

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32659

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560240

研究課題名(和文) 血液脳関門標的化バブルリポソームによる脳実質組織への超音波核酸デリバリーシステム

研究課題名(英文) Ultrasound-mediated gene delivery system into brain tissue by blood brain barrier targeting Bubble liposomes

研究代表者

根岸 洋一 (Yoichi, NEGISHI)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50286978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、バブルリポソーム(BL)と超音波照射併用による脳標的化する核酸・遺伝子デリバリーシステムの開発を目的とした。BLと高密度集束超音波(HIFU)を併用することで標的部位のみでのBBB透過性亢進が可能となる明らかとした。本法によりアンチセンス核酸・遺伝子の脳内デリバリーが可能となることも示された。さらにポリプレックス搭載型バブルリポソームを新規開発し、これを静脈内投与後に頭蓋外からのHIFU照射を行うことで更なる照射部位選択的な遺伝子発現が可能となることを明らかとした。以上の結果は、今後の脳神経疾患治療に有用な核酸・遺伝子医薬のための新規デリバリーシステムとなりうるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Here, we tried to develop the nucleic acid - gene delivery system into the brain by the combination of Bubble liposomes (BLs) and high-intensity focused ultrasound (HIFU). First, we examined whether the permeability of the BBB can be enhanced by the combination of BLs and HIFU using Evans blue (EB). As a result, the accumulation of EB in the HIFU-exposed brain was increased over that observed in the non-HIFU-exposed brain. Similarly, the combination of BLs and HIFU allowed antisense oligonucleotides or plasmid DNA to be delivered into the HIFU-exposed brain. Furthermore, polyplex-loaded BLs with HIFU further increased the gene expression in the delivered to the brain by the combination method of BLs and HIFU. Thus, the brain targeting method by the combination of BLs loading therapeutic genes and HIFU together may serves as a useful means for accelerating the permeability of BBB and thereby enabling therapeutic genes to be delivered to the focused brain site in CNS diseases.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：集束超音波 血液脳関門 バブルリポソーム 核酸・遺伝子デリバリー

## 1. 研究開始当初の背景

高度化社会を迎え、国内に約 100 万人以上の認知症老人がいるとされている。その約半分は、アルツハイマー病患者であり、今後の更なる増加が予想されることから有効な治療薬の開発は急務とされている。近年では、核酸・遺伝子医薬の実用化に向けての研究開発も進められている。しかし、中枢神経への核酸・遺伝子デリバリーは確立されていないことから、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。我々は、導入遺伝子の封入や標的指向性を持たせることが可能なりポソームに診断用超音波造影ガスを封入した微小気泡（ナノバブル）-バブルリポソームを開発し、新規の遺伝子導入ツールとなること、また、超音波造影が可能であることを報告してきた。このバブルリポソームに治療用超音波を照射するとキャビテーション誘導（バブルの崩壊）に伴うマイクロジェット流が発生し、それを駆動力として薬物・遺伝子が瞬時に細胞内へと送達できる。さらに、バブルリポソームと蛍光オリゴをマウス下肢部に経静脈的投与を行ない、経皮的に超音波を照射すると血管透過性が高まり、血管外組織内へと瞬時にオリゴが劇的に導入されることを見出している。よって、バブルリポソームと治療用超音波照射の併用により、脳内への核酸・遺伝子デリバリーシステムの構築が可能となると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、バブルリポソームと超音波照射併用による脳内核酸・遺伝子デリバリーシステムの開発を目的とし、はじめにバブルリポソーム投与後に頭蓋からの超音波照射による BBB 透過性を亢進させる技術を確認し、どのような分子サイズが脳内送達可能かを検証する。さらに効率的な核酸・遺伝子デリバリーを可能とするために、核酸・遺伝子を中枢神経系細胞選択的ペプチドやカチオン性高分子で複合化し、これをバブルに搭載し、静脈内投与後、脳内へとピンポイントの超音波照射を行うことで、脳疾患治療に有用な非侵襲的な脳実質組織への新規核酸・遺伝子デリバリーシステムの構築を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) バブルリポソームの調製

種々の PEG 修飾リポソームを作製するために、脂質組成が DPPC（中性脂質）あるいは DPPG（アニオン性脂質）と DSPE-PEG<sub>2000</sub> を基本脂質として用いた。PEG-リポソーム内への造影ガスの内封には、パーフルオロプロパン（C3F8）を用いてバブルリポソームの懸濁液を調製した。調製したリポソームおよびバブルリポソームの粒子径・ζ電位は、NICOMP 2500 にて測定した。

### (2) バブルリポソームへの核酸・遺伝子搭載の検討

アニオン性脂質である DPPG を含有させたバブルリポソームへの核酸・遺伝子を搭載させるためにカチオン性ペプチドやポリエチレンジアミン（PEI）を利用してポリプレックスを調製した。その物性評価をアガロース電気泳動（N/P 比変化に伴うポリプレックス形成能）、NICOMP（粒子径・ζ電位）にて調べた。さらに両者の静電的相互作用性をフローサイトメトリーにて測定し、バブルリポソームへのポリプレックス搭載能を評価した。

### (3) バブルリポソームと超音波併用による *in vitro* 遺伝子導入

Neuro2a 細胞、または COS7 細胞（ $3 \times 10^4$  cells/well）を 48 well プレートに播種し、24 時間後にアニオン性脂質含有バブルリポソームまたはアニオン性脂質を含有していない従来型バブルリポソーム、及び pDNA を 10% FCS 含有培地で混合し、各 well に添加した。その後速やかに、SONOPORE KTAC-3000（NEPA GENE, CO, LTD）を用いて超音波照射（Frequency: 2028 kHz, Duty: 50 %, Burst rate: 2.0 Hz, Intensity: 2.0 W/cm<sup>2</sup>, Time: 10 sec.）した。48 時間培養後にルシフェラーゼ活性測定を行い、その活性を指標に遺伝子導入効率を評価した。

### (4) 血液脳関門 (BBB) の透過性亢進

5 週齢の ICR マウスに対して調製した Evans Blue (Evans Blue ; EB) をマウス体重 1 g あたり 100 μg となるように尾静脈から投与した。その後 5 分後にアニオン性脂質含有バブルリポソームと PBS の混合液を尾静脈から投与し、直後に HIFU (ネッパジーン社 SONITRON, 照射条件 - Frequency: 3.5 MHz, Intensity: 0.1 - 1.5 kw, Duty cycle: 10%, Time: 60 sec.) を右脳側へ照射した。高密度焦点式超音波は SONITRON 2000 (NEPA GENE, CO, LTD) を用いた。この装置における超音波の集束する幅は 1.6 mm、直径は 1.1 mm である。HIFU 照射 3 時間後に、組織灌流後、未処置群をコントロール、右脳を処置群としてそれぞれ回収し、ホルムアミドに浸し、55°C で抽出した。その後、14000 rpm、4°C、10 分間遠心分離し、抽出液を 620 nm にて測定した。また、どのような分子サイズが透過可能かを明らかにするために FITC 修飾デキストラン（分子量 70 kDa、2000 kDa）のものを用いて、同様に評価した。FITC 修飾核酸 (PMO) の脳内分布に関しては、マエストロ *in vivo* 蛍光イメージング装置を利用した。

### (5) プラスミド DNA (pDNA) の脳内遺伝子デリバリー

5 週齢のオスの ICR マウスに対して調製したルシフェラーゼ遺伝子をコードした発現 pDNA を 50 μg、バブルリポソーム（全脂質量として 100 μg）に PBS 75 μL を混ぜたものを尾静脈から投与し、直後に HIFU (Frequency: 3.5 MHz, Intensity: 0.5 - 1.5 kw, Duty cycle: 10%, Time: 10 - 60

sec.)を右脳側へ照射した。その後、24 時間後に脳を回収し、ホモジネート後、Luciferase 活性測定を行った。また、*in vivo* イメージング装置 (IVIS) を用いて、*in vivo* での遺伝子発現解析を行った。24 時間後にルシフェリン溶液をマウス体重 1 g あたり 15  $\mu\text{g}$  となるように腹腔内投与し、10 分後に IVIS imaging system (IVIS Lumina III, 住商ファーマインターナショナル株式会社) により *in vivo* での観察を行った。その後、脳を回収し、ルシフェリン溶液に浸漬した後、*ex vivo* での観察も行った。

#### (6) 脳内超音波イメージング

投与後の脳内におけるバブルリポソームの脳内滞留性・安定性を評価するため、ICR マウス (5 週齢, ♂) に、それぞれ調製したバブルリポソームを尾静脈から投与し、直後に超音波診断用装置の 7.5 MHz のプローブを用いて、脳内超音波イメージングを一定時間行った。その後、撮像したイメージング画像の輝度 (ROI) を ImageJ ソフトにより数値化した。

なお、動物実験に関しては、東京薬科大学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。また、組換え DNA を使用する研究に関しては、東京薬科大学組換え DNA 安全委員会に申請し、審査を受けて研究を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) バブルリポソームと集束超音波 (HIFU) 照射併用による BBB 透過性の亢進

バブルリポソーム (BL) と集束超音波 (HIFU) 照射併用法を確立し、血液脳関門 (BBB) の透過性の向上を目指し、種々の検討を行った。BL の構成脂質として、DPPC および PEG を用いて調製した。はじめに BBB の透過性を調べるために、BL と HIFU 照射処理に伴う色素であるエバンスブルー (EB: 血液中でアルブミンと結合) の脳実質組織への漏出を肉眼的かつ定量的な解析を行った。マウスに EB を尾静脈内投与し、数分後に BL を投与し、その直後に頭蓋から、HIFU 照射を行った。数時間ごとに導入処理を行った脳を回収し、冠状断面の観察ならびに組織より、EB を抽出定量した。その結果、冠状断面の照射部位 (右脳) のみにおける EB の顕著な蓄積が観察された。また、抽出定量したところ超音波照射強度に伴う EB 透過量の増加が認められた。この BL と HIFU 照射処理後 1~3 時間において EB 蓄積量の増加は、ほぼ最大に達していた (Fig. 1)。次に HIFU 照射条件の特性評価を行うために、超音波照射条件を変動させたところ、Duty10%、60 秒で、十分な EB の透過を示した (Fig. 2)。さらに導入後の組織ダメージを HE 染色、NADH-TR 染色にて調べたところ、10%Duty では、顕著なダメージ

は、認められなかった。また、本照射条件 (10%Duty、60 秒) を利用することで、どの程度までの高分子化合物が、BBB を透過できるかを調べたところ、FITC-Dextran を用いて、同様の実験を行った。その結果、最大 2000kDa までの分子が透過する傾向が認められた。また、その透過量は分子量の大きさに依存することも示された (Fig. 3)。さらに FITC 修飾されたアンチセンス核酸 (を用いた場合では、BL と HIFU 照射処理によって、脳内移行している傾向が示された (Fig. 4)。以上のことから、BL と HIFU 照射処理により BBB の透過性を亢進させることが可能となることが明らかとなり、有用な脳へのデリバリーシステムとなりうるものと期待された。

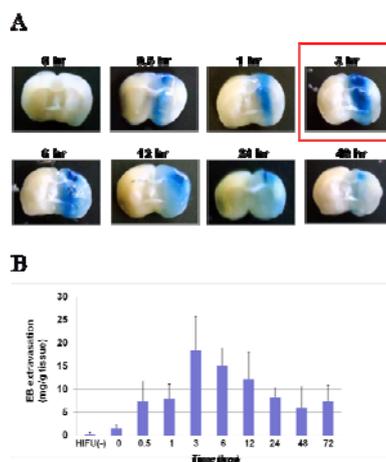


Figure 1. EB extravasation in the brain as a function of time after HIFU exposure. (A) Distribution of BBB disruption by extravasation of EB. Right brain: HIFU exposure. Left brain: control. (B) The amount of EB extravasation in the right brain. The mouse were injected into tail vein with EB 100 mg/kg. After 5 minutes, injected with Bubble liposomes 100  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  and exposed HIFU with 3.5 MHz, 10%, 1.5  $\text{kw}/\text{cm}^2$ , 60 seconds.

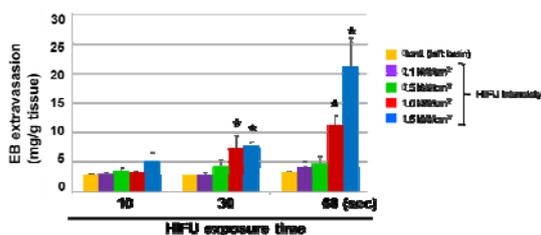


Figure 2. The amount of EB extravasation in the right brain (HIFU-exposed site). The mouse were injected into tail vein with EB 100 mg/kg. After 5 minutes, the mouse was injected with Bubble liposomes (100 mg/mouse) and exposed HIFU with 3.5 MHz, 10% Duty, 1.5  $\text{kw}/\text{cm}^2$ . After three hours, each tissue was corrected. A HIFU exposure time: 10, 30, or 60 sec. A different intensity: 0.1, 0.5, 1.0, or 1.5  $\text{kw}/\text{cm}^2$ . \* $p < 0.05$  vs. cont.

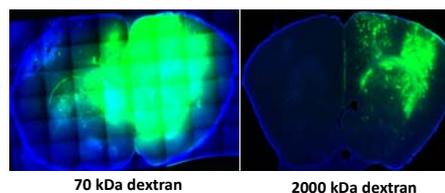


Figure 3. Study of the molecular size through the BBB opening using FITC-Dextrans and fluorescence imaging. The mouse were injected into tail vein with 70 kDa or 2000 kDa of FITC-dextran. After 5 minutes, injected with Bubble liposomes (100 mg/mouse) and exposed to HIFU with 3.5 MHz, 10% Duty, 1.5  $\text{kw}/\text{cm}^2$ , 60 seconds.

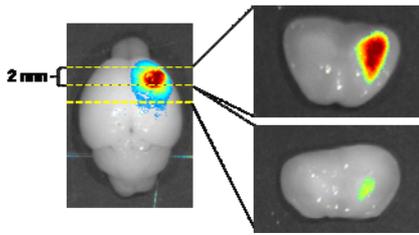


Figure 4 Distribution of FITC-PMO followed by HIFU exposure with Bubble liposomes.

## (2) 核酸搭載型バブルリポソームの調製と集束超音波 (HIFU) 照射併用による脳内核酸・遺伝子デリバリーシステムの構築

2種類の基本脂質を用いて調製したバブルリポソーム (BL) をマウスに尾静脈内投与し、その後の生体内 (脳内) での安定性を超音波診断装置にて調べた。頭蓋内への診断造影の結果、DPPC を用いた場合と比較し、DPPG を基本脂質としたバブルリポソーム (AnBL) は、数分間にわたり、造影効果を示したことから、AnBL は、脳内デリバリーにおいて有用な超音波造影剤であると考えられた。実際に AnBL と集束超音波 (HIFU) 照射併用法による脳内への遺伝子導入効果を有するか検討した。その結果、照射部位における顕著な遺伝子発現の増強が認められた。一方で、更なる遺伝子導入効率の向上を目指し、AnBL へのプラスミド DNA と PEI の複合体 (ポリプレックス) の搭載を試みた。その結果、N/P 比=5-20 で調製した粒子径 100 nm 以下のポリプレックスが AnBL に搭載可能であることが、フローサイトメトリーの解析により示された。また、AnBL へのポリプレックス搭載の有無に関わらず、造影能を維持できることも判明した。*in vitro* および *in vivo* での遺伝子導入実験では、Naked pDNA と BL との超音波併用時と比較して、ポリプレックス搭載 AnBL では、顕著な遺伝子発現レベルの上昇が認められた。以上のことから、AnBL は、生体内で安定な脳内核酸・遺伝子デリバリーツールとなりうるものと期待された。

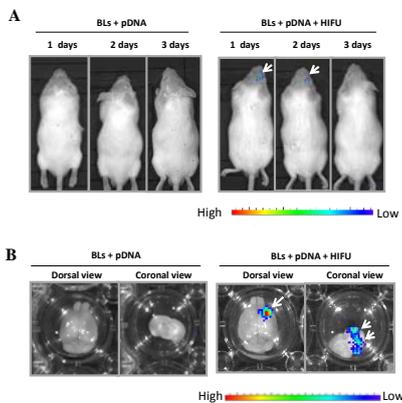


Figure 4. *In vivo* luciferase imaging after the delivery of Plasmid DNA into brain by the combination of BLs and HIFU exposure. (A) *In vivo* luciferase imaging during 3 days. (B) *Ex vivo* luciferase imaging. Plasmid DNA encoding luciferase gene and BLs were intravenously injected into mice, and then right hemispheres were exposed to 3.5 MHz pulsed HIFU conditions (intensity: 1.5 kW/cm, exposure time: 30 sec). White arrow indicated the luciferase expressing site in the exposure site.

## (3) 中枢神経細胞選択的核酸・遺伝子デリバリーシステムの構築

これまでの検討で、バブルリポソーム (BL) と頭蓋外からの集束超音波 (HIFU) 照射の併用により、BBB の透過性が亢進するとともに、脳内への遺伝子導入が可能となることを明らかとしてきた。さらに、BBB 透過後の核酸・遺伝子に神経細胞への選択性を付与することは、極めて重要と考えられる。そこで、神経細胞選択的ペプチドにカチオン性ペプチドを連結させた融合ペプチドを利用して、ポリプレックス搭載型 BL の作製を試みた。はじめにポリプレックスを調製し、その物性をアガロースゲル電気泳動により、確認したところ、N/P 比=10 以上では、ほぼ完全にポリプレックスを形成できていることが示された。また、粒子径は、50 nm 程度であり、ゼータ電位は、+10 程度であった。このポリプレックスの受容体選択的な遺伝子導入が可能かを、Neuro2a 細胞を用いて調べた。結果、Hela 細胞への遺伝子発現と比較して、Neuro2a 細胞では、顕著な発現レベルの増強が認められ、ポリプレックスの細胞選択性が示された。さらに FACS による解析から、AnBL への本ポリプレックスの搭載が認められた。以上より、神経細胞選択的なポリプレックスを搭載させた BL の作製に成功したことは、HIFU 照射併用による BBB 透過性亢進のみならず神経細胞選択的な核酸・遺伝子デリバリーシステムの構築に繋がるものと期待される。

以上より、BL と高密度集束超音波 (HIFU) との併用による標的部位のみでの BBB 透過性を亢進できることを明らかとし、核酸・遺伝子のみならず、様々な分子サイズの脳内送達が可能となったことから、本技術は BBB を透過できない薬物や抗体などの送達目的としても応用可能となるものと考えられる。今後は、さらにアルツハイマー病治療のターゲット遺伝子に対する siRNA やパーキンソン病治療に有用な神経保護因子遺伝子を用いた本デリバリーシステムにより、疾患モデル動物への送達導入を試みることで、臨床応用可能な脳神経疾患治療システムの開発に発展させていく予定である。

## 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 1 件)

- (1) Negishi-Y, Yamane-M, Kurihara-N, Endo-Takahashi-Y, Sashida-S, Takagi-N, Suzuki-R, Maruyama-K, Enhancement of Blood-Brain Barrier Permeability and Delivery of Antisense Oligonucleotides or Plasmid DNA to the Brain by the Combination of Bubble Liposomes and High-Intensity Focused Ultrasound, *Pharmaceutics*, **7**: 344-362, 2015  
doi: 10.3390/pharmaceutics7030344

〔学会発表〕(計 13 件)

- (1) 根岸洋一、高橋葉子、鈴木 亮、丸山一雄、新榎幸彦、セラノスティックスを可能とする超音波応答性ナノバブルによる核酸・遺伝子デリバリー、日本薬学会第 136 年会 招待講演 (2016 年 3 月 26 日, 横浜)
- (2) 根岸洋一、栗原奈保、高橋葉子、指田紗菜恵、高木教夫、鈴木 亮、丸山一雄、新榎幸彦、バブルリポソームと高密度集束超音波併用による脳内へのアンチセンス核酸・遺伝子デリバリー、日本核酸医薬学会第 1 回年会 (2015 年 11 月 30 日, 京都)
- (3) 根岸洋一、高橋葉子、栗原 奈保、鈴木 亮、丸山 一雄、高木教夫、新榎 幸彦、ナノバブルと高密度集束超音波併用による血液脳関門透過性亢進と脳内遺伝子デリバリー、第 14 回日本超音波治療研究会 (2015 年 11 月 28 日, 高知)
- (4) 山垣内貴文、根岸洋一、栗原奈保、高橋葉子、鈴木 亮、丸山一雄、新榎幸彦、pDNA 搭載型アニオン性脂質含有バブルリポソームによる脳内遺伝子デリバリー、第 59 回日本薬学会関東支部大会 (2015 年 9 月 12 日, 千葉)
- (5) 根岸洋一、栗原奈保、高橋葉子、鈴木 亮、丸山一雄、高木教夫、新榎幸彦、ナノバブルと集束超音波併用による脳内分子デリバリーシステムの構築、遺伝子・デリバリー研究会、第 15 回シンポジウム (2015 年 9 月 7 日, 京都)
- (6) 山垣内貴文、根岸洋一、栗原奈保、高橋葉子、鈴木 亮、丸山一雄、新榎幸彦、pDNA 搭載型アニオン性脂質含有バブルリポソームによる遺伝子デリバリー、遺伝子・デリバリー研究会、第 15 回シンポジウム (2015 年 9 月 7 日, 京都)
- (7) 根岸洋一、栗原奈保、山垣内貴文、高橋葉子、鈴木 亮、丸山一雄、新榎幸彦、バブルリポソームと集束超音波による脳内遺伝子デリバリー、第 31 回日本 DDS 学会学術集会 (2015 年 7 月 2 日, 東京)
- (8) 栗原奈保、根岸洋一、山根正也、山垣内貴文、高橋葉子、高木教夫、鈴木 亮、丸山一雄、新榎幸彦、アニオン性脂質含有バブルリポソームと高密度集束超音波による血液脳関門透過性亢進と脳内遺伝子デリバリー、日本薬剤学会 第 30 年会 (2015 年 5 月 21 日, 長崎)
- (9) Negishi-Y, Yamane-M, Kurihara-N, Endo-Takahashi-Y, Takagi-N, Suzuki-R, Maruyama-K, Aramaki-Y, Enhancement of Blood-Brain Barrier Permeability by the Combination of Bubble Liposomes and High-intensity focused ultrasound, 4th Focused Ultrasound Symposium (2014/10/12, Bethesda, USA)
- (10) 山根正也、根岸洋一、栗原奈保、高

橋葉子、鈴木 亮、丸山一雄、高木教夫、新榎幸彦、バブルリポソームと高密度集束超音波併用による血液脳関門透過性亢進に関する基礎的検討、日本薬学会第 134 年会 (2014 年 3 月 27 日, 熊本)

- (11) 根岸洋一、櫻井あかね、高橋葉子、鈴木 亮、丸山一雄、新榎幸彦、バブルリポソームと超音波照射併用による臓器選択的核酸デリバリーシステムの開発、第 4 回超音波分子診断治療研究会 (2014 年 3 月 7 日, 福岡)
- (12) 根岸洋一、菊池太希、高橋葉子、小栗由貴子、杉本勝俊、森安史典、鈴木 亮、丸山一雄、新榎幸彦、アニオン性脂質含有バブルリポソームの開発、第 12 回日本超音波治療研究会 (2013 年 11 月 30 日, 東京)
- (13) 山根正也、根岸洋一、栗原奈保、高橋葉子、鈴木 亮、丸山一雄、新榎幸彦、バブルリポソームと高密度焦点式超音波併用による血液脳関門透過性亢進に関する基礎的検討、第 57 回日本薬学会関東支部大会 (2013 年 10 月 26 日, 東京)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/yakubutsu\\_sotatsu/](http://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/yakubutsu_sotatsu/)

新聞掲載

「異物防ぐ関門、微小カプセルで開く-遺伝子、脳に効率導入」(2015 年 9 月 4 日, 日経産業新聞)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

根岸 洋一 (NEGISHI YOICHI)  
東京薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号：50286978

(2) 研究分担者

高木 教夫 (TAKAGI NORIO)  
東京薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：50318193

(3) 連携研究者

丸山 一雄 (MARUYAMA KAZUO)  
帝京大学・薬学部・教授  
研究者番号：30130040

野水 基義 (NOMIZU MOTOYOSHI)  
東京薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：00311522

高橋 葉子 (TAKAHASHI YOKO)  
(遠藤 葉子)

東京薬科大学・薬学部・助手  
研究者番号：30453806