

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09884

研究課題名(和文) immunoNBによる新しい腫瘍特性超音波造影剤の開発と薬物送達担体としての応用

研究課題名(英文) Development of a novel tumor-targeting ultrasound contrast agent and its application as a carrier for the drug delivery system

研究代表者

対馬 義人 (Tsushima, Yoshito)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20375546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、超音波造影効果の高い液体(PFOB)を含有させたポリマーナノバブルに抗EGFR抗体を結合した『immunoNB』の簡便な合成法を開発し、腫瘍特異的超音波造影剤としての有用性評価を行うことを目的とした。ポリマーの組成および合成法を検討することで、従来よりも薄い外殻層を有する、小さなPFOBナノバブルを簡便に得ることができた。得られたimmunoNBは、寒天培地を用いたファントム実験では、臨床診断用の超音波イメージング装置を用いて視認可能であった。動物実験では、immunoNBは下大静脈を明瞭に描出したが、腫瘍特異的な集積は認められず、さらなる分子の改良が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate a modulation in the polymer formulation to produce a thin-shelled PFOB nanobubbles while keeping its echogenicity, stealth property, and active targeting potential. Polymer formulation contains 40% PLGA-PEG yields the PEGylated PFOB nanocapsules of approximately 150 nm size with average thickness-to-radius ratio down to 0.15. Despite the acoustic response improvement, the in vivo tumor accumulation was inadequate to generate an observable acoustic response to the ultrasound power at the clinical level. Further modification in drug design was warranted.

研究分野：放射線科学

キーワード：超音波 微小気泡 腫瘍特異的 ナノバブル

1. 研究開始当初の背景

超音波イメージングは、装置が小型で安全かつ低コストであることから汎用性が高く、日常臨床において広く利用される画像診断法のひとつである。そのため、**腫瘍特異的造影効果をもつ造影剤**が開発されれば、**簡便ながん診断**が可能になると考えられ、注目を集めている。現在臨床で使用されているマイクロバブル型超音波造影剤は非常に高い造影効果を有している一方で、サブミクロン程度のサイズであるため、血管外への漏出が必須条件となる腫瘍特異的超音波造影剤の母体骨格としては必ずしも適切ではない。我々は、血管透過可能な小さなサイズの造影剤として、超音波造影効果を有する液体 (PFOB) を含有させた抗 EGFR 抗体標識 PFOB ナノバブル (immunoNB)を開発してきた。本研究では、これをさらに発展させ、臨床への応用を目指して、合成法の改善およびマウスを用いた *in vivo* 体内動態の検討および、EGFR 発現腫瘍を用いた超音波イメージング剤としての有効性の検討を行うことを計画した。また、本 NB は腫瘍細胞の細胞質内に内在化可能なことから、drug-delivery agent (薬物送達担体)としての有効性も強く示唆され、そのような展開も期待される。

2. 研究の目的

本研究では、PFOB を含有させたポリマーナノバブルに抗 EGFR 抗体を結合した『immunoNB』の合成方法を改善し、腫瘍特異的超音波造影剤としての有用性評価を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

① ナノバブルの合成

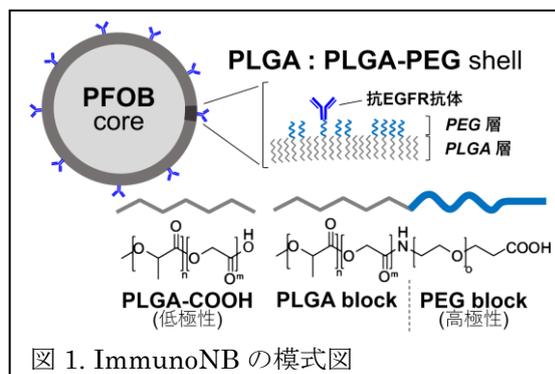
これまでの immunoNB は合成ステップ数が多く、操作が煩雑であったことから、本研究では合成経路を再検討し、合成の簡略化および時間短縮を試みた。

・抗体修飾方法

従来の方法では、ビオチン化ナノバブルに対してアビジン次いでビオチン修飾抗体を結合することにより immunoNB を作製しており煩雑であった。そこで本研究ではナノバブルに直接抗体修飾を行うことを目的として、表面にカルボキシル基を持つナノバブルを設計・合成した (図 1)。このカルボキシル基を活性エステル化することにより、容易に抗体のアミノ基と反応させることが可能となる。

・精製方法および凍結保護物質

従来の方法に従い作製したナノバブルは、凍結乾燥後の再溶解時に凝集塊を形成し、均一な懸濁液にすることが困難であった。そこで、再溶解性の向上を目的として、ナノバブル作製後の精製方法および凍結保護物質の再選定を行った。



・ポリマー組成の検討

PFOB ナノバブルの超音波応答性は外殻の厚さに大きく依存する。また、水溶性の高いポリマーである PEG は、網内系による認識を抑制する働き (ステルス性) を持つことから、ナノバブルの外層に導入されると、血中滞留性を改善できることが知られている。このことから、生分解性ポリマーである PLGA と PLGA-PEG との組成を検討することにより、高い超音波応答性を有し、抗体修飾可能な薄層型 PFOB ナノバブルの作製を試みた。

② ナノバブルの物性評価

得られた種々の PFOB ナノバブルの粒子径を動的散乱法により測定した。

③ *In vitro* 細胞取り込み実験

PFOB ナノバブルのステルス性を評価するため、PFOB ナノバブルをマクロファージ様細胞 RAW264.7 と一定時間インキュベートし、細胞内に取り込まれた PFOB ナノバブル量をフローサイトメトリー法により測定した。

④ 電子顕微鏡画像

PFOB ナノバブルの形状および外殻層厚は (cryo) 電子顕微鏡画像を用いて測定した。

⑤ *In vitro* ファントム実験

PFOB ナノバブルの超音波応答性を評価するため、寒天ゲル培地に PFOB ナノバブルを注入し、臨床用の超音波診断装置を用いて撮像を行った。

⑥ *In vivo* 超音波造影実験

PFOB ナノバブルに抗 EGFR 抗体を結合することにより ImmunoNB を得た。ImmunoNB をヌードマウス皮下に直接注入し、超音波撮像を行った。また、EGFR を高発現することが知られているヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 を移植することにより作製した担がんマウスに対して尾静脈より immunoNB を投与し、一定時間後に超音波撮像を行った。

⑦ 免疫組織化学染色

超音波撮像後の腫瘍を摘出、包埋後、薄切片、凍結切片を作製した。抗 EGFR 抗体および抗 CD31 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、蛍光顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

① ナノバブルの合成

PLGA-PEGの全ポリマーに対する割合を、0, 20, 40, 60, 80%とした種々の PFOB を作製した。以下、NB0%, NB20%, NB40%, NB60%, NB80%と表記する。

精製方法を超遠心分離法から限外ろ過法に、また凍結保護物質をポリビニルアルコールからシクロデキストリン誘導体に変更することで、容易に再溶解が可能な凍結乾燥品を得られることが明らかとなった。さらに、これらの変更を加えることで、ナノバブルの再溶解性のみならず、5 日半を要していた精製操作が1時間にまで短縮した。

② ナノバブルの物性評価

動的散乱法により測定した粒子径は約 100~170 nm であり、ポリマー組成比における PLGA-PEG の割合が増えるに従って増加する傾向が認められた (図 3 (上段))。また、粒子状物質の安定性の指標となる多分散指数 (polydispersity index, PDI、値が小さいほど均一性・安定性が高い) も PLGA-PEG の割合に従って増大した。この結果は、十分な腫瘍到達性と安定性の観点からは PLGA-PEG 混合比は最小限にとどめる必要があることを示唆する。

