

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700591

研究課題名(和文) 臨床応用を目指した超音波分子イメージング法の開発

研究課題名(英文) Development of molecular-targeted bubbles based on clinically available ultrasound contrast agent

研究代表者

大谷 健太郎(Otani, Kentaro)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：50470191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、本邦で臨床使用可能な超音波造影剤Sonazoidから、超音波分子イメージング用の分子標的気泡の作成が可能か否かについて検討することである。Lactadherinと混合することにより、Sonazoidのインテグリンavb3に対する集積性を向上させることが可能であったことから、Sonazoid-lactadherin複合体はインテグリンavb3を多く発現する腫瘍血管や血管新生療法に伴う新生血管に対する分子標的気泡となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we developed the preparation method of targeted-bubbles for ultrasound molecular imaging based on clinically available ultrasound contrast agent, Sonazoid. By modifying Sonazoid with lactadherin, the number of adhered bubbles to integrin avb3-expressing endothelial cells was increased significantly. Our results would imply the feasibility of lactadherin-bearing Sonazoid as ultrasound contrast agent for angiogenesis. The future in vivo studies would be of benefit.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：マイクロ・ナノデバイス 生体分子 超音波 分子イメージング 薬学

1. 研究開始当初の背景

造影超音波検査は微小気泡を血流トレーサとして利用する非侵襲的な造影検査法である。微小気泡の大きさは数 μm と赤血球よりも小さく、肺の毛細血管をも通過することが可能なため、理論的には全身の微小循環の非侵襲的評価が可能である。近年、微小気泡を単に血流トレーサとしてではなく、気泡表面に生体内抗原に特異的な抗体やペプチド・タンパクを化学的に結合させることにより(分子標的気泡)、炎症性血管病変・血栓・動脈硬化巣・新生血管等に特異的に集積させ、その気泡を画像化することで造影超音波法を利用した分子イメージングを行おうとする試みがなされている。

分子標的気泡を用いた超音波分子イメージングは、動物実験レベルにおいて良好な分子標的性および十分な造影画像が得られることが報告されている。しかし、分子標的気泡の作成は技術的に困難であり、超音波分子イメージングを行っている研究グループは世界的にも少ない。また、既報で使用されている分子標的気泡は研究用に特化されたものであり、臨床応用することは難しい。

我々は先般、本邦で臨床使用可能な超音波造影剤(微小気泡)Sonazoidの殻の構成成分であるリン脂質・ホスファチジルセリン(PS)を足場とし、かつPSと特異的に結合するAnnexin Vを仲介分子として用いることで、Sonazoidの表面にIgG抗体を結合させ得ることを報告した(Mol Imaging Biol 2011)。臨床使用可能な微小気泡を基盤とした分子標的気泡の作製の可能性を世界で初めて報告することができたが、同時に(Annexin V反応時に添加する Ca^{2+} の影響による)気泡凝集などの問題が認められ、現状ではヒトを含めた生体応用が困難なことも示された。 Ca^{2+} 非依存的にPSを認識する新規分子を仲介分子として用いることで、この問題は解決可能であると思われる

MFG-E8(別名Lactadherin)は、アポトーシスの研究領域において発見された、 Ca^{2+} 非依存的にPSとインテグリン $\alpha\text{v}\beta3/\alpha\text{v}\beta5$ を橋渡することで、マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食を促す機能を有する生体内タンパクである。Lactadherinを用いることで、Sonazoidを基盤とした臨床応用可能な分子標的気泡が作製できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、SonazoidとLactadherinの

併用により、臨床応用が可能なインテグリン $\alpha\text{v}\beta3$ に対する分子標的気泡の作製が可能か否かについて検討し、その医学的安全性及び有用性についても併せて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) Sonazoid-lactadherin 複合体の作製

SonazoidとLactadherinが複合体を形成するか否かについて、FACSにより検討を行った。LactadherinをPhycoerythrin(PE)にて蛍光標識した後(同仁科学; LK-23を使用)、PE-LactadherinとSonazoidを混合し、十分な洗浄・遠心操作の後、SonazoidからPEの信号が検出可能か否かについて検討した。また、SonazoidとLactadherinの結合安定性を評価するため、FACS後のサンプルを用手攪拌し、FACSにて再解析を行った。最後に、SonazoidとPE色素のみを反応させた群を準備し、SonazoidとLactadherinの結合の特異性を評価した。

(2) Lactadherin 修飾による Sonazoid の気泡径および造影能への影響

Lactadherinと複合体を形成することで、Sonazoidの気泡径の増大および造影能の低下が惹起されるか否かについて検討を行った。気泡径については、Lactadherinとの反応前後におけるSonazoidの直径をCoulter Counter (Multisizer IIIを使用)を用いて測定した。造影能については、Lactadherinとの反応前後におけるSonazoidを手製のアガロースゲル容器に充填し、診断用超音波装置SONOS5500 (Philips社)により画像化し、輝度解析を行った。

(3) インテグリン $\alpha\text{v}\beta3$ 発現細胞に対する Sonazoid-lactadherin 複合体の分子標的性の検討(流路系での検討)

Sonazoid-lactadherin複合体がインテグリン $\alpha\text{v}\beta3$ に対する分子標的性を有しているか否かを検討するために、Parallel-plate flow chamber systemを用い、shear stressがかかる流路内でインテグリン $\alpha\text{v}\beta3$ 発現細胞(HUVEC)とSonazoid-lactadherin複合体が接着するか否かについて検討を行った。HUVECを直径33mmのカバーガラス上で培養し、幅2.5mm・高さ0.254mmのゴムシートを装着した。そのスリット内に 5×10^6 bubbles/mlのSonazoidあるいはSonazoid-lactadherin複合体を0.7 dynes/cm²の速度で4分間灌流させた。6分間洗浄した後、HUVECに接着した気泡数を定量し、比較検討を行った。

(4) Lactadherin とインテグリン $\alpha\beta 3$ の結合様式の検討

インテグリン $\alpha\beta 3$ と Lactadherin との結合が、Lactadherin の RGD 領域を介したものであるか否かについて、solid-phase ELISA の実験系により検討を行った。96 穴 Maxisorp plate を Lactadherin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) でコーティングした。HUVEC を 4×10^4 cells ずつ添加し、15 分間反応させた後にプレートに接着した細胞数を算出した。同時に、プレートに播種する前の HUVEC に抗インテグリン $\alpha\beta 3$ 抗体あるいは cRGD ペプチドで前処理することにより、接着細胞数が変化するか否かについて検討を行った。

4. 研究成果

(1) Sonazoid-lactadherin 複合体の作製

PE-lactadherin と混合することにより、PE の蛍光を発する気泡の存在が確認できた。また、PE-lactadherin の添加量に比例して、気泡から得られる蛍光輝度は増大した(図 1)。このことから、Sonazoid と Lactadherin は複合体を形成することが明らかとなった。

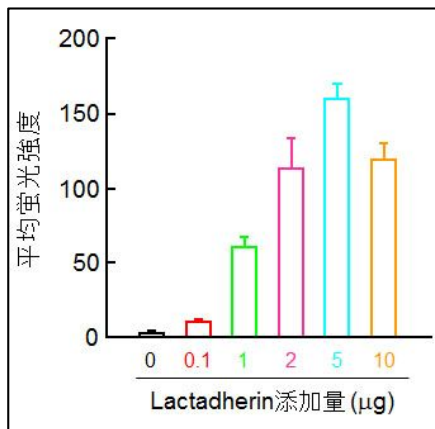


図 1. Sonazoid と Lactadherin の結合の確認

また、Sonazoid と Lactadherin の結合は、少しの衝撃程度では解離しないことが明らかとなった(図 2 左)。また、PE 色素と混合した Sonazoid に比し、PE-lactadherin と混合した Sonazoid において、強い PE の信号が確認されたことから、Sonazoid と Lactadherin は結合特異性が高いことが明らかとなった(図 2 右)。

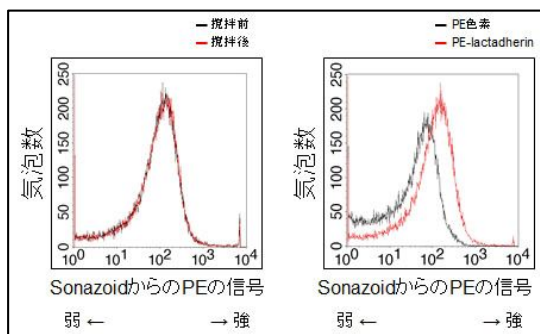


図 2. Sonazoid と Lactadherin の結合安定性と特異性

(2) Lactadherin 修飾による Sonazoid の気泡径および造影能への影響

Lactadherin と複合体を形成しても、Sonazoid の気泡径に有意な変化は認められなかった(Lactadherin なし: $2.90 \pm 0.04 \mu\text{m}$ vs. Lactadherin あり: $2.81 \pm 0.02 \mu\text{m}$ 、いずれも平均径)。このことから、Sonazoid-lactadherin 複合体は、生体投与可能なサイズを維持できていることが明らかとなった。また、Sonazoid-lactadherin 複合体の造影能は、Sonazoid とほぼ同等であった(図 3)。

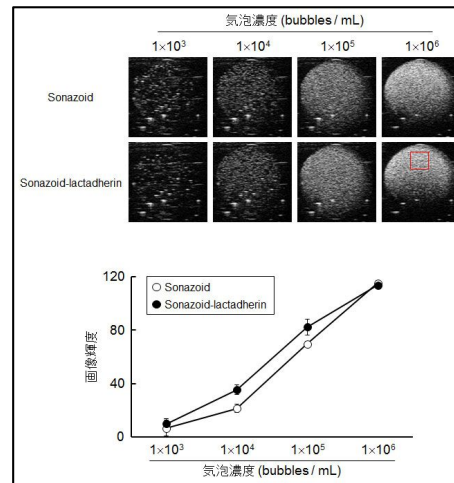


図 3. Sonazoid-lactadherin 複合体の造影能

(3) インテグリン $\alpha\beta 3$ 発現細胞に対する Sonazoid-lactadherin 複合体の分子標的性の検討

Lactadherin で表面を修飾することにより、HUVEC に接着する Sonazoid の気泡数は有意に増加した(Sonazoid なし: 12.1 ± 6.0 個 vs. Sonazoid あり: 58.7 ± 33.1 個)(図 4)。

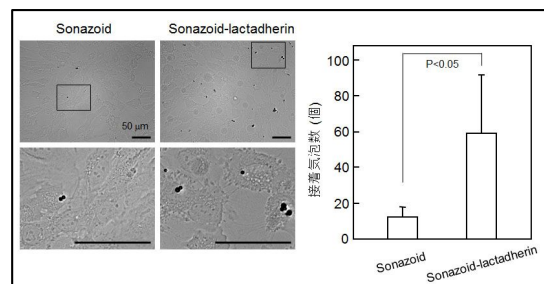


図 4. HUVEC に対する Sonazoid の接着性

(4) Lactadherin とインテグリン $\alpha\beta 3$ の結合様式の検討

cRGD あるいは抗インテグリン $\alpha\beta 3$ 抗体で HUVEC を前処理することで、Lactadherin に対する HUVEC の接着が有意に減弱したことから、両者の結合は Lactadherin の RGD 領域を介して行われていることが示唆された(図 5)。

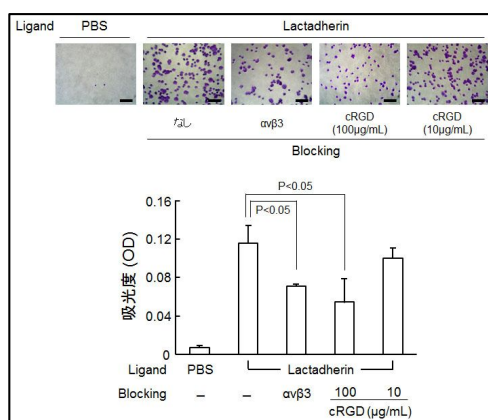


図 5. RGD 領域を介した Lactadherin とインテグリン $\alpha v \beta 3$ の結合

結論

Sonazoid と Lactadherin を併用することにより、臨床使用可能な超音波造影剤を基盤とした分子標的気泡の作製の可能性が示唆された。今後、in vivo 実験により、その医学的有用性についての更なる検討が必要ではあるが、Sonazoid-lactadherin 複合体が、腫瘍血管や血管新生療法に起因する新生血管に対する超音波分子イメージング用造影剤として有用である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Kentaro Otani, Kenichi Yamahara. Development of antibody-carrying microbubbles based on clinically available ultrasound contrast agent for targeted molecular imaging: a preliminary chemical study. **Mol Imaging Biol** 2011;13(2):250-6. (査読あり).
2. Kentaro Otani, Kenichi Yamahara. Feasibility of lactadherin-bearing clinically available microbubbles as ultrasound contrast agent for angiogenesis. **Mol Imaging Biol** 2013;15(5):534-41. (査読あり).

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 大谷健太郎、池田智明. Sonazoid と生体内分子の混合による簡便な分子標的気泡作成法の開発. **第 22 回日本心エコー学会学術集会**. 2011 年 4 月, 鹿児島市民文化ホール(鹿児島).
2. Kentaro Otani. Feasibility of lactadherin-bearing clinically available microbubbles as an ultrasound contrast agent for angiogenesis. **61st Annual Scientific Session of American College of Cardiology**. 2012 年 3 月, McComick Place (ロサンゼルス).

3. 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 回関西地方会学術集会**. 2013 年 11 月, 大阪国際会議場(大阪).
4. Kentaro Otani. Development of integrin $\alpha v \beta 3$ -targeted microbubbles based on clinically available ultrasound contrast agent. **19th European Symposium on Ultrasound Contrast Imaging**. 2014 年 1 月, Hilton Hotel Rotterdam(ロッテルダム).
5. Kentaro Otani. Development of molecular targeted-bubbles based on Sonazoid. **The 6th Asian Conference on Ultrasound Contrast Imaging**. 2014 年 5 月(予定), パシフィコ横浜(横浜).

〔図書〕(計 1 件)

1. Kentaro Otani. (2011) Feasibility of clinical application of ultrasound molecular imaging. **Ultrasound imaging-medical applications**. InTech, Rijeka, Croatia, 295-312.

〔その他〕

平成 24 年度 日本心エコー学会海外学会発表優秀論文賞 受賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大谷 健太郎 (OTANI KENTARO)

独立行政法人 国立循環器病研究センター
研究所 研究員

研究者番号：50470191