

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 6 月 14 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究 B

研究期間：2011～2012

課題番号：23792377

研究課題名（和文） ナノバブルと超音波を用いた顎顔面口腔領域の難治性疾患における特異的分子標的治療法

研究課題名（英文） Development of specific molecular target therapy for intractable disease in the oral and maxillofacial Region using the nanobubble and ultrasound

研究代表者

岩永 賢二郎（IWANAGA KENJIRO）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：20448484

研究成果の概要（和文）：超音波造影ガス（パーフルオロプロパン）を封入した新規リポソーム（バブルリポソーム）と超音波を併用することにより、癌細胞や滑膜細胞に効果的に薬剤やプラスミドが導入できた。同バブルへの抗癌剤の封入が困難であったため、ドキソルビシン内包 PEG リポソーム製剤であるドキシルに超音波造影ガスを封入し、新規ナノバブルリポソームの作製に成功した。ヒト歯肉扁平上皮癌細胞 Ca9-22 細胞においてドキソルビシン封入バブルリポソームと超音波の併用による致死活性効果について調べた。超音波照射 96 時間後では、コントロール 100% に対し、EDBL と超音波を併用群では 3.7% と有意な細胞数の減少を認めた。超音波照射 48 時間後では、コントロールと比較し、EDBL と超音波を併用群のみ細胞質が膨張し、形態的变化を認めた。また SubG1 期の著明な増加を認めた。さらに、EDBL と超音波を照射した群で細胞核の断片化を認め、またアネキシン陽性細胞と、アネキシン陽性かつ PI 陽性細胞の増加が認められた。細胞死がアポトーシスによるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Polyethylene glycosylated (PEG) liposome avoids uptake by the reticulo-endothelial system, thus improving drug delivery to tumor while decreasing systemic toxicity. PEG liposomes containing doxorubicin, Doxil®, have been used to treat Kaposi's sarcoma and ovarian cancer in clinics. Doxil® circulates around the body at a stable state and accumulates in tumor by passive targeting. Although it is difficult to release doxorubicin after accumulation into the tumor, we made new bubble liposomes from Doxil® and investigated the effect on cytotoxicity in human gingival squamous cell carcinoma Ca9-22 cells by combination with this new Doxil® bubble liposome, encapsulated doxorubicin bubble liposomes (EDBL), and ultrasound. The combination of EDBL and ultrasound was found to enhance the cytotoxicity of Ca9-22 cells treated by doxorubicin. This findings suggest that combination of EDBL and ultrasound might be an effective drug delivery system against cancer cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
23 年度	900,000	270,000	1,170,000
24 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：ソノポレーション, ナノバブル, 遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

近年、癌などの難治性疾患治療における薬剤、遺伝子の有効性を高める方法として、ナノスケールの運搬体を利用して病巣に選択的に薬剤、遺伝子を送達することを目的とするターゲティング型 DDS が注目を集めている。申請者は、医療用に用いられる程度の出力の超音波と造影剤であるマイクロバブルを併用することにより、様々な細胞や臓器へ薬剤や遺伝子を導入する技術(ソノポレーション法)を開発してきた。リポソームに超音波造影ガスを封入した 1 μm 以下のナノバブルは、その内部に薬剤や遺伝子などを封入することができ、バブル表面の PEG に標的指向性を付与することができる。本申請で、顎顔面口腔領域の難治性疾患に対する同法を用いたターゲティング型遺伝子薬剤導入法を開発、応用する。

2. 研究の目的

本申請で、正常組織への為害性が少なく局所に遺伝子や薬剤を効率的に導入できるソノポレーション法を用いて顎顔面口腔領域の難治性疾患に対する特異的標的治療法を開発する。

3. 研究の方法

まず、口腔扁平上皮癌の治療のために、超音波発振装置とナノバブルリポソームを用いたソノポレーション法を検討した。ドキソルビシン内包 PEG リポソーム製剤であるドキシルに超音波造影ガスを封入し、新規ナノバブルリポソームの作製を試みた。ヒト歯肉扁平上皮癌細胞 Ca9-22 細胞においてドキソルビシン封入バブルリポソームと超音波の併用による致死活性効果について調べた。

また顎関節炎の新規治療法開発の為に、ソノポレーションにて滑膜細胞に抗炎症性サイトカイン発現プラスミドなどの導入を試みた。

また、口腔領域の難治性疾患として肥厚性カンジダ症がある。臨床の場では、アムホテリシン B を封入した DDS 製剤としてアンビゾームが用いられている。今回、リポソーム製剤であるアンビゾームに超音波造影ガスを封入し、新規ナノバブルリポソームの作製を試みた。真菌 (*C. albicans*) において同バブルリポソームと超音波の併用による致死活性効果について調べた。

4. 研究成果

ドキソルビシン内包 PEG リポソーム製剤であるドキシルに超音波造影ガスを封入し、新規ナノバブルリポソームを作製した。ヒト歯肉扁平上皮癌細胞 Ca9-22 細胞においてドキソルビシン封入バブルリポソームと超音波の併用による致死活性効果について調べたところ、超音波照射 96 時間後では、コントロール:100% に対し、ドキシルのみ:89.6%、EDBL のみ:42.8%、超音波のみ:96.1%、ドキシルと超音波併

用:84.2% と細胞数の減少を認めた。EDBL と超音波を併用群では 3.7% と有意な細胞数の減少を認めた。超音波照射 48 時間後では、コントロールと比較し、EDBL と超音波を照射した群のみ細胞質が膨張し、形態的变化を認めた。また、subG1 の著明な増加を認めた。さらに、EDBL と超音波を照射した群で細胞核の断片化を認め、またアネキシン陽性細胞と、アネキシン陽性かつ PI 陽性細胞の増加が認められた。細胞死がアポトーシスによるものと考えられた。

同法を用いたウサギ膝関節由来滑膜細胞 HIG-82 細胞への導入効果をバブルリポソームとマイクロバブル (SonoVue®) で比較した。LacZ, GFP の発現をそれぞれ X-gal 染色、フローサイトメーターで解析したところ、マイクロバブル群に比べ、ナノバブル群で明らかな導入効果の増強が認められた。今回の結果から、*in vitro* の実験系においてウサギ膝関節滑膜細胞へのナノバブルと超音波を用いたソノポレーション法の開発が示唆された。

アンビゾームに超音波造影ガスを封入し、新規ナノバブルリポソームを作製した。真菌 (*C. albicans*) において同バブルリポソームと超音波の併用による致死活性効果について調べたところ、同バブルリポソームを併用した群で、明らかな抗真菌作用の増強を認めた。

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 6 件)

- ① Fujii, S., Okinaga, T., Ariyoshi, W., Takahashi, O., Iwanaga, K., Nishino, N., Tominaga, K., Nishihara, T. : Mechanisms of G1 cell cycle arrest and apoptosis in myeloma cells induced by hybrid-compound histone deacetylase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 434(3) 413-20 2013
- ② Takahashi, O., Okinaga, T., Iwanaga, K., Habu, M., Ariyoshi, W., Tominaga, K., Nishino, N and Nishihara, T: Novel histone deacetylase inhibitor exhibits antitumor activity via apoptosis induction in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Biophysical Chemistry* Vol.2, No.3;:215-221, 2011.
- ③ Sakedai, M., Ariyoshi, W., Okinaga, T., K. Iwanaga, M. Habu, I. Yoshioka, K. Tominaga, T. Nishihara. 2011. Inhibition of adjuvant arthritis in rats by electroporation with interleukin-1 receptor antagonist. *J. Interferon and Cytokine Res.* 2011 Nov;31(11):839-46

〔学会発表〕（計 14 件）

- ① 岩永賢二郎，沖永敏則，山本雅史，西原達次，富永和宏．ナノ・マイクロバブルと超音波を利用したドラッグデリバリーシステムの確立．第 73 回九州歯科学会総会．2013 年 5 月 19 日．北九州
- ② 岩永賢二郎．ナノバブルを利用した超音波遺伝子・ドラッグデリバリーシステムの確立．第 72 回九州歯科学会総会．2012 年 5 月 18 日．北九州

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩永 賢二郎 (IWANAGA KENJIRO)

研究者番号：20448484

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：