

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15554

研究課題名（和文）悪性神経膠腫に対する薬物送達治療の確立と脳内薬物動態の三次元解析

研究課題名（英文）The establishment of drug-delivery system and the 3D-microimaging of intra-cerebral pharmacokinetics in malignant glioma

研究代表者

吉田 道春（Yoshida, Michiharu）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・客員研究員

研究者番号：00795437

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：COVID-19のワクチン開発で世界的に注目を集めているmRNA封入脂質ナノ粒子（LNP）を送達薬剤とし、バブルリポソーム（BL）とmRNA封入LNPを静注後、頭部に集束超音波（FUS）を照射した。照射後、ルシフェラーゼ発現mRNA封入LNPと蛍光タンパク質（ZsGreen1）mRNA封入LNPの脳内送達（発現）に関して検討したところ、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。これにより、FUSとBLによるBBB開口によりmRNA封入LNPを脳実質へ送達できることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mRNAがLNP封入により血中で安定して維持され、FUS照射とBL製剤によって脳内の照射部位選択的にBBBを超えて送達可能であるという、脳内へのDDSにおける2つの大きな障壁を克服する新知見を得ることが出来た。今後は、薬剤封入技術を応用し、悪性神経膠腫モデルに対して抗癌剤（DOX）封入リポソームやmRNA封入LNPをFUSとBLにより脳内送達し抗腫瘍効果を得ることで、化学療法の治療効果の向上を期待できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：mRNA encapsulated-lipid nanoparticles (mRNA-LNPs) can hardly express foreign proteins in brain because they cannot spontaneously cross the blood-brain barrier (BBB). Focused ultrasound (FUS)/microbubbles-assisted BBB opening is an emerging technology that can transiently enhance BBB permeability of substances. The FUS/microbubbles-assisted BBB opening was investigated for delivery of mRNA-LNPs to brain via intravenous route. The exogenous protein (luciferase) expression by mRNA-LNPs specifically at the FUS-irradiated side of brain occurred only when FUS and microbubbles were applied to open the BBB. This exogenous protein expression was faster but shorter than in the case of plasmid DNA delivery. In addition, foreign protein expression was observed in microglia, while no expression was found in astrocytes or neurons. These results add mRNA-LNPs, which are now attracting particular attention, to the lineup of nanoparticles delivered by such BBB opening.

研究分野：脳腫瘍治療

キーワード：glioblastoma focused ultrasound micro-bubbles lipid nanoparticles drug delivery system mRNA doxorubicin malignant glioma

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は手術摘出による完全治癒が困難であり、放射線や化学療法といった後療法に対しても抵抗性である。薬剤抵抗性の主要因として血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) の存在による薬剤送達 (drug-delivery system: DDS) の問題が挙がる。

近年、頭蓋内疾患用の経頭蓋 MRI ガイド下集束超音波 (focused ultrasound: FUS) 装置 (ExAblate 4000、InSightec 社、イスラエル) が開発、臨床導入され、超音波の振動作用と超音波応答性マイクロバブル製剤を利用した低エネルギー照射による「脳内選択的および限局的な BBB の一時開口」による DDS への応用が期待されている。基礎研究においては超音波照射やマイクロバブル製剤の物理学的動態解析や対象薬剤の組織濃度分析と治療効果、対象検体の病理学的検討が中心に行われているものの、疾患モデルにおける BBB 開口時のマイクロでの薬物動態に関しては明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では悪性神経膠腫モデルに対し治療用の超音波応答性マイクロバブル製剤として開発されたバブルリポソーム (bubble lipopolyplexes: BL) 製剤に、集束超音波 (focused ultrasound: FUS) 装置を用いて BBB を開口させ、3次元薬物動態解析により安全で有効な DDS を実現し、ヒト悪性神経膠腫における化学療法の治療効果の向上を目的とする。

脳内送達する候補薬剤として、悪性神経膠腫に対して BBB 透過性が高く唯一の標準治療薬ではあるものの殺細胞効果は低いテモゾロミド (temozolomide: TMZ) と、殺細胞効果は高いが BBB 透過性が低いドキシソルビシン (doxorubicin: DOX) に着目した。BBB 開口時の両薬剤の抗腫瘍効果と薬物動態の比較検証を行う。

3. 研究の方法

(1) U87-MG ヒト悪性神経膠腫細胞株脳移植マウスに対し BL 投与後に、DOX を静注し FUS を照射する。BBB 開口と組織内薬物動態を脳組織透明化技術で 3 次的に解析し、IVIS (in vivo imaging system) による継時的腫瘍変化と生存期間、病理組織学的検討から抗腫瘍効果と有害事象を比較検証する。

(2) 上記 3-(1) で得られた照射条件下に、薬剤を mRNA 封入脂質ナノ粒子 (LNP) へ変更し、ルシフェラーゼ発現 mRNA 封入 LNP と蛍光タンパク質 (ZsGreen1) mRNA 封入 LNP の脳内送達 (発現) を、ルシフェラーゼ発現と 3 次元薬物動態解析により検討する。

4. 研究成果

(1)

正常マウスに対して麻酔下に BL (5×10^9 /kg) とエバンスブルー (100 mg/kg) を静注後、頭部に 3-MHz FUS を照射し 2 時間後に BBB 開口の効果と安全性を BL 量、超音波照射条件 (照射強度、照射時間、Duty Cycle) から検討した。照射後、BBB 開口と有害事象に関して評価し条件を適正化した (図 1)。

照射強度 1.5 kW/cm²、照射時間 60 秒、10 % Duty Cycle

(1 msec on, 9 msec off) において出血なく BBB 開口によるエバンスブルーが FUS の照射焦点に最も多く漏出していることを確認できた。なお、同様の照射強度、時間、Duty cycle でも 1 sec on, 9 sec off だと有害事象として出血を認めた。

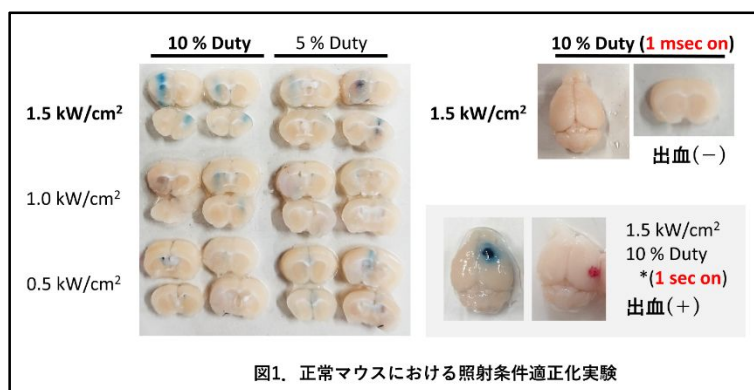
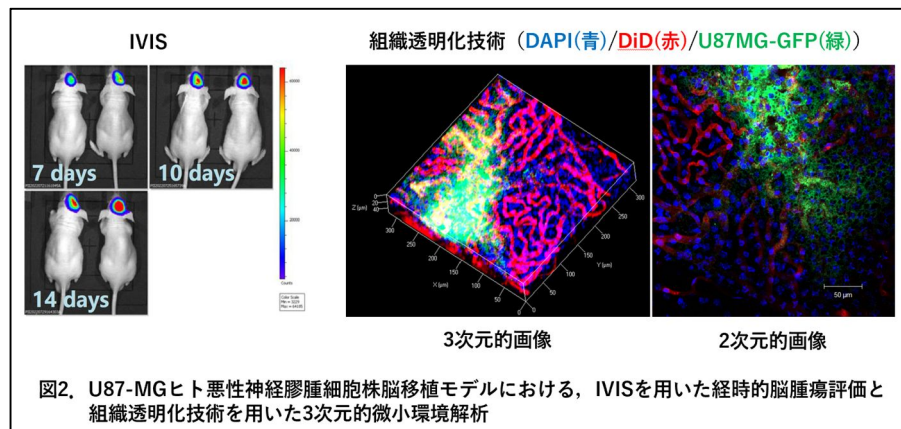


図1. 正常マウスにおける照射条件適正化実験

TMZ は薬物動態解析に必要な蛍光特性を有しておらず、同薬剤への蛍光特性付与も技術的に困難であったため、DOX での BBB 開口による薬物動態解析を行うこととした。ヌードマウスに対して麻酔下に BL と DOX (2.5 mg/kg, 5.0 mg/kg) を尾静脈投与し 4-(1) で得られた照射条件下に FUS 照射から 1 時間後に脳を摘出し照射側脳と非照射側脳を各々ホモジナイズ後に蛍光強度と DOX 濃度を比較した (n=3)。2.5 mg/kg では非照射側 158.2 ± 63.3 ng/g、照射側 205.2 ± 17.5 ng/g、5.0 mg/kg では非照射側 220.5 ± 81.5 ng/g、照射側 306.5 ± 124.6 ng/g と統計学的有意差を認めず、蛍光強度も 2.5 mg/kg で非照射側の 1~2 倍、5.0 mg/kg で非照射側の 1~3 倍と安定しなかった。照射手技の安定性よりも、DOX と FUS 装置の集束密度や強度、周波数との相性の

影響が原因として考えられた。腫瘍細胞株の移植前のヌードマウスに同 FUS 装置で DOX を安定して脳内送達できない以上、薬剤の脳腫瘍モデルへの抗腫瘍効果の向上も期待できないことが予想された。

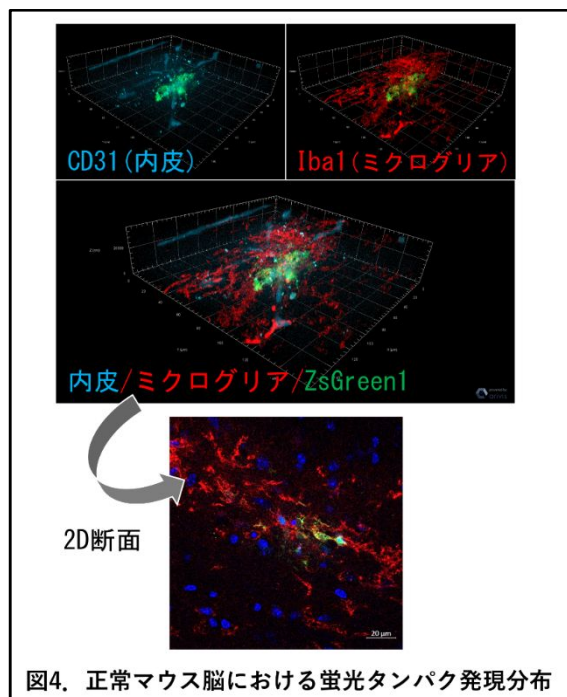
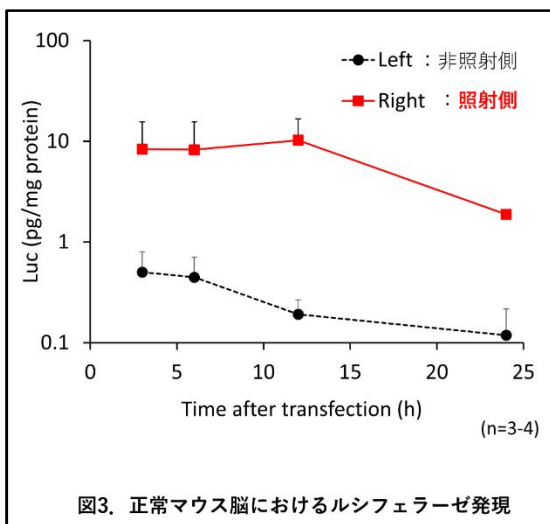
ヌードマウス脳に移植した Luc 発現 U87-MG 細胞株を IVIS で観察し、同様に GFP 発現 U87-MG 細胞株を移植し 3 次元的に微小環境を蛍光評価した(図 2)。IVIS では経時的な腫瘍の増大(左写真)と、顕微鏡では血管と神経細胞核、腫瘍細胞との関係性が複数の蛍光色素を用いて任意の立体(中央写真)と平面(右写真)で確認でき、腫瘍中心だけでなく正常組織まで空間的可視化に成功した。



(2) 4-(1) ~ の実験データから、脳腫瘍モデル作成と評価系の再現性確立の反面、TMZ と DOX の脳内薬物送達と動態解析が困難であることが予測された。そのため、同照射実験系で薬剤を、COVID-19 のワクチン開発で世界的に注目を集めている mRNA 封入脂質ナノ粒子(LNP)へ変更することとした。

ルシフェラーゼ mRNA 封入 LNP(80 $\mu\text{g}/\text{kg}$)と LB (5 $\times 10^9$ /kg)を静注し 3 MHz FUS を右脳線条体へ照射(強度 1.5 kW/cm²、時間 60 秒、10 % Duty Cycle)し、3、6、12、24 時間後に脳を摘出し非照射側と照射側のルシフェラーゼ発現を比較した(図 3)。12 時間後に最も発現量の差を認め、24 時間後には発現量は低下していた。

4-(2) で得られた条件下に、蛍光タンパク質(ZsGreen) mRNA 封入 LNP と LB を静注し FUS を右脳線条体へ照射し 12 時間後、ZsGreen の脳内発現分布を血管内皮(CD31)と Iba1(ミクログリア)と共に 3 次元薬物動態解析を行った(図 4)。mRNA 封入 LNP が BBB を超えて脳内へ送達され、ミクログリアが mRNA 導入細胞の一つであることが示唆された。



4-(2) ~ の実験結果より、mRNA が LNP 封入により血中で安定して維持され、FUS 照射と BL 薬剤によって脳内の照射部位選択的に BBB を超えて送達可能であるという、脳内への DDS における 2 つの大きな障壁を克服する新見を得ることが出来た。今後は、薬剤封入技術を応用し、悪性神経膠腫モデルに対して抗癌剤(DOX)封入リポソームや mRNA 封入 LNP を FUS と BL により脳内送達し抗腫瘍効果を得ることで、化学療法の治療効果の向上を期待できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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

〔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
研究協力者	川上 茂 (Kawakami Shigeru)	長崎大学・薬学部・教授 (17301)	
研究協力者	丸山 一雄 (Maruyama Kazuo)	帝京大学・薬学部・教授 (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
---------	---------