

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300192

研究課題名(和文) 診断と治療の両機能を有するナノバブルリポソームを用いる次世代超音波がん治療

研究課題名(英文) Ultrasound cancer therapy in next-generation with liposomal nanobubbles having both functions of diagnostics and therapeutics

研究代表者

丸山 一雄 (Maruyama, Kazuo)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：30130040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：PFCの保持を目的としたBLの外殻物質として新たにフッ化リン脂質F-DPPCを合成した。C5F12:C6F14=1:1(重量比)混合ガスを内封した、粒子径約500nmのRGD-BL(DSPC:F-DPPC:DSPE-PEG2K:DSPE-PEG3K-Mal=44:50:5:1(モル比))を調製した。RGD-BLと診断超音波照射は、固形癌組織の新生血管や血栓の造影が可能である。治療用超音波の照射によって、腫瘍内温度の上昇によるハイパーサーミアやIL12遺伝子導入による遺伝子治療も可能である。診断と治療の両機能を有するBLを用いる次世代超音波治療システムを構築出来た。

研究成果の概要(英文)：F-DPPC for high PFC was newly synthesized as shell of BL. Fluorinated phospholipid (F-DPPC) was synthesized as a new outer shell material of BL for the purpose of retention of PFC. RGD-BL (DSPC:F-DPPC:DSPE-PEG2000:DSPE-PEG3000-Mal=44:50:5:1(molar ratio)) encapsulating mixed gas of C5F12:C6F14=1:1(weight ratio), was prepared with about 500 nm in diameter. The combination of RGD-BL and diagnostic US make the image of the thrombus and neovasculature of solid tumor. The combination of RGD-BL and therapeutic US can be used for gene therapy by introduction of pCMV-IL12 and hyperthermia treatment with intratumoral temperature rise. Thus, the combination of RGD-BL and US may be used for ultrasound theranostics system with therapeutic and diagnostic, which is a next-generation.

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 超音波医科学

1. 研究開始当初の背景

本研究は、平成 19-21 年度に実施した NEDO の委託研究、次世代 D D S 型悪性腫瘍治療システムの研究開発事業「深部治療に対応した次世代 D D S 型治療システムの研究開発」の成果、また、平成 21-22 年度に実施した挑戦的萌芽研究(課題番号 21650131)の成果を踏まえて、次世代超音波治療システムの開発研究を行う。NEDO の研究で高く評価された液滴バブルリポソーム(特願 2009-113878)と挑戦的萌芽研究(特願 2010-174651)で得られた成果(バブルリポソームによる抗原たん白質の樹状細胞導入)について、更なる改良と新機能を付与して「診断と治療の両機能を有するナノバブルリポソームを用いる次世代超音波がん治療」を目指す。

2. 研究の目的

診断と治療の両機能を有するナノバブルリポソームを用いる次世代超音波治療

我々が独自に開発したバブルリポソームは、リポソーム内部にナノバブルと抗がん剤や遺伝子を共存できることが大きな特徴である。本研究では、凍結乾燥製剤を目標におき、大量調製および GMP レベルでの調製を可能にする新規調製法を開発する。ナノバブルリポソームの EPR 効果と標的指向性により、診断と治療を同時に可能とする超音波がん治療システムを開発する。内封されているナノバブルは、超音波のパルスによってマイクロバブルへと変化し、新生血管の超音波診断と造影を可能とする。ここに治療用超音波を照射し、マイクロバブルのキャビテーションを誘導することにより、抗がん剤や治療用遺伝子の導入による治療、または発熱による温熱療法を行うことを可能とする。本システムにより、体外からの超音波照射という低侵襲治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

パーフルオロカーボン(PFC)の選定:

PFC にはパーフルオロプロパン、パーフルオロブタン、パーフルオロペンタン、パーフルオロヘキサンなど、超音波造影剤として国内外で使用実績のあるものを用いた。これらの混合比を変化させて、超高圧ホモジナイザー(ナノマイザー)法でナノバブルミセルを調製して、相変化、キャビテーション能を調べ、最適な PFC および混合比を決定した。さらに、新規フルオラス脂質誘導体の選定に向けた基礎データとした。

フルオラスケミストリーに着目したフルオラスリン脂質の合成と最適化: 長期保存、用時調製を考慮して、PFC ミセル作製に最適な外殻(Shell)物質をフルオラスケミストリーに基づいて合成し選定した。FCH₂(CH₂)₁₆COOH を別途合成し、これをグリセロール骨格にエステル結合させてフッ素含有のホスファチジルコリンの合成を行った。

バブルリポソームの新規調製法の開発:

DSPC:F(2F)-DPPC:DSPE-PEG2000:DSPE-PEG3000-Mal=44:50:5:1 (モル比)構成脂質で 100 μmol の脂質をナシ型フラスコにとり、クロロホルム 4 mL ジイソプロピルエーテル 4 mL を加え、脂質を完全に溶解させた。PBS (pH 7.4) を 4 mL を加え、超音波洗浄槽を用いて w/o エマルションを作成し、ロータリーエバポレーターを用いてリポソームを調製した。得られたリポソームを extrusion 法によりサイズ調整し、平均粒子径を約 100 nm とした。12.5 mmol の RGD ペプチド(CGGc(RGDfK))溶液を加え静かに攪拌しながら 4 で一晩反応させた。リポソーム懸濁液とパーフルオロペンタン(C₅F₁₂)とパーフルオロヘキサン(C₆F₁₄) 1:1 液滴(用量比)を混合し、密封チューブ式ホモジナイザーを用いて RGD 修飾バブルリポソーム(RGD-BL)を調製した。

機能性バブルリポソームの評価を invitro, in vivo で行った。

④-1 腫瘍組織を標的とする場合: RGD-BL を B16/BL6 担がんマウスに尾静注し、腫瘍組織の新生血管の造影能力およびキャビテーションによる腫瘍内温度上昇と腫瘍縮小効果で調べた。

④-2 遺伝子治療: マウス卵巣がん細胞を移植した固形がんモデルマウスに IL-12 発現プラスミド DNA と RGD-BL を腫瘍内投与し、超音波を照射した。その後、RT-PCR による IL-12 発現確認と抗腫瘍効果を評価した。

④-3 血栓溶解: 試験管内に作製した血栓に RGD-BL を添加し、結合性とキャビテーションによる崩壊溶解について検討した。イソフルラン麻酔科でラットの総左頸動脈を剥離後、総頸動脈の下部にパラフィルムを敷き、総頸動脈とパラフィルムの間に 40% の第二塩化鉄をしみ込ませたる紙を挟み込み、15 分間刺激することで塩化鉄誘発血栓を総頸動脈内に作製した。血栓作製後、塩化第二鉄のろ紙を除去後、生理食塩水で術部を 3 回洗浄し、10 分間放置した。血栓を小動物用超音波画像診断機(VEVO 2100)でモニタリングしながら、尾静脈より RGD-BL を投与し、10 分後に RGD-BL の投与前後での血栓の輝度変化を観察および画像解析ソフト(Image J)で解析した。

4. 研究成果

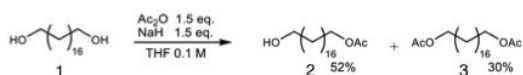
(1)パーフルオロカーボン(PFC)の選定

パーフルオロペンタン(C₅F₁₂ bp: 29)とパーフルオロヘキサン(C₆F₁₄ bp: 58-60)を用量比で 1:1 で混合した液滴を用いた場合、最も安定で、500nm 程度のナノバブルミセルを調製できることが出来た。

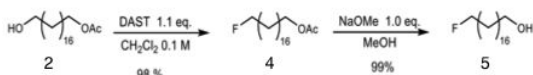
(2)フルオラスケミストリーに着目したフルオラスリン脂質の合成

FCH₂(CH₂)₁₆COOH(7)を別途合成し、これをグリセロール骨格にエステル結合させてフッ素含有のホスファチジルコリン(F-DPPC)を合成した。市販のジオール(1)の片側を選択

