

スミド DNA および コレステロール修飾 siRNA (Chol-siRNA) 組込みバブルリポソームを添加し、超音波照射した。細胞を洗浄し 2 日間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

### C. 研究結果

#### ルシフェラーゼ発現プラスミド DNA と siRNA の共導入

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(図 1)。それに対し、非特的な

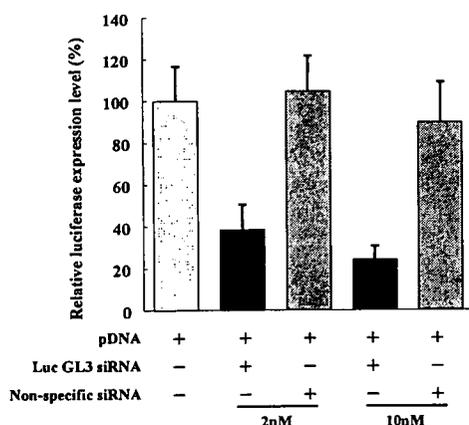


図 1 バブルリポソームによる siRNA の細胞内導入によるルシフェラーゼ発現の抑制効果

siRNA を用いて同様の導入実験を行った場合には、ルシフェラーゼ発現抑制効果は認められなかった。

#### ルシフェラーゼ恒常発現細胞への siRNA 導入

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(図 2)。

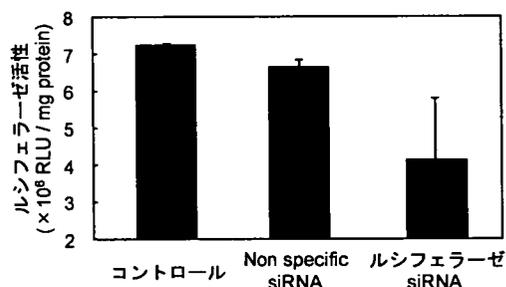


図 2 バブルリポソームによる siRNA 導入

#### 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 効果の評価

バブルリポソームに siRNA を保持させる目的で Chol-siRNA とバブルリポソームを混合したところ、Chol-siRNA をバブルリポソームに保持させることができた。これはコレステロールがアンカーとなってリポソーム膜に組み込まれたためと考えられた。そこで、この 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3)。その結果、今回用いた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。

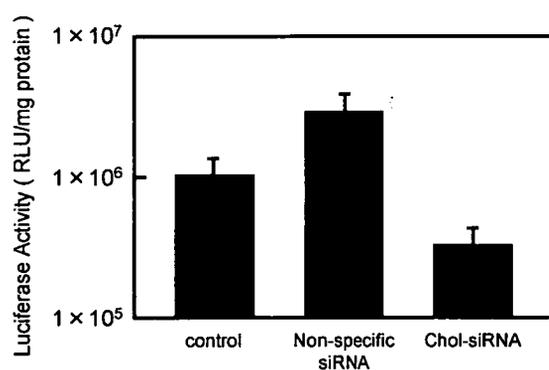


図3 Chol-siRNA 組込み型バブルリポソームと超音波の併用による RNAi 効果

#### E. 結論

バブルリポソームと超音波の併用により siRNA が細胞内に導入され、配列特異的な RNAi 効果を誘導することができた。さらに、Chol-siRNA を利用することで siRNA を保持した新たなタイプのバブルリポソームを開発することができた。この Chol-siRNA 組込み型バブルリポソームは超音波との併用により RNAi 効果を誘導できることが明らかとなった。それゆえ、バブルリポソームは新規 siRNA デリバリーキャリアーとして利用可能になる

ものと期待される。

#### F. 健康危険情報

該当無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 田中久美子、鈴木亮、滝澤知子、宇都口直樹、根岸洋一、丸山一雄 バブルリポソームを利用した超音波遺伝子導入法に関する基礎的検討 *Progress in Drug Delivery System*, **14**, 35-43 (2005)
2. 菊池眞、守本祐司、石原美弥、藤田真敬、萩原康介、石原雅之、佐藤俊一、佐藤正人、丸山一雄、分子細胞医療における医療工学技術 血管医学 (*Vascular Biology & Medicine*) , **5**, 75-83 (2004)
3. Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Kosuke Hagiwara, Kumiko Tanaka, Kaori Sawamura, Naoki Utoguchi, Toshihiko Nishioka, Kazuo Maruyama: Gene delivery by combination of novel liposomal bubbles with perfluoropropane and ultrasound, *J. Control. Release*, **117**, 130-136 (2007)

- 4.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)
- 5.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)
- 6.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)
- 7.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)
- 8.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)
- 9.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)
10. 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)
11. 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)

12. 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. 田中久美子、鈴木 亮、滝澤知子、宇都口直樹、根岸洋一、丸山一雄 バブルリポソームを利用した超音波遺伝子導入法に関する基礎的検討 第14回静岡DDSカンファレンス、静岡、2004年6月 口頭発表
2. Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Kumiko Tanaka, Naoki Utoguchi, Yoichi Negishi, Kazuo Maruyama, "Bubble Liposome" as Gene Delivery Tool、 遺伝子デリバリー研究会 第5回シンポジウム、東京、2005年5月 口頭発表
3. 丸山一雄 バブルリポソームを用いた遺伝子治療 日本 DDS 学会第20年会、東京、2005年7月 招待講演
4. 滝澤知子、田中久美子、鈴木亮、根岸洋一、丸山一雄 遺伝子導

入用造影ガス封入リポソーム (バブルリポソーム) の開発、第21回日本DDS学会、東京、2005年7月 ポスター発表

5. 澤村香織、鈴木亮、田中久美子、滝澤知子、遠藤葉子、根岸洋一、萩沢康介、安田純、渡辺隆、宇都口直樹、丸山一雄、超音波造影ガス封入リポソーム (バブルリポソーム) を利用した新規 siRNA 細胞内送達法の開発、第15回アンチセンスシンポジウム、群馬、2005年11月 口頭発表
6. Kazuo Maruyama, Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Kumiko Tanaka, Naoki Utoguchi, Yoichi Negishi, Development of "Bubble Liposome" as Gene Delivery Tool, International Society of Therapeutic Ultrasound 2005、米国、2005年10月 口頭発表
7. Kazuo Maruyama, Development of Lipid Bubbles formed from Liposome as A Gene Delivery Tool, International Liposome Society Meeting 2005、米国 2005年12月 口頭発表

8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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、米国、2006 年 12 月 口頭発表
13. Kazuo Maruyama, Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Kaori Sawamura, Naoko Utoguchi Drug And Gene Delivery By “Bubble Liposomes” And Ultrasound 2nd Annual Meeting of International Liposome Society、英国、2006 年 12 月 口頭発表
14. 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リポソーム(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
15. 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
16. 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
17. 鈴木 亮、丸山一雄 超音波造影ガス封入リポソーム（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
18. 鈴木 亮、丸山一雄 超音波造影ガス封入リポソーム（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
19. 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、英国、2006年8月 口頭発表
20. 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リポソーム（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
21. 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
22. Ryo Suzuki, Kumiko Tanaka, Tomoko Takizawa, Kaori

- Sawamura, Yoichi Negishi, Kosuke Hagusawa, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama Gene delivery with the liposomes entrapping perfluoropropane gas a novel non-viral vector 10<sup>th</sup> Liposome Research Days、米国、2006年5月 口頭およびポスター発表 Poster Award
23. Kaori Sawamura, Ryo Suzuki, Kumiko Tanaka, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Kosuke Hagusawa, Jun Yasuda, Takashi Watanabe, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama Development of the liposomes entrapped ultrasound contrast gas as a novel siRNA delivery carrier 10<sup>th</sup> Liposome Research Days、米国、2006年5月 ポスター発表
24. Tomoko Takizawa, Ryo Suzuki, Kumiko Tanaka, Naoki Utoguchi, Yoichi Negishi, Kazuo Maruyama Development of Bubble Liposome as Gene Delivery Tool 11<sup>th</sup> WFUMB2006、韓国、2006年5月 口頭発表
25. 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、京都、2007年12月、ポスター発表
26. 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、大阪、2007年12月、口頭発表
27. 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、横浜、2007年10月、ポスター発表
28. 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、名古屋、2007年6月、口頭発表
29. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Yoichi Negishi, Tomoko Takizawa, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama; Ultrasound enhanced tumor tissue

specific gene delivery with liposomal bubbles, ISTU2007、韓国、2007年6月、ポスター発表

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、宮城、2007年4月、シンポジウム

30. 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 10<sup>th</sup> Annual Meeting、米国2007年5月、ポスター発表

#### 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

31. 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、鹿児島、2007年5月、シンポジウム

32. 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、東京、2007年5月、ポスター発表

33. 鈴木 亮，滝澤知子，宇都口

## 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

#### 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

研究要旨 ゲノム維持機構や細胞周期に関与する遺伝子群のなかから、siRNA によるサイレンシングが癌細胞特異的に細胞増殖の抑制をもたらす標的遺伝子の探索を行った。その結果、RecQL1 ヘリカーゼをはじめとするいくつかの遺伝子を、抗癌剤開発のための分子標的として見出した。これらの標的遺伝子について、種々のがん細胞での評価、ゼノグラフトモデルを用いた評価を行い、RNA干渉によるサイレンシングが腫瘍増殖抑制活性を示す有望な標的を見出した。

#### A. 研究目的

ゲノム維持機構、細胞周期に関与する遺伝子群の中から、siRNA (small interfering RNA)によるサイレンシングが、癌細胞特異的に細胞増殖の抑制をもたらす癌標的遺伝子の探索を行う。選抜した標的遺伝子について、そのサイレンシングが実際に抗腫瘍活性をもたらすかどうか、皮下担癌モデルを用いて評価を行う。

#### B. 研究方法

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の選抜を行う。それらの標的候補遺伝子に対して、複数種の siRNA をデザインし、RNA 干渉に伴う細胞増殖抑制効果を測定する。

選抜した標的 siRNA は、細胞死をもた

らす機序を解析するために、タイムラプス顕微鏡による観察、免疫染色法およびフローサイトメーターによる解析、細胞パネルによる作用の評価、マイクロアレイによる発現プロファイルなど、一連の評価によって RNA 干渉 (RNAi) がもたらすサイレンシング効果の同定を行う。

In vivo レベルでの検証のため、肺がん細胞株 A549 を皮下担癌したゼノグラフトモデルを使って、選抜した siRNA の評価を行う。DDS として、入手可能な in vivo 用のポリエチレンイミンを使用し、siRNA-ポリエチレンイミン複合体を局所投与し、それぞれの siRNA がもつ抗腫瘍活性を評価する。

#### (倫理面への配慮)

動物の取扱いについては、社団法人日本実験動物実験学会の動物実験に関する方針に準拠した(株)ジーンケア研究所における実験動物取扱い規定に

従った。

### C. 研究結果

正常組織および癌組織由来の mRNA について定量的な PCR を行い、遺伝子発現の比較を行ったところ、細胞周期に関連する遺伝子群に特徴的に、明確な発現量の差異を見出した。

これらの遺伝子について、siRNA をデザインし、細胞に導入してみると、それらの多くで、細胞死や老化様の細胞周期停止状態をもたらした。特に M 期に関与する遺伝子群のサイレンシングは、細胞増殖に劇的な細胞死誘導活性を発揮した。これらのサイレンシングが癌細胞特異的に現れる理由を、各種のチェックポイント阻害剤を用いて詳細に解析を試みたところ、細胞が持つチェックポイントの恒常性の差異が細胞死に反映することを見出し、日本癌学会の国際誌 *Cancer Science* 誌上で発表した(文献6)。これらの siRNA のうち、正常細胞への影響が少ない数種の siRNA を標的候補として選抜した。

実際の腫瘍に対する増殖阻害活性を、肺がん細胞株 A549 の皮下担癌したモデルで評価を行った。送達手段(DDS)としては、入手可能な *in vivo* jetPEI を用い、核酸量換算で 50  $\mu$ g の siRNA を、1日1回週2回を1クールとする3クールの局所投与を行い、その抗腫瘍活性を評価した。

その結果、コントロール配列投与群と比較して、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すことが出来なかった。

### D. 考察

我々が見出した標的遺伝子は、*in vitro* 実験では、癌細胞株に対して劇的な細胞死あるいは増殖抑制活性を発揮したが、担癌モデル動物に対する抗腫瘍活性の程度は、様々であった。その理由としては、平面培養により増殖する細胞と、三次元増殖している細胞との性質上の違い、さらに siRNA の送達効率の違いによるものを反映していると考えられる。今回見出した分子標的遺伝子のサイレンシング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、抗癌剤開発のための標的として有望であると思われる。

### E. 結論

今回の解析で見出した分子標的は、ゼノグラフトモデルに対して効果的な抗腫瘍活性を示し、抗癌剤開発のための候補遺伝子として有望であると思われる。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 嶋本顕「RNA 干渉の医療への応用」  
日本臨床、63 巻、7 号、1291-1297  
(2005)
- 2) 高木基樹、嶋本顕、古市泰宏「RNAi  
療法; siRNA の癌治療薬への応用  
(RNAi 法とアンチセンス法)」講談社  
サイエンティフィック、76-87(2005)
- 3) Sato A., Takagi M., Shimamoto A.,  
Kawakami S., Hashida M. Small  
interfering RNA delivery to the liver  
by intravenous administration of  
galactosylated cationic liposomes in  
mice. Biomaterials, 28 巻、  
1434-1442(2007)
- 4) Sato A., Choi AW., Hirai M.,  
Yamayoshi A., Moriyama R., Yamano  
T., Takagi M., Kano A., Shimamoto  
A., Maruyama A. Polymer  
brush-stabilized polyplex for a  
siRNA carrier with long circulatory  
half-life. J Control Release, 122 巻  
(3 号), 209-216(2007)
- 5) 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, 30 巻  
(10 号), 1958-1961(2007)

- 6) 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 巻(1 号), 71-80,  
(2008)

### 2. 学会発表

- 1) 村田絵里子、多田周右、二見和伸、  
古市泰宏、関政幸、榎本武美  
「RecQL1 siRNA の処理によるがん細胞死」日本薬学会東北支部会、第45  
回大会(2006)
- 2) 二見和伸、熊谷栄美、牧野弘、伊藤  
千絵、古市泰宏、「RecQL1-siRNA  
の癌治療への応用」第17回アンチセ  
ンスシンポジウム、石川(2007)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他(出願特許)

- 1)【発明の名称】siRNA 癌治療薬  
【出願日】平成 17 年 12 月  
【発明者】二見和伸、嶋本顕  
【出願人】株式会社ジーンケア研究所  
【発明の概要】癌細胞選択的に細胞  
死を誘導する標的遺伝子の用途特許  
及び siRNA 配列
- 2)【発明の名称】肝指向性のリポソーム  
組成物

【出願日】平成 17 年 10 月

【発明者】佐藤あゆみ、高木基樹、嶋本顕、川上茂、橋田充

【出願人】株式会社ジーンケア研究所、国立大学法人京都大学

【発明の概要】肝実質細胞に siRNA を送達し、RNAi 効果により標的遺伝子の発現を抑制する siRNA リポソーム複合体の用途特許

3)【発明の名称】RNA 含有組成物

【出願日】平成 17 年 5 月

【発明者】佐藤あゆみ、平井美和、高木基樹、嶋本顕、丸山篤史、チェンウォン、狩野有宏

【出願人】株式会社ジーンケア研究所、国立大学法人九州大学

【発明の概要】siRNA の血中滞留性を高める siRNA ポリカチオン複合体の用途特許

4)【発明の名称】抗癌剤増感剤

【出願日】平成 18 年 9 月

【発明者】二見和伸、高木基樹、杉本正信、古市泰宏

【出願人】株式会社ジーンケア研究所  
【発明の概要】既存抗癌剤の作用を増感させる目的に用いる siRNA 標的遺伝子の用途特許。

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

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

分担研究者 立花 克郎 福岡大学 医学部解剖学教室

研究要旨

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

A. 研究目的

本研究の目的は、超小型の超音波発振セラミック技術を応用した超音波照射による遺伝子導入の検討およびその安全な低侵襲治療システムの確立にある。超音波エネルギーによる生体反応、薬剤透過性亢進作用、細胞内遺伝子導入が検討された。

B. 研究方法

GFP encoded plasmid DNA (pQBI25) を 20  $\mu$ g と異なった量・種類のマイクロバブル (BR14, Sonovue, Sonazoid, Bubble liposome) を  $2 \times 10^6$  Chinese hamster ovary (CHO) 細胞と混合して、異なった超音波 (1MHz、Intensity 0.5 ~ 1.5 W/cm<sup>2</sup>、Duty Cycle 10~50%、20~60 seconds) を照射し生細胞率を調べた。また、マイクロバブルの濃度・種類を調節し、超音波を照射した後、生細胞  $1 \times 10^5$  を回収・再培養し、48 時間後 GFP 陽性細胞率を比較した。

C. 研究結果

低侵襲性超音波はマイクロバブルの併

用により遺伝子を導入することができることが判明した。また、超音波の周波数、音響条件、素子の形状によって遺伝子導入増強率が左右されることも解った。低侵襲性超音波とマイクロバブルの併用は安全な癌遺伝子療法として大いに期待できることが示唆された。

G 研究発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Tachibana K, Tachibana S Emerging technologies using ultrasound for drug delivery Emerging Therapeutic Ultrasound 131-166 2006
  5. Feril LB Jr, Tachibana K Ultrasound in Medicine: To Search and diseased Tissues. *Philippine Physics journal* 28:67-72
  6. Tachibana K, Feril LBJr. Using ultrasound For Drug Delivery. *Philippine Physics journal* 28:125-135
  7. 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
  8. 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
  9. 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
  10. 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
  11. 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

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Y Bae, <u>Matsumura Y</u> , 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.	16	122-130	2005
T Hamaguchi, <u>Y Matsumura</u> , 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
H Uchino, <u>Y Matsumura</u> et al.	Cisplatin-Incorporating Polymeric Micelles (NC-6004) Can Reduce Nephrotoxicity and Neurotoxicity of Cisplatin in Rats.	Brit J Cancer.	93	678-687	2005
K. Sawada, <u>Y.Furuchi</u> , et al.	Differential cytotoxicity of anticancer agents in pre- and post-implant lymphoblastoid cell lines.	Biol.Pharm.Bull.	28	1202-1207	2005
K. Futami, <u>Y. Furuchi</u> et al.	Quantitative analysis of Werner helicase activity using the single-molecule fluorescence detection system MF10S.	Biol.Pharm.Bull.	28	9-12	2006
Sonoda S, <u>Tachibana K</u> et al.	Gene transfer to corneal epithelium and keratocytes mediated by ultrasound with microbubbles.	Invest Ophthalmol Vis Sci.	47	558-564	2006
Sivakumar M, <u>Tachibana K</u> et al.	Transdermal drug delivery using ultrasound-theory, understanding and critical analysis.	Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).	2;51 Suppl	OL767-84	2006

<u>Koike H, Tachibana K et al.</u>	An efficient gene transfer method mediated by ultrasound and microbubbles into the kidney.	J Gene Med	7	108-116	2005
<u>Koshiyama K, Kodama T, et al.</u>	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	2005
<u>T Negishi, F Koizumi, Y Matsumura, et al.</u>	NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, is a more potent radiosensitizing agent compared to free paclitaxel.	Brit J Cancer	95	601-606	2006
<u>F Koizumi, Y Matsumura, et al.</u>	Novel SN-38-incorporated polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial growth factor-secreting bulky tumors.	Cancer Res	66	10048-10056	2006
<u>Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama:</u>	Gene delivery by combination of novel liposomal bubbles with perfluoropropane and ultrasound	J. Control. Release	117	130-136	2007
<u>Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama</u>	Development of the liposomes entrapped ultrasound imaging gas ("Bubble liposomes") as novel gene delivery carriers, AIP conference Proc.	Therapeutic ultrasound		568-572	2006
<u>Takahashi M, Kodama T.</u>	Spinal gene transfer using ultrasound and microbubbles.	J Control Release.	117(2)	267-272	2007
<u>Kodama T.</u>	A non-invasive tissue-specific molecular delivery method of cancer gene therapy.	Minim Invasive Ther Allied Technol	15(4)	226-229	2006
<u>Koshiyama K, Kodama T</u>	Structural change in lipid bilayers and water penetration induced by shock waves: molecular dynamics simulations.	Biophys J	Sep 15;91(6)	2198-205	2006
<u>Tachibana K.</u>	Emerging technologies using ultrasound for drug delivery	Emerging Therapeutic Ultrasound		131-166	2006
<u>Feril LB Jr, Tachibana K</u>	Ultrasound in Medicine: To Search and diseased Tissues.	Philippine Physics journal	28	67-72	2006
<u>Tachibana K, Feril LB Jr.</u>	Using ultrasound For Drug Delivery.	Philippine Physics journal	28	125-135	

<u>Sonoda S, Tachibana K, et al.</u>	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
<u>Kagiya G, Tachibana K, et al.</u>	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
<u>Tabuchi Y, Tachibana K et al.</u>	Identification of genes responsive to low intensity pulsed ultrasound in a human leukemia cell line Molt-4	1. Cancer letters:	246	149-156	2006
<u>T, Hamaguchi., K, Kato., Y, Matsumura., et al.,</u>	A Phase I and Pharmacokinetic Study of NK105, a Paclitaxel-incorporating Micellar Nanoparticle Formulation.	Brit J Cancer	97	170-176	2007
<u>Y, Matsumura.</u>	Preclinical and clinical studies of anticancer drug-incorporated polymeric micelles.	J Drug Targeting.	15	507-517	2007
<u>K, Maekawa., Y Matsumura., et al.</u>	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
<u>T, Nakajima., Y, Matsumura., et al.</u>	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
<u>S, Yajima., Y Matsumura. et al.</u>	Expression profiling of fecal colonocytes for RNA-based screening of colorectal cancer.	Int J Oncol.	31	1029-37	2007
<u>Y, Saito., Y, Matsumura., et al.</u>	Enhanced distribution of NK012 and prolonged sustained-release of SN-38 within tumors are the key strategic point for a hypovascular tumor.	Can Science.			in press.2008
<u>M, Sumitomo., Y, Matsumura., et al.</u>	Novel SN-38-incorporated polymeric micelles, NK012, strongly suppress renal cancer progression.	Cancer Res.	68	1631-1635	2008

Aoi A, Watanabe Y, Mori S, <u>Kodama T</u> , et al.	Herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy using nano/microbubbles and ultrasound	Ultrasound Med Biol	343	425-434	2008
Takahashi M, <u>Kodama T</u> , et al.	Spinal gene transfer using ultrasound and microbubbles.	J Control Release	1172	267-272	2007
Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Naoki Utoguchi, Kaori Sawamura, Kumiko Tanaka, Eisuke Naimai, Yusuke Oda, Yasuhiro Matsumura, <u>Kazuo Maruyama</u>	Tumor specific ultrasound enhanced gene transfer in vivo with novel liposomal bubbles;	J. Control. Release	125	137-144	2008
Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Naoki Utoguchi, <u>Kazuo Maruyama</u>	Effective gene delivery with liposomal bubbles and ultrasound as novel non-viral system;	J. Drug Target.	15	531-537	2007
Emoto M, <u>Tachibana K</u> , 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	98(6)	929-935	2007
Tabuchi Y. Ando H, Takasaki I, Feril LB Jr, Zhao QL, Ogawa R, Kudo N, <u>Tachibana K</u> , Kon do T.	Identification of genes responsive to low intensity pulsed ultrasound in a human leukemia cell line Molt-4.	Cancer Letters	246	149-156	2007
Futami K., Kumagai E., Makino H., Goto H., Takagi M., Shimamoto A., <u>Furuichi Y.</u>	Induction of mitotic cell death in cancer cells by small interference RNA suppressing the expression of RecQL1 helicase.	Cancer Science	99	71-80	2008

---

**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**

---

**Younsoo Bae, Nobuhiro Nishiyama, Shigeto Fukushima,  
Hiroyuki Koyama, Matsumura Yasuhiro, and Kazunori Kataoka**

Department of Materials Science and Engineering, Graduate School  
of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku,  
Tokyo 113-8656, Japan, Department of Clinical Vascular  
Regeneration, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo,  
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan, and Investigative  
Treatment Division, National Cancer Center Research Institute East,  
6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8577, Japan

***Bioconjugate  
Chemistry***<sup>®</sup>

Reprinted from  
Volume 16, Number 1, Pages 122-130

# 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

Younsoo Bae,<sup>†</sup> Nobuhiro Nishiyama,<sup>‡</sup> Shigeto Fukushima,<sup>†</sup> Hiroyuki Koyama,<sup>‡</sup> Matsumura Yasuhiro,<sup>§</sup> and Kazunori Kataoka<sup>\*†</sup>

Department of Materials Science and Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan, Department of Clinical Vascular Regeneration, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan, and Investigative Treatment Division, National Cancer Center Research Institute East, 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8577, Japan. Received July 28, 2004; Revised Manuscript Received October 31, 2004

A novel intracellular pH-sensitive polymeric micelle drug carrier that controls the systemic, local, and subcellular distributions of pharmacologically active drugs has been developed in this study. The micelles were prepared from self-assembling amphiphilic block copolymers, poly(ethylene glycol)-poly(aspartate hydrazone adriamycin), in which the anticancer drug, adriamycin, was conjugated to the hydrophobic segments through acid-sensitive hydrazone linkers. By this polymer design, the micelles can stably preserve drugs under physiological conditions (pH 7.4) and selectively release them by sensing the intracellular pH decrease in endosomes and lysosomes (pH 5–6). In vitro and in vivo studies show that the micelles have the characteristic properties, such as an intracellular pH-triggered drug release capability, tumor-infiltrating permeability, and effective antitumor activity with extremely low toxicity. The acquired experimental data clearly elucidate that the optimization of both the functional and structural features of polymeric micelles provides a promising formulation not only for the development of intracellular environment-sensitive supramolecular devices for cancer therapeutic applications but also for the future treatment of intractable cancers with limited vasculature.

## INTRODUCTION

The selective augmentation of drug concentrations in avascular tumor tissues is the most challenging issue of current cancer chemotherapy using macromolecular bioconjugates (1–3). Most anticancer drugs are pharmacologically effective but limited in their clinical applications due to serious toxicity and low water solubility; thereby, the altered biodistribution of these drugs has an important meaning not only to reduce the toxicity but also to improve therapeutic effects (4–6). For these reasons, interest has centered on the creation of drug carriers that safely and precisely deliver the appropriate amounts of active drugs to solid tumors (7–10). Indeed, several macromolecular drug carriers are under clinical trials or used practically, which include water-soluble polymer-drug conjugates (11), liposomal carriers (12), and polymeric micelles (13). However, even though these carriers have made significant advancements in cancer therapy, recent studies point out their antitumor activities are subject to change according to the cancer species with pathological, pharmacological, and biochemical differences (14).

There are three major reasons why the present macromolecular drug carriers have difficulties in clinical use. First, the carriers injected into the body encounter in vivo barriers such as nonspecific systemic accumulation and phagocytotic clearance by the host defense system (15). Second, even after the carriers accumulated in solid tumors avoiding these in vivo barriers, they still have to overcome the heterogeneous tumor microenvironments that are characterized by insufficient blood supply, disordered vasculatures, and diffusion-limited interstitium (16). Third, the carriers that successfully accessed the inside of tumor tissues should release the loaded drugs back into active forms in order to exert the antitumor effect (17). Among these reasons, poor permeability of the carriers inside the tumor tissues and low concentrations of active drugs throughout solid tumors become particularly serious problems (18, 19). For these reasons, understanding the correlation between the physicochemical properties of drug carriers and their behaviors in the body is very important, and the combination of these two features is required for the design of ultimate carriers (20).

In this article, we will report that such tantalizing problems may be overcome by a novel tumor-infiltrating drug carrier, the pH-sensitive polymeric micelle, whose structural and functional features were optimized for the intracellular drug delivery (Figure 1A). The micelle is a nanosized supramolecular assembly from the self-assembling amphiphilic block copolymers, poly(ethylene glycol)-poly(aspartate hydrazone adriamycin) [PEG-p(Asp-Hyd-ADR)]. The anticancer drug, adriamycin (ADR), is

\* To whom correspondence should be addressed. Phone: +81-3-5841-7138, Fax: +81-3-5841-7139, E-mail: kataoka@bmw.t.u-tokyo.ac.jp.

<sup>†</sup> Department of Materials Science and Engineering, The University of Tokyo.

<sup>‡</sup> Department of Clinical Vascular Regeneration, The University of Tokyo.

<sup>§</sup> National Cancer Center Research Institute East.