

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18862

研究課題名(和文) 脳指向DDSの構築と脳腫瘍治療への展開

研究課題名(英文) Evaluation of drug and gene delivery to the brain by using  
ultrasound-responsible nanobubble liposomes

研究代表者

淵上 由貴 (FUCHIGAMI, Yuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・助教

研究者番号：60736403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ナノバブルリポソーム(BLs)と超音波照射による超音波応答性DDSを脳へ応用し、薬物・遺伝子の血液脳関門透過亢進に寄与する制御因子を評価した。BLsと併用したフルオロウラシル(FU)の脳内移行量は、BLsの投与量の減少に従って減少した。また、新たに構築した超音波造影ガスの封入量を向上させた遺伝子/BLs複合体SCR-based echo gas encapsulation(SCR-EGE) bubble lipopolyplexesでは、高い遺伝子発現がみられ、超音波応答性DDSの脳への薬物・遺伝子送達の制御化において、超音波造影ガスの投与量が重要な因子の一つであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In present study, we applied ultrasound-responsible nanobubble liposomes (BLs) combined with ultrasound irradiation (US) to the brain in mice and evaluated pharmacokinetics of a drug or efficiency of transgene expression in the brain to investigate a controlling factor for increase of blood-brain barrier. Firstly, we examined brain pharmacokinetics of fluorouracil (FU) concomitantly used with BLs combined with US. As a result, the concentration of FU in the brain decreased as BLs dose decreased. In addition, we developed SCR-based echo gas encapsulation (SCR-EGE) bubble lipopolyplexes (BLs / pDNA complexes) containing more echo gas compared to conventional bubble lipopolyplexes. The efficiency of transgene expression of SCR-EGE bubble lipopolyplexes in the brain was increased compared to that of conventional one. These results suggest that dose of echo gas is one of the important controlling factors for drug or gene delivery by ultrasound-responsible BLs combined with US.

研究分野：医療系薬学

キーワード：脳指向DDS 超音波応答性ナノバブルリポソーム 遺伝子デリバリー 薬物デリバリー

## 1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍は、浸潤性が高い場合や eloquent area 近傍にある場合には外科的手術による全摘が非常に困難といわれ、他臓器のがんと同様に有効な化学療法が求められる。しかしながら、現在までに脳腫瘍に適応される抗がん剤は限られており、その有効性も不確実とされている。適応される抗がん剤が僅かである原因の一つには、血液脳関門による障壁があると考えられる。そこで、効果的に血液脳関門を透過し、脳腫瘍に到達することが可能となる、新たな DDS の開発・導入が不可欠である。近年、国内外における DDS 領域では、超音波や光などの外部刺激を用いた精密なターゲティングの実現が大きく期待されている。中でも、非侵襲的な外部刺激として超音波が注目を集め、がんへの温熱療法、低強度超音波による薬物送達、血管溶解アポトーシス誘発など、様々な治療応用が研究されている。

ナノバブルリポソーム製剤は、粒子径約 300-500 nm の微小な超音波造影ガス封入製剤であり、超音波照射とナノバブルリポソーム製剤を組み合わせることで、肝臓、腎臓、脾臓、心臓に対する選択的な遺伝子デリバリーが可能であることが報告されている。これらの脳内移行機序や遺伝子や薬物の分布様式・送達効率に関する情報は未だ乏しく、これらの情報を明らかにし、安全性評価をおこなうことで、脳指向 DDS の飛躍的な発展に繋げていきたい。

## 2. 研究の目的

超音波照射とバブルリポソーム製剤を利用した脳組織への遺伝子・薬物デリバリー領域では、効率的な遺伝子の送達[1]やドキシソルピシンの脳実質への移行[2]に関する研究が報告されている。超音波照射による血液脳関門透過性の亢進は、一過性のものであると報告されている[3]が、脳内分布や詳細な透過メカニズム、その支配因子に関する情報は未だ不足している。また、脳組織への超音波照射、血液脳関門透過亢進による組織障害性などの安全性に関する評価は、本技術を実用化していく上で必要不可欠である。

このような背景のもと申請者らは、超音波照射による血液脳関門透過の亢進に寄与する支配因子の解明や組織障害性に関するエビデンスの構築をおこなうことで、脳腫瘍に対する有効かつ安全な遺伝子・薬物デリバリーを実現することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、ナノバブルリポソーム製剤と超音波照射を組み合わせ、低分子薬物や遺伝子の脳移行メカニズムや薬物動態、安全性を詳細に検討することを目的とし、次の4点について取り組んだ。(1) ナノバブルリポソーム製剤と超音波照射による、脳内薬物移行に寄与する影響因子を解明する。(2) 脳への

高効率な遺伝子導入のためのナノバブルリポソーム製剤 (SCR-based echo gas encapsulation (SCR-EGE) bubble lipopolyplexes) の構築をおこなう。(3) 遺伝子の脳内動態の解析に基づく、脳移行メカニズムの評価をおこなう。(4) SCR-EGE bubble lipopolyplexes による組織障害性を評価する。

## 4. 研究成果

(1) ナノバブルリポソーム製剤と超音波照射による、脳内薬物移行に寄与する影響因子の解明

ナノバブルリポソームと超音波照射による、低分子薬物の脳移行性を評価するため、低分子薬物のモデルとしてフルオロウラシル (FU) を用い、脳内薬物動態の解析をおこなった。その結果、FU 単独投与群と比較して、ナノバブルリポソームと超音波照射を組み合わせた群では、FU の脳移行性は向上した。次に、本法による血液脳関門透過性の亢進に寄与する主な影響因子を検討するため、超音波照射継続時間とナノバブルリポソームの投与量をそれぞれ変化させ、評価をおこなった。その結果、ナノバブルリポソームの投与量が減少するに従い、FU の脳内移行量も減少した。以前、Shen らによって、マイクロバブルリポソームによる血液脳関門透過性の亢進はマイクロバブルリポソームの投与量に応じて増加することが示されており[4]、この報告は今回の結果を支持するものである。このことから、超音波応答性 DDS の制御化における重要な因子の一つは、ナノバブルリポソームの投与量、すなわちナノバブルリポソームに封入された超音波造影ガスの投与量であることが示唆された。

(2) 高効率な遺伝子導入のためのナノバブルリポソーム製剤 SCR-based echo gas encapsulation (SCR-EGE) bubble lipopolyplexes の構築

超音波造影ガスの投与量が超音波応答性 DDS における重要な因子である可能性をさらに検証するため、遺伝子とナノバブルリポソームとの複合体を用いて検討した。

我々の研究グループではこれまで、超音波照射部位選択的かつ安全に遺伝子送達を達成するため、アニオン性電荷を有する bubble lipopolyplexes を開発してきた。本製剤は静電的相互作用に基づいた遺伝子/ナノバブルリポソーム複合体である。Bubble lipopolyplexes は表面電荷がアニオン性であることで、細胞への障害性が少なく、また、超音波照射を組み合わせることで、キャピテーションエネルギーにより、高効率かつ超音波照射部位選択的に遺伝子を導入できる可能性を示してきた [5]。そのため、この bubble lipopolyplexes において、超音波造影ガスの封入量を向上させることで、より効果的な脳への遺伝子導入が可能であると考えられる。

以前、我々の研究グループでは、遺伝子/

リポソーム複合体に塩化ナトリウムを添加することで、分子間の表面電荷が制御 (surface charge regulation, SCR) され、膜融合を介した製剤の膜安定化がもたらされることを報告してきた [6,7]。この SCR 法を bubble lipopolyplexes に応用することで、膜安定化に基づく超音波造影ガス封入量を向上させた製剤 SCR-EGE bubble lipopolyplexes の構築が可能であると考えた。この仮説を検証するため、bubble lipopolyplexes に塩化ナトリウムを添加して SCR-EGE bubble lipopolyplexes を調製し、超音波造影ガスの封入量と遺伝子導入効率を評価した。その結果、対照である塩化ナトリウム未添加の bubble lipopolyplexes と比較して、SCR-EGE bubble lipopolyplexes の超音波造影ガスの封入量は増加した。さらに SCR-EGE bubble lipopolyplexes をマウスに尾静脈投与し、脳への超音波照射をおこなったところ、塩化ナトリウム未添加の bubble lipopolyplexes と比較して、脳への遺伝子導入効率は 10 倍程度高値であった。以上の結果から、SCR により、bubble lipopolyplexes へのガス封入が促進され、高効率な脳への遺伝子導入が達成できる可能性が示され、脳への高効率な遺伝子導入のための SCR-EGE bubble lipopolyplexes を構築することに成功した。また、遺伝子/ナノバブルリポソーム複合体による超音波応答性 DDS においても、その制御化には、超音波造影ガスの投与量が重要な因子である可能性が示された。

### (3) 遺伝子の脳内動態の解析に基づく、脳移行メカニズムの評価

SCR-EGE bubble lipopolyplexes による脳への遺伝子導入時の遺伝子発現の空間的分布を明らかにするため、組織透明化を用いた多色深部イメージングによって評価した。マウスに SCR-EGE bubble lipopolyplexes を投与して超音波を照射後、脂溶性蛍光色素 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) により脳血管の染色をおこない、脳組織を摘出した。摘出した脳組織を透明化処理し、脳組織内の遺伝子発現分布を共焦点レーザー顕微鏡により三次元観察した。その結果、遺伝子発現の多くは DiI で標識された脳血管に分布しており、また、わずかに脳血管外にも発現している様子が観察された。この結果から、SCR-EGE bubble lipopolyplexes と超音波照射の組み合わせにより、遺伝子は主に脳血管内皮細胞に導入され、一部脳血管外の細胞に導入される可能性が示された。この結果は、Huang らによる、マイクロバブルと超音波照射より、遺伝子が神経細胞に遺伝子導入されるという報告 [1] を一部支持する結果であるが、この違いは、超音波応答性バブル製剤の物理化学的性質、超音波照射条件などの違いに起因するものと思われる。しかし、これらの要因が発現分布に及ぼす影響に関しては十分に明らかにされておらず、さらなる研究が必要で

ある。

### (4) SCR-EGE bubble lipopolyplexes による組織障害性の評価

SCR-EGE bubble lipopolyplexes の投与および最適化条件下での脳への超音波照射による遺伝子導入後、脳組織の障害性をヘマトキシリン-エオジン染色によって評価した。その結果、遺伝子導入 1 日後においては、わずかに血管外への赤血球の漏出がみられたものの、3 日後と 7 日後においては赤血球の漏出は観察されなかった。Song らは、超音波応答性マイクロバブル投与と脳に対する超音波照射処置後、一時的に溢血が生じるものの 1 週間後には観察されなくなることを報告しており [8]、本研究でみられた結果と一致するものである。これらの知見から、超音波応答性 DDS による組織障害性は一時的なものであると考えられるが、安全性を向上させるために、より詳細な超音波照射条件を探索する必要がある。

以上、本研究では、超音波応答性 DDS の脳への薬物・遺伝子送達制御化において、超音波造影ガスの投与量が重要な因子の一つである可能性が示された。また、超音波応答性 DDS における遺伝子の脳内空間分布について、多色深部イメージングにより明らかにすることができた。

### < 引用文献 >

- [1] Huang Q, Deng J, Xie Z, Wang F, Chen S, Lei B, Liao P, Huang N, Wang Z, Wang Z, Cheng Y. Effective gene transfer into central nervous system following ultrasound-microbubbles-induced opening of the blood-brain barrier. *Ultrasound Med Biol*, **38** (7), 1234-1243 (2012)
- [2] Treat LH, McDannold N, Vykhodtseva N, Zhang Y, Tam K, Hynynen K. Targeted delivery of doxorubicin to the rat brain at therapeutic levels using MRI-guided focused ultrasound. *Int J Cancer*, **121** (4), 901-907 (2007)
- [3] Konofagou EE, Tung YS, Choi J, Deffieux T, Baseri B, Vlachos F. Ultrasound-induced blood-brain barrier opening. *Curr Pharm Biotechnol*, **13** (7), 1332-1345 (2012)
- [4] Shen Y, Guo J, Chen G, Chin CT, Chen X, Chen J, Wang F, Chen S, Dan G: Delivery of liposomes with different sizes to mice brain after sonication by focused ultrasound in the presence of microbubbles. *Ultrasound Med Biol*, **42** (7), 1499-1511 (2016).
- [5] Kurosaki T, Kawakami S, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Sasaki H, Yamashita F, Hashida M. Development of anionic bubble lipopolyplexes for efficient and safe gene transfection with ultrasound exposure in mice. *J Control Release*, **176** (28), 24-34 (2014)
- [6] Fumoto S, Kawakami S, Ito Y, Shigeta K,

Yamashita F, Hashida M. Enhanced hepatocyte-selective in vivo gene expression by stabilized galactosylated liposome/plasmid DNA complex using sodium chloride for complex formation. *Mol Ther*, **10** (4), 719-729 (2004)

[7] Kawakami S, Ito Y, Fumoto S, Yamashita F, Hashida M. Enhanced gene expression in lung by a stabilized lipoplex using sodium chloride for complex formation. *J Gene Med*, **7** (12), 1526-1533 (2005)

[8] Song KH, Fan AC, Hinkle JJ, Newman J, Borden MA, Harvey BK. Microbubble gas volume: A unifying dose parameter in blood-brain barrier opening by focused ultrasound. *Theranostics*, **7** (1), 144-152 (2017)

#### 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 3 件)

Miura Y, Fuchigami Y, Hagimori M, Sato H, Ogawa K, Munakata C, Wada M, Maruyama K, Kawakami S. Evaluation of the targeted delivery of 5-fluorouracil and ascorbic acid into the brain with ultrasound-responsive nanobubbles. *J Drug Targeting*, 査読有, in press (2018)

DOI: 10.1080/1061186X.2017.1419354

Ogawa K, Fuchigami Y, Hagimori M, Fumoto S, Miura Y, Kawakami S. Efficient gene transfection of the brain with ultrasound irradiation in mice using stabilized bubble lipopolyplexes prepared by the surface charge regulation method. *Int J Nanomedicine*, 査読有, **13**, 2309-2320 (2018)

DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S157375>

Suga T, Fuchigami Y, Hagimori M, Kawakami S. Ligand peptide-grafted PEGylated liposomes using HER2 targeted peptide-lipid derivatives for targeted delivery in breast cancer cells: The effect of serine-glycine repeated peptides as a spacer. *Int J Pharm*, 査読有, **521** (1-2), 361-364 (2017)

DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.02.041

〔学会発表〕(計 10 件)

三浦雄介、淵上由貴、萩森政頼、川上 茂：超音波応答性ナノバブルリポソームを用いた 5-フルオロウラシルの脳内送達法における薬物動態評価、第 34 回日本薬学会九州支部大会、2017 年 11 月 25 日～2017 年 11 月 26 日、崇城大学薬学部（熊本県・熊本市）

小川昂輝、淵上由貴、植木郁花、三浦雄介、麓伸太郎、萩森政頼、川上 茂、超音波応答性ナノバブル複合体を用いた脳および癌組織への in vivo 遺伝子導入法の開発、第 23 回創剤フォーラム若手研究会、2017 年 9 月 9 日、慶應義塾大学薬学部（東京都・港区）

小川昂輝、淵上由貴、麓伸太郎、萩森政頼、川上 茂、超音波応答性遺伝子/ナノバブル複合体を用いた脳への遺伝子導入法の開発、日

本薬剤学会第 32 年会、2017 年 5 月 11 日～2017 年 5 月 13 日、大宮ソニックシティ（埼玉県・さいたま市）

淵上由貴、三浦雄介、小川昂輝、萩森政頼、麓伸太郎、川上 茂、超音波応答性ナノバブルによる脳指向 DDS における脳内への薬物動態の評価、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24 日～2017 年 3 月 27 日、仙台国際センター・東北大学川内地区（宮城県・仙台市）

Y. Miura, Y. Fuchigami, H. Sato, M. Hagimori, S. Kawakami, Evaluation of controlling factor of drug delivery to brain with nanobubbles and ultrasound irradiation, International Symposium on Drug Delivery and Pharmaceutical Sciences: Beyond the History, 2017 年 3 月 9 日～2017 年 3 月 10 日、京都リサーチパーク（京都府・京都市）

Y. Fuchigami, K. Ogawa, S. Fumoto, K. Nishida, M. Hagimori, S. Kawakami, Evaluation of transgene expression in brain using stabilized bubble lipopolyplexes with ultrasound irradiation in mice, International Symposium on Drug Delivery and Pharmaceutical Sciences: Beyond the History, 2017 年 3 月 9 日～2017 年 3 月 10 日、京都リサーチパーク（京都府・京都市）

Y. Miura, Y. Fuchigami, H. Sato, M. Hagimori, S. Kawakami, Evaluation of drug delivery to brain with nanobubbles and ultrasound irradiation using brain microdialysis method, APSTJ Global Education Seminar 2016, 2016 年 10 月 22 日、長崎大学（長崎県・長崎市）

小川昂輝、淵上由貴、麓伸太郎、萩森政頼、川上 茂、負電荷を有する電荷制御ナノバブル/遺伝子複合体を用いた脳への遺伝子デリバリーの評価、遺伝子・デリバリー研究会第 16 回夏期セミナー、2016 年 9 月 12～13 日、やすらぎ伊王島（長崎県・長崎市）

淵上由貴、小川昂輝、三浦雄介、丸山一雄、川上 茂、超音波応答性ナノバブルを用いた薬物・遺伝子の脳内デリバリー、第 32 回日本 DDS 学会総会、2016 年 6 月 30 日～2016 年 7 月 1 日、グランシップ（静岡県・静岡市）

淵上由貴、三浦雄介、小川昂輝、丸山一雄、川上 茂、脳を標的とした薬物・遺伝子デリバリーにおける超音波応答性 DDS の評価、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26 日～2016 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/arp/index-j.html](http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/arp/index-j.html)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

淵上 由貴 (FUCHIGAMI, Yuki)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・  
助教  
研究者番号：60736403

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

川上 茂 (KAWAKAMI, Shigeru)  
麓 伸太郎 (FUMOTO, Shintaro)  
三浦 雄介 (MIURA, Yusuke)  
小川 昂輝 (OGAWA, Koki)