

200500713A

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

超音波を利用した siRNA 内包バブルリポソームの
がん局所療法の臨床試験導入に関する研究

平成 17 年度 総括研究報告書

主任研究者 松村 保広

平成 18 (2006) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
超音波を利用した siRNA 内包バブルリポソームの がん局所療法の臨床試験導入に関する研究	1
松村 保広	
II. 分担研究報告	
1. siRNA の選定と臨床試験導入用動物実験モデルの作製に関する研究	6
松村 保広 小泉 史明	
2. 分子標的バブルリポソームに最適化された低侵襲治療装置の開発に関する研究	10
小玉 哲也	
3. 分子標的バブルリポソームに最適化された低侵襲治療装置の開発に関する研究	12
丸山 一雄	
4. 臨床試験導入用動物実験モデルの作製、siRNA のデザインならびに 前臨床評価に関する研究	16
古市 泰宏 嶋本 顕	
5. 標的バブルリポソームに最適化された低侵襲治療装置の開発に関する研究	19
立花 克郎	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	22
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

総括研究報告書

超音波を利用した siRNA 内包バブルリポソームのがん局所療法の臨床試験導入

主任研究者 松村 保広

（国立がんセンター東病院 臨床開発センター がん治療開発部）

静脈投与による全身療法としての遺伝子あるいは核酸治療の臨床試験はすべて失敗している。局所投与であれば臨床応用も可能との考えから、本研究では、臨床的に意義がある臨床モデルとして肝がんに対する遺伝子肝動注療法、脳腫瘍に対する動注療法および表在性膀胱がんに対する遺伝子膀胱注療法のモデル系確立をめざした。バブルリポソームと超音波を用いた分子導入法では、キャビテーション気泡の衝撃圧と細胞膜との干渉を理論と分子動力学 (MD) シミュレーションで明らかにし、また、細胞実験、マウスを使った動物実験では、分子導入に関わる物理条件の最適化をおこなった。

小泉史明	国立がんセンター東病院	室長
小玉哲也	東北大学先進医工学研究機構	助教授
丸山一雄	帝京大学薬学部	教授
立花克郎	福岡大学医学部	教授
古市泰宏	ジーンケア研究所	研究所長
嶋本 顕	ジーンケア研究所	

A. 研究目的

遺伝子治療を臨床へ導入するためには、標的とするがん種の選定と、前臨床における実験モデル構築が重要である。本研究ではヒト肝がんそして脳腫瘍に対する動注療法および表在性膀胱がんに対する膀胱注療法の確立とそれに使用するキャリアおよび標的遺伝子を決定することである。またバブルリポソームと超音波を併用し

た分子導入法では、バブルリポソームの崩壊で発生するキャビテーション気泡が分子導入の機序に関与すると考えられている。キャビテーション気泡は空洞化現象で、発生と崩壊時に衝撃圧が発生する。衝撃圧は細胞膜と干渉し膜構造を変化させ、外来分子はこの構造変化に誘起された形で細胞内に導入される。本研究では、キャビテーション気泡の衝撃圧の制御を目的として理論的解析、分子動力学シミュレーションをおこなった。また、細胞実験、マウスを使った動物実験により分子導入に関わる物理条件の最適化をおこなった。

B. 研究方法

1) 体外から各臓器への腫瘍生着を確

認するため、ヒト肝がん細胞株、ヒト脳腫瘍株、ヒト膀胱がん細胞株に対してルシフェラーゼ発現プラスミドを導入した。またルシフェラーゼ発現各種肝がん細胞をヌードマウスの肝臓皮膜下に移植した。ルシフェラーゼ発現脳腫瘍細胞はヌードラット大脳の前頭葉に移植した。ルシフェラーゼ発現膀胱がん細胞はヌードマウスの膀胱へ挿入された。

各臓器におけるがんの着床は、**photon imager**にて **photon** をカウントして、定性的かつ定量的に確認した。

2) 膀胱療法に関しては、超音波バブル法により、膀胱内腫瘍への膀胱注入遺伝子デリバリーの実験を行った。プラスミドとマイクロバブルを注入し、直ちに、マウス膀胱に超音波を 30 秒間外部照射した。超音波の条件は周波数 94.750、**duty ratio**20%、出力 20Vrms で行った。この遺伝子導入後 3 日目、6 日目に **photon imager** で遺伝子導入効率を確認した。

3) ターゲット分子については、肝がんはアポトーシス関連分子、あるいは **RecQ** ヘリカーゼ遺伝子について検討した。脳腫瘍については上皮性成長因子 (**EGFR**) あるいは **splicing** 変異体 **EGFR vIII** が高発現することが知られているので、それぞれの遺伝子をレトロウィルスベクターに **integrate** し、それぞれの強制発現株をつくった。それ

ぞれの強制発現株に対する **siRNA** の発現抑制効果を調べた。

4) 気泡の運動と衝撃波伝播の理論的解析および分子動力学シミュレーション：一次の音響モデル **Keller-Miksis** 方程式を使用し、気泡の運動を解析した。数値計算には 4 次精度の **ルンゲ・クッタ**法を用いた。衝撃波のエネルギーは、音響近似から求めた。衝撃波と細胞膜との干渉問題を分子レベルで明らかにするために分子動力学シミュレーションをおこなった。細胞膜を単純化するために、水分子で挟まれた脂質二重層と衝撃波との干渉問題を考える。衝撃波は力積として表現した。**In vivo** および **in vitro** 実験では、ナノバブルとしてアルブミン気泡、ミセル気泡、リポゾーム気泡を使用した。細胞毒性は **MTT** アッセイ、分子導入効率はルシフェラーゼアッセイでおこない、生体内の遺伝子の解析はリアルタイムイメージング法でおこなった。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は、動物倫理委員会の了承を得て、動物愛護の観点から実施した。

C. 研究結果

1) ルシフェラーゼ発現細胞 3 日目、7 日目に移植した肝、脳あるいは膀胱に一致して、**photon imager** にてルシフェラーゼ発現を確認することができ、本系が今後遺伝子デリバリーの実験

系として応用可能であることが明らかとなった。

2) 超音波プローブと lipid bubble を組み合わせた遺伝子導入6日後にマウス膀胱でのルシフェラーゼ発現を photon imager で確認することができた。また同膀胱を抗ルシフェラーゼ抗体にて免疫染色することにより、腫瘍表面のルシフェラーゼ発現を確認することができた。

3) ターゲット分子に関しては、肝臓がんでは抗アポトーシス分子である Bcl-x1 あるいは XIAP の高発現がおきており、それらの発現を siRNA を用いて抑制することで、CDDP、DXR、MMC、CPT-11 などの抗がん剤の感受性が増強することを確認した。。ヒト脳腫瘍では EGFRvIII の特異的 siRNA および EGFR、EGFR vIII の両者に効果のある siRNA を作製し、強制発現細胞において、それぞれに対する発現の抑制を確認した。また RecQ ヘリカーゼの siRNA で肝臓がんモデルにおける抗腫瘍効果を認めた。

4) 遺伝子発現特性は超音波の圧力、Duty 比、パルス数、圧力の空間分布、マイクロ気泡の種類に依存し、これらのパラメータを最適化することで分子導入効率が改善されることが示された。分子導入の機序にはキャビテーション気泡が発生する衝撃波が関与すると仮説を立て、超音波場でのキャ

ビテーション気泡を理論解析し、細胞膜損傷を誘起する衝撃波の伝播距離を明らかにした。分子レベルでの衝撃波と細胞膜との干渉を明らかにするために分子動力学シミュレーションをおこなった。衝撃波の干渉で脂質二重膜の構造変化が引き起こされ、この変化に誘導されて外来分子が細胞内に導入されることが示された。

D. 考察

2005 年の米国臨床腫瘍学会においては、PKC アンチセンスさえも臨床的有用性を証明することはできなかった。ところで、ヒト肝臓がんは他臓器に転移することは少ないが、終末像として肝臓全体に拡がり、肝不全で死亡する。このような肝臓がんのステージにおいては現在有効な治療法はない。ヒト肝臓がんは肝動脈で栄養されているので、抗腫瘍剤の肝動注により肝臓内の肝臓がんをコントロールすることは生存を延ばすことにつながる。脳腫瘍も脳内の腫瘍をコントロールが臨床的に意義がある。また、膀胱がんは外科的に切除しても再発しやすいことで有名であり、術後再発を抑えることは患者の QOL の向上および延命へとつながる。

本研究では、ヌードマウスあるいはラットの肝臓あるいは脳にヒト肝臓がんあるいは脳腫瘍と同様なそれぞれの動脈栄養の固形腫瘍を作り実験的動注

モデルを作製し、ターゲット遺伝子の発現効率および治療効果を検討する系を確立した。また、膀胱がんに対する遺伝子膀胱注モデル実験系も確立した。また膀胱腫瘍モデルにおいて世界ではじめて遺伝子の超音波バブル法による遺伝子デリバリーに成功した。

E. 結論

本研究においてヒト肝臓がんあるいは脳腫瘍を標的とする遺伝子動注実験モデルおよびヒト膀胱がんを標的とする遺伝子膀胱注実験モデルの構築に成功した。今後さらに遺伝子キャリアとして、今回評価しなかったリポソームやリポソーム以外のキャリアについて検討を重ねるべきである。遺伝子発現特性は超音波の圧力、Duty 比、パルス数、圧力の空間分布、マイクロ気泡の種類に依存し、これらのパラメータを最適化することで分子導入効率が改善されることが示された。分子導入の機序にはキャピテーション気泡が発生する衝撃波が関与すると仮説を立て、超音波場でのキャピテーション気泡を理論解析し、細胞膜損傷を誘起する衝撃波の伝播距離を明らかにした。分子レベルでの衝撃波と細胞膜との干渉を明らかにするために分子動力学シミュレーションをおこなった。衝撃波の干渉で脂質二重膜の構

造変化が引き起こされ、この変化に誘導されて外来分子が細胞内に導入されることが示された。分子導入手法を最適化することで気泡の衝撃圧を制御して、分子導入効率が改善されることが示された。また、標的遺伝子としては DNA ヘリカーゼにしぼりその siRNA の作製および評価を行い、将来の臨床試験をめざす。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. Y Bae, Matsumura Y, et al. Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-Triggered Drug Release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy. Bioconjugate Chem.2005,16:122-130.
2. T Hamaguchi, Y Matsumura, et al. NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend in vivo antitumour activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel. Brit J Cancer. 92:1240-1246, 2005.
3. H Uchino, Y Matsumura et al. Cisplatin-Incorporating Polymeric Micelles (NC-6004) Can Reduce Nephrotoxicity and Neurotoxicity of

- Cisplatin in Rats. Brit J Cancer. 93: 678-687, 2005.
4. K. Sawada, Y.Furuichi, et al. Differential cytotoxicity of anticancer agents in pre- and post-immortal lymphoblastoid cell lines. Biol. Pharm.Bull. 28,1202-1207, 2005.
 5. K. Futami, Y. Furuichi et al. Quantitative analysis of Werner helicase activity using the single-molecule fluorescence detection system MF10S. Biol. Pharm. Bull. 28, 9-12,2006.
 6. Sonoda S, Tachibana K, et al. Gene transfer to corneal epithelium and keratocytes mediated by ultrasound with microbubbles. Invest Ophthalmol Vis Sci. 47(2):558-64, 2006.
 7. Sivakumar M, Tachibana K et al. Transdermal drug delivery using ultrasound-theory, understanding and critical analysis. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2;51 Suppl:OL767-84,2006.
 8. Koike H, Tachibana K et al. An efficient gene transfer method mediated by ultrasound and microbubbles into the kidney. J Gene Med. 7(1):108-16, 2005.
 9. Koshiyama K, Kodama T, et al. Molecular delivery into a lipid bilayer with a single shock wave using molecular dynamics simulation. AIP (American Institute of Physics) Conference Proceedings, 754: 104-106 (Published March 2005).
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

siRNA の選定と臨床試験導入用動物実験モデルの作製に関する研究

分担研究者 松村 保広 小泉史明

（国立がんセンター東病院 臨床開発センター がん治療開発部）

静脈投与による全身療法としての遺伝子あるいは核酸治療の臨床試験はすべて失敗している。局所投与であれば臨床応用も可能との考えから、本研究では、臨床的に意義がある臨床モデルとして肝がんに対する遺伝子肝動注療法、脳腫瘍に対する動注療法および表在性膀胱がんに対する遺伝子膀胱注療法のモデル系確立をめざした。

A. 研究目的

遺伝子治療を臨床へ導入するためには、標的とするがん種の選定と、前臨床における実験モデル構築が重要である。本研究ではヒト肝がんそして脳腫瘍に対する動注療法および表在性膀胱がんに対する膀胱注療法の確立とそれに使用するキャリアおよび標的遺伝子を決定することである。

B. 研究方法

1) ヒト肝がん細胞株である HuH7、SK-HEP-1、PLC/PRF/5、HepG2、Hep3B ヒト脳腫瘍株である LN229、U251MG また、ヒト膀胱がん細胞株 UM-UC-3 に対してルシフェラーゼ発現プラスミド pEGFP_{Luc} を導入した。またルシフェラーゼ発現各種肝がん細胞 1x10⁶ 個を雌ヌードマウス

BALB/cSLC-nu/nu 肝臓皮膜下に移植した。ルシフェラーゼ発現脳腫瘍細胞はヌードラットを麻酔下に開頭し、大脳の前頭葉に 1x10⁶ 個移植した。ルシフェラーゼ発現膀胱がん細胞は同雌ヌードマウスの膀胱へ挿入された 24 ゲージ、アンギオカテーテルを介して 2 x 10⁶ 個を膀胱内注入により膀胱移植された、この際、膀胱粘膜のグリコサミノグリカンをトリプシン処理することにより膀胱がん細胞の膀胱粘膜への移植を促進させた。

2) 各臓器におけるがん着床を確認するために、各種がん細胞移植後 6 日目にルシフェラーゼの基質ルシフェリン 150mg/kg を腹腔内投与し、5 分後より 10 分間 photon をカウントして photon imager にてがんの局所への移植状況を定性的かつ定量的に確認し

た。

3) 膀胱療法に関しては、超音波バブル法により、膀胱内腫瘍への膀胱注入遺伝子デリバリーの実験を行った。雌ヌードマウスに 24 ゲージアンギオカテーテルにて 2.5%トリプシン 100 μ l を注入し、30 分後に生理食塩水で膀胱洗浄後、アンギオカテーテルを抜去した。さらに 4 時間後に外尿道口の結紮を解除した。移植後 7 日目に麻酔下に 24 ゲージアンギオカテーテルを用い、pEGFP_{luc} プラスミド 30 μ g(50 μ l) RNase free 25 μ l、lipid bubble 25 μ l を注入し、直ちに、マウス膀胱に超音波を 30 秒間外部照射した。超音波の条件は周波数 94.750、duty ratio20%、出力 20Vrms で行った。この遺伝子導入後 3 日目、6 日目に photon imager で遺伝子導入効率を確認した。

4) ターゲット分子については、肝がんはアポトーシス関連分子、脳腫瘍については上皮性成長因子 (EGFR) あるいは splicing 変異体 EGFRvIII が高発現することが知られているので、EGFRvIII をレトロウィルスベクターに integrate し、それぞれの強制発現株をつくった。それぞれの強制発現株に対する siRNA の発現抑制効果を調べた。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は、動物倫理委員会の了承を得て、動物愛護の観点から実

施した。

C. 研究結果

1) ルシフェラーゼ発現細胞 3 日目、7 日目に移植した肝、脳あるいは膀胱に一致して、photon imager にてルシフェラーゼ発現を確認することができ、本系が今後遺伝子デリバリーの実験系として応用可能であることが明らかとなった。

2) 超音波プローブと lipid bubble を組み合わせた遺伝子導入 6 日後にマウス膀胱でのルシフェラーゼ発現を photon imager で確認することができた。また同膀胱を抗ルシフェラーゼ抗体にて免疫染色することにより、腫瘍表面のルシフェラーゼ発現を確認することができた。

3) ヒト肝がんのターゲット分子に関しては Bcl-xl あるいは XIAP の高発現がおきており、かつそれらの siRNA において著しく発現抑制作用を示すことを確認した。ヒト脳腫瘍は EGFR および EGFRvIII 強制発現細胞において、それぞれに対する siRNA で両者とも著明に発現が抑制されることを確認した。

D. 考察

がんは遺伝子の異常により発生し、進展するとの考えからがんの遺伝子治療が提唱されて久しいが、アンチセンス持続静注以外では、一部の腫瘍で、しかも腫瘍内投与での臨床試験が行

われているにすぎない。一方遺伝子治療の全身（静注）投与においては全身に散らばった標的がん細胞への攻撃用弾丸である核酸の効率よい移行とがん細胞内での効率よい発現、加えてその間の攻撃用弾丸である核酸の分解を防ぐといったことをクリアしなければならない。これらの解決のためには弾丸である核酸のデリバリーシステムを確立する以外に遺伝子治療の全身療法は臨床の場に出てこないと考える。2005年の米国臨床腫瘍学会においては、PKCアンチセンスさえも臨床的有用性を証明することはできなかった。ところで、ヒト肝臓がんは他臓器に転移することは少ないが、終末像として肝臓全体に拡がり、肝不全で死亡する。このような肝がんのステージにおいては現在有効な治療法はない。ヒト肝がんは肝動脈で栄養されているので、抗腫瘍剤の肝動注により肝臓内の肝がんをコントロールすることは生存を延ばすことにつながる。脳腫瘍も脳内の腫瘍をコントロールが臨床的に意義がある。また、膀胱がんは外科的に切除しても再発しやすいことで有名であり、術後再発を抑えることは患者のQOLの向上および延命へとつながる。

本研究では、ヌードマウスあるいはラットの肝あるいは脳にヒト肝がんあるいは脳腫瘍と同様なそれぞれの動

脈栄養の固形腫瘍を作り実験的動注モデルを作製し、ターゲット遺伝子の発現効率および治療効果を検討する系を確立した。また、膀胱がんに対する遺伝子膀胱注モデル実験系も確立した。また膀胱腫瘍モデルにおいて世界ではじめて遺伝子の超音波バブル法による遺伝子デリバリーに成功した。

E. 結論

本研究においてヒト肝臓がんあるいは脳腫瘍を標的とする遺伝子動注実験モデルおよびヒト膀胱がんを標的とする遺伝子膀胱注実験モデルの構築に成功した。今後さらに遺伝子キャリアとして、今回評価しなかったリポソームやリポソーム以外のキャリアについて検討を重ねるべきである。また、標的遺伝子としてはDNAヘリカーゼにしぼりそのsiRNAの作製および評価を行い、将来の臨床試験をめざす。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Y Bae, Matsumura Y, et al. Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-Triggered Drug Release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy. Bioconjugate

Chem.2005,16:122-130.

2. T Hamaguchi, Y Matsumura, et al.
NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend in vivo antitumour activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel. Brit J Cancer. 92:1240-1246, 2005.
3. 3. H Uchino, Y Matsumura et al.
Cisplatin-Incorporating Polymeric Micelles (NC-6004) Can Reduce Nephrotoxicity and Neurotoxicity of Cisplatin in Rats. Brit J Cancer. 93: 678-687, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

超音波を利用した siRNA 内包バブルリポソームのがん局所療法の臨床試験導入

分担研究者 小玉哲也（東北大学 先進医工学研究機構）

分担研究項目 分子標的バブルリポソームに最適化された低侵襲治療装置の開発

バブルリポソームと超音波を用いた分子導入法では、バブルリポソームの崩壊で発生するキャビテーション気泡が外来分子の導入機序に関与する。本研究では、キャビテーション気泡の衝撃圧と細胞膜との干渉を理論と分子動力学 (MD) シミュレーションで明らかにし、また、細胞実験、マウスを使った動物実験では、分子導入に関わる物理条件の最適化をおこなった。キャビテーション気泡からの衝撃波が誘起する細胞膜の損傷領域を理論的に示し、また、MD シミュレーションでは衝撃波の細胞膜の干渉で導入される外来分子の運動を明らかにした。実験結果では超音波の照射条件を最適化することで効率的な遺伝子導入が達成されることが示された。

A. 研究目的

バブルリポソームと超音波を併用した分子導入法では、バブルリポソームの崩壊で発生するキャビテーション気泡が分子導入の機序に関与すると考えられている。キャビテーション気泡は空洞化現象で、発生と崩壊時に衝撃圧が発生する。衝撃圧は細胞膜と干渉し膜構造を変化させ、外来分子はこの構造変化に誘起された形で細胞内に導入される。本研究では、キャビテーション気泡の衝撃圧の制御を目的として理論的解析、分子動力学シミュレーションをおこなった。また、細胞実験、マウスを使った動物実験により分子導入に関わる物理条件の最適化をおこなった。

B. 研究方法

1. 気泡の運動と衝撃波伝播の理論的解析

一次の音響モデル Keller-Miksis 方程式を使用し、気泡の運動を解析した。数値計算には4次精度のルンゲ・クッタ法を用いた。衝撃波のエネルギーは、音響近似から求めた。

2. 分子動力学シミュレーション

衝撃波と細胞膜との干渉問題を分子レベルで明らかにするために分子動力学シミュレーションをおこなった。細胞膜を単純化するために、水分子で挟まれた脂質二重層と衝撃波との干渉問題を考える。衝撃波は力積として表現した。

3. 細胞・動物実験

5つの細胞株 (A549, MCF7, EMT6, C26, 293T) を使用した。マウスは BALB/C および SCID マウスを使用。ナノバブルとしてアルブミン気泡、ミセル気泡、リポソーム気泡を使用した。細胞毒性は MTT アッセイ、分子導入効率はルシフェラーゼアッセイでおこな

い、生体内の遺伝子の解析はリアルタイムイメージング法でおこなった。

C. 研究結果

遺伝子発現特性は超音波の圧力、Duty比、パルス数、圧力の空間分布、マイクロ気泡の種類に依存し、これらのパラメータを最適化することで分子導入効率が改善されることが示された。分子導入の機序にはキャビテーション気泡が発生する衝撃波が関与すると仮説を立て、超音波場でのキャビテーション気泡を理論解析し、細胞膜損傷を誘起する衝撃波の伝播距離を明らかにした。分子レベルでの衝撃波と細胞膜との干渉を明らかにするために分子動力学シミュレーションをおこなった。衝撃波の干渉で脂質二重膜の構造変化が引き起こされ、この変化に誘導されて外来分子が細胞内に導入されることが示された。

D. 結論

遺伝子発現特性は超音波の圧力、Duty比、パルス数、圧力の空間分布、マイクロ気泡の種類に依存し、これらのパラメータを最適化することで分子導入効率が改善されることが示された。分子導入の機序にはキャビテーション気泡が発生する衝撃波が関与すると仮説を立て、超音波場でのキャビテーション気泡を理論解析し、細胞膜損傷を誘起する衝撃波の伝播距離を明らかにした。分子レベルでの衝撃波と細胞膜との干渉を明らかにするために分子動力学シミュレーションをおこなった。衝撃波の干渉で脂質二重膜の構造変化が引き起こされ、この変

化に誘導されて外来分子が細胞内に導入されることが示された。本研究では主にマウス表層に位置する固形腫瘍を対象に実験をおこなったが、今後は本申請研究課題が対象とする膀胱がん、肝がん、脳腫瘍を対象に実験をおこなう予定である。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Koshiyama K, Kodama T, Hamblin MR, Doukas AG, Yano T, Fujikawa S. Molecular delivery into a lipid bilayer with a single shock wave using molecular dynamics simulation. AIP (American Institute of Physics) Conference Proceedings, 754: 104-106 (Published March 2005.)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

超音波を利用した siRNA 内包バブルリポソームのがん局所療法の臨床試験導入

分担研究者 丸山 一雄 帝京大学 教授

研究要旨：我々は、世界に先駆けてリポソームに超音波造影ガスを封入したバブルリポソームの調製法を確立することに成功した。このバブルリポソームは、保存安定性やガス保持効率に優れており、超音波診断装置を用いて *in vitro* ではあるが超音波造影されることも判明した。さらに、バブルリポソームと超音波照射を組み合わせることにより、キャビテーションを介した細胞への効率の良い遺伝子および siRNA の導入が可能であった。筋肉組織、膝関節組織に遺伝子導入が可能であった。バブルリポソームは超音波診断用造影剤としてばかりでなく、非侵襲的に効率よく遺伝子導入可能な新規キャリアーになると結論された。

A. 研究目的

バブルリポソームの調製法に関する検討と物性評価。バブルリポソームによる超音波遺伝子導入を培養細胞系およびマウス体内組織に対して検討した。さらに、バブルリポソームの siRNA 導入ツールとしての有用性についても検討した。

B. 研究方法

バブルリポソームの調製—REV 法により DSPC : DSPE-PEG (2K) -OMe を脂質としてリポソームを調製し 100-200nm とした。このリポソームに超音波造影用ガスであるパーフルオロプロパンを封入してバブルリポソームを調製した。

培養細胞株に対する遺伝子導入—COS-7 細胞 (3×10^4 cells/well) を 48 穴プレートに播種後、24 時間培養した。細胞を PBS (-) にて洗浄し、バブルリポソーム

(脂質量 : 60 mg) と pDNA (5 mg) の混合溶液を添加した。その後、速やかに超音波照射 (Frequency: 2 MHz, Duty: 50 %, Burst Rate: 2.0 Hz, Intensity: 2.5 W/cm², Time: 10sec) した。培地にて細胞を洗浄し、48 時間培養後にルシフェラーゼ活性を測定した。

筋組織における遺伝子導入— ddy マウスの頸部筋組織にバブルリポソーム (脂質量 : 60 mg) と pDNA (5 mg) の混合溶液の 40ml を局所投与し、直ちに、超音波照射した。5 日後に投与部位を回収し、細胞溶解液にてホモジネート後、ルシフェラーゼ活性測定を行った。

培養細胞株に対する siRNA の細胞内導入

COS-7 細胞 (3×10^4 cells/well) を 48 穴プレートに播種後、24 時間培養した。細胞を PBS (-) にて洗浄し、バブルリポソーム (脂質量 : 60 mg) と pDNA (5 mg)

と siRNA (2~10 nM (14.8~78 ng)/well) の混合溶液を添加した。その後、速やかに超音波照射 (Frequency : 2 MHz, Duty : 50 %, Burst Rate : 2.0 Hz, Intensity : 2.5 W/cm², Time : 10 sec.) した。培地にて細胞を洗浄し、48 時間培養後にルシフェラーゼ活性を測定した。用いた siRNA は、ルシフェラーゼ遺伝子に対して塩基配列特異的な Luc GL3siRNA と非特異的な配列である Non-specific siRNA を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、帝京大薬学部における指針に基づき、動物実験委員会に申請し、承認を受けた後、動物愛護の精神にのっとり行った。

C. 研究結果

バブルリポソームの外観と超音波診断装置による超音波造影

バブルリポソームは、白濁の懸濁液であった。ガス未封入りリポソームでは陰影像 (黒色部) のみしか認められなかった (図 1 a)。バブルリポソームの超音波造影では、リポソーム存在部において造影シグナルの増強が認められ、ガスの存在が確認できた (図 1 b)。また、このバブルリポソームに超音波照射することで、造影シグナルが減弱した (図 1 c)。

バブルリポソームによる遺伝子導入

pDNA とバブルリポソームを混合し超音波照射した群で、極めて高い遺伝子発現が認められた (図 2)。

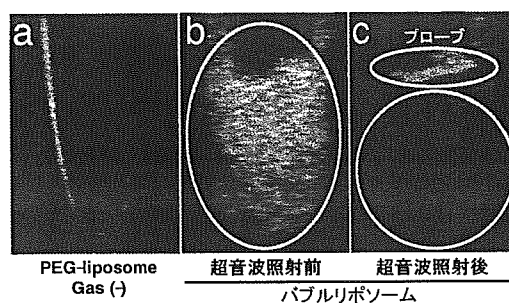


図 1 バブルリポソームの超音波イメージング

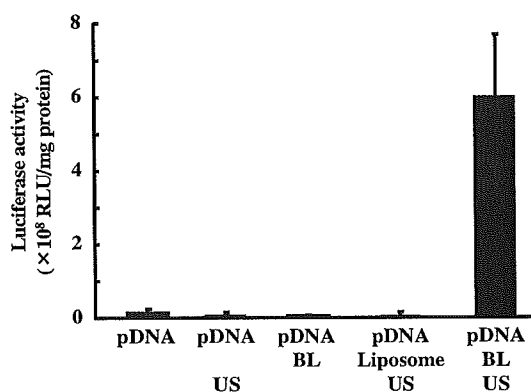


図 2 バブルリポソームを用いた超音波遺伝子導入

In vivo におけるバブルリポソームを用いた遺伝子導入—筋組織

バブルリポソームによる遺伝子導入が *in vivo* でも効果を示すかを明らかにするために、比較的遺伝子導入効果が確認しやすい筋組織を標的にし、その導入効率について検討した。その結果、バブルリポソームと超音波照射との併用による顕著な遺伝子発現の増強が認められた (図 3)。

