

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18500391

研究課題名（和文）超音波エネルギーによる皮膚への遺伝子導入システムの確立

研究課題名（英文）Development of a new method for transfection to the skin by ultrasound energy

研究代表者

入江 豊（IRIE YUTAKA）

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：80352235

研究成果の概要：

8 週齢の雌のヘアレスマウスの背部にマイクロバブルと遺伝子の混合溶液 0.05ml を複数箇所皮内投与した（SonoVue、Bracco 社製、GFP（1 $\mu$ g/ml））。超音波発振素子直径 6mm のプローブを用いて麻酔下の皮膚表面から照射した（2143kHz, 50% duty cycle, 3Hz Burst rate）。超音波照射後 4 8 時間後観察で、超音波強度 0.5W/cm<sup>2</sup>、照射時間 2 と 3 min の群で GFP の発現が認められた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	510,000	3,910,000

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：超音波照射、癌細胞皮膚

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、超音波エネルギーを利用した遺伝子治療に関する研究が日本・アメリカを中心に盛んに行なわれている。今現在の学会での論点はこの新しい手法を臨床の場でどのように利用できるかに変わりつつあり、臨床応用への機運が非常に高まっている。

(2) 超音波で細胞内へ遺伝子を導入する試みは Greenleaf らによって 1995 年に最初に発表された。遺伝子治療とエコーコントラスト剤を併用した超音波薬物治療は現在最も注目されている分野である。古くからマイク

ロカプセルの中に薬物を封入した DDS は研究されていたが、気体を含んだマイクロカプセル、つまりエコー・コントラスト剤と薬物を併用した DDS の研究が活発化したのはこの数年のことである。アルブミン、ガラクトース、脂質、ポリマーなどの材質でできた薄い殻の中に空気、または特殊なガス（perfluorocarbon など）が含まれるマイクロバブルが登場し、本来は気体と生体組織の超音波の反射の違いを利用して画像的に血管や心筋を造影する。しかし、治療用超音波の照射によってマイクロバブルの崩壊を時間的、空間的に制御できるので、バブル内に

封入した薬物や遺伝子の局所リリースに應用されようとしていた。Ungerらは liposome による DDS を早期に実用化しようとしており、動物実験で pCAT や IL-12 の著明な遺伝子発現を超音波で得ている。馬目らはマイクロバブルを使わずに大腸癌モデルで超音波によるマーカー遺伝子の細胞内導入促進作用を確認した。しかし、この実験では高い超音波強度が使用された。超音波強度を出来るだけ低く押さえるにはマイクロバブルと遺伝子を併用する必要があると考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、超音波発振セラミック技術を応用した超音波照射による皮膚への遺伝子導入の検討およびその安全な低侵襲治療システムの確立にある (非ウイルス・ベクター遺伝子)。また、各種マイクロバブルの併用による遺伝子導入率の比較検討を行うことにある。

(2) 悪性黒色腫の治療法として本研究で得た技術がそのまま臨床へ転用できる可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 8週齢の雌のヘアレスマウスの背部にマイクロバブルと遺伝子の混合溶液 0.05ml を 30G 針を用い複数箇所皮内投与した。SonoVue (ブラッコ社製、50%溶液) と GFP(green fluorescent protein)発現遺伝子 (1 $\mu$ g/ml) は皮内投与直前に混合した。超音波装置は KTAC-3000 を使用し直径 6mm のプローブを用いて麻酔下のマウス皮膚表面から照射した (図1)。2143KHz, 50% duty cycle, 3Hz Burst rate の条件下で 0.5, 1.0, 2.0 W/cm<sup>2</sup> の超音波強度と照射時間を変えて検討した。全検体は皮内投与から 48 時間後に蛍光顕微鏡下で GFP 遺伝子導入の観察を行った。

図1 直径 6mm のプローブを用い、麻酔下のヘアレスマウス皮膚表面にジェルを塗布、遺伝子とエコーコントラスト剤を皮膚内注射で膨疹を作った部位に軽く押しあてるような形で照射している状態。

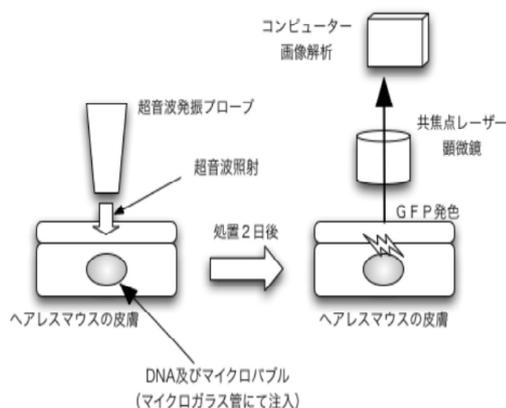
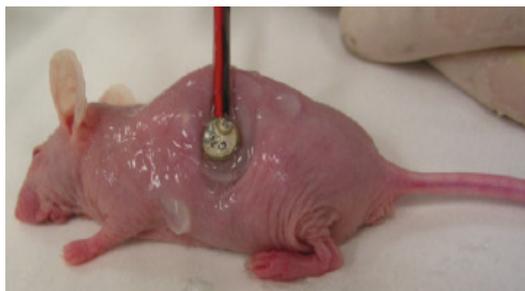


図2 GFP の蛍光検出システム

(2) 培養した悪性黒色腫細胞を  $1.0 \times 10^4$  /ml の濃度で 24-well プレートの各ウェルに 1.0 ml 播種した後、24 時間 CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養した。これらを 7 群、1. コントロール群、2. 遺伝子のみを添加した群、3. 遺伝子と超音波造影剤を添加した群、4. 超音波造影剤のみを添加した群、5. 超音波単独照射群、6. 超音波造影剤と超音波照射を併用した群、7. 超音波造影剤と超音波照射を併用し遺伝子を導入した群に分けた。各ウェルに、10  $\mu$ g の pEGFP-N1 遺伝子と超音波造影剤 10  $\mu$ l を添加し、超音波を照射した。出力設定は、周波数 1.011 MHz、出力電圧 0.17 W/cm<sup>2</sup>、出力周期 0.5 Hz、デューティー比 25%、出力期間 30 秒で行った。導入率は、照射 24 時間後、一視野 (x200) あたりの蛍光顕微鏡で GFP シグナルを発現している細胞数と全細胞数の比率を測定することによりおこなった。全ての測定は筆頭著者以外の者が各実験群に対してブラインドで行った。

## 4. 研究成果

(1) 高い超音波強度と長い超音波照射時間で皮膚潰瘍が観察された。皮膚潰瘍の肉眼所見の皮内投与した部位の条件は 2W/cm<sup>2</sup> で 2 分間照射されたものである。潰瘍の発生を認めず、GFP 遺伝子の発現も確認されなかった条件は 1W/cm<sup>2</sup> で 1 分間、及び 0.5W/cm<sup>2</sup> で 1 分間照射された群であった (図3)。

図4 皮膚に遺伝子導入(GFP)が確認された。条件は 0.5W/cm<sup>2</sup> で 3 分間照射されたものである。

(2) 悪性黒色腫細胞における細胞実験結果：超音波照射と超音波造影剤を併用し GFP

pEGFP-N1 cDNA は Clontech, Takara bio Inc(Ohtsu, Japan) 遺伝子導入した群の悪性黒色腫細胞は蛍光顕微鏡で全体の観測細胞の中の一部に GFP シグナルが発現していることが確認できた。導入率は 9.83%(±1.69 SD)であった。この方法で遺伝子が導入できることを確認した。

2 W/cm <sup>2</sup>	GFP(+)	Ulcer(++)	
1 W/cm <sup>2</sup>	Negative	Ulcer(+)	
0.5W/cm <sup>2</sup>	Negative	GFP(+)	GFP(++)
intensity/ duration	1 min	2 min	3 min

(3) 超音波発振プローブを用い生体組織（皮膚表面）の近くで超音波照射し、生体に対する影響は最小限に押さえられ、かつ、目標の組織部位で容易に遺伝子導入ができる点で今までのエレクトロポレーション方法に比べ安全に治療できる点が、本研究の成果としてあげられ、世界に先駆けて遺伝子導入がリアルタイムで視覚化でき、今後の臨床応用に必要なモニタリングシステムの意味で重要成果と考えられる。

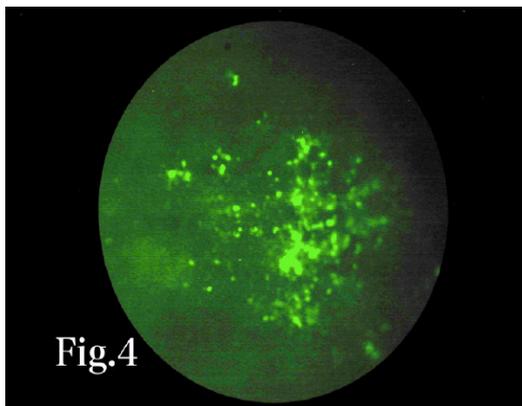


図4

#### 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5件)

- ① Hassan MA, Feril LB Jr, Suzuki K, Kudo N, Tachibana K, Kondo: Evaluation and

comparison of three novel microbubbles: Enhancement of ultrasound-induced cell death and free radicals production Ultrason Sonochem. 16(3);372-378, 2009、査読有り

- ② Dickerson C. Moreno, Feril LB Jr, Tachibana K, Irie Y, Gene Transfection through microbubble-aided sonication in cancer cells. Philippine Physics Journal. 31(3);1-6, 2009、査読有り
- ③ Yamaguchi K, Feril LB Jr, Harada Y, , Endo H, Irie Y, Nakayama J, Tachibana K, Growth inhibition of neurofibroma by ultrasound-mediated interferon  $\gamma$  transfection. Journal of Medical Ultrasonics, 36;3-8, 2009、査読有り
- ④ Tachibana K, Ogawa K, Ikeda-Dantsuji Y, Endo H, Harada Y, Kondo T, Ogawa R, Therapeutic potentials of low-intensity ultrasound (part II): Biomolecular effects, sono transfection and sono permeabilization, J. Med Ultrasonics, 35;161-167, 2008、査読有り
- ⑤ Feril LB Jr, Tachibana K, Yamaguchi K, Ogawa K, Ikeda-Dantsuji Y, Irie Y and Endo H, Bioeffects of Ultrasound for Therapy Philippine Physics Journal, 29;1-4, 2007、査読有り

〔学会発表〕(計4件)

- ① 立花 克郎、マイクロバブルの治療への応用、第10回国際造影超音波シンポジウム、東京；2008年12月13日
- ② 立花克郎、超音波遺伝子導入ブースター剤の開発  
第10回福岡大学技術交流会 産学官連携グランドコンベンション、2008年12月4日；福岡
- ③ 入江 豊, 立花克郎, フェリル ロリト, 遠藤日富美, 山口和記, 原田慶美、Sonoporation 法による皮膚への遺伝子導入、日本超音波学会第81回学術集会、2008年5月23日；神戸
- ④ 立花克郎、超音波の治療への応用—再生医療から癌治療まで—、日本皮膚科学会第340回福岡地方会 2007年3月10日；福岡市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

入江 豊 (IRIE YUTAKA)  
福岡大学・医学部・助教  
研究者番号：80352235

### (2) 研究分担者

立花 克郎 (TACHIBANA KATSURO)  
福岡大学・医学部・教授  
研究者番号：40271605

小川 皓一 (OGAWA KOICHI)  
福岡大学・医学部・准教授  
研究者番号：60078780

### (3) 連携研究者