

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

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

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 大谷 健太郎

平成26(2014)年 3月

## 目 次

I.	総括研究報告	
	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	----- 1
	大谷健太郎	
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	----- 6
III.	研究成果の刊行物・別刷	----- 7

## 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、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(分子標的気泡)、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。本年度は、肝腫瘤性及び乳房腫瘤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対する分子標的気泡となり得るか否かを評価するための基礎検討として、担癌モデルマウス及び頸動脈血栓モデルマウスの作成と、その病態評価系の確立を目的に検討を行った。ヌードマウスにヒト卵巣腺腫細胞(SK-OV-3)を皮下移植することにより、造影超音波法が施行可能な大きさの腫瘍を安定的に得ることが可能であり、また造影超音波法により明瞭な微小循環造影像を得ることができた。また、作成した腫瘍組織内には、Sonazoid-Lactadherin複合体の標的分子である新生血管が豊富に含まれていた。一方、塩化鉄(III)塗布による頸動脈血栓モデルはマウスにおいても作成可能であり、頸動脈血栓に標的分子であるGPIIb/IIIaが発現していることも併せて確認した。次年度以降は、本年度の結果を基にして、Sonazoid-Lactadherin複合体の医学的有用性について検討を行う予定である。

### A. 研究目的

近年、超音波造影剤である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。

その一方、超音波照射により微小気泡

が崩壊する際に発せられるマイクロジェット(物理エネルギー)を利用し、微小気泡の近傍に存在する細胞膜に一時的に穴を生じさせ、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、それらと並行して、薬剤を内包した微小気泡や、気泡殻に薬剤や核酸分子を付与した微小気泡の開発も進められている。

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内包・核酸修飾気泡を集積させ、超音波照射で局所選択的に微小気泡を破壊し、内包された薬剤の局所放出あるいは核酸分子を細胞内に導入するといった、今までにない全く新しい Drug Delivery System や Gene Delivery System の開発が行われる可能性がある。

我々はこれまでに、本邦で臨床使用可能な超音波造影剤 Sonazoid から分子標的気泡が作成可能であることを報告してきた (Mol Imaging Biol 2011, Ultrasound Imaging-Medical Applications 2011)。先般、生体内タンパク MFG-E8 (Lactadherin) と Sonazoid の混合することで、表面に RGD 配列を有する分子標的気泡が作成可能であることを見出した。RGD 配列は、細胞表面タンパク質であるインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  や種々の糖タンパクと特異的に結合するため、Sonazoid-Lactadherin 複合体は(癌および血管新生療法による)血管新生及び血栓に対する分子標的気泡となり得る可能性を有していると考えられる。

本研究の目的は、Sonazoid-Lactadherin 複合体が腫瘍血管及び新鮮血栓に対する分子標的気泡として有用か否かについて、in vitro 及び in vivo の実験系を用いて評価することである。

## B. 研究方法

### 腫瘍血管に対する分子標的性の検討

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、腫瘍血管などの新生血管で発現が認められる。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する。本年度は、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  $5.0 \times 10^6$  個移植した。腫瘍径を SK-OV-3 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。腫瘍体積は次の計算式により算出した。

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

腫瘍組織内の新生血管数を、抗マウス CD31 抗体を用いた免疫染色で評価した。

また予備的検討として、Day7 において腫瘍組織内の微小循環が造影超音波法にて評価可能か否かについて検討を行った。頸静脈よりカテーテルを挿入し、Sonazoid ( $1.2 \times 10^6$  bubbles)を投与した。超音波装置は東芝製 Aplio を用い、1202S プロープにて撮像を行った。音圧は Mechanical index 0.4 (AP 9%)とし、焦点位置は腫瘍組織よりも深部に設定した。

### 新鮮血栓に対する分子標的性の検討

糖タンパク GPIIb/IIIa は血栓形成において重要な因子であり、近年 RGD ペプチドを用いた血栓の分子イメージングの標的として注目されている。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、ヒト及びマウス血液から作製した血餅を用いた in vitro の実験系にて検討を行う。本年度は、血餅作成の至適条件の検討と、作製したヒト血餅におけ

る糖タンパク GPIIb/IIIa(CD41)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、室温で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。

また予備的検討として、ラットの頸動脈血栓モデルの作成を試みた。ペントバルビタールにて麻酔後、仰臥位に固定し、頸動脈を剥離した。頸動脈の下にパラフィルム及びろ紙を潜らせた。ろ紙に40%塩化鉄(III)溶液を10 $\mu$ L染み込ませ、15分間放置した。その後、灌流固定し、頸動脈を摘出・組織切片を作成した。頸動脈内血栓をH&E染色により組織学的に評価した。

次に、マウスにおける予備的検討も行った。剥離した頸動脈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染み込ませた。3分間反応させた後、ろ紙を回収し、5、10、15分後に灌流し、頸動脈を摘出・組織切片を作成した。血栓内のCD41の発現を免疫染色により評価した。

#### 【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 mm<sup>3</sup> vs. Day10: 101.3 $\pm$ 14.8 mm<sup>3</sup> vs. Day14: 58.3 $\pm$ 6.6 mm<sup>3</sup>) (図1B)。

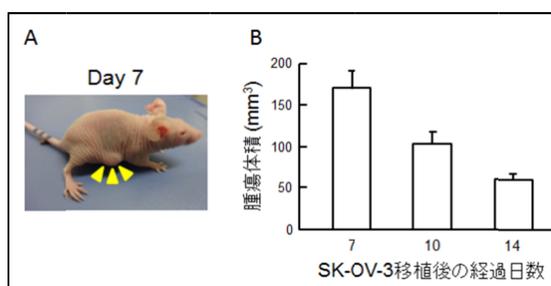


図1. 腫瘍の外観と腫瘍体積の経時変化

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)。

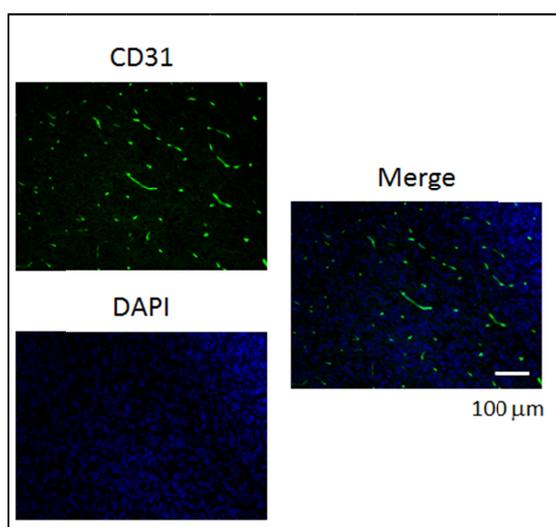


図2. 腫瘍組織内の新生血管の評価 (Day14での検討)

Sonazoid を用いた造影超音波法により、SK-OV-3 細胞移植 7 日後の腫瘍組織において、癌微小循環を非侵襲的に評価することが可能であった(図 3)。

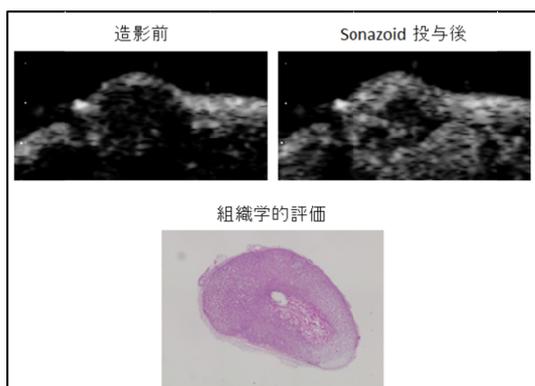


図 3. 造影超音波法による癌微小循環の評価

#### 新鮮血栓に対する分子標的性の検討

免疫染色の結果、ヒト血液から作成した血餅に CD41 が多く発現していることが明らかとなった(図 4)。また、血液を室温よりも 37 で凝固させることで、より強固な血餅が作成可能であることが明らかとなった(データ未掲載)。

