

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300193

研究課題名(和文)モルフォリノオリゴ搭載ナノバブルと超音波による筋ジストロフィーの革新的治療戦略

研究課題名(英文)Therapeutic systems of muscular dystrophy by morpholino oligonucleotide-loaded nanobubble and ultrasound

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) 13,600,000円、(間接経費) 4,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微小気泡(ナノバブル)の一つとして開発してきた超音波造影ガス封入リポソームにデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)治療用アンチセンスモルフォリノ(PMO)を搭載させたバブルリポソーム(BL)の開発に成功した。さらにBLと超音波照射との併用システムによりDMDモデルマウス骨格筋や心筋へのPMO送達・導入を行うことで、超音波照射部位におけるエクソンスキッピング誘導に伴う顕著なジストロフィンタンパク質の発現回復が可能となることを明らかとした。よって本システムは、DMDの核酸治療において全身筋組織への効率的PMO送達・導入とDMD治療における有用な一手段となると期待された。

研究成果の概要(英文)：It is expected that exon skipping, mediated by antisense oligonucleotides (AOs), is one of the most promising methods for restoration of dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy (DMD) treatment. However, efficient delivery method of AOs is still required for the DMD treatment. We have developed the PEG-liposomes entrapping echo-contrast gas, Bubble liposomes (BLs), which can function as a novel gene delivery tool with ultrasound (US). In this study, to develop an efficient phosphorodiamidate morpholino oligomer (PMO) delivery system, we tested the potency of the BLs combined with US to boost the delivery of PMO and increase the skipping of the mutated exon in the DMD model mouse. The results indicated that the combination of BLs and US increased the efficiency compared with PMO injection alone, leading to enhanced dystrophin expression in the US-focused muscles. Thus, this US-mediated BLs technique may provide an effective delivery method for PMO therapy for DMD muscle.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学

キーワード：超音波 筋ジストロフィー ジストロフィン アンチセンス

1. 研究開始当初の背景

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、筋繊維の変性・壊死を主病変とする遺伝性疾患である。ジストロフィン遺伝子上の変異により、ジストロフィンタンパク質が産生されなくなることで発症する。最近、DMD の全身治療を目的としたアンチセンス核酸：PMO が注目されている。PMO (phosphorodiamidate morpholino oligomer: PMO) は欠損しているジストロフィン遺伝子に配列特異的なエクソスキッピング (エクソン上の変異によって生じたストップコドンの読み飛ばし) を誘導し、そのタンパク質発現を回復させる。PMO は生体内で安定であるが、細胞透過性が低いため、臨床応用には、全身の骨格筋や心筋への導入効率を改善させる核酸送達システムが課題とされている。PMO の全身導入を成功させるには、血管内投与後、筋組織に豊富に存在する毛細血管壁を突破させ、筋繊維への導入を行うことが必要不可欠である。我々は、Polyethylene glycol (PEG) 修飾リポソームに超音波造影ガスを封入した微小気泡 (ナノバブル) - バブルリポソームの開発に着手し、超音波照射との併用により、遺伝子導入効果が得られることを報告している。さらに、バブルリポソームと治療用超音波照射を利用した骨格筋への効率的な遺伝子導入法の確立にも着手し、血管および組織透過性を高めることで高効率かつ広範囲の筋組織への経静脈的遺伝子導入にも成功している。よって、バブルリポソームと治療的超音波照射との併用により、DMD モデルマウス (*mdx*) の心筋・骨格筋への効率的な PMO 送達・導入が可能となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、これらの研究基盤をもとに新規な PMO 搭載バブルリポソームを作製し、筋ジストロフィーモデルマウス (*mdx*) を用いて、PMO を全身の骨格筋や心筋に対して選択的にかつ安全に効率よく導入する超音波核酸導入システムの構築を試み、欠損ジストロフィンタンパク質の発現に伴う筋機能回復を指標に評価し、より少ないアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与量、投与回数で効率的な治療効果を得ることを可能とする DMD 遺伝子治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) バブルリポソームの調製

基本脂質 (中性電荷の脂質) に DPPC 及び DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe を使用し、脂質組成が DPPC: DSPE-PEG₂₀₀₀ = 94 : 6 (molar ratio) となるようにし、REV 法により、リポソームを作製した。また、アニオン性脂質を含有させたりポソームの調製には、DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe、DOPG 及び DPPG を使用し、リポソームを調製した。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を用いてバブルリポソ-

ム懸濁液を調製した。調製したリポソームおよびバブルリポソームの粒子径・電位は、NICOMP 2500 を用いて測定した。

(2) バブルリポソームとカチオン性ペプチド修飾 PMO との相互作用の検討

カチオン性ペプチドを PMO に連結させた PMO を合成し、これを調製されたアニオン性脂質含有バブルリポソームに加え、両者の相互作用性をフローサイトメトリーにて測定し、バブルリポソームの PMO 搭載能を評価した。

(3) 骨格筋への PMO 導入

5-6 週齢の *mdx* マウスの前脛骨筋に PMO (2-10 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) とバブルリポソームの混合溶液を局所投与し、直ちに、前脛骨筋に対して超音波照射 (Frequency; 1 MHz, Duty; 50%, Intensity; 2 W/cm², Time; 60 sec.) をした。超音波照射装置は SONITRON 2000 (NEPA GENE, CO, LTD) を用いた。また、下肢部骨格筋への経静脈内投与では、PMO (10-50 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) とバブルリポソームの混合溶液をシリンジポンプにて、下肢部静脈内より注入し、直後に超音波照射した。また、ピンポイントへの筋組織への導入には、高密度集束超音波照射装置 SONITRON HIFU (NEPA GENE, CO, LTD) を用いた。

(4) 心臓へ PMO 導入

5-6 週齢の *mdx* マウスに PMO (100-500 μg) とバブルリポソームの混合溶液を尾静脈投与し、直ちに、体外から心臓に超音波照射 (Frequency; 1 MHz, Duty; 50%, Intensity; 2 W/cm², Time; 1 min または 8 min) した。超音波照射装置は SONITRON 2000 (NEPA GENE, CO, LTD) を用いた。導入 PMO の組織内分布の解析においては、組織回収後の凍結切片を蛍光顕微鏡にて観察した。

(5) PMO 導入効果の解析

mdx マウスに対し、エクソン 23 とイントロン 23 の境界部に相補的配列の PMO を投与した後に、エクソン 23 のスキッピング誘導が促進されているかを RT-PCR 法により解析した。導入後の筋組織から total RNA を抽出後、cDNA 合成を行い、forward primer (Ex20Fi 5'-CCCAGTCTACCCACCTATCAGAGC-3') と reverse primer (Ex2Ri 5'-CCTGCCTTTAAGCTTCCTT-3') を用い、PCR を行った後にアガロースゲル電気泳動にて検出した。PCR のバンド強度は ImageJ software を用いて解析を行った。エクソスキッピング効率は、[エクソスキッピングしたバンド強度 / エクソスキッピングしたバンドとエクソスキッピングしていないバンドの合計強度] から算出した。

(6) 免疫染色法によるジストロフィン発現の検出

mdx マウスより PMO 導入組織を回収し、凍結切片を作成した。得られた組織切片を抗ジストロフィン抗体 (NCL-DYS2) と反応させた。洗浄後、二次抗体 Alexa Fluor 546 で反応させた。洗浄後、VECTASHIELD Hard・Set Mounting Medium with DAPI で封入し、蛍光顕微鏡にて観察した。

(7)心エコーによる心機能の測定

非侵襲的に心機能を観察するため、心エコー診断装置を使用した探触子には 13 MHz のリニア型を用い、心筋の収縮能を表す左室内径短縮率 (fractional shortening, FS) および心臓のポンプ機能を表す左室駆出率 (ejection fraction, EF) を算出し、導入時における超音波照射の影響を評価した。

(8) 血清クレアチンキナーゼ (CK) 値の測定

mdx マウスの尾静脈から、導入前後に血液を採取し、室温で約 30 分放置後、4℃ で 20 時間前後静置し、遠心分離を行い (1200 g, 30min), その上清を血清とし、血清クレアチンキナーゼ値を測定した。

4. 研究成果

(1) より少ないアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与量、投与回数で効率的な治療効果を得ることを可能とする DMD 遺伝子治療法の確立を目指し、バブルリポソームと超音波照射併用による PMO 導入効果について、*mdx* マウスの局所筋組織 (前脛骨筋) において検討を行った。PMO 単独投与群と比較し、バブルリポソームと超音波照射併用により PMO 導入した群では、mRNA レベルにおいてエクソスキッピングの誘導効率が有意に上昇した (Fig. 1)。また、ジストロフィンタンパク質の発現においても PMO 単独投与群と比較し、バブルリポソームと超音波照射併用により PMO 導入した群では、広範囲かつ均一なジストロフィンの発現が観察され、ジストロフィン陽性筋繊維数が顕著に増加し、少ない投与量で効果が得られることが示された (Fig. 2)。以上の結果から、PMO をバブルリポソームと超音波照射併用により導入することで、PMO 送達エリアが拡大し、より多くの筋繊維に PMO を行渡らせることができるようになること、また、PMO がスプライシングの過程を制御するためには、核内に導入される必要があるが、バブルリポソームと超音波照射を併用することで、組織透過性が上昇し、筋線維の核内へ高効率に PMO が導入されたと考えられる。また、集束超音波装置を用いることで、限局した筋組織へと核酸導入できることも示された。以上より、PMO の筋組織への導入において、バブルリポソームと超音波照射を併用することで、少ない投与量で最大限の PMO の効果を得ることが可能となるものと期待された。

(2) 経静脈的導入法を適用し、より広いエ

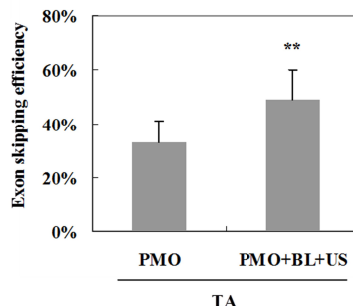


Fig. 1. Detection of exon 23- skipped dystrophin mRNA by RT-PCR. Quantitative analysis by RT-PCR. Exon 23-skipping efficiency in TA muscle was calculated by using the following formula [(the intensity of skipped band) / (the intensity of skipped band + the intensity of unskipped band)]. Data (n=8) are shown as means \pm S.D. ** $P < 0.01$. PMO: Phosphorodiamidate morpholino oligomer. BL: Bubble liposomes. US: Ultrasound.

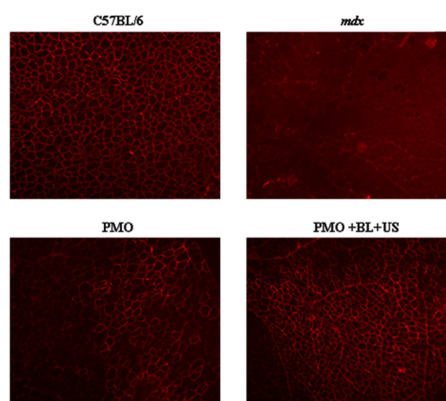


Fig. 2. Detection of dystrophin expression by immunohistochemistry. Dystrophin expression in TA muscle was detected by immunohistochemistry 2 weeks after intramuscular injection of morpholino with Bubble liposomes and ultrasound. Dystrophin expression was examined with fluorescence microscopy.

リアへの PMO 導入が可能となり、それによるジストロフィン発現が認められるか否かについて検討を加えた。RT-PCR によるエクソスキッピングの検出結果から、PMO 単独投与と比較し、バブルリポソームと超音波照射併用 PMO 導入群では、広いエリアの筋肉でエクソスキッピング効率の顕著な上昇が認められた。さらに免疫染色によって、エクソスキッピングと相関性のあるジストロフィンの発現を検出し、その発現領域は、広範囲の下肢部筋組織であることが判明した。中でも超音波照射部位直下であるハムストリング筋において、著しいジストロフィンの発現が観察された。これらのことから本導入法の有用性が示された。

(3) DMD の治療を考える際、心筋でのジストロフィンの発現回復を促す治療法の開発は最も重要な課題である。よって、心筋をターゲットにする特異的な送達システムを開発することで、心筋においてもジストロフィンの発現回復が可能になると考えられる。そこで、バブルリポソームと超音波照射を併用して、心臓への PMO 導入を試みた。PMO とバ

ブルリポソームの混合溶液を尾静脈から投与後、直ちに体外から心臓へ超音波を照射し導入を行った。PMO 単独投与群ではジストロフィンの発現が認められなかったのに対し、バブルリポソームと超音波照射により PMO 導入を行った群では、限局したジストロフィンの発現が観察された (Fig. 3)。さらにジストロフィン発現陽性線維数は、超音波照射時間を延長させることや修飾型 PMO (VMO) を用いることで増加する傾向が認められた。また、心臓への導入処置に伴う障害性が懸念されることから、導入後の心エコーによる心機能の測定を行ったが、導入前後での機能の差異は認められなかった。導入後の血清クレアチンキナーゼ値の測定も経時的に行ったが、バブルリポソームと超音波照射併用の有無に差異を認めなかったことから、本導入法の安全性が確認できた。このことから本導入法の有用性が示された。

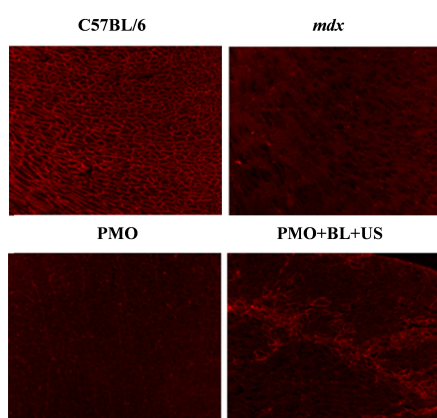


Fig. 3. Delivery of morpholino into heart by Bubble liposomes and Ultrasound. Morpholino and Bubble liposomes were injected into the tail vein of *mdx*, and ultrasound was focused at heart transcutaneously. Two weeks after injection, heart was collected and immunostaining. Dystrophin expression was examined with fluorescence microscopy. Magnification, x 20. PMO: Phosphorodiamidate morpholino oligomer. BL: Bubble liposomes. US: Ultrasound.

(4) PMO の搭載を可能とする新規バブルリポソームの開発を目的として、アニオン性脂質を含有させた PEG-リポソームを新規調製した。粒子径 200 nm のリポソームを作製し、超音波造影ガス (パーフルオロプロパンガス) を封入したところ、500 nm のバブルの調製に成功した。調製されたバブルの造影ガスの保持率を超音波造影装置にて調べたところ、およそ 60 分まで、ガスが安定に保持され、造影効果が維持されていることが示された。作製したアニオン性脂質含有バブルリポソームへのペプチド修飾 PMO (蛍光ラベル化) の搭載を FACS にて解析したところ、アニオン性脂質の含有量が高くなるにつれて、PMO の搭載量が増加することが示された。PMO 搭載バブルリポソームを *mdx* マウスに尾静脈内投与し、心臓への導入を行ったところ、導入に伴うジストロフィン陽性線維数は PMO 投与単独と比較して、バブルリポソームと超音波照射

の併用群において顕著な増加を認めた。以上より、アニオン性脂質含有バブルリポソームの超音波併用による PMO デリバリーツールとしての有用性が示された。さらにアニオン性脂質含有バブルリポソームは、様々なカチオン性化合物のデリバリーツールとなるものと期待された。

以上の本研究成果から、バブルリポソームと超音波照射併用による全身投与を可能とする PMO 導入システムにより、より少ない投与量、投与回数で治療効果が得られることが明らかとなった。今後、更に新規バブルリポソームを利用した導入法の最適化および種々の超音波照射プローブを組み合わせることで、DMD 治療に特化した安全かつ効率的な治療システムの実用化に向けた検討を進め、医療への貢献に繋げていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Negishi Y, Ishii Y, Shiono H, Akiyama S, Sekine S, Kojima T, Mayama S, Kikuchi T, Hamano N, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y, Bubble Liposomes and Ultrasound Exposure Improve Localized Morpholino Oligomer Delivery into Skeletal Muscles of Dystrophic *mdx* Mice., *Molecular Pharmaceutics*, 11: 1053-1061, 2014

DOI: 10.1021/mp4004755

Negishi Y, Hamano N, Shiono H, Akiyama S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y, Development of an ultrasound-mediated nucleic acid delivery system for treating muscular dystrophies., *Yakugaku Zasshi*, 132: 1383-1388, 2012

DOI: <http://dx.doi.org/10.1248/yakushi.12-00235-2>

〔学会発表〕(計 12 件)

- (1) 間山 彩, 根岸洋一, 秋山早希, 櫻井あかね, 高橋葉子, 片桐文彦, 野水基義, 鈴木 亮, 丸山一雄, 新橋幸彦, バブルリポソームと超音波照射併用した修飾型モルフォリノオリゴ導入による筋ジストロフィー治療システムの開発, 日本薬学会第 134 年会 (2014 年 3 月 28 日, 熊本)
- (2) 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, 新橋幸彦, 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)
- (3) Negishi Y, Akiyama S, Mayama S, Yamane M, End-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, and Aramaki Y, Intravenous antisense oligonucleotides delivery system with Bubble liposomes and ultrasound exposure into skeletal muscles of the *mdx* mice, The 5th Asian Arden Conference (2013/8/5,

- Nagoya)
- (4) 秋山早希, 根岸洋一, 間山 彩, 山根正也, 高橋葉子, 鈴木 亮, 丸山一雄, 新樞幸彦, 筋ジストロフィーモデルマウス心筋へのバブルリポソーム併用超音波核酸デリバリーと組織内分布, 第 29 回日本 DDS 学会 (2013 年 7 月 4 日, 京都)
 - (5) 根岸洋一, 秋山早希, 山根正也, 間山彩, 高橋葉子, 鈴木 亮, 丸山一雄, 新樞幸彦, バブルリポソームと超音波を利用した心臓への核酸デリバリーシステムの有用性評価, 第 29 回日本 DDS 学会 (2013 年 7 月 4 日, 京都)
 - (6) 山根正也, 根岸洋一, 奥津大輔, 濱野展人, 小俣大樹, 高橋葉子, 鈴木 亮, 丸山一雄, 新樞幸彦, バブルリポソームと高密度焦点式超音波による核酸導入法の確立, 第 13 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム (2013 年 5 月 11 日, 東京)
 - (7) 間山 彩, 根岸洋一, 秋山早希, 高橋葉子, 鈴木亮, 丸山一雄, 新樞幸彦, 筋ジストロフィー疾患治療のための超音波併用バブルリポソームによるアンチセンスデリバリーシステムの構築, 第 13 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム (2013 年 5 月 11 日, 東京)
 - (8) 根岸洋一, 塩野 瞳, 秋山早希, 高橋葉子, 鈴木 亮, 丸山一雄, 新樞幸彦, バブルリポソームと超音波照射併用による心筋への核酸デリバリー, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012 (2012 年 9 月 24 日, 仙台)
 - (9) 根岸洋一, 塩野 瞳, 秋山早希, 高橋葉子, 鈴木 亮, 丸山一雄, 新樞幸彦, バブルリポソームと超音波照射併用による心臓への核酸デリバリー, 第 12 回遺伝子・デリバリー研究会 夏季セミナー (2012 年 7 月 30 日, 北九州)
 - (10) 濱野展人, 根岸洋一, 塩野 瞳, 秋山早希, 高橋葉子, 鈴木 亮, 丸山一雄, 新樞幸彦, 筋ジストロフィー治療に向けた超音波核酸デリバリーシステムの開発, 日本薬学会第 132 年会(2012 年 3 月 31 日, 大阪)
 - (11) 根岸洋一, 高橋葉子, 鈴木 亮, 丸山一雄, 新樞幸彦, 超音波応答性バブルリポソームの核酸・遺伝子デリバリーシステムへの応用展開, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2011 (2011 年 9 月 2 日, 大阪) (招待講演)
 - (12) Negishi Y, Ishii Y, Sekine S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y, PMO delivery system with Bubble liposomes and ultrasound exposure into skeletal muscles of the mdx mice, American Society of Gene & Cell Therapy 14th Annual Meeting (2011/5/20, Seattle)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 2 件)

- (1) 名称: 負電荷バブルリポソーム及びカチオン性ペプチドからなる薬物送達キャリア
発明者: 根岸洋一、高橋葉子、野水基義、片桐文彦、早川靖彦
権利者: 学校法人東京薬科大学、ネッパジーン株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2013-218027 号
出願年月日: 25 年 10 月 21 日
国内外の別: 国内
- (2) 名称: モルフォリノ搭載バブルリポソームを有効成分としてなる筋ジストロフィー治療薬
発明者: 根岸洋一、高橋葉子、丸山一雄、新樞幸彦
権利者: 学校法人東京薬科大学、ネッパジーン株式会社
種類: 特許
番号: PCT/JP2012/ 61020
出願年月日: 24 年 4 月 25 日
国内外の別: 国外 (米国)
- (3) 名称: モルフォリノ搭載バブルリポソームを有効成分としてなる筋ジストロフィー治療薬
発明者: 根岸洋一、高橋葉子、丸山一雄、新樞幸彦
権利者: 学校法人東京薬科大学、ネッパジーン株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2011-098182 号
出願年月日: 23 年 4 月 26 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: 5 0 2 8 6 9 7 8
- (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: 3 0 1 3 0 0 4 0
高木 教夫 (TAKAGI NORIO)
東京薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 5 0 3 1 8 1 9 3
- (4) 連携研究者
新樞 幸彦 (ARAMAKI YUKIHIKO)
東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 9 0 1 3 8 9 5 9
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
野水基義 (NOMIZU MOTOYOSHI)
東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：00311522

(5) 研究者協力者

田野中浩一 (TANONAKA, KOUICHI)
東京薬科大学・薬学部・教授
丸ノ内徹郎 (MARUNOUCHI, TETSURO)
東京薬科大学・薬学部・大学院生
片桐 文彦 (KATAGIRI, FUMIHIKO)
東京薬科大学・薬学部・大学院生
小俣 大樹 (DAIKI, OMATA)
東京薬科大学・薬学部・大学院生
濱野 展人 (HAMANO, NOBUHITO)
東京薬科大学・薬学部・大学院生
石井 優子 (ISHII, YUKO)
東京薬科大学・薬学部・大学院生
小栗由貴子 (OGURI, YUKIKO)
東京薬科大学・薬学部・学部生
塩野 瞳 (SHIONO, HITOMI)
東京薬科大学・薬学部・学部生
秋山 早希 (AKIYAMA, SAKI)
東京薬科大学・薬学部・学部生
間山 彩 (MAYAMA, SAYAKA)
東京薬科大学・薬学部・学部生
菊池 太希 (KIKUCHI, TAIKI)
東京薬科大学・薬学部・学部生