

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2009
課題番号：19700423
研究課題名（和文） バブルリポソームと超音波の併用による低侵襲性がん遺伝子治療
研究課題名（英文） cancer gene therapy using non-invasive gene delivery with Bubble liposomes and ultrasound

研究代表者
鈴木 亮（SUZUKI RYO）
帝京大学・薬学部・助教
研究者番号：90384784

研究成果の概要：バブルリポソームと超音波照射の併用による新たな遺伝子デリバリー技術の開発を行い、本技術ががん遺伝子治療における低侵襲的な遺伝子導入システムとして有用であることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2000000	0	2000000
2008年度	1300000	390000	1690000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	390000	3690000

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：低侵襲治療システム

1. 研究開始当初の背景

がん遺伝子治療において、がん組織に効率よく遺伝子導入できる方法が必要とされている。これまでの遺伝子導入ベクターの大半はウイルスベクターであり、安全性の点で問題がある。この問題を解決するのは非ウイルスベクターであるが、遺伝子導入効率の低さが問題とされている。そのため、安全で有効な遺伝子治療を確立する上で、非ウイルスベクターの遺伝子導入効率の改善が求められている。

2. 研究の目的

これまでに申請者は、リポソームに超音波造影用ガスを封入した新たなタイプのリポソーム(バブルリポソーム)を開発し、バブルリポソームと超音波の併用により *in vitro* 培養細胞に細胞傷害性を伴うことなくプラスミド DNA を導入可能であることを報告してきた。この遺伝子導入法は、超音波照射時のみに遺伝子を細胞に導入可能であるため、がん遺伝子治療への応用を考慮した場合、がん組織に超音波照射することで、がん組織

特異的に遺伝子を導入可能になると考えられる。また、超音波は体外からがん組織に照射可能であるため、低侵襲的遺伝子導入法としても期待される。そこで本研究では、バブルリポソームと超音波の併用によるがん組織への遺伝子導入の確立およびそのがん遺伝子治療への応用について検討した。

3. 研究の方法

(1) バブルリポソームと超音波照射の併用によるがん組織への遺伝子導入

B6C3F1 マウス背部皮内にマウス卵巣がん細胞 (OV-HM 細胞) を移植し、7 日後にルシフェラーゼ発現プラスミド DNA (pCMV-Luc) およびバブルリポソームを腫瘍内に投与した。その後、超音波を腫瘍に向け体外から照射し、1 日後に腫瘍を回収しルシフェラーゼ発現を検討した。なお、コントロールとして市販の遺伝子導入試薬である Lipofectamine2000 を利用した遺伝子導入も行い、そのときの遺伝子発現についても比較検討した。

(2) バブルリポソームと超音波照射を用いた遺伝子導入によるがん遺伝子治療

B6C3F1 マウス背部皮内にマウス卵巣がん細胞 (OV-HM 細胞) を移植し、7 日後に Interleukin-12 (IL-12) 発現プラスミド DNA (pCMV-IL12) およびバブルリポソームを腫瘍内に投与した。その後、超音波を腫瘍に向け体外から照射した。その後、腫瘍径を指標に抗腫瘍効果を検討した。なお、コントロールとして pCMV-Luc を用いた群でも検討した。

4. 研究成果

(1) バブルリポソームと超音波照射の併用によるがん組織への遺伝子導入

pCMV-Luc 単独、pCMV-Luc とバブルリポソームまたは pCMV-Luc と超音波照射の群では、がん組織の遺伝子発現は低レベルであった。また、Lipofectamine2000 を利用した群でも、遺伝子発現は低レベルであった。一方、バブルリポソームと超音波照射を併用することで、高い遺伝子発現が得られた (図 1)。このことから、バブルリポソームと超音波照射の併用が、既存の非ウイルスベクターとして汎用されているリポフェクション法より効率よくがん組織に遺伝子導入可能なシステムであることが明らかとなった。

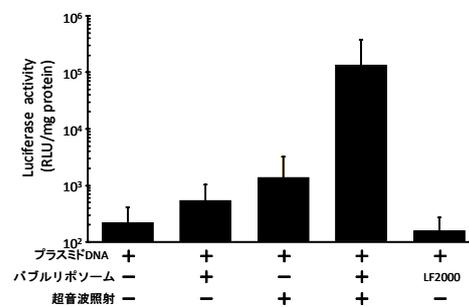


図 1 バブルリポソームを用いたがん組織への遺伝子導入

(2) バブルリポソームと超音波照射を用いた遺伝子導入によるがん遺伝子治療

pCMV-IL12 単独、pCMV-IL12 とバブルリポソームまたは pCMV-IL12 と超音波照射の群では、がん治療効果は認められなかった。また、Lipofectamine2000 を利用した群でも、同様にがん治療効果は認められなかった。一方、バブルリポソームと超音波照射を併用し pCMV-IL12 をがん組織に導入することで、がん治療効果が認められた。しかし、pCMV-Luc をバブルリポソームと超音波照射の併用により遺伝子導入してもがん治療効果が得られなかった (図 2)。このことより、バブルリポソームと超音波照射の併用により pCMV-IL12 をがん組織に導入することで IL-12 ががん組織内で発現し、これにより強

力な抗腫瘍免疫が活性化され、がん治療効果が得られたものと考えられた。

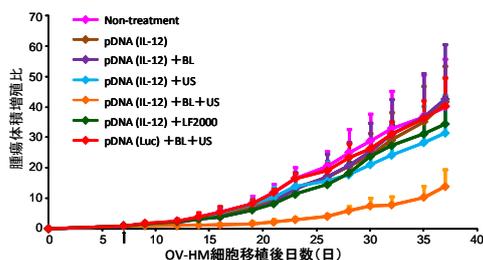


図2 バブルリポソームと超音波照射を用いた IL-12 発現遺伝子導入におけるがん遺伝子治療

以上の結果より、バブルリポソームと超音波照射の併用が、がん遺伝子治療において有用な非ウイルスベクターシステムに成り得ることが明らかとなった。

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 5 件)

- ① Negishi Y, Endo Y, Fukuyama T, Suzuki R, Takizawa T, Omata D, Maruyama K, Aramaki Y., Delivery of siRNA into the cytoplasm by liposomal bubbles and ultrasound. *J Control Release.*, 132(2): 124-130 (2008)、査読：有
- ② Suzuki R, Takizawa T, Negishi Y, Utoguchi N, Maruyama K., Effective gene delivery with novel liposomal bubbles and ultrasonic destruction technology., *Int J Pharm.* 354(1-2): 49-55 (2008)、査読：有
- ③ Zenitani T, Suzuki R, Maruyama K, Furuhashi H, Accelerating effects of ultrasonic thrombolysis with bubble liposomes, *J Med Ultrasonics*, 35:5-10 (2008)、査読：有

- ④ 鈴木 亮, 宇都口直樹、丸山一雄、バブルリポソームと超音波による DDS、化学工業、59(4)、300-57 (2008)、査読：無
- ⑤ Suzuki R, Oda Y, Namai E, Takizawa T, Negishi Y, Utoguchi N, Tachibana K, Maruyama K., Development of site specific gene delivery system with sonoporation, *Yakugaku Zasshi.* 128(2):187-192 (2008)、査読：無

[学会発表] (計 6 件)

- ① 鈴木 亮, 生井栄佑、小田雄介、平裕一郎、根岸洋一、宇都口直樹、立花克郎、丸山一雄 バブルリポソームと超音波の併用による肝臓特異的遺伝子導入法の開発 日本超音波医学会第 8 1 回学術集会、神戸、2008 年 5 月、口頭発表
- ② 鈴木 亮, 生井栄佑、小田雄介、宇都口直樹、根岸洋一、立花克郎、丸山一雄、リポソーム型微小気泡 (バブルリポソーム) を利用した in vivo 超音波遺伝子導入に関する検討、第 2 回超音波分子診断治療研究会、札幌、2008 年 8 月、口頭発表
- ③ 鈴木 亮, 丸山一雄、リポソームテクノロジーを基盤とする DDS と免疫療法の構築、日本油化学会第 4 7 年会 オレオナノサイエンス部会、東京、2008 年 9 月、招待講演
- ④ 鈴木 亮, 生井栄佑、小田雄介、西家功人、宇都口直樹、根岸洋一、丸山一雄、超音波エネルギーを利用した新規遺伝子導入法の開発、日本バイオイメージング学会、2008 年 10 月、千葉、ポスター発表
- ⑤ 鈴木 亮, 小田雄介、宇都口直樹、丸山一雄、リポソーム型微小気泡 (バブルリポソーム) の開発とドラッグデリバリー

への応用、超音波とマイクロバブルの相互作用に関するシンポジウム、2009年1月、名古屋、招待講演

- ⑥ **鈴木 亮**、丸山一雄、超音波感受性微小気泡を利用した薬物・遺伝子デリバリー、第36回日本超音波医学会 北海道地方会、札幌、2009年2月、招待講演

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 亮 (SUZUKI RYO)
帝京大学・薬学部・助教
研究者番号：90384784

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし