

令和 5 年 9 月 25 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04554

研究課題名(和文) リピッドバブルとMRIガイド経頭蓋超音波による血液脳関門開口と脳内薬物送達

研究課題名(英文) Blood-brain barrier opening and brain drug delivery by lipid bubble and MRI-guided transcranial ultrasound

研究代表者

丸山 一雄 (Maruyama, Kazuo)

帝京大学・薬学部・特任教授

研究者番号：30130040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：リピッドバブル(LB)と集束超音波を用いた血液脳関門開口による脳への薬物送達技術(BUS-DDS)の有用性を検討した。Glioma261脳腫瘍モデルマウスに対して、DOXILとLBを尾静注後、腫瘍移植部位に向けて経頭蓋BUS-DDS(1 MHz、0.4 MPa、2 min)を2日おきに合計3回の治療を行ったところ有意に生存期間が延長した。ルシフェラーゼ発現mRNA-LNPとZsGreen1 mRNA-LNPのBUS-DDSを検討したところ、脳実質内に高いルシフェラーゼ発現と、3次元薬物動態解析から血管内皮細胞およびグリア細胞でZsGreenの発現亢進が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リピッドバブル(LB)と集束超音波を用いた血液脳関門開口による脳への薬物送達技術(BUS-DDS)によって、認知症、アルツハイマー病、パーキンソン病に対して、抗体、ADC、核酸治療薬や核酸治療薬-LNPの脳内送達が可能になった。LBのGMP製造と非臨床試験を早急に進め、LBの安全性を確立し、医師主導によって、ヒトに対して、TBとMRIガイド経頭蓋超音波治療機(tFUS)によるBUS-DDSの治療研究を進める必要がある。米国で超音波造影剤DefinityとtFUSによる治療研究が進められているが、日本においてDefinityをLBに置き換えて進めることが可能になった。

研究成果の概要(英文)：The efficacy of drug delivery technique (BUS-DDS) to the brain by opening the blood-brain barrier using lipid bubbles (LB) and focused ultrasound was investigated. Mice bearing Glioma261 brain tumors were treated with transcranial BUS-DDS (1 MHz, 0.4 MPa, 2 min) every 2 days for a total of 3 treatments significantly prolonged survival. BUS-DDS of luciferase-expressing mRNA-LNPs and ZsGreen1 mRNA-LNPs was examined, and high luciferase expression in brain parenchyma and increased expression of ZsGreen in vascular endothelial cells and glial cells were observed from 3D pharmacokinetic analysis.

研究分野：薬物送達学

キーワード：血液脳関門 マイクロバブル 超音波 認知症 アルツハイマー病 パーキンソン病 脳腫瘍 LNP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳には血液と脳実質間の物質移行を厳密に制御する血液脳関門 (Blood Brain Barrier, BBB) が存在する。神経膠腫、脳転移性肺がんや乳がんなどの脳腫瘍では BBB により抗がん剤の移行が制限されている (Nat. Commun. 9, 2705, 2018; World Neurosurg. 117, 84-91, 2018)。そのため、脳腫瘍治療に向けた BBB を超えてがん細胞へと薬物を効率的に送達する技術の開発が望まれている。また、パーキンソン病やアルツハイマー病などの脳疾患に対する根本的な治療法は未だ確立されていないが、現在、これら疾患の進行を抑制することや症状を改善する核酸医薬や分子標的薬の開発が急ピッチで進められている。これらの治療薬は BBB を通過しないため髄腔内への直接投与が行われる。しかしながら、髄腔内への投与では侵襲性が高く脳内への移行量が非常に低いため、脳内へ効率的に送達する技術の開発が望まれている。