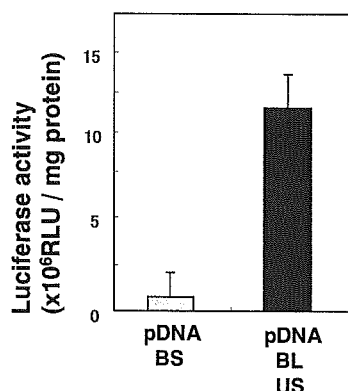


図3 筋組織におけるバブルリポソームを用いた遺伝子導入効果

バブルリポソームによる siRNA の細胞内導入

新規に開発したバブルリポソームを用いた基礎実験において培養細胞への遺伝子導入に成功した。そこで、標的遺伝子の発現を特異的に抑制することができる siRNA の細胞内導入効果について検討を行った。その結果、バブルリポソームと超音波照射との併用によってルシフェラーゼ遺伝子の発現を塩基配列特異的に抑制する LucGL3 siRNA を 10nM 濃度の条件で細胞内導入を行った場合には、遺伝子発現を 20 %まで抑制することが確認できた。それに対し、非特異的な siRNA を用いて同様の導入実験を行った場合には、そのようなルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制効果は認められなかった(図4)。

D. 考察

バブルリポソームは超音波診断装置による新規超音波造影剤として利用可能であることが示唆された。さらに、超音波

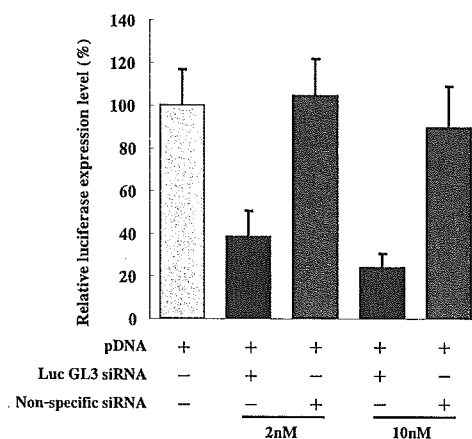


図4 バブルリポソームによる LucGL3 siRNA の細胞内導入によるルシフェラーゼ発現の抑制効果

照射によるキャビテーション誘導も可能であることより、キャビテーション誘導を駆動力にして、遺伝子が効率よく細胞内に導入されたものと考えられた。

今回調製しているバブルリポソームの構成成分には、ポリエチレングリコール (PEG) を使用しているため、標的分子を結合させた PEG を用いることによって標的指向性の高い分子標的バブルリポソームを容易に調製することが可能である。

遺伝子発現レベルは異なるものの、種々の培養細胞株 (Cos-7:サル腎ガン細胞、293T:ヒト腎ガン細胞、colon 26:ヒト大腸ガン細胞、HepG2:ヒト肝ガン細胞、口腔上皮ガン:KB、RAW264.7:マウスマクロファージ様細胞、HIG82:ウサギ関節滑膜細胞) に対し、超音波遺伝子導入可能であった。バブルリポソームは、

10 秒間という非常に短い細胞への接触時間でも高い遺伝子導入効率を有しているため、血流が存在し遺伝子の接触時間を十分に確保できない血管内皮細胞への遺伝子導入などにも利用可能になるものと考察された。

筋肉組織と膝関節組織（未発表）に対するバブルリポソームと超音波照射における最適周波数が存在することがしめされ、引き続きバブルリポソームを用いて遺伝子導入の最適化を行うとともに、種々の組織内における発現領域など組織学的に検討を進める必要があると思われる。

バブルリポソームは、遺伝子導入可能な新規キャリアであるばかりでなく siRNA の細胞内導入ツールとしても十分機能しうることが示された。

E. 結論

我々は、本研究開発を推進することによって世界に先駆けてリポソームに超音波造影ガスを封入したバブルリポソームの調製法を確立することに成功した。このバブルリポソームは、保存安定性やガス保持効率に優れており、超音波診断装置を用いて *in vitro* ではあるが超音波造影されることも判明した。さらに、バブルリポソームと超音波照射を組み合わせることにより、キャビテーションを介した細胞への効率の良い遺伝子導入が可能であった。「バブルリポソームによる siRNA の細胞内導入」の研究成果から、バ

ブルリポソームには遺伝子導入のみならず、次世代核酸医薬として期待されている siRNA の細胞内導入も可能であることが明らかとなった。このことは、バブルリポソームを用いた疾患治療の対象が拡大できることを示している。以上、バブルリポソームは超音波診断用造影剤としてばかりでなく、非侵襲的に効率よく遺伝子導入可能な新規キャリアーになるものと期待される。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し
3. その他
該当無し

超音波を利用した siRNA 内包バブルリポソームのがん局所療法の臨床試験導入

分担研究者 株式会社ジーンケア研究所 古市 泰宏、嶋本 顕

研究要旨 RecQファミリーは染色体安定化に働く一群のヘリカーゼで、このうち RecQ1 遺伝子に対する siRNA が癌細胞に強く細胞死を誘導し、担癌マウスへの局所投与により抗腫瘍活性をもつことを見出した。siRNA の医薬品化には患部へ効率的に送達させる治療法の開発が必須であり、ガラクトースリポソームを用いた治療法により、RecQ1 siRNA の肝癌治療薬としての可能性が示唆された。