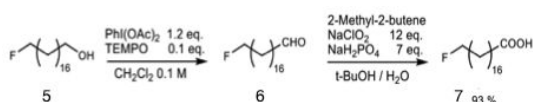
的にアセチル化を試み、0-3時間で所望するモノエステル体(2)を52%の収率で得ることができた。



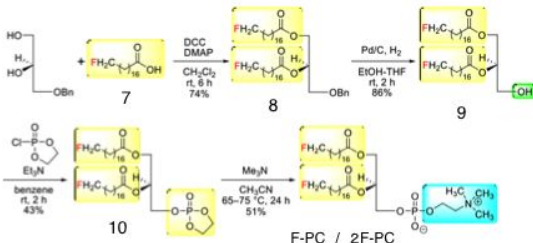
続いてモノエステル体(2)の水酸基をDASTを用いてフッ素化し、モノフルオロ化体(4)を99%の収率で得た。モノフルオロ化体(4)については、強塩基であるナトリウムメトキシドを用いてアセチル基の脱保護を行い、アルコール体(5)を得た。



アルコール体(5)をPhI(OAc)₂及びTEMPOを用いた酸化反応によってアルデヒド体(6)へ変換し、さらに過ヨウ素酸を用いてカルボン酸(7)へ誘導した。2段階の酸化によって93%の収率で所望するフッ素含有カルボン酸(7)が得られた。



このフッ素含有カルボン酸(7)を用いてグリセロールとエステル結合させることとした。グリセロールには、天然の脂質の立体化学を保持することを考慮し、市販されている末端をベンジルで保護した(R)体を用いた。フッ素含有カルボン酸(7)をDCCによって脱水縮合させてエステル化を行った。反応は室温で容易に進行し、74%の収率でジエステル体(8)を得ることができた。続いてジエステル体(8)のベンジルの脱保護をパラジウムを触媒に用いて接触水素化によって行い、収率86%でアルコール体(9)を得た。次にリン酸化のステップを試みたが、上述のオキシ塩化リン由来のリン酸化剤よりも安定性が高いとされる環状リン酸エステルを用いることとした。トリエチルアミン共存下、リン酸エステル化を行い、やや低い収率であるが、リン酸エステル化体(10)を合成できた。最後にこの環状のリン酸エステルを求核剤としてトリメチルアミンを用いて開環し、フッ素含有のホスファチジルコリン(F-DPPC, 2F-DPPC)の合成に成功した。



(3) バブルリポソームの新規調製法の開発

平均粒径約500nmのRGD-BL製剤が調製できた。密封チューブ式ホモジナイザーを用いる方法は、本研究で見出した新しい調製法で、調製容器はオートクレーブ可能であり、クリーン・ベンチ内で無菌的に調製可能である。

(4) 新規機能性バブルリポソームの評価

バブルリポソームと超音波を併用(BL+US法)することによりIL-12の発現と顕著な腫瘍増殖抑制が認められた。バブルのキャビテーションがIL-12発現プラスミドDNAを効率よく導入出来、この結果から、抗腫瘍効果を誘導可能な量のIL-12が腫瘍内で発現していたことが示唆された。したがって、遺伝子治療における本法(BL+US法)は有用な手段になると期待される。

④-1 腫瘍組織を標的(造影と治療)

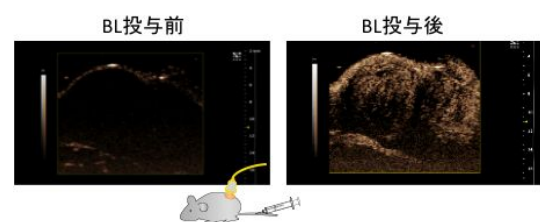


図1 B16/BL6 担がんマウスに尾静注後の腫瘍組織の新生血管造影

がん組織の新生血管の造影と治療について、RGD-BLの尾静注後、腫瘍部位への超音波照射で検討した。造影超音波照射で図1に示すように腫瘍血管の撮像が可能であった。BLは腫瘍内部を複雑に分岐していく細い腫瘍血管を連続性良く描写可能で、腫瘍血管造影剤として機能した。しかしながら、10分以内に十分な腫瘍集積を得るのは困難であることから、超音波造影によるRGD-BLのEPR効果の検出は困難であると考えられる。

次に、治療用超音波を照射によってキャビテーションを誘導した後の腫瘍内温度上昇を測定した。図2左に示すように、バブルリポソームと治療用超音波照射(BL+US)によって、約44℃の腫瘍内温度の上昇が得られ、図2右に示すように腫瘍体積の縮小が観察された。治療直後のがん組織を顕微鏡観察したところ、がん細胞の壊死領域が認められた。BL+USでがんハイパーサーミアが可能である。

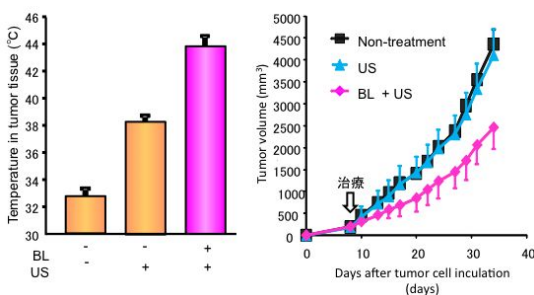


図2 BL投与と治療用超音波照射による腫瘍内温度と腫瘍体積の変化

バブルリポソームと超音波の併用は、HIFUより低強度の超音波照射で、バブルリポソームが分布している領域のがん細胞を傷害可能な方法として有用と考えられる。本システムによって、がん治療に向けた超音波セラノスティクスシステムを構築できると期待される。

-2 遺伝子治療：抗腫瘍免疫の活性化を目的とした新しいがん治療法としてサイトカイン療法が注目されている。その中でもインターロイキン-12 (IL-12) は、Natural Killer (NK) 細胞や細胞傷害性T細胞などを活性化することで強力な抗腫瘍効果を誘導するサイトカインとして、臨床の場においても期待されている。しかし、IL-12の全身投与は、全身作用による副作用のリスクが懸念されており、副作用の影響なく治療効果を得るためには、がん組織特異的にIL-12を作用させる必要がある。BL+USによるIL-12発現プラスミドDNA (pCMV-IL12)の遺伝子導入によるがん遺伝子治療を試みた。その結果、BL+USによりpCMV-IL12を導入した群で、RT-PCRによるIL-12発現を確認し(図3)、顕著な腫瘍増殖抑制効果(図4)が認められた。一方、Lipofectamine2000による遺伝子導入では、ほとんど腫瘍増殖抑制効果は認められなかった。このような結果が得られたのは、バブルリポソームと超音波の併用により効率よくIL-12遺伝子が発現し、強力な抗腫瘍免疫が誘導されたためであると考えられた。このことから、バブルリポソームと超音波照射の併用法はIL-12がん遺伝子治療において有望な遺伝子導入システムになることが示唆された。

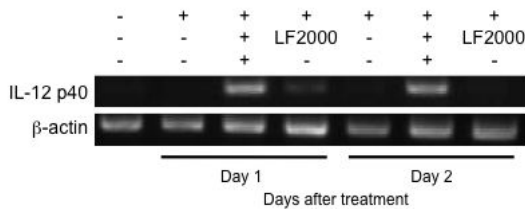


図3 バブルリポソームと超音波の併用によるpCMV-IL12遺伝子導入とIL-12発現

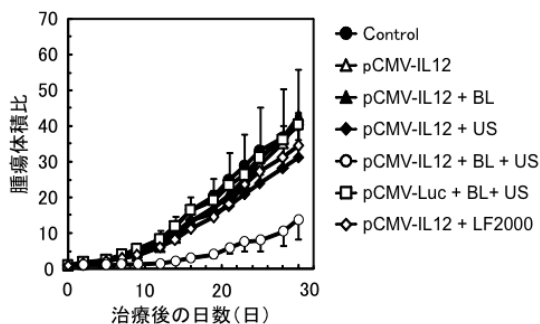


図4 バブルリポソームと超音波の併用によるpCMV-IL12遺伝子導入と抗腫瘍効果

④-3 血栓溶解：

RGD-Bは試験管内に作製した血栓に対して結合することを超音波造影で確認出来た。これに対して、治療超音波照射によるキャビテーションによって崩壊溶解した(図5)。

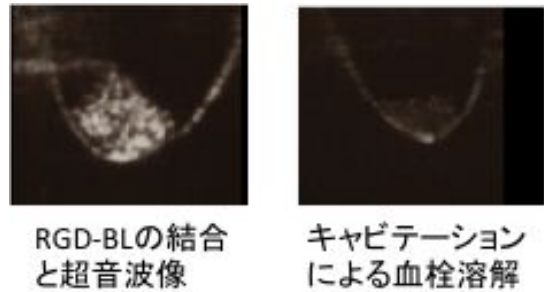


図5 RGD-Bの血栓結合と溶解 (in vitro)

総左頸動脈に人工的に血栓を作製したラットモデルに対して、RGD-Bを尾静注し血栓造影を行ったところ、図6に示すように明らかな輝度の上昇が見られ、また、画像解析ソフト(Image J)での解析でも同様に輝度の上昇を認め、RGD-Bが血栓にターゲティングし結合していることが確認出来た。

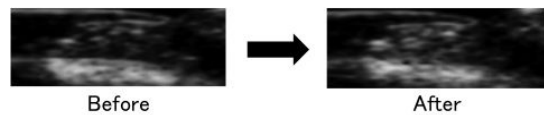


図6 RGD-Bの血栓結合 (in vivo)

塩化鉄誘発血栓に対してRGD-B投与すると、血栓の輝度上昇が確認された。輝度の上昇は血栓にバブルリポソームが結合したことが推察され、RGD-Bがin vivoでも機能することが確認出来た。しかしながら、治療超音波照射による血栓の再疎通または血流の増加を観測することが出来なかった。今後、投与量を変化させることで最適な血栓造影条件・超音波血栓溶解条件について検討する必要がある。

RGD-Bは超音波診断機での血栓の検出を容易にさせるだけでなく、脳梗塞の際に超音波と併用することでt-PAによる血栓溶解作用の促進にも利用できる可能性が期待された。

以上の結果より、バブルリポソームと超音波照射によって、診断と治療が可能な超音波セラノスティクスシステムを構築できるものと期待される。

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計8件)

Kono Yusuke, Kawakami Shigeru, Higuchi Yuriko, Maruyama Kazuo, Yamashita Fumiyoshi, Hashida Mitsuru. Anti-tumor effect of NF-κB decoy transfer by mannose-modified bubble lipoplex into macrophages in mouse malignant ascites.

Cancer Science 査読有 in press 2014

Ren Koda, Jun Koido, Naoto Hosaka, Shinya Onogi, Takashi Mochizuki, Kohji Masuda, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama. Evaluation of active control of Bubble liposomes in a bifurcated flow under various ultrasound conditions, Advanced Biomedical Engineering, 査読有, 3, 21-28, 2014

Nobuhito Hamano, Yoichi Negishi, Kyohei Takatori, Yoko Endo-Takahashi, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Takuro Niidome, Yukihiro Aramaki. Combination of Bubble liposomes and high-intensity focused ultrasound (HIFU) enhanced antitumor effect by tumor ablation. 査読有 Biological & Pharmaceutical Bulletin 37(1), 174-177, 2014.

Yoko E. Takahashi, Yoichi Negishi, Arisa Nakamura, Daichi Suzuki, Saori Ukai, Katsutoshi Sugimoto, Fuminori Mariyasu, Norio Takagi, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Yukihiro Aramaki. pDNA-loaded bubble liposomes as potential ultrasound imaging and gene delivery agents. 査読有 Biomaterials. 34. 2807-2813. 2013.

Kohsuke Hagiwara, Toshihiko Nishioka, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Yasuhiro Nishida, Kiyoshi Iida, Huai Luo, Robert J. Siegel. Thrombus targeted perfluorocarbon containing liposomal bubbles for enhancement of ultrasonic thrombolysis - in vitro and in vivo study -. 査読有 J. Thrombosis and Haemostasis. 11, 1565-1573, 2013

Yusuke Oda, Ryo Suzuki, Shota Otake, Norihito Nishiie, Keiichi Hirata, Risa Koshima, Tetsuya Nomura, Naoki Utoguchi, Nobuki Kudo, Katsuro Tachibana, Kazuo Maruyama. Prophylactic immunization with Bubble liposomes and ultrasound-treated dendritic cells provided a four-fold decrease in the frequency of melanoma lung metastasis. J. Controlled Release. 査読有 160. 362-366. 2012

〔学会発表〕(計 15 件)

澤口能一、鈴木亮、小田雄介、小俣大樹、宇留賀仁史、関むつみ、丸山一雄、超音波による t-PA 血栓溶解加速効果の音響強度定量的解析、第 134 回日本薬学会、2014 年 3 月 27 日、熊本

森達也、小田雄介、宇留賀仁史、鈴木亮、丸山一雄、忍足鉄太、夏苺英昭、高橋秀依、フッ素を含有した新規リン脂質の開発、第 134 回日本薬学会、2014 年 3 月 27 日、熊本

丸山一雄 超音波セラノスティクスシステムの開発、第 16 回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ、2013 年 12 月 25 ~26、東京

澤口能一、鈴木 亮、小田雄介、小俣大

樹、宇留賀仁史、関むつみ、萩沢康介、丸山一雄、血栓標的型バブルリポソームを用いた血栓 in vivo イメージング、第 57 回日本薬学会関東支部会、2013、10、26、東京

Ryo Suzuki, Cancer gene therapy with nano-bubble associated sonoporation. ICMBU2013. 2013 年 10 月 22-23 日、台湾大学

Yoshikazu Sawaguchi, Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Daiki Omata, Hitoshi Uruga, Mutsumi Seki, Kohsuke Hagiwara, Kazuo Maruyama, Development of thrombus targeting bubble liposome for diagnostic and tPA thrombolysis acceleration, 16th World Neurosonology Meeting、2013 年 10 月 17-20 日、Sofia, Bulgaria

Yoshikazu Sawaguchi, Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Daiki Omata, Uruga Hitoshi, Mutsumi Seki, Kohsuke Hagiwara, Kazuo Maruyama, The thrombus imaging by thrombus targeted bubble liposome, 第 22 回日本バイオイメージング学会学術集会、2013 年 9 月 14 ~ 16 日、東京大学薬学部

丸山一雄、超音波セラノスティクス、日本超音波医学会第 86 回学術集会、(招待講演)、2013 年 5 月 24-26 日、大阪

丸山一雄、超音波セラノスティクス (THERANOSTICS)、第 13 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム(招待講演)、2013 年 5 月 11 日、帝京大学

澤口能一、小田雄介、小俣大樹、鈴木 亮、萩沢康介、丸山一雄、バブルリポソーム併用血栓溶解療法の基礎検討、第 133 回日本薬学会、2013 年 3 月 28 日、横浜

Kazuo Maruyama, Yusuke Oda, Ryo Suzuki, Gene Delivery System by Cavitation of Bubble Liposome and Ultrasound in Cancer Therapy, 8th International Symposium on Cavitation, 2012 年 8 月 14~16 日、シンガポール

〔図書〕(計 0 件)

無し

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

無し

取得状況(計 0 件)

無し

〔その他〕

ホームページ

<http://www.teikyo-dds-lab.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 一雄 (Maruyama Kazuo)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：30130040

(2)研究分担者

鈴木 亮 (Suzuki Ryo)
帝京大学・薬学部・准教授
研究者番号：90384784

小田 雄介 (Oda Yusuke)
帝京大学・薬学部・助手
研究者番号：80505941

高橋 秀依 (Takahashi Hideyo)
帝京大学・薬学部・教授
研究者番号：10266348

(3)連携研究者

無し