

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3 月 30 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21659400

研究課題名（和文）：超音波とバブルリポソームを使った薬物送達法の開発～眼球用超音波照射装置の開発～

研究課題名（英文）：Development of ultrasound and bubble-liposome-mediated drug delivery to ocular tissues

研究代表者：坂本 泰二（SAKAMOTO TAIJI）

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10235179

研究成果の概要（和文）：超音波とバブルリポソームを組み合わせ、眼組織に薬物・遺伝子送達する方法を開発した。Green fluorescence protein (GFP)遺伝子をバブルリポソームに包埋して、眼表面・眼内に注入し、超音波を局所照射した所、結膜や網膜の意図した部に局限した遺伝子導入が可能であった。特に、ミュラー細胞への遺伝子導入が優れていた。適切なパワーで、照射部位の組織傷害を最小にすることが可能であった。超音波端子は心臓カテーテルで用いるものを改良したものが効果的であった。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel method to deliver genes or drugs to ocular tissues using ultrasound and bubble-liposome. GFP cDNA embedded in bubble-liposome was injected in the vitreous followed by irradiation of ultrasound. GFP was strongly expressed by retina where ultrasound was irradiated. Tissue damage was minimal. We also developed a new ultrasound probe for that.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	0	1,300,000
2010年度	800,000	0	800,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	2,900,000	240,000	3,140,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：超音波、ナノバブル、リポソーム製剤

1. 研究開始当初の背景

多くの薬物が開発されているが、眼科領域では、臨床応用が遅れていた。その大きな理

由が、眼の独特な構造あるいは脆弱性のために、有効な薬物送達法が未確立であったためである。特に、目的部位に局限した薬物送達

法の開発は、安全性と有効性を両立することに大きく寄与する。

遺伝子治療は、従来遺伝性疾患の原因遺伝子を補正するという概念に基づいて誕生した学問研究領域である。そのために多くの研究がなされたが、最近では遺伝子を補正することよりも、遺伝子あるいは遺伝子関連物質を投与する方法の方が現実的であると考えられるようになってきている。これは、遺伝子治療が、薬物治療の一つの分野に含まれるようになったと言える。

この目的のために、我々は当初は遺伝子導入ウイルスベクターとしてアデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクターを用いた。アデノウイルスベクターは遺伝子導入効率は極めて高いという利点はあるが、遺伝子発現期間が短い、あるいは組織傷害性が強いという欠点を持つ。レトロウイルスベクターは遺伝子導入に伴う細胞傷害性は低いものの、遺伝子導入効率が極めて低い。レンチウイルスベクターは、遺伝子導入効率が高く、組織傷害性も低い。遺伝子導入をする際に、導入組織をコントロールできない。レンチウイルスベクターには遺伝子導入による腫瘍発生のリスクがあるので、いわゆる通常疾患には使用しにくいという欠点がある。

そこで我々は5年前より、超音波による遺伝子導入の試みを始めた。その結果、超音波により、角膜上皮細胞に遺伝子導入することが可能であった(Sonoda S et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004)。また、組織傷害性は極めて軽微であった。この方法を応用して、前房内に析出したフィブリンを溶解するために、組織プラスミノゲンアクチベーターのcDNAをサイトメガロウイルスプロモーターを付けて、前房細胞中に遺伝子導入した。その結果、フィブリンを溶解することが可能であった。このことは眼内への超音波遺伝子導入が薬物治療の代替として、十分に可能であることを示したものである(Yamashita T et al. *Ultrasound Med Ther* 2009)。

そこで我々はこの方法を応用して、網膜への遺伝子導入が可能であるかを検討することにした。上記のように、我々の経験によるウイルスベクターにない点(空間限局的遺伝子導入+低傷害性)に利点を見出すために研究を行った。

2. 研究の目的

以上のように、超音波とバブルリポゾームを組み合わせることで、眼球組織とりわけ網膜の局所に遺伝子・薬物を送達することを目的とする。

3. 研究の方法

GFP 遺伝子 (cDNA) を適当なバブルリポゾー

ムに包埋した。白色家兎の硝子体を切除し、網膜表面に直接バブルリポゾームを置いた。具体的には pEGFP-N2, Clontech, Mountain View, CA, USA; 50 μ L を BLs (50 μ L) と混合して、30 秒間かけてゆっくりと網膜前に 27-gauge blunt needle を用いて注入した。その部に、超音波を照射した。条件は US (frequency = 3MHz; duty=6%; intensity = 0.15 W/cm²; time = 60 s) で SonoPore 4000 (NEPA GENE, Chiba, Japan) という器械を用いて上記の条件下で行った。遺伝子導入 48~72 時間後に眼球摘出して、固定した。その後、クライオ切片を作成して、GFP 発現を、直視下、および組織で検討した。定量化については、masked observer により、ランダムに得られた標本について、その強さを定量化して、平均比較した。本操作が及ぼす眼球への影響を、臨床的には施術後 1 週間の生体顕微鏡観察を行い、眼球摘出時に眼科各部位の組織学的検索を行った。

4. 研究成果

網膜のミュラー細胞と視細胞の一部に遺伝子発現を認めた。また、超音波のパワーを変えることで、組織傷害なく遺伝子導入することが可能であった。超音波端子は心臓血管カテーテル用の物を、眼球用に改変したものが、使用感、効率ともに優れていた。超音波を用いた網膜への遺伝子導入は、今までに報告されておらず、世界初の成果と言える。

本研究では MB のうち BL という新しいものを使った。これは Polyethylene glycol (PEG)-liposome に perfluoropropane (C₃F₈) gas を包埋させたもので、超音波を照射することで、気泡が破裂して、その衝撃で遺伝子を網膜細胞に導入するという原理を用いたものである。これは、単純にリポゾームを使ったものに比べて、遺伝子導入効率が高いだけでなく、超音波と組み合わせることで狙った部位に局限して遺伝子導入できるという利点がある。

ただし、いくつかの問題も浮かび上がった。家兎やげっし類などの動物は、超音波照射時に眼球を眼窩から脱臼させることが可能であるので、骨の影響をほぼなくすることが可能である。しかし、人体に应用する場合、眼球を眼窩から脱臼させることは事実上困難である。つまり、眼窩ソケット内に入ったままで眼球に超音波照射をすることになる。超音波は骨に反射されるのみならず、そこからの反射波と発信源が共鳴して、予想できない作用を起こす可能性があることが示唆された。この点は、超音波の発信パワーを低下させるなどの工夫が必要である。また、ミュラー細胞に遺伝子導入することは可能であったが、その他のグングリオン細胞、網膜視細胞、網

膜アマクリン細胞への遺伝子導入効率は低かった。遺伝子導入による目的が、遺伝子を入れることでなく、そこで神経保護因子、血管新生調節因子遺伝子を導入して、微小環境を変化させることであれば、この方法でも十分であるが、直接に神経節細胞や網膜視細胞を活性化させる目的であれば、本方法は限界がある。

今回の研究で、本法は遺伝子導入効率が高かっただけでなく、安全性も高いことが証明された。このことは、人体への臨床応用も可能であることを示唆する。網膜剥離、網膜色素変性症、緑内障など、網膜が障害される疾患は少なくない。その治療に、本法を用いて網膜保護因子遺伝子を導入することが以前から企図されているが、今回の遺伝子導入方法が応用されれば、その試みが現実的なものとなる可能性がある。

本法を応用することで、目的とする網膜局所に薬物や遺伝子を送達することが可能になり、今後の薬物治療へ新しい方法が可能になった。ただし、今回の研究で明らかになった問題点については、引き続き研究を継続して解決する必要がある。

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 15 件)

- ① Sonoda S, Tachibana K, Yamashita T, Shirasawa M, Terasaki H, Uchino E, Suzuki R, Maruyama K, Sakamoto T. Selective gene transfer to the retina using intravitreal ultrasound irradiation. *J Ophthalmol*. Volume 2012, Article ID 412752, 5 pages 査読有. doi: 10.1155/2012/412752
- ② Ueno Y, Sonoda S, Suzuki R, Yokouchi M, Kawasoe Y, Tachibana K, Maruyama K, Sakamoto T, Komiya S. Combination of ultrasound and bubble liposome enhance the effect of doxorubicin and inhibit murine osteosarcoma growth. *Cancer Biol Ther*.2011 Aug 15;12(4):270-277.査読有. DOI: <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.12.4.16259>
- ③ Matsuo Y, Uemura A, Nakano T, Inoue M, Sakamoto T. Atypical presentation of acute macular neuroretinopathy with tiny parafoveal reddish-brown lesions. *Jpn J Ophthalmol*.2011 Jul;55(4)362-364.査読有. DOI: 10.1007/s10384-011-0028-0
- ④ Fujita A, Uchino E, Otsuka H, Arimura N, Noda Y, Ishibashi T, Sakamoto T. Ocular surface molecule after transconjunctival vitrectomy. *Br J Ophthalmol*.2011 Mar;95(3):419-423.査読有.
- ⑤ Otsuka H, Arimura N, Sonoda S, Nakamura M, Hashiguchi T, Maruyama I, Nakao S, Hafezi-Moghadam A, Sakamoto T. Stromal cell-derived factor-1 is essential for photoreceptor cell protection in retinal detachment. *Am J Pathol*.2010 Nov;177(5):2268-2277.査読有. DOI: <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2010.100134>
- ⑥ Shimura M, Yasuda K, Nakazawa T, Takeshita T, Shiono T, Sakamoto T. Combination therapy for retinal vein occlusion. *Ophthalmology*.2010 Sep;117(9)1858,1858.e1-3.査読有. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ophtha.2010.03.077>
- ⑦ Terasaki H, Yamashita T, Tanaka M, Takahashi M, Sakamoto T. Aniridia associated with aphakia and secondary glaucoma.査読有. *Jpn J Ophthalmol*.2010 Sep;54(5):504-505 DOI: 10.1007/s10384-010-0852-7
- ⑧ Sakamoto T, Sheu SJ, Arimura N, Sameshima S, Shimura M, Uemura A, Kawano H, Wu TT, Kubota T, Sohma R, Noda Y. Vitrectomy for exudative age-related macular degeneration with vitreous hemorrhage. *Retina*. 2010 Jun;30(6):856-864. 査読有. 10.1097/IAE.0b013e3181c969cb
- ⑨ Okubo A, Arimura N, Abematsu N, Sakamoto T. Predictable signs of benign course of polypoidal choroidal vasculopathy: based upon the long-term observation of non-treated eyes.2010 Jun;88(4):e107-114. 査読有. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2009.01850.x
- ⑩ Shrestha B, Hashiguchi T, Ito T, Miura N, Takenouchi K, Oyama Y, Kawahara K, Tanchaoren S, Ki-I Y, Arimura N, Yoshinaga N, Noma S, Shrestha C, Nitanda T, Kitajima S, Arimura K, Sato M, Sakamoto T, Maruyama I.B cell-derived vascular endothelial growth factor A promotes lymphangiogenesis and high endothelial venule expansion in lymph nodes. *J Immunol*.2010 May1;184(9)4819-4826.査読有. DOI: 10.4049/jimmunol.0903063
- ⑪ Yamashita T, Kodama Y, Tanaka M,

Yamakiri K, Kawano Y, Sakamoto T. Steroid-induced Glaucoma in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia: A Possible Complication. *J Glaucoma*. 2010. Mar;19(3):188-190. 査読有.
DOI :10.1097/IJG.0b013e3181af321d

- ⑫ Shimura M, Yasuda K, Nakazawa T, Abe T, Shiono T, Iida T, Sakamoto T, Nishida K. Panretinal photocoagulation induces pro-inflammatory cytokines and macular thickening in high-risk proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009. Dec;247(12):1617-1624. 査読有. DOI: 10.1007/s00417-009-1147-x
- ⑬ Yamashita T, Ohtsuka H, Arimura N, Sonoda S, Kato C, Ushimaru K, Hara N, Tachibana K, Sakamoto T. Sonothrombolysis for intraocular fibrin formation in an animal model. *Ultrasound Med Biol*. 査読有. 2009. Nov;35(11):1845-1853. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2009.05.023>

[学会発表] (計25件)

- ① Sakamoto T. Early detection of macular hole closure in gas-filled eyes, Special Invited Lecture. 2011 International ongress of the Korean Retina Society. 2011年6月18日. St Mary's hospital, Seoul, Korea.
- ② Sakamoto T. SDF1 is essential for photoreceptor protection in retinal detachment. 2011 International ongress of the Korean Retina Society. 2011年6月18日. St Mary's hospital, Seoul, Korea.
- ③ Nakao K, Abematsu N, Mizushima Y, Sakamoto T. Optic disc swelling in Vogt-Koyanagi-Harada disease. Joint Congress of SOE/AAO. 2011年6月4日. Geneva, Switzerland.
- ④ Shozo Sonoda, Makoto Shirasawa, Hiroki Otsuka, Toshio Hisatomi, Noboru Arimura, Yasushi Sonoda, Taiji Sakamoto. Assay For Establishment Of Highly Polarized Porcine Retinal Pigment Epithelial Cells. ARVO2011. 2011年5月1日. Fort Lauderdale · U.S.A
- ⑤ Taiji Sakamoto. Chromovitrectomy. Yale Eye Center Clinical Conference Series. 2010年10月22日. U.S.A (New Haven.)

- ⑥ Taiji Sakamoto. Biology of Vitreous Cavity : Roles of Hyalocytes. Yale Eye Center Clinical Conference Series. 2010年10月21日. U.S.A (New Haven.)
- ⑦ 坂本泰二. Non-steroidal anti-inflammatory drug(NSAID)in exudative AMD. 第114回日本眼科学会総会. 2010年4月16日. 名古屋国際会議場 (名古屋市)
- ⑧ Yoshinaga N, Okubo A, Arimura N, Abematsu N, Sakamoto T. Effect of Intravitreal Triamcinolone Acetonide for Polypoidal Choroidal Vasculopathy in Japanese. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting. 2009年5月3日 Fort Lauderdale, U.S.A
- ⑨ Otsuka H, Arimura N, Yamakiri K, Hashiguchi T, Maruyama I, Sakamoto T. Vitreous SDF-1 and other cytokines in rhegmatogenous retinal detachment. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting. 2009年5月3日 Fort Lauderdale, U.S.A

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 血管新生抑制剤

発明者: 小賤健一郎, 坂本泰二, 上笹貫太郎

権利者: 鹿児島大学

種類: 特許

番号: 国内出願 特願 2011-510400

国際出願 PCT/JP2010/057735

出願年月日: 国内 2011年10月20日

国際 2010年4月23日

国内外の別: 国内外とも

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本泰二 (SAKAMOTO TAIJI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 10235179

(2) 研究協力者

立花克郎 (TACHIBANA KATSURO)

福岡大学・医学部・教授

丸山一雄 (MARUYAMA KAZUO)

帝京大学・薬学部・教授