

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390151

研究課題名(和文)線溶系代謝物を用いる病理性血管新生の標的医療(画像診断と同時治療)の開発

研究課題名(英文)Development of targeted medical care (simultaneous diagnostic imaging and therapy) for pathogenic angiogenesis using fibrinolytic metabolites

研究代表者

松浦 栄次(Matsuura, Eiji)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：20181688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円、(間接経費) 3,810,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた試験において、血漿糖タンパク質ベータ2-グリコプロテイン I (B2GPI) のドメイン I (DI) の濃度・時間依存的な細胞増殖制御効果が認められると共に、担がんマウスを用いた⁶⁴Cu 標識 DI、および B2GPI の PET イメージング解析により、DI が投与後迅速かつ高コントラストに腫瘍を描出できる PET イメージング剤となる可能性が示された。さらに、診断と同時治療をめざす Theranostics 技術の基盤となる ⁶⁴Cu 標識 B2GPI 結合リポソームの調製が可能となった。

研究成果の概要(英文)：By the cytostatic activity test and angiogenesis imaging analysis with human umbilical vein endothelial cells, we confirmed that DI of beta2-glycoprotein I (B2GPI) revealed dose- and time-dependent cytostatic and anti-angiogenesis activity. ⁶⁴Cu-labeled DI and ⁶⁴Cu-labeled B2GPI were prepared and used for PET/CT imaging of tumor-bearing mice. DI showed high tumor/blood ratio. ⁶⁴Cu-labeled and B2GPI-liposomes were prepared as an experimental model of the Theranostics (simultaneous diagnostic imaging and therapy) technology.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：血管新生 ベータ2-グリコプロテイン I 抗血管新生剤 B2GPI-ドメイン I nicked B2GPI PET イメージング 質量分析 DDS キャリア

1. 研究開始当初の背景

血管新生は動脈硬化症やがんの病態悪化と深くかかわっており、血管新生を標的としたがん治療の標的医療についてはさまざまな試行が行われてきた。

これまでの研究により我々は、難治性の自己免疫疾患である抗リン脂質抗体症候群(易血栓性が基本病態である)で見られる主要自己抗体(抗カルジオリピン抗体)が50 kDaの血漿糖タンパク質、 β 2-グリコプロテイン I(β 2GPI)を認識することを見いだすとともに、動脈血栓の原因抗原が酸化 LDL/ β 2GPI 複合体であることを見いだした。本複合体が動脈硬化巣で形成され、生活習慣病患者血清中にも認められることより、血中の当該複合体を測定する体外診断薬を開発した。さらに、非侵襲的なヒト動脈硬化の画像診断法の開発を目指し近赤外蛍光標識した、酸化 LDL/ β 2GPI 複合体に特異的なモノクローナル抗体を用いて、マウス動脈硬化の分子イメージングに成功した。

最近の研究で我々は、プラスミンによりドメイン V が限定分解された β 2GPI (nicked β 2GPI) が angiostatin (Ang, AG4.5) に特異的に結合することを見いだした。すなわち、nicked β 2GPI のドメイン V (DV) は、AG4.5 の ATPase に結合し、AG4.5 の本来有する血管新生抑制活性を逆に抑制する。一方、ドメイン I (DI) は、VEGF の特異的受容体に競合的に結合し、リガンドである VEGF と競合し血管新生を抑制する。

本研究では、動脈硬化のみならず、がん細胞の浸潤・転移と関わりのある病理性血管新生に着目し、対標的分子であり、かつ VEGF と拮抗する分子としての β 2GPI-DI および治療薬(抗がん剤、抗血管新生剤)を含有するマイクロキャリアを作製し、病理性の血管新生(がん、動脈硬化)を画像診断と同時に治療できる“Theranostics”(診断と治療の一体化)の開発を目指す。

2. 研究の目的

β 2GPI-DI は、動脈硬化やがん病変局所で起こる病理性血管新生を制御するタンパク質であると考えられ、その性質を利用した血管新生のイメージング法の確立は動脈硬化やがんの転移の標的分子特異的画像診断として有用である可能性が極めて高い。

本研究では、対標的分子として β 2GPI-DI を用いた薬剤内包マイクロキャリアによる Theranostics 技術を病理性血管新生の非侵襲的画像診断と同時治療の目的で開発する。

β 2GPI 遺伝子よりドメイン単位の欠失タンパク質 (DI、DV) を発現・精製し、プラスミン処理による nicked β 2GPI および DV タンパク質を調製して、それぞれのタンパク

質の *in vitro* での内皮細胞の増殖、管腔形成に及ぼす影響を解析する。さらに、 β 2GPI-DI を結合させた薬剤内包マイクロキャリアの調製を行い、 ^{64}Cu で標識し、担がんマウス、動脈硬化マウスに投与して体内動態を PET 画像解析によりモニターし、薬剤効果を評価する。

今回、開発予定の Theranostics 技術には将来的に Photodynamics (薬剤放出を制御する) を応用する計画であるが、標的性を持たせないと副作用が問題となるという点からも我々が開発する“Theranostics”用のマイクロキャリアが不可欠であると考えている。

3. 研究の方法

(1) β 2GPI 遺伝子よりドメイン単位の欠失タンパク質 (DI、DV) の発現・精製と、プラスミン処理による nicked β 2GPI および DV タンパク質の調製

β 2GPI のドメイン単位の欠失タンパク質 (DI、DV) を大腸菌発現系により発現、精製した。DI、DV 遺伝子コード領域に相当する cDNA 断片を PCR により増幅し、*Escherichia coli* 用発現ベクター pET 32a (+) に組み込んだ。この組換えプラスミドを宿主 *Escherichia coli* Rosetta-gami (DE3) 株 (trxB/gor 変異体であるため、ジスルフィド結合の形成および可溶性を向上させる) に導入した。得られた形質転換大腸菌 (*Isopropyl- β -D-thiogalactoside* (IPTG) により発現誘導) を培養し、菌体を超音波で破砕、遠心して得られた遠心上清より Ni-NTA 担体を用いて His-Tag 融合タンパク質を精製した。さらに、エンテロキナーゼにより N 末端側の His-Tag を切断、精製し、目的の遺伝子組換えタンパク質を得た。反応後のエンテロキナーゼはアガロースビーズにより除去し、MALDI-TOF-MS により確認した。

また全長 β 2GPI と DV のプラスミン処理により、限定分解を受けた nicked β 2GPI および nicked DV を得た。未処理の β 2GPI および DV と比較しながら、DI の血管新生への作用を確認した。

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) 培養系を用いて上述の(一連の)タンパク質の細胞毒性試験および細胞増殖抑制試験を行った。さらに、皮膚繊維芽細胞と HUVEC の共培養により形成される管腔の面積、総延長、分岐数、パス数への影響を血管新生定量ソフトウェアにより画像解析した。

(2) β 2GPI の NOTA 修飾と陰性荷電リン脂質結合能の検定

0.1M HEPES pH 8.9 に溶解した β 2GPI と DOPG ミセルを混和し、キレート剤である pSCN-Bn-NOTA を加え 37°C で 1 時間反応させた後、PD-10 カラムにより精製した。これをブタノールで洗浄後、PBS にバッファー置換した。TOF-MS 測定の結果、この方法で修

飾した β 2GPI (PG- β 2GPI-NOTA)には、1分子につき約3個のNOTAが結合した。

このPG- β 2GPI-NOTAと、PG非存在下で同様にpSCN-Bn-NOTAとのインキュベーションを行った β 2GPI (β 2GPI-NOTA)、および未処理の β 2GPIをそれぞれカルジオリピン固相化ELISA用プレートに加え、 β 2GPIのドメイン-IIIに対するマウスモノクローナル抗体であるCof-20を加えてインキュベーションを行い、洗浄後HRP標識抗マウスIgG抗体で検出した。

(3) DIのNOTA修飾

β 2GPI-DIと、pSCN-Bn-NOTAを混和し、37°Cで1時間反応させた後、遠心限外ろ過により精製し、0.1Mリン酸バッファーpH5.5に置換した。TOF-MSにより、同様にNOTAの結合を確認した。

(4) β 2GPIおよびDIの ^{64}Cu 標識

NOTA修飾DI 150 μg を1mg/mlゲンチジン酸を含む0.1Mリン酸バッファーpH5.5の中で $^{64}\text{CuCl}_2$ 450 MBqと37°C、10分間反応させ、その後50%体積の0.1M EDTA (pH7.0)を加え、37°C、5分おいて遠心限外ろ過により精製し、5 mg/mlゲンチジン酸含有整理食塩水にバッファー置換した。また、NOTA修飾 β 2GPI 200 μg を上記と同様に $^{64}\text{CuCl}_2$ 625 MBqと反応させ、PD-10カラムにより精製した。

(5) ^{64}Cu 標識DIおよび ^{64}Cu 標識 β 2GPIを用いた担がんマウスのPETイメージング

^{64}Cu -NOTA-DI 17.02 ± 0.76 MBq/9.8 μg 、あるいは ^{64}Cu - β 2GPI 9.33 ± 0.23 MBq/4.2 μg を、すい臓がん細胞CFPAC-1を移植して24日後のBALB/c nu/nuマウス2匹ずつに尾静脈より投与し、0-1、3、6、12、24時間後にPET撮像およびCT撮像を行い、最後のPET撮像後に解剖し、各臓器の放射能分布を測定した。さらに、投与後それぞれのタイムポイントで各臓器における放射能分布を γ カウンターにて測定した。得られたPET/CT画像の心臓、肝臓、腎臓、大腿筋、および腫瘍部分にVolume of Interest (VOI)を設定し、同一個体における放射能分布推移を解析した。

(6) マイクロキャリア (リポソーム) への β 2GPI結合法および ^{64}Cu 標識法の検討

β 2GPI全長分子を2-iminothiolaneで処理し、チオール化 β 2GPIを作製した。SH基の数は、 β 2GPI 1分子あたり4.5個であった。水素添加大豆ホスファチジルコリン(HSPC)、コレステロール、ポリエチレングリコール 2000付加ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE-PEG2K)、末端マレイミド基付加DSPE-PEG2K (DSPE-PEG2K-MAL)、DSPE-Rhodamineからなるリポソームと4°Cで一晩混和して β 2GPI結合リポソームを調製し、ゲル濾過により精製を行い、遠心により濃縮した。

リポソームの ^{64}Cu 標識のためには、DSPE-PEG2K-NH₂とキレート剤NOTAを結合したものを、上述のリポソーム脂質組成に追加して同様にリポソームを調製した。対照

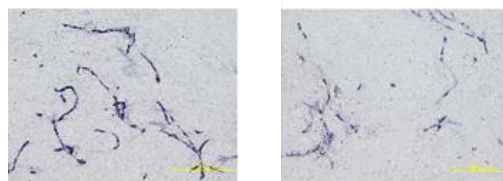
として、DSPE-PEG2K-MALおよび β 2GPIを含まないリポソームを調製した。

13-19 MBqの $^{64}\text{CuCl}_2$ 溶液と β 2GPI結合・NOTA修飾リポソーム、あるいは対照リポソーム(いずれも総脂質として1 μmol)を37°Cで40分間インキュベートし、その後0.1M EDTAを加え室温で15分間インキュベートし、PD-10カラムにかけ溶出画分を0.5 mlずつ分画し、各分画の放射能をキュリーメーターにより測定した。

4. 研究成果

(1) 全長 β 2GPI、ドメイン欠失タンパク質(DI、DV)、プラスミン処理によるnicked β 2GPIおよびDVタンパク質の血管新生への作用

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)培養系によるこれらタンパク質の細胞毒性試験および細胞増殖抑制試験の結果、DIによる細胞増殖抑制が濃度依存的・時間依存的に観察された。また、繊維芽細胞とHUVECの共培養により形成される管腔の面積、総延長、分岐数、パス数への影響を血管新生定量ソフトウェアにより画像解析した結果、DIにより管腔形成が濃度依存的に抑制されることが観察された(図1)。



VEGF (VEGF: 10 ng/ml) VEGF+DI (VEGF: 10 ng/ml, DI: 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

図1. DIの血管新生抑制作用

DI、nicked DVにそれぞれ濃度依存的な血管新生抑制活性が確認できた。全長のnicked β 2GPIにはその両者の活性を相対する傾向が見られた。また、全長の β 2GPIにおいても濃度依存的な血管新生抑制活性が確認できた。全長のnicked β 2GPIおよび β 2GPIの結果は2009年に報告された北海道大学のNakagawaらの結果(Blood, 2009, 114: 2553-2559, DOI: 10.1182/blood-2008-12-190629)を支持するものと判断した。

DI、nicked DVの血管新生における機能検討は、病変部局所の可視化法(画像診断)、および、治療法の技術開発の重要なプロセスであり、DIおよびDVの発現・精製の最適化はその鍵を握る。DIに関しては、当該研究推進の早い時期に大腸菌による安定な高発現系が確立できた。一方、DVの発現量・安定性に問題があり、今後、生活習慣病(主に閉塞性動脈硬化症)の発症・制御に関わる β 2GPIのドメインの機能解析を可能にするため、更なる安定的高発現に向けて改良を行う必要がある。

(2) β 2GPI の NOTA 修飾と陰性荷電リン脂質結合能の検定

β 2GPI をキレート剤により修飾するとリン脂質への結合能を失ったことからリン脂質結合部位のある第5ドメインのリジン残基に NOTA が修飾されたと推定した。そこで PG 存在下で β 2GPI の NOTA 修飾を行った。ELISA により、PG 処理 β 2GPI-NOTA のカルジオリピン固相への結合を確認し β 2GPI のリン脂質結合能を維持した状態でNOTA 修飾を行うことができたことを確認した。

(3) β 2GPI および DI の ^{64}Cu 標識

^{64}Cu 標識後、DI は 1.87 MBq/ μg 、 β 2GPI は 2.59 MBq/ μg の比放射能となった。TLC オートラジオグラフィーにより測定した放射化学的純度はいずれも 100%であった。

(4) ^{64}Cu 標識 DI および ^{64}Cu 標識 β 2GPI を用いた担がんマウスの PET イメージング

担がんマウスにおける ^{64}Cu 標識 β 2GPI、および ^{64}Cu 標識 DI の体内動態を PET により解析し、モニター後解剖して各臓器における放射能分布を測定した(図 2)。

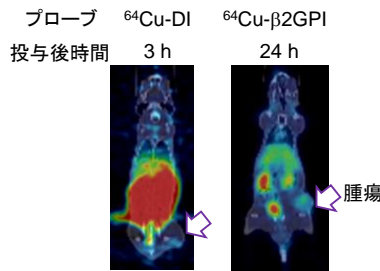


図 2. ^{64}Cu -DI および ^{64}Cu - β 2GPI を用いた担がんマウスの PET イメージング

PET 画像解析および放射能分布測定の結果から、いずれも腎臓からクリアランスされることが確認されたが、 β 2GPI が投与 24 時間後まで徐々に血中からクリアランスされた (3.5 ± 0.12 %ID/g at 24h) 一方で、DI は投与 3 時間後までに血中からほぼ消失し (0.069 ± 0.006 %ID/g at 3h)、その後一定の放射能が投与 24 時間後まで残存した。 β 2GPI および DI の放射能分布の腫瘍対血液比および筋肉比は、いずれも血中からのクリアランスに反して増加あるいは維持される傾向にあり、特に DI においては投与 3 時間後から β 2GPI と比べて顕著に高い腫瘍対血液比を示したことから、DI が投与後迅速かつ高コントラストに腫瘍を描出できる PET イメージング剤となり得ると考えられる (図 3)。

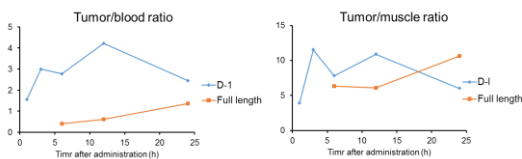


図 3. ^{64}Cu - β 2GPI-DI と ^{64}Cu - β 2GPI 全長の腫瘍対血液(左)、腫瘍対筋肉比(右)の経時変化

^{64}Cu 標識 β 2GPI 全長の代謝速度は DI と比べ著しく遅いため、投与後 24 時間で鮮明な PET 画像が得られた (図 2) が、DI の代謝排泄が著しく進行することで、体内残存量が著しく減少しており、この 24 時間点では、著明な腫瘍集積PET 画像が得られなかった。また、腎臓および膀胱など排泄に関わる高放射能濃度の組織が近傍に存在するために生じる強いシグナルが存在する場合、腫瘍特異的な PET 画像を正しく描出することが困難であることも明らかとなった。DI の高クリアランスという利点を最大限に生かして PET 画像収集の最適タイムポイントを探れば、高い標的性を有する血管新生(がん、動脈硬化)の画像診断と同時治療できる Theranostics 技術の開発が可能であると推察された。

(5) マイクロキャリア (リポソーム) への β 2GPI 結合法および ^{64}Cu 標識法の検討

リポソームへの β 2GPI の結合は分子間相互作用解析装置 BLItz (ForteBio 社製, Menlo Park, CA) を用いて確認した。Protein A が固相化されているセンサーに、抗 β 2GPI モノクローナル抗体 Cof-20 を結合させた後、上記の β 2GPI 結合リポソームを液相 (PBS) 中に加え、結合曲線および解離曲線を描いた。対照として β 2GPI を含まないリポソームを用い、 β 2GPI 結合リポソームとの結合量の差をとると、特異的な結合曲線が観察された (図 4)。このことにより β 2GPI がリポソームに結合していることが示唆された。

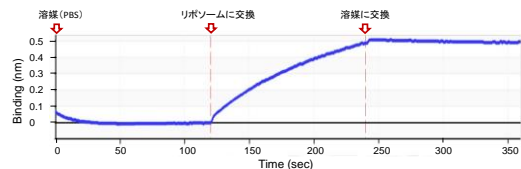


図 4. β 2GPI 結合リポソームの Cof-23 固相への結合-解離曲線

NOTA 修飾リポソームでは総脂質 1 μmol に対し加えた ^{64}Cu (16.54 MBq) のうち 46.9% がリポソームに標識されたのに対し、 β 2GPI 結合・NOTA 修飾リポソームでは加えた ^{64}Cu (13.70 MBq) のうち 82.2% が標識された。

以上の結果から DI は、病的血管新生の Theranostics 製剤に標的指向性を付与するための有力な候補素材と考えられる。本研究実施期間中には、それらのモデル実験として、NOTA を修飾した脂質を組み込んだリポソームに β 2GPI を結合し ^{64}Cu と反応させることで、Theranostics 技術の基盤となる ^{64}Cu 標識 β 2GPI 結合リポソームを調製することができ、期待される成果が得られた。

β 2GPI-DI による病変局所への指向性を利用する当該システムは、動脈硬化やがんの診断に有用であるのみならず、マイクロキャリア内包薬剤 (血管新生阻害剤や抗がん剤) を

送達させることにより、同時に治療が可能になる。また、分子イメージングシステムを利用するため、非侵襲的で、複数回施行が可能であり、長期間の治療・経過観察が同時に可能である。

動脈硬化を標的とし、分子イメージング診断と DDS による標的医療を同時実施可能な“Theranostics”の研究戦略は、極めて独創性に富んだ岡山発の技術が基盤になっている。既に、本研究により培った基盤技術を礎に産学共同研究体制を構築し、今年度より、基盤研究 (A) において、企業と協働で実用化技術を開発し、発展させる予定であり、近い将来、医療の中核をなしていくものと期待している。

5. 主な発表論文等 (本研究に関連のあるもの)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Matsuura E, Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Turiel M, Lopez LR, Nurmohamed MT. Is atherosclerosis an autoimmune disease? *BMC Med.* (執筆依頼、査読有) 2014; 12: 47. 5pages. DOI: 10.1186/1741-7015-12-47.
- ② Matsuura E, Lopez LR, Shoenfeld Y, Ames PR. β 2-glycoprotein I and oxidative inflammation in early atherogenesis: a progression from innate to adaptive immunity? *Autoimmun Rev.* (執筆依頼、査読有) 2012; 12: 241-9. DOI: 10.1016/j.autrev.2012.04.003.

[学会発表] (計 13 件)

- ① Matsuura E, Lopez L. Autoimmune and infection-mediated atherosclerosis: possible mechanisms and innovation from translational biomedical researches. 9th International Congress on Autoimmunity, March, 2014, Nice, France.
- ② Shen L, Matsuura E, *et al* (他6名, 8番目) Oxidized lipids composed of atherogenic complex autoantigen: by lipidome analyses with cutting-edge imaging mass microscope (iMScope). 9th International Congress on Autoimmunity, March, 2014, Nice, France.
- ③ Matsunami Y, Matsuura E, *et al* (他5名, 7

番目) In vivo molecular imaging using humanized anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies to detect arterial lesions in the atherosclerosis prone apoE^{-/-} mice. 9th International Congress on Autoimmunity, March, 2014, Nice, France.

- ④ Shen L, Matsuura E, *et al* (他8名, 10番目) Detection of oxidized lipoproteins accumulated in atherosclerosis lesions by imaging mass microscopy (iMS). 6th Asian Congress of Autoimmunity, November, 2013, Hong Kong, China.
- ⑤ Matsuura E, Shen L, Lopez L. Infection and immunity-mediated atherosclerosis. 6th Asian Congress of Autoimmunity, November, 2013, Hong Kong, China.
- ⑥ Sasaki T, Matsunami Y, Matsuura E. A non-invasive PET/CT imaging procedure for diagnosing atherosclerotic lesions: immunologic targeting to oxLDL/beta2-glycoprotein I in the WHHL rabbits. 6th Asian Congress of Autoimmunity, November, 2013, Hong Kong, China.
- ⑦ Matsunami Y, Matsuura E, *et al* (他5名, 7番目) Are autoantibodies against β 2-glycoprotein I really atherogenic?: Answers from in vivo PET imaging studies in apolipoprotein E-deficient mice. 6th Asian Congress of Autoimmunity, November, 2013, Hong Kong, China.
- ⑧ Liu Q, Matsuura E, *et al* (他3名, 5番目) Recombinant domain V of beta2-glycoprotein I inhibits the formation of atherogenic oxLDL/ β 2-glycoprotein I complexes. 6th Asian Congress of Autoimmunity, November, 2013, Hong Kong, China.
- ⑨ Matsuura E, Lopez L. Pathological implication of autoantibodies against

β 2-glycoprotein I and a novel
immune-theranostics in atherosclerosis. 6th
Asian Congress of Autoimmunity,
November, 2013, Hong Kong, China.

- ⑩ Matsuura E. β 2-Glycoprotein I and
oxidative inflammation in atherogenesis of
autoimmune atherothrombotic diseases.
International Congress on Autoimmunity,
May, 2012, Granada, Spain.
- ⑪ Matsuura E. Autoimmunity, oxidative
inflammation, and β 2-glycoprotein I in
early atherogenesis. Controversies and
Rheumatology & Autoimmunity 2013,
April, 2013, Budapest, Hungary.
- ⑫ Matsuura E. Autoimmunity, oxidative
inflammation, and β 2-glycoprotein I in
early atherogenesis. Changchun
International Forum for Cardiovascular
Diseases and Dietary Nutrition. April, 2013,
Jilin University, Changchun, China.
- ⑬ Shen L, Matsuura E. *et al* (他4名, 6番目)
Novel metabolic profiles in
atherosclerosis-prone mice. 7th
International Conference “Bioactive
Okayama 2012”, September, 2012,
Okayama.

〔図書〕 (計 1 件)

- ① Matsuura E., Lopez LR.
Anti- β 2-glycoprotein I antibodies.
Autoantibodies (3rd edition). Shoenfled Y,
Gershwin ME, eds. pp 689-698. Elsevier,
Amsterdam, The Netherland. 2014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 栄次 (Matsuura Eiji)

岡山大学・医歯（薬）学総合研究科・教授

研究者番号：20181688