

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20300173

研究課題名（和文） ナノバブルと超音波を用いた肝がん、膀胱がんへの遺伝子治療法の開発

研究課題名（英文） Development of gene therapy of liver and bladder cancer by using nanobubbles and ultrasound

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

本研究では、局所療法および EPR 効果が有効な膀胱癌および肝癌を対象に、ナノバブルと超音波を用いた遺伝子治療法の開発をおこなった。音響性リポソーム(ナノバブル)、二重超音波照射法による膀胱内壁への癌蛍光分子とプラスミド DNA の導入の実現、TNF α 遺伝子による腫瘍組織への導入と抗腫瘍効果の達成、肝癌治療評価のためのナノバブルと高周波超音波を組合せた3次元血管構築法の開発をおこなった。本成果により、膀胱癌および肝癌に対する新しい遺伝子治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The present research was aimed to develop a new gene therapy method of bladder and liver cancer by using nanobubbles (NBs) and ultrasound (US). The former was based on regional cancer therapy, and the later on the enhanced permeability and retention (EPR) effect. We developed acoustic liposome (NBs) (< 200nm in diameter) as drug carrier and ultrasound contrast agent, dual ultrasound exposure system with high/low acoustic intensity pulses for effective delivery of fluorescent molecules and naked plasmid DNA to the bladder wall in the presence of NBs. In addition, we achieved therapeutic level by delivering tumor necrosis factor (TNF)-alpha expressing plasmid DNA to solid tumors of mice with NBs and US. Furthermore, we established a two/three-dimensional (2/3D) vascular construction method to evaluate therapeutic effects on liver cancer by using NBs and US. Our results demonstrate that the combination of these established materials and methodology can be used for a new gene therapy of bladder and liver cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,400,000円	1,920,000円	8,320,000円
2009年度	3,000,000円	900,000円	3,900,000円
2010年度	5,700,000円	1,710,000円	7,410,000円
年度			
年度			
総計	15,100,000円	4,530,000円	19,630,000円

研究分野：人間医工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医療システム

キーワード：ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

超音波とナノ・マイクロバブルを使った分子導入法の問題点は、分子導入効率の低さにあると言える。導入効率を改善し、がんの治療効果を改善するには、薬剤到達効率が期待できる「がん」を選択し、バブルの衝撃圧制御法と長期発現治療用プラスミド DNA を開発することが必要である。薬剤の分子送達法は、局所投与（腹腔内投与、膀胱内投与、動脈注射等）と全身投与（静脈注射）に大別され、前者は後者に比べて分子送達効率は 1,000 倍高いという特徴がある。局所投与を考えれば、既存の治療法に優位性があり、抗腫瘍効果が期待できる臨床的に意味ある「がん」は、膀胱がん、脳腫瘍、卵巣がん、肝がんに限定される。

一方で、腫瘍新生血管は通常の血管に比べて血管壁の透過性が亢進しており、直径 200nm 以下の粒子は血管壁から流出・滞留する、いわゆる EPR 効果が確認されている。血液中にある酸素は血管壁から 100-200 μ m に拡散し、この範囲内にがん細胞は生存する。したがって、200nm 以下のナノバブルが血管に注射されれば、EPR 効果によってナノバブルは腫瘍新生血管壁から抜け出し、酸素拡散領域にある細胞周辺に滞留することになる。したがって、この状態にあるナノバブルを超音波照射で破壊して衝撃圧を誘起することができれば、腫瘍新生血管を標的とした分子導入法が可能になると考えられる。上記の局所投与に有効な「がん」と EPR 効果との相乗効果が期待できるがんは「肝臓がん」に限定される。

本研究では、局所投与と EPR 効果を考慮して、「膀胱がん」および「肝がん」を治療対象に選定している理由はここにある。

2. 研究の目的

本研究では、局所投与と EPR(Enhanced Permeability and Retention) 効果が有効な「膀胱がん」と「肝がん」を遺伝子治療の対象に、以下の 3 綱目を目指とする。(1) 長期発現治療用プラスミド DNA を内包する治療・標的ナノバブルを開発する。(2) ナノバブルと超音波によるプラスミド DNA の導入する。(3) 抗腫瘍効果を超音波の腫瘍形態とナノバブルの移動軌跡から再構築された腫瘍新生血管の三次元的な構造変化から定量をおこなう。

3. 研究の方法

(1) ナノバブルの開発

①音響性ナノバブルの開発
Distearoyl - Phosphocholine (DSPC)+
Distearoyl Phospho-ethanolamine (DSPE) -
PEG - OMe および Distearoyl

phosphatidylcholine (PC)-PEG をナノバブルの基本組成として、音響性ナノバブルを開発する。音響性は高周波超音波、構造は透過型電子顕微鏡で観察する。

②長期安定性ナノバブルの開発

上記組成に、キトサンを添加し、バブルの安定化を図る。生体中での安定性評価には、リンパ腫鼠 MCX10 マウスを使用し、腫瘍リンパ節内を流れるバブルの輝度を高周波超音波で評価する。

(2)膀胱癌・肝癌遺伝子治療法の開発

①二重超音波照射法の開発

膀胱のような閉鎖系を考えた場合には、低圧と高圧の二つの超音波音波で構成された二重超音波照射法を使用することで、膀胱壁への分子導入が可能になるもと考えられる(図 1)。ここでは、膀胱内をナノバブルと蛍光分子ないしはルシフェラーゼ発現性プラスミド DNA からなる混合溶液で満たし、内尿道口から膀胱尖に向けて二重超音波を照射する。生体発光イメージング装置と病理解析で導入効率の評価をおこなった。

②遺伝子治療への応用

腫瘍壊死因子(TNF- α)遺伝子を用いた膀胱癌・肝臓癌への遺伝子治療法の開発を目指す。これら腫瘍に対する TNF- α 遺伝子の抗腫瘍効果を確認するために、マウス固形腫瘍を用いて抗腫瘍効果を評価する。細胞実験では、EMT-6 細胞および Colon26 細胞に TNF α 遺伝子を導入し、アポトーシスの誘導が蛍光顕微鏡で確認する。In vivo 実験では固形腫瘍(EMT-6 細胞および Colon26 細胞)をマウス側腹に作製し、TNF- α とナノバブルの混合液を固形腫瘍に注射後に、超音波を照射する。抗腫瘍効果には、高周波超音波を用いた三次元血管構築法で腫瘍組織や血管構造の縮退、形状変化等の定量をおこなう。アポトー

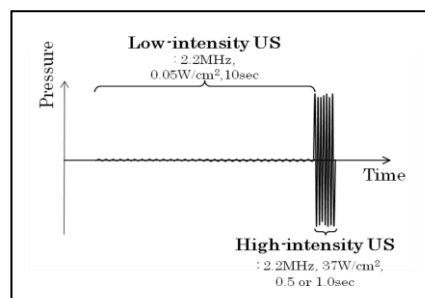


図 1. 二重照射法。低圧超音波と高圧超音波で構成される。

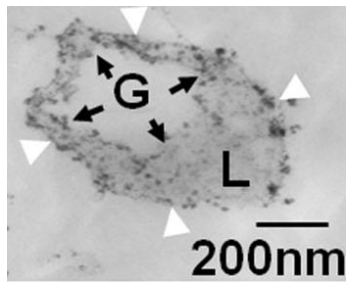


図 2. 音響性リポソームの透過型電子顕微鏡像. G:ガス, L:液体.

シス評価には、定量 PCR で caspase3, P53, および TNF α の遺伝子発現を定量化し、免疫染色で、caspase3, P53, および CD31 の発現を調べる。

③肝転移マウスモデルの開発

脾臓から肝臓に転移可能な転移モデルを開発する。ルシフェラーゼ発現性がん細胞 (EMT-6-Luc 細胞および Colon26-Luc 細胞) を使用し、脾臓から肝臓する肝転移を生体発光イメージング法および免疫染色で確認する。転移ルートの確認には、インドシアニン・グリーン (ICG) と近赤外線カメラを使用した。

④肝転移マウスモデルを用いた血管構築法の開発

ナノバブル輝度情報から三次元血管構造を取得するために、実験小動物用超高解像度超音波イメージングシステムの超音波プローブ (80MHz) を三次元移動計測システムに固定し、B モード画像を 30 μ m 間隔で 1 分間あたり 100 枚取得する。時系列の B モード画像に対し、輝度値の統計量に基づくアルゴリズムを開発し、従来指摘されている生体の動きともなって生じる輝度値の変化量を抑える。血液中バブル濃度を調整し、バブルと周囲の組織との超音波輝度値の差異を明確化できるよう、血管の三次元構築をおこなう。

4. 研究成果

(1) ナノバブルの開発

①音響性ナノバブルの開発

音響性リポソームの形態を透過型電子顕微鏡で調べた。気液封入効率は 20% であった。つぎに、液相リポソームの場合には、蛍光測定法から DNA への封入効率は 30% 程度であることが示された。

②長期安定性ナノバブルの開発

キトサンが含まれるバブル組成をもつナノバブルの腫脹リンパ節内で滞留時間を、高周波超音波で調べたところ、40 分以上滞留時間の滞留時間を確認することができた。

(2) 膀胱癌・肝癌遺伝子治療の開発

①二重超音波照射法の開発

蛍光分子は膀胱尖部位のみに導入され、その導入効率は超音波エネルギーに比例し増加した。同手法でルシフェラーゼ発現性プラスミド DNA も膀胱尖部位に導入することが可能であった。

②遺伝子治療への応用

細胞実験では、TNF α 遺伝子の導入によって、アポトーシスが誘導されることが蛍光顕微鏡で確認された。In vivo 実験ではナノバブルと超音波によって TNF α 遺伝子を固形腫瘍に導入した。生体発光イメージング装置、CD31 免疫染色、蛍光顕微鏡観察、定量 PCR により抗腫瘍効果が確認された。この事実から、TNF α 遺伝子を膀胱がんに導入することで抗腫瘍効果が得られるものと判断された。

③肝転移マウスモデルの開発

腫瘍細胞を脾臓に移植し、門脈経由で形成された肝転移モデル系の確立の可能性が示唆された。肝臓以外の臓器にも、がんの転移が観察され、手技改善の必要性も示唆された。肝転移モデルでは、マウスが死にやすく、おそらく 2 度の開腹手術と、移植や脾臓摘出時にがん細胞が漏れることで転移の進行が進んだことによるものと考えられる。脾臓摘出時にレーザーメス等で止血することで、この種の腫瘍細胞の漏出は防げるものと推測される。転移ルートの解明には、ICG をマウスの脾臓に注射し、近赤外観察カメラを使用した。マウス脾臓の中央部を短軸方向に結札し、脾臓の上部ないし下部に ICG 注射すると、いずれの場合においても、脾臓から肝臓に ICG が広がることが確認された。このルートを基礎に、肝転移の遺伝子治療を今後おこなう場合には、脾臓の半分を利用して肝転移モデルを作製し、残る半分の脾臓に遺伝子反復投与をおこなうような、遺伝子治療モデルを提案できる可能性がある。

④肝転移マウスモデルを用いた血管構築法の開発

臨床で使用されているソナゾイドをコントロールに使用した。肝転移部位でのナノバブルの安定性を高周波超音波の輝度値で評価

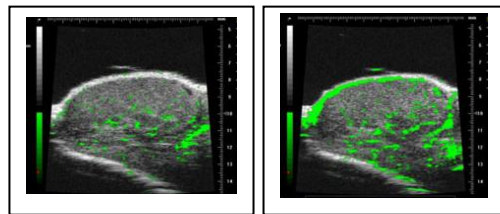


図 3. 長期安定性ナノバブルの超音波画像。(左)バブル投与 1 分後、(右)バブル投与 40 分後。

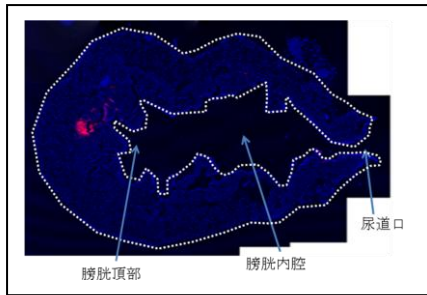


図 4. 二重超音波照射法を用いたマウス膀胱頂部への分子導入法. 蛍光分子が膀胱頂部のみに局限して導入される.

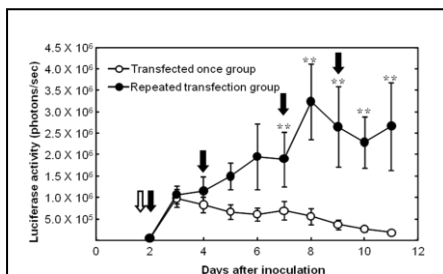


図 5. ナノバブルと超音波を用いた TNF α 遺伝子導入にともなう抗腫瘍効果. 繰り返し TNF α を導入することで, 腫瘍増殖を抑制することができる. ●: 繰り返し投与. ○: 1 回投与.

した. 輝度値はナノバブルの濃度に依存し, 10 μ g/mL で最大値が得られた. 生体内での安定性は, ソナゾイドでは尾静脈注射後 600 秒後でも一定の輝度値を保持するのに対して, ナノバブルでは尾静脈注射後, 約 100 秒程度で輝度値が半減した. 腫瘍新生血管の三次元的な構造変化は, ソナゾイドで有意差が確認されたが, ナノバブルでは確認されなかった. この結果は, 生体内のバブルの寿命時間を増加させることで, 腫瘍新生血管の三次元的構造変化から, 肝転移の早期診断法の開発が可能であることが示唆された.

以上の成果により, 膀胱癌および肝癌に対する新しい遺伝子治療法の可能性が示唆された.

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 11 件)

- ① du Toit LC, Govender T, Pillay V, Choonara YE, Kodama T. Investigating the effect of polymeric approaches on circulation time and physical properties of nanobubbles. *Pharmaceutical Research*. 査読有. 2010; 28: 494-504.
- ② Kodama T, Tomita N, Horie S, Sax N,

Iwasaki H, Suzuki R, Maruyama K, Mori S, Fukumoto M.

Morphological study of acoustic liposome using transmission electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy*. 査読有. 2010; 59(3):187-196

- ③ Kodama T, Tomita Y, Watanabe Y, Koshiyama K, Yano T, Fujikawa S. Cavitation bubbles mediated molecular delivery during sonoporation. *Journal of Biomechanical Science and Engineering*. 査読有. 2009; 4: 124-140.

[学会発表] (計 47 件)

- ① 小玉哲也. 三次元高周波超音波およびナノバブルを用いた肝転移の非侵襲的観察 第 69 回日本癌学会学術総会. 2010 年 9 月 22 日 (水) -24 日 (金) (大阪)

- ② Kodama T. Longitudinal three-dimensional noninvasive imaging analysis and quantification of anti-tumor effects of TNF-alpha gene for small tumor. 2010 World Molecular Imaging Congress. September 8-11, 2010., Kyoto, Japan.

- ③ Kodama T. Development and characterization of echogenic polyglutylated liposomes. 第 26 回日本 DDS 学会学術集会. 2010 年 6 月 17 日 (木) -18 日 (大阪国際交流センター)

- ④ Kodama T. Three-dimensional high-frequency ultrasound imaging for early diagnosis of lymph node metastasis combined with microbubbles. The 3rd East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering. Dec. 21-22, 2009 Engineering Auditorium, National University Of Singapore, Singapore.

- ⑤ Tetsuya Kodama. Molecular delivery system by using nanobubbles and ultrasound. International Symposium on HIV/AIDS, Medicinal Plants and Geophagia, Advancing the frontiers of Research on HIV/AIDS, Medicinal Plants and Geophagia at Walter Sisulu University Health Resource Centre Mthatha, Eastern Cape, South Africa 22- 24 July 2009

- ⑥ Kodama T. Contrast-Enhanced High-Frequency

Ultrasound Imaging of Liver Metastases in preclinical models.

2008 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS).

Beijing International Convention Center (BICC), Beijing, China, November 2-5, 2008.

⑦ Kodama T.

Peeling off effect and damage pit formation by ultrasonic cavitation.

The International Conference on Hydraulic Machinery and Equipments Timisoara, Romania, October 16-17, 2008.

[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

<http://www.ecei.tohoku.ac.jp/kodama/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

藤川 重雄 (FUJIKAWA SHIGEO)

北海道大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号 : 70111937

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :