

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591809

研究課題名(和文) PLGA微小気泡による新しい腫瘍特異性超音波造影剤の開発

研究課題名(英文) Development of novel tumor-specific PLGA microbubble ultrasound contrast media

研究代表者

対馬 義人(Tsushima, Yoshito)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・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)：Poly-D,L-lactide-co-glycolide (PLGA) microbubbleを悪性腫瘍特異性抗体で標識することにより、新しい腫瘍特異性超音波造影剤を開発し、さらにdrug-delivery agentとして利用するための基礎的検討を行った。PLGAをシェルとし、perfluorooctyl bromide (PFOB)を内包したnanobubble (NB; 67nm程度)を作成し、これを抗EGFR抗体(Cetuximab; CTX)で標識し、CTX-NBとした。このCTX-NBはin vitroにてMDA-MB-231ヒト乳癌細胞に特異的に内在化されることを確認した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop a novel ultrasound contrast media which specifically accumulates into malignant tumors, and also acts as a drug-delivery agent. After several attempts, Cetuximab-labelled nanobubble (CTX-NB) was successfully synthesized. Cetuximab is the monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor (EGFR). CTX-NB has a shell of Poly-D,L-lactide-co-glycolide (PLGA), and contains perfluorooctyl bromide (PFOB). Specific accumulation and internalization of CTX-NB were microscopically confirmed in vitro using cultured EGFR-positive MDA-MB-231 human breast cancer cells.

研究分野：放射線診断学

キーワード：超音波断層法 超音波造影剤 マイクロバブル 抗EGFR抗体 Cetuximab drug-delivery agent

1. 研究開始当初の背景

昨今、悪性腫瘍に対する分子標的治療薬の活躍は目覚ましいものがある。それらには、bevacizumab (Avastin)に代表される、血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)に対するモノクローナル抗体であり、その受容体(VEGF receptor; VEGF-R)への結合を阻害することにより効果を発揮するものや、sunitinib (Sutent)に代表される VEGF-R のチロシンキナーゼの作用を阻害するものなど多くの薬剤が試されている。これら分子標的治療薬は、腫瘍細胞自体へ作用するものではなく、腫瘍細胞から過剰に産生される VEGF の作用を阻害するものである。

これら分子標的治療薬には一定の効果が認められる一方、重篤な副作用も知られており、その適応には慎重である必要である。また、治療効果が認められない場合には早期に投与を中止するなどの対応がなされることが望ましい。しかしながら、VEGF-R 等の腫瘍特異性抗原発現の程度を知るには一般に病理組織検査が必要であり、非侵襲的に判定するための画像診断技術は確立していない。また分子標的治療薬においては、治療により効果があると臨床的に考えられても、腫瘍の縮小が見られない事がしばしばあり、その効果を客観的に判定することが難しい。

Dynamic MRI 等を用いて腫瘍の血流量を定量化したり、FDG-PET を用いて分子標的治療薬の適応判断、治療効果判定を行おうとする試みも見られるが、これら方法はいずれも腫瘍特異性抗原の発現そのものを評価しているわけではない。従って、臨床現場で簡便にかつ非侵襲的に腫瘍特異性抗原の発現、及び分子標的治療薬の適応決定、治療効果判定を行える画像診断法が渴望されており、そのためには腫瘍特異性抗原に特異性を持つ何らかの新たな造影剤を開発が必要である。

現在使用可能な超音波造影剤にはいくつかあるが、臨床現場で主に利用されているのは Sonazoid である。これは脂質のシェルを持ち、難溶性のガスである perflubutane を容れた微小気泡 (microbubble) である。リアルタイム性に優れた画像を得ることができ、dynamic study を行うことにより腫瘍の血流評価を行うことができる。harmonic imaging 法を用いるとその感度は極めて高く、直径 10 μ 程度の microbubble の一つ一つをリアルタイムで認識可能な程である。しかしながら、既存の超音波造影剤は腫瘍に特異的に集積するわけではない。

腫瘍特異性抗原は種々のものが知られており、microbubble としての超音波造影剤をこれらに対する抗体にて標識することが可能であれば、腫瘍の陽性造影剤として利用可能であると考えられる。

原発性・転移性肝腫瘍のみならず、リンパ節転移や乳癌、甲状腺癌など、超音波検査が

可能である部位の悪性腫瘍であれば、簡便かつ非侵襲的に腫瘍特異性抗原の発現、及び分子標的治療薬の適応決定、治療効果判定を行うことができ、また同時に血流評価も可能となる。さらにそのような造影剤には必然的に drug-delivery agent としての利用が可能である可能性を持っている。臨床的有用性は非常に高いと考えられる。

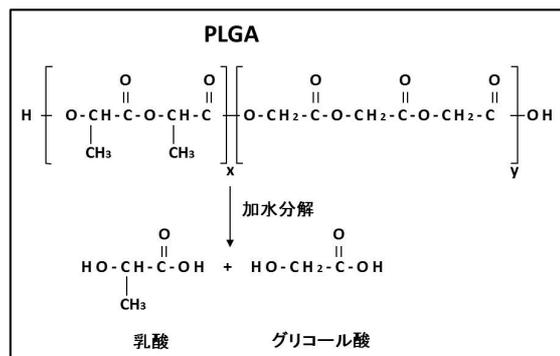
2. 研究の目的

Poly-D,L-lactide-co-glycolide (PLGA) microbubble を悪性腫瘍特異性抗体で標識することにより、新しい腫瘍特異性超音波造影剤を開発し、さらに drug-delivery agent として利用するための基礎的検討を行う。

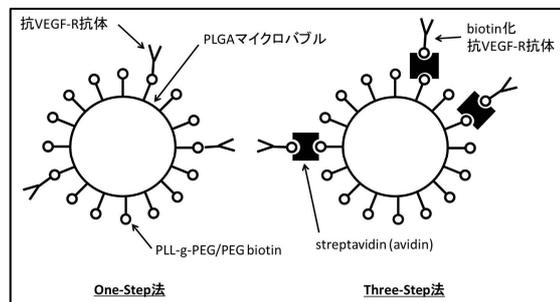
3. 研究の方法

1) PLGA microbubble の作成と標識

Poly-D,L-lactide-co-glycolide (PLGA)は、Lupron Depot や Zoladex などの薬剤の徐放剤の基材としてすでに広く臨床応用されている。乳酸を脱水結合することによって得られるポリマー（高分子重合体）であり、人体に対する安全性は確立されており (Straub JA, et al. J Control Release, 2005)、また内部にガスを充填することもできる。さらに PLGA microbubble には各種抗体を結合させることが可能であり、腫瘍特異性超音波造影剤を作成するにあたって極めて適切な材料である。



標識には one-step 法と three-step 法を計画したが、実際には後者を選択することとした。



作成した PLGA microbubble-PLL-g-PEG/PEG biotin に streptavidin (avidin) を結合させ、これに biotin 化した抗体を結合させる。fluorescence-labeled streptavidin を用いて正しく標識されていることを、蛍光抗体法を用いて確認する。形状の確認は transmission electron microscopy (TEM) を用い、粒子径、polydispersity index (PDI)、Zeta potential の測定は dynamic light scattering method を用いる。またゼラチン内に包埋することによってファントムを作成し、高周波プローベ (15MHz) を接続した超音波装置 (Avius, Hitachi Medical Co., Tokyo, Japan) にて実際に画像化し、エコー輝度の上昇を確認する。

2) 培養内皮細胞を用いた染色性の確認 (in vitro study)

培養内皮細胞が標識 PLGA-microbubble にて染色されることを in vitro にて蛍光抗体法を用いて確認する。

3) 腫瘍を移植した動物 (nude mouse) における腫瘍特異性造影剤としての機能の確認 (in vivo study)

マウスの皮下に腫瘍を移植し、最大径 5mm-1cm 程度まで成長させた後、超音波装置にてイメージングを行う。標識 PLGA-microbubble を造影剤として急速静注し、腫瘍の造影効果をリアルタイムで画像化する。これより 1 時間以上放置することにより、標識 PLGA-microbubble が腫瘍内皮細胞に結合した状態 (平行相) で同様にイメージングを行う。この後、病理学的検討を行う。

4. 研究成果

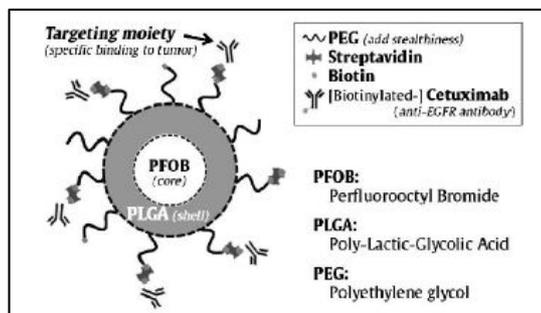
PLGA-microbubble の作成は容易であり、十分な収率をもって作成可能であったが、その大きさは概ね 540nm であり、毛細血管壁を通過しない大きさである。腫瘍への集積を目的とするのであれば間質へ拡散可能な大きさであることが望ましい。そのため microbubble をさらに小径とする試みを行い、これを特に nanobubble (NB) と呼ぶこととした。内部には perfluorooctyl bromide (PFOB) を封入することとした。

TEM による観察では、内部がガスであると PLGA-NB は球形とならずどろり形であり、構造的に不安定と考えられたが、PFOB を封入すると PLGA-NB は表面がスムーズな球形となり、67nm 程度の大きさとなった。

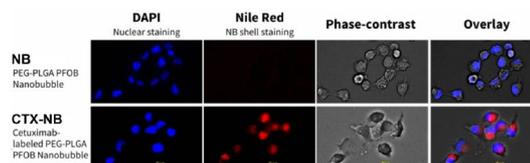
これをゲル内に封入して超音波検査装置を用いて観察したところ、視認性は良好であり、MI=0.5 程度まで明らかな崩壊は観察されず、Sonazoid と比較しても十分に臨床利用に耐えうる強度をもつと考えられた。

この PLGA-PFOB-NB に streptavidin (avidin) を介して抗 EGFR 抗体 (Cetuximab; EGFR に結合し、EGFR の活性化・二量体化

を阻害するモノクローナル抗体) で標識し、CTX-NB とした。



次に、EGFR(+)であることが知られている MDA-MB-231 ヒト乳癌細胞を培養し、CTX-NB (1mg/ml) を加えて fluorescence microscopy にて観察したところ、CTX-NB の癌細胞内への内在化を確認し、同時にコントロールとしての未標識の NB ではこの現象が全く認められないことも確認した。これは CTX-NB の腫瘍選択性が発揮されたことを示しており、理想的な結果といえる。



この癌細胞を nude mouse に異種移植し、in vivo での検討を行った。静注直後からリアルタイムにて観察したところ、CTX-NB が腫瘍に到達する様子を視認可能であった。

組織学的検討では、CTX-NB が腫瘍内の主に潰瘍あるいは壊死周囲に蓄積している様子が観察されたが、その腫瘍内蓄積は不十分である印象であった。

なぜ腫瘍の潰瘍あるいは壊死周囲に多く集積するのかが不明であり、腫瘍の vascularity や血管の permeability などとも関連していると推察している。潰瘍あるいは壊死の存在によって炎症が併存した場合、周囲血管の透過性は亢進すると考えられ、このことは今回作成した CTX-NB のサイズをさらに小さくすることが必要であることを示唆しているのかもしれない。

CTX-NB が腫瘍に一定の選択性をもって集積していることは確認できたが、その集積機序には今回検討されていない種々の要素が関与していると推察され、さらなる検討が必要である。

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. Heryanto YD, Achmad A, Taketomi-Takahashi A, Tsushima Y: *In vivo* molecular imaging of cancer stem cells. Am J Nucl Med Mol Imaging 2015; 5: 14-26.

2. Achmad A, Taketomi-Takahashi A, Tsushima Y: Current developments and clinical applications of bubble technology in Japan: a report from 85th Annual Scientific Meeting of The Japan Society of Ultrasonic in Medicine, Tokyo, 25-27 May, 2012. Med Ultrason 2013; 15(2):140-6.

〔学会発表〕(計 1 件)

1) Achmad A, 山口藍子, 宮崎将也, 中島崇仁, Huda M, 保坂純男, 対馬義人. 腫瘍特異的超音波造影画像化のためのポリマー・ベース PFOB immuno ナノバブル. 日本超音波医学会第 88 回学術集会. 2015.5.22 東京

2) Achmad A, Yamaguchi A, Nakajima T, Huda M, Hosaka S, Tsushima Y. Development of an echogenic and intratumor-specific polymer-based PFOB immunonanobubbles for targeted ultrasound contrast agent. The World Molecular Imaging Congress 2014.9.20 Seoul, South Korea.

3) Achmad A, Yamaguchi A, Miyazaki M, Horisoko E, Taketomi-Takahashi A, Higuchi T, Tsushima Y. A preliminary report on HER1-targeted PEGylated PLGA immunonanobubbles as an intratumor-specific targeted ultrasound contrast agent. 2012 The World Molecular Imaging Congress 2012.9.5 Dublin, Ireland.

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放射線診断
核医学分野・教授
研究者番号 : 20375546

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

Arifudin Achmad
群馬大学大学院医学系研究科放射線診断
核医学分野・助教
研究者番号 : 30757381