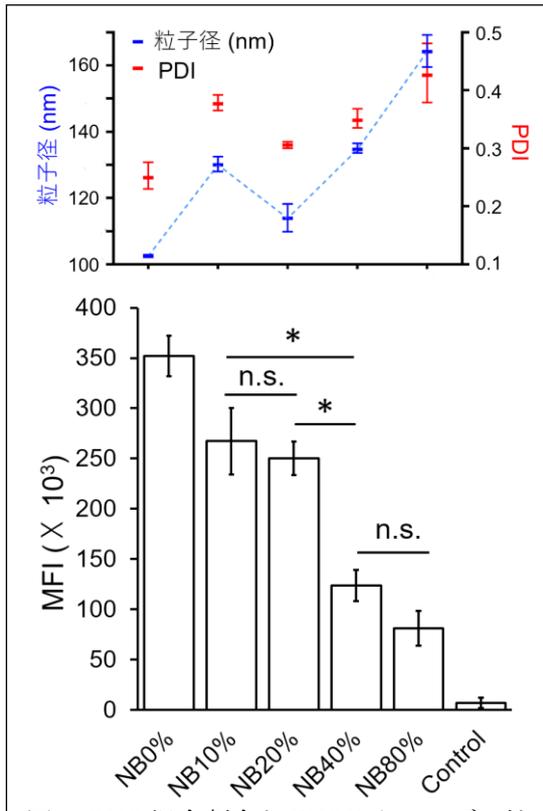


図 3. PEG 混合割合と PFOB ナノバブル粒子径および分散性(上段)または網内系細胞による貪食能 (下段) との関連性。PEG 割合が増加するに従い粒子径、分散性、ステルス性いずれも増大する傾向が認められた。

In vitro 細胞取り込み実験

フローサイトメトリー法により評価した種々の PFOB ナノバブルのマクロファージ様細胞集積量を図 3 (下段) に示す。PLGA-PEG の割合が増加するに従い、集積量は減少する傾向が示されたことから、PEG 化によるステルス性の向上が確認できた。また、NB40%と NB80%では PFOB ナノバブルのマクロファージ集積量に有意な差が認められなかった。このことから、以降の実験では、十分なステルス性を有する NB40%, NB60%, NB80%の中で、最も粒子径が小さく、均一性の高い NB40%を用いることとした。

③ 電子顕微鏡画像

NB40%のクライオ電子顕微鏡画像を図 4 に示す。左図のように NB40%は PFOB (黒色) を包含した球体であることが明らかとなり、良好な超音波応答性を有する可能性が期待された。また、ポリマー層は PFOB 周囲に認められる灰色の膜として観察されるが、NB40%は非常に薄い外殻層厚を有しているものと推察された。外殻層厚を詳細に調べるため、酢酸ウランによるネガティブ染色を行い、電子顕微鏡撮像 (常温) を行ったところ、NB40%の外殻厚-粒子半径比 (T/R 比) は 0.15 と、既報の PFOB ナノバブル(文献①)に比べ薄い外殻を有することが明らかとなった (図 4 右)。

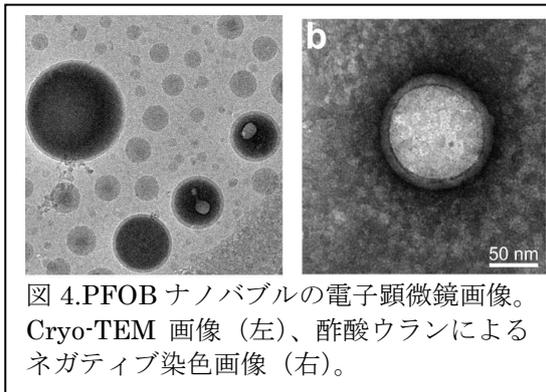


図 4. PFOB ナノバブルの電子顕微鏡画像。Cryo-TEM 画像 (左)、酢酸ウランによるネガティブ染色画像 (右)。

④ In vitro ファントム実験

以上の変更を加えた新規合成経路により作製されたナノバブルを用いてファントム実験を実施したところ、新規ナノバブルは従来のナノバブルと同様に良好な視認性を有することが確認できた。寒天培地に PFOB ナノバブル懸濁液を注入し、超音波撮像を行ったところ、PFOB ナノバブルは、臨床診断に用いられる低強度の超音波においても、高いエコー輝度を示した。

