

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700516

研究課題名（和文）分子標的超音波造影剤を用いた非侵襲的分子イメージング法の開発

研究課題名（英文）Development of ultrasound molecular imaging with targeted-microbubbles

研究代表者：

大谷 健太郎 (KENTARO OTANI)

独立行政法人国立循環器病研究センター 再生医療部 流動研究員

研究者番号：50470191

研究成果の概要（和文）：

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作成の可能性について検討した。Annexin V、アビジン-ビオチン結合を仲介させることにより、Sonazoid の表面に IgG 抗体を付加できることが明らかとなった。今後、Sonazoid を基盤とした分子標的気泡を利用した超音波分子イメージングの臨床応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：

The feasibility of preparation method of antibody-carrying microbubbles based on the clinically available ultrasound contrast agent, Sonazoid was examined. By utilizing the Annexin V and avidin-biotin complex formation, the attachment of IgG antibodies onto the surface of Sonazoid bubbles was feasible. Although the further study should be required, the molecular targeted-bubbles based on Sonazoid might be applicable to the clinical settings for ultrasound molecular imaging in the near future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成 22 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：超音波医科学

## 1. 研究開始当初の背景

超音波造影剤である微小気泡は超音波に対して脆弱であり、超音波照射によって容易に崩壊することが知られている。また、細胞近くで気泡崩壊を起こした場合、近接する細胞の膜透過性を一

時的に亢進させることが明らかとなっており、この特性を利用した超音波と微小気泡の併用による細胞内への薬剤や遺伝子の非侵襲的伝達法の開発が広く行われている。

1998年以降、超音波造影剤の表面に化学的に抗体・ペプチドを結合させ、体内の特定の分子にのみ集積する分子イメージング用造影剤(分子標的気泡)として利用しようとする試みが数多くなされている。近年では、分子標的気泡を利用した炎症性血管病変や新生血管の超音波分子イメージングが動物実験において広く検討されている。しかしながら、分子標的気泡の作成は技術的に難しく、超音波分子イメージングを行える施設は世界的にも少ない。このことが、本法の研究開発の障害になっている。

簡便な分子標的気泡の開発は、将来的に薬剤の内包や気泡表面への薬剤・遺伝子の付加により、体内の特定部位(特定の分子を発現した部位)のみを標的とした Drug Delivery System の開発へとつながる可能性がある。

## 2. 研究の目的

超音波分子イメージングの臨床応用を考慮し、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成を目的とした。実際には、本邦で臨床使用可能な超音波造影剤(Sonazoid、第一三共)を用い、Sonazoidの表面(殻上)に存在するホスファチジルセリン(PS)を足場として、Sonazoidの表面にIgG抗体を接着させ得るか否かについて検討した。

## 3. 研究の方法

(1) PSと特異的に結合することが知られている Annexin V を蛍光標識し、Sonazoid と混合・反応させることで Sonazoid が蛍光標識されるか否か、つまりは Sonazoid と Annexin V が結合するか否かについてフローサイトメトリー

(FACS)により評価した。

(2)次に、ビオチン化した Annexin V を用い、アビジン-ビオチン結合を利用して Sonazoid の表面にストレプトアビジンを結合させ得るか否かについて検討した。Sonazoid とビオチン化 Annexin V を反応させた後、蛍光標識したストレプトアビジンと反応させ、蛍光標識された気泡の有無を FACS で評価した。

(3)次に、Annexin V・アビジン-ビオチン結合を利用して Sonazoid の表面にビオチン化した IgG 抗体を接着させ得るか否かについて検討した。Sonazoid とビオチン化 Annexin V、ストレプトアビジンを順番に反応させた後に、ビオチン化かつ蛍光標識した IgG 抗体と反応させ、蛍光標識された気泡の有無を FACS で評価した。

## 4. 研究成果

Annexin V は PS と  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に結合することが広く知られているため、FACS による検討を始める前に、 $\text{Ca}^{2+}$  の添加が Sonazoid に与える影響について検討した。その結果、 $\text{Ca}^{2+}$  の添加により明らかな気泡の凝集・消失が認められた(図 1A)。これは、 $\text{Ca}^{2+}$  添加により気泡表面の負の電荷が中和され、気泡の安定性を失った結果だと考えられた。また、気泡数を Coulter Counter を用いて定量的に測定した結果、0.05mmol/L 以上の濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  の添加では気泡数の有意な減少が認められた(図 1B)。そのため、以下の検討は全て 0.05mmol/L の  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で行った。

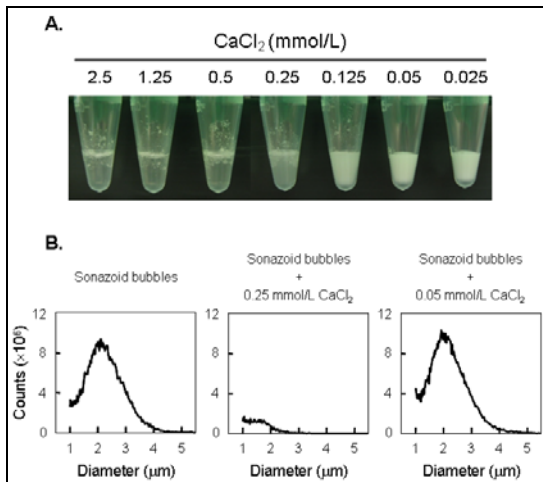


図 1.  $\text{Ca}^{2+}$  添加による Sonazoid 気泡の消失

蛍光標識した Annexin V を Sonazoid に添加・反応させ FACS 解析を行ったところ、蛍光標識された気泡の存在が確認できた。(図 2)。

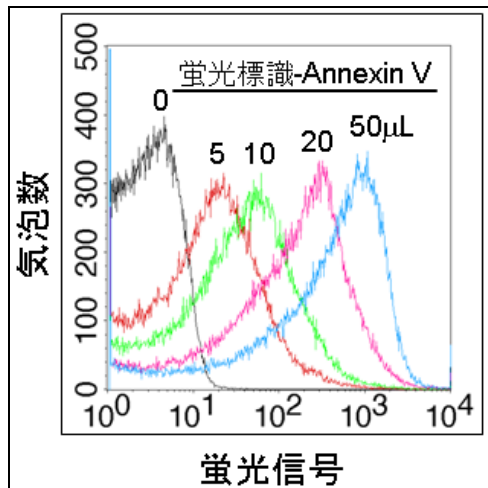


図 2. Annexin V による Sonazoid 中 PS の認識

また、ビオチン化 Annexin V - Sonazoid 複合体とストレプトアビジンの結合も FACS により確認できた(図 3)。ビオチン化 Annexin V を添加しない場合に明らかな蛍光強度の減弱が認められたことから、Sonazoid とストレプトアビジンの結合はアビジン-ビオチン結合を介していることが裏付けられた。

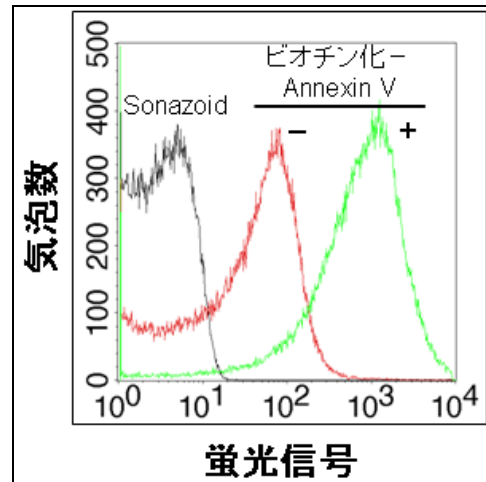


図 3. アビジン-ビオチン結合を介した Sonazoid とストレプトアビジンの結合

最後に、PS を足場とし、Annexin V・アビジン-ビオチン結合を利用することで Sonazoid の殻上に IgG 抗体を接着させることが可能であった(図 4)。

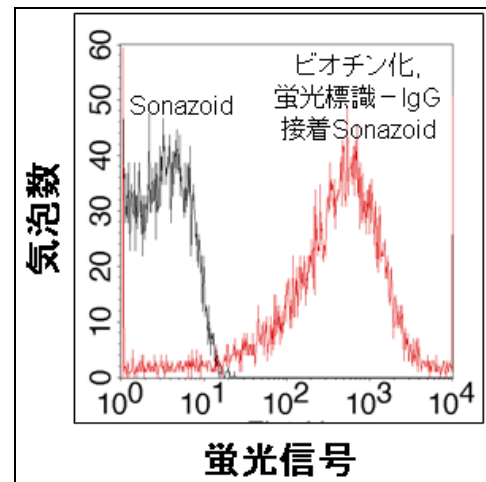


図 4. Sonazoid を基盤とした分子標的気泡

これらの結果より、Annexin V 及びアビジン-ビオチン結合を利用することで、Sonazoid を基盤とした分子標的気泡が作成できる可能性が示唆された。しかしながら、①Annexin V は PS の認識に  $\text{Ca}^{2+}$  を必要とすること、②ストレプトアビジンは免疫原性を有するために生体内へ複数回投与が難しいという問題点が考えられた。そこで、Annexin V に代わる分子として、

Ca<sup>2+</sup>非依存的に PS を認識する分子として知られている Lactadherin (MFG-E8)を用いた分子標的気泡の作成に着手した。

Annexin V と同様に、Lactadherin が Sonazoid 中の PS を認識することが確認できた。また、PS との結合力を比較したところ、Annexin V に比し Lactadherin でより強固であることが確認できた。このことから、Sonazoid を基盤とした分子標的気泡の作成において、Lactadherin は Annexin V よりも有用な分子である可能性が示唆された。

今後、Lactadherin を用いた分子標的気泡作成法の最適化、その安全性や医学的有用性の検討など更なる検討が必要だが、Sonazoid を基盤とした分子標的気泡を用いた超音波分子イメージングの臨床応用が可能となる日が来るかもしれない。

#### 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 1 件)

Otani K, Yamahara K. Development of antibody-carrying microbubbles based on clinically available ultrasound contrast agent for targeted molecular imaging: a preliminary chemical study. **Mol Imaging Biol** 2011;13:250-6.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 大谷 健太郎、山原 研一、池田 智明. Sonazoid を基盤とした分子標的微小気泡の開発. 第 35 回コントラストエコー研究会.
- ② Otani K, Yamahara K. Development of antibody-carrying microbubbles based on clinically available ultrasound contrast agent for targeted molecular imaging. American Heart Association Scientific Meeting 2009.
- ③ 大谷 健太郎、山原 研一、池田 智明. Sonazoid を基盤とした分子標的微小気泡の開発. 日本超音波医学会第 83 回学術集会.
- ④ Otani K, Yamahara K. Development of antibody-carrying microbubbles based on Sonazoid for ultrasound molecular imaging.

第 12 回国際造影超音波シンポジウム  
[図書] (計 1 件)

Otani K. InTech. Ultrasound Imaging, 2011, in press.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)  
なし

○取得状況 (計 0 件)  
なし

[その他]

第 12 回国際造影超音波シンポジウム  
Best Presentation Award 受賞

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大谷 健太郎 (KENTARO OTANI)  
独立行政法人国立循環器病研究センター  
再生医療部・流動研究員  
研究者番号: 50470191

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし