

Feasibility of lactadherin-bearing clinically available microbubbles as an ultrasound contrast agent for angiogenesis

Kentaro Otani

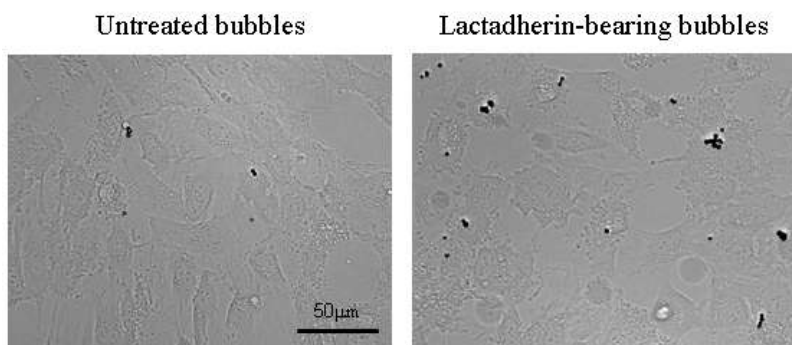
Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering,
National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Japan

Background: Phagocytosis of apoptotic cells by phagocytes is carried out by bridging the phosphatidylserine (PS)-expressing apoptotic cells and integrin $\alpha\beta3$ -expressing phagocytes with lactadherin. The aim was to examine whether the microbubbles targeted to integrin $\alpha\beta3$ could be produced by conjugating PS-containing clinically available microbubbles (Sonazoid) with lactadherin.

Methods: FACS analysis was performed to elucidate whether the lactadherin binds with Sonazoid bubbles or integrin $\alpha\beta3$ -expressing cells (HUVECs). The attachment of Sonazoid bubbles to HUVECs was examined by using parallel plate flow chamber. The number of attached bubbles was compared before and after conjugating with lactadherin.

Results: By increasing the dose of lactadherin, the number of lactadherin-bearing Sonazoid bubbles became larger. It was noteworthy that the size of Sonazoid bubbles did not change even after conjugating with lactadherin (2.90 ± 0.04 vs. 2.81 ± 0.02 μm). The binding between lactadherin and HUVECs were also confirmed by the FACS analysis. The parallel plate flow chamber study revealed that the attachment of Sonazoid bubbles to HUVECs was augmented by conjugating with lactadherin (12.1 ± 6.0 vs. 58.7 ± 33.1 bubbles) (Figure).

Conclusion: Because the integrin $\alpha\beta3$ is well known to play a key role in angiogenesis, the lactadherin-bearing Sonazoid bubbles has a feasibility to be a clinically translatable targeted ultrasound contrast agent for angiogenesis.



ラクトアドヘリン修飾 Sonazoid の新生血管特異的超音波造影剤としての可能性

大谷健太郎

国立循環器病研究センター研究所 再生医療部

【背景と目的】超音波分子イメージングを用いて、生体内分子の動態を非侵襲的に観察することが可能である。しかし、臨床使用可能な分子標的気泡は現在のところ皆無である。Sonazoid は気泡殻にホスファチジルセリン(PS)を含有する、本邦で臨床使用可能な超音波造影剤である。ラクトアドヘリン(Lactadherin)は、マクロファージ上のインテグリン $\alpha\beta3$

とアポトーシス細胞の細胞膜に露出した PS とを橋渡しする、アポトーシス過程において重要な分子である。本研究の目的は、Sonazoid-lactadherin 複合体がインテグリン $\alpha\beta3$ に対する標的気泡になり得るか否かについて検討することである。

【方法】最初に、Sonazoid(第一三共)と lactadherin を混合することで、Sonazoid-lactadherin 複合体が形成されるか否か検討した。Sonazoid(100 μ L)と蛍光標識した lactadherin を室温で 15 分間反応させ、FACS 解析により気泡からの蛍光強度の測定を行った。併せて、lactadherin との結合による Sonazoid の気泡径の変化をコールターカウンターにより検討した。次に、インテグリン $\alpha\beta3$ 発現細胞であるヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)と lactadherin が結合するか否か FACS で評価を行った。最後に、HUVEC に対する Sonazoid の接着が lactadherin の仲介によって増強するか否かについて、parallel plate flow chamber の実験系を用いて評価した。

【結果】Sonazoid から得られる蛍光強度は lactadherin の添加量に依存して上昇した(0 μ g, 3.1 \pm 0.1 vs. 1 μ g, 60.1 \pm 7.3 vs. 5 μ g, 159.9 \pm 10.1)。Sonazoid の気泡径は、lactadherin との複合体を形成しても有意に増大することはなかった (Sonazoid, 2.90 \pm 0.04 vs. Sonazoid-lactadherin, 2.81 \pm 0.02 μ m)。FACS 解析の結果、lactadherin と HUVEC との結合も確認できた。最後に、HUVEC に接着した Sonazoid の気泡数は、lactadherin の仲介により約 5 倍に増加した (Sonazoid, 12.1 \pm 6.0 vs. Sonazoid-lactadherin, 58.7 \pm 33.1 個)。

【結語】血管内皮細胞上に発現するインテグリン $\alpha\beta3$ は血管新生において重要な分子であることが従来から知られており、本研究の結果から Sonazoid-lactadherin 複合体がインテグリン $\alpha\beta3$ を標的とした、新生血管に対する特異的超音波造影剤になり得る可能性が示唆された。

質疑応答

質問 Sonazoid-lactadherin 複合体を病態モデル動物に投与したことはあるか？
応答 まだ検討していないが、虚血性心疾患モデル動物に対する血管新生療法の治療効果判定や、腫瘍イメージング用の造影剤としての利用可能性について今後検討したい。

質問 Sonazoid-lactadherin 複合体を使った超音波分子イメージングは臨床応用可能か？
応答 本研究の結果、Lactadherin との混合が Sonazoid の気泡径を増大させないことが明らかとなったため、Sonazoid-lactadherin 複合体の生体への投与は、Sonazoid と同様に安全だと考えられる。Sonazoid は日本で既に臨床使用されている超音波造影剤であるが、循環器領域における使用は認可されていない。そのため、今後循環器領域へ Sonazoid の使用が適応拡大されれば、Sonazoid を基盤とした超音波分子イメージングの臨床応用は可能になるのではないかと考えている。

コメント ネブラスカ大学の Thomas R. Porter 先生から、「臨床使用可能な超音波造影剤を使っている点は非常に重要かつ興味深い」とコメントを頂きました。