丸山と小俣は、診断と治療を可能とする3種の脂質を外殻成分としたマイクロバブル製剤 (MB) およびその凍結乾燥製剤化に成功した。MB は、高い血中安定性と滞留性を示し、診断用超音波 (10MHz 前後) で10分以上の腫瘍内血管を含めた躯体の血流観察が可能である。また、治療用超音波 (1-3 MHz) を照射すると、その強度に応じたオシレーションが誘導され、毛細血管の内皮細胞結合の一時的な開口によって血管透過性を亢進させて薬を送り届ける革新的送達法と治療法が可能である。

2. 研究の目的

本研究では、脳内の疾患部位局所の BBB を脳に傷害を与えることなく限局的で可逆的に開口する技術を開発し、非侵襲的に限局した脳深部への薬物送達を目指す。

本システムは、可逆的な BBB 開口が目的なので、照射部位の精密な座標設定と決して血管壁を破壊したり焼灼したりしない超音波条件設定が重要となる。超音波照射により MB の収縮や膨張といった機械的作用が誘導され、血管内皮細胞間の密着結合が緩まり、血管透過性が亢進すると考えられている。そのため、MB の収縮や膨張などの振る舞いに影響する超音波の周波数と音圧は、BBB の透過性亢進において重要なパラメーターである。そこで本研究では、効率のかつ低侵襲的な BBB の透過性亢進を行うために、脳への薬物送達と傷害性に及ぼす集束超音波の周波数と音圧の影響を検討する。さらに、本システムの有用性をマウス脳腫瘍 (Glioma261) モデルに対してドキシルピシン封入りポソーム (ドキシル) で検討する。

3. 研究の方法

(1) 小動物経頭蓋照射を目的とした周波数 250kHz・500kHz・1MHz の集束超音波トランスデューサと、それらが発生する超音波を小動物頭蓋へ伝えるアタッチメントを製作した。

(2) MB の収縮や膨張などの振る舞いに影響する超音波の周波数と音圧は、BBB の透過性亢進において重要なパラメーターである。マウスに MB とモデル薬物としてエバンスブルー (EB) を静脈内投与し、脳に集束超音波 (周波数: 0.25, 0.5, 1.0 MHz、音圧: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 MPa) を照射し、1時間後に血液還流して脳実質への EB 移行を評価した。

(3) マウス脳腫瘍細胞である Glioma261 をマウスの脳に移植し、その生着をヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色および小動物用 MRI 装置を用いて確認する。ドキシルと MB を尾静注し、経頭蓋的に集束超音波 (周波数 1 MHz、音圧 0.4 MPa、時間 2 min) を脳腫瘍移植部位に向けて照射し、2日おきに合計3回の治療を行い、腫瘍体積と生存日数を追跡した。腫瘍体積評価は、脳冠状パラフィン切片を 200 μ m 間隔で作成し、HE 染色を行いパッチャルスライドスキャナーで観察し腫瘍組織の面積を算出した。

4. 研究成果

(1) 周波数 250kHz・500kHz・1MHz の集束超音波トランスデューサとアタッチメントの製作技術課題は、250kHz の集束超音波トランスデューサの開発において最も厳しかった。開発ポイントは、1) 水中波長 6mm の超音波により、小動物頭蓋に比べて大きすぎないサイズの焦域を形成すること、2) 動作周波数における電氣的インピーダンスが、市販の RF パワーアンプおよび同軸ケーブルと整合のとれる 50 オームに近いこと、3) 小動物照射実験において使いやすいサイズであることである。一般に圧電素子は、共振周波数・反共振周波数と称される直列共振および並列共振周波数において、純抵抗に近い電氣的インピーダンスをもつ。2) と 3) を同時にみたすため、同じ抵抗値を1桁以上小さなサイズの圧電トランスデューサで実現可能な直列共振周波数を選び、水負荷・エアバック条件において電氣的インピーダンスが 50 オームとなるよう球殻状厚み共振トランスデューサの直径をチューニングした。また、1) をみたすため、500kHz・1MHz のトランスデューサについては、集束超音波として一般的な F 値 (焦点距離 / 直径) 1 を選んだが、250kHz のトランスデューサについては、0.75 を選んで、超音波周波数の割合に小さな焦域サイズを実現した。さらに、アタッチメントは、超音波を伝える脱気水を円錐形状のケース内に保持する形式とし、ケース材料には、アクリル樹脂と同様に透明ではあるが、超音波に暴露されてもより軟化しにくいポリカーボネイト樹脂を選んだ。

(2) MB と集束超音波による血液脳関門の透過性亢進に対するパラメーターの評価

マウスに MB とモデル薬物としてエバンスブルー (EB) を静脈内投与し、脳に集束超音波 (周波数: 0.25, 0.5, 1.0 MHz、音圧: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 MPa) を照射した。1 時間後に血液還流し、脳実質への EB 移行を評価した (図 1)。その結果、0.25 MHz、0.5 MHz の各音圧および 1 MHz の 0.6 MPa では脳の広範囲において脳の広範囲において EB の漏出が認められた。一方で、1 MHz の 0.4 MPa では超音波集束部位で EB の漏出が認められた。次に、各周波数において、EB 漏出が認められた最低音圧を用いて、BBB の透過性亢進を誘導し、脳切片の HE 染色により傷害性を評価した (図 2)。その結果、0.25 MHz と 0.5 MHz では赤血球の漏出が認められたに対して、1 MHz の 0.4 MPa では赤血球の漏出は認められなかった。これらの結果から、1 MHz、0.4 MPa の集束超音波照射条件を用いることで、標的部位に対して低侵襲的かつ効率的な BBB オープニングを誘導できることが示唆された。

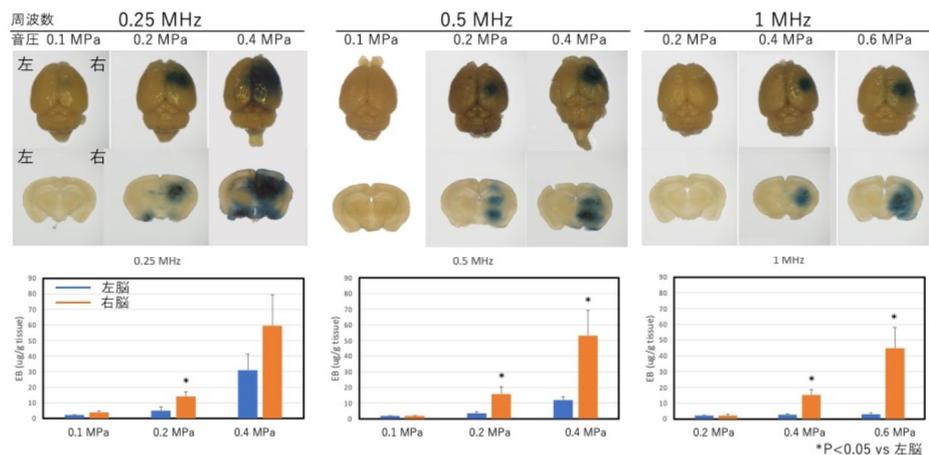


図 1 集束超音波の周波数と音圧のエバンスブルー漏出に対する影響

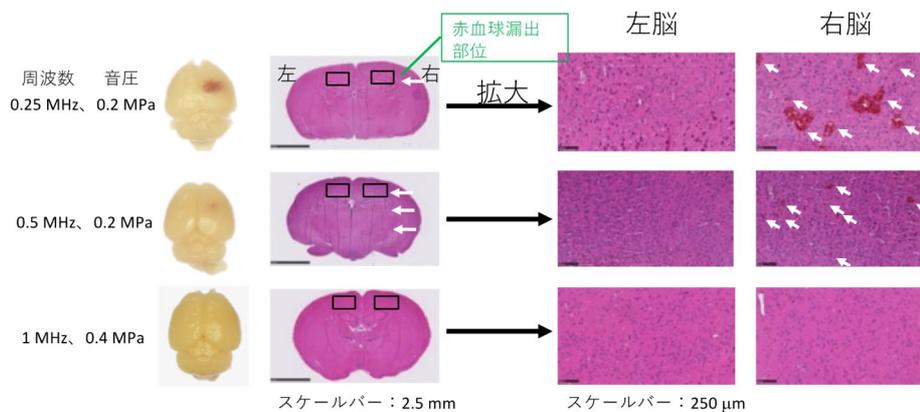


図 2 傷害性の評価

それぞれの周波数において、EB漏出が認められた最低音圧の超音波を用いた際の傷害性を評価した。

(3) MB と集束超音波の担癌マウスに対する有用性の評価

MB と集束超音波の有用性をマウス脳腫瘍 (Glioma261) モデルに対するドキソルピシン封入りポソーム (ドキシル) で検討した。Glioma261 をマウスの脳に移植後、脳の冠状切片を作製し、HE 染色をしたところ、腫瘍細胞の生着が認められた。また、小動物用 MRI 装置を用いた観察においても、脳内に腫瘍が存在することが確認できた。この脳腫瘍モデルマウスに対して、抗がん剤 (ドキシル) に MB と集束超音波を併用した治療を行い、生存日数を評価した。細胞移植 7 日後の脳腫瘍モデルマウスに対して、ドキシル、MB を尾静脈から投与した。その後、経頭蓋的に集束超音波 (周波数 1 MHz、音圧 0.4 MPa、時間 2 min) を脳腫瘍移植部位に向けて照射した。2 日おきに合計 3 回の治療を行い、腫瘍体積 (図 3) と生存日数 (図 4) を追跡した。その結果、無処置群、ドキシル単独投与群、MB と集束超音波のみを併用した群と比較して、ドキシルに MB と集束超音波を併用した群では、有意に腫瘍体積の縮小と生存期間が延長した。MB と集束超音波を併用することで BBB の透過性が亢進しドキシルの脳腫瘍組織への移行性が向上し、生存期間の延長につながったことが考えられた。これらの結果から、脳腫瘍治療において、MB と集束超音波を用いた薬物送達技術は有用であることが示唆された。

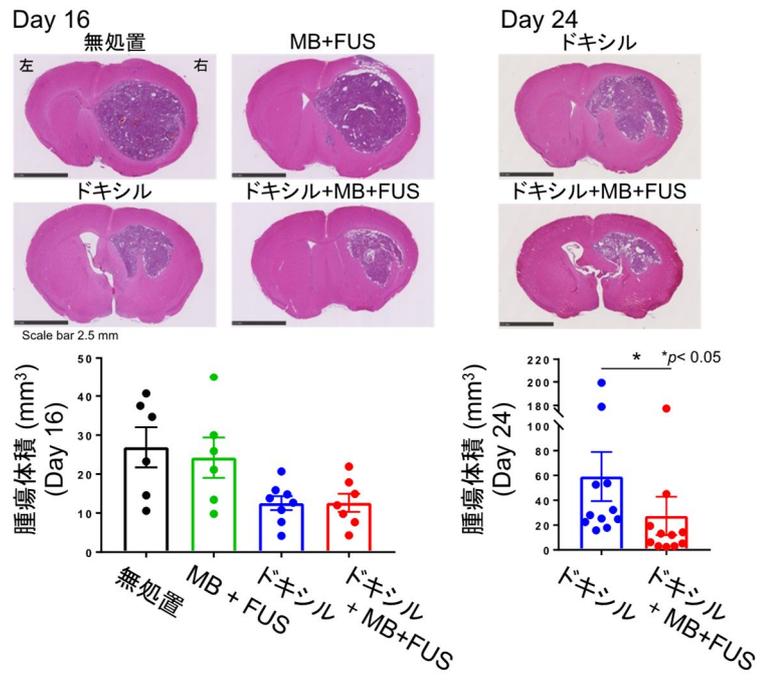


図3 腫瘍体積評価

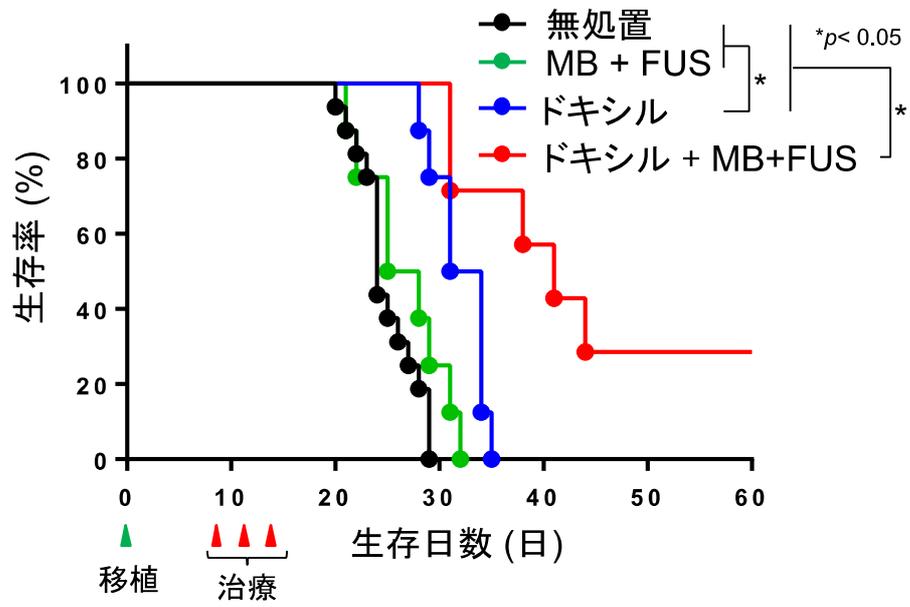


図4 生存日数の評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Maruyama Tamotsu, Sugii Mutsumi, Omata Daiki, Unga Johan, Shima Tadimitsu, Munakata Lisa, Kageyama Saori, Hagiwara Fumiko, Suzuki Yuno, Maruyama Kazuo, Suzuki Ryo	4. 巻 590
2. 論文標題 Effect of lipid shell composition in DSPG-based microbubbles on blood flow imaging with ultrasonography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 119886 ~ 119890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijpharm.2020.119886	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Unga Johan, Kageyama Saori, Suzuki Ryo, Omata Daiki, Maruyama Kazuo	4. 巻 30
2. 論文標題 Scale-up production, characterization and toxicity of a freeze-dried lipid-stabilized microbubble formulation for ultrasound imaging and therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Liposome Research	6. 最初と最後の頁 297 ~ 304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08982104.2019.1649282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Omata Daiki, Hagiwara Fumiko, Munakata Lisa, Shima Tadimitsu, Kageyama Saori, Suzuki Yuno, Azuma Takashi, Takagi Shu, Seki Kazuhiko, Maruyama Kazuo, Suzuki Ryo	4. 巻 109
2. 論文標題 Characterization of Brain-Targeted Drug Delivery Enhanced by a Combination of Lipid-Based Microbubbles and Non-Focused Ultrasound	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 2827 ~ 2835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2020.06.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yokoe Inoru, Murahata Yusuke, Harada Kazuki, Sunden Yuji, Omata Daiki, Unga Johan, Suzuki Ryo, Maruyama Kazuo, Okamoto Yoshiharu, Osaki Tomohiro	4. 巻 12
2. 論文標題 A Pilot Study on Efficacy of Lipid Bubbles for Theranostics in Dogs with Tumors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2423 ~ 2423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12092423	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa Koki, Kato Naoya, Yoshida Michiharu, Hiu Takeshi, Matsuo Takayuki, Mizukami Shusaku, Omata Daiki, Suzuki Ryo, Maruyama Kazuo, Mukai Hidefumi, Kawakami Shigeru	4. 巻 348
2. 論文標題 Focused ultrasound/microbubbles-assisted BBB opening enhances LNP-mediated mRNA delivery to brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 34 - 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2022.05.042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 垣内彩実、小俣大樹、宗像理紗、萩原芙美子、鈴木悠乃、丸山保、梅村晋一郎、吉澤晋、丸山一雄、鈴木亮
2. 発表標題 脳への薬物送達に向けた集束超音波照射条件の検討
3. 学会等名 第65回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 道春、小川 昂輝、加藤 直也、日宇 健、水上 修作、小俣 大樹、鈴木 亮、丸山 一雄、川上 茂、松尾 孝之
2. 発表標題 集束超音波とマイクロバブルによるmRNA封入脂質ナノ粒子の脳内送達の研究
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸山 一雄、吉田 道春、加藤 容崇、小俣 大樹、鈴木 亮
2. 発表標題 リピッドバブルとヒト用経頭蓋集束超音波装置を用いたBBBオープニングによる薬物送達に関する基礎研究
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山 一雄、吉田 道春、加藤 容崇、小俣 大樹、鈴木 亮
2. 発表標題 リピッドバブルと経頭蓋集束超音波を用いたBBBオープニングによる薬物送達
3. 学会等名 第36回日本DDS学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuo, Maruyama, Ryo Suzuki
2. 発表標題 Enhanced drug delivery to tumor tissue with opening of tumor neovasculature by lipid bubbles and ultrasound
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小俣大樹、丸山 保、宗像理紗、影山彩織、萩原美美子、鈴木悠乃、丸山一雄、鈴木 亮
2. 発表標題 脳標的薬物デリバリーに向けたマイクロバブル内包ガスの最適化
3. 学会等名 第29回日本バイオイメーjing学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山一雄、小俣大樹、鈴木 亮
2. 発表標題 新規マイクロバブル製剤の開発と超音波併用による薬物送達
3. 学会等名 第3回日本経頭蓋MRIガイド下集束超音波治療研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山 一雄、吉田 道春、加藤 容崇、小俣 大樹、鈴木 亮、Rachmilevitch Itay、鈴木 秀二、鎌田 一
2. 発表標題 リビッドバブルと220kHz経頭蓋MRIガイド集束超音波を用いた血液脳関門開通の研究
3. 学会等名 日本超音波医学会第93回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小俣大樹、宗像理紗、鈴木悠乃、梅村晋一郎、吉澤 晋、丸山一雄、鈴木 亮
2. 発表標題 マイクロバブルと集束超音波を併用したドキシルによる脳腫瘍治療
3. 学会等名 第31回日本バイオイメーシング学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本 桃、小俣大樹、宗像理紗、鈴木悠乃、田中浩揮、秋田英万、吉岡靖雄、吉澤 晋、梅村晋一郎、丸山一雄、鈴木 亮
2. 発表標題 脳へのmRNA送達における超音波とマイクロバブルの有用性評価
3. 学会等名 第66回 日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本 桃、小俣大樹、宗像理紗、鈴木悠乃、田中浩揮、秋田英万、吉岡靖雄、吉澤 晋、梅村晋一郎、丸山一雄、鈴木 亮
2. 発表標題 集束超音波とマイクロバブルを併用したmRNA搭載脂質ナノ粒子の脳への送達
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	吉田 道春 (Yoshida Michiharu) (00795437)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員 (17301)	
研究分担者	梅村 晋一郎 (Umemura Shinichiro) (20402787)	東北大学・医工学研究科・学術研究員 (11301)	
研究分担者	吉澤 晋 (Yoshida Shin) (30455802)	東北大学・工学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	小俣 大樹 (Omata Daiki) (80803113)	帝京大学・薬学部・講師 (32643)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------