

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 25 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24790173

研究課題名(和文) 低分子核酸搭載ナノバブルと高密度収束超音波併用による脳血管障害治療システムの開発

研究課題名(英文) Combination of nucleic acid-loaded Bubble liposomes and high-intensity focused ultrasound for therapy of cerebrovascular accident

研究代表者

高橋 葉子(遠藤葉子)(Endo-Takahashi, Yoko)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：30453806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微小気泡(ナノバブル)の脳血管障害の診断・治療ツールへの応用を目的に、ペプチド修飾による標的指向性、さらに治療用核酸の搭載をも可能とした超音波造影ガス封入リポソームの開発を行った。脳組織へ集積性を有するペプチドをナノバブル表面に修飾し、その修飾率や組成の最適化をすることで、核酸搭載ナノバブルへの脳組織指向性の付与に成功した。さらに、脳組織におけるペプチド特異的な造影輝度の上昇、遺伝子導入効果の向上も確認された。その導入効果は超音波照射部位に限局しており、高密度収束超音波の有用性も示唆された。本法は、疾患部位以外への影響を抑えた脳血管障害治療の有用なツールになり得るものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We have previously developed polyethylene glycol-modified liposomes (Bubble liposomes [BLs]) that entrap ultrasound (US) contrast gas and can serve as both nucleic acids carriers and US contrast agents. In this study, we attempted to prepare nucleic acid-loaded and brain-targeting BLs modified with Angiopep-2 (Ang2) peptide. Ang2 is expected to be a useful ligand for the efficient delivery of nanocarriers to the brain. We showed that nucleic acid-loaded BLs modified with Ang2 accumulated in brain tissue after intravascular injection. We also confirmed that above-mentioned BLs could enhance the intensities of US imaging in brain tissue and the effects of pDNA transfection to the US exposed area of the brain. These results suggested that Ang2-BLs may be a useful therapeutic and diagnostic tool for cerebrovascular accident.

研究分野：医歯薬学

キーワード：超音波 リポソーム ペプチド 脳

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害は、日本人の死因の中でも、癌、心疾患に次いで多く、そのうち約7割を脳梗塞が占めており、死に至らずとも麻痺や言語障害、意識障害などの後遺症が残る可能性の高い疾患である。脳梗塞の有用な新規治療法の一つとして、遺伝子治療の研究も近年盛んに進められているが、組織への効果的なデリバリーツールの開発が必要不可欠とされている。そこで本研究において着目したのが、超音波エネルギーを利用した細胞内導入法である。これまでに我々は、臨床で用いられる超音波造影ガスを PEG-リポソームに封入したナノサイズのバブル製剤(バブルリポソーム)を開発し、超音波照射との併用により、超音波造影効果のみならず、pDNA、siRNA の導入効果を有することを明らかとしている。さらに、負電荷をもつ pDNA や siRNA をその表面に搭載したカチオン性脂質含有バブルリポソームの開発にも成功している。これは核酸の生体内での安定性を向上させるのみならず、バブルリポソームとの生体内挙動が一致することで導入の更なる効率化が期待されるものである。疾患部位への核酸の送達量をさらに向上させることができれば、より高い治療効果が期待できる。そこで本研究では、低分子核酸をカチオン性脂質含有バブルリポソームに搭載させるのみならず、さらに、バブルリポソームをペプチドで修飾することで、疾患部位へ集積する新規バブル製剤の開発を試みる。また、併用する超音波を高密度収束超音波(HIFU)とすることで、照射エリアが限局されることから、疾患部位以外への傷害性を抑えた低侵襲的な核酸導入法となり得る。

2. 研究の目的

これまでに pDNA、siRNA の細胞内導入ツールとしての有用性を示してきたカチオン性脂質含有超音波造影ガス封入リポソームを基本に、ペプチド修飾により脳組織への集積性を付与した新規ナノバブルの開発を行う。また、治療用核酸として、近年明らかにされつつある新生血管を誘発可能な miRNA (miR-126) に着目し、miRNA 搭載ナノバブルによる脳梗塞の低侵襲性超音波診断治療システムの構築を目指す。即ち、核酸搭載ナノバブルを投与後、診断用超音波により核酸の血管閉塞部への集積を確認し、同時に治療用超音波により miRNA を導入することで、虚血部位での血管新生誘発に伴う血流改善が可能となる。

そこで、miR-126 の虚血性疾患に対する治療効果を評価するとともに、調製したナノバブルの脳組織における超音波造影効果、さらに核酸導入効果を評価する。その際に併用する超音波を HIFU とすることで、標的組織以外への影響を最小限とした脳血管障害治療システムへの応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 核酸搭載ペプチド修飾バブルリポソームの調製

カチオン性脂質含有バブルリポソームの調製

基本脂質に DSPC、カチオン性脂質(DSTAP、DSDAP、DDAB より1種)さらに PEG 脂質として DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe、あるいは鎖長の異なる DSPE-PEG₇₅₀-OMe を使用し、種々の組成、調製溶媒で REV 法によりリポソームを調製した。また、細胞との相互作用、あるいは *in vivo* における組織集積性を評価する際には、蛍光脂質として DiI を含有させたりリポソームを調製した。調製した各リポソームに超音波造影ガス(パーフルオロプロパン)を封入することで、ペプチド未修飾バブルリポソーム(PEG-BLs)とした。その粒子径およびゼータ電位は、NICOMP 380ZLS を用いて測定した。

ペプチド修飾バブルリポソームの調製

ペプチドを修飾する際には、の脂質の他に DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal を使用し、PEG 鎖末端のマレイミド基とペプチド末端のシステインを反応させ、ペプチド修飾リポソームを調製後、余剰のペプチドはゲルろ過にて除去した。また反応の終了は TLC により確認した。修飾ペプチドとして、脳組織への集積性が報告されている Angiopep-2、コントロールペプチドとして Angiopep-7 を用いた。ペプチド修飾リポソーム(Ang2-lipo、Ang7-lipo)に、上述と同様に超音波造影ガスを封入することでペプチド修飾バブルリポソーム(Ang2-BLs、Ang7-BLs)とした。

バブルリポソームと核酸の相互作用

各種バブルリポソームと FITC 標識 pDNA、あるいは miRNA を添加、混合後、調製 Buffer で希釈し、フローサイトメトリーにより評価した。

(2) 各種カチオン性脂質含有バブルリポソームによる導入効果の評価

下肢虚血モデルの作製法

ICR マウス(5週齢、)の左大腿動脈を結紮、切除し、切開した皮膚を外科縫合糸を用いて縫合した。虚血処置の10日後、自然回復が停止し、虚血が慢性化したマウスを下肢虚血モデルとした。

なお、動物実験に関しては、所属機関における指針に基づき、動物実験委員会に申請し、承認を受けた後、ヘルシンキ宣言に基づき動物愛護の精神を遵守しつつ行った。

下肢虚血モデルにおける遺伝子導入効果

3種の異なるカチオン性脂質含有バブルリポソームの導入効果について比較検討するため、Luciferase をコードした pcDNA3-Luc を搭載させた各バブルリポソームを下肢虚血モデルの尾静脈へ投与し、虚血部位へ超音波照射(Frequency: 1 MHz, Duty: 50%, Burst rate: 2.0 Hz, Intensity: 1.0 W/cm², Time: 2 min)を行った。2日後、超音波照射部位の筋組織を回収し、Luciferase 活性を測定した。

下肢虚血モデルにおける遺伝子治療効果
疾患モデルマウスに対する治療効果を評価
するため、虚血処置 10 日後と 12 日後の 2 回、
(2) と同様の条件で、bFGF をコードし
た pBLAST-hbFGF の虚血筋組織への導入を
試みた。レーザードップラー血流計を用いて
虚血部位の血流測定を定期的に行い、さらに
2 回目の導入から 4 日後、超音波照射部位の
筋組織を回収し、リアルタイム PCR により、
各種血管新生促進因子への影響について検討
した。

(3) miR-126 導入効果の検討

in vitro における導入効果

血管新生制御因子に対する miR-126 の導入
効果について検討するため、ヒト臍帯静脈内
皮細胞 (HUVEC) への miRNA の導入を行っ
た。48well プレートに HUVEC を播種し、1
日培養後、バブルリポソームおよび miR-126、
あるいはコントロール miRNA を 10% FCS 含
有培地で希釈、混合し、各 well に添加した。
その後、速やかに超音波照射 (Frequency: 2
MHz, Duty: 50%, Burst rate: 2.0 Hz, Intensity:
2.0 W/cm², Time: 10 sec.) (SONOPORE
KTAC-3000; NEPA GENE, CO. LTD) を行っ
た。無血清培地にて細胞を 2 回洗浄し、余剰のバ
ブルリポソームと miRNA を除去した。3 日間
培養後に細胞を回収し、リアルタイム PCR により
細胞内の miR-126 レベル、ウェスタンブ
ロット法により VEGF シグナル活性化への影
響について検討した。

下肢虚血モデルにおける miR-126 導入に伴
う治療効果

疾患モデルマウスに対する治療効果を評価
するため、虚血処置 10 日後と 12 日後の 2 回、
(2) と同様の条件で、miR-126 の虚血筋
組織への導入を試みた。レーザードップラー
血流計を用いて虚血部位の血流測定を定期的
に行い、さらに 2 回目の導入から 7 日後、超
音波照射部位の筋組織を回収し、リアルタイム
PCR により、各種血管新生促進因子への影
響について検討した。

(4) ペプチド修飾リポソーム、バブルリポ ソームの標的指向性評価

細胞との相互作用評価

脳血管内皮細胞 (bEnd.3 細胞) に対し、
Ang2-lipo、Ang7-lipo、あるいは Ang2-BLs、
Ang7-BLs を反応させ、フローサイトメトリー
により評価した。また、阻害実験を行う際
には、抗 LRP-1 抗体を前処理したうえで、各製
剤を反応させた後、同様にフローサイトメト
リーにて評価した。

脳組織への集積性評価

ICR マウス (5 週齢、) の尾静脈より各
バブルリポソームを投与し、10 分後、脳・肺・
心臓・肝臓・脾臓を回収し、*in vivo* イメージ
ング装置 (Maestro) により解析を行った。さら
に、脳組織は凍結切片とし、蛍光顕微鏡に
より冠状断面の観察を行った。

(5) 脳組織における超音波造影効果

超音波造影剤としての有用性について検討
するため、ICR マウス (5 週齢、) の尾静
脈より各種バブルリポソームを投与し、超音
波診断装置 Aplio (東芝) を用いて脳の超音波
イメージングを行った。

(6) 脳組織への遺伝子導入効果

各種ペプチド修飾バブルリポソームと
HIFU 併用による脳への遺伝子導入方法の条
件検討のため、pcDNA3-Luc を搭載させた各
バブルリポソームを ICR マウス (5 週齢、)
の尾静脈より投与し、速やかに体外より左脳
に対して HIFU 照射 (Frequency: 3 MHz, Duty:
10-30%, Intensity: 1.0-1.5 kW/cm², Time: 30-60
sec) を行った。1 日後に大脳を回収し、超音波
照射をした左脳と、照射していない右脳に分
け、それぞれ Luciferase 活性を測定した。導
入に伴う傷害性については、回収時に脳出血
の有無を確認した。

4. 研究成果

(1) 3 種の異なるカチオン性脂質含有バブ
ルリポソームの虚血部位へのデリバリーツ
ールとしての有用性について、レポーター遺伝
子を用い、その導入効果について比較検討を
行った。その結果、DSDAP 含有バブルリポ
ソームにおいて最も高い導入効果が得られた
(Fig. 1)。さらに、DSDAP 含有バブルリポ
ソームに bFGF をコードした pDNA を搭載さ
せ、下肢虚血部位への遺伝子導入を試みた
ところ、各種血管新生因子の mRNA レベルの上
昇、および血流改善効果も認められた。

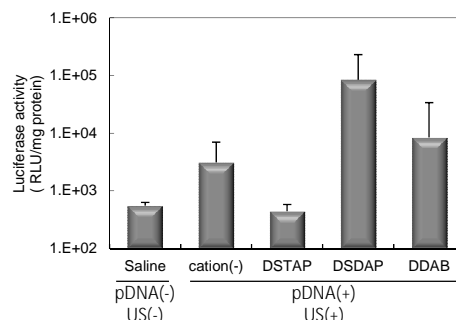


Fig. 1 Luciferase expression in ischemic muscle transfected with pDNA using pDNA-loaded BLs and US.

(2) DSDAP 含有バブルリポソームを用い
て miRNA の導入を行うにあたり、バブル表
面への搭載が可能であるか評価したところ、
pDNA および siRNA 同様に搭載が可能であ
ることが明らかとなった。次に、HUVEC への
miR-126 の細胞内導入を試みたところ、細胞
内 miR-126 レベルの上昇と、それに伴う
VEGF シグナルの活性化が認められた。これ
は既出の報告と同様に、miR-126 の血管新生
への影響を示唆するものであるが、これまで
に疾患モデルを用いた治療効果の報告はほと
んどない。そこでさらに、miR-126 による虚

血性疾患に対する治療効果を評価するため、作製法および核酸導入法を既に確立している下肢虚血モデルマウスを用いて検討を行った。その結果、各種血管新生因子の有意な上昇と血流改善効果が示された (Fig. 2)。

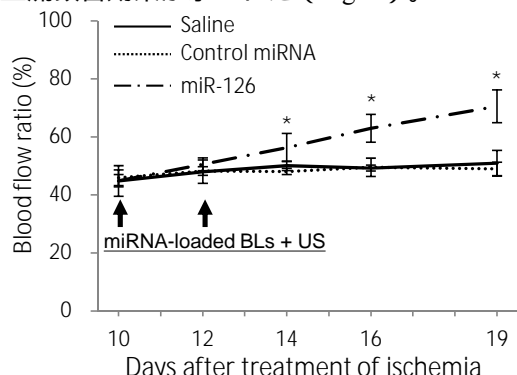


Fig. 2 The therapeutic effect of miR-126 transfer using miRNA-loaded BLs and US on the recovery of blood flow. *Statistically different from other groups ($p < 0.05$; one-way ANOVA and Tukey post hoc test).

(3) ペプチド修飾リポソームと bEnd.3 細胞との相互作用を指標に、リポソームの組成、調製溶媒、修飾率、修飾法などの最適化を行った。その結果を基に各種バブルリポソーム (PEG-BLs, Ang2-BLs, Ang7-BLs) を調製し、bEnd.3 細胞との相互作用を評価したところ、Ang2-BLs において相互作用の増大が認められた。さらに、この相互作用は、抗 LRP-1 抗体の前処理により、他の 2 種のバブルリポソームと同程度まで減弱したことから、ペプチド配列特異的に LRP-1 を介して相互作用していることが示唆された (Fig. 3)。また、これらのバブルリポソームを投与後の体内分布を評価したところ、Ang2-BLs 投与マウスにおいて、脳組織への高い集積性が示された。この集積性は、miRNA よりも分子サイズの大きい pDNA を表面に搭載した状態においても同様に認められた。

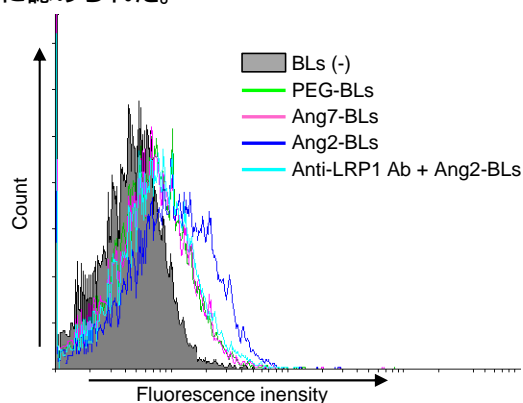


Fig. 3 Interaction of BLs modified with peptide with bEnd.3 cells.

(4) 脳組織における超音波造影効果について、3 種のバブルリポソームを比較検討したところ、Ang2-BLs 投与マウスの脳組織において、他の 2 種のバブルリポソーム投与マウス

と比較して、造影輝度の上昇と造影効果の持続が認められた。

(5) レポーター遺伝子を搭載させた各ペプチド修飾バブルリポソームをマウス尾静脈より投与し、併用する HIFU 照射の条件検討を行ったところ、脳出血などの傷害性を伴わず、Ang2-BLs 投与マウスにおいて、他の 2 種投与群と比較して、有意に高い遺伝子発現効果が認められる導入条件が得られた。その導入効果は、HIFU 照射を施した左脳に限局したものであり、疾患部位以外への影響を最小限に抑え得る HIFU の有用性も示唆された。

以上、核酸搭載ナノバブルの脂質組成の最適化、miR-126 導入による下肢虚血性疾患の治療効果、脳標的指向性ペプチド修飾ナノバブルの調製法について段階的に確認し、脳組織における超音波造影能、さらに HIFU 併用による遺伝子導入能を有する新規ナノバブルの開発に繋げることができた。しかしながら、本研究期間内においては、脳梗塞モデルを用いたナノバブルの集積性評価、miRNA 導入による治療効果の検討まで着手できなかった。Angiopep-2 が結合する LRP-1 は、脳梗塞部位周辺で発現が増強することも報告されている。今後上述の検討を進めることで、本研究において開発した新規ナノバブルの脳血管障害治療システムにおける有用性評価に繋がるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) Endo-Takahashi Y, Ooaku K, Ishida K, Suzuki R, Maruyama K, Negishi Y, Preparation of Angiopep-2 peptide-modified Bubble liposomes for delivery to the brain, *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 39, 2016 印刷中

(2) Endo-Takahashi Y, Negishi Y, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y, *Methods Mol. Biol.*, 査読有, 1372, 2016, 209-213, DOI: 10.1007/978-1-4939-3148-4_16.

(3) Endo-Takahashi Y, Negishi Y, Nakamura A, Ukai S, Ooaku K, Oda Y, Sugimoto K, Moriyasu F, Takagi N, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y, Systemic delivery of miR-126 by miRNA-loaded Bubble liposomes for the treatment of hindlimb ischemia, *Sci. Rep.*, 査読有, 4, 2014, 3883, DOI: 10.1038/srep03883.

(4) Endo-Takahashi Y, Negishi Y, Nakamura A, Suzuki D, Ukai S, Sugimoto K, Moriyasu F, Takagi N, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y, pDNA-loaded Bubble liposomes as potential ultrasound imaging and gene delivery agents, *Biomaterials*, 査読有, 34, 2013, 2807-2813, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.12.018.

〔学会発表〕(計 21 件)

高橋葉子、根岸洋一、石田一馬、鈴木亮、丸山一雄、新榎幸彦、脳への標的指向性を有する pDNA 搭載ペプチド修飾バブルリポソームの開発、第 14 回日本超音波治療研究会、2015 年 11 月 28 日、高知(若手研究者優秀発表賞)

高橋葉子、根岸洋一、石田一馬、鈴木亮、丸山一雄、新榎幸彦、脳への標的指向性を有する遺伝子搭載ペプチド修飾バブルリポソームの開発と機能評価、第 31 回日本 DDS 学会、2015 年 7 月 2 日、東京

高橋葉子、根岸洋一、大阿久琴美、石田一馬、鈴木亮、丸山一雄、新榎幸彦、pDNA 搭載 Angiopep-2 ペプチド修飾バブルリポソームの調製と機能評価、日本薬剤学会第 30 年会、2015 年 5 月 21 日、長崎

高橋葉子、根岸洋一、大阿久琴美、鈴木亮、丸山一雄、新榎幸彦、pDNA 搭載 Angiopep-2 ペプチド修飾バブルリポソームの脳組織への集積性評価、遺伝子・デリバリー研究会第 15 回シンポジウム、2015 年 5 月 1 日、京都

石田一馬、高橋葉子、根岸洋一、大阿久琴美、鈴木亮、丸山一雄、新榎幸彦、脳標的指向性ペプチド修飾バブルリポソームの調製と組織内分布評価、第 58 回日本薬学会関東支部大会、2014 年 10 月 4 日、東京

大阿久琴美、高橋葉子、根岸洋一、石田一馬、鈴木亮、丸山一雄、新榎幸彦、脳標的指向性ペプチド修飾リポソームの調製と基礎的検討、日本薬剤学会第 29 年会、2014 年 5 月 20 日、さいたま

高橋葉子、根岸洋一、大阿久琴美、石田一馬、鈴木亮、丸山一雄、新榎幸彦、脳への標的指向性を有するバブル製剤開発に向けたペプチド修飾リポソームの調製と基礎的検討、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28 日、熊本

高橋葉子、根岸洋一、鶴飼さおり、大阿久琴美、杉本勝俊、森安史典、小田雄介、鈴木亮、丸山一雄、新榎幸彦、miRNA 搭載型バブルリポソームと超音波併用による虚血性疾患治療システムの開発、第 12 回日本超音波治療研究会、2013 年 11 月 30 日、東京

大阿久琴美、高橋葉子、根岸洋一、鶴飼さおり、石田一馬、鈴木亮、丸山一雄、新榎幸彦、miRNA 搭載型バブルリポソームと超音波併用による虚血下肢の造影および治療効果、第 57 回日本薬学会関東支部大会、2013 年 10 月 26 日、東京

高橋葉子、根岸洋一、鈴木亮、丸山一雄、新榎幸彦、全身投与を可能とする超音波応答性核酸搭載型バブルリポソームの開発、第 22 回 DDS カンファレンス、2013 年 9 月 6 日、静岡

Endo-Takahashi Y, Negishi Y, Ukai S,

Ooaku K, Takagi N, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y, Systemic delivery of miR-126 by miRNA-loaded Bubble liposomes for treatment of hindlimb ischemia, The 5th Asian Arden Conference, 2013 年 8 月 5 日、Nagoya

高橋葉子、根岸洋一、鶴飼さおり、大阿久琴美、鈴木亮、丸山一雄、新榎幸彦、miRNA 搭載型バブルリポソームと超音波併用による新規血管新生療法の開発、第 29 回日本 DDS 学会、2013 年 7 月 4 日、京都

高橋葉子、根岸洋一、大阿久琴美、鈴木亮、丸山一雄、新榎幸彦、miRNA 搭載型バブルリポソームと超音波照射併用による下肢虚血モデルへの miR-126 導入効果、日本薬剤学会第 28 年会、2013 年 5 月 23 日、名古屋

鶴飼さおり、高橋葉子、根岸洋一、大阿久琴美、菊池太希、鈴木亮、丸山一雄、新榎幸彦、miRNA キャリアーとしてのカチオン性脂質含有バブルリポソームの調製と物性評価、日本薬剤学会第 28 年会、2013 年 5 月 23 日、名古屋

高橋葉子、根岸洋一、鈴木亮、丸山一雄、新榎幸彦、遺伝子キャリアーおよび超音波造影剤としてのカチオン性脂質含有バブルリポソームの開発、遺伝子・デリバリー研究会第 13 回シンポジウム、2013 年 5 月 11 日、東京

大阿久琴美、高橋葉子、根岸洋一、鈴木大地、鶴飼さおり、鈴木亮、丸山一雄、新榎幸彦、バブルリポソームによる遺伝子デリバリーおよび超音波造影に及ぼす正電荷脂質の影響、遺伝子・デリバリー研究会第 13 回シンポジウム、2013 年 5 月 11 日、東京

鈴木大地、高橋葉子、根岸洋一、鶴飼さおり、大阿久琴美、鈴木亮、丸山一雄、新榎幸彦、疾患モデルにおけるカチオン性脂質含有バブルリポソームの超音波造影剤および遺伝子キャリアーとしての有用性評価、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 28 日、横浜

高橋葉子、根岸洋一、中村有沙、鈴木大地、鶴飼さおり、高木教夫、鈴木亮、丸山一雄、新榎幸彦、カチオン性脂質含有バブルリポソームによる下肢虚血部位の超音波イメージングと遺伝子デリバリー、遺伝子・デリバリー研究会第 12 回夏期セミナー、2012 年 7 月 30 日、北九州

中村有沙、高橋葉子、根岸洋一、鈴木大地、鶴飼さおり、高木教夫、鈴木亮、丸山一雄、新榎幸彦、正電荷脂質を用いた pDNA 表面結合型バブルリポソームの遺伝子導入キャリアーとしての有用性評価、第 28 回日本 DDS 学会、2012 年 7 月 4 日、札幌

高橋葉子、根岸洋一、中村有沙、鈴木大地、鶴飼さおり、高木教夫、鈴木亮、丸

山一雄、新橋幸彦、血管新生遺伝子キャリアーとしての pDNA 搭載型カチオン性脂質含有バブルリポソームの開発、日本薬剤学会第 27 年会、2012 年 5 月 24 日、神戸

- ②1 Endo-Takahashi Y, Negishi Y, Nakamura A, Suzuki D, Ukai S, Sugimoto K, Moriyasu F, Takagi N, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y, Novel transfection system with ultrasound and pDNA-loaded Bubble liposomes for angiogenic gene therapy via systemic injection, The 4th Asian Conference on Ultrasound Contrast Imaging, 2012 年 5 月 12 日, Seoul, Korea (Travel Grant Award)

〔その他〕

日経産業新聞 2013 年 6 月 27 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 葉子 (遠藤葉子) (TAKAHASHI YOKO)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：30453806