

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500567

研究課題名(和文)超音波を利用した非侵襲的な脳内への薬物デリバリー技術の構築

研究課題名(英文)Development of drug and gene delivery into brain with ultrasound technologies

研究代表者

鈴木 亮 (Suzuki, Ryo)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：90384784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、アルツハイマー病をはじめとする脳で機能を発揮する薬物・遺伝子治療が開発されつつある。しかし、血液-脳関門の存在により脳内への薬物や遺伝子のデリバリーは、厳密に制限されており、脳で機能を発揮する薬物や遺伝子の脳内への低侵襲的な導入方法の開発が望まれている。本研究では、微小気泡と超音波の併用による脳にダメージのない遺伝子導入法を開発した。今後、本技術が脳への薬物・遺伝子導入に関する突破口になるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, some drug and gene therapies for brain disorder have been developed. However, many drugs and genes dropped off from clinical candidates in animal and clinical phase studies because of low efficiency of brain delivery. Therefore, it is necessary to develop effective and non-invasive drug and gene delivery system. To improve this, I developed a novel gene delivery system into brain by the combination of nanobubbles and ultrasound. Our delivery system is the combination of systemic injection of nanobubbles and plasmid DNA and trans-scalp ultrasound exposure to brain. It could express reporter gene in the brain. Therefore, this ultrasound delivery system would be a minimally invasive and brain-selective gene delivery system.

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：リボソーム

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えアルツハイマー病や認知症の患者数が増加しつつある。これら脳疾患は、患者の Quality of Life (QOL) を著しく低下させてしまうばかりでなく、患者をフォローする介護者にも多大なる負担が生じている。介護施設や介護福祉士の不足が社会問題となっている本邦では、本疾患の進行を抑制するもしくは、症状を改善する治療法の開発が必要不可欠である。しかし、血液-脳関門の存在により脳への薬物移行が制限されてしまうため、これら疾患に対する医薬品開発の進展の足かせとなっている。それゆえ、アルツハイマー病や認知症治療薬の開発スピードを加速しうる脳内薬物デリバリーシステム技術の開発は緊急に推し進めるべき課題であると考えられている。

2. 研究の目的

これまでに機能性ナノバブルとして超音波感受性リポソーム (バブルリポソーム) を開発し、バブルリポソームと超音波照射の併用による遺伝子送達に関する基盤技術の構築を行ってきた。そのなかで、バブルリポソームとプラスミド DNA をマウスに全身投与し、体外からマウスの肝臓に向け経皮的に超音波照射することで、肝臓に傷害を与えることなく肝臓特異的かつ肝臓全体に遺伝子導入可能であることを見出した。この遺伝子導入メカニズムとして、血中のバブルリポソームに超音波が照射されると血中でバブルリポソームの圧壊が誘導され、その時に生じるジェット流で肝臓に遺伝子が導入されたと考えられた。この技術を脳に応用すれば血液-脳関門を一時的に開放し、脳に傷害を与えることなく様々な薬物や遺伝子を脳内に送達可能になると期待される。そこで本研究では、バブルリポソームと超音波照射の併用による非侵襲的な脳内への薬物・遺伝子送達のための基盤技術の構築を目指す

3. 研究の方法

(1) バブルリポソームと超音波照射によるマウスの脳への傷害性評価方法

バブルリポソームを ddY マウス (雄、6 週齢) の尾静脈から全身投与し、その後すぐに脳に向けて経頭蓋的に超音波を照射した。1 日後に脳を回収し、超音波照射領域の傷害を外観的に観察した。さらに、脳の凍結切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行い顕微鏡観察した。

(2) バブルリポソームと超音波照射によるマウスの脳への遺伝子導入方法

ddY マウス (雄、6 週齢) に、各種レポーター遺伝子を発現するプラスミド DNA (100 μ g) とバブルリポソーム (500 μ g) を混合したサンプルを、尾静脈から投与した。投与後速やかに体外から脳に向け超音波照射 (超音波周波数: 1 MHz, Duty : 10 %, Burst Rate :

2.0 Hz, 照射強度 : 1.2 W / cm², Time : 1 分間) した。超音波照射 1 日後、脳を回収し、レポーター遺伝子の発現を測定した。

4. 研究成果

(1) マウス尾静脈からルシフェラーゼ発現プラスミド DNA とバブルリポソームを全身投与し、その後脳に向けて経頭蓋的に超音波照射した。1 日後、脳を回収しルシフェラーゼ活性の測定を行った。その結果、バブルリポソームと超音波を組み合わせたときのみ、高いルシフェラーゼ発現が観察された (図 1)。

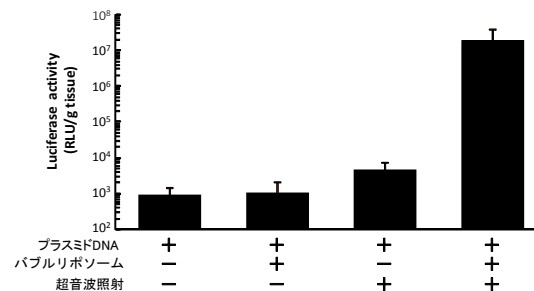


図 1 バブルリポソームと超音波を利用した脳への遺伝子導入効率

なお、このとき超音波照射していない他の組織のルシフェラーゼ活性も測定したが、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、肺などの超音波照射していない組織のルシフェラーゼ活性は低レベルであった (図 2)。

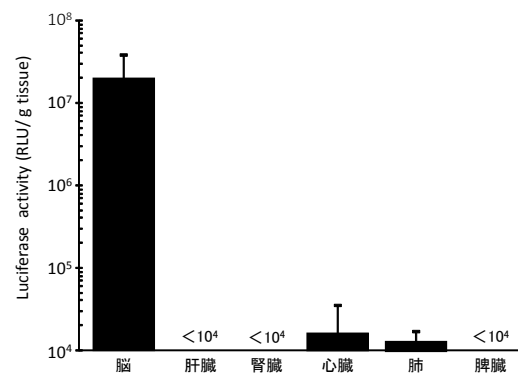
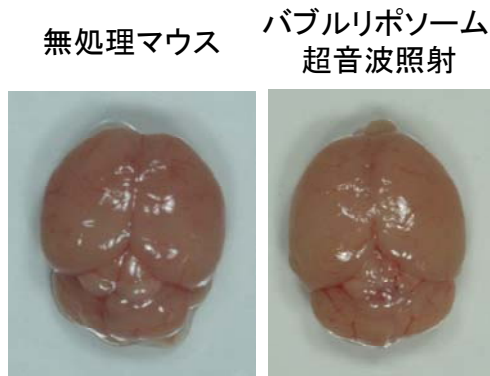


図 2 バブルリポソームと脳への超音波照射による脳選択的遺伝子導入

(2) 脳への傷害性を評価するため、回収した脳を観察したところ、超音波照射部位である頭頂部を含むいずれの部分においても外観的な出血は認められなかった (図 3 (a))。さらに、凍結切片による組織の顕微鏡観察でも、バブルリポソームと超音波照射の併用群において顕著な組織傷害は認められなかった (図 3 (b))。このことから、本方法が脳傷害を誘導せずに低侵襲的に脳内に遺伝子を導入可能な非常にユニークな方法であることが示された。

(a) 外観



(b) 組織切片

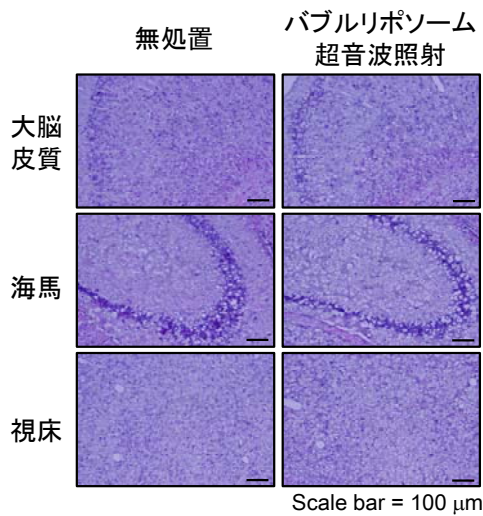


図3 バブルリポソームと超音波照射による脳への傷害性評価

(3) 本遺伝子導入法による遺伝子の脳内での発現部位を評価した。本検討では、βガラクトシダーゼ発現プラスミドDNAを用いて評

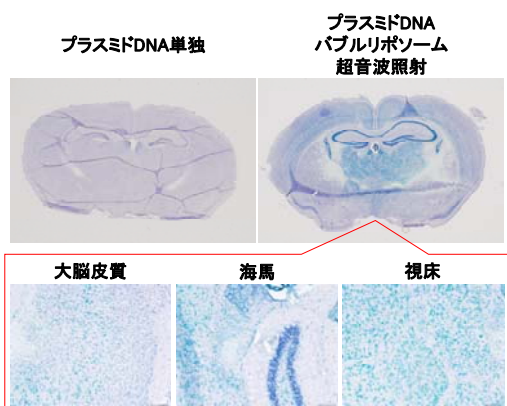


図4 バブルリポソームと超音波照射での遺伝子導入における遺伝子発現部位の評価

価を行った (図4)。その結果、脳全体でβガラクトシダーゼの発現が確認できた。特に海馬や視床において強い発現が認められた。そこで次に、発現の高かった海馬における遺伝子発現細胞の特定を行った。本検討では、

レポーター遺伝子として蛍光たんぱく質 (ビーナス) 発現プラスミドDNAを用い、各種細胞に対するマーカーたんぱく質の免疫染色により遺伝子導入細胞の特定を試みた (図5)。

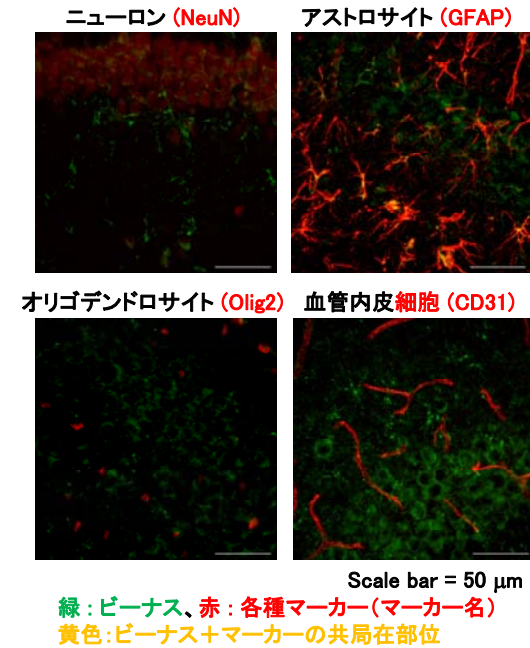


図5 バブルリポソームと超音波照射での脳への遺伝子導入における遺伝子発現細胞の評価

その結果、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、血管内皮細胞でビーナスの発現が認められた。特に、アストロサイトでビーナスの発現が高かった。このように血液内に投与したプラスミドDNAが血管内皮細胞の外側の脳実質細胞に対しても導入されていることが明らかとなった。このことから、バブルリポソームと超音波照射の併用は、血液-脳関門を一時的に開放できることが示唆された。それゆえ、本方法は血液-脳関門の透過性を一過性に向上させる新たな脳内への遺伝子・薬物デリバリーツールになるものと期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① Un K, Kawakami S, Yoshida M, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M; Efficient suppression of murine intracellular adhesion molecule-1 using ultrasound-responsive and mannose-modified lipoplexes inhibits acute hepatic inflammation. *Hepatology*, 査読有, 56: 259-269. (2012)
DOI: 10.1002/hep.25607
- ② Oda Y, Suzuki R, Otake S, Nishiie N, Hirata K, Koshima R, Nomura T, Utoguchi N, Kudo N, Tachibana K, Maruyama K.; Prophylactic immunization with Bubble liposomes and ultrasound-treated dendritic cells provided a four-fold

decrease in the frequency of melanoma lung metastasis. J Control Release. 査読有, 160:362-366 (2012)

DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.12.003

- ③ Un K, Kawakami S, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M ; Involvement of activated transcriptional process in efficient gene transfection using unmodified and mannose-modified bubble lipoplexes with ultrasound exposure. J Control Release. 査読有, 156: 355-363 (2011)
DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.06.040

[学会発表] (計 14 件)

- ① Ryo Suzuki, Cancer gene therapy with nano-bubble associated sonoporation、ICMBU2013、2013年10月22~23日、台湾大学
② 鈴木 亮、脳に対する超音波遺伝子デリバリーに関する基礎的検討、日本超音波医学会・基礎技術研究会、2013年8月3日、北海道大学
③ 鈴木 亮、リポソーム技術を駆使した超音波 DDS の開発、日本 DDS 学会 (招待講演)、2012年7月4~5日 (札幌)

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

[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

鈴木 亮 (SUZUKI, Ryo)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：90384784

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

丸山 一雄 (MARUYAMA, Kazuo)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：30130040