

機関番号：32659
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20300179
 研究課題名（和文）新生血管選択的な超音波造影ガス封入リポソームによる
 低侵襲性血管障害治療システムに関する研究
 研究課題名（英文）Low invasive therapeutic system for vascular diseases by neovascular
 specific liposomes containing US-contrast gas
 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

研究成果の概要（和文）：本研究では、これまでに開発してきた超音波診断造影と薬物・遺伝子導入を可能とする超音波造影ガス封入リポソーム(バブルリポソーム)に、さらに新生血管に集積性の高い標的指向性ペプチドを付与した新規分子標的型バブルリポソームの作製に成功し、これを利用した超音波診断と治療の超音波を併用した遺伝子送達・導入法を確立した。さらに新規な超音波造影剤を利用した血管障害治療システムの構築を行うために遺伝子を搭載可能なカチオン性脂質を利用したバブルリポソームを作製し、虚血部位へのバブルの送達効果を超音波診断造影で確認した。実際に虚血性疾患モデルへの血管新生遺伝子(bFGF)の全身循環を介した超音波遺伝子導入を行うことで、血管新生因子の増加とそれに伴う血流回復を認めることを明らかとした。以上のことから本法が血管障害治療に有用な一手段となることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：Previously, we have developed polyethyleneglycol (PEG)-modified liposomes entrapping echo-contrast gas, Bubble liposomes (BLs), as a ultrasound-mediated gene delivery tool. In this study, to develop a peptide-modified BLs for angiogenic gene delivery, we prepared the AG73 peptide-modified BLs. AG73-BLs could strongly associate with the bFGF or VEGF-stimulated HUVEC and enhance the gene transfection efficiency into the HUVEC by the combination of US exposure. Furthermore, to make stably pDNA/BLs complexes, we developed BLs containing DOTAP (DOTAP-BLs) as a cationic lipid and PEG. When bFGF-expressing plasmid DNA/DOTAP-BLs complexes were administrated into ischemic mice model via intravenously and ultrasound was immediately exposed to the ischemic site, the blood flow could be recovered and angiogenic-related genes could be enhanced. These results suggest that AG73-BLs and DOTAP-BLs may be a useful tool for ultrasound-mediated gene delivery in an angiogenic gene therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

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：新生血管, 超音波造影ガス封入リポソーム, 超音波照射, 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

近年、虚血性血管障害に対する新たな治療法として、血管新生遺伝子治療法が期待されている。しかし、患者の筋肉内に直接遺伝子を投与するため、侵襲性がその問題点として挙げられる。これまで我々は、Polyethylene glycol (PEG) 修飾リポソームに超音波造影ガスを封入した PEG 修飾バブルリポソームの開発に着手し、超音波造影能および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。これは、超音波を PEG 修飾バブルリポソームへと照射することで、キャビテーションを起こし、発生するマイクロジェット流を駆動力として導入する方法であり、PEG 修飾バブルリポソームを併用することでより低い超音波照射強度かつ短時間の照射で効果的な遺伝子導入を可能とするものである。さらに分子標的型また、遺伝子搭載型のバブルリポソームの開発は、虚血部位への造影剤の集積による高感度な造影のみならず、疾患部位のみへの超音波照射にともなう選択的導入を可能とするものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、バブルリポソームにさらに新生血管に集積性の高い標的指向性ペプチドを付与し、超音波診断と治療的超音波を併用した遺伝子送達・導入法を確立することで、低侵襲性血管障害治療システムの構築を目指す。新生血管への標的指向性を付与するために細胞接着や血管新生などに関与するラミニン-1 由来ペプチド (AG73) を用い、また、カチオン性脂質の利用で、遺伝子搭載可能なバブルリポソームを作製する。これらを下肢虚血モデル動物に投与し、超音波診断と治療的超音波との併用により、血管新生遺伝子 (bFGF) の全身循環を介した超音波遺伝子導入を行うことで、新規バブルリポソームの有用性を明らかとする。

3. 研究の方法

(1) バブルリポソームの調製

基本脂質に 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、DOTAP 含有リポソームの調製には、DPPC, DOTAP, DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe, DSPE-PEG₇₅₀ の 4 種を使用し、リポソームを調整した。パーフルオロプロパンを封入することでバブル化した。

AG73 ペプチドリポソームの調製においては、DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal を利用し、ペプチド修飾を行った。

(2) AG73 バブルリポソームと細胞相互作用

細胞懸濁液 (2×10^5 cells/mL) を播種後、DiI 標識 AG73 バブルリポソームを加え、相互作用させた。細胞を回収し、細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーにより測定した。

(3) 造影効果の検討

6 well プレートに細胞を播種し、24 時間後、AG73 バブルリポソームを添加し、細胞と相互作用させ、小動物用超音波診断装置である UltraView MHF-1 (NEPA GENE, CO, LTD) により造影を行った。

(4) 還流培養システムによる AG73 バブルリポソームの細胞接着性

セルカルチャーインサート (BD) で調製した HUVEC (2×10^5 cells) を播種し 18 時間後、細胞混合培養システム MK2000 (ヤマト工機) にセットし、DiI 標識 AG73 バブルリポソームと 10% FCS 含有培地の混合溶液を shear stress; 3.92 dyn/cm^2 で 5 分間負荷し、室温で還流させた。その後、Alexa Flour 488 ファロイジンで細胞骨格を染色後、蛍光顕微鏡により観察した。

(5) 遺伝子導入

レポーター遺伝子として、CMV プロモーター制御下で Luciferase を発現する pcDNA 3-Luc を用いた。遺伝子導入の前日に播種した細胞 (3×10^4 cells/well/48 well プレート) に、PEG 修飾バブルリポソームおよび pDNA を 10% FCS 含有培地で混合し、各 well に添加し、SONOPORE KTAC-3000 (NEPA GENE, CO, LTD) を用いて、速やかに超音波照射 (Duty : 50%, Intensity : $1-4 \text{ W/cm}^2$, Time : 5-60 sec.) した。その後、Luciferase 活性を測定した。また、AG73 バブルリポソームによる遺伝子導入を行う際には、細胞と AG73 バブルリポソームを接着させ、超音波照射した。DOTAP-BL 及び従来型バブルリポソームによる遺伝子導入においても同様に行った。細胞は C2C12 細胞または、HUVEC を用いた。

(6) pDNA とバブルとの相互作用

DOTAP-BL を PBS で希釈し、FITC 標識 pDNA を添加した後、フローサイトメトリーにより測定した。

(7) 下肢虚血モデルの作製

ICR マウス (5-6 週齢, ♂) を使用し、左下肢の中間部の皮膚を切開し、大腿動脈を切除し、虚血モデルマウスを作製した。なお、動

物実験に関しては、所属機関における指針に基づき、動物実験委員会に申請し、承認を受けた後、ヘルシンキ宣言に基づき動物愛護の精神を遵守しつつ行った。

(8) 全身循環を介した遺伝子導入

虚血モデルマウスに DOTAP-BL と pDNA の複合体溶液を投与し、下肢虚血部位への超音波照射 (Duty: 25~100%, Intensity: 2~3 W/cm², Time: 30~300 sec.) をした。照射装置は SONITRON 2000 (NEPA GENE) を用いた。

(9) 血流測定

下肢虚血モデルへの遺伝子導入後 8 日までの下肢の血流をレーザー組織血流計 (OMEGA FLO, FLO-C1) を用いて計測した。

(10) 下肢虚血部位での種々の血管新生関連因子の mRNA 発現

遺伝子導入 3 日後に大腿筋を回収し、total RNA 抽出を抽出精製し、cDNA 合成し、定量 Real time PCR を行った。内在性コントロール遺伝子としては、18S ribosomal RNA を用いた。

4. 研究成果

AG73 をバブルリポソーム膜表面に修飾した AG73 バブルリポソームを調製し、分子標的型の新規超音波造影剤としての可能性と超音波併用による遺伝子導入効果について検討し、以下の結果を得た。

(1) FACS 解析より、AG73 バブルリポソームはシンデカンを介して接着していることが明らかとなった。さらに血管新生促進因子である VEGF と bFGF を用いて、AG73 バブルリポソームの細胞接着性に及ぼす VEGF または bFGF の影響について調べたところ、刺激されている HUVEC 細胞により多くの AG73 バブルリポソームが接着することが確認された (Fig.1)。このことから AG73 バブルリポソームの新生血管を標的化する分子標的型バブルリポソームとしての可能性が期待された。

(2) 生体内への投与を考えた場合、AG73 バブルリポソームが造影効果を有すること、また AG73 バブルリポソームが血流を介して血管新生部位に集積する必要がある。そこで、AG73 バブルリポソームの造影効果の検討と、生体での血流を模倣した還流培養システムにおける HUVEC 細胞への細胞接着性を評価した。その結果、接着した AG73 バブルリポソームは造影効果を有すること、また、循環培養液中においても AG73 バブルリポソームの細胞接着性が明らかとなった (Fig. 2)。このことから、AG73 バブルリポソームの分子

標的型の超音波造影剤としての可能性が示唆された。

(3) 細胞膜近傍でのキャビテーション誘導が遺伝子導入効果の増強につながるか否かを明らかとするため、細胞を培養プレートに播種後、AG73 バブルリポソームと相互作用させ、超音波併用による HUVEC への遺伝子導入を試みた。その結果、AG73 バブルリポソームを細胞に接着させた後に超音波照射することで、遺伝子導入効果が増強することが示された (Fig. 3)。このことから、AG73 バブルリポソームが HUVEC に接着し、造影効果を有すること、さらには超音波併用による遺伝子導入効果を増強させることが明らかとなった。

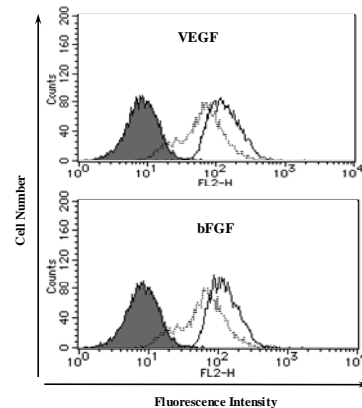


Fig. 1 Effect of VEGF or bFGF on adhesion activity of AG73-Bubble liposomes

■ ; control ; AG73 — ; AG73 + VEGF or bFGF

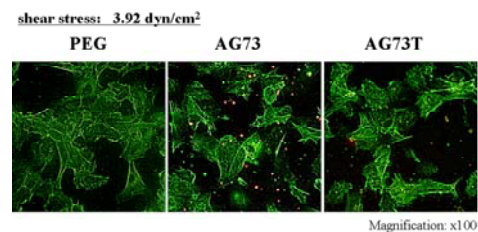


Fig. 2 Adhesion activity of AG73-Bubble liposomes in Perfusion chamber system

Green : Phalloidin-FITC

Orange : DiI-labeled AG73-Bubble liposomes

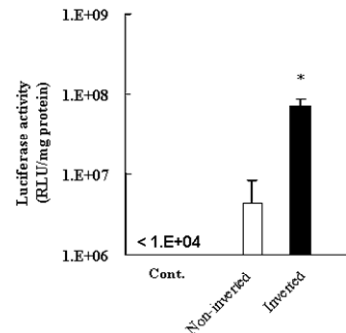


Fig. 3 Bubble liposomes and ultrasound-mediated enhancement of luciferase gene expression in inverted culture

*: $P < 0.005$, compared with non-inverted.

(4) 投与したバブルリポソームと pDNA の複合体の体内動態を一致させ、血中ヌクレアーゼによる分解を回避し、全身循環を介した遺伝子導入をより効率的に行う必要がある。そこでバブルリポソームの構成脂質にカチオン性脂質 DOTAP を加え、鎖長の異なる PEG を 2 種類用いた DOTAP 含有バブルリポソーム (DOTAP-BL) を調製し、pDNA との相互作用を検討した。その結果、pDNA との相互作用は、カチオン性脂質である DOTAP が含まれることにより、静電的相互作用が起こり、アニオン性である pDNA が DOTAP-BL に搭載され、複合体を形成することが明らかとなった。さらに、pDNA との相互作用は、鎖長の異なる 2 種の PEG₂₀₀₀ 及び PEG₇₅₀ の比率も重要であることも判明した (Fig. 4)。

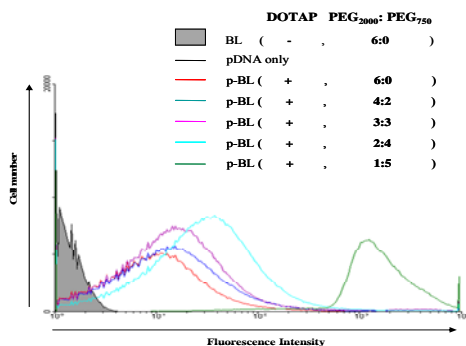


Fig. 4 Effect of PEG chain length on interaction between DOTAP-BL and pDNA

(5) DOTAP-BL の遺伝子導入効果を検討するために、*in vitro* における導入条件の最適化、及び DOTAP を含有しない従来型バブルリポソームとの比較検討を、C2C12 細胞及び HUVEC を用いて検討を行ったところ、従来型バブルリポソームと同程度の遺伝子導入能を有し、筋芽細胞や内皮細胞にも適用可能であることが明らかとなった。

(6) 血流量が著しく低下している下肢虚血部位への全身投与による DOTAP-BL の移行性を確認することは、体外からの超音波照射併用による標的部位への効率的な遺伝子導入を達成する上で重要である。そこで、DOTAP-BL が、全身循環を介して下肢虚血部位へ到達可能であるか否か、超音波診断装置を用い、下肢虚血部位での超音波イメージングを行った。その結果、静脈内投与後、DOTAP-BL は 10~20 sec 後に下肢虚血部位での顕著な輝度の上昇が認められた (Fig. 5)。このことから、静脈内投与された DOTAP-BL は、全身循環を介して、下肢虚血部位へ送達されていることが明らかとなった。

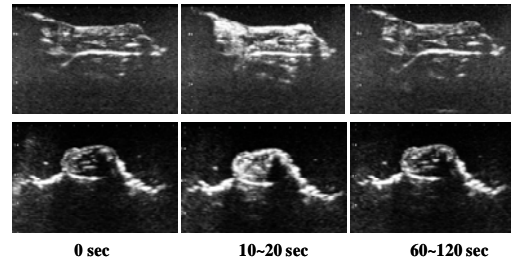


Fig. 5 Imaging of DOTAP-BL by US imaging in hind-limb

Ischemic Mice were injected with DOTAP-BL via *i.v.* The ischemic hind-limb of mice were immediately imaged using US-imaging system after treated DOTAP-BL. Upper panels are longitudinal imaging of ischemia hind-limb. Lower panels are cross-section imaging of ischemia hind-limb.

(7) 血管新生療法への応用を目標とし、下肢虚血モデル及び治療遺伝子として bFGF を用い、DOTAP-BL を用いた治療遺伝子の超音波導入による下肢虚血性疾患治療法への応用を試みた。まず、最適遺伝子導入条件を用いて、全身循環を介して治療用遺伝子として、bFGF を下肢虚血部位へ導入することにより下肢虚血モデルの血流量の変化をレーザー Doppler 装置を用いて検討した。その結果、PBS 投与群及び control pDNA を投与した control 群に比べ、bFGF 投与群において、有意な血流量の改善が認められた (Fig. 6)。

また、mRNA レベルにおける血管新生関連遺伝子の発現量の検討を行ったところ、Fig. 7 に示すように、PBS 投与群に比べ、bFGF 投与群では、種々の血管新生関連遺伝子の mRNA レベルにおける上昇が認められ、bFGF を導入することによる血管新生関連遺伝子の発現上昇が確認された。

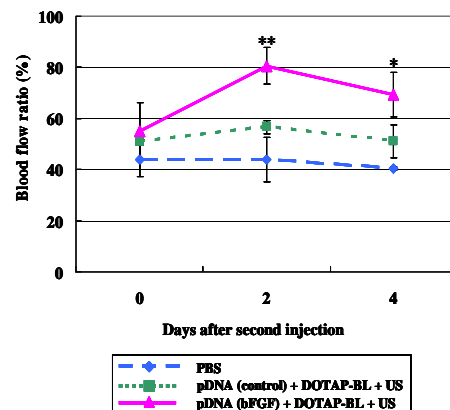


Fig. 6 Effect of DOTAP-BL and US mediated bFGF gene transfer on recovery of blood flow in ischemic limbs by systemic circulation

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with PBS or pDNA (control)+DOTAP+BL+US

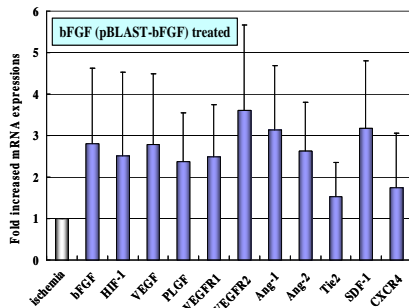


Fig. 7 mRNA expressions of angiogenic genes by real time PCR analysis

以上より、下肢虚血モデルへの DOTAP-BL を用いた経静脈の全身循環における超音波遺伝子導入法は虚血性疾患治療法において有用な手段となることが明らかとなった。

現在、下肢虚血モデルへの DOTAP-BL を用いた経静脈の全身循環における超音波遺伝子導入法の有効性が明らかとなったので、DOTAP-BL にさらに AG73 ペプチドを修飾した AG73 バブルリポソームによる虚血部位への *in vivo* 遺伝子導入法の最適化を進めている。今後詳細な検討を加えることで、より安全かつ効率的な血管新生遺伝子治療システムの開発を進める予定である。

血管障害の治療法である血管新生療法の中でも特に、血管新生促進因子を発現する遺伝子を疾患部位へと導入する遺伝子治療は、臨床応用が期待されていることから、今後、さらに新規バブルリポソームを用いた遺伝子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行きたい。

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下線)
〔雑誌論文〕(計 7 件)

- (1) Negishi Y, Tsunoda Y, Endo Y, Takagi N, Suzuki R, Maruyama K, Emoto M, Nomizu M, and Aramaki A, Ultrasound imaging and gene delivery by AG73-modified bubble liposomes, *Peptide Science* 2008, p127-130, 2009
- (2) Negishi Y, Sekine S, Endo Y, Nishijima N, Suzuki R, Maruyama K, and Aramaki Y, Intravenous Delivery of pDNA and siRNA into Muscle with Bubble Liposomes and Ultrasound, *9th International Symposium Therapeutic Ultrasound. AIP Conf. Proc.*, 1215, 299-302, 2009.
- (3) Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Takagi N, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y, Intramuscular Injection of Angiogenic Gene with Bubble Liposomes Followed by

Ultrasound Exposure to Improve Angiogenesis, *10th International Symposium Therapeutic Ultrasound. AIP Conf. Proc.*, in press

- (4) Negishi Y, Omata D, Iijima H, Takabayashi Y, Suzuki K, Endo Y, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y, Enhanced laminin-derived peptide AG73-mediated liposomal gene transfer by bubble liposomes and ultrasound., *Mol Pharm.*, 7: 217-226, 2010
- (5) Negishi Y, Omata D, Iijima H, Hamano N, Endo-Takahashi Y, Nomizu M, Aramaki Y, Preparation and characterization of laminin-derived peptide AG73-coated liposomes as a selective gene delivery tool., *Biol Pharm Bull.*, 33: 1766-1769, 2010
- (6) Negishi Y, Matsuo K, Endo-Takahashi Y, Suzuki K, Matsuki Y, Takagi N, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y, Delivery of an Angiogenic Gene into Ischemic Muscle by Novel Bubble Liposomes Followed by Ultrasound Exposure., *Pharm. Res.*, 28: 712-719, 2011
- (7) Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y, Development of gene delivery system into skeletal muscles by bubble liposomes and ultrasound., *YAKUGAKU ZASSHI*, 130: 1489-1496, 2010

〔学会発表〕(計 14 件)

- (1) Y. Negishi, K. Matsuo, Y. Endo-Takahashi, K. Suzuki, Y. Matsuki, N. Takagi, R. Suzuki, K. Maruyama, and Y. Aramaki, Intramuscular Injection of Angiogenic Gene with Bubble Liposomes Followed by Ultrasound Exposure to Improve Angiogenesis, 10th International Symposium on Therapeutic Ultrasound (2010/6/10, Tokyo)
- (2) D. Omata, Y. Negishi, Y. Endo-Takahashi, R. Suzuki, K. Maruyama, M. Nomizu, and Y. Aramaki, Ultrasound-targeted Bubble Liposomes Destruction Enhances AG73-mediated Gene Transfer by Improvement of Intracellular Trafficking, 10th International Symposium on Therapeutic Ultrasound (2010/6/10, Tokyo)
- (3) Y. Negishi, Y. Endo-Takahashi, N. Takagi, R. Suzuki, K. Maruyama, Y. Aramaki, bFGF Gene Transfer into Skeletal Muscle of Hindlimb Ischemia Model by Bubble Liposome and Ultrasound, International Liposome Research Days and Lipids, Liposomes, & Membrane Biophysics (2010/8/4, Vancouver)

- (4) Y. Negishi, N. Hamano, Y. Endo-Takahashi, R. Suzuki, K. Maruyama, M. Nomizu, M. Emoto, and Y. Aramaki, Development of AG73-modified Bubble liposomes as a vascular targeting ultrasound contrast agents, The 2010 World Molecular Imaging Congress (2010/9/8, Kyoto)
- (5) Y. Negishi, Y. Endo-Takahashi, R. Suzuki, K. Maruyama, and Y. Aramaki, In vivo gene delivery system by Bubble liposomes and Ultrasound, 12th International Symposium on Ultrasound Contrast Imaging (2010/12/11, Tokyo) (招待講演)
- (6) N. Hamano, Y. Negishi, Y. Endo-Takahashi, R. Suzuki, K. Maruyama, M. Nomizu, C. Batsuren, M. Emoto, and Y. Aramaki, Ultrasound imaging of tumor model by AG73 peptide modified Bubble liposomes, 12th International Symposium on Ultrasound Contrast Imaging (2010/12/11, Tokyo)
- (7) 根岸洋一, 高橋葉子, 高木教夫, 鈴木亮, 丸山一雄, 新榎幸彦, バブルリポソーム併用超音波遺伝子デリバリーシステムの疾患治療への応用, 第3回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 (2011年1月22日, 東京) (招待講演)
- (8) 根岸洋一, 松尾慶子, 遠藤葉子, 鈴木健太郎, 高木教夫, 鈴木亮, 丸山一雄, 新榎幸彦, 超音波技術を利用した下肢虚血モデルへの bFGF/SDF-1 遺伝子導入効果の解析, 日本薬剤学会第24年会 (2009年5月21日, 静岡)
- (9) Y. Negishi, S. Sekine, Y. Endo, N. Nishijima, R. Suzuki, K. Maruyama, and Y. Aramaki, Intravenous Delivery of pDNA and siRNA into Muscle with Bubble Liposomes and Ultrasound, 9th International Symposium on Therapeutic Ultrasound (2009/9/23, Aix en Provence)
- (10) 根岸洋一, 鈴木健太郎, 遠藤葉子, 高木教夫, 鈴木亮, 丸山一雄, 新榎幸彦, バブルリポソームと超音波技術の融合による下肢虚血モデルへの bFGF/SDF-1 遺伝子導入効果の解析, 第9回日本再生医療学会総会 (2010年3月19日, 広島)
- (11) 濱野展人, 根岸洋一, 遠藤葉子, 鈴木亮, 丸山一雄, 野水基義, Chojamts Batsuren, 江本精, 新榎幸彦, AG73 ペプチド修飾バブルリポソームを用いた新生血管を標的化する新規超音波造影剤の開発, 日本薬学会第130年会 (2010年3月28日, 岡山)
- (12) 根岸洋一, バブルリポソームと超音波技術を融合した筋組織への遺伝子導入システムの開発, 日本薬学会第130年会 (2010年3月28日, 岡山) (招待講演)
- (13) Y. Negishi, Development of AG73-modified Bubble liposomes as a targeted ultrasound imaging gas, The 10th International Symposium on Ultrasound Contrast Imaging (2008年12月13日, 東京)
- (14) K. Matsuo, Y. Negishi, Y. Endo-Takahashi, N. Takagi, R. Suzuki, K. Maruyama, and Y. Aramaki, Gene Transfer of bFGF into Skeletal Muscle of Murine Hindlimb Ischemia Model by Echo-contrast Gas Entrapping Liposomes, "Bubble liposomes" and Ultrasound 11th Liposome Research Days Conference (2008年7月18日, 横浜)

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：50286978

(2) 研究分担者

新榎 幸彦 (ARAMAKI YUKIHIKO)
東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：90138959

丸山 一雄 (MARUYAMA KAZUO)
帝京大学・薬学部・教授
研究者番号：30130040

高木 教夫 (TAKAGI NORIO)
東京薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：50318193

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

(3) 研究協力者

角田 由佳 (TSUNODA YUKA)
東京薬科大学・薬学部・大学院生

松尾 慶子 (MATSUO KEIKO)
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

松木 勇樹 (MATSUKI YUKI)
東京薬科大学・薬学部・大学院生