

超音波を用いた核酸導入法の開発

谷山義明,* 森下竜一

Development of Plasmid DNA-based Gene Transfer

Yoshiaki TANIYAMA,* and Ryuichi MORISHITA

*Department of Clinical Gene Therapy, Osaka University Graduate School of Medicine,
2-2 Yamada-oka, Suita City 565-0871, Japan*

(Received June 26, 2006)

Gene therapy based on ultrasound with microbubbles offers a novel approach for the prevention and treatment of variety of diseases. The major development of gene transfer has importantly contributed to intense investigation of the potential of gene therapy in cancer or cardiovascular medicine. The amazing advances in molecular biology have provided a dramatic improvement of the technology that is necessary to transfer target genes into somatic cells. Gene transfer methods have been surprisingly improved. In fact, some of them (retroviral vectors, adenoviral vectors or liposome based vectors, etc.) have been used in the clinical trials already. But some severe side effects were reported in clinical gene therapy using such viral, so people desire safe and efficient clinical gene therapy. Recently, ultrasound-mediated gene transfer has been reported to augment the transfection efficiency and facilitate local gene expression. Interestingly, gene transfer into the fetal central nervous system was successfully achieved by intrauterine injection with microbubble-enhanced ultrasound. Compared to other viral vectors, there are some theoretical advantages including safety, simplicity of preparation, and local gene transfer. Thus, we focused on the development of gene transfer using naked plasmid DNA with an ultrasound or microbubble-enhanced ultrasound method.

Key words—ultrasound; gene therapy; microbubble; central nerve system; cavitation

1. はじめに

遺伝子治療は、当初先天性疾患や癌などの悪性腫瘍の治療として開発された治療法であるが、近年の分子生物学の進歩により対象疾患が拡大され、現在では循環器疾患や免疫疾患も含む難治性疾患がターゲットとして注目されている。ウイルスベクターを用いた核酸導入法が一般的であるが、癌化などの安全性についていまだ問題が残されている。そこでわれわれはウイルスを用いない遺伝子導入法として物理的刺激を研究してきた。今回、超音波を用いて sonoporation を発生させ様々な細胞や臓器へ核酸を導入する技術を紹介し、臨床応用に向けたこの試みを解説する。

2. 超音波による Sonoporation

超音波によるキャビテーションが細胞の近くで生じるとそれが細胞膜に影響を与える。その影響が強い場合は細胞死が誘導されるが、その程度を調整することにより、細胞死は誘導しないものの、一過性に微小孔を生じさせることが報告されている。¹⁾ この小孔を介して大小の分子を細胞内に導入することが可能であり、この現象を sonoporation と呼んでいる。

3. 超音波とマイクロバブル（造影剤）を併用したキャビテーション増強効果

まずマイクロバブルとは、直径 1—10 μm の既に臨床で使用されている診断用造影剤であり、内部には可溶性あるいは難溶性のガスが満たされている。今回われわれの実験にて用いたマイクロバブルは直径 3—4 μm で内部に octafluoropropane が入っているヒト・アルブミンにて殻を作った造影剤で現在、米国で最も使用頻度の高いものである。

マイクロバブルを含む溶液に超音波が照射される

大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝子治療学（〒565-0871 吹田市山田丘 2-2）

*e-mail: taniyama@cgt.med.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S7 で発表したものを中心に記述したものである。

と、特に共鳴周波数近傍では細胞障害性のない低い音圧でもマイクロバブルがキャビテーションの核になることによって容易にキャビテーションが生じることが知られている。Figure 1 に示すように、われわれは培養細胞に超音波単独刺激 (1 MHz, 1 W/cm²) あるいは超音波とマイクロバブルを併用してルシフェラーゼ遺伝子を導入したところ、超音波単独でも遺伝子導入することはできたが、マイクロバブルの併用でマイクロバブルがキャビテーションその効果が増強されることを証明した。^{2,3)} その機序を解明するため実際に電子顕微鏡で細胞を観察した (Fig. 2)。超音波単独でも細胞表面に微小孔ができることは既に報告されていた⁴⁾が、超音波とマイクロバブルの併用にてより大きな孔が生じ、さらにその孔は 24 時間後には消失していることが明らかとなった。

4. 超音波刺激とマイクロバブル併用の有無による遺伝子導入の違い

Figure 3 上段に示すように、超音波単独でも細胞表面に微小孔を作ることはできるが、細胞全体に生じる可能性があり細胞障害が大きくなり壊死やアポトーシスを誘導してしまう可能性が高い。一方、Fig. 3 下段に示すようにマイクロバブルと超音波の併用は小孔の出現がマイクロバブルの存在する部分に限定されるため一部に限定される。超音波単独よりより低い音圧でもキャビテーションが発生するため、マイクロバブルのない部分は細胞に大きな障害を与えずに済む。結果として一部に小孔を出現させる以外の部分では壊死やアポトーシスが誘導されないと考えられる。

5. 動物モデルへの応用

われわれは安全な核酸導入法である、超音波とマイクロバブルの併用を動物モデルへ応用を試み

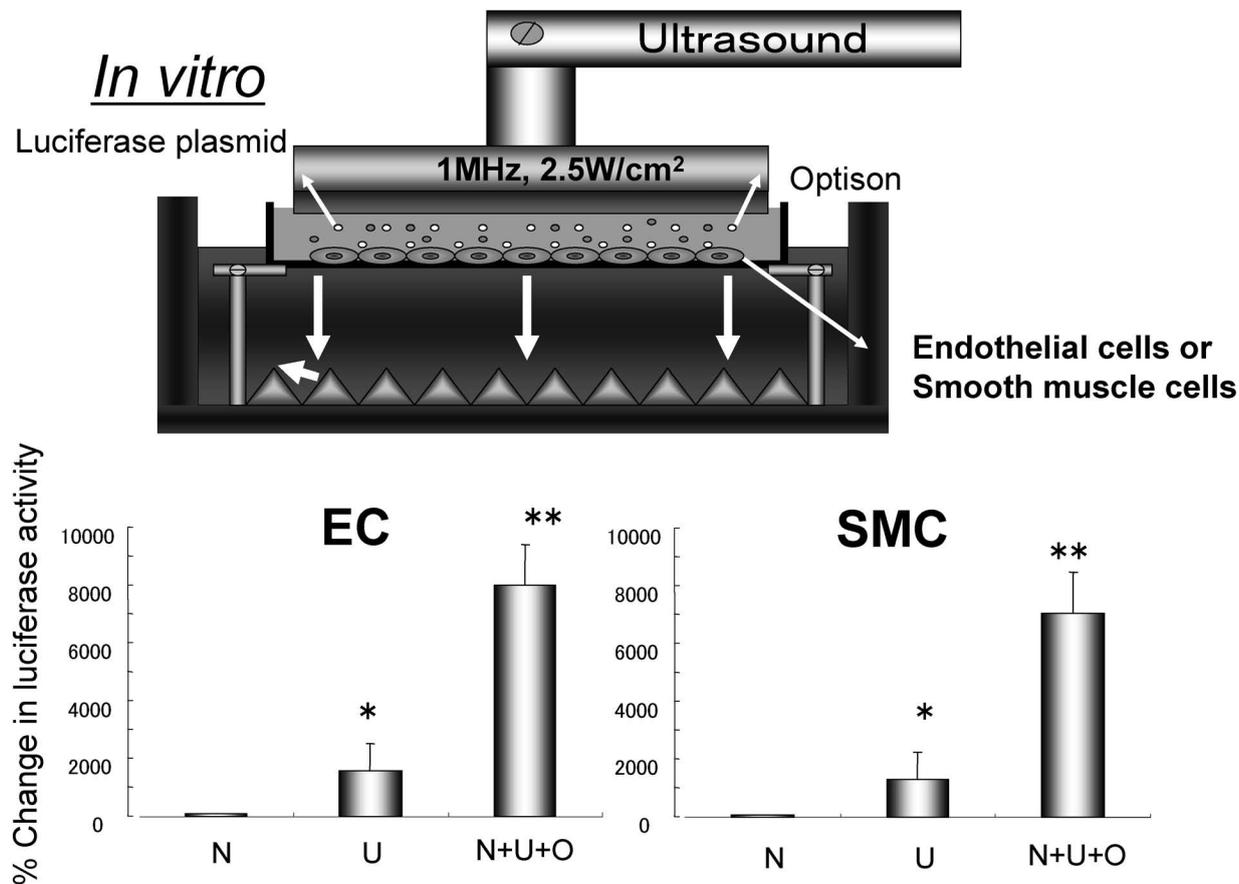


Fig. 1. Upper Panel, the Device for Gene Transfer, Lower Panel, Ultrasound Irradiation

Significantly increased the luciferase activity in endothelial cells or smooth muscle cells ($p < 0.01$), and ultrasound with microbubbles much increased it ($p < 0.01$). N: naked DNA, U: naked DNA + ultrasound, N+U+O: naked DNA + ultrasound + optison (microbubble). * $p < 0.01$ vs. naked, ** $p < 0.01$ vs. ultrasound. (Taniyama et al., *Circ.*, 2002).

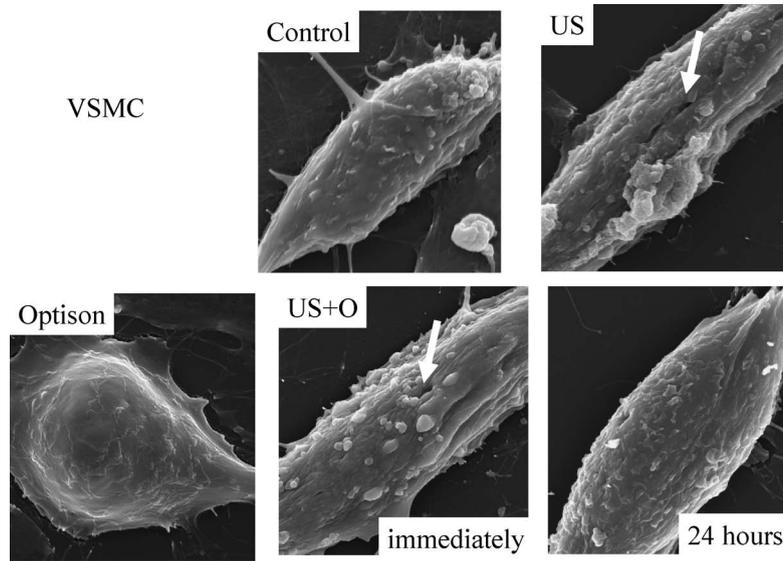


Fig. 2. Electron Microscope Photos for a Vascular Smooth Muscle Cell before and after Ultrasound Irradiation with or without Microbubbles

There was no hole on the surface of the cell in control or microbubble (optison) alone, while there was a small hole in ultrasound irradiation with or without microbubble. 24 hours after ultrasound irradiation, its hole disappeared. Control, US: ultrasound, Optison: microbubble alone, US+O: immediately after ultrasound irradiation with microbubble, 24 hours after ultrasound irradiation with microbubble. (Taniyama et al., *Circ.*, 2002).

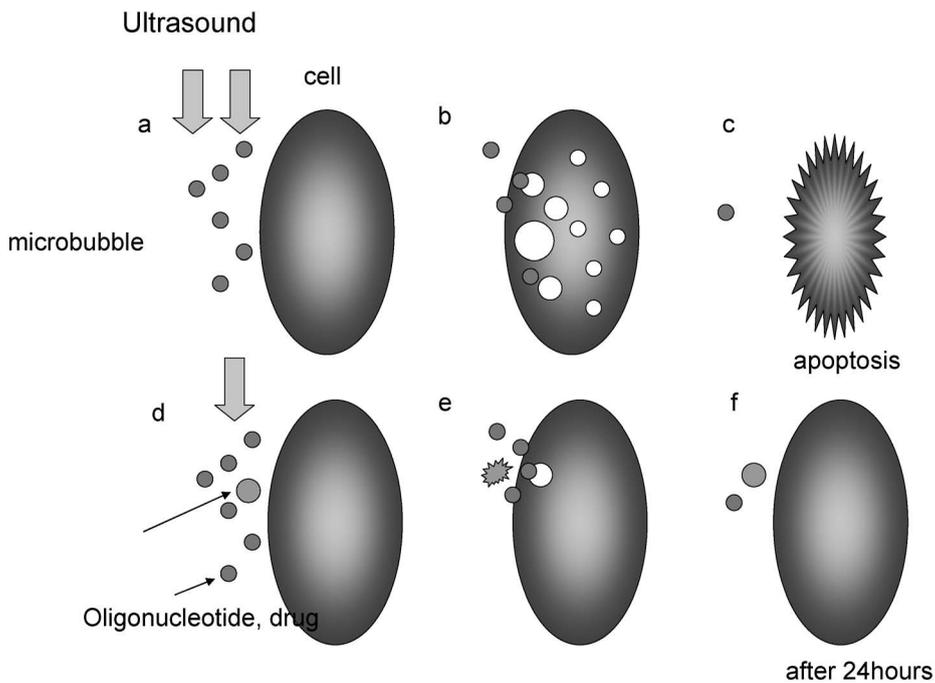


Fig. 3. Hypothesis for the Mechanism of Gene Transfer by Ultrasound

Upper panel: Ultrasound without microbubble (a) can make holes on the surface of the cell (b), but many holes sometimes lead apoptosis (c). Lower panel: Ultrasound with microbubble (d) makes holes on the surface of the cell only near the microbubble (e). Holes are not so many, so it does not lead apoptosis (f).

た. 3,5-12)

5-1. 循環器疾患への遺伝子導入 Figure 4 に示すように下肢筋肉へ上記手法にて遺伝子導入を施行すると8分までは超音波を照射するほど強い導入効果が得られた。そこで、ウサギの下肢虚血モデル

へ血管新生因子肝細胞増殖因子 (HGF; hepatocyte growth factor) を同手法によって導入したところ、血管数、血流量、下肢の正常側と虚血側との血圧比はいずれも HGF の単独投与よりも有意に改善していた。また、ラットの頸動脈バルーン障害モデルに

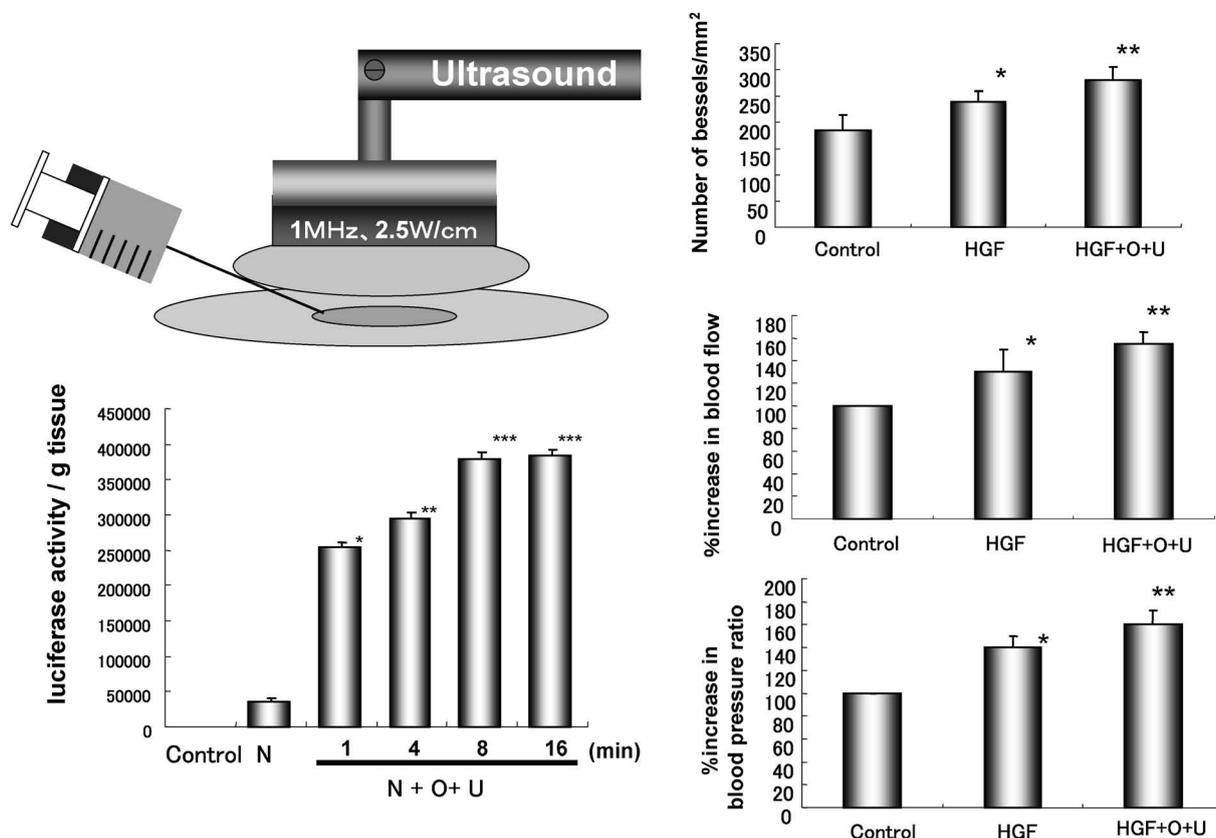


Fig. 4. Gene Transfer for Skeletal Muscle by Ultrasound with Microbubble

Left panel: We injected luciferase plasmid with microbubble (N+O+U) into skeletal muscle, and irradiated ultrasound for 1 to 16 mins. N+O+U significantly increased luciferase activity in dose dependent manner ($p < 0.01$). N: luciferase plasmid only, N+O+U: luciferase plasmid with microbubble and ultrasound. Right panel: 1 month after making hind limb ischemia rabbit model, we injected control plasmid, HGF plasmid or HGF plasmid+microbubble with ultrasound (HGF+O+U). HGF plasmid injection significantly increased the number of vessels, % increase in blood flow and % increase in blood pressure ratio compared to control ($p < 0.01$), and HGF+O+U significantly increased them compared to HGF plasmid alone ($p < 0.01$). * $p < 0.01$ vs. control, ** $p < 0.05$ vs. HGF. (Taniyama et al., *Gene Ther.*, 2002).

おいての同様の手法で *p53* 遺伝子を血管平滑筋細胞に遺伝子導入し、平滑筋細胞の増殖を抑制し再狭窄を抑制することを証明した。²⁾ さらに、同様の結果は、ほかの研究室からも急性心筋梗塞モデルで報告されている。¹³⁾

5-2. 腎臓への遺伝子導入 超音波とマイクロバブルを用いた sonoporation 増強作用は、転写因子を抑制するデコイの導入が可能であることをわれわれは確認した。その上でラット腎移植モデルの腎臓に炎症の中心的役割を演じている転写因子 NF- κ B のデコイを導入した効果を Fig. 5 に示す。左上に示すように腎移植後、腎動脈から逆行性に NF- κ B のデコイとマイクロバブル (optison) を注入し、外側より超音波を照射した。右上に示すように移植を行っていない腎臓 (UN) には炎症のサイトカインである IL-1 β や TNF- α は発現していないものの移植した腎臓に scramble decoy (SD) を導入した

群では両方とも過剰発現し、NF- κ B のデコイを導入した群では炎症が抑制され両方とも抑制されていた。結果として下に示すように、NF- κ B のデコイ導入群では腎移植による生存率を有意に改善させた。

5-3. 胎児への遺伝子導入 われわれは同様の手法で胎児の皮膚への遺伝子導入の可能性を検討した。⁸⁾ Figure 6 の右上にあるように羊水中に β -gal 遺伝子とマイクロバブルを注入し、外側より超音波を照射したところ、左上にあるように皮膚全体が緑に発光し遺伝子導入が可能であることが示された。さらに、ルシフェラーゼ遺伝子を同手法で導入し他の臓器を検証したところ、下に示すように皮膚に最も多く導入されているが、脳、肺、心臓、肝臓、羊水膜などにも導入されていた。これは胎児が羊水を飲んで体に羊水が循環するためであると推測される。

5-4. 中枢神経系への遺伝子導入 さらにわれわれは中枢神経系への遺伝子導入も検討した。

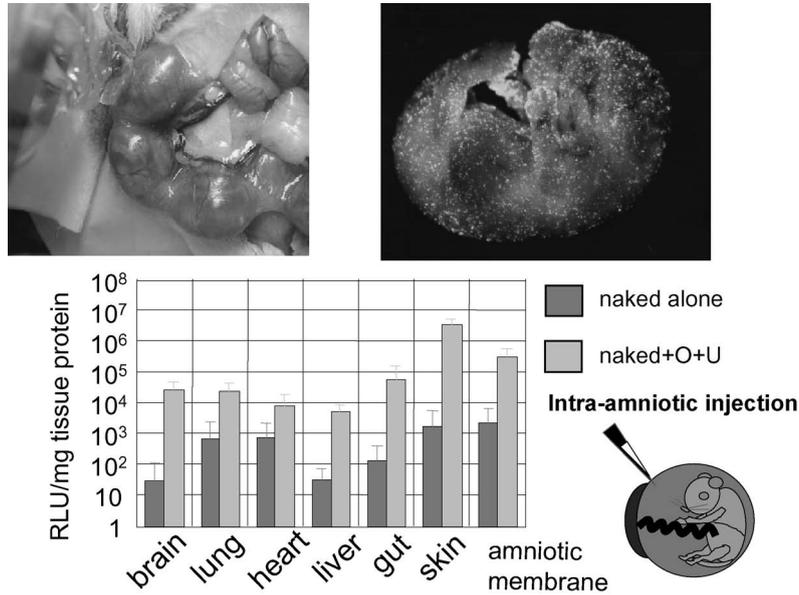


Fig. 5. Gene Transfer for Unborn Child by Ultrasound with Microbubble

We mixed GFP plasmid and microbubble into amniotic fluid, and irradiated ultrasound. GFP plasmid was expressed on the surface of skin (right panel). Luciferase plasmid with microbubble and ultrasound (naked + O+U) significantly increased luciferase activity in brain, lung heart, liver gut, skin and amniotic membrane ($p < 0.01$). Also increased compared to control (naked alone : luciferase plasmid alone). (Endoh M. et al., *Mol Ther*, 2002).

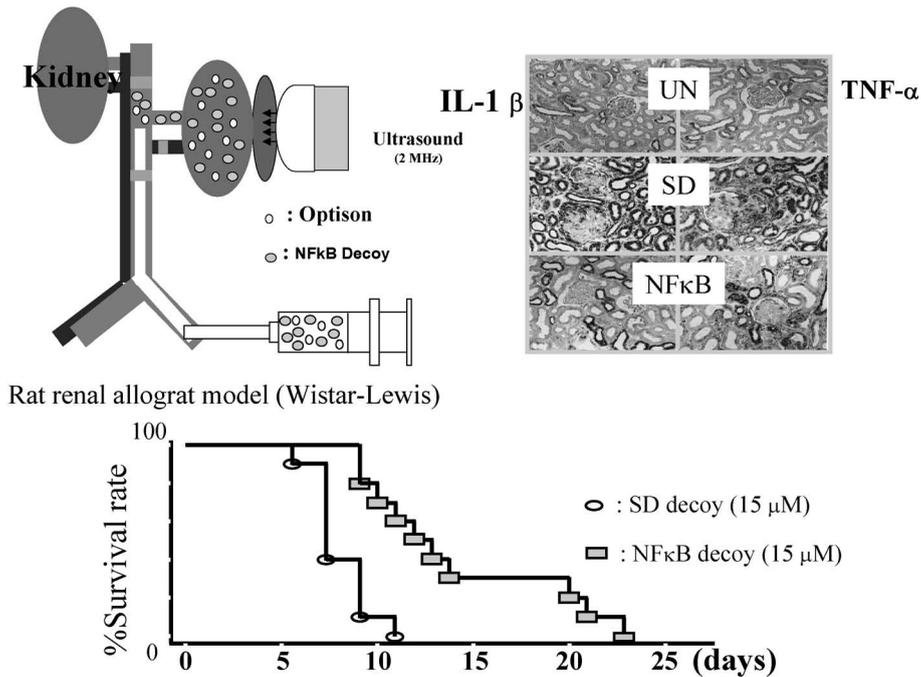


Fig. 6. Oligonucleotide Transfer for Transplanted Kidney by Ultrasound with Microbubble

Upper panel: We did kidney transplantation, and injected NF-κB decoy with microbubble and ultrasound (NF-κB), scramble decoy (control) with microbubble and ultrasound. NF-κB decoy transferred kidney showed decreased IL-1β or TNF-α (inflammatory cytokines) compared to scramble decoy ($p < 0.01$). Lower panel : % survival rate was significantly improved by NF-κB transfection by microbubble and ultrasound ($p < 0.01$). (Azuma H., Tomita N. et al., *Gene Ther.*, 2003).

Figure 7 の左上段 b に示すように、大槽に注射器を用いて Venus プラスミド (発現すると緑に発光)、マイクロバブルを注入し c に示すように超音波をあけると右に示すように緑の発光がみられ同部位に遺

伝子導入ができたことが確認された。またこれは神経の染色である NeuN では染色されなかったの、遺伝子導入されたのは神経細胞自体ではなく支持細胞であることが分かった。また上段 d のよう

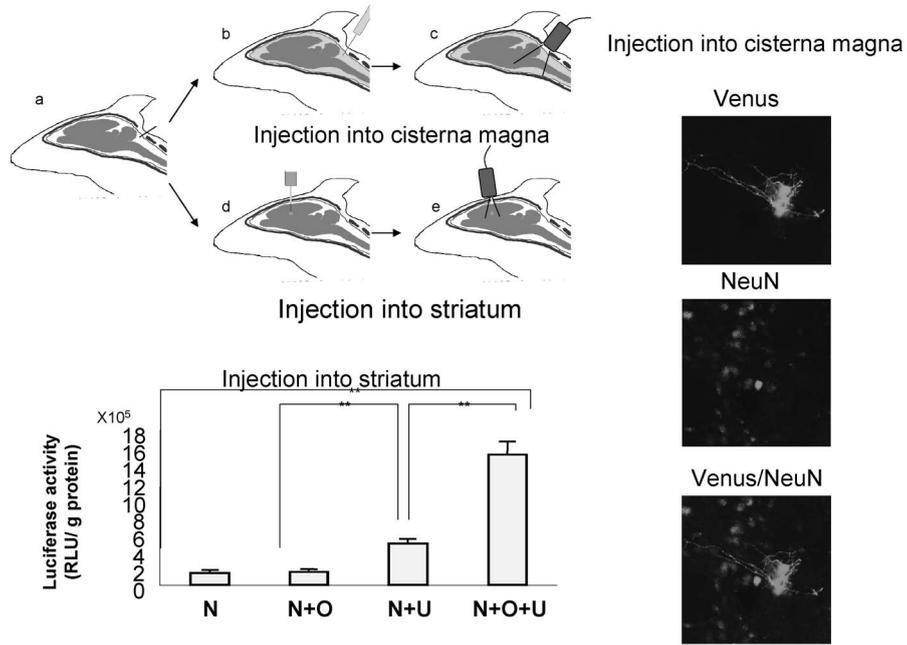


Fig. 7. Gene Transfer for Brain by Ultrasound with Microbubble

Upper panel: We injected venus plasmid or luciferase plasmid with microbubble and ultrasound into cisterna magna (b–c), and striatum directly (d–e). Lower panel: Naked luciferase plasmid with ultrasound (N+U) significantly increased luciferase activity compared to naked plasmid only (N) ($p < 0.01$), naked plasmid with optison did not increase it (N+O), naked plasmid with optison and ultrasound (N+O+U) significantly increased luciferase activity compared to Naked luciferase plasmid with ultrasound (N+U) ($p < 0.01$). Right panel: We stained NeuN a neuron specific protein, but venus expression by ultrasound with microbubble was not seen in NeuN positive cell. It mean transfection by ultrasound with microbubble transfer foreign gene into the cells around the neuron not neuron cell itself. (Shimamura M., et al., *Gene Ther.*, 2004).

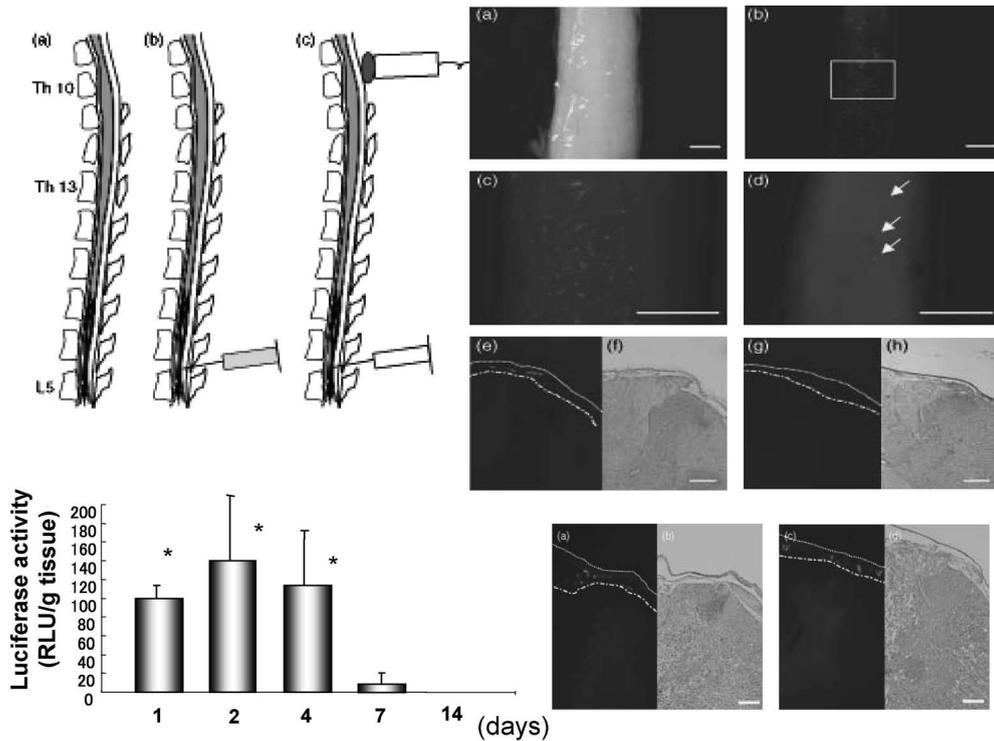


Fig. 8. Gene Transfer for Spinal Cord by Ultrasound with Microbubble

Left upper panel: We injected venus plasmid and microbubble (b), and irradiated ultrasound (c). Left lower panel: Luciferase plasmid with ultrasound and microbubble significantly increased luciferase activity at 1, 2 and 4 days after ultrasound irradiation ($p < 0.01$). Right panel: Venus gene expression were seen not in neuron itself but in meninges. At 3 days (a, b), 5 days (c, d) and 7 days (e, f), while venus gene expression was not seen (g, h) at 7 days after injection in venus plasmid alone. (Shimamura M., et al., *J. Gene Med.*, 2005).

に直接脳内にルシフェラーゼプラスミドとマイクロバブルを注入し、eに示すように超音波を照射しても下段に示すように遺伝子発現が可能であった。これらの遺伝子導入法は、神経細胞そのものには導入されないが、分泌型蛋白を導入することにより神経保護効果や血管新生効果を誘導することの可能性が示された。現在、われわれは脳変性疾患へ同手法を用いて治療効果を確認中である。

さらに、われわれは Fig. 8 に示すように脊髄への遺伝子導入を試みた。左上段にあるようにプラスミドとマイクロバブルの注入を L5-4 で行い、cにあるように Th9-10 で超音波を照射した。下段に示すようにルシフェラーゼによる遺伝子発現は 1—2 週間まで確認された。また左に示すように超音波の併用によって髄膜の細胞に Venus 遺伝子が導入されており、安全性に問題はなかった。現在、脊髄神経障害モデルへの治療効果を検討中である。

6. おわりに

超音波とマイクロバブルの併用による安全な核酸導入法の原理・仮説及び、各種疾患モデルへの応用を解説した。この手法の適正を正確に検討すれば現段階でも臨床応用できる分野はあると考えている。一方でその問題点としてはマイクロバブルを使用する場合、主に導入部位がマイクロバブルと接する表面に限定されるのが難点である。われわれはこの問題点を克服するため実験を重ねており、いずれ成果を報告したいと考えている。

謝辞 名誉ある薬学会シンポジウムに参加する機会をあたえていただきました薬学会の関係者の皆様方に改めて感謝の意を表したいと思います。

REFERENCES

- Holmes R. P., Yeaman L. D., Taylor R. G., McCullough D. L., *J. Urol.*, **147**, 733-737 (1992).
- Taniyama Y., Tachibana K., Hiraoka K., Nanba T., Yamasaki K., Hashiya N., Aoki M., Ogihara T., Yasufumi K., Morishita R., *Circulation*, **105**, 1233-1239 (2002).
- Taniyama Y., Tachibana K., Hiraoka K., Aoki M., Yamamoto S., Matsumoto K., Nakamura T., Ogihara T., Kaneda Y., Morishita R., *Gene Ther.*, **9**, 372-380 (2002).
- Tachibana K., Uchida T., Ogawa K., Yamashita N., Tamura K., *Lancet*, **353**, 1409 (1999).
- Taniyama Y., Walsh K., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **34**, 1241-1247 (2002).
- Azuma H., Tomita N., Kaneda Y., Koike H., Ogihara T., Katsuoka Y., Morishita R., *Gene Ther.*, **10**, 415-425 (2003).
- Lan H. Y., Mu W., Tomita N., Huang X. R., Li J. H., Zhu H. J., Morishita R., Johnson R. J., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **14**, 1535-1548 (2003).
- Endoh M., Koibuchi N., Sato M., Morishita R., Kanzaki T., Murata Y., Kaneda Y., *Mol. Ther.*, **5**, 501-508 (2002).
- Hashiya N., Aoki M., Tachibana K., Taniyama Y., Yamasaki K., Hiraoka K., Makino H., Yasufumi K., Ogihara T., Morishita R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**, 508-514 (2004).
- Koike H., Tomita N., Azuma H., Taniyama Y., Yamasaki K., Kunugiza Y., Tachibana K., Ogihara T., Morishita R., *J. Gene Med.*, **7**, 108-116 (2005).
- Shimamura M., Sato N., Taniyama Y., Yamamoto S., Endoh M., Kurinami H., Aoki M., Ogihara T., Kaneda Y., Morishita R., *Gene Ther.*, **11**, 1532-1539 (2004).
- Shimamura M., Sato N., Taniyama Y., Kurinami H., Tanaka H., Takami T., Ogihara T., Tohyama M., Kaneda Y., Morishita R., *J. Gene Med.*, **7**, 1468-1474 (2005).
- Kondo I., Ohmori K., Oshita A., Takeuchi H., Fuke S., Shinomiya K., Noma T., Nanba T., Kohno M., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **44**, 644-653 (2004).