

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ボ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。¹⁻³⁾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。⁴⁻¹¹⁾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嵐 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。

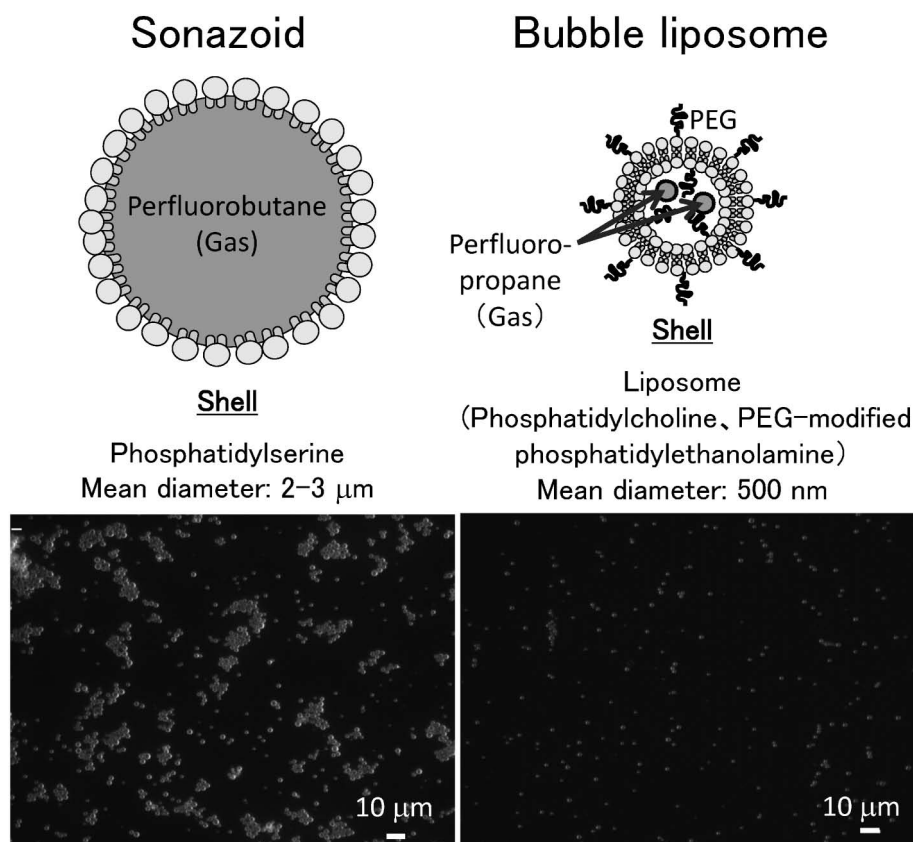


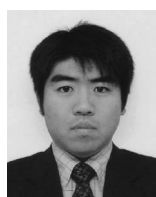
Fig. 1. Comparison of Sonazoid and Bubble Liposome
Scheme (upper) and microscope ($\times 400$) (lower)

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 Fehcheimer らによる報告から始まった。¹²⁾ 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ョ



鈴木 亮

帝京大学薬学部生物薬剤学教室講師。博士(薬学)。1973年神奈川県生まれ。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/cm²) 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。¹³⁾ 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。

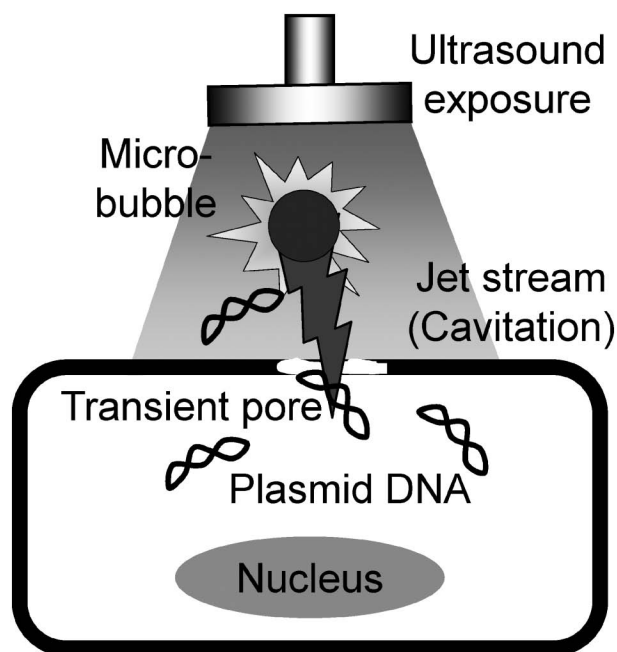


Fig. 2. Mechanism of Gene Delivery into Cell by Microbubble and Ultrasound Exposure

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 **Albunex**, 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とパーフルオロプロパンを封入した **PES-DA**, パルミチン酸を含むガラクトース結晶複合体からなる **Levovist**, 脂質膜中にパーフルオロプロパンを封入した **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。¹⁴⁾ 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)。¹¹⁾ 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

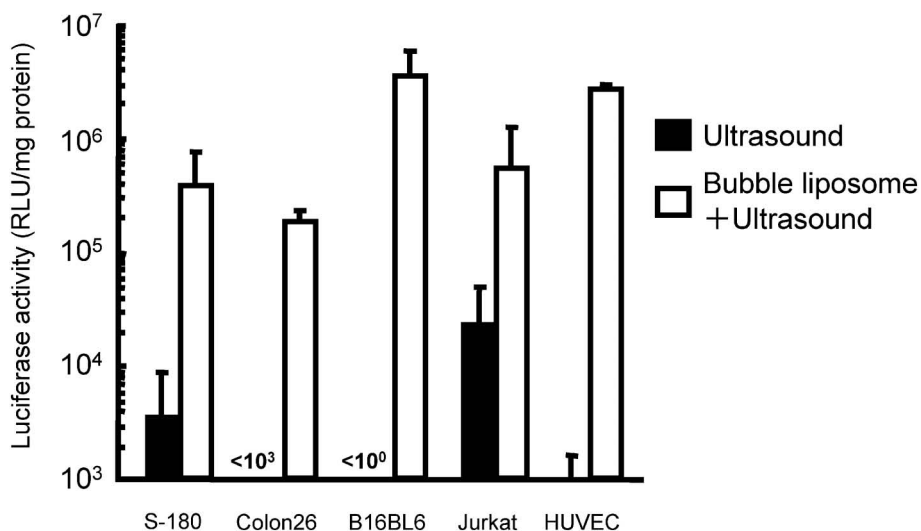


Fig. 3. Gene Delivery by Bubble Liposome and Ultrasound Exposure *in vitro*

Cells (1×10^5 cells/500 μ l) mixed with pCMV-Luc (5 μ g) and Bubble liposomes (60 μ g) were exposed or not to ultrasound (frequency, 2 MHz; duty, 50%; burst rate, 2 Hz; intensity, 2.5 W/cm²; 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.

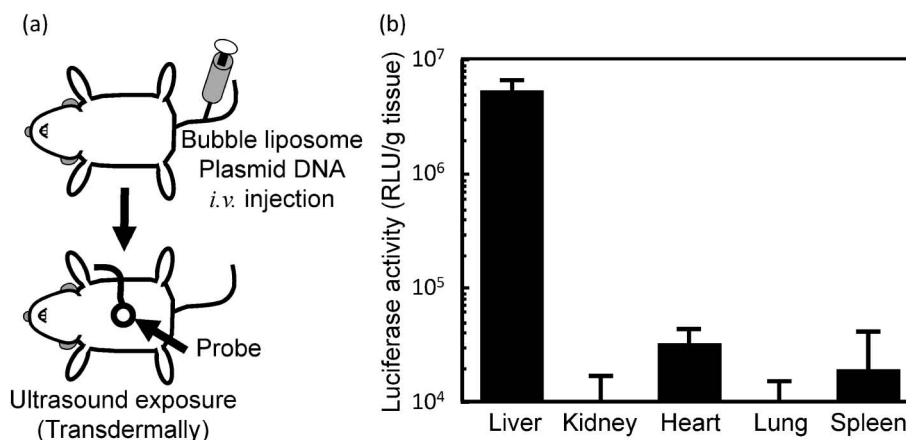


Fig. 4. Liver Specific Gene Delivery by Bubble Liposomes and Ultrasound Exposure

(a) Gene delivery method: Luciferase coded plasmid DNA (100 μ g) and Bubble liposomes (500 μ g) were intravenously injected and ultrasound (1 MHz, 1 W/cm², 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

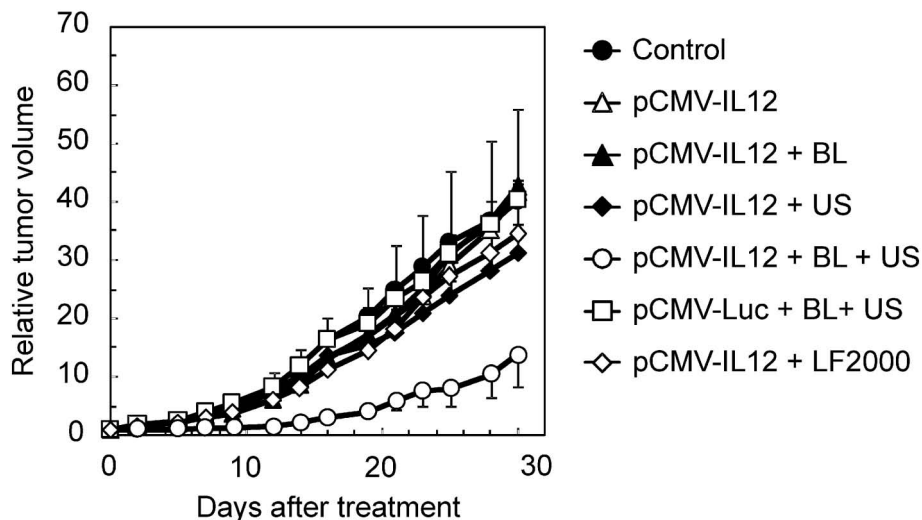


Fig. 5. Cancer Gene Therapy in Gene Delivery by Bubble Liposomes and Ultrasound Exposure

B6C3F1 mice were intradermally inoculated with 1×10^6 OV-HM cells into the flank. After 7 days of tumor inoculation, the tumors were injected with pCMV-IL12 (10 μ g) using Bubble liposomes (2.5 μ g) and/or ultrasound (1 MHz, 0.7 W/cm², 1 min), or Lipofectamine 2000 as a conventional lipofection method. The volume of the growing tumors was calculated by: (tumor volume; mm³) = (major axis; mm) \times (minor axis; mm)² \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。⁷⁾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。⁴⁾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ティングやアクティブターゲティ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ティ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深謝する。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・工藤信樹先生に深謝する。さらに、本研究の一部は厚労省科研費：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., Uchimaru 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) Fechheimer M., Boylan J. F., Parker S., Sicken 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).