

平成21年4月8日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19800002

研究課題名（和文） ナノバブルと超音波を用いた新しいワクチン接種システムの開発

研究課題名（英文） A feasibility study for a new vaccination system using Nanobubbles and ultrasound

研究代表者

堀江 佐知子 (HORIE SACHIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・技術補佐員

研究者番号：90451640

研究成果の概要：本研究の目的は、ナノバブルと超音波を用いた新しいワクチン接種法のためのドラッグデリバリーシステムを開発し、これまで治療が困難であった感染症などの予防や治療に貢献することである。これまで我々は、ナノバブルの体内分布の超音波画像でのモニタリングや生体細胞への遺伝子導入効率、さらには、超音波照射とナノバブル破碎時の組織障害の程度、それにともなう炎症性細胞浸潤の程度などを検討した。その結果、静脈注射によりナノバブルがリンパ節に流入し、リンパ節内の樹状細胞に抗原タンパクや遺伝子の導入が可能であること、ナノバブル破碎時の超音波の強さを調節することにより、照射部に適度な炎症性細胞の集簇を促し、ナノバブル破碎によるアジュバント効果が期待できること、ナノバブル表層への抗体の組み込みが可能なこと、バブル内への抗原タンパクや遺伝子、あるいはアジュバント分子の封入が可能であることなど、本研究を推進する上で極めて重要な知見を得ることができた。しかし、ナノバブルと超音波を用いた分子導入法においては、導入効率の低さが問題になる可能性が考えられた。そこで、1回のトランスフェクションで100日以上もタンパク発現が可能で長期発現プラスミドDNAをナノバブルと超音波を用いて導入するシステムを開発し、従来の分子導入法の導入効率の低さの問題を解決することが可能となった。しかしその一方で、生体内での持続的なウイルス抗原の産生は、高グロブリン血症や免疫複合体病等の誘発の可能性も考えられることから、今後は、タンパク発現量の増大のみならず発現タンパクの制御法の検討も必要かと思われる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	890,000	0	890,000
2008年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,840,000	285,000	2,125,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医用システム

キーワード：(1) ナノバブル (2) 超音波 (3) ワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、トリインフルエンザや地球温暖化に伴うマラリアなどの感染症の地球規模での拡大が危惧されているが、研究代表者は長年アメリカ合衆国に滞在し、アメリカ合衆国におけるマイノリティーや貧困層のエイズやB型肝炎の問題解決のためのフィールドワークに参加し、これらの感染症問題の現状を間近にみてきた経験から、地球規模で拡大する感染症の深刻さを実感している。研究代表者は現在、東北大学大学院医工学研究科治療医工学講座分子デリバリーシステム研究分野と協力し、ナノバブルと超音波を用いた分子導入法を用いた遺伝子治療の研究に携わっているが、非侵襲的に生体組織細胞に分子導入できるこの分子導入法を用いれば、これまでにない有効なワクチン投与が可能になり、感染症をはじめとする様々な疾患の予防や治療に貢献できるのではないかと思いたった。

ワクチンは、感染予防のみならず、がん治療などの幅広い医療分野への応用が期待される医療技術である。ワクチン接種を受けた個体は、その後、ある特定の病原体の感染を回避することができるが、この特質は、同じ病原体には二度と罹らずという免疫系の「記憶」作用に依存している。この「記憶」は、免疫応答の強さ、迅速さを二次免疫応答に賦与するものであるが、これには、ワクチン接種時に誘導される一次免疫応答でのアジュバント（副刺激）作用、樹状細胞やリンパ球上の共刺激分子を介したシグナルの質が深く関与している。また、最近では、ワクチン誘導の場の重要性も認識されてきた。したがって、ワクチン医療の応用性は、いかに副刺激、共刺激、誘導の場を工夫して、治療目的に沿う二次免疫応答を誘導するかに寄っていると言うことができる。実際に、ワクチン誘導時の共刺激シグナル強度を抗体でブロックしたり刺激したりして変え、がん細胞に対する免疫を増強したり、アレルギーや自己免疫応答といった免疫疾患を軽減する方法が提案され、動物実験ではある程度の成功を修めている。ワクチン医療は、今後、臨床への応用が期待されるとともに、その工夫による改善の余地が多いに残された技術分野であるとも言える。

一方、超音波と微小気泡を使った分子導入法は、気泡が超音波照射により破壊される時に生じる衝撃波や液体ジェット等の衝撃圧を利用して、非侵襲的に標的組織に遺伝子などの高分子を導入することが可能であるが、研究代表者が所属する東北大学大学院医工学研究科治療医工学講座分子デリバリーシステム研究分野の小玉哲也教授は、超音波特性とキャビテーション気泡の動特性との相関から、直径 200nm 以下のキャビテーション

気泡の衝撃圧の制御で分子導入効率の改善が図られることを確認し、経皮的な分子導入をも可能にする高効率型超音波分子導入装置（特許出願中、発明者：小玉哲也、森士朗、出願番号：特願 2006-109894、PTC/JP2001/057878）を開発した。

また、ワクチン開発に応用できるナノバブルの優れた特質は、ナノバブルに標的細胞に特異的な抗体やリガンドを組み入れ、かつ抗原分子や抗原遺伝子をバブルに内包させることにより、細胞標的性を持ったドラッグデリバリーシステムの担体として利用できる点と、非ウイルス性の遺伝子導入ベクターとしてできる点にある。さらに、ナノバブルは構造的コンプライアンスから、副刺激分子や共刺激モジュレーターなどを抗原分子や抗原遺伝子とともに運搬することが可能である。以上の利点を考慮し、ナノバブルと超音波を用いた新しいワクチン接種法のためのドラッグデリバリーシステムを開発し、これまで治療が困難であった感染症などの予防や治療に貢献することができるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

近年、地球規模での感染拡大が危惧されているトリインフルエンザやエイズなどの感染症に対処するため、分子生物学的手法を駆使したワクチン開発が試みられ、治療に有用と思われる様々な遺伝子やタンパクが報告されてきた。しかし、これらのタンパクや遺伝子を用いたワクチン接種システムの開発は、著しく立ち遅れており、特に、抗原遺伝子を用いたワクチン接種のための臨床応用可能な遺伝子導入システムは、現在のところ皆無と言っても過言ではない。これまで報告されてきたウイルスベクターを用いた方法は安全性や標的細胞の特異性に問題があり、電気パルスを用いたエレクトロポレーション法や超音波を用いたソノポレーション法、あるいはリポソームを用いた方法には導入効率に問題があり、いずれにおいても問題が山積している状態である。

超音波とナノバブルを用いた分子導入法では、細胞膜に一過性の浸透圧変化を誘起して、エンドサイトーシスを介さずに、外来分子を細胞質に直接導入することを基本原理としている。したがって、高い分子導入効率と治療効果を改善するためには、キャビテーション気泡の動特性と超音波特性の関係を明らかにすること、および、対象とする細胞の増殖機能に本質的な個所でキャビテーション気泡の衝撃圧を誘発する方法論を確立する必要がある。研究代表者の指導者である小玉教授は、キャビテーション気泡の動特性に着目して経皮的な分子導入をも可能にする高効率型超音波分子導入装置（特許出願中、

発明者：小玉哲也、森士朗、出願番号：特願2006-109894、PTC/JP2001/057878))を作製した。また、研究代表者は、現在、小玉教授の共同研究者である東北大学医学系研究科病理病態学講座病理形態学分野の小野栄夫教授に、免疫病理学的研究に関して御教授いただいている。従って、研究代表者が、これまで小玉教授や小野教授の指導のもとに修得してきたナノバブルと超音波を用いた遺伝子導入法と免疫病理学的研究手法のノウハウを応用すれば、これまで治療が困難であった感染症などにも有効な新しいワクチン接種システムの開発も可能かと思われる。本研究の目的は、ナノバブルと超音波を用いた新しいワクチン接種法のためのドラッグデリバリーシステムを開発し、これまで治療が困難であった感染症などの予防や治療に貢献することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 分子導入用ナノバブルの作製

後述する動物実験において、組織内に漏出・滞留するナノバブルの時間応答性を見るために、直径が異なる二つの脂質ナノバブルを作製した。各組成と平均直径は Distearoyl-Phosphocholine(DPPC)+6%Distearoyl Phosphoethanolamine (DSPE)-PEG-OMe (平均直径 170nm) および Distearoyl phosphatidylcholine (PC)-PEG (平均直径 400nm) で、ナノバブルはロータリーエバポレーターで作製した。

#### (2) エコー輝度情報の定量化

後述する動物実験において、組織内に漏出・滞留するナノバブルの画像情報を小型動物用超音波イメージング装置(最高周波数 80MHz)で取得し、ナノバブルの直径、ナノバブル注入後の濃度の経過時間に対するエコーの輝度情報を定量化した。

#### (3) キャビテーション気泡の動特性

キャビテーション気泡の動特性を解明するにはキャビテーション気泡の粒径分布と減衰特性スペクトルの情報が不可欠である。まず、水槽実験から、超音波照射後のナノバブルの粒径分布を粒度分布測定装置で測定し、次に、気泡の音響減衰スペクトルをパルスレーザで測定した。また、破壊時の圧力情報を高周波帯域用マイクロフォンで測定しFFT解析を行った。さらに、粒径分布、音響減衰スペクトル、FFT解析を基礎に、Keller-Miksis の気泡モデルからキャビテーション気泡の動特性を求めた。

#### (4) キャビテーション気泡による細胞膜の浸透圧変化機構の解明

研究代表者の指導者である小玉教授らが

開発をおこなってきた衝撃波と脂質二重層膜の分子動力学シミュレーションの数値コードを使い、キャビテーション気泡の崩壊で発生する衝撃波と細胞膜との干渉問題に取り組み、細胞膜の構造変化をオーダーパラメーター、二次元動径分布関数、自由ポテンシャルエネルギーで評価して、外因性分子の細胞膜貫通のメカニズムを調べた。

#### (5) 遺伝子導入用長期発現性プラスミド DNA の作製

本研究においては、生体発光イメージングシステムを用いて、遺伝子導入効率を定量的にリアルタイムで検討するために、リポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子をレンチウイルス骨格のプラスミドに組み入れて、ルシフェラーゼ長期発現性プラスミド DNA を作製した。

#### (6) マウス組織への分子導入

マウスの皮下組織、筋組織、あるいはリンパ節組織等に、上記ルシフェラーゼ長期発現性プラスミド DNA およびナノバブルを注入し、我々の研究室で開発した高効率型超音波分子導入装置を用いて、組織内のナノバブルを破壊し、ルシフェラーゼ遺伝子の導入を行った。

#### (7) マウス組織におけるリポーター遺伝子発現の経時的・定量的検討

生体発光イメージングシステムを用いて、マウス組織内に導入したルシフェラーゼの遺伝子導入効率を経時的かつ定量的にリアルタイムで検討した。

#### (8) マウス組織におけるリポーター遺伝子発現細胞の同定

ルシフェラーゼ遺伝子を導入したマウス組織を経時的に採取し、病理組織標本を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色および抗ルシフェラーゼ抗体を用いた免疫組織化学的染色を行い、遺伝子導入部位に関して病理組織学的に検討するとともに、遺伝子導入細胞の同定を免疫組織化学的に検討した。

### 4. 研究成果

これまで我々は、ナノバブルの体内分布の超音波画像でのモニタリングや生体細胞への遺伝子導入効率、さらには、超音波照射とナノバブル破碎時の組織障害の程度、それに伴う炎症性細胞浸潤の程度などを検討した。

その結果、本研究および本研究に関する様々な予備実験を通じて、静脈注射によりナノバブルがリンパ節に流入し、リンパ節内の樹状細胞に抗原タンパクや遺伝子の導入が可能であること、ナノバブル破碎時の超音波の強

さを調節することにより、照射部に適度な炎症性細胞の集簇を促し、ナノバブル破碎によるアジュバント効果が期待できること、ナノバブル表層への抗体の組み込みが可能なこと、バブル内への抗原タンパクや遺伝子、あるいはアジュバント分子の封入が可能であることなど、本研究を推進する上で極めて重要な知見を得ることができた。

しかし、ナノバブルと超音波を用いた分子導入法においては、導入効率の低さが問題になる可能性が考えられた。そこで、1回のトランスフェクションで100日以上もタンパク発現が可能な長期発現プラスミドDNAをナノバブルと超音波を用いて導入するシステムを開発し、従来の分子導入法の導入効率の低さの問題を解決することが可能となった。しかしその一方で、生体内での持続的なウイルス抗原の産生は、高グロブリン血症や免疫複合体病等の誘発の可能性も考えられることから、今後は、タンパク発現量の増大のみならず発現タンパクの制御法の検討も必要かと思われる。

#### 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1件)

- ①渡邊夕紀子、青井あつ子、堀江佐知子(他6名)、Low-intensity ultrasound and microbubbles enhance the antitumor effect of cisplatin, *Cancer Science*, Vol.99, 2525-2531, 2008、査読有

[学会発表] (計34件)

- ①李麗、高周波超音波を用いたリンパ節早期転移の画像診断システムの開発、第42回日本生体医工学会 東北支部大会講演会、2008年12月13日、東北大学青葉記念会館(仙台)
- ②富田典子、Development of diagnostic imaging system for regional lymph node micrometastasis with high-frequency ultrasound、2008 IEEE International Ultrasonics Symposium、2008年11月3日、International Convention Center(北京、中国)
- ③陳銳、Contrast-Enhanced High-Frequency Imaging of Liver Metastases in preclinical models、2008 IEEE International Ultrasonics Symposium、2008年11月3日、International Convention Center(北京、中国)
- ④陳銳、Local gene delivery system of nano/microbubbles-enhanced ultrasound aimed for treatment of gingival tumor、2008 International Conference on

Frontiers of Dental and Craniofacial Research、2008年11月1日、Beijing International Conception Center(北京、中国)

- ⑤堀江佐知子、ナノバブルと超音波を用いた膀胱がんへの遺伝子導入法の開発、第46回日本癌治療学会学術総会、2008年10月31日、名古屋国際会議場(名古屋)
- ⑥富田典子、高周波超音波イメージングシステムを用いた所属リンパ節転移画像診断システムの開発、第46回日本癌治療学会学術総会、2008年10月31日、名古屋国際会議場(名古屋)
- ⑦富田典子、高周波超音波を利用した新しいリンパ節内微小転移診断システムの開発、第67回日本癌学会総会、2008年10月30日、名古屋国際会議場(名古屋)
- ⑧堀江佐知子、膀胱がん治療のための新しい薬剤送達法の開発、第67回日本癌学会総会、2008年10月29日、名古屋国際会議場(名古屋)
- ⑨陳銳、ナノバブルを用いた肝転移診断に関する三次元高周波超音波イメージング、第67回日本癌学会総会、2008年10月29日、名古屋国際会議場(名古屋)
- ⑩渡邊夕紀子、癌疼痛緩和およびPETによるイメージング、67回日本癌学会総会、2008年10月29日、名古屋国際会議場(名古屋)
- ⑪堀江佐知子、膀胱がん治療のための分子デリバリーシステムの開発、東北大学イノベーションフェア2008 in仙台、2008年9月30日、仙台国際センター(仙台)
- ⑫富田典子、高周波超音波を利用した主要性リンパ節内血管構築による早期診断法の開発、東北イノベーションフェア2008 in仙台、2008年9月30日、仙台国際センター(仙台)
- ⑬渡邊夕紀子、各種疾患モデルマウス前脛骨筋におけるNIS遺伝子発現のPETによる可視化、東北イノベーションフェア2008 in仙台、2008年9月30日、仙台国際センター(仙台)
- ⑭堀江佐知子、Bladder cancer therapy using nanobubbles and two different intensities of ultrasound、Nanomedicine2008、2008年9月21日、ホテルエデンロック(スペイン)
- ⑮渡邊夕紀子、ナノ・マイクロバブルと超音波によるシスプラチンの抗腫瘍効果の増強、日本超音波医学会第36回東北地方学術集会、2008年9月21日、山形テレサ(山形)
- ⑯渡邊夕紀子、マウス骨格筋でのNa/I symporter(NIS)遺伝子発現の可視化、日本機械学会2008年度年次講演会、2008年8月3-7日、横浜国立大学(横浜)
- ⑰陳銳、歯周組織への遺伝子導入を目指した

新しい非ウイルス法の開発、日本実験力学  
会 2008 年度年次講演会、2008 年 6 月 30 日  
-7 月 2 日、北海道大学学術交流会館（北海  
道）

⑱宮下仁、ナノバブル超音波システムを用いた  
抗癌剤および抗腫瘍分子導入による新  
たな癌治療法の開発、第 32 回日本頭頸部  
癌学会/第 29 回頭頸部手術技研究会、2008  
年 6 月 11-13 日、ハイアットリージェン  
シー東京（東京）

⑲大木宏介、ナノバブルを用いた腫瘍血管造  
影法による口腔癌早期診断システムモデ  
ルの開発、第 32 回日本頭頸部癌学会/第 29  
回頭頸部手術技研究会、2008 年 6 月 11-  
13 日、ハイアットリージェンシー東京（東  
京）

⑳小玉哲也、高周波超音波イメージングシス  
テムによるシスプラチン抗腫瘍効果の定  
量化、第 46 回日本生体医工学大会、2008  
年 5 月 10 日、神戸国際会議場（神戸）

㉑富田典子、高解像度超音波イメージングシ  
ステムを用いたシスプラチンによる抗腫瘍  
効果の定量化、2008 年 3 月 23 日、仙台市情  
報・産業プラザ アエル 5 階（仙台）

㉒渡邊夕紀子、ナノバブルと超音波を利用し  
た炎症性疾患モデルマウスでの Na/I  
symporter (NIS) 遺伝子発現の可視化、2008  
年 3 月 23 日、仙台市情報・産業プラザ ア  
エル 5 階（仙台）

㉓ 富田典子、Evaluation of  
cisplatin-induced antitumor effect with  
contrast-enhanced high-frequency  
ultrasound、The 11<sup>th</sup> International  
Symposium on Advanced Biomedical  
Ultrasound、2008 年 3 月 7 日、東北大学（仙  
台）

㉔陳銳、ナノバブルと超音波を用いた歯周組  
織への遺伝子導入、日本機械学会 第 20 回  
バイオエンジニアリング部門講演会、2008  
年 1 月 25-26 日、芝浦工業大学 豊洲キャン  
パス（東京）

㉕堀江佐知子、High frequency ultrasound  
for analysis of antitumor effects、第 19  
回先端医療技術学会国際会議 (SMIT)、2007  
年 11 月 20 日、仙台エクセルホテル東急（仙  
台）

㉖渡邊夕紀子、Molecular imaging of gene  
expression induced by delivery of  
nanobubbles and ultrasound、第 19 回先端  
医療技術学会国際会議 (SMIT)、2007 年 11  
月 20 日、仙台エクセルホテル東急（仙台）

㉗ 富田典子、Three-dimensional image of  
intratumoral neovascular constructed with  
high-frequency contrast-enhanced  
micro-ultrasound、第 19 回先端医療技術学  
会国際会議 (SMIT)、2007 年 11 月 20 日、仙  
台エクセルホテル東急（仙台）

㉘堀江佐知子、高周波超音波画像診断による  
シスプラチン(CDDP)の抗腫瘍効果の評価、東  
北大イノベーションフェア 2007in仙台、2007  
年 10 月 5 日、仙台国際センター（仙台）

㉙堀江佐知子、高周波超音波画像診断による  
抗腫瘍効果の評価、第 66 回日本癌学会学術  
総会、2007 年 10 月 4 日、横浜パシフィコ（横  
浜）

㉚ 富田典子、ナノバブルと高周波超音波によ  
る腫瘍内血管の三次元画像の構築、第 66 回  
日本癌学会学術総会、2007 年 10 月 4 日、横  
浜パシフィコ（横浜）

㉛渡邊夕紀子、ソノポレーションと Na/I シン  
ポーター遺伝子の可視化、第 66 回日本癌学  
会学術総会、2007 年 10 月 4 日、横浜パシフ  
ィコ（横浜）

㉜陳銳、Periodontal gene transfer using  
ultrasound and nano/microbubbles、日本超  
音波医学会第 34 回東北地方学術集会、2007  
年 9 月 30 日、長陵会館（仙台）

㉝ 富田典子、シスプラチンを使った抗腫瘍効  
果：高周波超音波による定量化、日本機械学  
会 2007 年度年次大会、2007 年 9 月 9-12 日、  
関西大学（吹田）

㉞小玉哲也、ソノポレーションによる遺伝子  
導入効率：気泡特性に対する検討、日本超音  
波医学会第 80 回学術集会、2007 年 5 月 18-20  
日、城山観光ホテル（鹿児島）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀江 佐知子 (HORIE SACHIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・技術補佐員  
研究者番号：90451640

### (2) 研究協力者

小玉 哲也 (KODAMA TETSUYA)

東北大学・大学院医工学研究科・教授  
研究者番号：40271986

小野 栄夫 (ONO MASAO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20302218

森 士朗 (MORI SHIRO)

東北大学・病院・講師  
研究者番号：80230069