

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 of 臨床試験導入に関する研究

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 松村 保広

平成19（2007）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	13
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	19
古市 泰宏	
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	22
立花 克郎	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	26
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）

将来の臨床試験を念頭においた非臨床動物実験モデル系の確立を行った。脳腫瘍に対しては、遺伝子の内頸動脈動注方法とその評価系を確立した。易再発性、表在性膀胱がんモデル系も安定的に構築することが可能となり、超音波・バブルリポソームの評価系が確立した。3種類のナノバブルについて分子導入効率を比較したところ *in vitro* ではミセルバブルが *in vivo* ではリポソームバブルにおいて高い分子導入効率を発揮することが証明された。抗腫瘍性 siRNA については細胞分裂に関与する遺伝子 KNTC2 を抑制する siRNA を新たに見いだした。以上のハイブリッドは低侵襲性遺伝子核酸治療のツールになる可能性があると考えられる。

小泉史明 国立がんセンター研究所 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

うことで必要十分量の核酸を目的の部に送達することを考えた。

そのためには局所投与が生命予後の延長を含め、臨床的に意味のあるヒトがん種を選択し、そのモデル系を構築して評価することが最も重要であるとの考えに基づき、合致するモデルとして脳腫瘍への動注、膀胱腫瘍への膀胱注入モデルを設定し、評価系の構築を行った。局所遺伝子治療のツールとして、超音波・バブルシステムの最適かの研究を行った。超音波発生プローブを試作し、バブル崩壊に最適な超音波の特性を求め、一方で、異なる膜組成からなる3種類のバブル（アルブミン、脂質ミセル、脂質リポソーム）を使用して、分子導入の比較をおこなった。新規標的遺伝子に対する siRNA を

#### A. 研究目的

遺伝子核酸は実験レベルでは明確な効果がある。この臨床試験の失敗のひとつの要因として、肺がんを選んだこと、そして全身投与を行ったことにあると考える。遺伝子および核酸こそ現場（がん）にデリバリーされないことには効果を発揮しない。少なくとも現時点においては、治療効果を発揮するに十分な量の遺伝子あるいは核酸をデリバリーする方法は殆どない。そこで当研究チームでは、がん局所投与において遺伝子核酸デリバリーを行

用いて抗癌活性評価を行い、RNA 干渉を応用した新規核酸医薬の開発も同時並行して行った。

## B. 研究方法

1) 膀胱腫瘍 *in vivo* モデル系の構築：ヌードマウス膀胱がんモデル系の安定的作製法を確立すべく検討を重ねた。24 ゲージサーフロー針外筒を尿道口から膀胱まで挿入し、可及的に排尿後、0.25%トリプシン液を 100  $\mu$ l 膀胱内へ注入し、30 分放置後、外筒の先で膀胱内壁を擦過したあと、トリプシン液を除く。生理食塩水で膀胱内を洗浄後ルシフェラーゼ発現 UM-UC-3 ヒト膀胱がん細胞を膀胱内注入する。外筒を引き抜くと同時に外尿道口を結紮し、4 時間放置後、結紮を解く。

2) 脳腫瘍 *in vivo* モデル系の構築：①. ラットへの脳腫瘍の移植  
イソジン消毒を行った後、両外耳孔を結ぶ線を上端とし鼻根部まで正中切開を行う。大泉門を確認し、これより 1mm 前方、4mm 外側の頭蓋骨を穿頭する。ここより深さ 5mm までハミルトンシリンジを刺入しヒトグリオーマルシフェラーゼ強制発現株 U251MG/LUC を注入する。②.ルシフェラーゼアッセイによる脳腫瘍の評価移植後 10 日目にルシフェリンナトリウム 75mg/kg を腹腔内投与する。20 分後に photon imager を用いルシフェ

リン-ルシフェラーゼ反応により生じた光子を定量する。

### ③.siRNA-liposome 複合体の頸動脈内注入

総頸動脈、内頸動脈をクランプし外頸動脈断端から外径 0.5mm のポリエチレンチューブを挿入する。ルシフェラーゼ siRNA 1nmol と SR-028 カチオンリポソーム 50nmol からなる複合体を蒸留水で総量 500ul に希釈しシリンジポンプを用いて5分かけて注入した。3) 超音波プローブは 1MHz の超音波であり、最大で 30W/cm<sup>2</sup> の出力発生が可能である。音圧は超音波プローブの面から 1mm の距離で、PVDF ハイドロフォンで測定した。ナノバブルは 3 種類であり、膜組成はアルブミン、脂質ミセル (Phosphocholine と polyethleneglycol), 脂質リポソーム (DPPC-DSPE-PEG2K) からなる。内部ガスは C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> である。それぞれ、*in vitro* と *in vivo* の系で評価した。

4) ddY マウスの尾静脈よりバブルリポソーム (500 mg) と pCMV-Luc (100 mg) 混合溶液 (250 ml) を投与し、直ちに体外から心臓や肝臓に向け超音波照射した。

5) 正常組織および癌組織間で遺伝子発現の定量的な比較を行い、癌組織特異的に発現が亢進している遺伝子群を選抜した。これらを癌治療のための標的候補遺伝子群とし、それぞれの標

的遺伝子に対する siRNA をデザインし、RNA 干渉に伴う細胞増殖抑制効果について調べた。

### C. 研究結果

- 1) 今回我々が確立した膀胱がんの膀胱壁内への移植術は 100%の確率で成功した。しかも組織学的に膀胱内腔へ進展するヒト表在性膀胱がんの形態をとっていた。
- 2) 注入後 4 日後にルシフェラーゼアッセイによる脳腫瘍の評価を行った。ルシフェラーゼの silencing siRNA の注入を行ったラットで有意にルシフェリン-ルシフェラーゼ反応が低下した。
- 3) 細胞実験では、ミセルバブルが 3 種類の中で導入効率が高いことが示された。一方で、動物実験ではバブルリポゾームが高いことが示された。
- 4) 超音波照射部位である心臓または肝臓でそれぞれ高いルシフェラーゼ発現が認められた。このように本遺伝子導入法は、低侵襲的かつ組織特異的に遺伝子導入できる優れた方法であることが示された。
- 5) KNTC2 遺伝子に対する siRNA の効果を種々の細胞中で評価したところ、0.1-2nM 程度の低濃度で細胞増殖を抑え、細胞死を誘導することを確認した。また、作用機序としては、タイムラプスおよび FACS 解析により、M 期での

捕捉による細胞周期停止であることを見出した。

### D. 考察

ヒト脳腫瘍は他臓器に転移することはないが、終末像として脳全体に拡がることにより死亡する。このような脳腫瘍のステージにおいては現在有効な治療法はない。ヒト脳腫瘍は内頸動脈で栄養されているので、抗腫瘍剤の内頸動脈動注により脳内の脳腫瘍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。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脳にヒト脳腫瘍と同様な栄養動脈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。超音波・バブル条件設定の研究において、細胞実験ではミセルバブル、動物実験ではバブルリポゾームが最適なベクターであることが分かった。細胞実験では、超音波にともなう流体の変動でミセルバブルが容易に崩壊し、一方で組織内ではリポゾームバブルが外来分子の細胞内への取り込みに効果的に作用したも

のと考えられる。今回標的分子として見いだされた KNTC2 は、紡錘糸結合の場であるキネトコア成分をコードし、発現を抑制することで、M 期進行が阻止され (=スピンドルチェック)、この状態に陥った細胞はやがてはカタストロフィーと称される強力な細胞死によって排除されると考えた。

#### E. 結論

本年度の研究結果により、ヒトにおける表在性膀胱がんのモデルを安定して作成することができることがわかった。よって今後、超音波・バブルリポソーム治療の膀胱がん非臨床評価系が確立した。また、脳腫瘍動注評価系も確立した。今後、リポソームやミセルなどのキャリアによる遺伝子のデリバリーの方法および超音波・バブルリポソームの適応の条件が示された、KNTC2 に対する siRNA などによる治療実験を開始する。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. T Negishi, F Koizumi, Y Matsumura, et al. NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, is a more potent radiosensitizing agent compared to free paclitaxel. Brit J Cancer.

95:601-606 2006.

2. F Koizumi, Y Matsumura, et al. Novel SN-38-incorporated polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial growth factor-secreting bulky tumors. Cancer Res 66:10048-10056.2006.
3. Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama: Gene delivery by combination of novel liposomal bubbles with perfluoropropane and ultrasound, J. Control. Release, 117, 130-136 (2007)
4. Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama: Development of the liposomes entrapped ultrasound imaging gas ("Bubble liposomes") as novel gene delivery carriers, AIP conference Proc. Therapeutic ultrasound, 568-572 (2006)
5. Takahashi M, Kodama T. Spinal gene transfer using ultrasound and microbubbles. J Control Release. 2007; 117(2):267-272.
6. Kodama T. A non-invasive tissue-specific molecular delivery method of cancer gene therapy. Minim Invasive Ther Allied Technol. 2006;15(4):226-229.
7. Koshiyama K, Kodama T. Structural change in lipid bilayers and water penetration induced by shock waves: molecular dynamics simulations.

- Biophys J. 2006 Sep 15;91(6):2198-205
8. Tachibana K, Tachibana S Emerging technologies using ultrasound for drug delivery Emerging Therapeutic Ultrasound 131-166 2006
  9. Feril LB Jr, Tachibana K Ultrasound in Medicine: To Search and diseased Tissues. Philippine Physics journal 28:67-72
  10. Tachibana K, Feril LBJr. Using ultrasound For Drug Delivery. Philippine Physics journal 28:125-135
  11. Sonoda S, Tachibana K, Uchino E, Okubo A, Yamamoto M, Sakoda K, Hisatomi T, Sonoda KH, Negishi Y, Izumi Y, Takao S, Sakamoto T. Gene transfer to corneal epithelium and keratocytes mediated by ultrasound with microbubbles. Invest Ophthalmol Vis Sci. Invest Ophthalmol Vis Sci. 47(2):558-564 2006
  12. Kagiya G, Tabuchi Y, Feril LB Jr, Ogawa O, Zhao Q-L, Kudo N, Hiraoka W, Tachibana K, Umemura S, and Kondo T. Confirmation of enhanced expression of heme oxygenase-1 gene induced by ultrasound and its mechanism: Analysis by cDNA microarray system, real-time quantitative PCR, and western blotting. J Med Ultrasonics 33:3-10 2006
  13. Tabuchi Y, Ando H, Takasaki I, Feril LB Jr, Zhao Q-L, Ogawa R, Kudo N, Tachibana K and Kondo T Identification of genes responsive to low intensity pulsed ultrasound in a human leukemia cell line Molt-4 Cancer letters 246:149-156 2006
- 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

国立がんセンター研究所 化学療法部耐性研究室）

本研究では、将来の臨床試験を念頭においた非臨床動物実験モデル系の確立を行った。脳腫瘍に対しては、遺伝子の内頸動脈動注方法とその評価系を確立した。易再発性、表在性膀胱がんモデル系も安定的に構築することが可能となり、超音波・バブルリポソームの評価系が確立した。

#### A. 研究目的

2005 年のアメリカ臨床腫瘍学会において、非小細胞肺癌を対象とした臨床第 3 相試験において protein kinase C アンチセンスの有用性が否定された。遺伝子核酸は実験レベルでは明確な効果がある。この臨床試験の失敗のひとつの要因として、肺癌を選んだこと、そして全身投与を行ったことにあると考える。遺伝子および核酸こそ現場（がん）にデリバリーされないことには効果を発揮しない。少なくとも現時点においては、治療効果を発揮するに十分な量の遺伝子あるいは核酸をデリバリーする方法は殆どない。そこで当研究チームでは、がん局所投与において遺伝子核酸デリバリーを行うことで必要十分量の核酸を目的の部に送達することを考えた。

そのためには局所投与が生命予後の

延長を含め、臨床的に意味のあるヒトがん種を選択し、そのモデル系を構築して評価することが最も重要であるとの考えに基づき、合致するモデルとして脳腫瘍への動注、膀胱腫瘍への膀胱注入モデルを設定し、以下に述べる評価系の構築を行った。

#### B. 研究方法

1) 膀胱腫瘍 in vivo モデル系の構築：  
ヌードマウス膀胱がんモデル系の安定的作製法を確立すべく検討を重ねた。24 ゲージサーフロー針外筒を尿道口から膀胱まで挿入し、可及的に排尿後、0.25%トリプシン液を 100  $\mu$ l 膀胱内へ注入し、30 分放置後、外筒の先で膀胱内壁を擦過したあと、トリプシン液を除く。生理食塩水で膀胱内を洗浄後  $1 \times 10^7 / 100 \mu$ l のルシフェラーゼ発現 UM-UC-3 ヒト膀胱がん細胞を膀胱内



注入する。外筒を引き抜くと同時に外尿道口を結紮し、4時間放置後、結紮を解く。

## 2) 脳腫瘍 in vivo モデル系の構築:①. ラットへの脳腫瘍の移植

F344/NJcl-rnu/rnu / 8weeks にペントバルビタールナトリウム 6mg を腹腔内投与する。約 10 分待ち十分に麻酔が効いたところで頭部を脳定位手術装置に固定する。イソジン消毒を行った後、両外耳孔を結ぶ線を上端とし鼻根部まで正中切開を行う。大泉門を確認し、これより 1mm 前方、4mm 外側の頭蓋骨を穿頭する。ここより深さ 5mm までハミルトンシリンジを刺入し  $10^5$  /ul に希釈したヒトグリオーマルシフェラーゼ強制発現株 U251MG/LUC を 10 分かけて 10ul 注入する。注入後針を刺入した状態で 10 分間待ち抜針後の漏れを防ぐ。抜針後止血を十分に確認し閉創する。

## ②.ルシフェラーゼアッセイによる脳腫瘍の評価

移植後 10 日目にルシフェリンナトリウム 75mg/kg を腹腔内投与する。20 分後に photon imager を用いルシフェリン-ルシフェラーゼ反応により生じた光子を定量する。

## ③.siRNA-liposome 複合体の頸動脈内注入

F344/NJcl-rnu/rnu / 8weeks/ 150gram にペントバルビタールナトリウム

6mg を腹腔内投与する。約 10 分待ち十分に麻酔が効いたところで頭部と両手足を手術台にテープで固定した。手術用顕微鏡下に頸部正中皮膚を 10 番メスにて胸骨柄直上まで切開した。綿棒を用いて鈍的に胸骨舌骨筋と右胸鎖乳突筋を剥離する。肩甲舌骨筋の裏に頸動脈が透件見できるのでこれを術野の上端で横切開し外側に翻転する。直下に総頸動脈とこれに併走する迷走神経を確認できる。迷走神経反射による突然死を避けるために薄い頸動脈鞘のみを裂くようにして頸動脈分岐部までの剥離を進める。さらに外頸動脈を術野上端ぎりぎりまで露出し、二重結さつ後に切断する。後にこの断端からカテーテルの挿入を行うのでなるべく長く取るように留意する。また、このとき甲状腺動脈、蓋翼突動脈は凝固切断する。これは外頸動脈経由で注入する siRNA-リポソーム複合体の病巣部への到達量を増やすためである。総頸動脈、内頸動脈をクランプし外頸動脈断端から外径 0.5mm のポリエチレンチューブを挿入する。ルシフェラーゼ siRNA 1nmol と SR-028 カチオニックリポソーム 50nmol からなる複合体を蒸留水で総量 500ul に希釈しシリンジポンプを用いて 5 分かけて注入した。

(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) 今回我々が確立した膀胱がんの膀胱壁内への移植術は 100%の確率で成功した。しかも組織学的に膀胱内腔へ進展するヒト表在性膀胱がんの形態をとっていた。

2) 注入後 4 日後にルシフェラーゼアッセイによる脳腫瘍の評価を行った。ルシフェラーゼの silencing siRNA の注入を行ったラットで有意にルシフェリン-ルシフェラーゼ反応が低下した。

### D. 考察

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、ヒト脳

腫瘍は他臓器に転移することはないが、終末像として脳全体に拡がることにより死亡する。このような脳腫瘍のステージにおいては現在有効な治療法はない。ヒト脳腫瘍は内頸動脈で栄養されているので、抗腫瘍剤の内頸動脈動注により脳内の脳腫瘍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。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脳にヒト脳腫瘍と同様な栄養動脈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。

### E. 結論

本年度の研究結果により、ヒトにおける表在性膀胱がんのモデルを安定して作成することができることがわかった。よって今後、超音波・バブルリポソーム治療の膀胱がん非臨床評価系が確立した。また、脳腫瘍動注評価系も確立した。今後、リポソームやミセル等のキャリアによる遺伝子のデリバリーの評価および超音波・バブルリポソームの適応などの検討を行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. T Negishi, F Koizumi, Y Matsumura,  
et \_\_\_\_\_ al. NK105, a  
paclitaxel-incorporating micellar  
nanoparticle, is a more potent  
radiosensitizing agent compared to  
free paclitaxel. Brit J Cancer.  
95:601-606 2006.
2. F Koizumi, Y Matsumura, et al.  
Novel SN-38-incorporated polymeric  
micelles, NK012, eradicate vascular  
endothelial growth factor-secreting  
bulky tumors. Cancer Res  
66:10048-10056.2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

分担研究者 小玉哲也 東北大学先進医工学研究機構

本研究では、ナノバブルとして3種類のバブルを使用して、超音波照射条件を *in vitro* および *in vivo* で最適化した。細胞実験ではミセルバブル、動物実験ではリポソームバブルが高い分子導入効率を発揮することが示された。

#### A. 研究目的

バブルリポソームとは殻構造をもち、直径がナノサイズのガス気泡である。超音波を使用してこのバブルを *in vitro* および *in vivo* で最適に崩壊させて、その作用圧で分子を導入させるには超音波の発生特性やバブルの化学特性を最適化する必要がある。本研究では、超音波発生プローブを試作し、バブル崩壊に最適な超音波の特性を求め、一方で、異なる膜組成からなる3種類のバブル（アルブミン、脂質ミセル、脂質リポソーム）を使用して、分子導入の比較をおこなった。

#### B. 研究方法

作成した超音波プローブは 1MHz の超音波であり、最大で 30W/cm<sup>2</sup> の出力発生が可能である。音圧は超音波プローブの面から 1mm の距離で、PVDF ハイドロフォンで測定した。ナノバブルは3種類であり、膜組成はアルブミン、

脂質ミセル (Phosphocholine と polyethleneglycol), 脂質リポソーム (DPPC-DSPE-PEG2K) からなる。内部ガスは C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> である。細胞実験では、EMT6 マウス乳癌細胞株、colon26 マウス結腸癌細胞株、および 293T ヒト胎児腎細胞株を使用し、24well プレートに細胞を播種し、24 時間後にナノバブルと DNA ないし抗がん剤を加え、さらにナノバブルを添加後に、超音波を照射する。遺伝子発現は 24 時間後に評価する。マウス実験では SCD1 マウスおよび BALB/c マウスを使用し、プラスミドルシフェラーゼを導入した。発現は *in vivo* イメージングシステムで解析した。

#### C. 研究結果

細胞実験では、ミセルバブルが3種類の中で導入効率が高いことが示された。一方で、動物実験ではバブルリポソームが高いことが示された（図 1）。

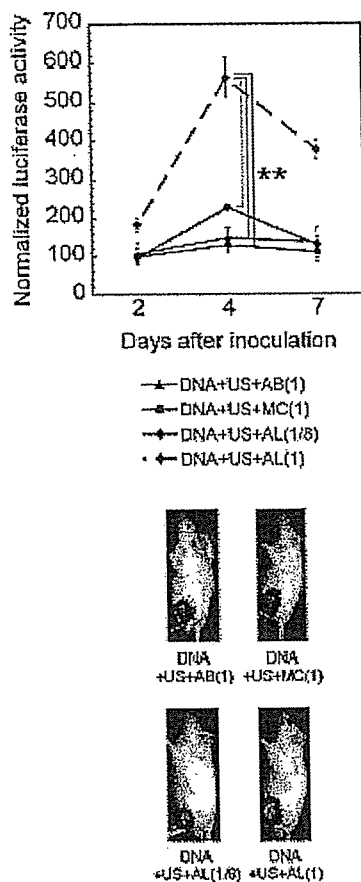


図1. AB:アルブミンバブル, MC:脂質ミセルバブル, AL:脂質リポソームバブル. (1)および(1/8)はそれぞれ50% (v/v) および 6.25% (v/v) を示す. ルシフェラーゼの発現活性は遺伝子導入後4日目に最大値をとる. 脂質リポソームバブルが高い導入効率を示す.

#### D. 考察

バブルの種類によって分子導入効率に差が生じた. 細胞実験ではミセルバ

ブル, 動物実験ではバブルリポソームが最適なベクターとなる. 細胞実験では, 超音波にともなう流体の変動でミセルバブルが容易に崩壊し, 一方で組織内ではリポソームバブルが外来分子の細胞内への取り込みに効果的に作用したものと考えられる.

#### E. 結論

細胞実験では脂質ミセルバブルを使用し, 動物実験では脂質リポソームバブルを用いることで, 高い分子導入効率を得られる.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. Takahashi M, Kido K, Aoi A, Furukawa H, Ono M, Kodama T. Spinal gene transfer using ultrasound and microbubbles. *J Control Release.* 2007; 117(2):267-272.
2. Kodama T, Aoi A, Vassaux G, Mori S, Morikawa H, Koshiyama KC, Yano T, Fujikawa S, Tomita Y. A non-invasive tissue-specific molecular delivery method of cancer gene therapy. *Minim Invasive Ther Allied Technol.* 2006;15(4):226-229.
3. Koshiyama K, Kodama T, Yano T, Fujikawa S. Structural change in lipid bilayers and water penetration induced by shock waves: molecular dynamics simulations. *Biophys J.* 2006 Sep 15;91(6):2198-205

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 超音波発生用プローブ. 2006年4月12日.

特願 2006-109894. 小玉哲也, 森士朗.

2. がん治療用組成物. 2006年10月20日.

特願 2006-285961. 小濱泰昭, 小玉哲也

分子標的バブルリポソームの開発・遺伝子導入用超音波装置の開発

分担研究者 丸山 一雄 帝京大学 教授

研究要旨：これまでに我々は、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した。このバブルリポソームは、*in vivo* における超音波造影剤として機能しうることが判明した。さらに、バブルリポソームは、体外からの超音波照射との併用により、膀胱、心臓、肝臓に効率のよい遺伝子導入を可能とした。また、*in vitro* の評価ではあるが、恒常的に発現するたん白質の発現抑制を行う siRNA 導入ツールとしてのバブルリポソームの有用性が示された。このように、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、低侵襲的に効率よく核酸医薬を導入可能な新規ツールになると結論された。

A. 研究目的

バブルリポソームの超音波造影剤としての可能性を *in vivo* において評価した。また、siRNA 導入ツールとしての可能性を評価した。さらに、低侵襲的かつ組織特異的な遺伝子導入について評価するため、バブルリポソームと体外からの超音波照射の併用における膀胱、心臓、肝臓への遺伝子導入効率を検討した。

B. 研究方法

バブルリポソームによる超音波造影

ddY マウスの尾静脈からバブルリポソーム (100  $\mu$ g) を投与後、超音波診断装置により心臓を観察した。

バブルリポソームを用いた siRNA 導入

ルシフェラーゼ恒常発現 Colon26 細胞 ( $3 \times 10^4$  cells) にバブルリポソーム

(120  $\mu$ g/mL) と siRNA (200 nM) を添加し、超音波照射した。1時間後、細胞を洗浄し 24 時間培養した。今回は、ルシフェラーゼ特異的な配列のルシフェラーゼ siRNA と非特異的な配列である Non-specific siRNA を用いた。

膀胱への遺伝子導入

ddY マウスの膀胱内を洗浄し、1群はトリプシン処理により膀胱粘膜を剥離した。その後、バブルリポソーム (562.5  $\mu$ g) とルシフェラーゼ発現プラスミド DNA (pCMV-Luc, 37.5  $\mu$ g) 混合溶液 (250  $\mu$ l) を膀胱内に注入し、超音波照射した。

心臓または肝臓への遺伝子導入

ddY マウスの尾静脈よりバブルリポソーム (500  $\mu$ g) と pCMV-Luc (100  $\mu$ g) 混合溶液 (250  $\mu$ l) を投与し、直ちに体外から心臓や肝臓に向け超音波照射した。

## ルシフェラーゼ発現 (in vivo) の確認

遺伝子導入1日後にルシフェラーゼイメージング装置にてルシフェラーゼ発現部位を確認した。

## 倫理面への配慮

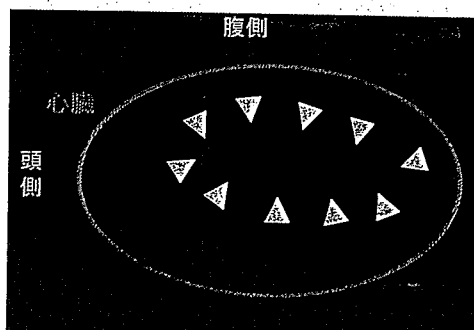
動物実験に関しては、帝京大薬学部の指針に基づき、動物実験委員会の承認を受けた後、動物愛護の精神に則り行った。

## C. 研究結果

### バブルリポソームによる超音波造影

バブルリポソームの超音波造影剤としての可能性を評価するため、バブルリポソーム投与後の心臓における造影効果を検討した。その結果、バブルリポソーム投与により心臓内腔でのエコーシグナルの増強が認められた (図1)。

図1 バブルリポソームによる超音波心臓造影



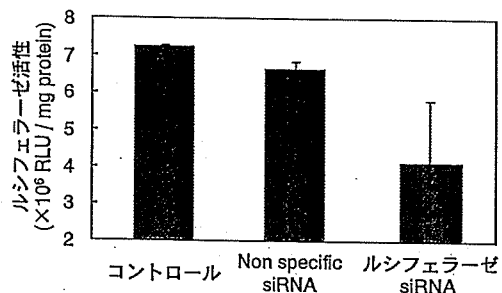
▲ 超音波エコーシグナル増強部分

### ルシフェラーゼ恒常発現細胞に対する siRNA の細胞内導入

siRNA 無処理のコントロール群と比較して Non specific siRNA を作用させた群において、ルシフェラーゼ発現抑制は

認められなかった。一方、ルシフェラーゼ siRNA を導入群で約 45 % のルシフェ

図2 バブルリポソームによる siRNA 導入

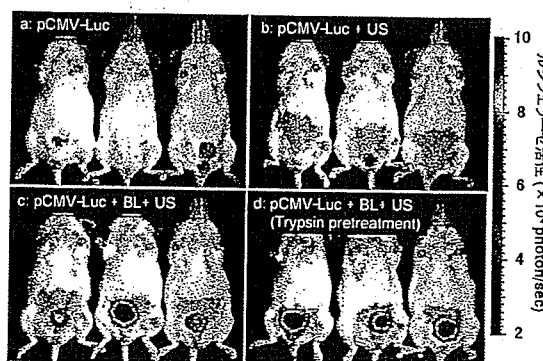


ラーゼ発現抑制が観察された (図2)。このことより、バブルリポソームと超音波の併用による siRNA 導入は、恒常発現しているタンパク質の発現抑制も可能であることが確認された。

### 膀胱への遺伝子導入

コントロール群である pCMV-Luc のみまたは pCMV-Luc と超音波照射では、ルシフェラーゼ発現が低かった (図3 a, b)。一方、バブルリポソームと超音波を併用により、ルシフェラーゼ発現の顕著な増強が認められた (図3 c, d)。また、この発現はトリプシン処理群で顕著であった

図3 バブルリポソームを用いた膀胱への超音波遺伝導入



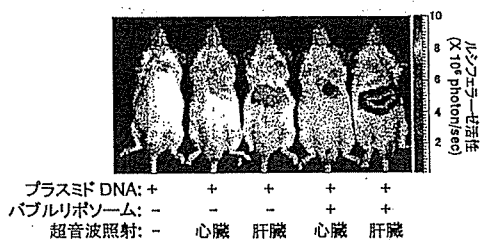


(図3d)。このトリプシン処理による発現増強は、粘膜層の除去によるプラスミド DNA やバブルリポソームの膀胱内皮細胞へのアクセス性改善に起因していると考えられた。

#### 心臓または肝臓への遺伝子導入

バブルリポソームと体外からの超音波照射の併用による低侵襲的な遺伝子導入システムの確立を試みた。その結果、超音波照射部位である心臓または肝臓でそれぞれ高いルシフェラーゼ発現が認められた(図4)。このように本遺伝子導入法

図4 バブルリポソームを用いた心臓や肝臓への超音波遺伝子導入



は、低侵襲的かつ組織特異的に遺伝子導入できる優れた方法であることが示された。

#### D. 考察

バブルリポソームを尾静脈より全身投与することで、心臓内腔における血流をリアルタイムにイメージングできることが判明した。したがって、バブルリポソームが超音波診断装置による新規超音波造影剤として有用であると考えられた。

また、バブルリポソームは体外からの

超音波照射との併用により低侵襲的かつ効率よく膀胱、心臓、肝臓に遺伝子導入可能であった。このように、バブルリポソームは低侵襲的かつ組織特異的な遺伝子導入を可能にする他に類を見ないユニークな遺伝子導入ツールであることが示唆された。

さらに、このバブルリポソームはプラスミド DNA のみならず恒常発現するたん白質の発現を発現抑制するための siRNA 導入ツールとしても利用可能であることが示された。

#### E. 結論

バブルリポソームは、超音波診断装置を用いて動物実験レベルではあるが、心臓内腔を超音波造影できた。さらに、バブルリポソームは siRNA に対する新たな導入ツールとしての可能性も見出された。特に簡便な操作で低侵襲的かつ組織特異的な遺伝子導入も可能であったことより、バブルリポソームは次世代核酸医薬に対するデリバリーツールとして期待される。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Kosuke Hagiwara, Kumiko Tanaka, Kaori Sawamura, Naoki Utoguchi, Toshihiko Nishioka, Kazuo Maruyama: Gene delivery by combi

- nation of novel liposomal bubbles with perfluoropropane and ultrasound, *J. Control. Release*, *117*: 130-136 (2007)
2. 鈴木 亮、滝澤知子、宇都口直樹、丸山一雄: 次世代型 DDS 製剤としてのリポソームの可能性. *BIO INDUSTRY*, *24*: 51-60 (2007)
  3. 鈴木 亮、滝澤知子、宇都口直樹、丸山一雄: ソノケミストリーの医療分野への応用. *ファインケミカル*, *36*: 52-59 (2007)
  4. Ryo Suzuki, Kumiko Tanaka, Kaori Sawamura, Tomoko Takizawa, Naoki Utoguchi, Yoichi Negishi, Kosuke Hagiwara, Toshihiko Nishioka, Kazuo Maruyama: Development of the liposomes entrapped ultrasound imaging gas ("Bubble liposomes") as novel gene delivery carriers, *AIP conference Proc. Therapeutic ultrasound*, 568-572 (2006)
2. 学会発表
1. 鈴木 亮、滝澤知子、根岸洋一、宇都口直樹、丸山一雄 リポソーム技術と超音波技術の融合による新たなドラッグデリバリーシステムの構築 第 127 年会日本薬学会、富山、2007 年 3 月 招待講演
  2. 澤村香織、鈴木 亮、小田雄介、滝澤知子、根岸洋一、宇都口直樹、松村保広、丸山一雄 次世代型遺伝子デリバリーツールとしてのバブルリポソームの可能性 第 127 年会日本薬学会、富山、2007 年 3 月 招待講演
  3. 小田雄介、鈴木 亮、澤村香織、宇都口直樹、滝澤知子、岡田直貴、門脇則光、丸山一雄 バブルリポソームと超音波の併用による樹状細胞への新規抗原送達法の開発 第 127 年会日本薬学会、富山、2007 年 3 月 ポスター発表
  4. Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Kaori Sawamura, Yusuke Oda, Yoichi Negishi, Kosuke Hagiwara, Yasuhiro Matsumura, Katsuro Tachibana, Naoko Utoguchi, Kazuo Maruyama Feasibility of Bubble liposome as a novel gene delivery carrier 第 8 回国際造影超音波シンポジウム、東京、2006 年 12 月 ポスター発表、Outstanding Poster Award
  5. Kazuo Maruyama Development of bubble liposomes as gene delivery carriers 2006 International Conference On Bio And Pharmaceutical Science And Technology And Bio And Pharmaceutical Technology Exhibition, USA、2006 年 12

月 口頭発表

6. Kazuo Maruyama, Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Kaori Sawamura, Naoki Utoguchi Drug And Gene Delivery By "Bubble Lipo-somes" And Ultrasound 2nd Annual Meeting of International Liposome Society, UK, 2006年12月 口頭発表
7. 鈴木 亮、滝澤知子、根岸洋一、宇都口直樹、丸山一雄 超音波造影ガス封入りポソーム (バブルリポソーム) を用いた超音波遺伝子導入法の開発 第28回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、静岡、2006年11月 招待講演
8. Yusuke Oda, Ryo Suzuki, Kaori Sawamura, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama In vivo gene delivery utilized with novel liposomal bubbles バイオハイブリッド研究会、神奈川、2006年11月 ポスター発表
9. Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Kaori Sawamura, Yoichi Negishi, Kosuke Hagiwara, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama Basic study of a new type liposomal carrier for application to BNCT 12回国際中性子捕

捉療学会、香川、2006年10月 ポスター発表

10. 鈴木 亮、丸山一雄 超音波造影ガス封入りポソーム (バブルリポソーム) の開発と遺伝子導入ツールへの応用 第1回創薬・創剤基盤技術研究会セミナー、京都、2006年9月 招待講演
11. 鈴木 亮、丸山一雄 超音波造影ガス封入りポソーム (バブルリポソーム) の開発と遺伝子導入ツールへの応用 遺伝子・デリバリー研究会 第6回夏季セミナー、大阪、2006年9月 口頭発表
12. Kazuo Maruyama, Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Kaori Sawamura, Naoki Utoguchi Drug and gene delivery by "bubble lipo-somes" and ultrasound 6th Int. Symp. on Therapeutic Ultrasound, UK, 2006年8月 口頭発表
13. 鈴木 亮、滝澤知子、澤村香織、根岸洋一、宇都口直樹、立花克郎、丸山一雄 超音波エコーガス封入りポソーム (バブルリポソーム) による低侵襲的遺伝子導入に関する検討 第1回ソノポレーション研究会、福岡、2006年7月 口頭発表
14. Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Kaori

Sawamura, Yoichi Negishi, Kumiko  
Tanaka, Naoki Utoguchi, Kazuo  
Maruyama DEVELOPMENT OF NOVEL  
LIPOSOMAL BUBBLES WITH PERFLUORO  
-PROPANE GAS AS GENE DELIVERY  
CARRIERS 1<sup>st</sup> FIP-APSTJ Joint  
Workshop on Gene Delivery、北海道、  
2006年7月 口頭発表 The Best  
Presentation Award

15. Ryo Suzuki, Kumiko Tanaka, Tomoko  
Takizawa, Kaori Sawamura, Yoichi  
Negishi, Kosuke Hagiwara, Naoki  
Utoguchi, Kazuo Maruyama Gene  
delivery with the liposomes  
entrapping perfluoropropane gas a  
novel non-viral vector 10<sup>th</sup>  
Liposome Research Days、USA、2006  
年5月 口頭およびポスター発表  
Poster Award

16. Kaori Sawamura, Ryo Suzuki, Kumiko  
Tanaka, Tomoko Takizawa, Yoichi  
Negishi, Kosuke Hagiwara, Jun  
Yasuda, Takashi Watanabe, Naoki  
Utoguchi, Kazuo Maruyama Develop-  
ment of the liposomes entrapped  
ultrasound contrast gas as a novel  
siRNA delivery carrier 10<sup>th</sup>  
Liposome Research Days、USA、2006  
年5月 ポスター発表

17. Tomoko Takizawa, Ryo Suzuki, Kumiko

Tanaka, Naoki Utoguchi, Yoichi  
Negishi, Kazuo Maruyama Develop-  
ment of Bubble Liposome as Gene  
Delivery Tool 11<sup>th</sup> WFUMB2006、2006  
年5月 口頭発表

#### 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  
該当なし