

バブルリポソームと超音波を用いた薬物・遺伝子送達システム

丸山一雄,^{*,a} 鈴木 亮,^a 滝澤知子,^a 宇都口直樹,^a 根岸洋一^b

Drug and Gene Delivery by “Bubble Liposomes” and Ultrasound

Kazuo MARUYAMA,^{*,a} Ryo SUZUKI,^a Tomoko TAKIZAWA,^a
Naoki UTOGUCHI,^a and Yoichi NEGISHI^b^aDepartment of Biopharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, 1091-1 Sagamiko, Sagami-hara City 229-0195, Japan, and ^bSchool of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, 1432-1 Horinouchi, Hachioji City 192-0392, Japan

(Received January 15, 2007)

Gene therapy has a potentiality for treatment of cancer and diseases from genomic defects. It is important to select a vector which has good potency in terms of gene transduction efficiency, and is safe and easy to apply. Many researchers have attempted to develop an effective gene delivery carrier. Recently, it was reported that microbubbles, which are ultrasound (US) contrast agents, improved the transfection efficiency by cavitation with US exposure. However, microbubbles had problems with stability and targeting ability. To solve these problems, we focused on liposomes that had many advantages such as being stable and safe *in vivo* and easily modifying targeting ligand. We succeeded in preparing the liposomes (“Bubble liposomes” (BLs)) entrapping perfluoropropane gas which was utilized for contrast enhancement in ultrasonography. In this study, we assessed the feasibility of BLs as gene delivery carrier utilized cavitation by US exposure. BLs could deliver plasmid DNA to various cell types *in vitro* by combining with US without cytotoxicity. To evaluate the ability of BLs to *in vivo* gene delivery, we attempted to deliver plasmid DNA into the femoral artery. The gene expression at this artery treated with BLs and US combination was higher than with US only, BLs without US or Lipofectamine 2000. This result suggested that Bubble liposomes could quickly deliver plasmid DNA into the artery even under conditions of short contact time between BLs and the endothelial cells and the existence of the bloodstream and serum. These results suggested that BLs might be a non-invasive and effective carrier for gene delivery.

Key words—liposome; gene therapy; ultrasound; microbubble; cavitation

1. はじめに

超音波技術の発展に伴い、診断用の超音波技術は目覚ましい進歩を遂げてきた。その結果、超音波画像の画質も飛躍的に向上し、循環器領域に留まらず様々な分野における一般診療において必要不可欠な診断手法となっている。近年、この超音波を診断目的のみならず、治療への応用も進められている。超音波を利用した治療例として腎結石破砕が挙げられるが、これに加えて現在では、超音波を数 mm 単位で患部への正確な照射を可能にする強力集束超音波治療 (High intensity focused ultrasound: HIFU) も

開発されている。この HIFU は標的部位を加熱することが可能であり、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。

さて、超音波治療の作用機序は、主に温熱効果と非温熱効果を利用する 2 種類に大別できる。前者の温熱効果による治療は、上述したような HIFU による超音波熱エネルギーで標的組織を加熱傷害する方法である。一方、後者の非温熱効果は低エネルギー超音波を利用した血栓溶解、薬物吸収性改善や遺伝子導入などに利用可能である。¹⁻⁴⁾ さらに、この超音波照射と超音波造影剤として利用されているマイクロバブルを併用することで、薬物・遺伝子のデリバリー効率が格段に向上することが知られてい

^a帝京大学薬学部生物薬剤学教室 (〒229-0195 相模原市相模湖町寸沢嵐 1091), ^b東京薬科大学薬学部薬物送達学教室 (〒192-0392 八王子市堀之内 1432-1)

*e-mail: maruyama@pharm.teikyo-u.ac.jp

本総説は日本薬学会第 126 年会シンポジウム S2 で発表したものを中心に記述したものである。

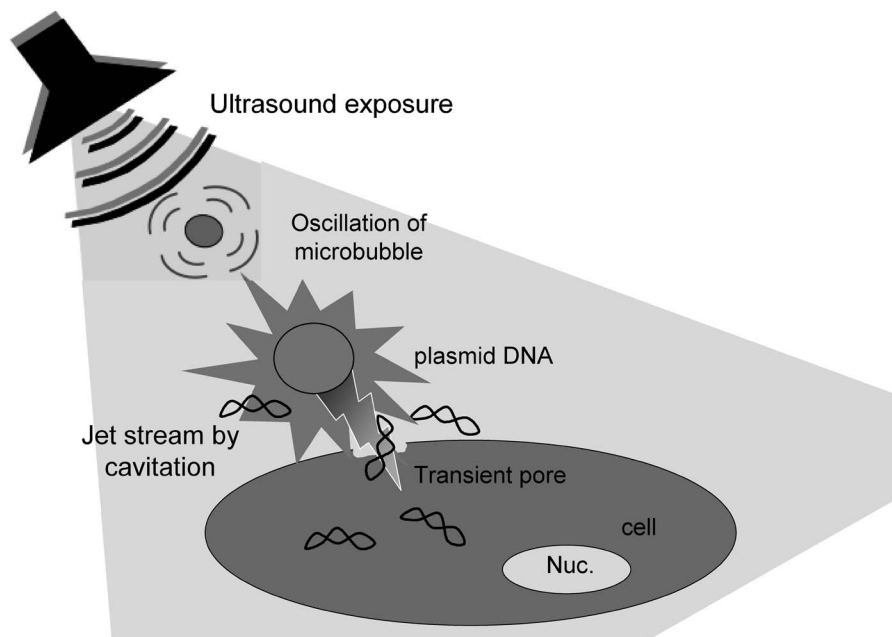


Fig. 1. Mechanism of Gene Delivery with Microbubbles and Ultrasound

る.^{4,5)} このマイクロバブルへの超音波照射はバブル崩壊（キャビテーション）を誘導し、そのとき生じるジェット流が細胞に一過性の小孔を開け細胞膜の透過性を向上させることで、細胞外の物質が細胞内に導入される（Fig. 1）。このキャビテーションを利用した薬物・遺伝子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薬物・遺伝子デリバリーを可能とする新たなドラッグデリバリーシステム（DDS）として期待されている。このDDSを実現していくためには、本システム用に最適化されたバブル製剤の開発が必要である。これまでに筆者らは、薬物・遺伝子キャリアーとしての可能性・安全性・汎用性などの観点から新たなバブル素材としてリポソームに着目し、超音波造影ガスを封入した新規リポソーム（バブルリポソーム）の調製に成功した。^{6,7)} このバブルリポソームは超音波造影のみならず、治療用超音波照射と併用した低侵襲的な薬物・遺伝子デリバリーを可能とする新たなDDS製剤として期待される。そこで本稿では、リポソーム技術と超音波技術の融合による新たなDDSの構築について、筆者らが開発したバブルリポソームを中心に概説する。

2. バブルリポソームの特徴

バブルリポソームは、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することで調

製される。筆者らは、血中安定性・滞留性に優れ、標的指向性を容易に付与可能なポリエチレングリコール（PEG）修飾リポソームにガスを封入したバブルリポソームを調製した（Fig. 2）。このバブルリポソーム懸濁液は白濁しており、この懸濁液を静置すると、マイクロバブルと同様に水相上部に浮上する性質を有していた。なお、この浮上したバブルリポソームは、混和により容易に再懸濁可能であった。このバブルリポソームを Darklite illuminator（NEPA GENE）を用いて顕微鏡観察したところ、市販されているマイクロバブルである Optison（NEPA GENE）よりはるかに小さい粒子であることが判明した（Fig. 3）。Table 1 に世界で市販又は研究開発されているマイクロバブルの一覧を示した。⁸⁾ このなかで本邦では現在のところ Levovist[®]のみが医薬品（造影剤）として臨床応用されている。



丸山一雄

帝京大学薬学部生物薬剤学教室教授。1953年北海道旭川市生まれ。東京薬科大学卒業、熊本大学薬学研究科修士。1977年帝京大学薬学部薬剤学教室助手。1988年テネシー大学生化学科に留学。ステルスイムノリポソームの研究。2002年帝京大学薬学部生物薬剤学教室教授、現在に至る。リポソームを基盤とする“DDSと免疫療法”の構築。リポソームによるDDS製剤の実用化を目指して臨床医や企業との共同研究多数。

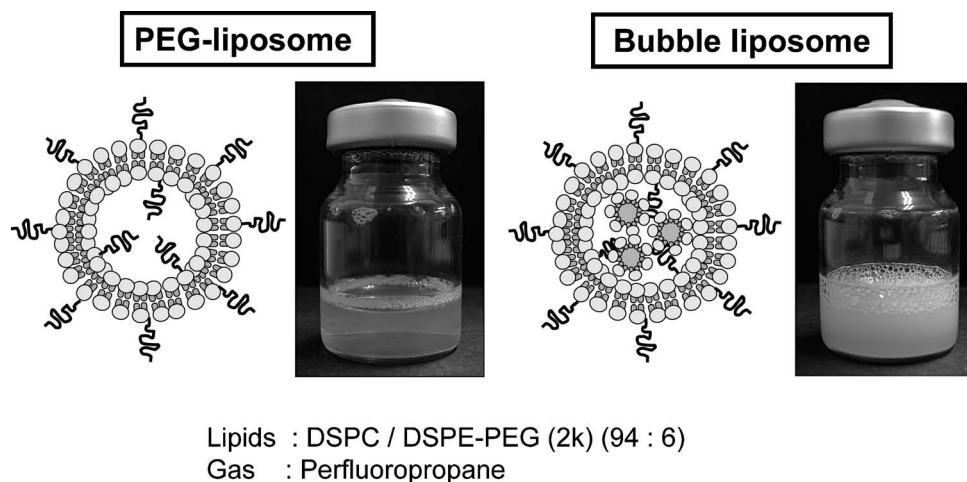


Fig. 2. Aspect of PEG-liposomes and Bubble Liposomes
PEG-liposomes sonicated with perfluoropropane gas became to Bubble liposomes in the vial.

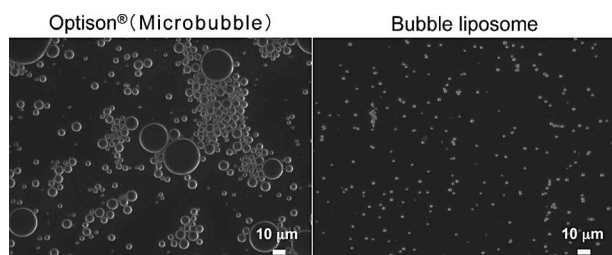


Fig. 3. Microscopy of Bubble Liposomes
Optison and Bubble liposomes were observed with a microscope using a dark-light illuminator.

この Table 1 をみると既存のマイクロバブルのサイズは比較的大きいことが分かる。一方、これらマイクロバブルに比べバブルリポソームは小さいサイズであることから、バブルリポソームが組織深部への到達性に優れたバブル製剤であると推察される。

3. バブルリポソームの超音波造影剤への応用

バブルリポソームは高輝度の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製剤であり、超音波造影装置による造影が可能であると考えられる。そこで、このバブルリポソームへのガス封入を確認する目的で、超音波診断装置による超音波造影を行った (Fig. 4)。その結果、ガス未封入りポソームでは陰影像 (黒色部) のみしか認められなかった。一方、バブルリポソームの超音波造影では、リポソーム存在部においてエコーシグナルの増強が認められ、ガスの存在が確認できた。このことから、バブルリポソームは超音波造影剤として利用可能になるものと期待される。そこで、バブルリポ

ソームの *in vivo* における超音波造影効果を評価した (Fig. 5)。マウス尾静脈からバブルリポソームを投与し心臓における造影効果を確認したところ、バブルリポソーム投与による心臓内エコーシグナルの増強が認められた。このように、バブルリポソームは超音波造影剤として臨床応用可能であると考えられた。

4. バブルリポソームの細胞内デリバリーツールとしての可能性

既存のマイクロバブルは超音波との併用により、バブルの崩壊 (キャビテーション) を誘導し、そのとき生じるエネルギーで細胞内に薬物や遺伝子を導入できる。そこで、筆者らが開発した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 (Fig. 6)。その結果、超音波照射後、バブルリポソーム懸濁液の透明化及び超音波エコーシグナルの減弱が観察され、バブルリポソームへの超音波照射によるキャビテーション誘導が確認された。したがって、バブルリポソームも、このキャビテーションエネルギーを利用することで、細胞内に様々な物質を導入可能であると推察された。

遺伝子治療で利用されている核酸医薬は細胞内へのデリバリーが必須であるが、核酸分子が高分子であるために細胞内への核酸デリバリー効率の点で改善すべき課題が数多く残されている。したがって、有効な遺伝子治療を確立していくためには、治療用遺伝子を安全かつ効率よく目的細胞に導入するベクターが必要である。さらに、今後の臨床応用を考慮

Table 1. List of Microbubbles⁸⁾

Microbubble	Manufacturer	Shell	Gas	Mean size
Albunex	Molecular Biosystems	Albumin	Air	4.3 μm
Optison	Mallinckrodt/Amersham	Albumin	Octafluoropropane	2–4.5 μm
Definity	Bristol-Myers Squibb Medical Imaging	Lipid/surfactant	Octafluoropropane	1.1–3.3 μm
Imagent	Imcor	Lipid/surfactant	N ₂ /perfluorohexane vapor	6.0 μm
Sonovue	Bracco Diagnostics	Lipid	Sulphur hexafluoride	2–3 μm
Levovist	Schering AG	Lipid/galactose	Air	2–4 μm
Cardiosphere (BP127)	Point Biomedical	PLGA polymer/albumin	Nitrogen	4 μm
AI-700	Acusphere	PLGA polymer	Perfluorocarbon	2.2 μm
Sonovist	Schering AG	Cyanoacrylate polymer	Air	
Sonazoid	Nycomed/Amersham	Not disclosed	Perfluorocarbon	3 μm

PLGA: polylactide co-glycolide.

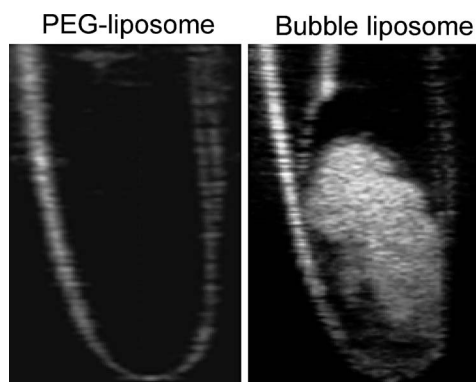


Fig. 4. Ultrasonographic Images of PEG-liposomes and Bubble Liposomes

したとき、そのベクターが持ち併せるべき性質として安全性の観点だけではなく、汎用性や低侵襲性についても具備すべき条件としていかなければならない。その点、超音波を利用した遺伝子導入方法は体外からでも標的組織に超音波照射可能である上、超音波照射部位のみで遺伝子発現を誘導可能であるため、低侵襲的かつ部位特異的な遺伝子導入が可能になると考えられる。そこで次に、バブルリポソームを用いた超音波遺伝子導入について検討した。まず始めに、*in vitro*における遺伝子導入効率を評価したところ、プラスミド DNA (pDNA) 単独、pDNA に超音波照射した通常のソノレーション、pDNA とバブルリポソーム混合液、又は pDNA とガスを封入していないリポソームを混合し超音波照

射した群ではほとんど遺伝子発現が認められなかった (Fig. 7)。一方、pDNA とバブルリポソームを混合し超音波照射した群では、pDNA などの上述の群に比べ極めて高い遺伝子発現が認められた。このように、ガス未封入りリポソームではなくバブルリポソームへの超音波照射で高い遺伝子発現が認められたことより、この遺伝子導入は超音波照射によるバブルリポソームを介したキャビテーション誘導を駆動力にして、遺伝子を効率よく細胞内に導入されたものと考えられた。また、このバブルリポソームと超音波の併用による遺伝子導入方法は、血清存在下でも遺伝子導入活性を維持していた。⁶⁾ 一般的に既存のカチオニックリポソームを用いたリポフェクション法では血清存在下で顕著な遺伝子導入活性の低下が報告されており、*in vivo* 遺伝子導入に不向きであることが知られている。⁹⁾ しかし、バブルリポソームと超音波の併用は、血清の影響を受けることなく遺伝子導入可能な方法として *in vivo* における効率のよい遺伝子導入方法として期待される。そこで、筆者はバブルリポソームと超音波の併用による *in vivo* での遺伝子導入について検討した。次に血管内皮と心臓、肝臓部位への遺伝子導入について紹介する。

血流が存在し既存の非ウイルスベクターでは遺伝子導入が困難であると考えられている血管内皮細胞への遺伝子導入について、バブルリポソームを用い検討した (Fig. 8)。マウス下肢動脈の上流からバ

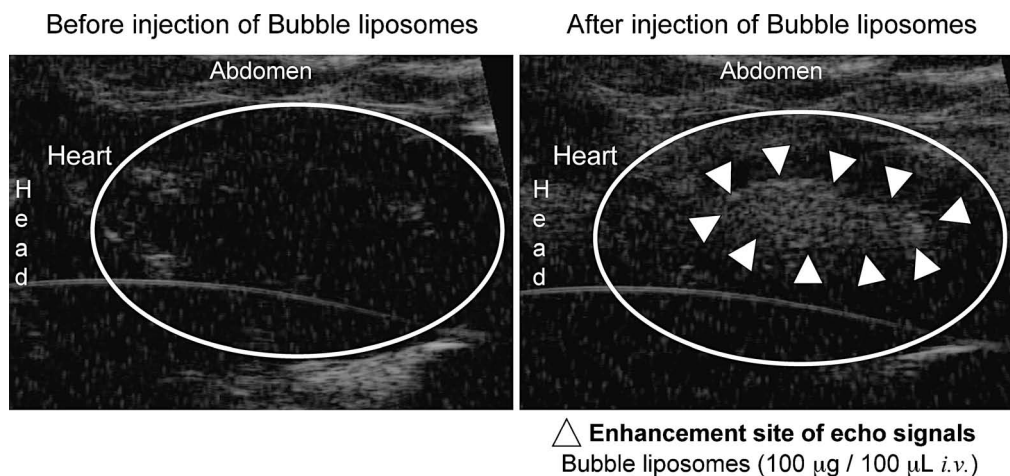


Fig. 5. Ultrasonographic Images of Heart with Bubble Liposomes

Bubble liposomes $100 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ were injected into mouse tail vein. In the same time, probe (9 MHz) of an ultrasound imaging machine (UF-750XT, Fukuda Denshi Co Ltd., Tokyo, Japan) was positioned on the heart of mouse.

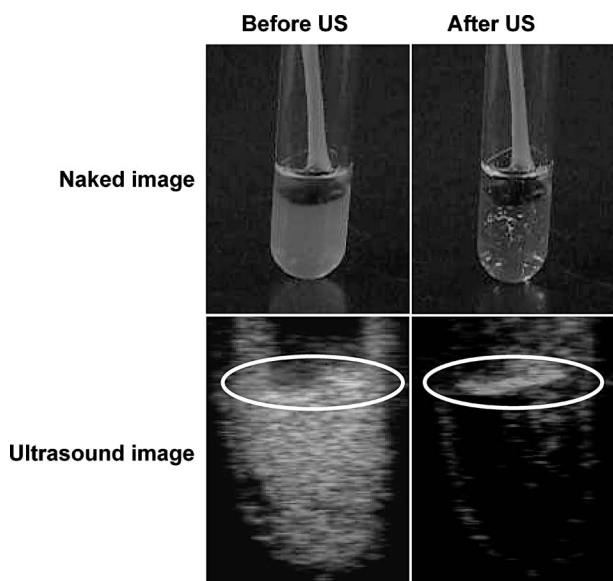


Fig. 6. Induction of Cavitation with Bubble Liposome and Ultrasound

Naked and ultrasound images of Bubble liposomes. Ultrasonic probe positioned in Bubble liposome suspension exposed $2.5 \text{ W}/\text{cm}^2$ of ultrasound for 10 seconds. Images were observed before and after US.

ブルリポソーム及びルシフェラーゼ発現 pDNA を投与し、投与と同時に投与部位下流に体外から超音波照射を行った。その2日後に超音波照射部位の血管を回収し、ルシフェラーゼ活性測定を行った。その結果、バブルリポソームと超音波の併用において高いルシフェラーゼ活性が認められた。また、この遺伝子発現はリポフェクタミン 2000 を用いた既存のリポフェクション法より高く、バブルリポソームと超音波の併用が優れた非ウイルスベクター遺伝子

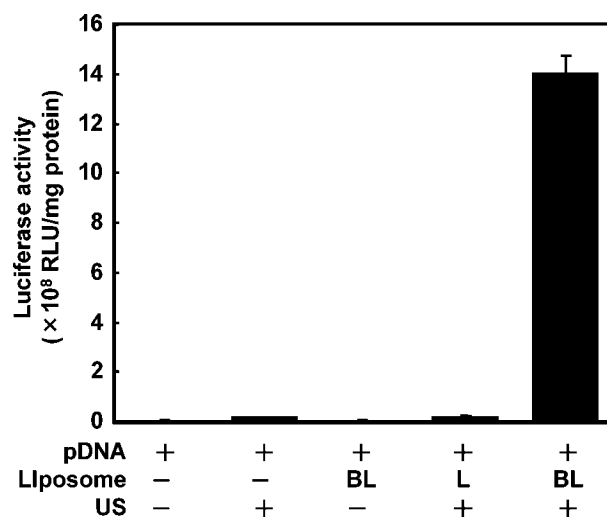


Fig. 7. Luciferase Expression in COS-7 Cells Transfected with Bubble Liposomes and Ultrasound Exposure

COS-7 cells (1×10^5 cells/500 ml/tube) were mixed with pCMV-Luc (5 mg) and Bubble liposomes (60 mg). The cell mixture was exposed with ultrasound (frequency: 2 MHz, duty: 50%, burst rate: 2 Hz, intensity: $2.5 \text{ W}/\text{cm}^2$, 10 sec). The cells were washed and cultured for 2 days. After that, luciferase activity was determined. Each data represents the mean \pm S.D. ($n=3$).

導入システムになり得ることが示された。さらに、バブルリポソームと超音波の併用による遺伝子導入では、超音波を照射した部位のみに遺伝子発現を誘導することが可能であることも明らかとなった。

バブルリポソームとルシフェラーゼ発現 pDNA をマウス尾静脈より投与し、直ちに心臓部位又は肝臓部位に対して体外から超音波照射を行った (Fig. 9)。2日後にルシフェラーゼのバイオイメージング撮影と超音波照射部位の心臓又は肝臓を回収し、ル

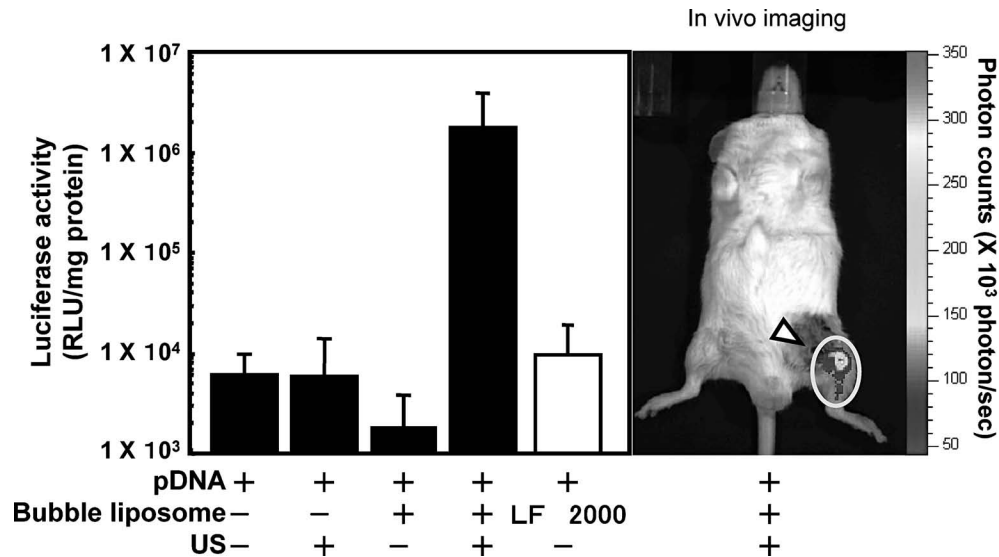


Fig. 8. Gene Delivery to Femoral Artery with Bubble Liposomes

Each samples containing plasmid DNA 10 mg were injected into femoral artery. In the same time, ultrasound (frequency: 1 MHz, duty: 50%, burst rate: 2 Hz, intensity: 1 W/cm², time 2 minutes) was exposed to the downstream area of injection site. (Left) Luciferase expression in femoral artery of the ultrasound exposure area at 2 days after transfection. Data are shown as means \pm S.D. ($n=5$). (LF2000: Lipofectamine 2000). (Right) *In vivo* luciferase imaging at 2 days after transfection in the mouse treated with plasmid DNA, Bubble liposomes and ultrasound exposure. The photon counts are indicated by the pseudo-color scales. Arrowhead shows injection site and circle shows ultrasound exposure area.

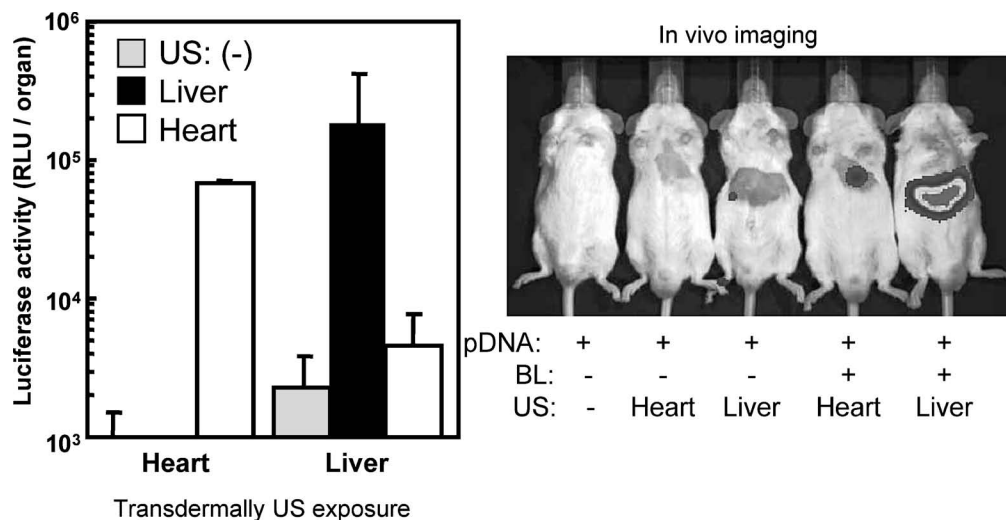


Fig. 9. Minimally Invasive Gene Delivery to Heart or Liver with Bubble Liposomes

Mixture of Bubble liposomes 250 mg and plasmid DNA 10 mg were injected into mouse tail vein. In the same time, ultrasound (frequency: 1 MHz, duty: 50%, burst rate: 2 Hz, intensity: 1 W/cm², time 1–2 minutes) was transdermally exposed to heart or liver. (Left) Luciferase expression in heart or liver of the ultrasound exposure area at 2 days after transfection. (Right) *In vivo* luciferase imaging at 2 days after transfection in the mouse treated with plasmid DNA, Bubble liposomes and ultrasound exposure.

シフェラーゼ活性測定を行った。その結果、超音波照射部位、つまり心臓又は肝臓において高いシフェラーゼ発現が認められた。

このように、バブルリポソームと超音波の併用により血管に効率よく遺伝子導入できたのは、血流が存在し血管内皮細胞と pDNA の接触時間が十分に得られない状況でも、バブルリポソームは超音波照射により瞬時に遺伝子を細胞内に導入できたため

あると考えられた。また、この遺伝子発現は超音波照射部位のみで誘導され、本遺伝子導入法を用いることで部位特異的な遺伝子発現を比較的簡単に確認できると期待される。

5. 今後の展望

本稿では、バブルリポソームの超音波造影剤としての可能性や遺伝子導入に関する研究を紹介した。冒頭でも述べたようにバブルリポソームはリポソーム

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。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。

また、本方法で発生するキャビテーションエネルギーを利用して効率よく細胞に遺伝子導入可能であることが明らかとなった。本方法は細胞外の物質を細胞質内に直接導入可能であるため、細胞質内にターゲットが存在する siRNA に対して理想的な導入ツールになると期待される。そこで実際に筆者らはバブルリポソームと超音波の併用による siRNA 導入を検討したところ、標的遺伝子に対する配列特異的な発現抑制効果を誘導できることを確認している。また、本方法の細胞内への細胞外物質導入特性を利用して低分子量の抗がん剤などの細胞内薬物送達を検討したところ、細胞内への薬物導入効率の向上も認められた。このように、バブルリポソームと超音波の併用は、様々な物質を細胞内に容易に導入可能な方法として幅広く利用できる。したがって、リポソーム技術と超音波技術の融合は、低侵襲かつ組織特異的な遺伝子・薬物送達ツールとして次世代の DDS 製剤を担う新たな技術として捉えられる。

最近では、超音波装置の小型化・高性能化により、ベッドサイドでの超音波診断・治療が益々普及すると考えられる。しかしながら、現在の超音波造影用マイクロバブルはサイズ・安定性・標的指向性付与の点で数多くの課題を有している。超音波診断・治療装置の完成度が高くても、それらと併用するバブル製剤が最適化されていなければ、超音波を用いた医療の進展はないといっても過言ではない。すなわち超音波診断・治療の発展は、優れた超音波診断・治療剤となるバブル製剤の開発に掛かっている。それゆえ、今回紹介したような特性を有するバブルリポソームが、次世代型バブル製剤として超音波診断のみならず超音波治療・DDS ツールに利用され、新たな医療システム構築に貢献できることを

期待したい。

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、研究遂行にご協力いただいた学生諸子に深謝する。また、本研究遂行においてご協力いただ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、防衛医科大学校・萩沢康介博士、福岡大学医学部・立花克郎先生、ネッパジーン㈱・早川靖彦氏、山内貴博氏、鈴木孝尚氏に深謝する。さらに、本研究は NEDO：産業技術研究助成（04A05010）、厚労省科研費：萌芽の先端医療技術推進研究（17070301）、文科省科研費：萌芽研究（16650126）、若手研究（160700392）の研究助成により遂行された研究であり心より謝意を表する。

REFERENCES

- 1) Mitragotri S., Blankschtein D., Langer R., *Science*, **269**, 850–853 (1995).
- 2) Tachibana K., *Pharm. Res.*, **9**, 952–954 (1992).
- 3) Tachibana K., Koga E., *Ketsueki to Miyatsukan*, **12**, 450–453 (1981).
- 4) Tachibana K., Tachibana S., *Jpn. J. Appl. Phys.*, **38**, 3014–3019 (1999).
- 5) Greenleaf W. J., Bolander M. E., Sarkar G., Goldring M. B., Greenleaf J. F., *Ultrasound Med. Biol.*, **24**, 587–595 (1998).
- 6) Suzuki R., Takizawa T., Negishi Y., Hagiwara K., Tanaka K., Sawamura K., Utoguchi N., Nishioka T., Maruyama K., *J. Control. Release*, **117**, 130–136 (2007).
- 7) Suzuki R., Tanaka K., Sawamura K., Takizawa T., Utoguchi N., Negishi Y., Hagiwara K., Nishioka T., Maruyama K., “5th International Symposium on Therapeutic Ultrasound,” eds. by Clement G. T., McDannold N. J., Hynynen K., AIP Conference Proceeding, **829**, 568–572 (2005).
- 8) Lindner J. R., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, 527–532 (2004).
- 9) Mizuguchi H., Nakanishi T., Nakanishi M., Nakagawa T., Nakagawa S., Mayumi T., *Cancer Lett.*, **100**, 63–69 (1996).