

peutic ultrasound (1.011 MHz) was irradiated from a device (Sono-Pore KTAC-4000, NepaGene, Chiba, Japan) at intensity of 0.15 or 0.44 W/cm<sup>2</sup> (duty cycle of 25%) for 20 s immediately after addition of Bubble liposomes into the sample.

### 2.7. Measurement of cell viability

The Trypan blue dye exclusion test was carried out by mixing 200  $\mu$ l of the suspension of HeLa cells with an equal amount of 0.3% Trypan blue solution (Sigma Chemicals) in PBS. After 5 min incubation at room temperature, the number of cells excluding Trypan blue was counted using a C-Chip disposable hemocytometer (Digital Bio Technology Co., Gyeonggi, Korea) to estimate the number of viable cells immediately after sonication.

### 2.8. Measurement of infectivity of chlamydiae

The 1.0 ml of chlamydial suspensions in SPG treated with ultrasound and/or nanobubbles was inoculated into triplicate cultures of McCoy cells in order to estimate the infectivity immediately after sonication. Chlamydial suspensions, 0.25 ml each, were added onto the monolayer culture of McCoy cells. After centrifugation at 1000g for 60 min, the inoculum was decanted, and the cells were washed with medium to remove the nonadsorbed chlamydiae, and were then further incubated in 1.0 ml of maintenance medium.

### 2.9. Internalization of dextran–fluorescein conjugates

Dextran–fluorescein conjugates (3000 MW, anionic; Molecular Probes, Inc., OR, USA) were soluble in 0.02 M Tris–HCl buffer (pH 8.0) at 10  $\mu$ g/ml, and performed by filtration using 0.2  $\mu$ m pore-diameter sterile filters. Aqueous solutions of dextran were diluted to 10  $\mu$ g/ml with maintenance medium. The 50  $\mu$ l of solution of dextran conjugates instead of antibiotics were added into the monolayer cultures of HeLa cells in a 24-well plate with lumox™ fluorocarbon film bottom. Ultrasound was irradiated for 20 s with or without Bubble liposomes at 50  $\mu$ g/ml. Cultures were rinsed in PBS(–) solution and examined immediately after rinsing by fluorescent microscopy (Leica Microsystems CTR4000, Wetzlar, Germany).

### 2.10. Statistical analysis

Data from these study were analyzed using unpaired *t*-test including Welch's correction. Results were considered to be significant when the corrected *p*-value is less than 0.05, indicated as *p* < 0.05 in the manuscript and figure legends. Error bars shown in the figures are standard deviations of duplicate samples in experiments repeated at least three times.

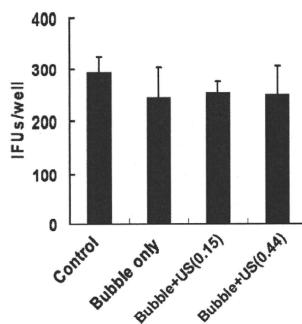
## 3. Results

### 3.1. Cell viability of HeLa cells and infectivity of chlamydiae by nanobubble-enhanced ultrasound

We first investigated whether nanobubble-enhanced ultrasound decreased the cell viability of HeLa cells and the infectivity of chlamydia. As shown in Table 1, ultrasound at intensity of 0.44 W/cm<sup>2</sup> caused no significant effect, but ultrasound at intensity of 0.15 W/cm<sup>2</sup> decreased slightly on cell viability. On the other hand, the application of ultrasound also caused no significant effect on chlamydial infectivity at both intensities of 0.15 and 0.44 W/cm<sup>2</sup> (Fig. 2).

**Table 1**  
Viable cell counts following exposure of HeLa cell to ultrasound.

Application of ultrasound	Cytotoxicity: No. of viable cells/well (% of control)
Control	
(–) Sonication	7475 $\pm$ 1950 (100)
(–) Bubble liposomes	
Bubble	
(–) Sonication	8940 $\pm$ 950 (120)
(+) Bubble liposomes	
Ultrasound (0.15 W/cm <sup>2</sup> )	6290 $\pm$ 950 (84)
(+) Bubble liposomes	
Ultrasound (0.44 W/cm <sup>2</sup> )	7865 $\pm$ 950 (105)
(+) Bubble liposomes	



**Fig. 2.** Infectivity of chlamydiae by nanobubble-enhanced ultrasound. No significant change in infectivity when cells were treated with bubble liposomes (Bubble only) or ultrasound at intensities 0.15 W/cm<sup>2</sup> (Bubble + US(0.15)) and 0.44 W/cm<sup>2</sup> (Bubble + US(0.44)) in the presence of bubble liposomes.

### 3.2. Ultrasonic enhancement of antibiotic action on *C. trachomatis*-infected HeLa cells

The MIC of DOX for *C. trachomatis*-infected HeLa cells was determined to be 0.03  $\mu$ g/ml. Infected cultures were treated with DOX at 1/2 MIC (0.015  $\mu$ g/ml) then sonicated with or without the addition of Bubble liposomes (50  $\mu$ g/ml). The results showed that ultrasound alone or Bubble liposomes alone did not decrease the formation of inclusions in infected cells administered with DOX (Fig. 3). However, DOX at 1/2 MIC in combination with nanobubble-enhanced ultrasound significantly reduced the number of IFUs to 66  $\pm$  39% and 15  $\pm$  12%, respectively, at intensities of 0.15 and 0.44 W/cm<sup>2</sup>, compared with that administered with DOX at 1/2 MIC only (Control in Fig. 3).

The MIC of CZX for *C. trachomatis*-infected HeLa cells could not be determined because intracellular pathogens are known to be resistant to CZX, therefore, we tried to use considerably high concentrations of 0.125, 0.25, 0.5 and 1.0  $\mu$ g/ml. Any of the concentrations used did not show any effect against chlamydia when applied alone but in combination with bubble-enhanced ultrasound, significant IFU reduction was observed and most with 1.0  $\mu$ g/ml CZX (data not shown). Similar to the observed effect with DOX, 1.0  $\mu$ g/ml CZX in combination with nanobubble-enhanced ultrasound also reduced the number of IFUs to 53  $\pm$  32% and 50  $\pm$  48%, respectively, at intensities of 0.15 and 0.44 W/cm<sup>2</sup>, compared with that administered 1.0  $\mu$ g/ml CZX only (Fig. 4).

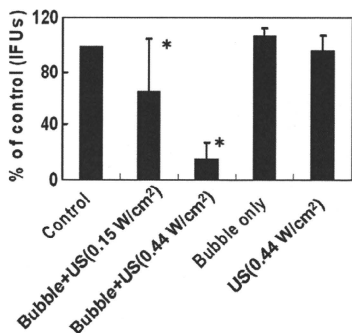


Fig. 3. Ultrasonic enhancement of bactericidal activity of doxycycline (DOX) at 1/2 MIC on *C. trachomatis*-infected HeLa cells. Data represents % of control that is the number of chlamydial inclusions treated with DOX at 1/2 MIC only ( $p < 0.05$ ).

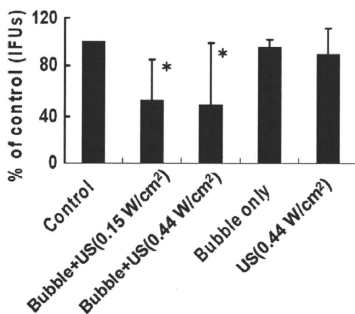


Fig. 4. Ultrasonic enhancement of bactericidal activity of ceftizoxime (CZX) at 1.0 µg/ml on *C. trachomatis*-infected HeLa cells. Data represents % of control that is the number of chlamydial inclusions treated with CZX at 1.0 µg/ml only ( $p < 0.05$ ).

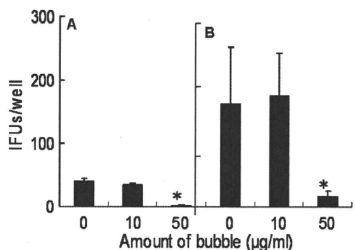


Fig. 5. Effect of concentration of Bubble liposomes in addition with ultrasound irradiation and antibiotics on *C. trachomatis*-infected HeLa cells. (A) Before ultrasound irradiation, the infected culture was treated with DOX at 1/2 MIC. (B) Before ultrasound irradiation, the infected culture was treated with CZX at 1.0 µg/ml ( $p < 0.05$ ).

Next, we examined the effect of the amount of Bubble liposomes on nanobubble-enhanced ultrasound reduction of IFU. With increased amount of Bubble liposomes, the synergistic effect of ultrasound and DOX was significantly increased (Fig. 5A). Bubble dose-dependent synergy was also observed with CZX and ultrasound (Fig. 5B).

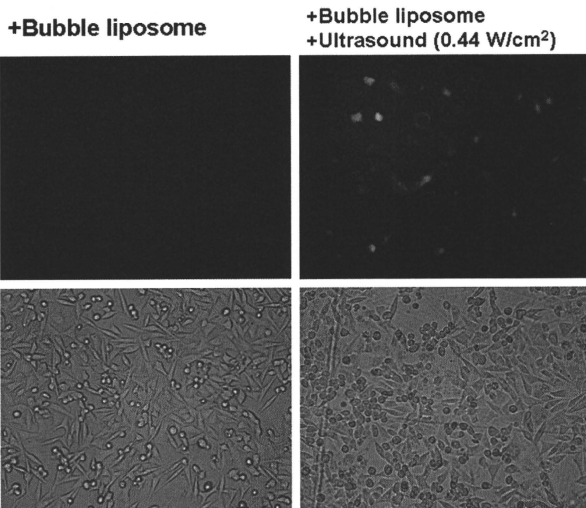
### 3.3. Internalization of dextran–fluorescein conjugates by ultrasound

Finally, to examine whether ultrasound can facilitate intracellular uptake of large molecules, we sonicated HeLa cells in the presence of fluorescein-labeled dextran and afterwards examined the cells by fluorescence microscopy. Approximately 10% of viable cells were observed to have internalized the dextran molecules after ultrasound irradiation at intensity of 0.44 W/cm<sup>2</sup> in the presence of Bubble liposomes (Fig. 6). This observation showed that ultrasound can facilitate cellular uptake of large molecules.

## 4. Discussion

Previous reports have shown a synergistic effect between ultrasound and antibiotics in killing *E. coli* and *P. aeruginosa* [8]. The purpose of this present study was to determine if the same synergistic effect could be observed with *C. trachomatis* even if this is an intracellular organism. The results of the MIC experiments and the measurements of bactericidal activity against *C. trachomatis* show that addition of nanobubble-enhanced ultrasound to DOX treatment enhanced the effectiveness of DOX in eradicating *C. trachomatis* (Fig. 3). Dramatic reduction of IFUs to 15 ± 12% was observed at higher ultrasound intensity of 0.44 W/cm<sup>2</sup> (Fig. 3). These findings could have important clinical applications because the tissue concentration of antibiotics often became below the MICs in actual clinical settings.

In a previous study, the duration of the illness in patients with *C. trachomatis*-triggered reactive arthritis (ReA) was shorter in patients treated with lymecycline for 3 months than in a placebo-treated group [13]. Other studies on the long-term treatment of acute ReA with ciprofloxacin showed no advantage over placebo treatment in the outcome of ReA [14]. So far, the optimal treatment of ReA with antimicrobial drugs remains controversial. In addition, it was recently reported that persistent chlamydial infection induced ReA [15–17]. Most recent finding by Reveneau et al. have shown that persistent chlamydial forms are more resistant to DOX than acute forms because of the decreased antibiotic uptake by host cells [18]. Therefore, a more effective treatment of persistent chlamydial infections requires a method to increase antibiotics uptake by the infected cells. On the other hand, advances in ultrasound and nanobubble-enhanced ultrasound technologies have raised the possibility of using ultrasound not only for diagnostic but also for therapeutic purposes. The combination of an agent as nanobubbles and ultrasound exposure makes sonoporation possible. Sonoporation is characterized by a transient change in cellular membrane permeability mediated by ultrasound [19–24]; the cavitation energy created by the bubble collapse is thought to be the key mechanism [19]. Thereby, we confirmed that the intracellular delivery of macromolecules such as dextran was observed under the condition used in our experiments (Fig. 6). In addition, ultrasound did not damage HeLa cells or chlamydial organisms in the presence of Bubble liposomes (Fig. 2 and Table 1). This may be due to the size of the bubbles such that cavitations created are enough to deliver the drug to the cells but not “large” enough to create fatal damage to the cell itself. However, to understand the dynamic of the interactions between nanobubble, cell membrane and ultrasound [25], further study is needed. Collectively, our data suggest the possibility of using nanobubble-en-



**Fig. 6.** Internalization of dextran–fluorescein conjugates by ultrasound irradiation with Bubble liposomes. Upper images show the detection of fluorescein into HeLa cells by fluorescence microscopy, and lower images show the condition of HeLa cells by light microscopy. After addition of dextran conjugates and Bubble liposomes on the cells, ultrasound was irradiated for 20 s or not.

hanced ultrasound to deliver antibiotic molecules into cells to eradicate intracellular bacteria without causing significant damage to the cells itself. This modality may become a new treatment modality for Chlamydial infection.

### Acknowledgements

This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas (18800075 and 20500432) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan and also in part by a grant from Fukuoka University Central Research Institute.

### References

- [1] R.W. Peeling, R.C. Brunham, Chlamydiae as pathogens: new species and new issues, *Emerg. Infect. Dis.* 2 (1996) 307–319.
- [2] J. Schachter, Infection and disease epidemiology, American Society for Microbiology, Washington DC, 1999.
- [3] W. Cates Jr., J.N. Wasserheit, Genital chlamydial infections: epidemiology and reproductive sequelae, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 164 (1991) 1771–1781.
- [4] K.A. Workowski, S.M. Berman, CDC sexually transmitted diseases treatment guidelines, *Clin. Infect. Dis.* 35 (2002) S135–S137.
- [5] D.H. Martin, T.F. Mroczkowski, Z.A. Dalu, J. McCarty, R.B. Jones, S.J. Hopkins, R.B. Johnson, A controlled trial of a single dose of azithromycin for the treatment of chlamydial urethritis and cervicitis. The Azithromycin for Chlamydial Infections Study Group, *N. Engl. J. Med.* 327 (1992) 921–925.
- [6] A. Nilsen, A. Halsos, A. Johansen, E. Hansen, E. Torud, D. Moseng, G. Anestad, G. Storvold, A double blind study of single dose azithromycin and doxycycline in the treatment of chlamydial urethritis in males, *Genitourin. Med.* 68 (1992) 325–327.
- [7] J.D. Oriel, G.L. Ridgway, Epidemiology of chlamydial infection of the human genital tract: evidence for the existence of latent infections, *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1 (1982) 69–75.
- [8] W.G. Pitt, M.O. McBride, J.K. Lunceford, R.J. Roper, R.D. Sagers, Ultrasonic enhancement of antibiotic action on gram-negative bacteria, *Antimicrob. Agents Chemother.* 38 (1994) 2577–2582.
- [9] A.M. Rediske, B.L. Roeder, M.K. Brown, J.L. Nelson, R.L. Robison, D.O. Draper, G.B. Schaajle, R.A. Robison, W.G. Pitt, Ultrasonic enhancement of antibiotic action on *Escherichia coli* biofilms: an in vivo model, *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1999) 1211–1214.
- [10] A. Nagayama, T. Nakao, H. Taen, In vitro activities of ofloxacin and four other new quinolone-carboxylic acids against *Chlamydia trachomatis*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 32 (1988) 1735–1737.
- [11] R. Suzuki, T. Takizawa, Y. Negishi, K. Hagiwara, K. Tanaka, K. Sawamura, N. Utoguchi, T. Nishioka, K. Maruyama, Gene delivery by combination of novel liposomal bubbles with perfluropropane and ultrasound [see comment], *J. Control. Release* 117 (2007) 130–136.
- [12] T. Nozomi, Y. Ikeda, A. Nagayama, Minimum inhibitory and minimal lethal concentration against *Chlamydia trachomatis* dependent on the time of addition and the duration of the presence of antibiotics, *Chemotherapy* 45 (1999) 242–248.
- [13] K. Laasila, L. Laasonen, M. Leirisalo-Repo, Antibiotic treatment and long term prognosis of reactive arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 62 (2003) 655–658.
- [14] T. Yli-Kerttula, R. Luukkainen, U. Yli-Kerttula, T. Mottonen, M. Hakola, M. Korpela, M. Sanila, J. Parvainen, J. Ukkila, R. Vainionpaa, A. Toivanen, Effect of a three month course of ciprofloxacin on the outcome of reactive arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 59 (2000) 565–570.
- [15] M.U. Rahman, M.A. Cheema, H.R. Schumacher, A.P. Hudson, Molecular evidence for the presence of chlamydia in the synovium of patients with Reiter's syndrome, *Arthritis Rheumatism* 35 (1992) 521–529.
- [16] J.S. Gaston, Immunological basis of Chlamydia induced reactive arthritis, *Sex. Transm. Infect.* 76 (2000) 156–161.
- [17] H. Hanada, Y. Ikeda-Dantsuji, M. Naito, A. Nagayama, Infection of human fibroblast-like synovial cells with *Chlamydia trachomatis* results in persistent infection and interleukin-6 production, *Microb. Pathog.* 34 (2003) 57–63.
- [18] N. Reveneau, D.D. Crane, E. Fischer, H.D. Caldwell, Bactericidal activity of first-choice antibiotics against gamma interferon-induced persistent infection of human epithelial cells by *Chlamydia trachomatis*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 1787–1793.
- [19] H.R. Guzman, A.J. McNamara, D.X. Nguyen, M.R. Prausnitz, Bioeffects caused by changes in acoustic cavitation bubble density and cell concentration: a unified explanation based on cell-to-bubble ratio and blast radius, *Ultrasound Med. Biol.* 29 (2003) 1211–1222.
- [20] L.B. Feril Jr., T. Kondo, Q.L. Zhao, R. Ogawa, K. Tachibana, N. Kudo, S. Fujimoto, S. Nakamura, Enhancement of ultrasound-induced apoptosis and cell lysis by echo-contrast agents, *Ultrasound Med. Biol.* 29 (2003) 331–337.
- [21] L.B. Feril Jr., R. Ogawa, K. Tachibana, T. Kondo, Optimized ultrasound-mediated gene transfection in cancer cells, *Cancer Sci.* 97 (2006) 1111–1114.

- [22] M. Ward, J. Wu, J.F. Chiu, Experimental study of the effects of Optison concentration on sonoporation in vitro, *Ultrason Med. Biol.* 26 (2000) 1169–1175.
- [23] C.X. Deng, F. Sieling, H. Pan, J. Cui, Ultrasound-induced cell membrane porosity, *Ultrason Med. Biol.* 30 (2004) 519–526.
- [24] K. Tachibana, T. Uchida, K. Ogawa, N. Yamashita, K. Tamura, Induction of cell-membrane porosity by ultrasound, *Lancet* 353 (1999) 1409.
- [25] L.B. Feril Jr., K. Tachibana, T. Kondo, R. Ogawa, Q.-L. Zhao, Y. Yamaguchi, K. Ogawa, H. Endo, Y. Irie, Y. Harada, Hypotonia-induced cell swelling enhances ultrasound-induced mechanical damage to cancer cells, *J. Med. Ultrasonics* 37 (2010) 3–8.

## 超音波感受性リポソームを利用した超音波がん治療システムの開発

鈴木 亮,\* 小田雄介, 宇都口直樹, 丸山一雄

## Development of Ultrasonic Cancer Therapy Using Ultrasound Sensitive Liposome

Ryo SUZUKI,\* Yusuke ODA, Naoki UTOGUCHI, and Kazuo MARUYAMA  
Department of Biopharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University,  
1091-1 Suwarashi, Midori-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-5195, Japan

(Received September 1, 2010)

Ultrasound (US) has been utilized as a useful tool for diagnosis and therapy. US mediated drug and gene delivery is paid to attention as a non-invasive system. The combination of US and microbubbles generated microjet stream by inducing disruption of bubbles and resulted in enhancing permeability of cell membrane. This phenomenon has been utilized as driving force for drug and gene delivery. Recently, we developed ultrasound sensitive liposome [Bubble liposome (BL)] containing perfluoropropane gas. US combined with BL could effectively transfer gene *in vivo* compared to conventional cationic liposomes. Using this method, we succeeded to obtain a therapeutic effect in cancer gene therapy with Interleukin-12 corded plasmid DNA. Therefore, it is expected that US combined with BL might be a useful non-viral vector system. From this result, the fusion of liposomal and ultrasound technologies would be important for establishment of advanced cancer therapy.

**Key words**—liposome; ultrasound; non-viral vector; drug delivery system (DDS); gene therapy

## 1. はじめに

リポソームは脂質二重膜からなる閉鎖小胞であり、その内部に薬物を封入したり、表面にポリマーや抗体などを修飾できる性質を有していることから、薬物キャリアーとして期待されている。実際に11品目のリポソーム製剤が世界中で上市されており、リポソーム技術は薬物治療の最適化を目指すドラッグデリバリーシステム (DDS) のための製剤技術として注目されている。その中で筆者らは、リポソームに関する研究を長年続けており、がん細胞にアクティブターゲティング可能な抗がん剤封入リポソームや中性子捕捉療法におけるがん組織へのポロン化合物送達システムとしてのリポソームの利用など様々なリポソーム開発に携わってきた<sup>1-3)</sup>。そして最近では、新たな取り組みとしてリポソームの内水相部分に超音波造影ガスであるパーフルオロプロパンを封入した新たなタイプのリポソーム開発を

行っている<sup>4-11)</sup>。そこで本稿では、筆者らが開発を続けているリポソーム型微小気泡 (バブルリポソーム) と超音波照射の併用によるがん遺伝子治療について紹介する。

## 2. バブルリポソームについて

近年の超音波技術の進展は目覚ましく、超音波造影装置の高解像度化や3D撮像などが可能となっている。そして最近では、超音波を数mm単位で患部に対し正確に照射することのできる強力集束超音波 (High intensity focused ultrasound: HIFU) が開発され、超音波熱エネルギーによる前立腺がんや子宮筋腫の低侵襲的治療として医療の現場で利用され始めている。このように超音波技術は医療分野において診断及び治療に応用され、これからさらなる飛躍が期待されている。これに加え、超音波造影剤の開発も進められており、わが国においては世界に先駆け肝腫瘍性病変のための超音波造影剤であるSonazoidが上市された。このSonazoidは静脈内投与後、速やかに肝臓のクッパー細胞に取り込まれることで肝腫瘍病変を陰影像としてとらえることができる優れた超音波造影剤である。このように肝臓のクッパー細胞を利用した超音波造影が可能になるの

帝京大学薬学部生物薬剤学教室 (〒252-5195 神奈川県相模原市緑区寸沢風 1091-1)

\*e-mail: r-suzuki@pharm.teikyo-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第130年会シンポジウムS10で発表されたものを中心に記述したものである。

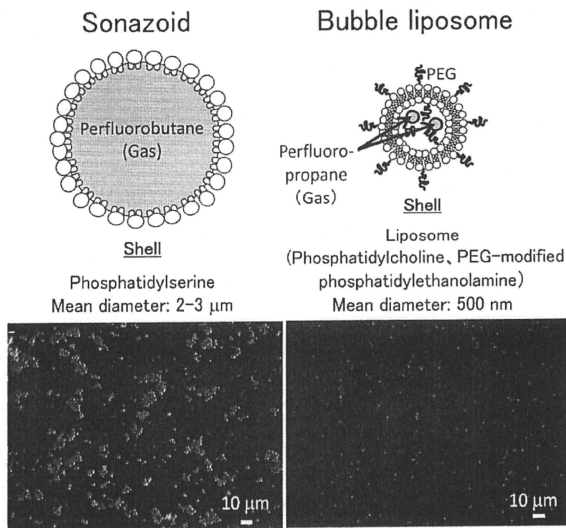


Fig. 1. Comparison of Sonazoid and Bubble Liposome  
Scheme (upper) and microscope ( $\times 400$ ) (lower)

は、Sonazoid がホスファチジルセリンからなる気泡であること、さらに粒子サイズが $2\text{--}3\ \mu\text{m}$ でありクッパー細胞に積極的に貪食され易い性質を有しているためである。一方、われわれが開発したバブルリポソームは、粒子サイズが約 $500\ \text{nm}$ と Sonazoid より小さい上、ポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソーム内に気泡が封入された構造であるため表面に存在する PEG の影響でクッパー細胞による貪食から逃れ易くなっている (Fig. 1)。したがって、粒子サイズ及びクッパー細胞などによる貪食の回避などの観点から、バブルリポソームが組織深部にまで到達可能になるものと期待される。

### 3. ソノポレーションを利用した遺伝子デリバリー

超音波を利用した遺伝子導入研究は 1987 年に Fechtmeier らによる報告から始まった。<sup>12)</sup> この超音波による遺伝子導入メカニズムとしてキャビテーション (空洞現象) が関与していると考えられている。キャビテーションとは、液体に超音波を照射したときの負の圧力が液体を維持するのに必要な圧力に打

ち勝ったときに空洞を生じる現象である。このキャビテーション気泡は最終的に圧壊するが、この圧壊時に気泡近傍にジェット流が生じ、このエネルギーにより細胞膜に一過性の小孔が開くことで、細胞外の物質が細胞内に送達されると考えられている。しかし、超音波を利用した初期の遺伝子導入ではキャビテーションの誘導効率を高めるために $20\text{--}50\ \text{kHz}$ の低い周波数の超音波が用いられており、細胞に対する傷害性が問題となっていた。これは低い周波数ほど低い強度でキャビテーションを誘導可能であるが、キャビテーション気泡の直径が大きくなり細胞に対する傷害性が高くなってしまったと考えられた。一方、高い周波数の超音波ではキャビテーシ



鈴木 亮

帝京大学薬学部生物薬剤学教室講師、博士 (薬学)、1973 年神奈川生まれ、東京薬科大学卒業、大阪大学大学院薬学研究科博士課程修了、2001 年東レ株式会社入社、2004 年帝京大学薬学部助手、2007 年同助教、2010 年現職。リポソーム技術を駆使した革新的がん治療システムの構築に関する研究に従事。

ン誘導作用が低いものの、発生したキャビテーション気泡の直径は小さく、細胞傷害性は低いと考えられている。そのため、1-2 MHzの超音波周波数が遺伝子導入に使用されるようになった。しかし、この周波数ではキャビテーション誘導の閾値が高くなるため、強い照射強度(20-100 W/cm<sup>2</sup>)あるいは長い時間(3-30分)の照射が必要となり細胞傷害の問題を完全に払拭できるような条件と言いが難かった。この問題を解決するために考えられたのが、超音波によるキャビテーションを誘導し易くするためにあらかじめキャビテーション核となる微小気泡を存在させておくことである。すなわち、上述の超音波遺伝子導入において超音波造影剤であるマイクロバブルを添加することで、低い超音波照射強度及び短時間で遺伝子導入可能であることが報告されるようになった。<sup>13)</sup> これは、マイクロバブルがキャビテーション核として存在することで、遺伝子導入に必要なキャビテーションを誘導するための超音波照射強度の閾値を下げることでできたと考えられた(Fig. 2)。このような背景の下、1990年代後半からマイクロバブルと超音波の併用による遺伝子導入に関する研究がスタートしている。

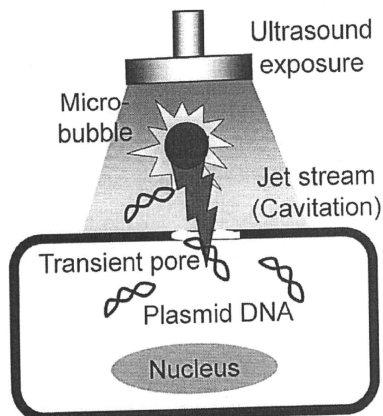


Fig. 2. Mechanism of Gene Delivery into Cell by Microbubble and Ultrasound Exposure

#### 4. 微小気泡と超音波の併用による遺伝子デリバリー

マイクロバブルを用いた遺伝子導入増強に関する報告が進む中、マイクロバブルの種類による導入効率の比較検討も行われた。アルブミン外殻中に空気を封入した Albnunex、アルブミン外殻中にパーフルオロプロパンを封入した Optison、アルブミン外殻中に空気を封入した Definity など多くの超音波造影剤が開発されており、各々のマイクロバブルと超音波の併用による遺伝子導入の増強効果が認められている。<sup>14)</sup> このようなキャビテーションを利用したデリバリーシステムは、体外からの超音波照射により目的組織にのみ低侵襲的な遺伝子デリバリーを可能とする新たな遺伝子デリバリーシステムとして期待されている。そこで、このキャビテーションを利用した遺伝子導入がバブルリポソームでも可能であることを評価するため、バブルリポソームと超音波照射の併用による遺伝子導入について検討した。様々な種類の細胞にルシフェラーゼ発現プラスミド DNA を超音波単独又はバブルリポソームと超音波照射の併用により遺伝子導入したところ、いずれの細胞種においてもバブルリポソームと超音波照射の併用により高いルシフェラーゼ発現が認められた(Fig. 3)。<sup>15)</sup> このようにバブルリポソームと超音波の併用が細胞種を問わず遺伝子導入可能であったのは、キャビテーションによる物理的エネルギーを利用して細胞質内に遺伝子を直接導入できるためであると考えられた。

本方法は超音波を照射したときのみ遺伝子導入が誘導されるため、超音波照射部位をコントロールすることで超音波照射部位特異的な遺伝子導入が可能になると考えられる。そこで、バブルリポソームと超音波の併用による低侵襲的かつ組織特異的な *in vivo* 遺伝子導入システムの確立を試みた。バブルリポソームとルシフェラーゼ発現プラスミド DNA をマウスの尾静脈から全身投与後、直ちに肝臓に向けて体外から経皮的に超音波照射した。その2日後にマウスから各臓器を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した(Fig. 4)。その結果、超音波照射部位である肝臓において高いルシフェラーゼ発現が認め

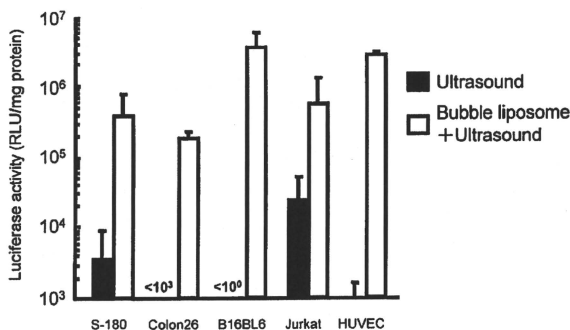


Fig. 3. Gene Delivery by Bubble Liposome and Ultrasound Exposure *in vitro*

Cells ( $1 \times 10^6$  cells/ $500 \mu\text{l}$ ) mixed with pCMV-Luc ( $5 \mu\text{g}$ ) and Bubble liposomes ( $60 \mu\text{g}$ ) were exposed or not to ultrasound (frequency, 2 MHz; duty, 50%; burst rate, 2 Hz; intensity,  $2.5 \text{ W/cm}^2$ ; time, 10 s). The cells were washed and cultured for 2 days. Thereafter, luciferase activity was determined. Data are shown as means  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). S-180, mouse sarcoma; Colon26, mouse colon adenocarcinoma; B16BL6, mouse melanoma; Jurkat, human T cell line; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell.

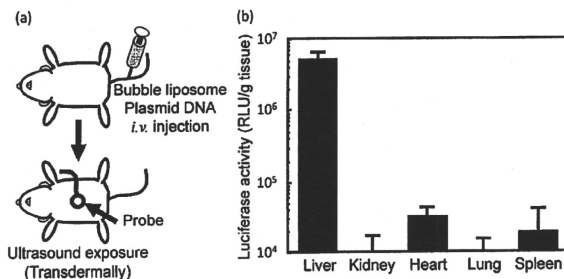


Fig. 4. Liver Specific Gene Delivery by Bubble Liposomes and Ultrasound Exposure

(a) Gene delivery method: Luciferase coded plasmid DNA ( $100 \mu\text{g}$ ) and Bubble liposomes ( $500 \mu\text{g}$ ) were intravenously injected and ultrasound (1 MHz,  $1 \text{ W/cm}^2$ , 1 min) was transdermally exposed toward liver. After 1 day of ultrasound exposure, luciferase expression in each tissue was measured. (b) Luciferase expression in each tissue.

られた。このようにバブルリポソームとプラスミド DNA が血流を介して流れていたにもかかわらず肝臓に遺伝子導入できたのは、超音波照射部位である肝臓でバブルリポソームがキャビテーションを誘導し、そのときに遺伝子を肝臓に導入したためであると考えられた。今回は示していないが、筆者らは同様の方法を用い超音波照射部位を変更することで脾臓や脳へも遺伝子導入できることを確認している。このように今回示した方法は、超音波照射部位を変更するだけで様々な組織や部位に低侵襲的かつ特異

的に遺伝子導入できる可能性を有しており、他の遺伝子導入ベクターにはない非常に簡便でユニークな特性を持つ方法であると言える。

##### 5. バブルリポソームと超音波照射を利用したがん遺伝子療法

近年、抗腫瘍免疫の活性化を目的とした新しいがん治療法としてサイトカイン療法が注目されている。その中でも IL-12 は、NK 細胞や細胞傷害性 T 細胞などを活性化することで強力な抗腫瘍効果を誘導するサイトカインとして、臨床の場においても期



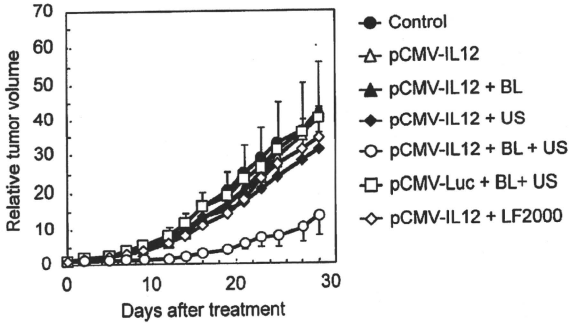


Fig. 5. Cancer Gene Therapy in Gene Delivery by Bubble Liposomes and Ultrasound Exposure

B6C3F1 mice were intradermally inoculated with  $1 \times 10^6$  OV-HM cells into the flank. After 7 days of tumor inoculation, the tumors were injected with pCMV-IL12 (10  $\mu$ g) using Bubble Liposomes (2.5  $\mu$ g) and/or ultrasound (1 MHz, 0.7 W/cm<sup>2</sup>, 1 min), or Lipofectamine 2000 as a conventional lipofection method. The volume of the growing tumors was calculated by: (tumor volume; mm<sup>3</sup>) = (major axis; mm)  $\times$  (minor axis; mm)<sup>2</sup>  $\times$  0.5. The data are represented as tumor volume relative to the tumor volume on the first day of treatment (day 7 after tumor inoculation). Each point represents the mean  $\pm$  S.D. (n=5). BL, Bubble liposomes; US, Ultrasound; LF2000, Lipofectamine 2000.

待されている。しかし、IL-12の全身投与は、全身作用による副作用のリスクが懸念されており、副作用の影響なく治療効果を得るためには、がん組織特異的にIL-12を作用させる必要がある。前項で示したように、バブルリポソームと超音波照射の併用は、がん細胞に効率よく遺伝子導入できることが明らかとなっている。そこで筆者らは、バブルリポソームと超音波の併用によるIL-12発現プラスミドDNA (pCMV-IL12)の遺伝子導入によるがん遺伝子治療を試みた (Fig. 5)。その結果、バブルリポソームと超音波の併用によりpCMV-IL12を導入した群で顕著な腫瘍増殖抑制効果が認められた。一方、Lipofectamine™ 2000による遺伝子導入では、ほとんど腫瘍増殖抑制効果は認められなかった。このような結果が得られたのは、バブルリポソームと超音波の併用により効率よくIL-12遺伝子が発現し、強力な抗腫瘍免疫が誘導されたためであると考えられた。このことから、バブルリポソームと超音波照射の併用法はIL-12がん遺伝子治療において有用な非ウイルスベクターになることが示唆された。

## 6. おわりに

本稿では、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紹介した。バブルリポソームと超音波の併用による遺伝子導入は、短時間の超音波照射で細胞内に遺伝子導入可能である上、体外から

の超音波照射により超音波照射部位のみに遺伝子を送達可能であった。本方法は既存の非ウイルスベクターシステムとは異なり、低侵襲的かつ部位特異的遺伝子導入を可能とする有望な遺伝子導入法として期待される。それゆえ、本稿で紹介した方法は、遺伝子治療分野で課題となっている部位特異的な遺伝子発現用ベクター開発において有望な技術ではないかと考えられる。

冒頭でも述べたようにバブルリポソームはリポソーム技術を基盤としたバブル製剤であり、リポソーム表面に容易に標的指向性分子を修飾することができる。今回紹介しなかったが、これまでに筆者らの共同研究者はバブルリポソーム表面に血栓を認識するペプチドを修飾し、血栓モデル動物に静脈内投与することで、バブルリポソームの血栓部位への集積を超音波造影により確認している。<sup>4)</sup>さらに、この集積したバブルリポソームにキャビテーションを誘導するような周波数・強度の超音波を体外から照射することで血栓を破壊し血流を再開することが可能であることも確認している。このように、バブルリポソームと超音波の併用は、単に細胞に遺伝子を導入するだけでなく、これまで超音波造影では診断できなかった血栓の診断を可能にし、さらに治療用超音波照射により血栓治療も行えるような次世代型医療システムの構築を予感させる。

今後、バブルリポソームへのパッシブターゲットイングやアクティブターゲットイング能の付与による体内動態制御及び集束超音波による超音波照射部位の空間的制御の両者を組み合わせたダブルターゲットイングを利用することで、厳密な空間的・時間的制御を可能とする理想的な超音波がん治療システムが構築可能になるものと期待される。

謝辞 本稿で紹介したバブルリポソームに関する研究は、帝京大学薬学部生物薬剤学教室で行われた研究であり、研究遂行にご協力頂いた学生諸子に感謝する。また、本研究遂行においてご協力頂いた東京薬科大学薬学部・根岸洋一先生、国立がんセンター東病院・松村保広先生、陸上自衛隊研究本部・萩沢康介博士、福岡大学医学部・立花克郎先生、北海道大学大学院情報科学研究科・工藤信樹先生に感謝する。さらに、本研究の一部は厚生省科研費：第3次対がん総合戦略研究事業、文科省科研費：基盤研究(A)、若手研究(B)、医薬基盤研究所：保健医療分野における基礎研究推進事業の研究助成により遂行された研究である。

#### REFERENCES

- 1) Harata M., Soda Y., Tani K., Ooi J., Takizawa T., Chen M., Bai Y., Izawa K., Kobayashi S., Tomonari A., Nagamura F., Takahashi S., Uchimarui K., Iseki T., Tsuji T., Takahashi T. A., Sugita K., Nakazawa S., Tojo A., Maruyama K., Asano S., *Blood*, **104**, 1442-1449 (2004).
- 2) Suzuki R., Takizawa T., Kuwata Y., Mutoh M., Ishiguro N., Utoguchi N., Shinohara A., Eriguchi M., Yanagie H., Maruyama K., *Int. J. Pharm.*, **346**, 143-150 (2008).
- 3) Yanagie H., Maruyama K., Takizawa T., Ishida O., Ogura K., Matsumoto T., Sakurai Y., Kobayashi T., Shinohara A., Rant J., Skvarc J., Ilic R., Kuhne G., Chiba M., Furuya Y., Sugiyama H., Hisa T., Ono K., Kobayashi H., Eriguchi M., *Biomed. Pharmacother.*, **60**, 43-50 (2006).
- 4) Hagiwara K., Nishioka T., Suzuki R., Takizawa T., Maruyama K., Takase B., Ishihara M., Kurita A., Yoshimoto N., Ohsuzu F., Kikuchi M., *Int. J. Cardiol.* (in press)
- 5) Un K., Kawakami S., Suzuki R., Maruyama K., Yamashita F., Hashida M., *Hum. Gene Ther.*, **21**, 65-74 (2010).
- 6) Negishi Y., Omata D., Iijima H., Takabayashi Y., Suzuki K., Endo Y., Suzuki R., Maruyama K., Nomizu M., Aramaki Y., *Mol. Pharm.*, **7**, 217-226 (2010).
- 7) Suzuki R., Namai E., Oda Y., Nishiie N., Otake S., Koshima R., Hirata K., Taira Y., Utoguchi N., Negishi Y., Nakagawa S., Maruyama K., *J. Control. Release*, **142**, 245-250 (2010).
- 8) Suzuki R., Oda Y., Utoguchi N., Namai E., Taira Y., Okada N., Kadowaki N., Kodama T., Tachibana K., Maruyama K., *J. Control. Release*, **133**, 198-205 (2009).
- 9) Suzuki R., Takizawa T., Negishi Y., Utoguchi N., Sawamura K., Tanaka K., Namai E., Oda Y., Matsumura Y., Maruyama K., *J. Control. Release*, **125**, 137-144 (2008).
- 10) Negishi Y., Endo Y., Fukuyama T., Suzuki R., Takizawa T., Omata D., Maruyama K., Aramaki Y., *J. Control. Release*, **132**, 124-130 (2008).
- 11) Suzuki R., Takizawa T., Negishi Y., Utoguchi N., Maruyama K., *J. Drug. Target.*, **15**, 531-537 (2007).
- 12) Fechner M., Boylan J. F., Parker S., Sissen J. E., Patel G. L., Zimmer S. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8463-8467 (1987).
- 13) Suzuki R., Oda Y., Utoguchi N., Maruyama K., *J. Control. Release*. (in press)
- 14) Li T., Tachibana K., Kuroki M., *Radiology*, **229**, 423-428 (2003).

## バブルリポソームと超音波技術を融合した骨格筋への遺伝子デリバリーシステムの開発

根岸洋一,<sup>a,\*</sup> 高橋(遠藤)葉子,<sup>a</sup> 鈴木 亮,<sup>b</sup> 丸山一雄,<sup>b</sup> 新嶺幸彦<sup>a</sup>

### Development of Gene Delivery System into Skeletal Muscles by Bubble Liposomes and Ultrasound

Yoichi NEGISHI,<sup>a,\*</sup> Yoko ENDO-TAKAHASHI,<sup>a</sup> Ryo SUZUKI,<sup>b</sup>

Kazuo MARUYAMA,<sup>b</sup> and Yukihiko ARAMAKI<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Drug and Gene Delivery Systems, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432-1 Horiinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan, and <sup>b</sup>Department of Biopharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, 1091-1 Suwarashi, Midori-ku, Sagami-hara 252-5195, Japan

(Received July 20, 2010)

Skeletal muscle is a promising target tissue for the gene therapy of both muscle and non-muscle disorders. Gene transfer into muscle tissue can produce a variety of physiologically active proteins and may ultimately be applied to treatment of many diseases. A variety of methods have been studied to transfer genes into skeletal muscle, including viral and non-viral vectors. Recently, we have developed the polyethyleneglycol (PEG)-modified liposomes entrapping echo-contrast gas known as ultrasound (US) imaging gas. We have called the liposomes "Bubble liposomes" (BLs). We have further demonstrated that US-mediated eruption of BLs loaded with naked plasmid-DNA is a feasible and efficient technique for gene delivery. In this study, to assess the feasibility and the effectiveness of BLs for the gene therapy of disorders, we tried to deliver therapeutic genes (anti-inflammatory cytokine; IL-10 or anti-angiogenic factor; hK1-5) into skeletal muscles of arthritis or tumor model mice by the gene delivery system with BLs and US exposure. As a result, their disease symptom was efficiently improved by the systemic secretion of therapeutic proteins. Thus, this US-mediated BLs technique for muscle gene transfer may provide an effective noninvasive method for arthritis or cancer gene therapy in clinical use. In addition, it may be applicable for the gene therapy of other non-muscle and muscle disorders.

**Key words**—ultrasound; Bubble liposome; gene delivery system; gene therapy

#### 1. はじめに

遺伝子治療は、候補となる治療用遺伝子を体内の標的組織へ、効率的に安全に導入する手法を用いて、遺伝病、がん、感染症などの疾患へ適用する治療法で臨床応用が期待されている。標的組織への遺伝子導入を担うベクターの開発は、遺伝子治療の技術開発の中でも重要であると考えられているが、毒性、抗原性などの臨床上の安全性の問題がなく、しかも遺伝子発現効率の高い非ウイルスベクター及びドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術・方法

論の研究開発が切望されている。<sup>1,2)</sup>

そのような背景から、これまでにわれわれは、非ウイルスベクターの新規の遺伝子デリバリーツールとしての超音波造影ガス封入リポソーム (バブルリポソーム)<sup>3-7)</sup>と超音波照射を利用した遺伝子デリバリーシステムの開発を進めてきた。

本稿では、バブルリポソームを利用した骨格筋への超音波遺伝子デリバリー技術を紹介し、遺伝子治療に向けた応用展開について概説する。

#### 2. 超音波造影ガス封入リポソーム (バブルリポソーム)

超音波は、組織ダメージが極めて低く安全性が高いことから、既に医療分野で非侵襲的な超音波診断・治療などに利用されている。近年では、超音波エネルギーの DDS への応用が考案され、実際に超音波造影剤であるマイクロバブルと導入遺伝子の共

<sup>a</sup>東京薬科大学薬学部薬物送達学教室 (〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1)、<sup>b</sup>帝京大学薬学部生物薬劑学教室 (〒252-5195 神奈川県相模原市緑区寸沢風 1091-1)

\*e-mail: negishi@toyaku.ac.jp

本誌説は、日本薬学会第 130 年会シンポジウム S19 で発表したものを中心に記述したものである。

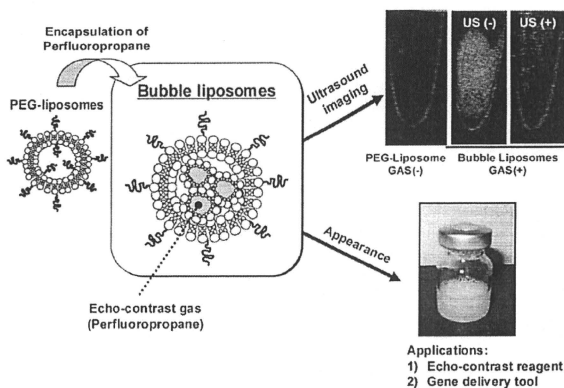


Fig. 1. Bubble Liposomes

存下に治療用超音波を照射することでバブルが崩壊し、同時にキャビテーション（衝撃波）が生じ、その駆動力を利用して薬物や遺伝子を細胞内へと導入する試みが、基礎研究で成功を取っている。<sup>8,9)</sup> この方法は、超音波照射した部位にのみ効率よく導入が可能であり、臓器・組織特異的に遺伝子導入する方法として期待されている。<sup>10,11)</sup> しかし、これまで報告されているマイクロバブルは直径4-6  $\mu\text{m}$ と粒子サイズが大きいため、組織深部への移行性が悪く、血管内投与に最適なサイズとは言えない。また、表面修飾ができないため、標的指向性が得られないなどの改善すべき課題が残されている。

そのような背景から、これまでに生体適合性・血中安定性・滞留性に優れ、深部組織にまで十分到達できることが報告されている粒子サイズ約100-200 nmのポリエチレングリコール修飾リポソーム(PEG-リポソーム)<sup>12)</sup>に注目し、PEG-リポソームに超音波造影ガスであるパーフルオロプロパンを封入したバブルリポソームを調製した (Fig. 1)。これは、超音波造影剤として機能するのみならず、治療用超音波(1-3 MHz)を併用する低侵襲的な薬物・遺伝子デリバリーツールとして期待される (Fig. 2)。<sup>3,4)</sup> さらにリポソームは、様々な修飾をすることで標的指向性を付与できることが知られている。以上より、バブルリポソームはマイクロバブルの問題を解決し得る新規の遺伝子デリバリーツールとなる

と考えられる。

### 3. バブルリポソームを利用した超音波遺伝子デリバリーシステム

既存のマイクロバブルに超音波照射を行うとバブル崩壊に伴うキャビテーション誘導が生じ、それを駆動力とする薬物や遺伝子の細胞内導入法が報告されている。そこで、まず、バブルリポソームのキャビテーション誘導について検討した。試験管内で調製されたバブルリポソームに超音波照射(1-3 MHz)を行うと超音波造影シグナルの減弱が観察された。このことは、バブルリポソームの崩壊に伴うキャビテーション誘導が生じた可能性を示唆している (Fig. 1)。次にバブルリポソームと超音波照射の併用によるキャビテーションを利用した遺伝子導入が可能か否かをCOS7細胞に対して行った。方法としては、バブルリポソームとルシフェラーゼ発現プラスミドDNA (pDNA)を培地中に添加し、直ちに超音波照射(2 MHz, 2.5 W/cm<sup>2</sup>, 10s)を行った。



根岸洋一

東京薬科大学薬学部薬物送達学教室准教授。博士(薬学)。1965年東京生まれ。東京薬科大学卒業。北海道大学薬学研究所博士課程修了。朝SRL遺伝子解析研究センター勤務。1996年帝京大学薬学部助手。2004年東京薬科大学薬学部講師。2007年より現職。2001年米国ピッツバーグ大学に留学(Liuf Huang 教授)。超音波技術を融合したDDS・GDSの研究開発に従事。

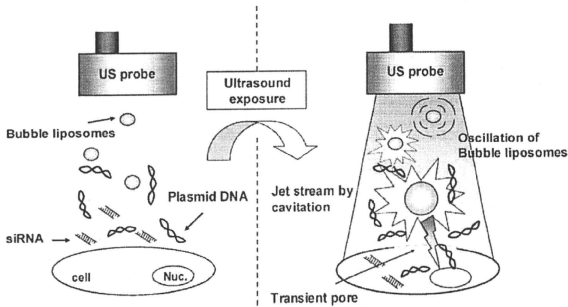


Fig. 2. Mechanism of Gene Delivery System by Bubble Liposomes and Ultrasound

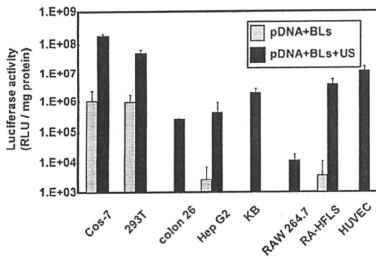


Fig. 3. Transfection with Bubble Liposomes and Ultrasound on Various Cell Lines

Solution of pDNA (pCMV-Luciferase) and Bubble liposomes were added into cells. Immediately, ultrasound (Frequency: 1 MHz, Duty: 50%, Intensity: 2.5 W/cm<sup>2</sup>, Time: 10 s) was exposed. Two days after transfection, luciferase expression was determined.

その結果、ルシフェラーゼ活性の上昇が認められ、細胞内への遺伝子導入は、わずか 10 秒という超音波照射時間で効率よく達成できることが判明した。<sup>3)</sup> この効果は pDNA とバブルリポソムの混合液に超音波照射した場合に初めて高い遺伝子発現が認められた。ガス未封入リポソムと超音波照射を併用した場合は、十分な導入効果は得られなかった。COS7 細胞以外のがん細胞 (HepG2, Colon26, KB など)、関節滑膜細胞、マクロファージ様細胞においても導入効果を示され、バブルリポソムと超音波照射を併用することで種々の培養細胞株に対して遺伝子導入が可能であることが明らかとなった

(Fig. 3)。また、本導入システムによって、pDNA のみならず、低分子核酸である siRNA も効率よく細胞内導入できることも明らかとしている。<sup>4)</sup>

#### 4. 遺伝子治療における骨格筋への遺伝子デリバリーの有用性

遺伝子治療を成功させるには、生体に対して安全な方法で遺伝子を標的細胞に効率よく導入し、発現させることが重要である。<sup>1,2)</sup>

体内の様々な細胞や組織が標的となり得るが、その中でも骨格筋は遺伝子治療の有望な標的組織と考えられている。なぜなら、骨格筋自身が遺伝性疾患 (例: 筋ジストロフィー) の発症部位で遺伝子治療の標的部位であり、その治療のために有用なタンパク質が骨格筋で発現可能であることが既に示されているからである。さらに、骨格筋には大量の血管が存在するため、局所で発現した生理活性タンパク質を全身へ送り出すことで他の全身性疾患 (例: 転移性がん、慢性関節リウマチ) の治療が可能となることも理由の 1 つである。また、筋細胞は非分裂細胞なので、細胞分裂に伴う導入遺伝子の消失が回避でき、持続的発現が期待できるという利点もある。これらの特長を生かし、治療効果を最大とするには、治療が必要な部位の筋組織全体若しくは十分な発現量や発現エリアを確保できる範囲に遺伝子導入することが必要である。Figure 4 に示すように治療用遺伝子をバブルリポソムともに筋組織内へと投与した後に、超音波照射することで、バブルリポソムが崩壊し、キャビテーション誘導に伴うマイクロシ

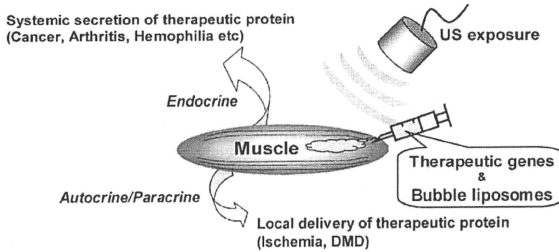


Fig. 4. Gene Delivery System into Muscle by Bubble Liposomes and Ultrasound

エット流を発生させることが可能と考えられる。これを駆動力とすることで、効率のよい筋細胞内への遺伝子デリバリーが可能となり、遺伝子治療に有用かつ安全性の高い遺伝子デリバリーシステムが構築できると考えられる。

#### 5. バブルリポソームを利用した骨格筋への超音波遺伝子デリバリーシステム

超音波照射を併用したバブルリポソームの *in vivo* での機能評価をするために、骨格筋を標的にし、超音波遺伝子導入効率について検討した。方法としてマウスの頸部筋組織にバブルリポソームとルシフェラーゼ遺伝子をコードした pDNA の混合溶液を局所筋肉内投与し、直ちに、体外から超音波照射 (1 MHz, 50% duty, 2 W/cm<sup>2</sup>, 60 s) し、5日後の抽出組織をホモジネートしてルシフェラーゼ活性測定を行った。なお超音波照射装置は、NEPA GENE 社製の SONOPORE 3000、又は、Sonitron 2000 を使用した。その結果、pDNA 単独、pDNA とバブルリポソーム混合液を添加した群、pDNA に超音波照射した群では、ほとんど遺伝子発現に顕著な差が認められなかったのに対し、pDNA とバブルリポソームを混合し、さらに超音波照射した群では、pDNA などの上述の群に比べ両組織ともに 10 倍以上の高い遺伝子発現が認められた (Fig. 5)。さらに遺伝子導入後の pDNA の体内動態並びに発現分布を解析するために、*in vivo* ルシフェラーゼイメージングシステム (IVIS 社) を用いた全身での発現分布を解析した。その結果、pDNA のみを導入した場合に比べ、pDNA とバブルリポソーム混合液を局所投与したマウス頸部筋組織において局在化したルシフェラーゼの遺伝子発現の増強が観察

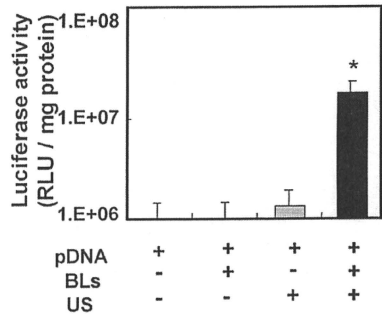


Fig. 5. Luciferase Expression in Muscle Transfected with Bubble Liposomes and Ultrasound

Mice were injected into tibialis muscle with pDNA (pCMV-Luciferase) 10  $\mu$ g and Bubble liposomes 30  $\mu$ g. Immediately, ultrasound (Frequency: 1 MHz, Duty: 50%, Intensity: 2 W/cm<sup>2</sup>, Time: 60 s) was exposed. Five days after transfection, luciferase expression was determined. \* $p < 0.01$  vs. pDNA with US. The Data are shown as mean  $\pm$  S.D. ( $n = 4$ ).

された (Fig. 6)。その発現は、少なくとも 4 週間は持続していた。さらに EGFP をコードした発現プラスミドを筋組織内に同様の方法で導入後、組織学的な発現解析を蛍光顕微鏡にて行ったところ、超音波照射エリアに依存した顕著な EGFP 発現が確認できた (Fig. 7)。これらのことは、筋組織内に導入されたバブルリポソームが、超音波照射にตอบสนองして、効率よく崩壊し、それに伴うキャビテーション誘導を駆動力として遺伝子を細胞内へ送達させたものと考えられる。また、既存の遺伝子導入試薬として幅広く用いられている Lipofectamin 2000 (インビトロジェン社) では、ほとんど遺伝子導入活性が認められなかったことから、バブルリポソームの

*in vivo*での高い有用性が示された。

## 6. 動物モデルへの応用

次にわれわれは、バブルリポソームを利用した安全な超音波遺伝子デリバリーシステムの有用性を明らかにするために、疾患動物モデルへの応用を試みたので概説する。

**6-1. 関節炎モデルマウスの遺伝子治療** Figure 5及び6の結果に示されるようにバブルリポソームを利用する骨格筋への超音波遺伝子導入が効率よく達成されたことから、同様の導入条件（導入部位：

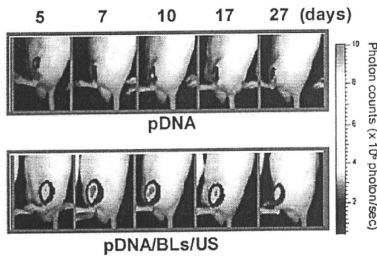


Fig. 6. *In vivo* Luciferase Imaging in Muscle Transfected with Bubble Liposomes and Ultrasound

Mice were treated with Bubble liposomes and ultrasound-mediated intramuscular luciferase gene transfer. After the transfection, *in vivo* luciferase expression was monitored at 0–27 days using an IVIS imaging system (Xenogen, CA, USA). pDNA (pCMV-Luciferase): 10  $\mu$ g, Bubble liposomes: 30  $\mu$ g, ultrasound exposure: (Frequency: 1 MHz, Duty: 50%, Intensity: 2 W/cm<sup>2</sup>, Time: 60 s).

脛部筋組織、超音波照射条件：1 MHz, 50% duty cycle, 60 s)にて、抗炎症性サイトカインとして知られているIL-10遺伝子をコードしたプラスミドDNAをコラーゲン誘発性関節炎モデルマウスに対して、遺伝子治療を試み、その有用性を評価した。その結果、血清中のIL-10タンパク質の発現分泌の上昇が、およそ1週間目で認められ、それは、3週間ほどの持続性を示していた。さらに関節炎所見を観察し、スコア化したところ、顕著な関節炎の抑制が認められた (Fig. 8)。また、組織学的解析によっても、関節炎の進行に伴う関節破壊や滑膜肥厚の抑制が認められた。このことは、バブルリポソームによって、超音波遺伝子導入された筋組織から産

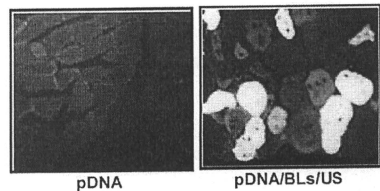


Fig. 7. EGFP Expression in Muscle Transfected with Bubble Liposomes and Ultrasound

Mice were treated with Bubble liposomes and ultrasound-mediated intramuscular EGFP gene transfer. After 5 days of transfection, the transfected muscle was sectioned and analyzed by fluorescent microscopy. pDNA (pEGFP-N3): 10  $\mu$ g, Bubble liposomes: 30  $\mu$ g, ultrasound exposure: (Frequency: 1 MHz, Duty: 50%, Intensity: 2 W/cm<sup>2</sup>, Time: 60 s).

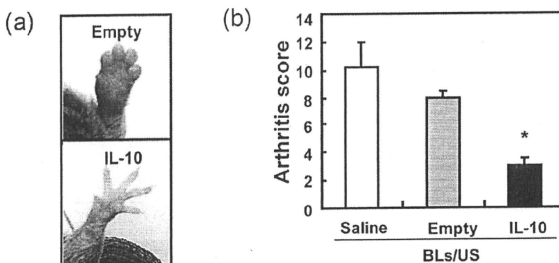


Fig. 8. Gene Transfer of IL-10 Plasmid into the Muscle of Collagen-induced Arthritis Model Mice by Bubble Liposomes and Ultrasound

Collagen-induced arthritis model mice were treated with Bubble liposomes and ultrasound-mediated intramuscular IL-10 gene transfer at days 21 after first immunization. (a) These photographs show the development of arthritis in fore paw at days 49 after first immunization. (b) The development of arthritis in fore and hind paws were counted. For example, score 1 or 2 indicates moderate symptom. In contrast, score 3 or 4 means severe arthritis. In the case of the treated group of IL-10 plasmid, the arthritis severity was significantly attenuated as compared with the treated group of saline or empty vector. \* $p < 0.05$  vs. saline or empty vector. The data are shown as mean  $\pm$  S.D. ( $n = 10$ ).

生分泌された IL-10 タンパク質の全身循環作用によって、遠隔部位に存在する関節部位の炎症反応を効率的に沈静化したものと考えられる。よって、バブルリポソームによる安全な超音波遺伝子デリバリーシステムが、関節疾患への遺伝子治療法の一手段として有用であることが示された。同様の遺伝子導入法を用いて、下肢虚血モデルマウスに対する血管新生遺伝子治療を試みたところ、血管密度の増加や血流回復が観察されたことから、エンドクリン作用を期待するような局所筋組織の治療にも有用な遺伝子導入法となることも示している。

**6-2. 腫瘍モデルマウスの遺伝子治療** 骨格筋への遺伝子導入を利用したがん遺伝子治療を考える場合、効率よく骨格筋へ遺伝子導入し、タンパク質を産生させる必要がある。効率のよい遺伝子導入法として、骨格筋を支配する血管を介した遺伝子導入が、広範囲の遺伝子発現領域を確保できるため有効であると考えられる。しかし、血管と筋組織の間には、血管内皮細胞や筋内膜などの障壁が存在するため、これらの障壁を突破し、筋細胞内へと遺伝子導入する必要がある。これまでにわれわれは、血管を介した遺伝子デリバリーシステムとして、マウス下肢上部に止血帯を施し、大伏在静脈から pDNA とバブルリポソームの混合溶液を投与し、超音波照射を行うと組織透過性が増し、筋細胞内への遺伝子導入が可能となることを明らかにしてきた。<sup>5)</sup> そこで、バブルリポソームと超音波併用による骨格筋への経静脈的遺伝子デリバリーシステムのがん遺伝子治療への可能性を探るべく治療用遺伝子を用いて、その有用性を評価した。今回、治療用遺伝子とし

て、高い抗血管新生作用を持ち、臨床応用の可能性が期待されている plasminogen 断片の kring1-5 をコードした pDNA を用いた。Kring1-5<sup>13)</sup> は、既に抗血管新生タンパク質として知られているアンジオスタチンに相溶性の高い Kringle 構造を有するタンパク質で、アンジオスタチンよりも 50 倍近い内皮細胞の増殖抑制効果を示すことから臨床応用が期待されている。そこでマウスメラノーマ由来 B16 細胞株をマウスの皮下に移植し、1 週間後に骨格筋へ経静脈的に超音波遺伝子導入し、腫瘍増殖の抑制効果を観察した。その結果、バブルリポソームと超音波非照射群では腫瘍の増殖抑制効果が認められないのに対し、バブルリポソームと超音波照射併用群で、有意な腫瘍体積の抑制効果が認められた (Fig. 9)。また、同様の導入実験を簡便に新生血管を観察できる Dorsal Air Sac モデルマウスに対して行った場合においても、がん細胞が誘発する背部皮下の新生血管の顕著な抑制が観察できた。よって、抗血管新生遺伝子治療におけるバブルリポソームを利用した経静脈的な骨格筋への超音波遺伝子デリバリーシステムの有用性が明らかとなった。

### 7. バブルリポソームを利用した骨格筋への超音波遺伝子デリバリーシステムの課題

ここまでバブルリポソームを利用する骨格筋への超音波遺伝子導入デリバリーシステムとその有用性を紹介してきたが、全身性疾患に対する遺伝子治療で必須なのは、広範囲で治療用遺伝子が導入発現することと安全性が確保されることである。本導入法は、広範囲の骨格筋で十分な活性が得られており、骨格筋で、生理活性タンパク質を発現分泌させるこ

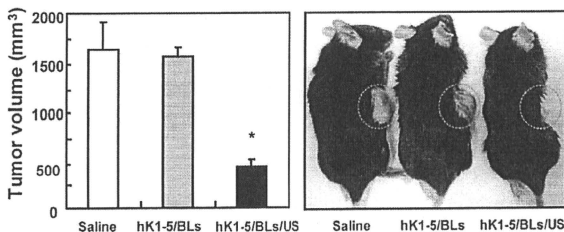


Fig. 9. Gene Transfer of hK1-5 Plasmid into the Muscle of Tumor Model Mice by Bubble Liposomes and Ultrasound  
C57BL/6 mice were subcutaneously injected into right flank with B16. At 7 days after injection, when tumor volume become approximately 50 mm<sup>3</sup>, intravascular hK1-5 gene transfection into skeletal muscle by Bubble liposomes and ultrasound was performed. At 15 days, each tumor volume was measured. \**p* < 0.05 vs. saline or empty vector. The data are shown as mean ± S.D. (*n* = 6).



とで全身循環作用を期待する疾患治療戦略の1つとして、その有用性を発揮できたものと考えられる。しかしながら、骨格筋を治療用タンパク質の供給源とすることは、疾患によっては、望まれない臓器や組織においても全身循環した生理活性タンパク質が作用し、それが驚異的な副作用を引き起こす恐れも考えられる。例えば、今回のような抗炎症性サイトカインや抗血管新生タンパク質を用いた疾患治療においては、長期の全身作用によって、免疫力の低下を引き起こし、それが日和見感染症につながる恐れや虚血性疾患を誘発させてしまうことなども危惧される。

それゆえ、今後は、治療用タンパク質用の遺伝子発現ベクターを工夫することで発現量や発現時間をコントロールすることや産生分泌させるタンパク質に標的細胞への指向性を付与することで、安全かつ効率的なピンポイント治療が可能となると期待される。

## 8. おわりに

遺伝子工学が発展し、疾患関連遺伝子の発見や遺伝子診断技術の進歩に伴い、その情報を利用して治療を行う遺伝子治療への期待が高まっている。疾患の原因となる遺伝子の変異に対して、補充する遺伝子を導入したり、発現を抑えるアンチセンスを導入したりする方法が模索されている。しかし、いずれの場合においても、最適な導入技術が存在して初めて治療効果を獲得できる。そのような点で、バブルリポソームによる骨格筋への超音波遺伝子デリバリーシステムは、有用な手段と考えられる。今回紹介した関節炎やがん治療以外にも、上述の課題を克服することが可能となれば、感染症や循環器疾患などの治療にも適用範囲を拡大できるものと思われる。臨床応用に際しては、さらなる安全性の確保が求められるが、本研究成果が、その足掛かりとなることを期待したい。

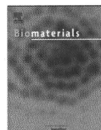
謝辞 本稿で紹介した研究成果は、主に東京薬科大学薬学部薬物送達学教室と帝京大学薬学部生物薬学教室・丸山一雄先生、鈴木 亮先生との共同研究の一環として行われたものである。研究遂行にご協力頂いた当教室の学生諸子（特に福山哲也修士、角田由佳修士、関根祥子修士、松尾慶子修士、西島信明修士）に深謝する。また、本研究遂行にご

協力頂いた昭和大学歯学部歯周病学教室・山本松男先生、東邦大学医療センター大森病院口腔外科・関谷秀樹先生、超音波照射に関する技術的なご指導を頂いた福岡大学医学部解剖学教室・立花克郎先生、ネッパジーン㈱・早川靖彦氏、鈴木孝尚氏に深謝する。さらに、本研究は独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）（Industrial Technology Research Grant Program（04A05010））、文科省科研費：萌芽研究（18650146）、基礎研究（B）（20300179）の研究助成により遂行されたものであり、ここに深甚なる誠意を表します。

## REFERENCES

- 1) Nishikawa M., Huang L., *Hum. Gene Ther.*, **12**, 861-870 (2001).
- 2) Niidome N., Huang L., *Gene Ther.*, **9**, 1647-1652 (2002).
- 3) Suzuki R., Takizawa T., Negishi Y., Hagsisawa K., Tanaka K., Sawamura K., Utoguchi N., Nishioka T., Maruyama K., *J. Control. Release*, **117**, 130-136 (2007).
- 4) Negishi Y., Endo Y., Fukuyama T., Suzuki R., Takizawa T., Omata D., Maruyama K., Aramaki Y., *J. Control. Release*, **132**, 124-130 (2008).
- 5) Negishi Y., Sekine S., Endo Y., Nishijima N., Suzuki R., Maruyama K., Aramaki Y., *AIP Conf. Proc.*, **1215**, 299-302 (2009).
- 6) Negishi Y., Omata D., Iijima H., Takabayashi Y., Suzuki K., Endo Y., Suzuki R., Maruyama K., Nomizu M., Aramaki Y., *Mol. Pharm.*, **7**, 217-226 (2010).
- 7) Suzuki R., Namai E., Oda Y., Nishiie N., Otake S., Koshima R., Hirata K., Taira Y., Utoguchi N., Negishi Y., *J. Control. Release*, **142**, 245-250 (2010).
- 8) Tachibana K., Tachibana S., *Jpn. J. Appl. Phys.*, **38**, 3014-3019 (1999).
- 9) Mitragotri S., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 255-259 (2005).
- 10) Lawrie A., Briskin A. F., Francis S. E., Cumberland D. C., Crossman D. C., Newman C. M., *Gene Ther.*, **7**, 2023-2027 (2000).
- 11) Taniyama Y., Tachibana K., Hiraoka K., Namba T., Yamasaki K., Hashiya N., Aoki M., Ogihara T., Yasufumi K., Morishita R., *Circulation*, **105**, 1233-1239 (2002).

- 
- 12) Maruyama K., Ishida O., Kasaoka S., Takizawa T., Utoguchi N., Shinohara A., Chiba M., Kobayashi H., Eriguchi M., Yanagie H.,  
*J. Control. Release*, **98**, 195–207 (2004).
- 13) Cao R., Wu H. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 5728–5733 (1999).



## Development of an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier for DNA vaccine therapy

Keita Un<sup>a,b</sup>, Shigeru Kawakami<sup>a</sup>, Ryo Suzuki<sup>c</sup>, Kazuo Maruyama<sup>c</sup>, Fumiyoshi Yamashita<sup>a</sup>, Mitsuru Hashida<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Drug Delivery Research, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshida-shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

<sup>b</sup> The Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), Chiyoda-ku, Tokyo 102-8471, Japan

<sup>c</sup> Department of Biopharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, 1091-1 Suwarashi, Sagami-ku, Sagami-hara, Kanagawa 229-0195, Japan

<sup>d</sup> Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University, Yoshida-ushinomiya-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8302, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 31 May 2010

Accepted 29 June 2010

Available online 24 July 2010

#### Keywords:

Gene transfer

Bubble lipoplexes

Ultrasound exposure

Mannose receptors

Antigen presenting cells

DNA vaccine therapy

### ABSTRACT

Development of a gene delivery system to transfer the gene of interest selectively and efficiently into targeted cells is essential for achievement of sufficient therapeutic effects by gene therapy. Here, we succeeded in developing the gene transfection method using ultrasound (US)-responsive and mannose-modified gene carriers, named Man-PEG<sub>2000</sub> bubble lipoplexes. Compared with the conventional lipofection method using mannose-modified carriers, this transfection method using Man-PEG<sub>2000</sub> bubble lipoplexes and US exposure enabled approximately 500–800-fold higher gene expressions in the antigen presenting cells (APCs) selectively *in vivo*. This enhanced gene expression was contributed by the improvement of delivering efficiency of nucleic acids to the targeted organs, and by the increase of introducing efficiency of nucleic acids into the cytoplasm followed by US exposure. Moreover, high anti-tumor effects were demonstrated by applying this method to DNA vaccine therapy using ovalbumin (OVA)-expressing plasmid DNA (pDNA). This US-responsive and cell-specific gene delivery system can be widely applied to medical treatments such as vaccine therapy and anti-inflammation therapy, which its targeted cells are APCs, and our findings may help in establishing innovative methods for *in-vivo* gene delivery to overcome the poor introducing efficiency of carriers into cytoplasm which the major obstacle associated with gene delivery by non-viral carriers.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

In the post-genome era, the analysis of disease-related genes has rapidly advanced, and the medical application of the information obtained from gene analysis is being put into practice. In particular, the development of effective method to transfer the gene of interest selectively and efficiently into the targeted cells is essential for the gene therapy of refractory diseases, *in-vivo* functional analysis of genes and establishment of animal models for diseases. However, a suitable carrier for selective and efficient gene transfer to the targeted cells is still being developed. Although various types of viral and non-viral carriers have been developed for gene transfer, they are limited to use by viral-associated pathogenesis and low transfection efficiency, respectively. For the cell-selective gene transfer,

many investigators have focused on ligand-modified non-viral carriers such as liposomes [1–4], emulsions [5], micelles [6] and polymers [7], because of their high productivity and low toxicity. On the other hand, since the gene transfection efficiency by non-viral carriers is poor, it is difficult to obtain the effective therapeutic effects by gene therapy using non-viral carriers. Moreover, in the gene transfection using conventional ligand-modified non-viral carriers, since the carriers need to be taken up into cells via endocytosis following by interaction with targeted molecules on the cell membrane, the number of candidates which are suitable as ligands for targeted gene delivery is limited.

Some researchers have attempted to develop the transfection method using external stimulation, such as electrical energy [8], physical pressure [9] and water pressure [10], to enhance the gene transfection efficiency. Among these, gene transfection method using US exposure and microbubbles enclosing US imaging gas, called “sonoporation method”, have been focused as effective drug/gene delivery systems [11–14]. In the sonoporation method, microbubbles are degraded by US exposure with optimized intensity, then cavitation energy is generated by the destruction of

\* Corresponding author. Department of Drug Delivery Research, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshida-shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan. Tel.: +81 75 753 4545; fax: +81 75 753 4575.

E-mail address: [hashidam@pharm.kyoto-u.ac.jp](mailto:hashidam@pharm.kyoto-u.ac.jp) (M. Hashida).

microbubbles. Consequently, the transient pores are created on the cell membrane, and large amount of nucleic acids are directly introduced into the cytoplasm through the created pores [13,15,16]. However, the *in-vivo* gene transfection efficiency by conventional sonoporation method administering the nucleic acids and microbubbles separately is low because of the rapid degradation of nucleic acids in the body [17], the large particle size of conventional microbubbles [15] and the different pharmacokinetic profiles of the nucleic acids and microbubbles. Moreover, to transfer the gene into the targeted cells selectively by sonoporation method *in vivo*, the control of *in-vivo* distribution of nucleic acids and microbubbles, which are separately administered, is necessary.

In our previous report [16], we have demonstrated the effective transfection by combination-use method using our mannosylated lipoplexes composed of Man-C4-*chol*: DOPE [1], and conventional Bubble liposomes (BLs) [12] with US exposure. However, this combination-use method is complicated because of the necessity for multiple injections of mannosylated lipoplexes and BLs; therefore, it is difficult to apply for medical treatments using multiple transfections. In addition, the difference of *in-vivo* distribution characteristics between mannosylated lipoplexes and BLs might be decreased its transfection efficacy. Therefore, it is essential to develop the US-responsive and cell-selective gene carriers constructed with ligand-modified gene carriers and microbubbles.

Taking these into considerations, we examined the gene transfection system for effective DNA vaccine therapy using physical stimulation and ligand-modification. First, we developed US-responsive and mannose-modified gene carriers, Man-PEG<sub>2000</sub> bubble lipoplexes (Fig. 1), by enclosing perfluoropropane gas into mannose-conjugated PEG<sub>2000</sub>-DSPE-modified cationic liposomes (DSTAP: DSPC: Man-PEG<sub>2000</sub>-DSPE (Fig. 1))/pDNA complexes. Then, we evaluated the enhanced and cell-selective gene expression in the APCs by intravenous administration of Man-PEG<sub>2000</sub> bubble lipoplexes and external US exposure in mice. Finally, we examined high anti-tumor effects by applying this method to DNA vaccine therapy using OVA-expressing pDNA.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Mice and cell lines

Female ICR mice (4–5 weeks old) and C57BL/6 mice (6–8 weeks old) were purchased from the Shizuoka Agricultural Cooperative Association for Laboratory Animals (Shizuoka, Japan). All animal experiments were carried out in accordance

with the Principles of Laboratory Animal Care as adopted and promulgated by the US National Institutes of Health and the guideline for animal experiments of Kyoto University. CD8-OVA1.3 cells, T cell hybridomas with specificity for OVA 257–264 kb, were kindly provided by Dr. C.V. Harding (Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA) [18]. EL4 cells (C57BL/6 T-lymphomas) and E.G7-OVA cells (the OVA-transfected clones of EL4) were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA). CD8-OVA1.3 cells and EL4 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium and E.G7-OVA cells were maintained in RPMI-1640. Both mediums were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 0.05 mM 2-mercaptoethanol, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.2. pDNA

pCMV-Luc and pCMV-OVA were constructed in our previous reports [19,20]. Briefly, pCMV-Luc was constructed by subcloning the HindIII/Xba I firefly luciferase cDNA fragment from pGL3-control vector (Promega, Madison, WI, USA) into the polylinker of pCDNA3 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). pCMV-OVA was constructed by subcloning the EcoRI chicken egg albumin (ovalbumin) cDNA fragment from pAc-neo-OVA, which was kindly provided by Dr. M.J. Bevan (University of Washington, Seattle, WA, USA) into the polylinker of pVAX1. pDNA were amplified in the E. coli strain DH5α, isolated and purified using a QIAGEN Endofree Plasmid Giga Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany).

### 2.3. Synthesis of Man-PEG<sub>2000</sub>-DSPE and preparation of Man-PEG<sub>2000</sub> bubble lipoplexes

Man-PEG<sub>2000</sub>-DSPE was synthesized in a one-step reaction by covalent binding with NH<sub>2</sub>-PEG<sub>2000</sub>-DSPE (NOF Co., Tokyo, Japan) and 2-imino-2-methoxyethyl-1-thiomannoside (IME-thiomannoside). IME-thiomannoside was prepared according to the method of Lee [21]. Next, NH<sub>2</sub>-PEG<sub>2000</sub>-DSPE and IME-thiomannoside were reacted, vacuum dried and dialyzed to produce Man-PEG<sub>2000</sub>-DSPE, and then, the resultant dialysates were lyophilized. To produce the liposomes for bubble lipoplexes, DSTAP (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA), DSPC (Sigma Chemicals Inc., St. Louis, MO, USA) and Man-PEG<sub>2000</sub>-DSPE or NH<sub>2</sub>-PEG<sub>2000</sub>-DSPE were mixed in chloroform at a molar ratio of 7:2:1. For construction of BLs, DSPC and methoxy-PEG<sub>2000</sub>-DSPE (NOF Co., Tokyo, Japan) were mixed in chloroform at a molar ratio of 94:6. The mixture for the construction of liposomes was dried by evaporation, vacuum desiccated and the resultant lipid film was resuspended in sterile 5% dextrose. After hydration for 30 min at 65 °C, the dispersion was sonicated for 10 min in a bath sonicator and for 3 min in a tip sonicator to produce liposomes. Then, liposomes were sterilized by passage through a 0.45 µm filter (Nihon-Millipore, Tokyo, Japan). The lipoplexes were prepared by gently mixing with equal volumes of pDNA and liposome solution at a charge ratio of 1.0:2.3 (–:–). For preparation of BLs and bubble lipoplexes, the enclosure of US imaging gas into liposomes and lipoplexes was performed according to our previous report [16]. Briefly, prepared liposomes and lipoplexes were added to 5 mL sterilized vials, filled with perfluoropropane gas (Takachiho Chemical Industries Co., Ltd., Tokyo, Japan), capped and then pressured with 7.5 mL of perfluoropropane gas. To enclose US imaging gas into the liposomes and lipoplexes, the vial was sonicated using a bath-type sonicator (AS ONE Co., Osaka, Japan) for 5 min. The particle sizes and zeta

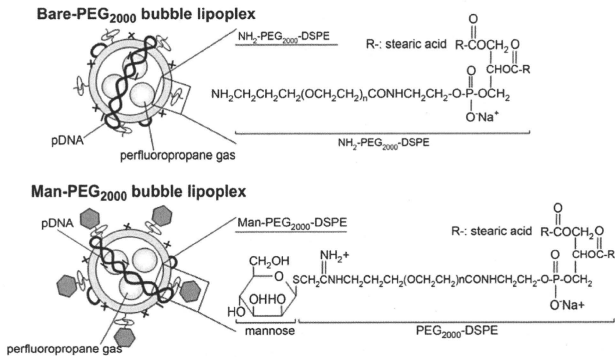


Fig. 1. Structure of Bare-PEG<sub>2000</sub> bubble lipoplex containing NH<sub>2</sub>-PEG<sub>2000</sub>-DSPE and Man-PEG<sub>2000</sub> bubble lipoplex containing Man-PEG<sub>2000</sub>-DSPE used in this study.