

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19390522  
 研究課題名（和文） ソノポレーション法を用いた癌の特異的分子標的治療法の確立と臨床的有効性の確認  
 研究課題名（英文） Development of specific molecular target therapy for cancer using sonoporation and investigation for possibility of clinical application.  
 研究代表者  
 福田 仁一（FUKUDA JIN-ICHI）  
 九州歯科大学・歯学部・特任教授  
 研究者番号：00106270

## 研究成果の概要：

近年、癌治療における薬剤、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および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（Drug Delivery System）が注目を集めている。我々は、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ナノバブルを併用することにより、癌細胞や癌組織に遺伝子や薬剤を導入する技術を見出し、癌の特異的分子標的治療法の実現に向け多くの知見を得ることができた。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2008 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

## 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：癌、遺伝子導入、ソノポレーション、マイクロバブル、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、抗癌剤または癌抑制遺伝子を非ウイルスベクター法で導入する方法を検討してきた。これまで、口腔扁平上皮癌の治療のために、マイクロバブルとソノポレーション法を用いた遺伝子・薬剤導入法を検討し、一定の抗癌効果があることを確認した。しかしマイクロバブルは形状的に大きく（2～4.5 μm）、遺伝子治療の臨床で要求される組織深部に到達することは困難であった。

## 2. 研究の目的

そこで、我々は新たな遺伝子・薬剤キャリ

アーとして超音波造影ガス（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 400～500 nm）（帝京大学薬学部生物薬剤学教室より供与）に着目した。

リポソームに超音波造影ガスを封入した 1 μm 以下のナノバブルリポソームは、その内部に抗がん剤や遺伝子などを封入することができ、超音波照射によるバブルの圧壊で生じるジェット流により細胞に一過性の小孔が生じ、細胞内に薬剤や遺伝子が導入される DDS として使われている。またポリエチレングリコール（PEG）修飾リポソームを用いて

癌細胞表面に過剰発現している受容体 (EGFR) を認識する抗体 (抗 EGFR 抗体) を付与することもできる。これらのバブルを用いれば、ターゲットとなるがん組織にバブルを集積させ、体外からの超音波診断とともに、治療用超音波エネルギーで、抗癌剤および遺伝子を導入することができる。

### 3. 研究の方法

- ① *In vitro* の実験系におけるナノバブルによるソノポレーション法の導入効果検討: pVIVO1-GFP/LacZ を超音波発振装置 (ソニトロン 2000) とマイクロバブル (SonoVue), またはナノバブル (DSPE-PEG liposome) を用いてヒト歯肉扁平上皮癌細胞 Ca9-22 細胞に導入し, 導入効果を検討した。また, ナノバブルを用い, プレオマイシン (以下 BLM) を Ca9-22 細胞に導入し, 抗腫瘍効果を検討した。
- ② 動物実験モデルの確立: ヒト扁平上皮癌細胞 (Ca9-22 cell) をフットパットに移植した担癌マウスを作製し, 腫瘍支配動脈である大腿動脈にナノバブルとルシフェラーゼ発現 pDNA を投与し, 投与と同時に癌組織に超音波を照射する方法で癌組織への遺伝子導入を試みた。
- ③ EGFR を標的とした癌細胞特異的導入法の確立: 抗 EGFR 抗体を作製するここまでの手法は確立している。精製した抗 EGFR 抗体とナノバブルの複合体を用い, 抗癌剤および癌抑制遺伝子を癌細胞に導入し, 導入効果を検討した。
- ④ ナノバブルに内包する癌抑制遺伝子, あるいは抗癌剤の選定: BLM または, ドキソルビシン内包 PEG リポソーム製剤であるドキシルや, EGFR を標的にするモノクローナル抗体薬剤であるセツキシマブ, 新規ペプチド製剤である Ky-2 などを用い, 抗腫瘍効果について検討した。

### 4. 研究成果

- ① *In vitro* の実験系にて, LacZ, GFP 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。このナノバブルを用い, BLM を Ca9-22 細胞に導入したところ, コントロール群に比べ, 導入群で明らかに致死活性効果が増強することを

確認した。

- ② Ca9-22 細胞をフットパットに移植した担癌マウスを用いて, 腫瘍支配動脈である大腿動脈にナノバブルとルシフェラーゼ発現 pDNA を投与し, 投与と同時に癌組織に超音波照射する方法で癌組織への遺伝子導入を試みた。癌組織を回収し, ルシフェラーゼ活性測定を行ったところ, コントロール群に比べ, 導入群では約 100 倍高い遺伝子発現が認められた。
- ③ AFFINIXQ (イニシウム社) を用い, バブルリポソームと抗体との結合を評価したところ, 結合によるものと考えられる周波数の変化を認めた。また, 同バブル溶液をカバーガラス上の Ca9-22 細胞に作用させた後, ピペティングしバブルの残存率を計算したところ, 抗 EGFR 抗体で修飾していないナノバブルの残存率は数%程度であったが, 抗 EGFR 抗体修飾バブルの残存率は約 60%程度あり, 抗 EGFR 抗体修飾ナノバブルの Ca9-22 細胞への特異的付着が確認できた。現在, 同バブルを用いて BLM を Ca9-22 細胞に導入し, 抗腫瘍効果を評価中である。
- ④ BLM または, ドキソルビシン内包 PEG リポソーム製剤であるドキシルや, EGFR を標的にするモノクローナル抗体薬剤であるセツキシマブ, 新規ペプチド製剤である Ky-2 など *in vitro* の実験系にて Ca9-22 細胞に導入したところ一定の抗腫瘍効果を認めた。

### 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 3 件)

- ① Khanal, A., Yoshioka, I., Tominaga, K., Furuta, N., Habu, M. and Fukuda, J.: The BMP signaling and its Smads in Mandibular Distraction Osteogenesis. Oral Diseases 14: 347-355, 2008. 査読有
- ② Hayashi, K., Yoshioka, I., Khanal, A., Furuta, N., Tominaga, K., Fukuda, J.: Effects of latency on bone formation during the consolidation period of rabbit mandibular distraction. Asian J Oral Maxillofac Surg. 20(1):5-11, 2008. 査読有
- ③ Hironobu Maeda, Kazuhiro Tominaga, Kenjiro Iwanaga, Fuminori Nagao, Manabu Habu, Toshiyuki Tsujisawa,

Yuji Seta, Kuniaki Toyoshima, Jin-ichi Fukuda, Tatsuji Nishihara. Targeted drug delivery system for oral cancer therapy using sonoporation. Journal of Oral Pathology and Medicine. 2009. (in press) 査読有

〔学会発表〕(計2件)

- ① Maeda, H., Iwanaga, K., Nagao, F., Tsujisawa, T., Tominaga, K., Fukuda, J., Nishihara, T. Targeted drug delivery system for cancer therapy using sonoporation. 86<sup>st</sup> General Session of the IADR, Toronto, Canada, July, 3, 2008
- ② Nagao, F., Tujisawa, T., Maeda, H., Iwanaga, K., Habu, M., Yoshioka, I., Tominaga, K., Fukuda, J., Nishihara, T. Gene transfer of interleukin-1 receptor antagonist into HIG-82 cells. 86<sup>st</sup> General Session of the IADR, Toronto, Canada, July, 3, 2008

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福田 仁一 (FUKUDA JIN-ICHI)  
九州歯科大学・歯学部・特任教授  
研究者番号：00106270

### (2) 研究分担者

西原 達次 (NISHIHARA TATSUJI)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：80192251

富永 和宏 (TOMINAGA KAZUHIRO)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：40188793

吉岡 泉 (YOSHIOKA IZUMI)  
九州歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号：10305823

土生 学 (HABU MANABU)  
九州歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：00360058

岩永 賢二郎 (IWANAGA KENJIRO)  
九州歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：20448484

(3) 連携研究者  
なし