

平成22年 4月13日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19300185

研究課題名（和文）バブルリポソームと超音波による siRNA 治療システムの開発

研究課題名（英文）Development of siRNA delivery system by the combination of bubble liposomes and ultrasound

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

研究成果の概要（和文）：バブルリポソームの調製法（GMP 対応、サイズ調整）を確立した。In vitro と in vivo において siRNA の効果を確認したが、十分な siRNA の効果を発するためには、超音波照射条件、バブルリポソーム投与量など至適化が必要であった。膀胱癌治療では、マウス膀胱癌細胞の PLK-1 に対する siRNA 導入によって抗腫瘍効果を検討中である。

研究成果の概要（英文）：The preparation method (GMP, controlled size) of bubble liposome was established. The effectiveness of siRNA in vitro and in vivo was observed. However, its effect was not enough for treatment. The condition of ultrasound and bubble liposome amount, etc, should be considered. Mouse bladder cancer therapy by the siRNA for PLK-1 is undergoing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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：低侵襲治療システム

## 1. 研究開始当初の背景

超音波とマイクロバブルを用いた遺伝子導入法の開発は、低侵襲的かつ超音波照射部位のみで遺伝子導入可能な方法として画期的であるが、マイクロバブルはもとも血管造影剤として開発されているため、形状的に大きく、遺伝子治療の臨床で要求される深部組織に到達させることは困難である。また、導入遺伝子を内封できないことや標的指向

性がないこと、血中安定性などに問題を抱えている。多くの研究では、遺伝子送達に最適化されたバブルが無いために、仕方なく市販のマイクロバブルを使用しているのが現状である。したがって診断・治療のための機能をもったバブル製剤の開発と共に遺伝子や siRNA に特化したバブルの開発が重要である。

## 2. 研究の目的

- (1) リポソームの形態を生かして siRNA の送達に特化したバブルリポソームを開発する。
- (2) 実用化を念頭に GMP 基準の製造法を確立する。
- (3) siRNA を特定の部位に安全かつ確実に導入する新しい送達システムを考案する。

## 3. 研究の方法

- (1) バブルリポソームの調製法 (GMP 対応、サイズ調整) の確立
  - ① GMP 対応 ② サイズ調整
- (2) バブルリポソームへの siRNA の会合 (会合型バブルリポソーム)
- (3) コレステロール修飾 siRNA (Chol-siRNA) の合成と組込型バブルリポソーム
- (4) siRNA 効果の in vitro 評価 (レポーター遺伝子を用いた評価)
- (5) siRNA 効果の in vivo 評価 (レポーター遺伝子を用いた評価)
- (6) 腫瘍細胞に対する siRNA 導入による抗腫瘍効果の誘導
- (7) ヒト膀胱癌の PLLK-1 を標的とする siRNA 導入による抗腫瘍効果の誘導

## 4. 研究成果

- (1) バブルリポソームの調製法 (GMP 対応、サイズ調整) の確立: エタノールのみを用いたリポソーム製剤の GMP 製造法を開発した。ガスの封入方法は GMP レベルでの大量調製を考え、バイアル瓶に高压にガスを封じ込めた密閉状態にして強力超音波照射 (27-45KHz、100W) で行う。
- (2) バブルリポソームへの siRNA の会合: REV 法によるコレステロール修飾 siRNA (Chol-siRNA) 組込リポソーム (脂質組成 DPPC:DSPE-PEG2000 (94:6m/m)) 調製法を確立した。アクリルアミドゲル電気泳動、RNase に対する抵抗性から、リポソームの膜内外に siRNA の組込を確認した (図 1)。組み込まれなかった Chol-siRNA を超遠心で除くことが可能で、精製度を上げることができた。このリポソームの siRNA の効果を検討したところ、単独では細胞への導入が低いためにほとんど効かないことを確認した。

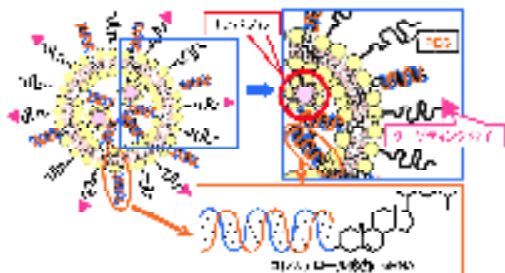


図 1 バブルリポソームへの siRNA の組込の検討

- (3) siRNA 効果の in vitro 評価 (レポーター遺伝子を用いた評価): ルシフェラーゼ遺伝子発現腫瘍細胞を腹腔内または皮下に移植し、siRNA 組込型・会合型バブルリポソームによる siRNA 導入効率を検討した (図 2)。In vivo におけるバブルリポソームおよび超音波照射条件の最適化を図った。siRNA の効果を確認したが、十分な siRNA の効果を発するまでに至らず、in vitro と in vivo 間の超音波照射条件、バブルリポソーム投与量など最適化が必要であった。
- (4) 腫瘍細胞に対する siRNA 導入による抗腫瘍効果の誘導: ルシフェラーゼ遺伝子発現腫瘍細胞に対する siRNA 組込型・会合型バブルリポソームと治療用超音波照射について、siRNA の細胞内導入効果を明らかにするために、pDNA と siRNA を同時に細胞内導入する共導入 (コトランスフェクション) との比較を行った。組込型バブルリポソームでは、低用量から高用量の chol-siRNA が効率よく搭載可能で安定性が向上した。また、超音波照射に応答しキャビテーションを生じ、遺伝子発現抑制を発揮した。安全性の高い導入法とするためには、更なる超音波照射条件の最適化を図る必要性が考えられる。

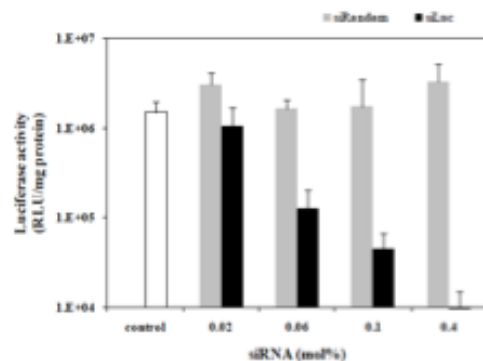


図 2 Down-regulation of luciferase expression on bysi-BLs and US  
 pDNA:5 $\mu$ g/well  
 si-BLs:60 $\mu$ g/well  
 (loading ratio of chol-siRNA 0.02~0.4mol%)  
 Sonication condition (Frequency:2028kHz, Duty50%, Burstrate:2.0Hz, Intensity:2.5W/cm<sup>2</sup>, Time:10sec.)  
 pDNA alone set as control.  
 Chol-siRNA: cholesterol conjugated siRNA  
 siRandom: controlled chol-siRNA,  
 siLuc: Luciferase specific chol-siRNA,  
 si-BLs: chol-siRNA loading Bubbleliposomes,  
 US:ultrasound

- (5) ヒト膀胱癌に対する siRNA 導入による抗腫瘍効果の誘導: PLK-1 (Polo-like kinase-1) は細胞周期のうち G2/M 期境界及び M 期に特異的に発現するセリン・スレオニンキナーゼで、細胞分裂時に紡錘体形成、染色体分離および細胞質の分裂に関与する。現在 PLK-1 に対する siRNA を作成して、ヒト膀胱癌モデルで検討中である。経尿道的に siRNA 組込型・

会合型バブルリポソームを投与して、体外より非侵襲的に治療用超音波照射して効果を見るが、期間内に終了することが出来なかった。

#### 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 Yoichi Negishi, Daiki Omata, Hiroshi Iijima, Yasuko Takabayashi, Kentaro Suzuki, Yoko Endo, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Motoyoshi Nomizu, and Yukihiro Aramaki, Enhanced Laminin-derived Peptide AG73-mediated Liposomal Gene Transfer by Bubble Liposomes and Ultrasound. *Molecular Pharmaceutics*. 査読有, 7, 2009, 217-226

② Yoichi Negishi, Yoko Endo, Tetsuya Fukuyama, Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Daiki Omata, Kazuo Maruyama, Yukihiro Aramaki, Delivery of siRNA into the cytoplasm by liposomal bubbles and ultrasound, *J. Controlled Release*. 査読有, 132, 2008, 124-130

③ Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa, Yoichi Negishi, Kosuke Hagisawa, Naoki Utoguchi, Kaori Sawamura, Kumiko Tanaka, Eisuke Namai, Yusuke Oda, Toshihiko Nishioka, Yasuhiro Matsumura, Kazuo Maruyama. Tumor specific ultrasound enhanced gene transfer in vivo with novel liposomal bubbles. *J. Control. Release*, 査読有, 125, 2008, 137-144

④ R. Suzuki, T. Takizawa, Y. Negishi. N. Utoguchi, K. Maruyama. Effective Gene Delivery With Liposomal Bubbles And Ultrasound As Novel Non-Viral System. *J. Drug Targeting*, 査読有, 15, 2007, 531-537

⑤ 鈴木亮, 滝澤知子, 宇都口直樹, 丸山一雄, 超音波を利用した siRNA デリバリーバイオインダストリー, 査読有, 24, 2007, 15-21

[学会発表] (計9件)

① 石井和美, 根岸 洋一, 遠藤葉子, 鈴木亮, 丸山一雄, 新槇幸彦, コレステロール修飾 siRNA 搭載型新規バブルリポソームによる siRNA 導入法の開発、日本薬学会第130年会、岡山、2010. 3. 28

② 遠藤葉子, 根岸洋一, 石井和美, 鈴木亮, 丸山一雄, 新槇幸彦, バブルリポソームと超音波照射併用によるコレステロール修飾 siRNA の細胞内導入法の開発、第8回日本超音波治療研究会、東京、2009. 11. 28

③ Yoko Endo, Yoichi Negishi, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, and Yukihiro Aramaki,

NOVEL SIRNA-LOADED LIPOSOMAL BUBBLES WITH ULTRASOUND EXPOSURE FOR RNA INTERFERENCE, Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense Symposium, Fukuoka, 2009. 11. 4

④ 遠藤葉子, 根岸洋一, 石井和美, 鈴木亮, 丸山一雄, 新槇幸彦, バブルリポソームによるマウス脛部筋組織への siRNA 送達システムの有用性の評価日本薬剤学会第24年会、静岡、2009. 5. 21

⑤ 遠藤葉子, 根岸洋一, 石井和美, 鈴木亮, 丸山一雄, 新槇幸彦, バブルリポソームと超音波照射併用による siRNA の細胞内導入およびその抑制効果、第7回日本超音波治療研究会、東京、2008. 11. 29.

⑥ Yoko Endo, Yoichi Negishi, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Yukihiro Aramaki, Intracellular Delivery of siRNA by Liposomal Bubbles and Ultrasound, 11th LIPOSOME RESEARCH DAYS CONFERENCE, yokohama, 2008. 7. 19.

⑦ 遠藤葉子, 根岸洋一, 石井和美, 鈴木亮, 丸山一雄, 新槇幸彦, バブルリポソームと超音波照射併用による siRNA の細胞内導入機構、第24回日本DDS学会、東京、2008. 6. 29

⑧ 遠藤葉子, 根岸洋一, 石井和美, 鈴木亮, 丸山一雄, 新槇幸彦, バブルリポソームによるマウス脛部筋組織への siRNA 送達システムの有用性の評価、日本薬剤学会第23年会、札幌、2008. 5. 20

⑨ 遠藤葉子, 根岸洋一, 石井和美, 鈴木亮, 丸山一雄, 新槇幸彦, siRNA デリバリーツールとしてのカチオン性脂質含有バブルリポソームの調製とその基礎的検討、日本薬学会第129年会、京都、2008. 3. 26.

[図書] (計1件)

① Suzuki R, Maruyama K, Springer, New York. Effective In Vitro and In Vivo Gene Delivery by The Combination of Liposomal Bubbles (Bubble liposomes) and Ultrasound Exposure, in *Liposomes, Methods and Protocols* (Ed by Volkmar Weissig) 2010, pp473-486

[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

## 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

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

鈴木 亮 (SUZUKI RYO)  
帝京大学・薬学部・助教  
研究者番号：90384784

滝澤 知子 (TAKIZAWA TOMOKO)  
帝京大学・薬学部・助手  
研究者番号：90260934  
(2007年)