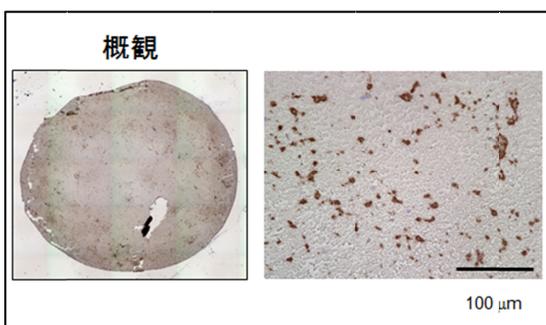


図 4. ヒト血餅における GPIIb/IIIa の発現

ラット頸動脈に塩化鉄(III)を 15 分間反応させることにより、ほぼ血流を途絶させるほどに巨大な血栓を作製することが可能であった(データ未掲載)。また、塩化鉄(III)に

よる血栓モデルはマウスにも応用可能であり、マウスでは塩化鉄(III)との反応後 15 分の時点において、ほぼ血流を途絶するほどの大きな血栓が作製可能であった(図 5A)。また、作製された血栓において GPIIb/IIIa(CD41)の発現を免疫染色により確認することができた(図 5B)。

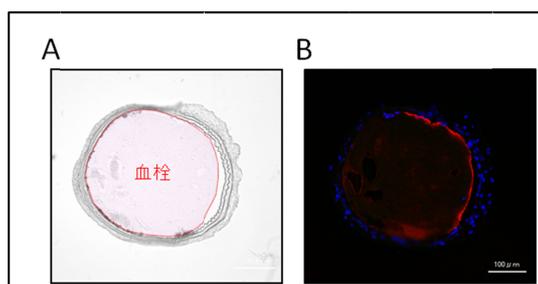


図 5. マウス頸動脈血栓モデルの作製

#### D. 考察

本年後の研究の結果、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実験動物モデルを確立することができた。また、担癌モデルマウスにおいては、造影超音波法で癌微小循環の可視化が可能であることも同時に確認できた。分子標的気泡を用いた超音波分子イメージングでは、標的分子と気泡とが反応する時間が必要であることから、気泡投与後しばらく経ってから撮像を開始する事が一般的である。理想的には、この撮像開始時に標的分子に結合しなかった気泡は血液中に残存していないことが望ましい。しかし、標的分子への気泡の集積率を向上させるためには、多くの分子標的気泡を投与することが必要となり、この際には標的分子に結合しなかった気泡の存在が問題となってくる。本年度の基礎検討では、若干多めの  $1.2 \times 10^6$  bubbles の Sonazoid を投与することで癌微小循環の可視化が可能

であった。Sonazoid 投与 10 分後の超音波画像を同時に評価したところ、この時点では腫瘍内にほとんど気泡の残存を認めなかったことから、腫瘍血管に対する Sonazoid-Lactadherin 複合体の分子標的性の検討には、 $10^6$  オーダーの気泡量でも十分評価可能だと思われる。

担癌モデルマウスにおいては、造影超音波法が問題なく施行できたが、頸動脈血栓モデルマウスでも同様に造影超音波法が施行できるか否かについては検証が必要である。マウス頸動脈は外径が 1mm 程度と細いため、高周波数の超音波での映像化が必須である。しかし、周波数が高くなると、気泡の共振周波数との乖離が大きくなるため、十分な造影効果が得られない可能性がある。他方、造影超音波法に有利な低周波数で画像化を行うと、十分な空間分解能を有する画像が得られないという懸念がある。この点については、早急に検討を行い、最適な超音波装置の条件を見極める必要がある。

### C. 結論

本年度の検討により、造影超音波法を用いた超音波分子イメージングの医学的有用性を検証する *in vitro* 及び *in vivo* の実験系を確立することができた。今後、これらの実験系を用いて 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について検討を進めて行く予定である。

### D. 健康危険情報

該当なし。

### E. 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  $\alpha\beta 3$ -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(予定).

### F. 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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Otani K. Yamahara K.	Feasibility of lactadherin-bearing clinically available microbubbles as ultrasound contrast agent for angiogenesis	<b>Mol Imaging Biol</b>	15(5)	534-541	2013