-Lactadherin 複合体の新生血管に対する分子標的性を担癌モデルマウスを用いて評価した。最初に、超音波分子イメージングを施行する至適時期を決定するため、腫瘍サイズ及び病理組織像の経時的観察を行った。担癌モデルマウスは北山ラベス株式会社に委託して作成した。4週齢の雌性ヌードマウスの右腹部皮下に、ヒト卵巣線種細胞(SK-OV-3)を  $5.0 \times 10^6$  個移植し、腫瘍径を細胞移植後 7(Day7)、10(Day10)、14日目(Day14)に計測するとともに、Day14に腫瘍組織を摘出し、組織切片を作成した。腫瘍体積は以下の計算式により算出した。

$$\text{体積}(\text{mm}^3) = (\pi/6) \times \text{短径}^2 \times \text{長径}$$

腫瘍組織内の新生血管を、抗マウス CD31抗体を用いた免疫染色で評価した。

次に、Day7に造影超音波法にて評価を行った。頸静脈に留置したカテーテルより Sonazoid ( $1.2 \times 10^6$  bubbles)および Sonazoid-Lactadherin 複合体を投与した。造影剤投与後 10分後に超音波装置 Aplio(東芝社)の 1202S プローブを用いて撮像を行った。音圧は Mechanical index 0.4 (AP 9%)とし、視野深度は 1cm、焦点位置は腫瘍組織よりも深部とした。

Sonazoid-Lactadherin 複合体は、既報の

方法と同様に、Sonazoid ( $1.2 \times 10^8$  bubbles, 100 $\mu$ L)と Lactadherin 5 $\mu$ g (100 $\mu$ L)を室温で 15 分反応させて作製した。その後、蒸留水を用いての洗浄と遠心分離操作によって未反応の Lactadherin を除去した。

### 新鮮血栓に対する分子標的性の検討

Sonazoid-Lactadherin 複合体の標的分子である糖タンパク GPIIb/IIIa は血栓形成において重要な因子であり、RGD ペプチドを用いた血栓の分子イメージングの標的分子として近年注目されている。そこで、Sonazoid-Lactadherin 複合体の新鮮血栓に対する分子標的性について、ヒトおよびマウス血餅を用いた *in vitro* 実験と頸動脈血栓モデルマウスを用いて評価した。

はじめに、ヒト血液を用いて血餅作製の至適条件を検討し、作製したヒト血餅における GPIIb/IIIa の発現を免疫染色により評価した。ヒト血液を凝固促進用シリカ微粒子が添加された採血管に入れ、37℃ で 2 時間凝固させた。その後切片を作成し、抗 CD41 抗体を用いて免疫染色を行った。マウス血餅も同様の方法で作製した。

頸動脈血栓モデルは、ペントバルビタールナトリウムにて麻酔したマウスの右頸動脈を剥離し、その下にパラフィルム及びろ紙を潜らせた後、ろ紙に 6%塩化鉄(III)溶液を 4 $\mu$ L 染み込ませ、3 分間反応させた。ろ紙を回収後、頸動脈を生理食塩水で洗浄し、30 分後に頸動脈を摘出した。

次に、担癌モデルマウスと同様に、頸動脈血栓モデルマウスにおいても超音波分子イメージングが施行可能なことを確認するため、マウス頸動脈血流を造影超音波により観察し得るか否か検討を行った。右

大腿静脈に挿入したカテーテルから Sonazoid を静脈内投与し、マウス頸動脈が鮮明に描出されるか否かについて、超音波装置 Aplio の 1202S プロブを用いて検討した。音圧は AP 9%、視野深度は 1cm、焦点位置は頸動脈のやや深部に設定した。

### Sonazoid-Lactadherin の結合特異性の検討

今後、Sonazoid-Lactadherin 複合体の簡便な作製法を開発するには、Sonazoid と Lactadherin の結合が真に特異的か否かを検証しておく必要がある。そこで、Lactadherin と分子量および等電点が近い Angiopoietin-like protein 5 (ANGPTL5)を用い(表 1)、Sonazoid と Lactadherin の結合特異性について検討を行った。

表 1. Lactadherin と ANGPTL5 の比較

	Lactadherin	ANGPTL5
分子量	41.6kDa	42.3kDa
等電点	6.7	6.7

Lactadherin および ANGPTL5 を R-Phycoerythrin Labeling Kit (LK23, 同仁化学)を用いて蛍光標識した後、Sonazoid と室温で 15 分反応させた。十分に洗浄・遠心分離した後、Sonazoid を FACSCalibur (BD Biosciences)にて解析し、Sonazoid と Lactadherin あるいは ANGPTL5 との結合について評価を行った。

### 簡便な作製法の実現に向けた Lactadherin 定量法の確立

通常、分子標的気泡の調製には洗浄と遠心分離の操作が必須である。しかし、今

後混合するだけで Sonazoid-Lactadherin 複合体の作製を目指すには、溶液中の Lactadherin 濃度を正確に検出する測定系を確立する必要がある。そこで、Human MFG-E8 Quantikine ELISA Kit (DFGE80, R&D Systems)を用い、本研究で使用している Recombinant Human MFG-E8 (Lactadherin, 2767-MF, R&D Systems)の測定および、Sonazoid-Lactadherin 複合体中の Lactadherin 濃度について検討を行った。

#### 【倫理面への配慮】

本研究では、分子標的気泡を用いた超音波分子イメージングの医学的有用性及び生物学的安全性について、病態モデルマウスを用いた動物実験により評価する。そのため、実験動物に対する倫理的配慮として、動物実験は国立循環器病研究センターの動物実験指針を遵守し施行した。また、動物愛護上の配慮として、モデル作成・病態評価の際に極力苦痛を与えないように努めた。

### C. 研究結果

#### 腫瘍血管に対する分子標的性の検討

実験に用いた全てのヌードマウスにおいて、腹部に SK-OV-3 細胞由来の腫瘍の形成が認められた(図 1A)。また、腫瘍体積は Day7 から Day14 にかけて、次第に縮小していくことが明らかとなった (Day7:  $168.5 \pm 21.1 \text{ mm}^3$  vs. Day10:  $101.3 \pm 14.8 \text{ mm}^3$  vs. Day14:  $58.3 \pm 6.6 \text{ mm}^3$ ) (図 1B)。

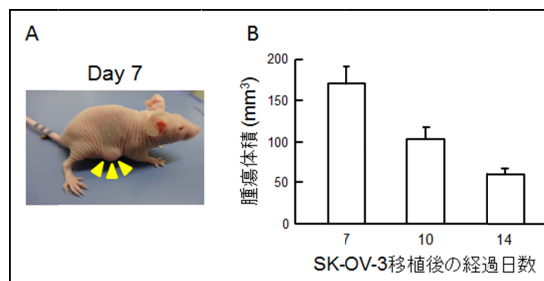


図 1. 腫瘍の外観と腫瘍体積の経時変化

腫瘍内の新生血管について抗 CD31 抗体を用いた免疫染色で検討したところ、SK-OV-3 細胞移植 7 日後及び 14 日後において、数多くの CD31 陽性の血管が形成されていることが明らかとなった(図 2)。

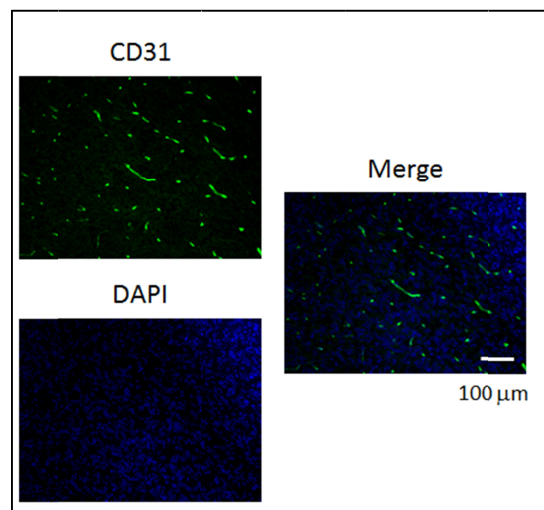


図 2. 腫瘍組織内の新生血管の評価 (Day14 での検討)

Day7 の担癌モデルマウスに対し、Sonazoid-Lactadherin 複合体にて癌新生血管の分子イメージングが可能か否かについて検討した。Sonazoid-Lactadherin 複合体投与直後は良好な腫瘍の造影像が認められた(図 3 中央)。ところが、造影剤投与 10 分後に再度撮像を行ったところ、腫瘍内の染影はほぼ消失してしまっており、腫瘍内に Sonazoid-Lactadherin 複合体の滞留はほ

とんど認められなかった(図3右)。

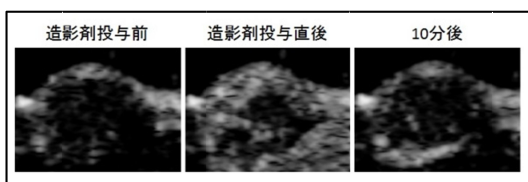


図3. Sonazoid-Lactadherin 複合体を用いた腫瘍血管に対する分子イメージングの検討

#### 新鮮血栓に対する分子標的性の検討

免疫染色の結果、ヒト血液から作製した血餅には GPIIb/IIIa が多く発現していることが明らかとなった(図4)。

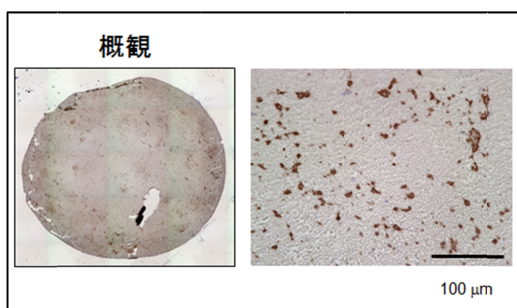


図4. ヒト血餅における GPIIb/IIIa の発現

次に、マウス血餅における GPIIb/IIIa の発現を免疫染色で検討したところ、非特異的信号が少なく、かつヒト血餅の結果(図4)と近い発現パターンが認められた(図5左図)。次に塩化鉄(III)塗布により惹起したマウス頸動脈血栓を同様に染色したところ、血栓において一様な GPIIb/IIIa の発現が認められた(図5右図)。

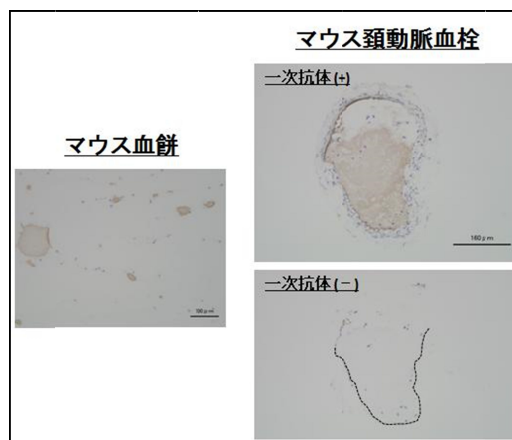


図5. マウス血餅および頸動脈血栓における CD41(GPIIb/IIIa)の発現

次に、造影超音波法をマウス頸動脈にも適応可能か否か検討したところ、Sonazoid 投与によって明瞭に筋状の染影像が描出されることを確認した(図6右図)。また、Sonazoid による造影中に頸動脈にかけた手術糸を牽引することで、筋状の染影像が移動したことから、観察された染影像が頸動脈由来のものであることが確認できた(データ未掲載)。

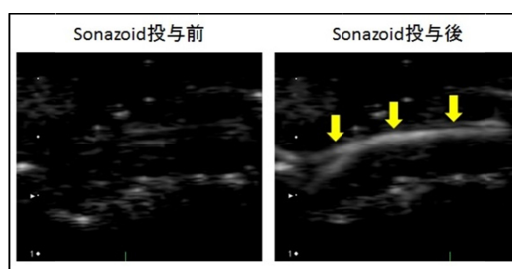


図6. マウス頸動脈の超音波造影像

#### Sonazoid-Lactadherin の結合特異性の検討

Sonazoid と蛍光標識した Lactadherin あるいは ANGPTL5 とを混合し、FACS により評価したところ、Lactadherin と混合した場合には Sonazoid からの蛍光強度が顕著に増加することが確認できた(図7)。一方、

ANGPTL5 と混合した場合には、蛍光色素とのみ混合した場合と同等の蛍光強度の増加しか認められなかった(図 7)。このことから、Sonazoid と Lactadherin との結合は特異的であることが示唆された。

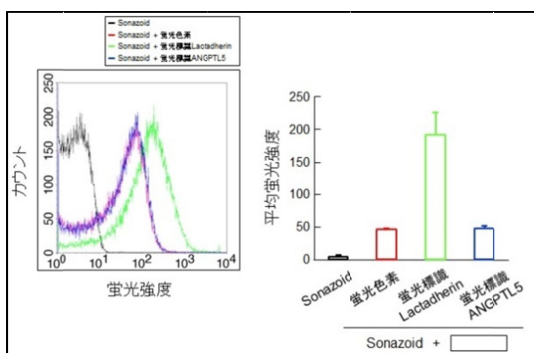


図 7. Sonazoid との結合特異性の検討

#### 簡便な分子標的作製法の実現に向けた

#### Lactadherin 定量法の確立

最初に、従来法で Sonazoid-Lactadherin 複合体を作製した場合の、最終的な Bubble 溶液内の Lactadherin 濃度を計算により推定し、その濃度の Recombinant Human MFG-E8 が MFG-E8 Quantikine ELISA Kit の測定レンジ内で測定可能か否か検討した。計算で算出した Bubble 溶液内の Lactadherin 濃度は数  $\mu\text{g/mL}$  となり、MFG-E8 Quantikine ELISA Kit の測定レンジ(62.5 ~ 4000pg/mL)に比べて非常に高濃度であることが判明した。そこで、1ng/mL (= 1000 pg/mL)の Recombinant Human MFG-E8 を準備し、MFG-E8 Quantikine ELISA Kit で測定を行ったところ、25pg/mL と測定レンジ外の値を示した。その後検討を重ねたところ、MFG-E8 Quantikine ELISA Kit では実際の Recombinant Human MFG-E8 濃度の 1/40 ~ 1/20 の値が算出されることが明らかと

なった。このことから、MFG-E8 Quantikine ELISA Kit において 1ng/mL 付近での測定を想定した場合、Sonazoid-Lactadherin 複合体溶液(通常は  $7 \sim 9 \times 10^7$  bubbles/mL、2.5 $\mu\text{g/mL}$  程度と予想)から 20 ~ 40ng/mL の測定液を準備するには、約 60 ~ 100 倍希釈 ( $10^5 \sim 10^6$  bubbles/mL オーダー)に希釈する必要があると考えられた。そこで、実際に Sonazoid-Lactadherin 複合体から  $5 \times 10^5$  bubbles/mL、 $1 \times 10^6$  bubbles/mL、 $2 \times 10^6$  bubbles/mL、 $5 \times 10^6$  bubbles/mL のサンプルを作成し、MFG-E8 Quantikine ELISA Kit にて測定を行ったところ、 $5 \times 10^5$  bubbles/mL ~  $1 \times 10^6$  bubbles/mL の Sonazoid-Lactadherin を用いることで、測定レンジ内での定量が可能であることが明らかとなった。

#### D. 考察

本研究により、Sonazoid-Lactadherin 複合体の新生血管及び新鮮血栓に対する分子標的性を検証するためのモデルマウス(担癌モデル、頸動脈血栓モデル)の確立、およびそれぞれのモデルマウスにおける超音波分子イメージングの施行可能性の検証を行うことができた。また、Sonazoid-Lactadherin 複合体の簡便な作製法の開発に必要な、溶液中の Lactadherin 濃度の定量法の確立および Sonazoid と Lactadherin の結合特異性についても明らかにすることができた。

一方で、今後研究を進めて行く上で克服すべき課題も発見することができた。担癌モデルマウスにて Sonazoid-Lactadherin 複合体の分子標的性について検討を行ったが、先般発表した洗浄・遠心分離操作を

伴う従来の作製法で得られた Sonazoid-Lactadherin では、癌新生血管に対する分子標的性を見出すことはできなかった。その理由としては、Sonazoid の気泡密度(気泡数)の低下が大きく関係していると推察される。通常、Sonazoid は蒸留水で溶解後、2 時間以内に使用するよう決められている。これは、溶解後に Sonazoid の気泡数が経時的に減少していくためである(しかし、気泡数が低下しても、同数の気泡で比較した場合は Sonazoid の造影能にそれほど影響はない)。洗浄・遠心分離操作を伴う方法で Sonazoid-Lactadherin 複合体を作製した場合、少なくとも溶解後 1 時間は必要となる。この時点で Sonazoid-Lactadherin 複合体溶液の気泡密度を定量し、マウスへの投与量を決定するが、実際にマウスに投与するまでにさらに数時間を要するため、マウスに投与した気泡数が想定よりもかなり少ない可能性が否定できない。この問題を克服するには、マウスに投与する直前に Sonazoid と Lactadherin を混合し、複合体形成後速やかに投与するという実験系の確立が重要であり、そのためには洗浄・遠心分離操作の不要な Sonazoid-Lactadherin 複合体作製法の開発が必要である。その点において、本研究にて Sonazoid-Lactadherin 複合体溶液内の Lactadherin 濃度を定量評価する実験系を確立できたことは非常に大きな意味があると考えている。

本研究において、マウス腫瘍組織と同様に、マウス頸動脈においても、造影超音波法が施行可能なことが一応は確認できた。しかし、超音波分子イメージングでは、造影超音波法で使用する気泡数よりも桁違いに少ない気泡数を検出する必要がある。

そのため、現在我々が用いている超音波装置が、直径 100 $\mu$ m 程度の細い頸動脈内の血栓へ付着した極微量の気泡を検出する感度および空間分解能を有するか否かについて、今後さらに検証を行う必要があると思われる。

## E. 結論

本研究により、Sonazoid-Lactadherin 複合体の新生血管および新鮮血栓に対する分子標的性を評価する、多くの *in vitro* および *in vivo* 実験評価系(担癌モデルマウス・頸動脈血栓モデルマウス)を確立することができた。今後、これらの実験評価系を駆使し、Sonazoid-Lactadherin 複合体を用いた非侵襲的かつ定量性の高い、臨床応用可能な超音波分子イメージングの開発へと発展させたいと考えている。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Otani K, Yamahara K. Feasibility of lactadherin-bearing clinically available microbubbles as ultrasound contrast agent for angiogenesis. **Mol Imaging Biol** 2013;15(5):534-541.

## 2. 学会発表

### 【シンポジウム】

大谷健太郎. 「Sonazoid を基盤とした分子標的気泡作成法の開発とその特性評価」. 日本超音波医学会第 40 回関西地方会. 大阪, 2013 年 11 月.

### 【学会・研究会発表】

Otani K. 「Development of integrin  $\alpha v\beta 3$ -targeted microbubbles based on clinically available ultrasound contrast agent」. The 19th European Symposium on Ultrasound Contrast Imaging. Rotterdam, 2014 年 1 月.

Otani K. 「Development of molecular targeted-bubbles based on Sonazoid」. The 6th Asian Conference on Ultrasound Contrast Imaging. 横浜, 2014 年 5 月.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし。

### 2. 実用新案登録

該当なし。

### 3. その他

研究協力者 なし