

200712007B

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発研究事業

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～平成19年度 総合研究報告書

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

..... 9

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

..... 13

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

..... 18

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

..... 27

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

..... 31

立花 克郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

..... 33

IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発研究事業）

総合研究報告書

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）

がんにおける核酸・遺伝子を使った、全身投与は臨床的有用性をいまだしめられていない。理由の一つは核酸の全身デリバリーのためのキャリアがないことによると考え、局所投与で臨床的有用性が得られる、肝がん、脳腫瘍、膀胱がん、卵巣がんの同所移植、非臨床評価モデルを確立した。核酸の局所デリバリー法として超音波照射・バブルリポソームにより、siRNA をがん細胞に導入するシステムの開発を行なった。siRNA のターゲット分子として KNTC2 や RecQL1 などが見いだされた。

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 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

応用という観点からも大きな一歩をふみだすことになる。本システムはがん局所療法として、表在性膀胱がん、ステージ3卵巣がん、肝がんなどに応用できる。本システムは、装置の小型化により臨床現場において極めて簡易に施行でき、組織障害が少なく超音波を非侵襲的または低侵襲的に目的部位に照射できるので、安全性が高く、患者のQOLを高めることができ、社会的な貢献度は計り知れない。成果の社会への還元という点からも、日本のみならず世界の医療・福祉の向上に大いに貢献するものと期待される。

A. 研究目的

本研究の目的は、分担者の丸山らが基盤技術として確立しているナノサイズの機能化バブルリポソームと、分担者の立花や小玉らが開発している非侵襲用超音波装置とのハイブリッドにより、申請者や安永のような臨床医や分担者の古市・嶋本のような分子生物学者らによって開発される標的分子と核酸医薬を用いて、非侵襲または超低侵襲的に核酸治療を施すシステムを開発することである。いまだ先行きが見えていない核酸療法の臨床

B. 研究方法

1) 効率の良い分子導入のための超音波装置の開発。In vitro において、がん細胞株にルシフェラーゼ DNA とバブルを加え、今回作製した超音波プローブと市販の超音波プローブとで、遺伝子導入効率

を比較した。

2) パーフルオロプロパンガスを封入した PEG ナノバブルリポソームの作製。

3) 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するスクリーニングシステムを確立し。選抜されてきた標的候補遺伝子に対して、siRNA をデザインし、RNA 干渉に伴う細胞増殖抑制効果を測定・比較し、有望な標的を選抜する。

4) 非臨床評価のための前臨床評価用 in vivo モデル系の構築： ヒト肝がん、ヒト脳腫瘍、ヒト卵巣がん、ヒト膀胱がん細胞株にルシフェラーゼ発現プラスミドを導入した。局所投与評価を行うために、それぞれの同所移植モデルの作成を行った。

5) 抗体修飾を施した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) 照射面の圧力分布が一様になったことで、分子の細胞への導入効率が市販のプロープに比べ 4 倍高くなった。

2) 作製したバブルリポソームは周囲を PEG で覆っているために溶液中でよく分散していた。またサイズは 500-600 ナノメートルに統一されていた。siRNA 無処理のコントロール群と比較して、バブルリポソームと超音波の併用により、約 45% のルシフェラーゼ発現抑制が認められた。このことから、バブルリポソームと超音波の併用は恒常発現たん白質の発現も抑制可能な新規 siRNA 導入ツールとして期待される。

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。今回見出した分子標的による抗腫瘍活性は、今後、試験数を増やし更なる詳細な検討が必要だと思われるが、有望であると思われる。

4) ルシフェラーゼ強制発現させた肝がん、脳腫瘍、卵巣がん、そして膀胱がん

の同所移植腫瘍はルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを腹腔内投与することにより、photon imagerにて、簡単に移植部での増殖状態を追跡できることがわかった。加えて、肝がん、脳腫瘍の動注方法、膀胱がんに対する膀胱注入方法も確立した。特に、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。

5) 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

高い分子導入効率を得られる超音波装置が完成した。またパーフルオロプロパンガス封入ナノバブルリポソームおよび抗体が付加されたイムノバブルリポソームは一定の規格で作製できるようになった。また局所核酸治療の非臨床モデルが確立した。問題は siRNA のターゲット分子として、確実なものがみいだせなかったことにある。

いまだ国際的にも核酸・遺伝子治療は確立されていない。本研究で作製したバブルリポソームは生体親和性が高く、これと低出力かつ高効率分子導入超音波装置は正常組織を損傷することなく、効率よく生体深部への核酸導入を可能とした。治療も効果の診断も超音波で判断でき、すべてが非侵襲で治療が完結できる、画期的な診断治療システムが開発できる。今後、本局所遺伝子療法は易再発性表在性膀胱がんにしぼって開発する。正常とがんの間でのアレー解析を通し、siRNA のターゲット分子をみいだし、かつ膀胱がん特異的抗体の作製をおこない。超音波・イムノバブルリポソーム・siRNA 併用の新規膀胱がん治療技術を確立し、臨床第 1 相試験をめざす。

E. 結論

世界初の超音波治療をめざす土台作りができた。今後は表在性膀胱がんに焦点をあてて臨床開発をめざす。

F. 研究発表

1. 論文発表

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).
10. 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.
11. 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.
12. Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama: Gene delivery by combi -nation of novel liposomal bubbles with perfluoropropane and ultra -sound, *J. Control. Release*, 117, 130-136 (2007)
13. 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)
14. Takahashi M, Kodama T. Spinal gene transfer using ultrasound and microbubbles. J Control Release. 2007; 117(2):267-272.
 15. Kodama T. A non-invasive tissue-specific molecular delivery method of cancer gene therapy. Minim Invasive Ther Allied Technol. 2006;15(4):226-229.
 16. 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
 17. Tachibana K, Tachibana S Emerging technologies using ultrasound for drug delivery Emerging Therapeutic Ultrasound 131-166 2006
 18. Feril LB Jr, Tachibana K Ultrasound in Medicine: To Search and diseased Tissues. Philippine Physics journal 28:67-72
 19. Tachibana K, Feril LBJr. Using ultrasound For Drug Delivery. Philippine Physics journal 28:125-135
 20. 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
 21. 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
 22. 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
 23. 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 .
 24. Y, Matsumura., Preclinical and clinical studies of anticancer drug-incorporated polymeric micelles. J Drug Targeting., 15(7-8) : 507-517, 2007 .
 25. K, Maekawa., Matsumura, Y., et al., Genetic variations and haplotype structures of the DPYD gene encoding

- Japanese and their ethnic differences. *J Hum Genet.*, 52 : 804-819, 2007.
26. 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.
 27. 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.
 28. 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).
 29. M, Sumitomo, Y, Matsumura, et al., Novel SN-38-incorporated polymeric micelles, NK012, strongly suppress renal cancer progression. *Cancer Res.*, 68 : 1631-1635, 2008.
 30. 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.
 31. Takahashi M, Kodama T, et al. Spinal gene transfer using ultrasound and microbubbles. *J Control Release* 2007;1172:267-272.
 32. 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)
 33. 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)
 34. 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
 35. 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

246:149-156.2007

36. 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
37. 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

2. 学会発表

1.超音波を用いたヒト神経線維腫細胞への Gamma Interferon Gene Transfection と増殖抑制効果の検討
第3回ソノポーレーション研究会 1.13
2007 福岡市

2.Sonotransfection as a potential alternative gene therapy method in treating pregnant women: a study using Gamma Interferon Gene against Neurofibroma

The 23rd Fetus as a Patient International Congress 5.15-3.17 2007 Manila, Philippines

3.超音波血栓溶解療法

日本超音波医学会第80回学術集会

5.18-5.20 2007 鹿児島

4.Therapeutic Potentials of Low Intensity Ultrasound

日本超音波医学会第80回学術集会

5.18-5.20 2007 鹿児島

5.BR1とBR14による低浸襲性超音波の遺伝子導入効果の比較

日本超音波医学会第80回学術集会

5.18-5.20 2007 鹿児島

6.Enhanced gene transfer by echo contrast agents: comparison between BR1 and BR14 in vitro and in vivo

American Society of Gene Therapy 10th Annual Meeting 5.29-6.3 2007 Washington

7.Interferon β Sonotransfection Inhibits Proliferation of Malignant Melanoma In-vivo

7th international Symposium on Therapeutic Ultrasound 6.12-6.15 2007 Seoul Korea

8.皮膚科領域における超音波の治療への応用

ななくま 6-22 2007 福岡市

9.Ultrasound-mediated Gene Transfection of Interferon β Inhibits Proliferation of Malignant Melanoma In-vivo

平成19年度厚生省がん研究助成金(山崎班)第1回班会議 8.4 2007 東京

10.HIFU (強力集束超音波治療法)

第26回日本脳神経超音波学会 7.8-7.10 2007 横浜

11.Ultrasound-induced mechanical damage

on cells enhanced by hypotonia-induced
cell swelling

19th International Congress on Acoustics
9.2-9.7 2007 Madrid Spain

12. Effect of low-intensity ultrasound on
human gastric carcinoma in nude mice

19th International Congress on Acoustics
9.2-9.7 2007 Madrid Spain

13. ヒトメラノーマ細胞への超音波照射
による増殖抑制効果と超音波を用いた
IFN β と IFN γ の遺伝子導入による増
殖抑制効果の検討

平成 19 年度厚生省がん研究助成金(山
崎班) 第 2 回班会議 10.30 2007 東
京

14. 超音波を用いたヒトメラノーマ細胞
へのインターフェロン β 遺伝子の導入
と増殖抑制効果の検討

第 21 回日本色素細胞学会学術大会
12.8-12.9 2007 愛知県豊明市

15. The effect of cell killing by
Ultrasound-Microbubble-Anticancer drug
第 9 回国際造影超音波シンポジウム
12.15-12.16 2007 大阪

ープ.

2007 年 4 月 10 日; PCT/JP2007/057878.

2. 実用新案登録

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

Ultrasound catheter with utility lumen

United States Patent: 7,186,246

Bennett, et al.: March 6, 2007

小玉哲也, 森士朗. 超音波発生用プロ

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発研究事業）

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

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

要旨：遺伝子の全身デリバリーはまだキャリアの開発が進んでいない。よって遺伝子・核酸治療は局所投与で活路をみいだすべき。局所投与が臨床的に意味があるのは、脳腫瘍、肝がん、卵巣がん、そして膀胱がんなどに限られてくる。よってそれら非臨床モデルを構築しそのデータをもとに臨床試験へはいるべきである。

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、脳腫瘍への内頸動脈

からの動注、原発性肝がんに対する、肝動脈動注、ステージ 3 卵巣がんへの腹腔内投与、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てきた。

B. 研究方法

1) 前臨床評価用 in vivo モデル系の構築：ヒト肝がん、ヒト脳腫瘍、ヒト卵巣がん、ヒト膀胱がん細胞株にルシフェラーゼ発現プラスミドを導入した。局所投与評価を行うために、それぞれの同所移植モデルの作成を行った。

2) 超音波・バブルリポソームの併用による siRNA の in vivo 導入は主に、膀胱がん同所移植モデルにおいて評価した。評価はルシフェラーゼ強制発現、ヒト膀胱がん同所移植モデルに対し、ルシフェラーゼ siRNA 膀胱内導入後、ルシフェラーゼ活性の減少をみることで評価した。

（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) ルシフェラーゼ強制発現させた肝がん、脳腫瘍、卵巣がん、そして膀胱がんの同所移植腫瘍はルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを腹腔内投与することにより、**photon imager** にて、簡単に移植部での増殖状態を追跡できることがわかった。①肝がんでは、同所モデルにはメス **SCID mouse** を使用した。全身麻酔下に上腹部正中に約 1cm の皮膚切開を加え開腹した。肝外側区域を体外へ誘導し、直視下に 27G の注射針を用いて 1×10^6 個/20 μ L のヒト肝がん細胞株を注入した。細胞懸濁液が腹腔内などに流出しないことを確認し、閉創した。全身麻酔下に上腹部に約 2.5cm の逆 L 字切開を加え開腹した。門脈および総胆管を目印に胃十二指腸動脈(GDA)を確認し、血行遮断後に GDA を切開した。外径 0.36mm (内径 0.18mm) の Polyurethane 製の catheter を挿入し薬剤を注入した。また、連続投与が必要な場合は **Alzet Osmotic Pump** を用いることで 1.0 μ L/hr であれば 3 日間、0.5 μ L/hr であれば 1 週間持続投与が可能である。単回投与であれば catheter は抜去し、GDA は結紮止血を行う。連続投与であればそのまま catheter および **Alzet Osmotic Pump** は腹腔内に留置して、閉創した。②脳腫瘍では、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。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。**siRNA-liposome** 複合体の頸動脈内注入に関しては、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。肩甲骨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が確認できる。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。注入後止血処理を完全に行い閉創する。

③膀胱腫瘍 **in vivo** モデル系の構築: ノ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 1x10⁷/100 μ l のルシフェラーゼ発現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。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) 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。本研究においては、臨床的に局所投与が延

命効果につながる可能性のある、脳腫瘍、肝がん、卵巣がん、膀胱がんの同所移植モデルの確立に力点をおいた。その結果、非臨床評価系として問題ない同所移植モデルの確立に成功した。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も確立した。またイムノ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イムノ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

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Y Bae, Y Matsumura, 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 antitumor 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. 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.
 5. 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.
 6. 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 .
 7. Y. Matsumura, Preclinical and clinical studies of anticancer drug-incorporated polymeric micelles. *J Drug Targeting*., 15(7-8) : 507-517, 2007 .
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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).
 12. M, Sumitomo., Y. Matsumura, et al., Novel SN-38-incorporated polymeric micelles, NK012, strongly suppress renal cancer progression. *Cancer Res*., 68 : 1631-1635, 2008.

厚生科学研究費補助金（医療機器開発研究事業）

分担研究報告書

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。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、バブルリポソ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 ($3W/cm^2$) 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

SCDI マウス (オス, 6 週齢) の側腹皮下に

HT29-luc 細胞 ($1 \times 10^6/100 \mu L/site$) を移植

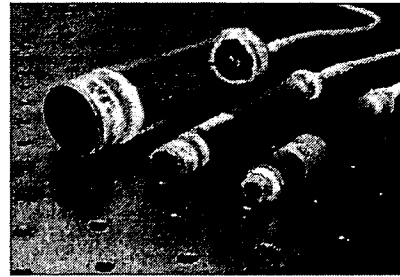


図 1. 試作の超音波プローブ

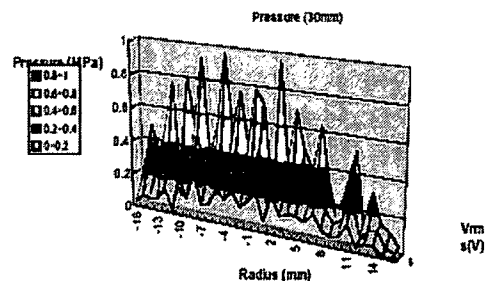


図 2. 半径方向の音圧分布。

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 ($3W/cm^2$) を照射する。翌日から毎日、腹腔内に GCV ($150 \mu g/g$ 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 (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

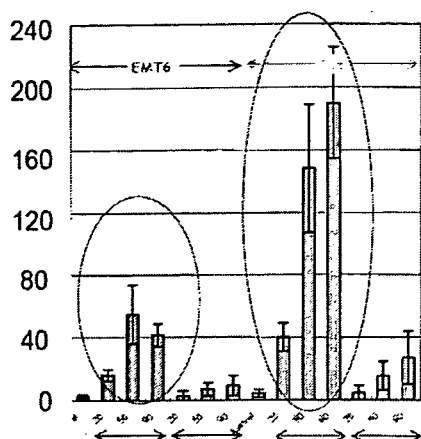


図 3. 導入効率の比較

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 種類のパ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

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

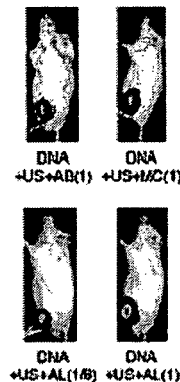
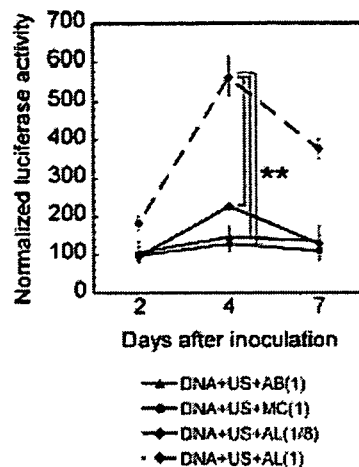


図 4. バブルの違いにともなう遺伝子発現の比較。AB:アルブミンバブル, MC:脂質バブル, AL:バブルリポゾーム。(1)および(1/8)はそれぞれ 50%(v/v)および 6.25%(v/v)を示す。ルシフェラーゼの発現活性は遺伝子導入後 4 日目に最大値をとる。脂質リポゾームバブルが高い導入効率を示す。

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 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

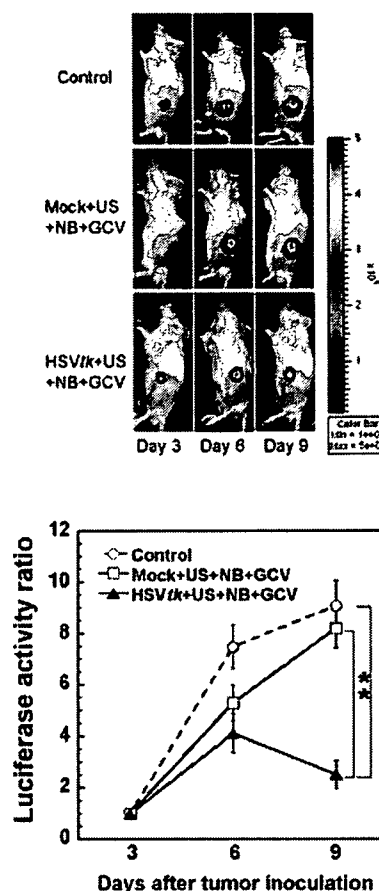


図5. HSVtk/GCV 自殺遺伝子療法.** $p < 0.01$.

intercellular communication (GJIC)が重要な働きを演じていると指摘されている。本実験では明朗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。

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.

Kodama T, Koshiyama K, Tomita Y, et al. Interaction of impulsive pressures of cavitation bubbles with cell membrane during sonoporation. *AIP Conference Proceedings* 2006a;829:34-38.

Kodama T, Tomita Y, Koshiyama K, Blomley MJ. Transfection effect of microbubbles on cells in superposed ultrasound waves and behavior of cavitation bubble. *Ultrasound Med Biol* 2006b;326:905-914.

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; 916: 2198-2205.

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

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：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と超音波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 siRNA の導入が可能であった。さらに、コレステロール修飾 siRNA をバブルリポソームに添加するだけでバブルリポソームに siRNA を組込むことに成功した。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、バブルリポソームが siRNA キャリアーとしての有望な新規ツールになると期待される。

A. 研究目的

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と超音波を利用した遺伝子導入について報告してきた。本方法は直接細胞質へ遺伝子導入可能であるため、siRNA にも適した導入方法であると考えられる。そこで本研究ではバブルリポソームの siRNA 導入キャリアーとしての可能性を検討した。

B. 研究方法

ルシフェラーゼ発現プラスミド DNA と siRNA の共導入

COS-7 細胞にバブルリポソームとルシフェラーゼ (GL3) 発現プラスミド DNA と siRNA を添加し超音波照射した。細胞を洗浄し、48 時間培養後にルシフ

エ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。

ルシフェラーゼ恒常発現細胞への siRNA 導入

ルシフェラーゼ恒常発現 Colon26 細胞にバブルリポソームと siRNA (200nM) を添加し、超音波照射した。1 時間後、細胞を洗浄し 24 時間培養した細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。

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