A. 研究目的 (100)

我々は RecQ ヘリカーゼ遺伝子群が癌細胞で高発現しており、発現を抑制することにより癌細胞選択的細胞死を誘導する制癌剤標的遺伝子であることを見出した。本研究は、RecQ ヘリカーゼ遺伝子群に対する siRNA を用いて、RNAi の機構を応用した新規核酸医薬の開発を目的とする。

B. 研究方法 (400)

培養細胞に対して最も増殖抑制効果が高く、またマウス背面皮下移植の腫瘍に対して直接投与により腫瘍抑制効果が認められた RecQ1 遺伝子に対する siRNA を用いて、肝臓に対する全身性投与効果を検討した。

肝集積性の高いガラクトースリポソームとマウス内在性遺伝子に対する siRNA を混合し、平均粒子径がおおよそ 110 nm のガラクトースリポソーム

／siRNA 複合体を調整した。この複合体 (50 ug siRNA) をマウス尾静脈より投与し、肝臓における内在性遺伝子の発現抑制効果を半定量的な RT-PCR 法により検討した。

肝癌治療への応用を検討するため、ヒト肝癌細胞 Hep3B を肝臓へ移植したヌードマウスを肝癌モデルとして、RecQ1 siRNA の腫瘍抑制効果を検討した。肝癌細胞移植 7 日後からガラクトースリポソーム／RecQ1 siRNA (50 ug) 複合体を 3 日毎に 6 回投与し、肝癌抑制効果を調べた。

ヒト肝癌組織における RecQ1 タンパク質の発現を検討するため、抗 RecQ1 抗体を用いた免疫組織学的解析を行った。

C. 研究結果

マウス内在性遺伝子に対するガラクトースリポソーム／siRNA 複合体

をマウス尾静脈より全身性に投与することにより、蛍光標識 siRNA の組織分布を検討した結果、肝臓>肺>脾臓の順で siRNA の蓄積が認められ、腎臓、心臓には分布していなかった。これらの臓器から RNA を抽出しマウス内在性遺伝子の発現抑制効果を検討した結果、肝臓、肺、脾臓で内在性遺伝子の発現抑制が確認され、これら臓器への siRNA のデリバリーにガラクトースリポソームが有効であることが示唆された。

次に全身性デリバリーによる RecQ1 siRNA の抗腫瘍効果を検討するため、ヒト肝癌細胞 Hep3B を肝臓へ移植したヌードマウスを肝癌モデルとして、ガラクトースリポソーム/siRNA 複合体を尾静脈より投与した。その結果、コントロール RNA コンプレックス投与群では、肝臓表面に多数の Hep3B 細胞由来腫瘍が出現していたのに対して、RecQ1 siRNA コンプレックス投与群では、腫瘍の出現が顕著に抑制されているのが観察された。しかしながら、両群の間での肝重量の差は認められなかった。

肝癌を標的癌種とする妥当性を検討する目的で、ヒト肝癌組織における RecQ1 タンパク質の発現を免疫組織学的手法により解析した。抗 RecQ1 抗体を用いた免疫染色を行った結果、肝臓の癌部において RecQ1 タンパク

質の高い発現が観察された。一方、非癌部では RecQ1 タンパク質の発現は認められなかったことから、癌組織において特異的に高発現していることが明らかになった。

D. 考察

ガラクトースリポソームは肝臓集積性・送達性に優れたデリバリーシステムとして期待されているが、肺、脾臓においても遺伝子抑制が認められたことから、細網内皮系への非特異的な取込みが示唆された。したがって単なるカチオン性リポソームとの差別化を示すことはできなかった。一方、RecQ1 siRNA による肝癌の増殖抑制が認められたことから、RecQ1 siRNA は RNAi の機構を利用した新規核酸医薬候補となりうることが示唆された。また肝癌において RecQ1 タンパク質は高発現していることから、RecQ1 遺伝子は肝癌組織においても癌の生存・維持に重要な役割を担っており、臨床への応用の妥当性が示唆された。

E. 結論

肝癌モデルにおいて RecQ1 siRNA は抗腫瘍効果を示したことから、RecQ1 遺伝子を標的とした siRNA は新規核酸医薬の有力な候補である。しかしその効果はデリバリーシステムの性質に依存しており、ガラクトース

リポソームはその一例に過ぎない。
siRNA 医薬の早期の臨床応用を目指して、より臨床に近い開発段階のものを
選択・応用する必要があるだろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. K. Sawada, Y.Furuichi, et al.
Differential cytotoxicity of anticancer agents in pre- and post-immortal lymphoblastoid cell lines.
Biol.Pharm.Bull. 28:1202-1207,2005.

2. K. Futami, Y. Furuichi et al.
Quantitative analysis of Werner helicase activity using the single-molecule fluorescence detection system MF10S.
Biol.Pharm.Bull. 28:9-12,2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし