

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03037

研究課題名(和文) 生理活性ガスを含有する超音波応答性ナノバブルの開発と疾患治療システムの構築

研究課題名(英文) Development of ultrasound-responsive nanobubbles containing physiologically active gas and construction of disease treatment system

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化窒素(NO)は循環器系疾患をはじめ、様々な疾患治療への応用が期待されていることから、NOを疾患部位へと送達させるDDS技術の開発は重要である。本研究では、超音波応答性ナノバブルに、NOを内封したナノバブルの新規開発に着手し、体外からの超音波照射により、目的部位におけるNOデリバリーを可能とするナノバブルの開発に成功した。実際に本ナノバブルを下肢虚血マウスへと投与し、体外からの超音波照射により、NO放出に伴う血流量の増加を認めた。本ナノバブルは、超音波造影を可能とすることから、虚血性疾患や様々な疾患における非侵襲性診断・治療(セラノスティクス)システムの構築にも有用となると期待される。

研究成果の概要(英文)：Since nitric oxide (NO) is expected to be applied to various diseases including cardiovascular diseases, it is important to develop DDS technology to deliver NO to disease sites. In this research, we tried to develop a novel nanobubble with ultrasound-responsive nanobubbles encapsulating NO gas, succeeded in developing nanobubbles that enable NO gas delivery at the target site by ultrasound exposure transcutaneously. Indeed, this nanobubble was administered to hindlimb ischemic mouse model, and ultrasound exposure transcutaneously caused an increase in blood flow rate of ischemic site due to NO release at the site. Since this nanobubble enables ultrasound contrast imaging, it is expected to be useful for constructing noninvasive diagnostic and therapeutic (Theranostics) systems in ischemic and various diseases.

研究分野：超音波DDS

キーワード：超音波 ナノバブル 一酸化窒素ガス セラノスティクス

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では、高齢化社会に伴い、生活習慣病(狭心症、動脈硬化症、糖尿病等)に起因する循環器系疾患(脳梗塞、心筋梗塞、閉塞性動脈硬化症等)を有する重症患者数が増加している。これらの病態改善には、生体内コントロール可能な(NO)の投与により、健全な血管構築と、それに伴う周辺組織の保護と再生が可能となると期待されている。そのような背景から、NOの選択的供給を可能とする新規治療薬開発が注目されている。しかし、ガス状分子の状態でのNOを静脈内投与すると、血液中ですぐに不活化されることから、安全かつ効率的な疾患部位選択的なNOデリバリーシステム(DDS)の開発は、各種疾患・障害に対する新規治療の実現に極めて有用である。これまでに申請者は、生体適合性・血中安定性・滞留性に優れ、深部組織にまで十分到達できることが報告されている、粒子サイズ約100~200 nmのポリエチレングリコール修飾リポソーム(PEG-リポソーム)に注目し、PEG-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、新規の薬物・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。

以上の背景を踏まえ、申請者は、バブルリポソームと超音波照射の併用が血管病変部位への生理活性ガス送達法の課題を克服する有力な手段となると期待した。即ち、NOガスの供給によって疾患治療が期待される循環器系疾患などの治療に特化したNO内封バブルリポソームを新規開発する。これを病変部位へと集積させ、体外からの超音波照射を行うことで局所的な生理活性ガスの放出および疾患部位のみへの選択的な作用が可能となり、NOガスの安全かつ効率的デリバリーによる疾患治療システムが構築できると考えた。さらには、診断用超音波造影ガスをリポソーム内へと同時に混合内封すれば、非侵襲性の高い診断・治療(セラノスティクス)システムの構築に繋がると期待される。

## 2. 研究の目的

生理活性ガス分子(一酸化窒素:NO)は血管・神経・免疫系の制御に関わることが知られており、様々な疾患治療への応用が期待されている。しかしながら、NOガス自身を疾患部位へと選択的かつ効率的に安定供給させる実用的デリバリーシステムは、ほとんど研究開発されていない。本研究では、これまで微小気泡(ナノバブル)の一つとして開発してきた超音波診断造影と薬物・遺伝子デリバリーシステム(DDS)を可能とする超音波造影ガス封入リポソーム(バブルリポソーム)に、NOを内封したバブルリポソームを開発する。本研究では、これまでの超音波DDS研究の基盤を生かし、未だ確立されていない超音波を併用する非侵襲的なNOガスデリバリーシステムを構築し、疾患治療への応用を目指す。動脈硬化症、糖尿病などの生活習慣病に伴う循環器系疾患(脳梗塞や閉塞性動脈硬化症等)への応用が期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) NO内封バブルリポソーム(NOBL)の調製

基本脂質として、1,2-Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC)、1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC)、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DPPG)、1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DSPG)、DSPE-PEG<sub>2000</sub>を用い、REV法にて粒子径約150 nmのリポソームを調製した。これをガラスバイアルに注入した後に、パーフルオロプロパンガス(C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>)とNOガスを充填した。これを、バス型ソニケーターを用いて超音波処理し、NO内封バブルリポソーム(NOBL)を作製した。さらにナノ化するために高速攪拌を行った。さらに粒子径は、NICOMP 380 ZLS (Particle Sizing Systems, Inc.)を用いて測定した。

### (2) DAF-2によるNOの検出

一酸化窒素(NO)検出用蛍光試薬として知られているDiaminofluorescein-2 (DAF-2)を500倍希釈し、96 wellプレートに100 µlずつ入れ、これにNOBLを経時的(0、30、60 min.)に添加・混合し、蛍光強度を吸光光度計にて測定した(励起波長:495 nm、蛍光波長:515 nm)。

### (3) 造影効果を指標としたガス保持能の検討

6 wellプレートにPBSとともにC<sub>3</sub>F<sub>8</sub>BL又はNOBL 120 µlを添加し、診断用超音波(P60 Ultrasonic Biomicroscope, Paradigm Medical Industries, Inc.)を用いて造影した。得られた画像のエコーシグナルを画像解析ソフトであるImage-Jにて解析した。また、*in vivo*での造影実験においては、バブルの安定性を心エコーを指標に評価した。下肢虚血モデルマウスを用いた実験においては、虚血部位におけるバブルの到達性をエコーシグナルを指標に評価した。

### (4) エバンスブルーを利用した血管透過性実験

5-6週齢のICR系統マウスに対して、調製したNOBL溶液200 µL(脂質換算濃度:1 µg/µL)を尾静脈注射により全身投与した。投与後、治療用の超音波照射装置(Sonitron 2000、ネッパ

ジーン株式会社)のプローブを下肢部筋組織に当て、体外からの超音波照射を行った。当該超音波照射は、周波数 1 MHz、照射強度 2W/cm<sup>2</sup>、照射時間 60 秒の照射条件にて行った。その後、10 mg / 体重 kg 相当量の Evans blue を尾静脈注射により全身投与した。当該静脈投与から 180 分経過後、上記超音波照射部位の筋組織を回収し、当該筋組織に含まれる Evans blue 量を定量した。マイクロチューブに入れた回収組織の重さを量り、ホルムアミドを 5 μl/mg となるように加え、55 °C のヒートブロック恒温槽にて一晩抽出した。これを遠心分離 (RT、14,000 rpm、10 min.) し、96 well プレートに入れ、吸光度 (波長: 620 nm) を測定した。

#### (5) 下肢虚血モデルマウスへの NO デリバリー

下肢動脈を切除 (片足のみ) することで、虚血モデルマウス (5-6 週齢の ICR 系統マウス使用) を作製し、調製したナノ化 NOBL 溶液 200 μL (脂質換算濃度: 1 μg/μL) を尾静脈注射により全身投与した。虚血部位へのバブルの到達性を超音波造影により調べた。次にナノ化 NOBL の投与後、治療用超音波照射プローブを下肢部虚血部位に当て、体外からの超音波照射を行った。当該超音波照射は、周波数 1 MHz、照射強度 2W/cm<sup>2</sup>、照射時間 120 秒の照射条件にて行った。その後の足裏の血流量の変化をレーザー Doppler 計にて測定した。尚、動物実験 (3-5) に関しては、東京薬科大学における指針に基づき、動物実験委員会の承認を受け実施した。

#### (6) 標的指向性 NOBL の調製

マレイル化 PEG 脂質に ICAM-1 標的化ペプチドを修飾し、これをポストインサクション法により、リポソームのペプチド修飾を行った。本リポソーム溶液を注入したガラスバイアルにパーフルオロプロパンガス (C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>) と NO を充填した。これを、バス型ソニケーターを用いて超音波処理し、ICAM-1 ペプチド修飾 NOBL とした。

### 4. 研究成果

#### (1) NO 内封バブルリポソーム (NOBL) の調製と物性評価

NOBL の調製法の検討を行い、その安定性を *in vitro* および *in vivo* にて評価した。はじめに 4 つの異なる構成脂質 (DSPC, DPPC, DSPG, DPPG) および PEG を用いてリポソームを調製し、それらへの NO ガスの内封を試み、粒子径測定を行った。結果、超音波造影ガスであるパーフルオロプロパンガスを用いて、バブル化した際には、いずれの構成脂質を含有したバブルリポソームにおいても粒子径が 500 nm 程度であるのに対し、NO ガスを内封させることで、粒子径が 800-1500 nm となることが示されたことから、NO を内封することで粒子径が大きくなる傾向が示された。実際にバブル化されたリポソーム内に NO ガスが内封されているかを、一酸化窒素 (NO) 検出用蛍光試薬である DAF-2 を用いて調べたところ、いずれの構成脂質から調製されたバブルリポソームにおいても NO ガスが内封されていることも確認された。*in vitro* 用の超音波造影装置にて経時的な造影効果を調べたところ、4 種の脂質に大きな差異を認めなかった。また、バブルの安定化を考慮して、PEG (DSPE-PEG<sub>2000</sub>) 修飾率を 2-10mol% と変化させた場合においても、粒子径が 800-1500 nm となることが示された。さらに 2-10mol% PEG を含有した NOBL について、*in vitro* における NO の相対量を DAF-2 を用いて行った。その結果、PEG 修飾率が 2-10mol% にあるバブルリポソームのいずれにおいても、同程度の一酸化窒素量が生理活性を有する気体分子の状態にて内封されていることが明らかとなった。

#### (2) NOBL の生体内安定性評価

次に、*in vivo* 用の超音波造影装置にて、様々な構成脂質で調製した NOBL の生体内での安定性を評価するために、4 つの異なる構成脂質 (DSPC, DPPC, DSPG, DPPG) からなる NOBL をマウスに静脈内投与し、心エコーの強度を指標に調べた。その結果、中性脂質 (DSPC) を構成脂質とした NOBL が、生体内を循環する血管内環境下において、最も安定保持に富んでいることが明らかとなった。また、DSPC を基本資質とした場合、PEG 修飾率が 2-10mol% にある NOBL のいずれについても、生体内を循環する血管内環境下においても安定性が高く、特に PEG 修飾率 2-6mol% のバブルリポソームでは、安定保持能が顕著に高く、生体内にて 30 分間以上の長時間の NO の安定保持が可能であることが示された (図 1)。

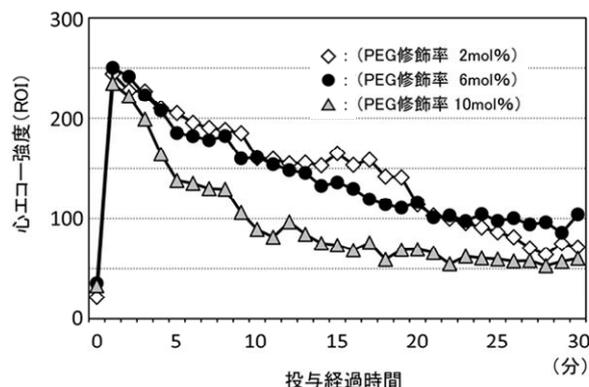


図 1. 超音波造影能を指標とした生体内でのガス保持能の定量評価

### (3) 高速攪拌を利用した NOBL の調製と物性評価

静脈内投与後に組織深部への到達性においては、投与するバブルの粒子径がナノサイズである方が優れていると考えられる。それゆえ(1)項での方法で調製した NOBL をさらに高速攪拌することで、粒子サイズの制御を試みた。その結果、NOBL の粒子サイズが、高速攪拌により、1/5 以下にサイズダウンし、安定したナノ粒子ができることを明らかとした。さらに攪拌時間を延長することで、より微細化されることも示された。また、NO ガスの内封効率を DAF-2 により調べたところ、ナノ化することで総脂質量あたりの NO ガスの内封効率が 1.5 倍まで増加することも示された。また、ナノ化調製後、常圧にて 30 分間保管した後の NO 保持量を DAF-2 にて測定したところ、PEG 修飾率が 2-10mol% のナノ化 NOBL では、常圧条件にて 30 分間の静置保管を行った場合でも NO 保持量を示す蛍光強度は高値を示し、ナノ化することで比較的安定な NOBL となることが明らかとなった。

### (4) ナノ化 NOBL の生体内安定性評価

(3) 項で調製したナノ化 NOBL について、経静脈注射による全身投与および *in vivo* 造影(心エコーの強度の測定)を行い、生体内での NO 保持能に関する評価を行った。結果、PEG 修飾率が 2-10mol% のナノ化 NOBL のいずれについても、生体内を循環する血管内環境下においても安定性が高く、少なくとも 30 分以上の NO の安定保持が可能であることが示された。また、NOBL を微細化し、ナノ化することで全体的に心エコー強度が強くなり、NO 保持能が向上していることが示された。特に PEG 修飾率が 6 mol% のナノ化 NOBL では、検出される心エコー強度が特に高い値を示し、生体内にて非常に安定して NO の安定保持が可能であることが示された。

以上(1-4)の結果から、調製 NOBL を激しく懸濁することで、がん組織や炎症部位への集積に有効である 200 nm 以下のナノ化 NOBL の調製が可能であることが示された。

当該 NOBL では、 $\mu\text{m}$  スケールの NOBL よりも内封可能な NO の保持量が増加しており、生体内環境での NO 保持能も向上することが示された。特に、PEG 修飾率 6mol% のナノ化 NOBL では生体内安定性が非常に高く、NO 送達キャリアとして特に適することが示された。

### (5) NOBL の加圧保管試験

調製した NOBL について、長期保管の可能性について検討した。調製した NOBL を高圧バイアル内で 60 分間保管し、NO 保持量を DAF-2 にて測定した。その結果、バイアル内が加圧された条件においては、NOBL、及び、ナノ化 NOBL のいずれにおいても、60 分保管後での蛍光強度の減少は全く認められず、製造直後の NO 量そのまま安定保持されていることが示された。よって NOBL は、バイアル瓶等の内部を加圧条件にして保管することによって、長期保管が可能であることが示された(図2)。

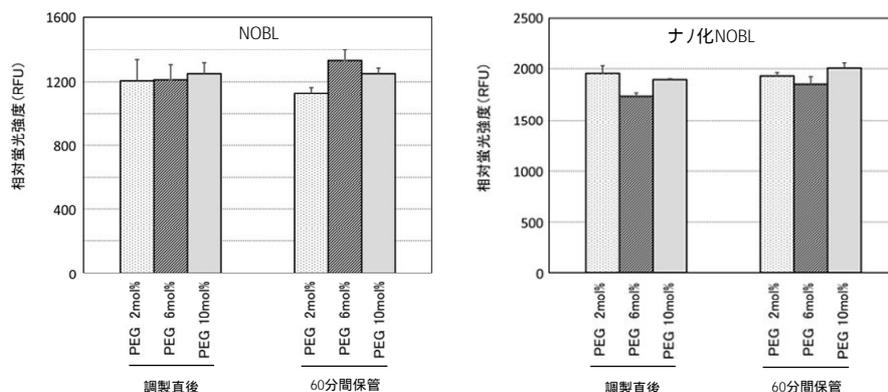


図2. DAF-2 による NO 保持量の評価

### (6) 超音波照射による選択的 NO 放出

体外からの超音波照射により、上記調製した NOBL から任意の部位に選択的に NO 放出を行うことが可能かを検証した。

5-6 週齢の ICR 系統マウスに対して、調製した NOBL 溶液を尾静脈注射により全身投与した。構成脂質は (DSPC : DSPE-PEG2000 = 94 : 6) とした。投与後、治療用の超音波照射装置のプローブを下肢部筋組織に当て、体外からの超音波照射を行った。直後にエバンスブルーを尾静脈内投与した。当該静脈投与から 180 分経過後の筋組織に含まれるエバンスブルー量を定量した。その結果、NOBL を全身投与した後に筋組織に局所的に超音波照射を行うことによって、未照射群と比較して、当該筋組織におけるエバンスブルーの蓄積量が大幅に増加すること

が示された。なお、当該実験における超音波照射は、治療用超音波照射装置を用いた弱い超音波照射を用いて実行することが可能であった。

以上より、NOBLを全身投与した後、目的部位に局所的な超音波照射を行うことによって、任意の組織や部位等に選択的にNOを送達することが可能となることが示された。即ち、NOの生理機能である血管拡張作用を、任意の超音波照射部位に選択的に発揮させることが可能となることが示された。

#### (7) 下肢虚血モデルへの超音波照射併用によるNOデリバリーシステムの有用性評価

作製した下肢虚血モデルマウスを用いて、体外からの超音波照射により、上記調製したNOBLから虚血部位へと選択的にNO放出を行うことで、虚血下肢の血管拡張に伴う血流量が一時的に回復するか否かについて検証した。下肢虚血モデルマウスにナノ化NOBLを尾静脈注射により全身投与し、虚血部位へのバブルの到達性を超音波造影により調べたところ、20分以上バブルが滞留していることが観察された。次にナノ化NOBLの投与後、治療用超音波照射装置のプロローブを下肢部虚血部位に当て、体外からの超音波照射(周波数1MHz、照射強度 $2\text{W}/\text{cm}^2$ 、照射時間120秒)を行った。その結果、治療用超音波照射後のバブルの崩壊を超音波造影により確認することができた(図3)。さらにNO放出後の足裏の血流量の変化をレーザードップラー計にて測定したところ、ナノ化NOBL単独投与では、虚血下肢における血流量の変化は認められなかったのに対し、ナノ化NOBL投与直後に治療用超音波照射した群において、30%ほどの血流量の回復が認められた(図4)。以上より、NOBLを全身投与した後、虚血部位に局所的な超音波照射を行うことによって、選択的にNOを送達することが可能となることが示された。即ち、NOの生理機能である血管拡張作用を、任意の超音波照射部位に選択的に発揮させることが可能となることが示され、NOBLと治療用超音波照射の併用によるNOデリバリーシステムの有用性が明らかとなった。

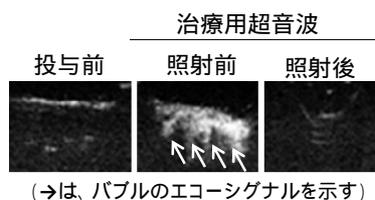


図3. 超音波造影による虚血部位におけるバブルの崩壊性の確認

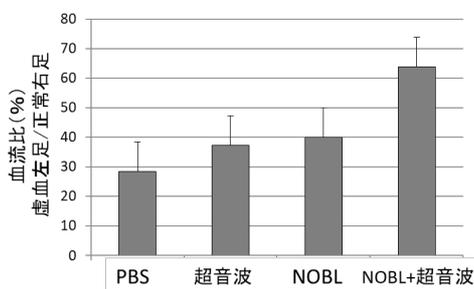


図4. NOデリバリーに伴う虚血下肢の血流量の評価

#### (8) ICAM-1結合ペプチド修飾NOBLの作製

標的指向性を有するリガンド分子(ペプチド)を修飾したNOBLの調製を進め、さらに*in vivo*での有用性を検証した。はじめにICAM-1標的化ペプチドを修飾したNOBLを高速攪拌することで、ペプチド未修飾場合と同様に粒子径が80-200nmにナノ化できることが示された。NO保持量をDAF-2にて測定したところ、バイアル内が加圧された条件においては、60分保管後での蛍光強度の減少は全く認められず、製造直後のNO量がそのまま安定保持されていることが示された。さらに蛍光ラベルしたICAM-1修飾NOBLとヒト血管内皮細胞との相互作用性を蛍光顕微鏡にて調べたところ、安定してバブルが結合していることが示された。次に診断用超音波にてICAM-1修飾NOBL投与後の虚血部位をイメージングしたところ、ペプチド未修飾のNOBLと比較して、やや増加傾向となることが示された。今後更にペプチド修飾量を増加させ調製法を最適化することで、虚血性疾患に対する本NOデリバリーシステムを高度化できるものと期待される。

以上の本研究成果から、超音波造影ガス封入リポソーム(バブルリポソーム)に、NOを内封したバブルリポソームの開発に成功した。実際に超音波造影能を有するNOBLを下肢虚血モデルへと全身投与した後に、虚血部位へと体外からの治療用超音波照射を行うことで、NOデリバリーによる生理機能を発揮できることを明らかとした。このことから虚血性疾患のみならず、NOの供給を必要とする様々な疾患治療のための非侵襲性の高い診断・治療(セラノスティクス)システムの構築に繋がるものと期待される。本研究遂行で得られた基盤技術は、NOガスのみならず、他の生理活性ガス(硫化水素ガスや一酸化炭素ガスなど)を選択的に送達するデリバリーシステムの開発にも有益な情報を提供するものである。

#### 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)

[学会発表](計3件)

澤田ほのか、葦沢 慧、異島 優、高橋葉子、鈴木 亮、丸山一雄、新槇幸彦、丸山 徹、根岸洋一、一酸化窒素ガス内封ナノ・マイクロバブルの調製と物性評価，第33回日本DDS学会学術集会 (2017年7月6日，京都)

Negishi Y, Sawada H, Ishima Y, Suzuki R, Maruyama K, Maruyama T, and Endo-Takahashi Y, Development of nitric oxide gas encapsulating liposomes, The 16th International Symposium on Advanced Technology (ISAT-16) (2018/11/1)

根岸洋一、澤田ほのか、葦沢 慧、異島 優、高橋葉子、笹山瑞紀、鈴木 亮、丸山一雄、丸山 徹，一酸化窒素ガスを内封した超音波応答性バブルリポソームの開発，日本薬学会第138年会 (2018年3月25日，金沢)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称：一酸化窒素内包バブルリポソーム及びその利用

発明者：根岸洋一

権利者：学校法人東京薬科大学

種類：特許

番号：特願2017-101930

出願年月日：出願日2017年5月23日

国内外の別：国内

## 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

丸山 一雄 (MARUYAMA KAZUO)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：30130040

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

鈴木 亮 (SUZUKI, RYO)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：90384784

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)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30453806

丸山 徹 (MARUYAMA, TORU)

熊本大学・薬学部・教授

研究者番号：90423657

### (4) 研究協力者

異島 優 (ISHIMA, YU)

徳島大学・薬学部・准教授

澤田ほのか (SAWADA, HONOKA)

東京薬科大学・薬学部・学部生

笹山瑞紀 (SASAYAMA, MIZUKI)

東京薬科大学・薬学部・学部生