

## 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25年3月31日現在

機関番号：32651  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22500443  
 研究課題名（和文） 脳腫瘍に対する超音波医療のための核酸デリバリーシステムの開発  
 研究課題名（英文） Development of a nucleic acids-delivery system into brain tumor using ultrasound  
 研究代表者  
 馬目 佳信（MANOME YOSHINOBU）  
 東京慈恵会医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：30219539

## 研究成果の概要（和文）：

原発性脳腫瘍の多くを占める神経膠腫は浸潤性が高く予後が不良である。しかし他臓器への遠隔転移を起さないため有効な局所療法を開発すれば予後の著明な改善が期待できる。代表者はこれまで超音波による音響外力と超音波増感剤を利用した脳腫瘍の新しい診断・局所治療システムを開発してきた。本研究ではそれに加えて超音波による核酸の導入条件や補助因子、変調の対象となる転写遺伝子を同定してトランスデューサーを試作し有効な治療補助デリバリー技術を追加した。このことにより治療効果の高い超音波医療のための統合型システムを開発することが可能となった。

## 研究成果の概要（英文）：

Glioma is one of the most common and intractable diseases in the central nervous system. Since the prognosis is unfavorable, alternative therapies have been required. Despite poor prognosis, distant metastasis is rare in the patients and cause of the death is mostly local recurrence of the tumor. For that reason, long survival or even a cure can be expected only by control of local recurrence. Previously, local therapy using therapeutic ultrasound irradiator was developed and beneficial effect of therapeutic insonation to glioma in combination to microbubbles was reported. In this study, to enhance the therapeutic efficacy of the previous approach, a nucleic acids-delivery system using ultrasound was developed. Ultrasound conditions for delivery as well as adjuvant factors for modulation of target transcripts were examined. In addition, a transducer for delivery of nucleic acids was devised and the effects of ultrasound for gene transcriptions were examined.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：超音波医科学、核酸医療

### 1. 研究開始当初の背景

原発性脳腫瘍の中で多くを占める神経膠腫や神経膠芽腫などは浸潤性が高く予後も不良だが、遠隔転移を起こすことは稀であり、有効な局所療法を確立すれば患者の長期生存や治癒が期待できる。代表者はこれまでの研究では超音波を利用して、治療を行いながらイメージングにより診断を行うセラグノーシス・システム装置の開発を行ってきた。このシステムでは治療用の超音波として周波数 500kHz, 連続波を 0-3W/cm<sup>2</sup> の強度で脳局所に照射することが可能であり超音波増感剤のバブル製剤と組み合わせることにより脳腫瘍を物理的に破壊することが可能であった。その研究の過程で腫瘍細胞に細胞傷害性を与える特性がバブル製剤と超音波によるキャビテーション効果、特に細胞膜に孔を空けることによって細胞の活動の維持を破綻させるメカニズムであることに気がついたため同様のメカニズムを利用することにより狙った脳腫瘍組織の細胞に穿孔部から核酸を導入して細胞の性質を変調させることにより、さらに効果的な脳腫瘍治療法の開発ができるのではないかと発想を得た。そのため脳腫瘍組織に核酸を導入できる超音波照射条件を検討して現在の治療に核酸導入を追加できるシステムの開発を行うことを企画した。

### 2. 研究の目的

超音波にはリアルタイムで病巣の状況を診断できるという他の診断装置にない特性を持つがその他に外部から体深部に効率よく物理エネルギーを加えることができるという大きなメリットがある。悪性腫瘍に対しては国内外でも高密度焦点式超音波療法 (HIFU) などの利用が広がっているが、実際には超音波増感剤などを使用すればこのような強力な超音波を用いなくても生体に安全な閾値の超音波照射で十分な治療効果が得られることを研究代表者はこれまでに脳腫瘍に対して示してきた。それらのデータを元に超音波医療に応用できる装置として、

1. 3次元脳腫瘍モデル
2. 音響化学活性物質
3. 脳腫瘍イメージング用超音波プローブ

4. 脳腫瘍音響化学治療用超音波照射装置、の4つの要素から構成される治療システムを作製したがこの研究ではシステムの治療効果を更に高めるため、新たに

5. 超音波による核酸デリバリーシステムを付加し、安全性が要求される脳の病変に対しても核酸医療の併用を可能にすることを目的とした。具体的には脳腫瘍の細胞に外部から遺伝子や RNA 干渉核酸を超音波を用いて独自条件で脳局所組織にデリバリーし、生体内で腫瘍細胞の発現する遺伝子を変調させることでその後の超音波による治療効果を増強させるシステムを構築した。

### 3. 研究の方法

超音波照射により核酸を細胞内のどこの位置まで到達させることができるかが本研究でシステムを成功させるための鍵となる。そこで核酸の細胞内への到達を目指して超音波を照射する条件の最適化と到達部位の確認、導入する核酸配列の決定、トランスデューサーの作製と超音波による中枢神経系細胞への有害事象の有無の確認を行った。核酸のデリバリーに関して頭蓋内照射で治療のための比較的安全な超音波は 200kHz 以上の周波数帯域であり、代表者らは大脳スライスモデルを使用した実験で、例えば 500kHz であれば 0.3W/cm<sup>2</sup> などで人体への影響が少ないことなどを明らかにしてきた。そこで超音波の周波数は予測される効果から①300kHz, ②500kHz, の2つに絞り効果の点から連続波を使用、強度(intensity)について治療用超音波より安全性の確立している 0.3W/cm<sup>2</sup> 以下からデリバリー効率を重視して 5W/cm<sup>2</sup> 強まで条件を振って検討した。対象とした組織はこれまでに報告してきた3次元培養脳腫瘍細胞をモデルとして使用、核酸の到達部位については蛍光を用いて形態学的に観察した。導入する核酸についてまず超音波の治療効果を高める因子のスクリーニングを最初に行った。脳腫瘍細胞が脳内の浸潤や再発、増殖様式に影響を与える細胞接着等のシグナル伝達については数多くの先行研究がある。それらの分子の発現をヒト4種類、ラット3種類の脳腫瘍細胞株を用いてスクリーニングした。結果から発現させる核酸として PTEN、

変調させる核酸として ROCK (Rho キナーゼ : アイソフォームを含む)、上皮成長因子受容体 (EGFR)、STAT3 を選び効果を調べるためにラットまたはヒト脳腫瘍細胞にベクターを作製して導入しどのような変化が期待できるのかについて調べた。超音波強度の選定には最初に超音波単独で直接局所に核酸を導入できる条件を調べたが安全性のため現在の超音波装置で許容されている範囲の超音波で導入効率を増加させる方法を検討し、特に血液脳関門の核酸の通過を超音波で促進する方法の開発を試みた。超音波の中枢神経系細胞への安全性について遺伝子の網羅的解析で発現の変化する転写産物を次世代シーケンサーおよびマイクロアレイにて解析した。なお研究に際して動物実験については東京慈恵会医科大学動物実験委員会での審査による認可を核酸実験については東京慈恵会医科大学遺伝子組換え実験安全委員会での審査による承認を得てから研究を開始している。

#### 4. 研究成果

核酸の超音波を利用した脳腫瘍へのデリバリーについて測定したところ 500kHz, 5.8W/cm<sup>2</sup> の超音波で著明に腫瘍モデルに核酸が導入されることが判明した。この方法での到達部位は細胞質が多く一部は核まで到達しており発現ベクターを供与すると細胞内で遺伝子が発現されることが確認された。この条件でも細胞内で遺伝子が発現するため細胞の生存能力が確認されるものの超音波診断装置における SPTA (Spatial Peak, Temporal Average) の許容基準として 0.72W/cm<sup>2</sup> が挙げられている。そこで 500kHz 連続波でこの超音波強度が核酸を細胞内に導入できる可能性を検討した。核酸のデリバリーに関してもう 1 つの問題は中枢神経系への投与経路である。超音波については音響の物理的外力を脳深部に収束させることができるので腫瘍の破壊範囲などに一定の制御が可能であるが核酸のデリバリーについては可能な限り生理的な投与経路による方法が求められる。近年ナノマテリアルなどの開発が進み中枢神経系への侵入の可能性が問題となっている。そこで *in vitro* の血液脳関門モデルを使ってナノ粒子の血液脳関門の通過について各粒子径による透過係数を測定した。その結果、400nm 以上のナノ粒子は関門を通過しない一方 30nm 以下のサイズの粒子のものは透過係数 4.2Papp(cm/sec) で関門を通過できることを

確認した。また粒子表面を PEG やカルボキシル基で修飾すると透過性は低下するがアミノ基修飾のものは無修飾のものに比べて通過しやすいことが判明した。そこで核酸をナノ粒子と反応させて核酸のデリバリーを行ったところ 0.7W/cm<sup>2</sup> でも細胞内に核酸が導入されることが判った。

脳腫瘍では増殖系のシグナル伝達異常が知られている。そこで A172, T98G, U138MG, KNS42 など神経膠腫細胞を用いて共通するシグナル異常を調べたところ Rho キナーゼ (ROCK), EGFR の発現の亢進や PTEN の発現欠失等が認められた。これらの異常は神経膠腫で共通に認められたため核酸医療の標的になるのではないかと思われる。そこでそれぞれの分子を変調または発現させるベクターを作製して細胞内に導入、安定株を得ることにより各分子の機能の特徴を解析した。中でも脳内で浸潤や再発、増殖様式に影響を与える伝達経路として低分子 G タンパク質 Rho がある。Rho のエフェクターである Rho キナーゼ/ROCK はミオシン軽鎖のリン酸化やアクチン重合促進を介して細胞収縮や肥大、細胞形態や接着性に影響を及ぼす。ROCK のアイソフォームは ROCK1 と ROCK2 の 2 種類があり、ROCK1 では Rho 結合ドメイン、ROCK2 ではキナーゼ活性部位それぞれに対する sh(ショートヘアピン)RNA をデザインしこれらの分子の発現を低下させた。その結果、細胞周期を調べると ROCK1 を変調させた細胞では G0/G1 期、ROCK2 の細胞では G2/M 期の細胞の割合が低下した。また ROCK1 を低下させると脳腫瘍に用いられる抗癌剤のテモゾロミドへの感受性を増加させることが判った。一方、EGFR の変調では細胞倍加時間を 25.7% 増加させるもののテモゾロミドへの感受性を変化させることはなく、PTEN の遺伝子の導入では増殖時間を 1.21 倍に延長させること、細胞周期へは G0/G1 期の割合を低下、G2/M 期の割合を増加させること、テモゾロミドや放射線への感受性を上げることなどを観測した。いずれの分子も脳腫瘍の増殖抑制の方向に作用するがそれぞれ特徴が異なり実際場面では個別に核酸を選択する必要があると考えられる。

以上のように超音波医療のための核酸デリバリーシステムの概要やスペック、特長を明らかとすることができた。また臨床への応用を考える際、中枢神経系を治療する時に最も重要となる点は安全性である。中枢神経系はクリティカルな臓器であり通常の状態では再生させることが難しいため治療では安全性が最も必要とされる。そこで超音波が中枢

神経系細胞へ与える影響について遺伝子転写の変化を包括的に調べることにした。炎症性反応や血液脳関門の維持に関わる小膠細胞、星状膠細胞への影響をまず測定することとして超音波を局所照射して細胞を単離し、RNAを抽出、相補鎖DNAを逆転写反応で作製して次世代シーケンサーで転写の変化する遺伝子を同定した。非照射群と照射群で解析を行うと結論として星状膠細胞では非照射時に転写が盛んな遺伝子は mitochondriaの呼吸等に関与する遺伝子、タンパクや核酸合成の遺伝子細胞の維持・代謝に関与する遺伝子中枢神経系機能に関与する遺伝子等々であったが、超音波を照射すると全体でmRNAの量は3倍程度上昇することや遺伝子のリード数が極端に増える遺伝子が存在することなどが判った。この中には非照射時に転写される遺伝子に加えて、核酸やタンパク質合成酵素や核内の転写因子、細胞内シグナル系、その他の遺伝子の転写が亢進した。一方、小膠細胞でも超音波照射でmRNAの量は3倍程度上昇したが極端にリード数が増える遺伝子はあまり認められなかった。インターロイキンやケモカイン受容体の発現が上昇する特徴が認められた。また超音波が神経幹細胞に与える影響についてマイクロアレイで解析を行ったところ超音波照射で2倍以上発現が上昇した遺伝子3483、発現が減少した遺伝子2766を同定することができた。この中には発現が100倍以上増加するもの(5遺伝子)や50分の1に低下する遺伝子(14遺伝子)等が含まれている。

今回のシステムによる治療技術は、費用が安く手技が簡単な割に予想される効果が高いものと思われる。超音波のみならず抗癌剤や放射線照射への感受性を増加させることが可能な核酸分子も同定された。このシステムの開発によってバブル製剤を使った脳腫瘍への音響力学療法の効果が高まることが期待されるが、超音波医療は元来我が国が他国をリードしていた基幹技術であり、診断装置としても医療で広く使われている。超音波医療の技術水準は既に高まっているため核酸デリバリー技術の開発がわが国からの新しいテクノロジーの産出に繋がると医療のみならず経済・産業界にも貢献するようになると思われる。

##### 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 Kamada M, Ikeda K, Fujioka K, Akiyama N, Akiyoshi K, Inoue Y, Hanada S, Yamamoto K, Tojo Y, Manome Y. Expression of mRNAs of urocortin and corticotropin-releasing factor receptors in malignant glioma cell lines. *Anticancer Research* 32: 5299-5308, 2012.

② Inaba N, Kimura M, Fujioka K, Ikeda K, Somura H, Akiyoshi K, Inoue Y, Nomura M, Saito Y, Saito H, Manome Y. The Effect of PTEN on Proliferation and Drug- and Radiosensitivity in Malignant Glioma Cells. *Anticancer Res.* 31:1653-1658, 2011.

③ Inaba N, Fujioka K, Saito H, Kimura M, Ikeda K, Inoue Y, Ishizawa S, Manome Y. Down-regulation of EGFR prolonged cell growth of glioma but did not increase the sensitivity to temozolomide. *Anticancer Research* 31:3253-3258, 2011.

④ Inaba, N. Ishizawa, S. Kimura, M. Fujioka, K. Watanabe, M. Shibasaki, T. Manome, Y Effect of inhibition of the ROCK isoform on RT2 malignant glioma cells. *Anticancer Research* 30:3509-3514, 2010.

[学会発表] (計2件)

① Kamada M, Ikeda K, Akiyoshi K, Fujioka K, Manome Y Evaluation of the small-molecule release from the Central Nervous System cells by therapeutic insonation The 11th Conference for BioSignal and Medicine (CBSM) 2012.9.1 志摩、三重

② Kouhei Akiyoshi, Kouki Fujioka, Keiichi Ikeda, Yuriko Inoue, Nobuharu Inaba, Yoshinobu Manome. Effect of modulations of intracellular signals on sensitivity to antineoplastic agent. Conference for biosignal and medicine (CBSM) 2011. 2011年6月24日 軽井沢、長野。

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他] (計0件)

##### 6. 研究組織

###### (1)研究代表者

馬目 佳信 (MANOME YOSHINOBU)  
東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：30219539

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし