

超音波を利用した部位特異的遺伝子デリバリーシステムの開発

鈴木 亮,^a 小田雄介,^a 生井栄佑,^a 滝澤知子,^a
根岸洋一,^b 宇都口直樹,^a 立花克郎,^c 丸山一雄^{*,a}

Development of Site Specific Gene Delivery System with Sonoporation

Ryo SUZUKI,^a Yusuke ODA,^a Eisuke NAMAI,^a Tomoko TAKIZAWA^a

Yoichi NEGISHI,^b Naoki UTOGUCHI,^a Katsuro TACHIBANA,^c and Kazuo MARUYAMA^{*,a}

^aDepartment of Biopharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, 1091-1 Suwarashi, Sagamiko-cho, Sagami-hara City 229-0195, Japan, ^bDepartment of Drug and Gene Delivery System, Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, 1432-1 Horinouchi, Hachioji City 192-0392, Japan, and ^cDepartment of Anatomy, School of Medicine, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

(Received September 18, 2007)

In gene therapy, it is important to develop an effective and safe gene delivery system. Especially, from the viewpoint of reducing side effects, gene delivery into a specific site is essential. We previously, developed liposomal bubbles (Bubble liposomes) containing perfluoropropane. Bubble liposomes were useful as ultrasound enhanced gene delivery tools *in vitro* and *in vivo*. In this review, we introduced the characteristics of Bubble liposomes as ultrasound imaging agents and ultrasound enhanced gene delivery tools. Bubble liposomes worked as ultrasound imaging agents in cardiosonography. In addition, their combination with ultrasound exposure was able to deliver plasmid DNA in the femoral artery. The gene expression was only observed at the site of ultrasound exposure. Moreover, the gene delivery by Bubble liposomes and ultrasound exposure was more efficient than that by conventional lipofection method using Lipofectamine 2000. Therefore, it was suggested that Bubble liposomes might be a new class of tools for site specific gene delivery.

Key words—sonoporation; gene delivery; ultrasound; liposome; cardiosonography

1. はじめに

遺伝子治療は、先天性の遺伝子疾患やがんの新しい治療法として期待されている。これまでに行われてきた遺伝子治療では、遺伝子導入効率の観点から、アデノウイルスやレトロウイルスなどのウイルスベクターが利用されてきた。しかしながら、ウイルスベクターに関して安全性の面で危惧する報告がなされている。^{1,2)} そのような観点から、安全性が高く、容易に利用できる非ウイルスベクターが注目を集めている。一方で、非ウイルスベクターの遺伝子

導入効率は一般的に低いと、この問題を解決可能な新規遺伝子導入ツールの開発が望まれている。さらに、いずれのベクターにおいても遺伝子導入部位を簡易的にコントロールすることは困難であるとされている。有効性が高く、副作用の少ない遺伝子治療を行っていくためには、目的部位特異的に安全かつ効率よく遺伝子導入可能なシステムの構築が求められている。

近年、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の技術が注目されている。³⁻⁶⁾ さらに、この超音波エネルギー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る。^{6,7)} 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

^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 1091-1）、^b東京薬科大学薬学部薬物送達学教室（〒192-0392 八王子市堀ノ内 1432-1）、^c福岡大学医学部解剖学講座（〒814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1）

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

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウムS6で発表したものを中心に記述したものである。

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.⁸⁻¹⁰⁾ 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, このバブルリポソームと超音波の併用による部位特異的遺伝子導入に関する基礎研究について紹介するとともに今後の展望について論ずる.

2. 超音波造影剤としてのバブルリポソーム

バブルリポソームは 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することで調製される (Fig. 2). このバブルリポソーム懸

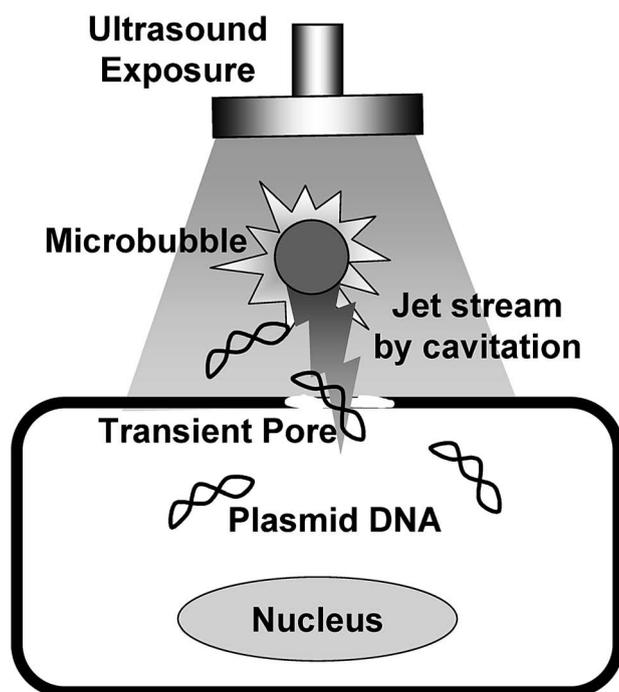
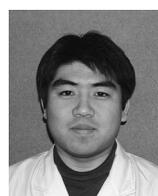


Fig. 1. Mechanism of Gene Delivery by the Combination of Microbubbles and Ultrasound

濁液は白濁しており, しばらく静置するとマイクロバブル同様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. 封入されているパーフルオロプロパンは超音波造影における高輝度ガスであるため, バブルリポソームは超音波造影剤としても利用可能であると考えられる. そこで, バブルリポソームのエコーシグナル増強効果を評価するため, バブルリポソームの超音波造影を行った. 水槽中のゴムチューブ内にバブルリポソーム懸濁液を注入し, 水槽外から超音波診断装置 [UF-750XT (9 MHz), フクダ電子] を用いバブルリポソームの超音波造影を行った (Fig. 2). なお, 今回はコントロールとしてガス未封入の PEG-リポソームの超音波造影も行った. その結果, ガス未封入の PEG-リポソームでは陰画像 (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た. このことから, バブルリポソームが超音波造影における造影剤として機能し得るものと考えられた. そこで, バブルリポソームの *in vivo* における超音波造影剤としての可能性を評価した (Fig. 3). 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. このことから, バブルリポソームは超音波造影剤として臨床応用可能になるものと期待される.

3. バブルリポソームと超音波の併用による *in vitro* 遺伝子導入

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. 4). バブルリポソームに診断用超音波とは異なる治療用に用いられている周波数の超音波を照射



鈴木 亮

帝京大学薬学部助教・薬学博士 (大阪大学) 「リポソームテクノロジーを基盤とする DDS とがん免疫療法の構築」をテーマに我々が開発したバブルリポソームと超音波の併用による新たな DDS 技術の構築を目指して研究を進めている.

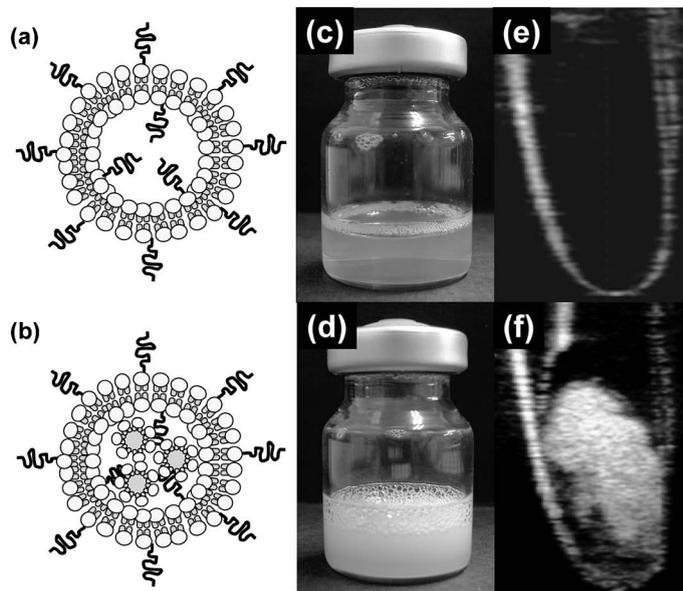


Fig. 2. PEG-liposomes and Bubble Liposomes

Schema of PEG-liposomes (a) and Bubble liposomes (b). And aspects of PEG-liposomes (c) and Bubble liposomes (d). PEG-liposomes sonicated with perfluoropropane gas became to Bubble liposomes in the vial. Ultrasonographic images of PEG- liposomes (e) and Bubble liposomes (f).

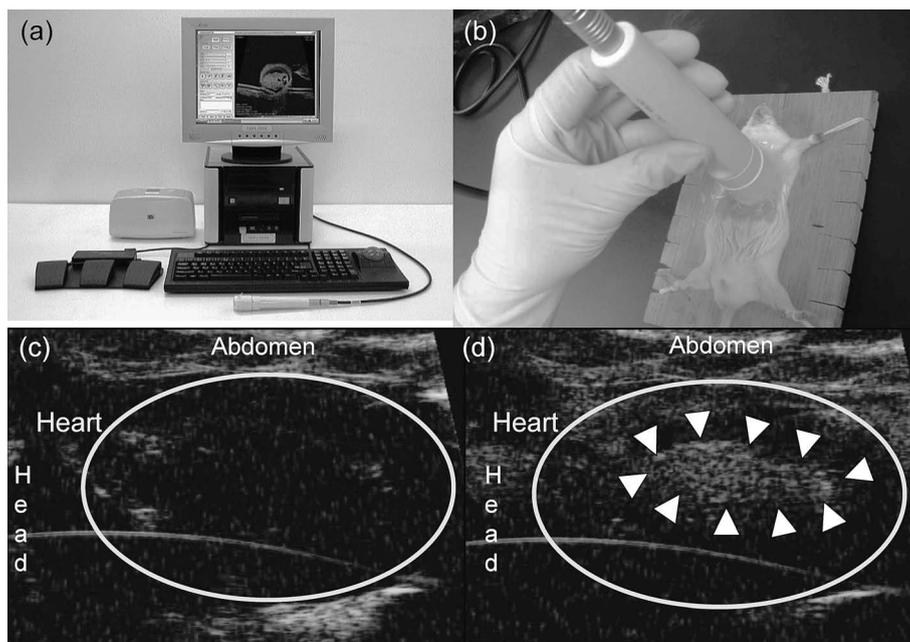


Fig. 3. Cardiosonography with Bubble liposomes

Ultrasound imaging system (NP60R-UBM [NEPAGENE]) (a) and its probe (35 MHz) (b). Mouse was scanned with the probe of ultrasonography before (c) or after (d) injection of Bubble liposomes ($100 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) into tail vein. Circle shows heart and triangle shows enhanced echo signals.

し、そのときのバブルリポソームの崩壊を肉眼及び超音波造影装置により観察した。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バブルリポソームの崩壊が確認された。次に、このバブルリポソームの崩

壊におけるエネルギーを利用した培養細胞への超音波遺伝子導入を試みた (Fig. 5)。細胞、バブルリポソーム及びルシフェラーゼ発現プラスミド DNA (pDNA) を混合し、すぐに超音波照射を行った。細胞を洗浄し、2日間細胞を培養したのち、ルシフェラーゼ活性を測定した。pDNA 単独、pDNA に

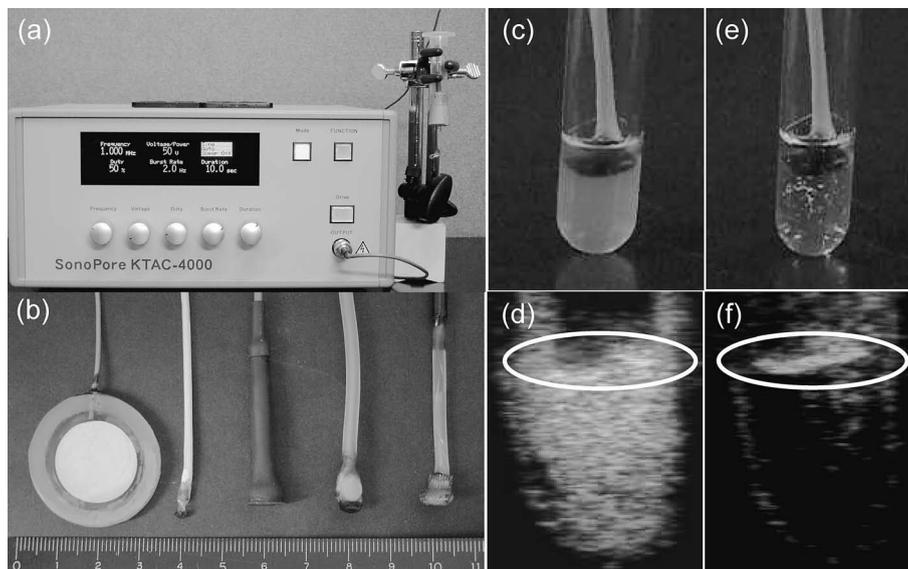


Fig. 4. Disruption of Bubble Liposomes Exposed to Ultrasound

Ultrasound generator (KTAC-4000 [NEPAGENE]) (a) and their probes (b). Naked (c, e) and ultrasonographic (d, f) images of Bubble liposomes. Ultrasonic probe (circle) positioned in Bubble liposome suspension exposed with ultrasound. Images were observed before (c, d) and after US (e, f).

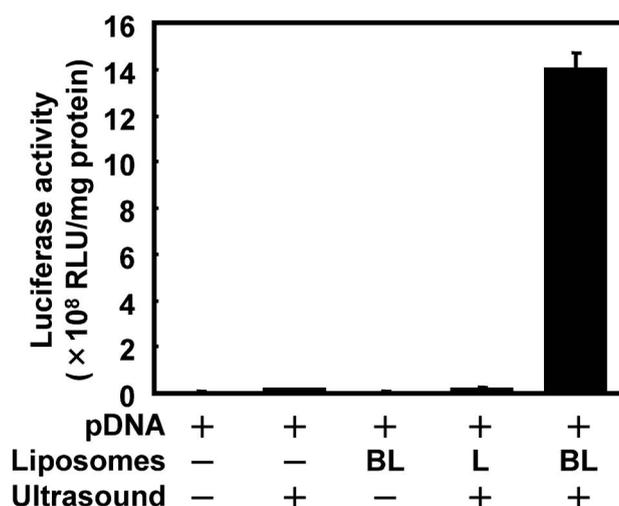


Fig. 5. Luciferase Expression in COS-7 Cells Transfected by Ultrasound with Bubble Liposomes

COS-7 cells (1×10^5 cells/500 μ l) mixed with pCMV-Luc (5 μ g) and Bubble liposomes (60 μ g) were exposed to ultrasound (frequency, 2 MHz; Duty, 50%; burst rate, 2Hz; intensity, 2.5 W/cm²; time 10 seconds). The cells were washed and cultured for 2 days and then luciferase activity was measured. Data are shown as means \pm S.D. ($n=3$). BL: Bubble liposomes, L: PEG-liposomes.

超音波照射した通常のソノポレーション、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に比べ、pDNAとバブルリポソームを混合し超音波照射した群において、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、データには示していないが、超音波照射をたった1秒間だけ行った場合でも細胞内に遺伝子導入可能であることを確認しており、本方法が瞬時に遺伝子導入を完了しているものと考えられた。

さて、一般的に既存のカチオニックリポソームを用いたりポフェクション法では、培養細胞に対する遺伝子導入効率は高いものの、*in vivo*に適用すると途端に遺伝子導入活性が消失してしまい*in vivo*遺伝子導入に不向きであることが知られている¹¹⁾。

これはカチオニックリポソームと血清や生体由来タンパク質などの相互作用に起因すると考えられている。一方、バブルリポソームは血清との相互作用の少ないPEG-リポソームから調製されているため、血清の影響を受けることなく遺伝子導入可能なツールであると考えられる。そこで、バブルリポソームによる超音波遺伝子導入の血清存在下での*in vitro*培養細胞に対する遺伝子導入効率について評価した。その結果、バブルリポソームと超音波の併用による遺伝子導入は、血清添加の影響を全く受けないことが明らかとなった⁸⁾ (data not shown)。

このことより、本方法が *in vivo* 遺伝子導入にも利用できるものと期待される。

4. バブルリポソームと超音波の併用による *in vivo* 遺伝子導入

一般的に既存の非ウイルスベクターでは血流の存在により血管内皮細胞への遺伝子導入が困難とされている。これは血管内皮細胞とベクターの接触時間が極めて短いことに起因する。それゆえ、血管内皮細胞への遺伝子導入の場合、瞬時に遺伝子導入可能なデリバリーシステムが必要になる。第3項で示したように、バブルリポソームと超音波の併用による遺伝子導入は瞬時に遺伝子導入可能である上、血清の影響を受けないことから、血管内皮細胞への遺伝子導入に適した方法であると期待される。そこで、実際に本方法を用いたマウスの下肢動脈への遺伝子導入を試みた (Fig. 6).⁸⁾ マウス下肢動脈の上流からバ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。このように、既存の非ウイルスベクターでは遺伝子導入が困難であった部位に対しても、本遺伝子導入法を用いることで部位特異的な遺伝子導入が可能になるものと期待される。

5. おわりに

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。特に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な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。今回はデータに示していないが、われわれはバブルリポソームと pDNA を固形がん組織の腫瘍支配動脈から投与し、固形がん部分に超音波照射することでがん組織特異的に遺伝子を導入することに成功した。さらに、バブルリポソームと pDNA をマウスの尾静脈

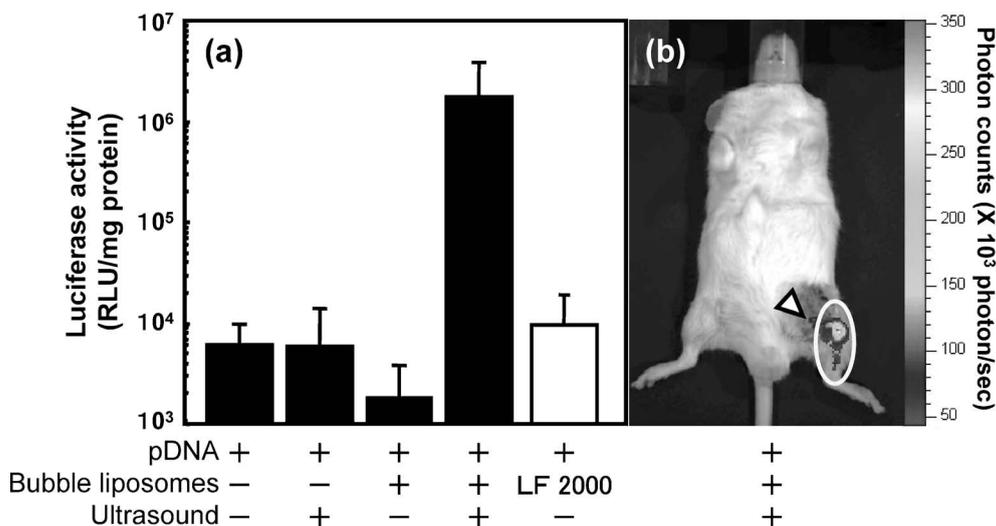


Fig. 6. Gene Delivery to Femoral Artery with Bubble Liposomes

Each sample containing plasmid DNA 10 μ g was 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. (a) Luciferase expression in femoral artery of the ultrasound exposure area at 2 days after transfection, Luciferase expression was measured. Data are shown as means \pm S.D. ($n=5$). (LF2000: Lipofectamine 2000). (b) *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.

から全身投与し、体外から心臓や肝臓に向けて超音波照射することで超音波照射組織特異的に遺伝子導入可能であることも見い出している。このように、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。

さて、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。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、単に細胞に様々な物質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。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・超音波遺伝子導入ツールに利用され、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頂いた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、ネッパジーン(株)・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：萌芽的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) Check E., *Nature*, **420**, 595 (2002).
- 2) Marshall E., *Science*, **286**, 2244–2245 (1999).
- 3) Mitragotri S., Blankschtein D., Langer R., *Science*, **269**, 850–853 (1995).
- 4) Tachibana K., *Pharm. Res.*, **9**, 952–954 (1992).
- 5) Tachibana T., Koga E., *Ketsueki to Myakkan*, **12**, 450–453 (1981).
- 6) Tachibana T., *Geka*, **62**, 1696–1700 (2000).
- 7) Greenleaf W. J., Bolander M. E., Sarkar G., Goldring M. B., Greenleaf J. F., *Ultrasound Med. Biol.*, **24**, 587–595 (1998).
- 8) 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).
- 9) Yamashita T., Sonoda S., Suzuki R., Arimura N., Tachibana K., Maruyama K., Sakamoto T., *Exp. Eye Res.*, **85**, 741–748 (2007).
- 10) Suzuki R., Takizawa T., Negishi Y., Utoguchi N., Sawamura K., Tanaka K., Namai E., Oda Y., Matsumura Y., Maruyama K., *J. Control. Release* (2007) (in press).
- 11) Mizuguchi H., Nakagawa T., Nakanishi M., Imazu S., Nakagawa S., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **218**, 402–407 (1996).