

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 医薬品等規制調和・評価研究事業  
(英語) Research on Regulatory Science of Pharmaceuticals and Medical Devices

研究開発課題名 : (日本語) 診断用超音波造影剤の特徴を活かした低侵襲かつ局所選択的超音波治療法の開発に関する研究  
(英語) Development of non-invasive and region-selective ultrasound-mediated theranostics using clinically available ultrasound contrast agent.

研究開発担当者 (日本語) 国立循環器病研究センター研究所 再生医療部 上級研究員 大谷健太郎  
所属 役職 氏名 : (英語) National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, Staff Scientist, Kentaro Otani

実施期間 : 平成 28年 4月 1日 ~ 平成 29年 3月 31日

分担研究 (日本語)  
開発課題名 : (英語)

研究開発分担者 (日本語)  
所属 役職 氏名 : (英語)

## II. 成果の概要（活動総括概要）

### 和文

本研究では、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簡便な作製法の開発および物性評価と、腫瘍血管および新鮮血栓に対する超音波分子イメージングの開発、ならびに、それらを基盤とした新たな腫瘍血管に対する遺伝子・薬剤導入法や高効率な血栓溶解療法の開発を目標に検討を行った。

先行研究にて研究開発担当者らは、Sonazoid と生体内タンパクである Lactadherin を結合させることにより、Sonazoid の表面に RGD 配列(Arg-Gly-Asp)を付与することが可能で、血管新生に重要な因子であるインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  に特異的な分子標的気泡(Sonazoid-lactadherin 複合体)として機能する可能性があることを報告した。本研究ではまず、洗浄・遠心分離操作が不要な、簡便な Sonazoid-lactadherin 複合体の作製法を確立するために、Sonazoid と Lactadherin の最適な混合比率を FACS 解析により算出した。次に、その結果から、特定の混合比率で Sonazoid と Lactadherin を混合することで、簡便に Sonazoid-lactadherin 複合体が作製可能なことを見出し、かつ、Lactadherin による表面修飾が Sonazoid の超音波に対する反応性や Sonazoid の表面電位に影響を与えないことを明らかにした。併せて、将来の Sonazoid-lactadherin 複合体の臨床応用を見据えて、健常人における血中 Lactadherin の濃度測定を実施し、Sonazoid-lactadherin 複合体中の Lactadherin 含有量の妥当性についても検討を行った。また、Sonazoid-lactadherin 複合体のインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  を発現する腫瘍血管に対する分子標的性を、ヒト卵巣腺腫 (SK-OV-3) 細胞を皮下移植した担癌マウスモデルを用いた検討にて明らかにした。

近年、活性化血小板上の糖タンパク GPIIb/IIIa を標的とした RGD ペプチドを用いた血栓イメージングが核医学領域を始めとして広く行われていることから、腫瘍血管に対する分子標的性の検討と並行して、Sonazoid-lactadherin 複合体の活性化血小板に対する分子標的性についても検討することとした。これまでに、ヒト血餅に対する Sonazoid-lactadherin 複合体の分子標的性を検討するための *in vitro* 実験系の整備、ならびに動脈血栓に対する Sonazoid-lactadherin 複合体の分子標的性を検討するための頸動脈血栓モデルマウスの確立と、直径 1mm 足らずのマウス頸動脈における超音波分子イメージングの実験系の整備を完了した。

従来、リン脂質含有気泡が炎症細胞、特に活性化白血球に高率に接着することが知られており、リン脂質であるホスファチジルセリンを気泡殻に含有する Sonazoid は、それ自身が活性化白血球に対する分子標的気泡になりうる可能性がある。そのため、Sonazoid-lactadherin 複合体の分子標的気泡としての実現可能性の検討と並行して、Sonazoid の活性化白血球に対する分子標的気泡としての実現可能性についても検討を開始した。現在までに、腎臓虚血再灌流モデルマウスの確立とマウス腎臓における超音波分子イメージングの実験系の整備をほぼ終了した。

本研究により、Sonazoid-lactadherin 複合体のインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  を発現する腫瘍血管に対する分子標的性を明らかにするとともに、Sonazoid-lactadherin 複合体の血栓に対する分子標的性を検討する *in vitro* および *in vivo* 実験系の整備、ならびに Sonazoid の炎症細胞に対する分子標的性を検討する *in vivo* 実験系の整備を終えることができた。今後、これらの実験系を駆使し、Sonazoid あるいは Sonazoid-lactadherin 複合体を用いた超音波分子イメージングの確立と、それを基盤とした新たな超音波治療法の開発を進めて行く予定である。

The diagnostic utility of ultrasound molecular imaging with targeted bubbles has been demonstrated in numerous animal models of cardiovascular diseases and tumors. Although, a lot of targeted bubbles have been developed, however the number of clinically translatable one is few. Recently, we developed the clinically translatable targeted bubbles based on Sonazoid (perfluorobutane gas microbubbles stabilized by a membrane of hydrogenated egg phosphatidylserine (PS)), an ultrasound contrast agent approved in several countries. By conjugating Sonazoid with an endogenous secreted glycoprotein (lactadherin), Sonazoid acquires a capability to expose the RGD (arginine–glycine–aspartate) motif on its surface (lactadherin-bearing Sonazoid). Because the RGD motif binds preferentially to  $\alpha_v\beta_3$  integrin, which is known to play a key role in angiogenesis, lactadherin-bearing Sonazoid has an ability to bind to  $\alpha_v\beta_3$  integrin-expressing cells. However, the targetability of lactadherin-bearing Sonazoid to the  $\alpha_v\beta_3$  integrin-expressing tumor vessels is still unknown. In the present research, we aimed to develop the simplified preparation of  $\alpha_v\beta_3$  integrin-targeted bubbles based on Sonazoid and to examine the targetability of lactadherin-bearing Sonazoid to the  $\alpha_v\beta_3$  integrin-expressing tumor vessels using a human ovarian adenocarcinoma (SK-OV-3) mouse xenograft model. Our results suggest that the lactadherin-bearing Sonazoid is prepared easily without the complicated washing and centrifugation process. In addition, the lactadherin-bearing Sonazoid would be a novel clinically translatable targeted bubble for  $\alpha_v\beta_3$  integrin-expressing vessels.

Recently, the usefulness of cyclic RGD-bearing bubbles for visualizing thrombosis has been examined. Therefore, we also planned to examine the targetability of lactadherin-bearing Sonazoid to the Glycoprotein IIb/IIIa-expressing activated platelet. For this purpose, the ferric chloride-induced thrombosis mouse model was developed, and the ultrasound imaging system was optimized for visualizing the mouse carotid artery.

It has been well known that the PS-containing lipid microbubbles are useful targeted-bubble for activated leukocyte. Because PS is one of the components of Sonazoid, Sonazoid itself has a potential to be a targeted bubble for activated leukocyte. To test this hypothesis, renal ischemia/reperfusion mouse model was developed, and the ultrasound imaging system was optimized for visualizing the mouse kidney.

In this project, we developed the simplified preparation method of lactadherin-bearing Sonazoid, and confirmed the targetability of lactadherin-bearing Sonazoid to the  $\alpha_v\beta_3$  integrin-expressing vessels. In addition, several in vitro and in vivo settings for examining the targetability of Sonazoid or lactadherin-bearing Sonazoid were optimized. The further continuous studies should be required to examine the potential of Sonazoid or lactadherin-bearing Sonazoid as a clinically translatable targeted bubble for cardiovascular disease.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Simplified preparation of targeted bubbles for  $\alpha_v\beta_3$  integrin based on a clinically available ultrasound contrast agent: Validation in a tumor-bearing mouse model. Moderated Poster 発表, Kentaro OTANI. The 22nd European Symposium on Ultrasound Contrast Imaging, 2017/01/20, 国外.
2. Sonazoid を用いた腫瘍血管に対する超音波分子イメージングの開発. 口頭発表、大谷健太郎、平成 28 年度 第 4 回超音波分子診断治療研究会、2017/03/11、国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし