

200712007A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

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 19 年度 総括研究報告書

主任研究者 松村 保広

平成 20 (2008) 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 of 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 安永 正浩	
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	9
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	14
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（医療機器開発推進研究事業）

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）

研究要旨：低侵襲でかつ効率のよい超音波装置の開発を行った結果、超音波照射面の圧力分布を一様にするにより、市販のプロープより 4 倍高い分子導入効率を得られた。多量の siRNA を保持するために siRNA 組込型バブルリポソームを作製し、効率のよい分子導入が得られることが証明された。がん細胞特異的に細胞増殖の抑制をもたらす標的遺伝子を探索した結果、RecQ1 ヘリカーゼや KNTC2 といった分子が選択され、それらの siRNA サイレンシングにより、抗腫瘍効果が得られた。局所核酸デリバリーの非臨床モデルとして表在性膀胱がんモデルを確立した。超音波と免疫バブルリポソームの併用で siRNA の効率よい導入が認められた。

安永正浩 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 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

的遺伝子について、そのサイレンシングが実際に抗腫瘍活性をもたらすか調べる。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本年度は特に、膀胱腫瘍への膀胱注入モデルを設定し、超音波・バブルリポソーム併用実験を行う。

A. 研究目的

安全な低侵襲治療システムの確立のために、超音波エネルギーによる生体反応、薬剤透過性亢進作用、細胞内遺伝子導入を検討すること。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る。siRNA 組込み型バブルリポソームと超音波の併用による RNAi 効果について評価する。RecQL1 ヘリカーゼをはじめとするいくつかの遺伝子を抗癌剤開発の分子標的として見出した。これらの標

B. 研究方法

1) 試作の 1-MHz 超音波プローブを配置する. 3 軸高剛性・精密型自動ステージ(位置決め精度 0.025mm, Sigma Koki Ltd., Tokyo, Japan)に PVDF ハイドロフォン (PVDF-Z44-1000; Specialty Engineering Associates, Soquel, CA,

USA)を取り付ける。超音波発生面から 1-mm の距離に、超音波発生面に垂直にハイドロフォンの受圧面を配置する。ステージコントローラ (Mark-204MS, Sigma Koki Ltd.)で 3 軸高剛性・精密型自動ステージを駆動させて、超音波発生面に平行に 30-mm×30-mm の二次元面を走査する。パルス発生器 (WF 1946A; NF Co., Yokohama, Japan)で発生された信号を高速度バイポーラ増幅器(HSA4101; NF Co.)で増幅させて 1-MHz の超音波を発生させる。

2) DPPC / DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe (94:6 (mol %))を構成脂質としたバブルリポソームと Chol-siRNA を室温で混合した。その後、アクリルアミドゲル(15%)を用いた電気泳動により、バブルリポソームへの Chol-siRNA の組み込みを確認した。COS-7 細胞にルシフェラーゼ発現プラスミド Chol-siRNA と組み込みバブルリポソームを添加し、超音波照射した。

3) 標的候補遺伝子をスクリーニングし、これらの標的遺伝子のサイレンシングによる癌細胞増殖阻害の評価を、肺癌細胞株 A549 を皮下担がんしたゼノグラフトモデルを用いて行う。

4) 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。ルシフェラーゼを強制発現させた

UM-UC-3, RT-112 および 5637 という 3 種のヒト膀胱がん細胞をそれぞれ膀胱内注入する。抗体修飾を施したりリポソームと修飾を施していないリポソームを用いてバブルを調整した。Luciferase-siRNA を最終濃度 50nM に調整し、バブルを添加して 6W/cm² の出力で 1 分間超音波を照射した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換えに関しては法律 “遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律” 及び関連する法律・政令・省令・告示を遵守して行う。動物実験に関しては、文部科学省 “研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針” 厚生労働省 “動物実験等の実施に関する基本指針” 及び関連する法律・ガイドラインを遵守して行う。

C. 研究結果

1) 超音波の照射面の圧力分布を一様にしたことにより、今回作製した超音波プローブが市販のものよりも導入効率が 4-8 倍高いことがわかった。

2) Chol-siRNA 組み込み型バブルリポソームと超音波の併用においてルシフェラーゼの発現抑制が観察された。

3) コントロール配列投与群に比較して、Eg5、Cdc5、KNTC2、RecQL1 のそれぞれの siRNA で 50~70% 程度の抗腫瘍活性を見出した。一方、

PLK1 は、細胞系評価において、劇的な効果を見出していたが、マウスゼノグラフトモデルではほとんど抗腫瘍活性を見出せなかった。

4) 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%の確立で成功した。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。バブルリポソームでは十分なルシフェラーゼ活性抑制効果を得られなかったため、キャビテーションの効果向上を促すべく膀胱がん細胞の膜タンパクを認識する抗体をバブルリポソームに付加した。(以下: イムノバブルリポソーム)

バブルリポソームとイムノバブルリポソームを用いて再度同様の実験を行なったところ、イムノバブルリポソームはバブルリポソームに比べ有意にルシフェラーゼ活性を抑制した。

D. 考察

機器としての超音波装置と核酸のキャリアとしてのバブルリポソームの改良を重ねてきた結果、安全で効率よい分子導入装置が確立できた。siRNA のターゲット候補も数種類選択されてきたが、今後がん種ごとに、さらに慎重にターゲット分子は選択していくべきである。局所遺伝子デリバリーモデルとしては膀胱がんに関心をあてて作成してきた結果、安定し

て表在性膀胱がんがマウス膀胱内に生着するようになった。

E. 結論

今後正常組織へのダメージの有無につきさらなる検討が必要である。超音波・ナノバブルリポソームの併用療法の基礎ができた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. T, Hamaguchi., K, Kato., Y, Matsumura., et al., A Phase I and Pharmacokinetic Study of NK105, a Paclitaxel-incorporating Micellar Nanoparticle Formulation. *Brit J Cancer.*, 97 : 170-176, 2007 .
2. Y, Matsumura., Preclinical and clinical studies of anticancer drug-incorporated polymeric micelles. *J Drug Targeting.*, 15(7-8) : 507-517, 2007 .
3. K, Maekawa., Matsumura, Y., et al., Genetic variations and haplotype structures of the DPYD gene encoding dihydropyrimidine dehydrogenase in Japanese and their ethnic differences. *J Hum Genet.*, 52 : 804-819, 2007.
4. T, Nakajima., Y, Matsumura., et al., Synergistic antitumor activity of the novel SN-38 incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of

- colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil. *Int J Cancer*. 122 : 2148-2153 ,2008.
5. S, Yajima., Y Matsumura. et al., Expression profiling of fecal colonocytes for RNA-based screening of colorectal cancer. *Int J Oncol*. Nov;31(5):1029-37, 2007.
 6. Y, Saito., Y. Matsumura, et al.; Enhanced distribution of NK012 and prolonged sustained-release of SN-38 within tumors are the key strategic point for a hypovascular tumor. *Can Science.*, 2008(in press).
 7. M, Sumitomo., Y. Matsumura, et al., Novel SN-38-incorporated polymeric micelles, NK012, strongly suppress renal cancer progression. *Cancer Res.*, 68 : 1631-1635, 2008.
 8. Aoi A, Kodama T, et al. Herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy using nano/microbubbles and ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 2008;343:425-434.
 9. Takahashi M, Kodama T, et al. Spinal gene transfer using ultrasound and microbubbles. *J Control Release* 2007;1172:267-272.
 10. Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Naoki Utoguchi, Kaori Sawamura, Kumiko Tanaka, Eisuke Namai, Yusuke Oda, Yasuhiro Matsumura, Kazuo Maruyama. Tumor specific ultrasound enhanced gene transfer in vivo with novel liposomal bubbles; *J. Control. Release*, **125**, 137-144 (2008)
 11. Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, Effective gene delivery with liposomal bubbles and ultrasound as novel non-viral system; *J. Drug Target.*, **15**, 531-537 (2007)
 12. 3.Emoto M, Tachibana K, Iwasaki H, Kawarabayashi T. Antitumor effect of TNP-470, an angiogenesis inhibitor, combined with ultrasound irradiation for human uterine sarcoma xenografts evaluated using contrast color Doppler ultrasound. *Cancer Sci*. Jun;98(6):929-35.2007
 13. Tabuchi Y. Ando H, Takasaki I, Feril LB Jr, Zhao QL, Ogawa R, Kudo N, Tachibana K, Kondo T. Identification of genes responsive to low intensity pulsed ultrasound in a human leukemia cell line Molt-4. *Cancer Letters* 246:149-156.2007
 14. Futami K., Takagi M., Shimamoto A., Sugimoto M., Furuichi Y. Increased chemotherapeutic activity of camptothecin in cancer cells by siRNA-induced silencing of WRN helicase. *Biol & Pharm Bull*, 2007, 30 (10), 1958-1961

15. Futami K., Kumagai E., Makino H., Goto H., Takagi M., Shimamoto A., Furuichi Y. Induction of mitotic cell death in cancer cells by small interference RNA suppressing the expression of RecQL1 helicase. Cancer Science, 99 (1), 71-80, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

小玉哲也, 森士朗. 超音波発生用プローブ.

2007年4月10日; PCT/JP2007/057878.

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究報告

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

主任研究者 松村 保広 分担研究者 安永 正浩

（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）

研究要旨：超音波・バブルリポソーム併用の膀胱がんに対する、核酸膀胱内注入療法の実臨床評価モデルとして、ヒト膀胱がん細胞の膀胱内同所移植を確立した。また超音波・バブルリポソームを使った siRNA の膀胱腫瘍導入実験において、バブルリポソームで導入が認められなかったが、ヒト膀胱がん特異抗体をバブルリポソーム表面に付加したイムノリポソームにおいて siRNA の導入が確認された。超音波・イムノバブルリポソームは *in vivo* 遺伝子導入に有用であると考えられる。

A. 研究目的

遺伝子・核酸治療が提唱されて久しいが、なかなか臨床的有用性が証明されないのが現実である。核酸のデリバリーが真剣に検討されていないことも、その原因の一つにあげられる。典型例として、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本年度は特に、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 μ 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 $1 \times 10^7 / 100 \mu\text{l}$ のルシフェラーゼを強制発現させた UM-UC-3, RT-112 および 5637 という 3 種のヒト膀胱がん細胞をそれぞれ膀胱内注入する。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) ルシフェラーゼ強制発現株に対するルシフェラーゼ-siRNA の導入方法の検討

膀胱がん細胞株 RT-112 にホタルルシフェラーゼを発現させた。抗体修飾を施したりポソームと修飾を施していないリポソームを用いてバブルを調整した。Luciferase-siRNA を最終濃度 50nM に調整し、バブルを添加して $6\text{W}/\text{cm}^2$ の出力で 1 分間超音波を照射した。

(倫理面への配慮) 遺伝子組み換えに関しては法律 “遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律” 及び関連する法律・政令・省令・告示を遵守して行う。動物実験に関しては、文部科学省 “研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針” 厚生労働省 “動物実験等の実施に関する基本指針” 及び関連する法律・ガイドラインを遵守して行う。

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%の確立で成功した。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) 十分なルシフェラーゼ活性抑制効果を得られなかったため、キャビテーションの効果を向上させるべく膀胱がん細胞の膜タンパクを認識する抗体をバブルリポソームに付加した。

(以下：イムノバブルリポソーム)

バブルリポソームとイムノバブルリポソームを用いて再度同様の実験を行なったところ、イムノバブルリポソームはバブルリポソームに比べ有意にルシフェラーゼ活性を抑制した。

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。臨床応用を考えた場合、当面の間は局所投与方法を考えるべきである。本年度の研究において、数種のヒト膀胱癌株を安定的にマウス膀胱内に同所移植する方法を確立

した。また免疫バブルリポソームと超音波の併用により、同所移植膀胱がんへ、十分量の siRNA を導入しうることがわかった。

E. 結論

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。今後はバブルリポソームあるいは免疫バブルリポソームによる siRNA 導入治療研究を展開するが、その標的となる分子の選定およびターゲットを高めるパイロット分子としてのヒト膀胱がん特異抗体の作製を行っていく。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. T, Hamaguchi., K, Kato., Y, Matsumura., et al., A Phase I and Pharmacokinetic Study of NK105, a Paclitaxel-incorporating Micellar Nanoparticle Formulation. Brit J Cancer., 97 : 170-176, 2007 .
2. Y, Matsumura., Preclinical and clinical studies of anticancer drug-incorporated polymeric micelles. J Drug Targeting., 15(7-8) : 507-517, 2007 .
3. K, Maekawa., Matsumura, Y., et al., Genetic variations and haplotype structures of the DPYD gene

encoding dihydropyrimidine dehydrogenase in Japanese and their ethnic differences. J Hum Genet., 52 : 804-819, 2007.

4. T, Nakajima., Y, Matsumura., et al., Syneragistic antitumor activity of the novel SN-38 incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil. Int J Cancer. 122 : 2148-2153 ,2008.
5. S, Yajima., Y Matsumura. et al., Expression profiling of fecal colonocytes for RNA-based screening of colorectal cancer. Int J Oncol. Nov;31(5):1029-37, 2007.
6. Y, Saito., Y, Matsumura., et al., Enhanced distribution of NK012 and prolonged sustained-release of SN-38 within tumors are the key strategic point for a hypovascular tumor. Can Science., 2008(in press).
7. M, Sumitomo., Y, Matsumura., et al., Novel SN-38-incorporated polymeric micelles, NK012, strongly suppresses renal cancer progression. Cancer Res., 122 : 2148-2153, 2008.

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

本研究分担は、分子標的バブルリポソームに最適化された超音波装置を開発することを目的とする。空間的に非一様に、高次周波数を発生させることで、バブルリポソームを効果的に破壊させて、細胞・組織内への外来分子の導入効率を約 4-8 倍高めることに成功した。これにより、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向けた機器開発の可能が示唆された。

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ことが必要である(Aoi et al. 2008; Takahashi et al. 2007)。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、膜組成の異なる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、*in vitro* および *in vivo* で分子導入の比較をおこなった。最後に、本プローブでのがん治療効果を評価するために自殺遺伝子を用いて、固形腫瘍の治療効果の検討をおこなった。

B. 研究方法

1. 音響測定

脱気水で満たされた容器に、試作の 1-MHz

超音波プローブを配置する。3軸高剛性・精密型自動ステージ(位置決め精度 0.025mm, Sigma Koki Ltd., Tokyo, Japan)に PVDF ハイドロフォン (PVDF-Z44-1000; Specialty Engineering Associates, Soquel, CA, USA)を取り付ける。超音波発生面から 1-mm の距離に、超音波発生面に垂直にハイドロフォンの受圧面を配置する。ステージコントローラ(Mark-204MS, Sigma Koki Ltd.)で3軸高剛性・精密型自動ステージを駆動させて、超音波発生面に平行に 30-mm×30-mm の二次元面を走査する。パルス発生器 (WF 1946A; NF Co., Yokohama, Japan)で発生された信号を高速度バイポーラ増幅器 (HSA4101; NF Co.)で増幅させて 1-MHz の超音波を発生させる。

2. バブルリポソーム

膜組成の異なる3種類バブル; アルブミン、脂質バブル (Phosphocholine, polyethleneglycol), および、バブルリポソーム(DPPC-DSPE-PEG2K)を使用し、バブルリ

ポゾームの分子導入効率を評価する。内部ガスは C_3F_8 である。バブルのゼータ電位と粒径分布はゼータ電位・粒径測定システム (ELSZ-2, 0.6nm-7 μ m, Otsuka Electronics Co.Ltd., Osaka)で測定する。

3. プラスミド DNA

レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼプラスミド DNA (pGL3-control, Promega, Madison, WI, USA), および GFP プラスミド DNA (pEGFP, Clontech, Palo Alto, CA, USA) を使用する。チミジンキナーゼプラスミド DNA (pHSV) は ERBB2 プロモータで駆動される。pRS303 はトランス遺伝子を保持しておらず、mock プラスミドとして使用する。

4. 細胞実験

細胞実験では、EMT6 マウス乳がん細胞株, Colon26 マウス結腸がん細胞株, および 293T ヒト胎児腎細胞株, HT29-luc ヒト大腸がんルシフェラーゼ発現細胞を使用する。24well プレートに細胞を播種し, 24 時間後にバブルと DNA を加え, 超音波を照射する。遺伝子発現は 24 時間後に評価する。

5. マウス実験

5.1. 導入効率

バブルと超音波を使用して, シフェラーゼプラスミド DNA とバブルを BALB/c マウス (オス, 6 週齢) の骨格筋に注入し, 超音波 (3W/cm²) を照射する。ルシフェラーゼ発現は *in vivo* イメージングシステム (Xenogen Corp., Alameda, CA, USA) で解析した。

5.2. 自殺遺伝子療法

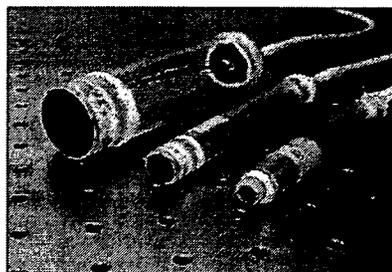


図 1. 試作の超音波プローブ

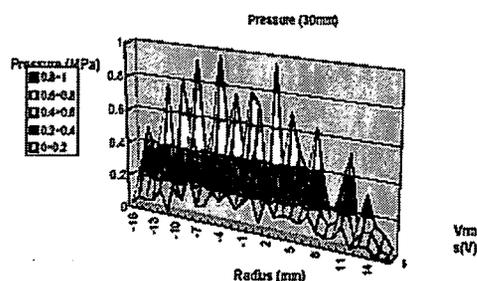


図 2. 半径方向の音圧分布。

SCDI マウス (オス, 6 週齢) の側腹皮下に HT29-luc 細胞 (1×10^6 / 100 μ L/site) を移植し, 固形腫瘍を作成する。バブルと pHSV プラスミド DNA を固形腫瘍に注入後, 超音波 (3W/cm²) を照射する。翌日から毎日, 腹腔内に GCV (150 μ g/g body weight) の投与をおこなう。抗腫瘍効果は *in vivo* イメージングシステムで得られた固形腫瘍のルシフェラーゼ発現活性値で評価する。

C. 研究結果

1. 超音波プローブの試作

図 1 は試作した超音波プローブである

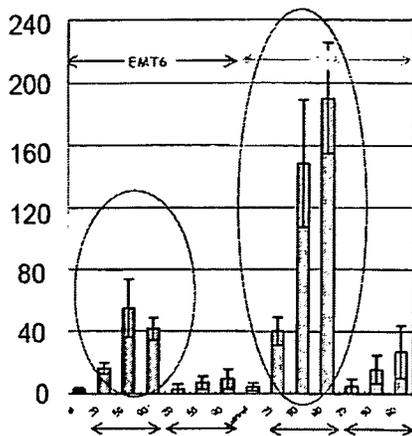


図 3. 導入効率の比較

(小玉哲也, 森士朗 2006 年 4 月 12 日; 小玉哲也, 森士朗 2007 年 4 月 10 日). 図 2 は半径方向の圧力分布であり, 複数の超音波が形成されることがわかる.

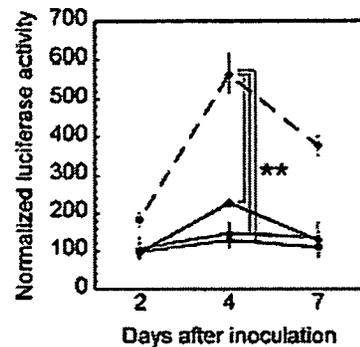
2. 導入効率

EMT6 細胞および Colon26 細胞に pGL3 プラスミドを導入する. 超音波の Duty 比は 20, 50, 80% である. 丸印が本プローブ, それ以外は市販の超音波で得られたルシフェラーゼ活性値である. Duty 比によらず, 本プローブが市販のものよりも導入効率が 4-8 倍高いことがわかる.

3. バブルの違いによる導入効率

3 種類のバブルと超音波を使用して, マウス骨格筋にルシフェラーゼプラスミド pGL3 を導入する(図 4). 遺伝子発現は一過性であり, 導入後 4 日目に発現値が最大になる. バブルリポゾームの導入効率はアルブミン(AL)および脂質バブル(MC)よりも高く, しかも, 導入効率が 5 倍程高い.

3. 自殺遺伝子療法



—◆— DNA+US+AB(1)
—●— DNA+US+MC(1)
—▲— DNA+US+AL(1/8)
-◆- DNA+US+AL(1)



図 4. バブルの違いにともなう遺伝子発現の比較. AB:アルブミンバブル, MC:脂質バブル, AL:バブルリポゾーム. (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. 脂質リポゾームバブルが高い導入効率を示す.

ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ

(HSVtk) 遺伝子は代表的な自殺遺伝子である. HSVtk は毒性の弱い前駆体 (プロドラッグ) であるガンシクロビル (GCV) をリン酸化し, 毒性の強い GCV-三リン酸

(GCV-TP) を作り、この GCV-TP の強力な DNA 合成阻害作用によって癌細胞の増殖を阻止することができる。図 5 はマウス固形腫瘍に pHSV プラスミドをバブルと超音波を使って導入し、その抗腫瘍効果を調べた結果である (Aoi et al. 2008)。抗腫瘍効果は、腫瘍移植後 6 日後から観察されることがわかる。

D. 考察

バブルの粒径分布は空間的に広がりがある。したがって、バブル粒径で定まる周波数を固定せずに、高次の超音波で駆動・破壊させることで導入効率が改善されるものと期待される。本研究では高次モードでの超音波の発生が可能な超音波プローブを試作して、市販の超音波装置よりも 4-8 倍高い分子導入効率を達成することができた。導入効率はバブルの組成だけでなく、バブル溶液に含有するバブルの数にも依存することになる(図 3)。これは、バブル崩壊にともなう衝撃圧が隣接する細胞の膜構造を変化させて外来分子が細胞内に導入されたものと考えられる(Kodama et al. 2006a; Kodama et al. 2006b; Koshiyama et al. 2006)。

本導入システムの有効性を示すために、HSVtk/GCV 自殺遺伝子療法で固形腫瘍の治療をおこなった(Aoi et al. 2008)。本装置を使った分子導入法で、効率的な治療効果が得られた。HSVtk を発現する細胞だけでなく周囲の細胞も bystander 効果で死にいたることが知られている。この現象は HSVtk

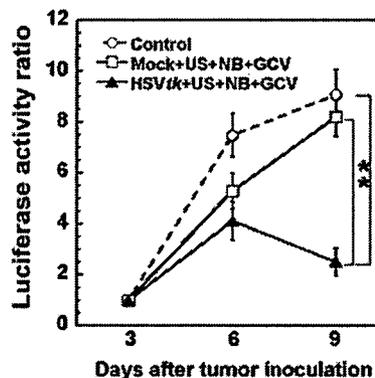
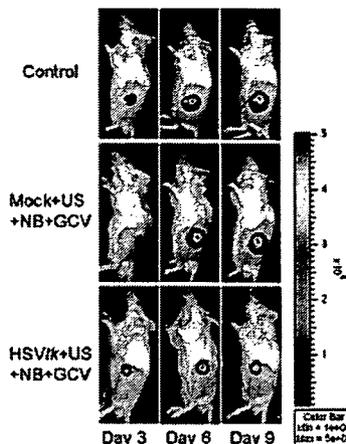


図5. HSVtk/GCV 自殺遺伝子療法.** $p < 0.01$.

を発現する細胞から毒性の高い GCV 代謝産物が細胞間の輸送によって周囲の細胞に移動するものであり、gap junctional intercellular communication (GJIC)が重要な働きを演じていると指摘されている。本実験では明らかな組織損傷も観察されないことから、GJIC のような生物学的機能も関与して抗腫瘍効果が得られたものと考えられる。抗腫瘍効果は、腫瘍サイズだけでなく、腫瘍内の血管密度も考慮する必要がある。現在、血管抽出法に関して、研究を展開している(Horie et al. 2007; Tomita et al. 2007)。

E. 結論

1. 超音波発生面を高次に振動可能な超音波プローブを開発した。
2. マウス骨格筋での遺伝子発現測定から、試作プローブは市販のプローブよりも 4-8 倍遺伝子導入効率が高いことが示された。
3. 導入効率はバブルの組成だけでなく、含有されるバブルの数に依存する。本実験で作成したバブルリポゾームは、市販のバブルよりも 4 倍高い導入効率を示す。
4. 試作したプローブを使用し、固形腫瘍の HSVtk/GCV 遺伝子治療をおこなった結果、顕著な抗腫瘍効果が確認できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Aoi A, Watanabe Y, Mori S, et al. Herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy using nano/microbubbles and ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 2008;343:425-434.

Takahashi M, Kido K, Aoi A, et al. Spinal gene transfer using ultrasound and microbubbles. *J Control Release* 2007;1172:267-272.

H. 知的財産権の出願・登録状況

小玉哲也, 森士朗. 超音波発生用プローブ.
2007年4月10日; PCT/JP2007/057878.

厚生科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

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：バブルリポソームに多量の siRNA を保持させる目的でコレステロール修飾 siRNA (Chol-siRNA) 組込み型バブルリポソームを新たに調製し RNAi 効果を評価した。その結果、Chol-siRNA とバブルリポソームを混同することで容易に Chol-siRNA をバブルリポソームに組み込むことが可能であった。さらに、この siRNA 組込み型バブルリポソームと超音波の併用による RNAi 効果を評価したところ、標的遺伝子の発現を抑制可能であることが明らかとなった。以上のことから、Chol-siRNA 組込み型バブルリポソームが siRNA キラーとして新規ツールになると期待される。

A. 研究目的

バブルリポソームへの siRNA 保持を目的にコレステロール修飾 siRNA を用いてバブルリポソームへの組み込みを行った。さらに、この siRNA 組込み型バブルリポソームと超音波の併用による RNAi 効果について評価した。

B. 研究方法

バブルリポソームへの Chol-siRNA の組み込みの確認

DPPC / DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe (94:6 (mol %)) を構成脂質としたバブルリポソームと Chol-siRNA を室温で混合した。その後、アクリルアミドゲル(15%) を用いた電気泳動により、バブルリポソームへの Chol-siRNA の組み込みを確認した。

Chol-siRNA 導入バブルリポソームと超音波の併用による RNAi 効果の評価

COS-7 細胞 (3 X 10⁴ cells/well) を 48 穴プレートに播種し、1 日後にルシフェラーゼ発現プラスミド DNA (5 μg) および Chol-siRNA (25 nM) 組込みバブルリポソーム (60 μg) を添加し、超音波照射 (2 MHz、2.5 W/cm²、10 秒) した。細胞を 2 回洗浄し 2 日間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定した。なお、今回はコントロールとしてルシフェラーゼ非特異的な配列である Non-specific siRNA を用いた。

C. 研究結果

バブルリポソームへの Chol-siRNA の組み込みの確認

Chol-siRNA とガス未封入りポソームまたはバブルリポソームを室温で混合した後、アクリルアミド電気泳動を行った (図 1)。その結果、リポソームやバブルリポソームと混合した Chol-siRNA はフリーの Chol-siRNA より電気泳動距離が低下していた。このことから、Chol-siRNA がリポ

ソームやバブルリポソームに混合しただけで組込まれることが明らかとなった。

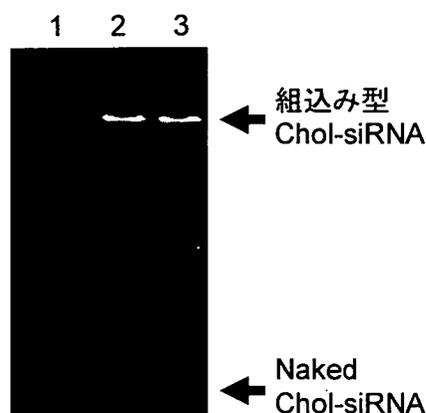


図1 Chol-siRNA のリポソームへの組込み評価
Lane 1: Naked Chol-siRNA, 2: Chol-siRNA + リポソーム, 3: Chol-siRNA + バブルリポソーム

Chol-siRNA 導入バブルリポソームと超音波の併用による RNAi 効果の評価

Chol-siRNA 導入バブルリポソームと超音波の併用による RNAi 効果の評価するため、ルシフェラーゼに対する Chol-siRNA を用いルシフェラーゼ発現プラスミド DNA との共導入の系で RNAi 効果について検討した (図2)。その結果、今回用いた

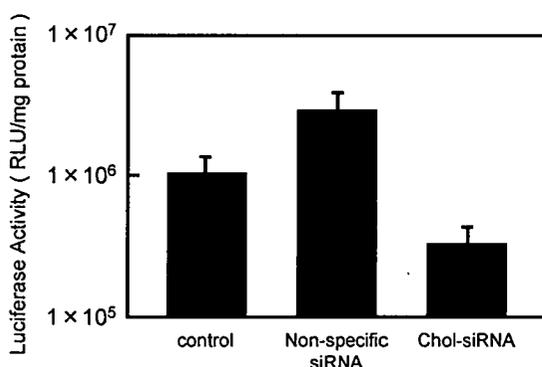


図2 Chol-siRNA 組込み型バブルリポソームと超音波の併用による RNAi 効果

コントロール配列の Non-specific siRNA ではルシフェラーゼ発現抑制は認められなかった。一方、Chol-siRNA 組込み型バブルリポソームと超音波の併用においてルシフェラーゼの発現抑制が観察された。

D. 考察

Chol-siRNA がバブルリポソームに組込まれることが明らかとなった。これは Chol-siRNA のコレステロール部分がアンカーとなりリポソーム膜に組込まれたためであると考えられた。また、このリポソームと超音波の併用により、細胞に Chol-siRNA が導入され RNAi 効果を誘導することに成功した。これは、リポソーム膜に組込まれていた Chol-siRNA が超音波照射によるバブルリポソームの崩壊現象で細胞内に送達されたためと考えられた。

E. 結論

Chol-siRNA を組込んだ新たなタイプのバブルリポソームの調製に成功した。さらに、このバブルリポソームと超音波の併用により RNAi 効果を誘導することも明らかとなった。したがって、バブルリポソームは siRNA 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

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, Effective gene delivery with novel liposomal bubbles and ultrasonic destruction technology; *Yakugaku Zasshi*, **128**, 187-192 (2008)
2. Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, Effective gene delivery with novel liposomal bubbles and ultrasonic destruction technology; *Int. J. Pharm.*, **354**, 49-55 (2008)
3. Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Naoki Utoguchi, Kaori Sawamura, Kumiko Tanaka, Eisuke Namai, Yusuke Oda, Yasuhiro Matsumura, Kazuo Maruyama, Tumor specific ultrasound enhanced gene transfer in vivo with novel liposomal bubbles; *J. Control. Release*, **125**, 137-144 (2008)
4. Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, Effective gene delivery with liposomal bubbles

and ultrasound as novel non-viral system; *J. Drug Target.*, **15**, 531-537 (2007)

5. Toshicumi Yamashita, Shozo Sonoda, Ryo Suzuki, Noboru Arimura, Katsuro Tachibana, Kazuo Maruyama, Taiji Sakamoto, A novel bubble liposome and ultrasound-mediated gene transfer to ocular surface: RC-1 cells in vitro and conjunctiva in vivo; *Exp. Eye. Res.*, **85**, 741-748 (2007)
6. Kazuo Maruyama, Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Naoki Utoguchi, Yoichi Negishi, Drug and gene delivery by "bubble liposomes" and ultrasound; *Yakugaku Zasshi*, **127**, 781-787 (2007)

2. 学会発表

1. Ryo Suzuki, Eisuke Namai, Yusuke Oda, Tomoko Takizawa, Naoki Utoguchi, Yoichi Negishi, Katsuro Tachibana, Kazuo Maruyama; In vivo gene delivery by sonoporation with liposomal bubbles, ISSS2007、2007年12月、京都、ポスター発表
2. 生井栄佑、鈴木 亮、小田雄介、

- 根岸洋一、滝澤知子、宇都口直樹、丸山一雄；バブルリポソームと超音波を利用した組織特異的遺伝子送達法の確立、ファーマ・バイオフォーラム 2007、2007年12月、大阪、口頭発表
3. Ryo Suzuki, Naoki Utoguchi, Tomoko Takizawa, Kazuo Maruyama : Gene delivery into tumor tissue with novel liposomal bubbles and ultrasound、第66回日本癌学会学術総会、2007年10月、横浜、ポスター発表
 4. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama; Tissue specific gene delivery with liposomal bubbles and ultrasound, 日本遺伝子治療学会、2007年6月、名古屋、口頭発表
 5. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Yoichi Negishi, Tomoko Takizawa, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama; Ultrasound enhanced tumor tissue specific gene delivery with liposomal bubbles, ISTU2007、2007年6月、韓国、ポスター発表
 6. Ryo Suzuki, Kaori Sawamura, Yusuke Oda, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama: Development of minimally invasive and tissue specific gene delivery with novel liposomal bubbles, ASTG 10th Annual Meeting、2007年5月、米国(シアトル)、ポスター発表
 7. 鈴木 亮、滝澤知子、根岸洋一、宇都口直樹、門脇則光、工藤信樹、立花克郎、丸山一雄；超音波を利用した薬物送達におけるリポソーム技術の新展開、日本超音波医学会、2007年5月、鹿児島、シンポジウム
 8. 生井栄佑、鈴木 亮、小田雄介、根岸洋一、滝澤知子、宇都口直樹、丸山一雄；バブルリポソームを利用した組織特異的遺伝子デリバリー法の確立、遺伝子・デリバリー研究会第7回シンポジウム、2007年5月、東京、ポスター発表
 9. 鈴木 亮、滝澤知子、宇都口直樹、丸山一雄；リポソーム型バブルと超音波の併用による組織特異的遺伝子導入法の開発、日本生体医工学会、2007年4月、仙台、シンポジウム

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