⑤ In vivo 超音波造影実験

得られた immunoNB を用いて in vivo における基礎検討を行った。種々の濃度の immunoNB 懸濁液を皮下に直接注入し、超音波イメージング装置を用いて immunoNB の in vivo における視認性の評価を行った。その結果、50 mg/mL, 25 mg/mL の高濃度のみならず、2 mg/mL

の低濃度でも十分に視認可能であった(図5)。
 静脈内投与の場合には注射液は生体内で高度に希釈されるが、初期濃度を高く設定することで、希釈条件下においても腫瘍を描出できる可能性が高いと考えられた。

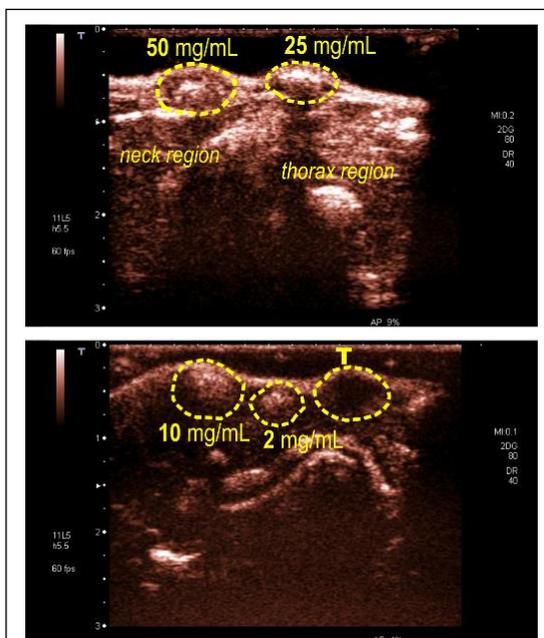


図5. ImmunoNBの超音波造影画像。
 ImmunoNBは2mg/mLの高度希釈条件下でも高エコー輝度(画像上で白色に光る)を示した。

そこで、静脈内投与を実施し、実際にimmunoNBを用いて腫瘍を造影可能であるかの評価を行った。その結果、投与直後には下大静脈を非常に明瞭に造影したが(図6)、腫瘍内における造影効果を認めなかった。

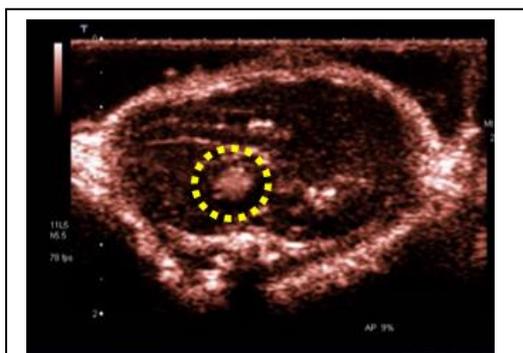


図6. ImmunoNB静脈投与直後の超音波造影画像(マウス腹部)。下大静脈を明瞭に描出した。

⑥ 免疫組織化学染色

ImmunoNBの腫瘍内分布を調べるため、イメージング終了後に腫瘍を摘出して凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。その結果、immunoNBは腫瘍血管周囲に局在しており、腫瘍細胞へ到達できていないことが

明らかとなった。

これらの結果から、腫瘍特異的な超音波造影剤を開発するためには、① immunoNB自体の超音波輝度の向上 ② 腫瘍細胞への到達性の向上が必要であることが示唆された。

〈引用文献〉

① Pisani E. et al. Adv Funct Mater 2008;18:2963-71

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

Achmad A, Yamaguchi A, Tsushima Y: Development of EGFR-targeting Polymer-based Ultrasound Contrast Agents. 第2回 膵・機能画像研究会, 2017年1月, 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

対馬 義人 (TSUSHIMA YOSHITO)
 群馬大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号: 20375546

(2) 研究分担者

花岡 宏史 (HANAOKA HIROFUMI)
 群馬大学・大学院医学系研究科・特任准教授
 研究者番号: 50361390

山口 藍子 (YAMAGUCHI AIKO)
 群馬大学・大学院医学系研究科・寄附講座
 等教員
 研究者番号: 80609032

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし