

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20717

研究課題名(和文)超音波応答性マイクロバブルを用いた脳腫瘍への薬物送達技術の開発と治療戦略の構築

研究課題名(英文)Development of brain tumor-targeted drug delivery system using microbubbles and ultrasound

研究代表者

小俣 大樹(Omata, Daiki)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：80803113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロバブルと超音波を併用することで、脳腫瘍マウスモデルにおいて、脳腫瘍の血液脳関門オープニングを誘導できることを明らかにした。また、抗がん剤にマイクロバブルと超音波を併用することで、脳腫瘍への抗がん剤移行量を増加させ、生存日数を延長することに成功した。マイクロバブルと超音波を用いた血液脳関門オープニング技術は脳腫瘍治療に貢献すると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロバブルと超音波を用いた血液脳関門オープニング技術が注目されているが、脳腫瘍モデル動物での研究は十分に進められていない。本研究では、脳腫瘍マウスモデルにおいて、マイクロバブルと超音波による抗がん剤デリバリー技術を確立し、脳腫瘍治療効果を得ることに成功した。本研究で得られた知見は、脳腫瘍治療戦略の構築に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)： We demonstrated that the combination of microbubbles and ultrasound could induce the blood brain barrier opening in the tumor tissue in mouse model for brain tumor. We evaluated the cisplatin delivery to the brain tumor using the combination of microbubbles and ultrasound. As a result, the cisplatin amount in brain tumor in the treatment of cisplatin with microbubbles and ultrasound was higher than that of treatment of cisplatin alone. In addition, we assessed the therapeutic effects of the treatment of cisplatin with microbubbles and ultrasound for brain tumor. The duration of survival was prolonged by the treatment of cisplatin with microbubbles and ultrasound. Our results suggested that the combination of microbubbles and ultrasound could efficiently deliver anti-cancer drug to the brain tumor and enhance the anti-tumor effect.

研究分野：薬剤学

キーワード：マイクロバブル 超音波 脳腫瘍 ドラッグデリバリー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍はがん全体の約 5% の割合を占め、がん患者の約 10% は脳へのがん転移を生じる。脳腫瘍に対しては外科的治療、放射線治療、薬物治療が行われている。薬物治療による高い効果を得るためには、薬物を脳実質に存在するがん細胞に対して効率的に送達し、機能させることが重要である。しかし、脳には血液と脳実質の間の物質移行を厳密に制御する血液脳関門が存在し、脳腫瘍に対する薬物治療では血液脳関門により薬物移行が制限されてしまう。そのため、血液脳関門を超えて脳腫瘍へと効率的に薬物送達可能な技術の開発が求められている。近年、薬物を脳内へ送達するために、マイクロバブル (気体を脂質などで覆い安定化した微小気泡) と超音波を利用した血液脳関門オープニング技術が注目されている。これまでの研究の多くは正常な動物に対する血液脳関門オープニング誘導に関する研究が多く、脳腫瘍モデル動物に対する研究は少ない。脳腫瘍治療に本技術を応用していくためには脳腫瘍モデル動物において知見を得ることが重要と考えられた。

### 2. 研究の目的

これまでに申請者らは、低侵襲的かつ効率的な血液脳関門オープニングに適した外殻組成や内包ガスを有するマイクロバブルの開発に成功してきた。また、血液脳関門オープニングに適した周波数や強度などの超音波照射条件を見出してきた。そこで本研究では、脳腫瘍モデル動物において、開発を進めてきたマイクロバブルと超音波を用いた血液脳関門オープニング技術の確立を試みた。さらに、血液脳関門オープニング技術を用いて種々の抗がん剤を脳腫瘍へデリバリーし、治療効果を評価することで、脳腫瘍治療戦略の構築を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) ルシフェラーゼ安定発現細胞株の作製

マウス膠芽腫細胞 (Glioma 261) (National Cancer Institute, US) にレンチウイルスベクターを用いて、ルシフェラーゼ遺伝子を導入し、ルシフェラーゼ安定発現 Glioma 261 細胞 (Glioma 261-Luc) を作製した。

#### (2) 膠芽腫細胞に対する抗がん剤の殺細胞効果

Glioma 261-Luc 細胞を播種し、1 日培養した。その後、抗がん剤としてテモゾロミド、シスプラチンまたはドキソルビシンを種々の濃度で添加し、2 日間培養した。Cell counting kit-8 (DOJINDO Laboratories, Kumamoto) を用いて細胞生存率を評価した。

#### (3) 脳腫瘍マウスモデルの作製

C57BL/6 マウス (雌、6 週齢) を三種混合麻酔 (塩酸メドミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルファンール) で麻酔し、除毛クリームで頭部を除毛した。その後、脳定位固定装置に頭部を固定し、希ヨードチンキで頭皮を消毒した。頭皮を切開し、頭蓋骨を露出したのち、プレグマから右脳側に 2 mm、前方に 1 mm の位置にドリルを用いてバーホールを開けた。マイクロシリンジを用いて、Glioma 261-Luc 細胞 ( $2 \times 10^5$  細胞 / 5  $\mu$ L) を深さ 3 mm の位置に 3 分間かけて投与した。投与後 1 分間静置し、ボーンワックスを用いてバーホールを塞ぎ、皮膚を縫合した。移植から 7 日後または 12 日後に、D-ルシフェリン (150 mg/kg) を腹腔内投与し、IVIS imaging system (Summit Pharmaceuticals International Corporation, Tokyo) を用いて、Glioma 261-Luc 細胞由来の発光を測定した。発光量を指標に群分けを行い脳腫瘍マウスモデルとして以降の検討に使用した。

#### (4) 脳腫瘍へのシスプラチン送達

移植から 12 日後の脳腫瘍マウスモデルをイソフルラン麻酔し、脳定位固定装置を用いて頭部を固定し、移植位置に超音波プローブ (直径 6 mm) を設置した。マイクロバブル (外殻組成 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine:1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol):1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxyl (polyethylene glycol)-2000]=30:60:10 (モル比)、内包ガス パーフルオロプロパン、 $3 \times 10^9$  個/kg) とシスプラチン (2.5 mg/kg) の混合液を尾静脈内投与し、直ちに超音波 (超音波照射装置: Sonitron2000V (Nepa Gene Co. Ltd., Chiba)、周波数: 1 MHz、強度: 0.5 W/cm<sup>2</sup>、時間: 3 min) を照射した。1 時間後にリン酸緩衝液で灌流し、脳を摘出した。脳を左脳、右脳 (腫瘍組織以外) に腫瘍に分割した。組織重量を測定し、硝酸を加え、マイクロ波試料前処理装置 (Ethos one, Milestone General, Kanagawa) を用いて灰化した。その後、誘導結合質量分析法 (ICP-MS iCAP Qc, Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo) によりシスプラチン量を測定した。

#### (5) 脳腫瘍治療効果の評価

移植から 7 日後の脳腫瘍マウスモデルをイソフルラン麻酔し、脳定位固定装置を用いて頭部を固定し、移植部位に超音波プローブを設置した。マイクロバブル ( $3 \times 10^9$  個/kg) とシスプラ

チン (2.5 mg/kg) の混合液を尾静脈内投与し、直ちに超音波 (周波数: 1 MHz、強度: 0.5 W/cm<sup>2</sup>、時間: 3 min) を照射した。その後、5日おきに合計3回の治療を行い、生存日数を追跡した。同様に、マイクロバブル (3 × 10<sup>9</sup> 個/kg) とドキシソルピシン (5 mg/kg) の混合液を投与し、超音波を照射した。1日おきに合計3回の治療、または、連日合計5回の治療を行い、生存日数を追跡した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Glioma 261-Luc 細胞に対する抗がん剤の殺細胞効果

脳腫瘍治療に使用されるテモゾロミドと脳腫瘍治療に適応はないものの様々ながんの治療に使用されるシスプラチンとドキシソルピシンの殺細胞効果を検討した。その結果、テモゾロミドと比較して、シスプラチンおよびドキシソルピシンは Glioma 261-Luc 細胞に対して高い殺細胞効果を示した (図1)。50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出したところ、テモゾロミド 2, 143 μmol/L、シスプラチン 1.45 μmol/L、ドキシソルピシン 0.14 μmol/L であった。このことから、シスプラチンやドキシソルピシンを脳腫瘍へと送達することで高い抗腫瘍効果が得られることが考えら

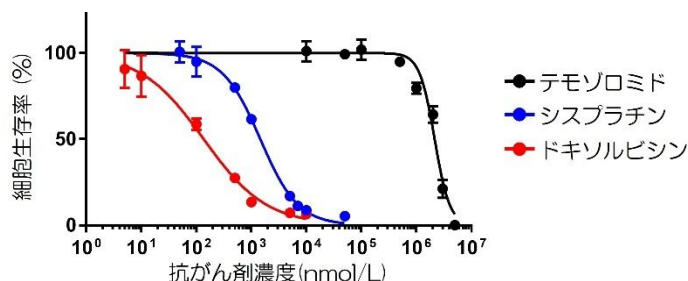


図1. 抗がん剤の殺細胞効果 された。

##### (2) 血液脳関門オープニングとシスプラチン送達

脳腫瘍マウスモデルにシスプラチンとマイクロバブルを投与し、脳腫瘍移植部位に超音波を照射し、腫瘍組織へのシスプラチン移行量を指標に血液脳関門オープニングを検討した。シスプラチン単独投与群では、左脳や右脳と比較して、腫瘍組織でシスプラチン移行量が高い傾向が認められた。これは、腫瘍組織で血管新生が誘導され、血管の透過性が亢進しているためにシスプラチン移行量が高くなったと考えられた。シスプラチンとマイクロバブルを投与し、超音波を照射した群では、シスプラチン単独投与群と同様に、左脳や右脳と比較して、腫瘍組織でシスプラチン移行量が増加した。また、シスプラチン単独投与群の腫瘍組織と比較して、シスプラチンにマイクロバブルと超音波を併用した群の腫瘍組織では有意に高いシスプラチン移行量が認められた (図2)。このことから、マイクロバブルと超音波を併用することで、腫瘍組織の血液脳関門オープニングが誘導されることが示唆された。また、マイクロバブルと超音波を併用することで、腫瘍組織へのシスプラチンデリバリーが可能であったことから、脳腫瘍治療効果が得られることが期待された。さらに、血液脳関門オープニングの特性評価として、血液脳関門オープニングの持続時間を評価した。マイクロバブルを投与し超音波照射を行い、0、3、6または24時間後にシスプラチンを投与し、腫瘍組織への移行量を評価した。その結果、シスプラチン単独投与群の腫瘍組織への移行量と比較し、マイクロバブルと超音波を併用した0または3時間後にシスプラチンを投与すると腫瘍組織へのシスプラチン移行量は有意に高かった。このことから、マイクロバブルと超音波を併用した血液脳関門オープニング誘導効果は少なくとも3時間は持続することが示唆された。

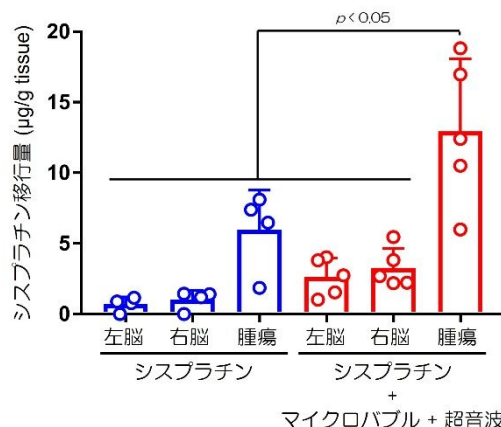


図2. 脳へのシスプラチン移行量

##### (3) 脳腫瘍治療効果

脳腫瘍マウスモデルにシスプラチンとマイクロバブルを投与し、脳腫瘍移植部位に超音波を照射する治療を3回繰り返し、生存日数を指標に治療効果を検討した。その結果、未処置群、シスプラチン単独投与群、マイクロバブルと超音波を併用した群と比較し、シスプラチンにマイクロバブルと超音波を併用した群において、有意な生存日数の延長が認められた (図3)。これは、マイクロバブルと超音波を併用することで、腫瘍組織の血液脳関門オープニングが誘導され、腫瘍組織へのシスプラチン移行量が増加し、抗腫瘍効果につながったと考えられた。次に、ドキシソルピシンにマイクロバブルと超音波を併用する治療を3回または5回行い治療効果を評価した。

その結果、ドキソルビシン単独投与群と比較して、ドキソルビシンにマイクロバブルと超音波を併用した群の生存日数に有意な延長は認められなかった。十分な治療効果が得られず、一部のマウスで体重減少が認められたことから、ドキソルビシンの投与量や治療スケジュールを変更する必要性が可能性が考えられた。これらの結果から、マイクロバブルと超音波を併用することで腫瘍組織の血液脳関門オープニングが誘導され、抗がん剤を効率的にデリバリーできることが示された。

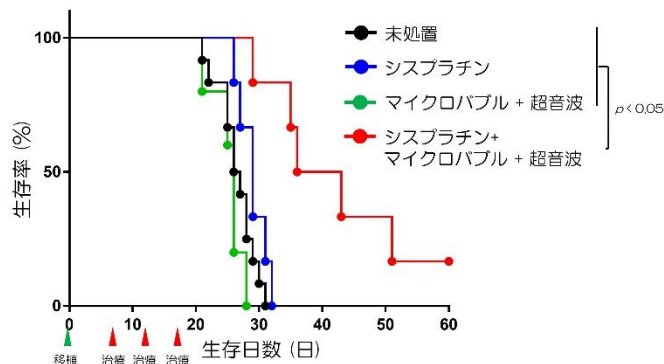


図 3. 治療後の生存日数

本検討から、脳腫瘍マウスモデルに対してマイクロバブルと超音波を併用することで、腫瘍組織の血液脳関門オープニングが誘導できることを明らかにした。また、血液脳関門の透過性が低く、脳腫瘍治療に適応のないシスプラチンおよびドキソルビシンは膠芽腫細胞に対して高い殺細胞効果を示すことを明らかにした。そのため、これらの抗がん剤を腫瘍組織へデリバリーすることで抗腫瘍効果が得られると期待された。実際に、シスプラチンにマイクロバブルと超音波を併用することで、腫瘍組織へのシスプラチン移行量が増加し、生存日数の延長が認められた。本研究で得られた成果は、未だ十分な治療効果が得られていない脳腫瘍に対する治療戦略を構築していくための有用な知見と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Omata Daiki, Munakata Lisa, Kageyama Saori, Suzuki Yuno, Maruyama Tamotsu, Shima Tadimitsu, Chikaarashi Takumi, Kajita Naoya, Masuda Kohji, Tsuchiya Naoto, Maruyama Kazuo, Suzuki Ryo | 4. 巻<br>30              |
| 2. 論文標題<br>Ultrasound image-guided gene delivery using three-dimensional diagnostic ultrasound and lipid-based microbubbles  | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Drug Targeting  | 6. 最初と最後の頁<br>200 ~ 207 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1080/1061186X.2021.1953510  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Omata Daiki, Hagiwara Fumiko, Munakata Lisa, Shima Tadimitsu, Kageyama Saori, Suzuki Yuno, Azuma Takashi, Takagi Shu, Seki Kazuhiko, Maruyama Kazuo, Suzuki Ryo | 4. 巻<br>109               |
| 2. 論文標題<br>Characterization of Brain-Targeted Drug Delivery Enhanced by a Combination of Lipid-Based Microbubbles and Non-Focused Ultrasound                              | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Pharmaceutical Sciences  | 6. 最初と最後の頁<br>2827 ~ 2835 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.xphs.2020.06.008  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>小俣大樹、萩原芙美子、宗像理紗、鈴木悠乃、丸山保、丸山一雄、鈴木亮 |
| 2. 発表標題<br>超音波とマイクロバブルを用いたシスプラチン送達による脳腫瘍治療   |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第142年会                       |
| 4. 発表年<br>2021年                              |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>垣内彩実、小俣大樹、宗像理紗、萩原芙美子、鈴木悠乃、丸山保、梅村晋一朗、吉澤晋、丸山一雄、鈴木亮 |
| 2. 発表標題<br>脳への薬物送達に向けた集束超音波照射条件の検討                          |
| 3. 学会等名<br>第65回日本薬学会関東支部大会                                  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>小俣大樹                            |
| 2. 発表標題<br>超音波とマイクロバブルを用いたイメージング・治療システムの開発 |
| 3. 学会等名<br>第30回日本バイオイメージング学術集会（招待講演）       |
| 4. 発表年<br>2021年                            |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>萩原英美子、小俣大樹、宗像理紗、鈴木悠乃、丸山保、島忠光、丸山一雄、鈴木亮 |
| 2. 発表標題<br>脳腫瘍モデルマウスに対するマイクロバブルと超音波を利用した抗がん剤治療   |
| 3. 学会等名<br>第37回日本DDS学会学術集会                       |
| 4. 発表年<br>2021年                                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>小俣大樹、丸山保、宗像理紗、影山彩織、萩原英美子、鈴木悠乃、丸山一雄、鈴木亮 |
| 2. 発表標題<br>脳標的薬物デリバリーに向けたマイクロバブル開発に関する基礎的検討       |
| 3. 学会等名<br>日本超音波医学会第94回学術集会（招待講演）                 |
| 4. 発表年<br>2021年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Daiki Omata, Tamotsu Maruyama, Fumiko Hagiwara, Lisa Munakata, Saori Kageyama, Yuno Suzuki, Kazuo Maruyama, Ryo Suzuki |
| 2. 発表標題<br>Effect of Encapsulated Gas in Lipid-based Microbubbles on Brain-targeted Drug Delivery                                 |
| 3. 学会等名<br>7th International Symposium on Focused Ultrasound (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>小俣大樹、丸山保、宗像理紗、影山彩織、萩原英美子、鈴木悠乃、丸山一雄、鈴木亮 |
| 2. 発表標題<br>脳標的薬物デリバリーに向けたマイクロバブル内包ガスの最適化          |
| 3. 学会等名<br>第29回日本バイオイメーキング学会学術集会                  |
| 4. 発表年<br>2020年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>萩原英美子、小俣大樹、宗像理紗、影山彩織、鈴木悠乃、丸山保、島忠光、丸山一雄、鈴木亮     |
| 2. 発表標題<br>マイクロバブルを用いた効率的な血液脳関門オープニングへ向けた超音波照射条件に関する基礎的検討 |
| 3. 学会等名<br>第3回日本経頭蓋MRガイド下集束超音波治療研究会                       |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>小俣大樹、丸山保、宗像理紗、影山彩織、萩原英美子、鈴木悠乃、丸山一雄、鈴木亮 |
| 2. 発表標題<br>血液脳関門オープニングに向けたマイクロバブル内包ガスの最適化         |
| 3. 学会等名<br>第27回次世代医工学研究会                          |
| 4. 発表年<br>2020年                                   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Daiki Omata, Tamotsu Maruyama, Fumiko Hagiwara, Lisa Munakata, Tadamitsu Shima, Saori Kageyama, Yuno Suzuki, Kazuo Maruyama, Ryo Suzuki |
| 2. 発表標題<br>Effect of Encapsulated Gas in Microbubbles on Ultrasound-based Drug Delivery for Brain  |
| 3. 学会等名<br>AAPS 2019 PharmSci 360 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>小俣大樹、丸山一雄、鈴木亮             |
| 2. 発表標題<br>脳疾患治療に向けた血液脳関門オープニング技術の構築 |
| 3. 学会等名<br>第18回 日本超音波治療研究会（招待講演）     |
| 4. 発表年<br>2019年                      |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>丸山保、小俣大樹、宗像理紗、島忠光、萩原芙美子、鈴木悠乃、丸山一雄、鈴木亮 |
| 2. 発表標題<br>脳内への超音波薬物送達におけるマイクロバブル内包ガスの影響         |
| 3. 学会等名<br>第63回 日本薬学会 関東支部大会                     |
| 4. 発表年<br>2019年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Daiki Omata, Tamotsu Maruyama, Fumiko Hagiwara, Lisa Munakata, Tadamitsu Shima, Saori Kageyama, Yuno Suzuki, Kazuo Maruyama, Ryo Suzuki |
| 2. 発表標題<br>Brain-targeted Drug Delivery using Ultrasound and Lipid-based Microbubbles loading Different Gases                                      |
| 3. 学会等名<br>Liposome research days 2019 (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-------|---------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 萩原 芙美子<br><br>(Hagiwara Fumiko) |                       |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|