

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26年度

総括研究報告書

研究代表者 大谷 健太郎

(国立循環器病研究センター研究所)

平成27(2015)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 大谷健太郎 | ----- 1 |
|--|---------|

II. 学会発表資料 ----- 8

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 11

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 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局所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。これまで我々は、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開発を行ってきた。本年度は、先般我々が開発した、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Sonazoidの複合体(Sonazoid-Lactadherin複合体)の、新生血管に対する分子標的性について担癌モデルマウスを用いて検討を行った。また併せて、Sonazoid-Lactadherin複合体の新鮮血栓に対する分子標的性を評価するための基礎検討として、造影超音波法にてマウス頸動脈の血流評価が可能か否かについて検討を行った。従来の洗浄・遠心分離の過程を経て作成したSonazoid-Lactadherin複合体では鮮明な新生血管の分子イメージング画像の取得が困難であったことから、洗浄・遠心分離操作の不要なSonazoid-Lactadherin複合体作製法の確立の重要性を再確認した。一方、マウス頸動脈については造影超音波法による血流評価が可能なが検証できた。また、洗浄・遠心分離操作の不要なSonazoid-Lactadherin複合体作製法の確立のために必須である、溶液中のLactadherin濃度の定量法を確立した。これまでに確立した技術を駆使し、今後Sonazoid-Lactadherin複合体による新生血管・新鮮血栓に対する超音波分子イメージングの確立を目指したいと考えている。

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 μm 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、血流中の微小気泡を生体内の炎症部位や動脈硬化巣等を集積させることによる、造影超音波法を用いた分子イメージングの開発が試みられている。微小気泡を特定部位に集積させる方法として、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る方法が開発されている。また一方で、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。

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。

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。

我々はこれまでに、本邦で臨床使用可能な超音波造影剤 Sonazoid を基盤とした、生体内の特定部位に集積する微小気泡(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)。先般、生体内タンパク MFG-E8(Lactadherin) と Sonazoid を併用することで、癌や血管新生療

法に起因する新生血管に対する、臨床応用可能な分子標的気泡の作製が可能であることを明らかにした(Mol Imaging Biol 2013)。Sonazoid-Lactadherin 複合体は Sonazoid 表面に RGD 配列を有しているため、既報の新生血管の他に、新鮮血栓に対する分子標的気泡にもなり得ると考えられる。

本年度は、Sonazoid-Lactadherin 複合体の新生血管(腫瘍血管)および新鮮血栓に対する分子標的気泡としての有用性を検証するため、マウスモデルを用いた検討を行った。併せて、Sonazoid-Lactadherin 複合体作製法の簡素化へ向けた in vitro 実験による検討を行った。

B. 研究方法

腫瘍血管に対する分子標的性の検討

Sonazoid-Lactadherin 複合体の新生血管に対する分子標的性について、担癌モデルマウスを用いて検討した。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 5.0×10^6 個移植し、移植 7 日目(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 (1.2×10^6 bubbles) および Sonazoid-Lactadherin 複合体を投与した。造影剤投与 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 (1.2×10^8 bubbles, 100 μ L)と Lactadherin 5 μ g (100 μ 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 複合体の新鮮血栓に対する分子標的性の検討には、昨年度と同様にマウス頸動脈血栓モデルを用いた。まず、昨年度検討を行った、マウス頸動脈血栓に対する抗 CD41 抗体(GPIIb/IIIa)を用いた免疫染色について再検討を試みた。というのも、昨年度は蛍光標識二次抗体を用いて CD41 の検出を行ったが、蛍光染色では血球からの自家蛍光が大きな障害となるため、今回は酵素抗体法を用いて検討を行った。

頸動脈血栓は昨年度と同様に、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およびろ紙を潜らせた後、ろ紙に 6%塩化鉄(III)溶液を 4 μ L 染み込ませ、3 分間反応させることにより作成した。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(東芝社)の 1202S プロブを用いて検討した。音圧は Mechanical index 0.4、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確立するに当たり、まず 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ともに近いタンパクである 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。

簡便な分子標的気泡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、今後洗浄・遠心操作が不要な 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

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。

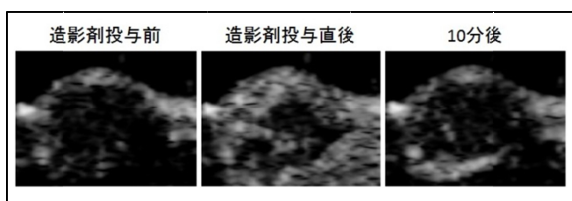


図 1. Sonazoid-Lactadherin 複合体を用いた腫瘍血管に対する分子イメージングの検討

Sonazoid-Lactadherin 投与直後は良好な腫瘍の造影像が認められた(図 1 中央)。しかし、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 1 右図)。

新鮮血栓に対する分子標的性の検討

最初に、マウス血餅における CD41 (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、かつ昨年度ヒト血餅を用いて検討した結果に近い CD41 の発現が認められた(図 2 左図)。次に同様の方法にてマウス頸動脈血栓を染色したところ、血栓において一様な CD41 の発現が認められた(図 2 右図)。

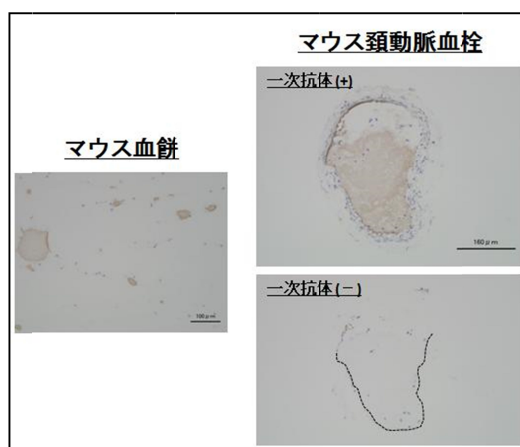


図 2. マウス血餅および頸動脈血栓における CD41(GPIIb/IIIa)の発現

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 3 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)。

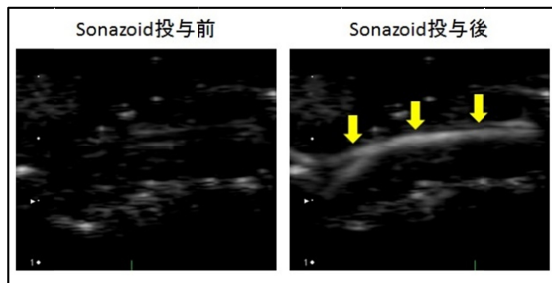


図 3. マウス頸動脈の超音波造影像

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 4)。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 4)。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。

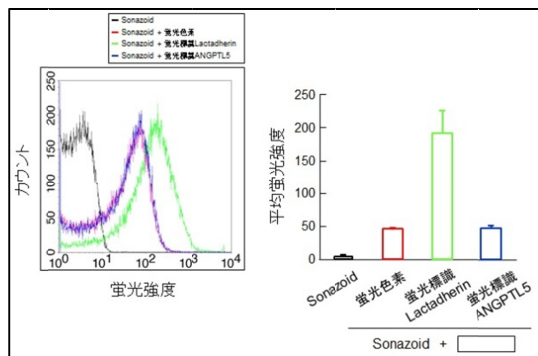


図 4. Sonazoid との結合特異性の検討

簡便な分子標的気泡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($62.5 \sim 4000 \text{ pg/mL}$)に比べて非常に高濃度であることが判明した。そこで、 1 ng/mL ($= 1000 \text{ pg/mL}$)の Recombinant Human MFG-E8 を準備し、MFG-E8 Quantikine ELISA Kit で測定を行ったところ、 25 pg/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 $1/40 \sim 1/20$ 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 1 ng/mL 付近での測定を想定した場合、Sonazoid-Lactadherin 複合体溶液(通常は $7 \sim 9 \times 10^7 \text{ bubbles/mL}$ 、 $2.5 \mu\text{g/mL}$ 程度と予想)から 50 ng/mL の測定液を準備するには、約 50 倍(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 $5 \times 10^5 \text{ bubbles/mL}$ 、 $1 \times 10^6 \text{ bubbles/mL}$ 、 $2 \times 10^6 \text{ bubbles/mL}$ 、 $5 \times 10^6 \text{ bubbles/mL}$ 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、 $5 \times 10^5 \text{ bubbles/mL} \sim 1 \times 10^6 \text{ bubbles/mL}$ 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

本年後の研究の結果、先般報告した洗浄・遠心分離操作が必要な従来の作製法

で得られた Sonazoid-Lactadherin 複合体では、癌新生血管に対する分子標的性を見出すことは困難であった。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では 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の定量を行い、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は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。この点については、本年度の検討で確立した Sonazoid-Lactadherin 複合体溶液内の Lactadherin 濃度の定量評価系を用いて、速やかに解決したいと考えている。

本年度の検討で、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できる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 μ m 程度の頸動脈内の数少ない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、今後検証する必要がある。

E. 結論

本年度の検討により、Sonazoid-Lactadherin 複合体を用いた超音波分子イメージングの実現に、洗浄・遠心操作が不要な気泡作製法の早急な開発が必要であることが明らかとなった。また一方で、その簡便な気泡作製法の開発に必要な、Sonazoid-Lactadherin 複合体溶液中の Lactadherin 濃度の定量法を確立した。今後は、これまでに確立した様々な実験系を駆使して、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。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし

2. 学会発表

【学会・研究会発表】

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

第6回アジア造影超音波会議

The 6th Asian Conference on Ultrasound Contrast Imaging (ACUCI 2014)

President

Fuminori Moriyasu

Tokyo Medical University

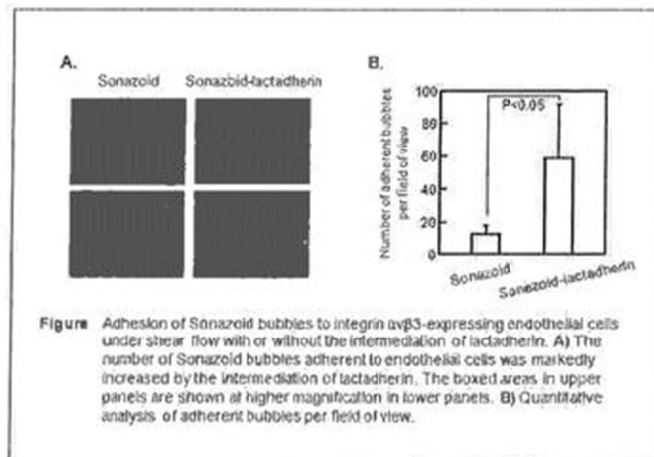


May 10, 2014 / Pacifico Yokohama

Kentaro Otani

National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute

Ultrasound molecular imaging with molecular-targeted bubbles enables the noninvasive visualization of molecular dynamics in situ. Although some ultrasound contrast agents have been clinically applied for the vascular/Kupffer imaging, however the clinically translatable molecular-targeted bubble has not been developed until now. The aim of this study was to examine the feasibility of molecular-targeted bubbles preparation based on Sonazoid, a clinically available ultrasound contrast agent in Japan. As Sonazoid is stabilized by a membrane of hydrogenated egg phosphatidylserine (PS), we planned to utilize the PS as a scaffold for attaching IgGs and proteins onto Sonazoid. For detecting PS in Sonazoid, annexin V and lactadherin were utilized. By using biotin-avidin complex formation and annexin X, the attachment of IgG onto the surface of Sonazoid was feasible. However, majority of bubbles were disappeared during the bubbles preparation due to the addition of Ca^{2+} for maintaining the binding between PS and annexin V. On the other hand, lactadherin was superior to annexin V, because Ca^{2+} is unnecessary for the binding between PS and lactadherin. Furthermore, the lactadherin-bearing Sonazoid bubbles have an ability to bind with integrin $\alpha v \beta 3$ -expressing endothelial cells (Figure). Because integrin $\alpha v \beta 3$ is well-known to play a key role in angiogenesis, the lactadherin-bearing Sonazoid might have feasibility as a clinically translatable targeted ultrasound contrast agent for angiogenesis.



Development of molecular targeted-bubbles based on Sonazoid

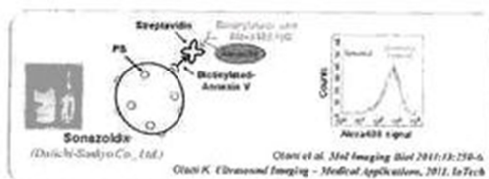


Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering,
National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute,
Suita, Japan

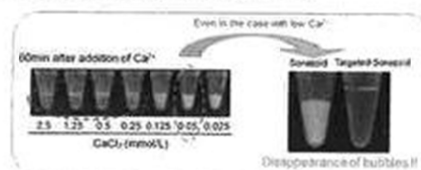
Kentaro Otani

Background and Aim

- Contrast ultrasound imaging with molecular-targeted bubbles enables the noninvasive visualization of molecular dynamics in situ.
- We reported previously the feasibility of antibody-carrying microbubbles preparation based on Sonazoid, which consists of perfluorobutane gas microbubbles stabilized by a membrane of hydrogenated egg phosphatidylserine (PS), by using annexin V and biotin-avidin complex formation.



- However, the necessity of Ca^{2+} for achieving the binding between PS and annexin V markedly reduced the number of bubbles due to the significant aggregation.



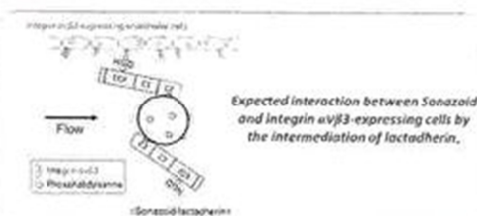
- Additionally, the usage of biotin-avidin complex formation is a barrier for the clinical translation of molecular targeted-bubbles, because of the immunogenicity of streptavidin.

Milk fat globule EGF factor 8 (MFG-E8, lactadherin)



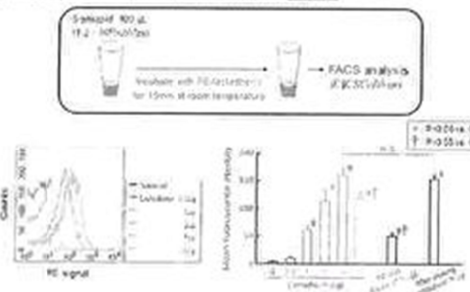
- is a protein secreted from macrophages.
 - accelerates the englobement of apoptotic cells.
- Binding between PS and lactadherin is Ca^{2+} -independent.

- So, we hypothesized that lactadherin has the potential to be a mediator between PS-containing bubbles and integrin $\alpha v \beta 3$ -expressing cells.
- The aim of this study was to examine whether microbubbles targeted to integrin $\alpha v \beta 3$ could be produced by conjugating Sonazoid with lactadherin.

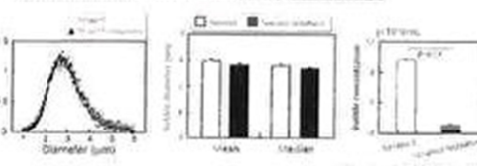


Methods and Results

1) Binding between Sonazoid and lactadherin

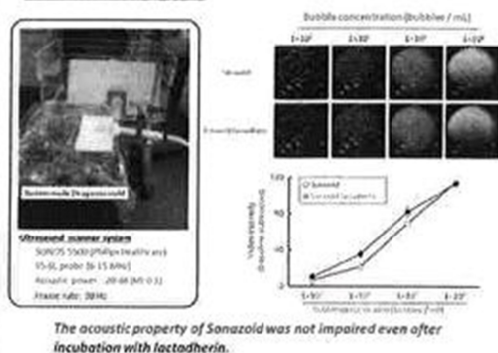


2) Size distribution and concentration of Sonazoid before and after conjugation with 5µg lactadherin

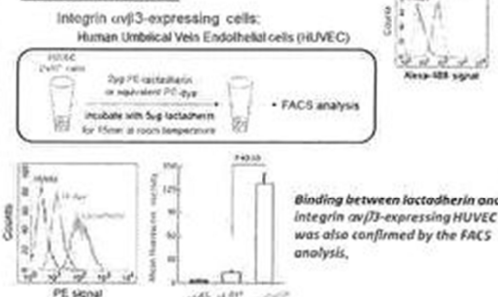


Although the bubble concentration was reduced after the conjugation with lactadherin (due to dilution), the size of lactadherin-bearing Sonazoid was almost the same with that of naked Sonazoid.

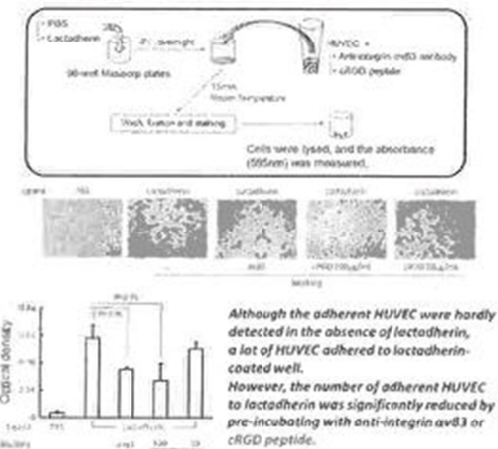
3) Acoustic property of Sonazoid with or without lactadherin conjugation



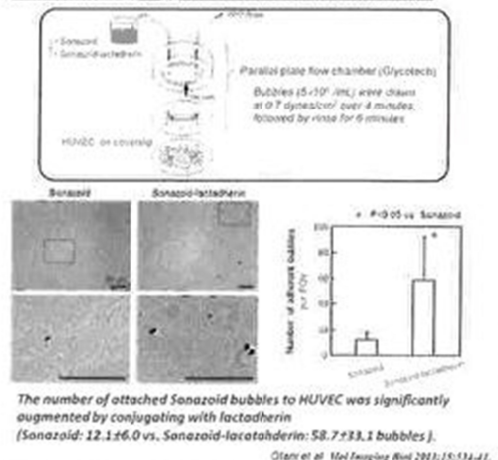
4) Binding between integrin $\alpha v \beta 3$ -expressing cells and lactadherin



5) Specificity of binding between lactadherin and HUVEC



6) Attachment of Sonazoid with HUVEC under shear flow



Summary and Conclusion

- Bubbles size of Sonazoid was not altered even after conjugating with lactadherin.
- Attachment of Sonazoid to integrin $\alpha v \beta 3$ -expressing cells were augmented by the intermediation of lactadherin.
- Because integrin $\alpha v \beta 3$ is well known to play a key role in angiogenesis, the lactadherin-bearing Sonazoid has feasibility as a clinically translatable targeted ultrasound contrast agent for angiogenesis.

Disclosure information

I have no relationships to disclose.

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 |
|-------|---------|------|----|-----|-----|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |