

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32643

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650299

研究課題名(和文)フルオラスケミストリーに基づく次世代バブル製剤の開発

研究課題名(英文)Development of new bubble with fluororous chemistry

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：フッ素がフッ素を呼び寄せるフルオラスケミストリーに基づきC3F8ガス封入バブルリポソームの開発研究を行った。Fをパルミトイル基末端に含むリン脂質F-DPPCと2F-DPPCの合成法を確立した。DSPC、DSPE-PEG2000-OMe、F-DPPCから成るリポソームを調製して、C3F8ガスを封入したバブルリポソームを調製した。F-Fの相互作用により、C3F8ガスの封入率が上昇した。実用化を考え凍結乾燥化を行い機能評価を行ったところ、復水後のバブルリポソームの機能に変化が無く、凍結乾燥化に成功した。

研究成果の概要(英文)：C3F8 encapsulated bubble liposome was developed under fluororous-chemistry. Liposome was prepared with F-palmitoyl phosphatidylcholine (F-DPPC, 2F-DPPC), DSPC and DSPE-PEG2000-OMe, and C3F8 was encapsulated to make bubble liposome. The presence of F-DPPC increased C3F8 encapsulation rate. To aim at the practical use of bubble liposome, freeze dry formulation of bubble liposome was examined. Rehydration of freeze dried bubble liposome showed same property of bubble liposome in size, ultrasound imaging and cavitation.

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：マイクロバブル 超音波 セラノスティクス

1. 研究開始当初の背景

微小気泡(マイクロバブル)である超音波造影剤は、ハーモニックイメージング技術の導入とともに、特に肝臓および循環器領域での超音波診断に画期的進歩をもたらした。マイクロバブルは、パーフルオロカーボン(PFC)ガスと脂質や糖と界面活性剤からなるミセル構造をしている。現在市販されているレボピストは、空気の気泡を用いた、いわゆる第一世代の造影剤である。クッパーイメージが得られるという利点があるが、造影効果はフッ素系の気泡を用いた造影剤ほど高くなく、また気泡の数も多くないので超音波測定装置の条件設定が難しいという欠点を有している。第二世代超音波造影剤の一つである Sonazoid (ソナゾイド) は、世界に先駆けてわが国で肝腫瘍性病変の診断に臨床使用可能となったマイクロバブルで、ペルフルオロブタンガスのホスファチジルセリンミセルで、超音波に対して安定で、破壊することなく持続的な造影効果を得ることができる。ソナゾイドは非常に Kupffer 細胞に取り込まれやすい性質を持っており、肝腫瘍診断に特化した造影剤である。しかし、キャビテーションによる治療は想定されていない。

一方、気泡の特性を生かして、マイクロバブルを遺伝子治療や血栓溶解療法、がん温熱療法へ利用する方法が検討され、単に診断薬としてだけでなく、治療にも有効な薬剤として利用できることが示されている。しかしながら、既存のマイクロバブルはもともと肝臓および循環器領域での超音波診断用として開発されているため、形状的に大きく不揃いであり、深部組織に到達させることは困難である。また、標的指向性がないこと、血中安定性などに問題がある。したがって、超音波装置の高機能化に伴い、診断と治療の機能をもった次世代型バブル製剤の開発が一層求められている。

近年、高度にフッ素化された化合物がフルオラス溶媒に良く溶けるといふフルオラスケミストリーが、グリーンケミストリーの分野で注目されている。そこで、PFC ガスにフッ素含有脂質誘導体を用いれば、安定なミセルつまりバブル製剤を開発できると考えた。

2. 研究の目的

フルオラスケミストリーに基づく新規フッ素含有脂質誘導体の合成を行う。PFC にはパーフルオロ-プロパン、-ブタン、-ペンタン、-ヘキサンなど、超音波造影剤として国内外で使用実績のあるものを単体または混合体として用いる。最適な PFC の組合せと混合比を検討し、診断用超音波では、安定で破壊することなく持続的な造影効果の得られるバブル製剤とし、治療用超音波では、キャビテーションによる加熱凝固壊死効果が得られる次世代型バブル製剤の開発を行う。次世代型バブル製剤の機能は、診断用超音波では、安定で破壊することなく持続的な造影効果

が得られ、治療用超音波では、キャビテーションによる加熱凝固壊死効果が得られるものとする。実用化を念頭に、最適な PFC の組合せと混合比を検討し、用時調製で利用できる製剤とするための新規調製法を開発する。担癌動物における新生血管造影効果ならびに加熱凝固壊死効果を検討し、次世代型バブル製剤の機能評価を行う。

3. 研究の方法

(1) フルオラスケミストリーに基づく新規フッ素含有脂質誘導体の合成

$CF_3(CF_2)_5(CH_2)_6COOH(1)$  及び  $FCH_2(CH_2)_{16}COOH(5)$  を別途合成し、これをグリセロール骨格にエステル結合させてフッ素含有のホスファチジルコリン(A)及び(B)の合成を行った。

(2) 次世代型バブル製剤の開発

DSPC: フッ化リン脂質(B): DSPE-PEG2k-OMe = 44: 50: 6 (モル比)の構成脂質で 100  $\mu$ mol の脂質をナシ型フラスコにとり、クロロホルム 4 mL ジイソプロピルエーテル 4 mL を加え、脂質を完全に溶解させた。得られたリポソームを extrusion 法によりサイズ調整し、平均粒子径を約 100 nm とした。このリポソーム懸濁液を 9% ショ糖溶液で希釈して脂質濃度として 1 mg/mL とし、5 mL 用バイアル瓶に 2 mL 入れた。このバイアル瓶を 10 mL のパーフルオロプロパンで置換・加圧し、超音波洗浄槽を用いてナノバブルリポソームを調製した。このナノバブルリポソームを -30 冷凍庫で凍結させ、凍結乾燥機を用いて凍結乾燥した。

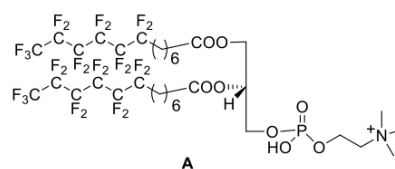
(3) 凍結乾燥バブルリポソームの機能評価

復水は、超純水を 27G 注射針とシリンジを用いて復水した。凍結乾燥製剤化によるガス封入量の変化と超音波造影効果をガスクロと造影装置で評価した。キャビテーション効果を Colton-26 細胞に対する pCMV-Luc の遺伝子導入効果で比較検討した。

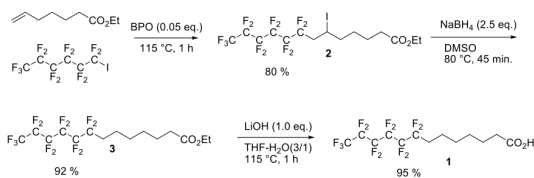
4. 研究成果

(1) フルオラスケミストリーに基づく新規フッ素含有脂質誘導体の合成

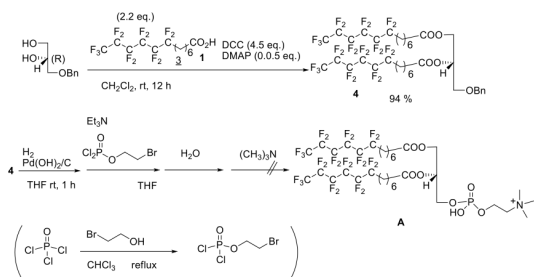
$CF_3(CF_2)_5(CH_2)_6COOH(1)$  を別途合成し、これをグリセロール骨格にエステル結合させてフッ素含有のホスファチジルコリン(A)を得ようと試みた。以下に(A)の合成の検討結果を記す。



まず、市販のヘプテン酸エチルエステルとヨード化パーフルオロヘキサンを過酸化ベンゾイルによってカップリングし、ヨード体(2)を 80%の収率で得た。続いて水素化ホウ



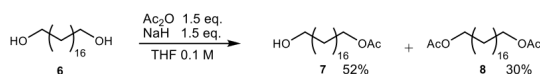
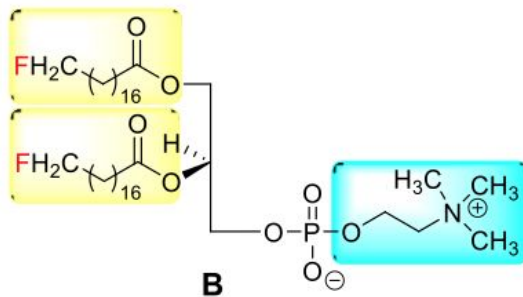
素ナトリウムを用いてジメチルスルホキシド中で(2)を還元し、脱ヨード体(3)を収率良く得た。最後に水酸化リチウムによってエステル(3)を加水分解し、所望する $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_5(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$ (1)を高い収率で得ることができた。このフッ素含有鎖脂肪酸を用いてグリセロールへのエステル化を試みた。グリセロールには、天然の脂質の立体化学を保持することを考慮し、市販されている末端をベンジルで保護した(*R*)体を用いることとした。これに上述の $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_5(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$ (1)を4.5当量用いてDCCによって脱水縮合させてエステル化を行った。反応は室温で容易に進行し、94%の収率でジエステル体(4)を得ることができた。得られたジエステル体(4)にコリンを導入するステップでは、ベンジル保護基を脱保護する必要があるが、1級水酸基が生じるとエステルの転位が起こる可能性があるため、脱保護の直後にコリンの導入を行うことをめざし、以下の反応はワンポット合成を試みた。



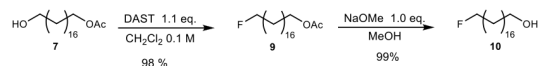
ジエステル体(4)の脱保護は、水酸化パラジウムを用いた接触水素化によって行い、TLC上で脱保護が完了したことを認めた後に、オキシ塩化リンにプロモエタノールを加えてあらかじめ調製しておいたリン酸エステルを加えた。続けてこれを加水分解し、さらにトリメチルアミンを加えてコリンを合成しようとした。TLC上では、加水分解まで進行したが、最後にトリメチルアミンを加えると化合物が分解することがわかった。これは、フッ素を多く含む長鎖脂肪酸エステル部位の酸性度が大変高く、トリメチルアミンの塩基性もしくは求核性によってエステル部分が加水分解されるためと考えられた。これは、この化合物独自の物性であるため、コリンの導入は不可能と判断し、フッ素含有のホスファチジルコリン(A)の合成については断念した。

続いて、フッ素の数を減らして安定性を高めたフッ素含有のホスファチジルコリン(B)の合成を計画した。この化合物は、フッ素の数を減らし、末端にそれぞれ一つずつ含有す

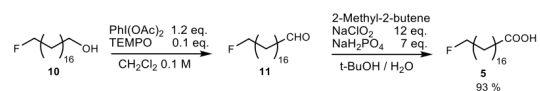
るだけである。従って、分子全体へのフッ素の影響はそれほど大きくないだろうと予想された。初めに $\text{FCH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ (5)を別途合成し、これをグリセロール骨格にエステル結合させてフッ素含有のホスファチジルコリン(B)を合成することとした。合成法について以下に記す。



市販のジオール(6)の片側を選択的にアセチル化することを試み、0-3時間で所望するモノエステル体(7)を52%の収率で得ることができた。

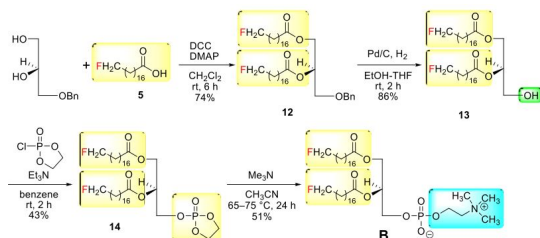


続いてモノエステル体(7)の水酸基をDASTを用いてフッ素化し、モノフルオロ化体(9)を99%の収率で得た。モノフルオロ化体(9)については、強塩基であるナトリウムメトキシドを用いてアセチル基の脱保護を行い、アルコール体(10)を得た。アルコール体(10)を $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ 及びTEMPOを用いた酸化反応によってアルデヒド体(11)へ変換し、さらに過ヨウ素酸を用いてカルボン酸(5)へ誘導した。2段階の酸化によって93%の収率で所望するフッ素含有カルボン酸(5)が得られた。

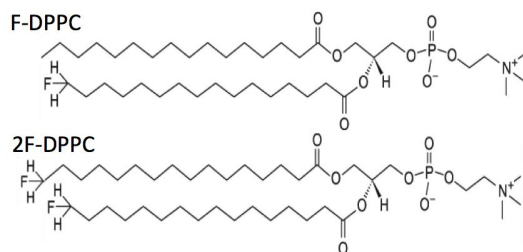


このフッ素含有カルボン酸(5)を用いてグリセロールとエステル結合させることとした。グリセロールには、天然の脂質の立体化学を保持することを考慮し、市販されている末端をベンジルで保護した(*R*)体を用いた。フッ素含有カルボン酸(5)をDCCによって脱水縮合させてエステル化を行った。反応は室温で容易に進行し、74%の収率でジエステル体(12)を得ることができた。続いてジエステル体(12)のベンジルの脱保護をパラジウムを触媒に用いて接触水素化によって行い、収率86%でアルコール体(13)を得た。次にリン酸化のステップを試みたが、上述のオキシ塩化リン由来のリン酸化剤よりも安定性が高いとされる環状リン酸エステルを用いること

とした。トリエチルアミン共存下、リン酸エステル化を行い、やや低い収率であるが、リン酸エステル化体(14)を合成できた。最後にこの環状のリン酸エステルを求核剤としてトリメチルアミンを用いて開環し、フッ素含有のホスファチジルコリン(B)の合成に成功した。フッ素含有カルボン酸(5)の縮合のステップから最終生成物(B)まで4段階を経て総収率は14%であった。



最終的に F-DPPC と 2F-DPPC の合成に成功し、合成法を確立することが出来た。



### (2) 次世代型バブル製剤の開発

バブルリポソームのパーフルオロプロパンガスの封入に対するフッ化リン脂質のフッ素原子数の影響について、ガスクロでパーフルオロプロパンガスを定量して比較した。図1に示すように、フッ化リン脂質の存在でパーフルオロプロパンガスの封入率が高くなり、フッ素数の増加によって封入率が高くなった。しかし、フッ化率の高いリン脂質の合成は非常に難しく、実用性を考えると F-または 2F-DPPC が適すると考えられる。

外観や形状の観察から、フッ化リン脂質の存在は、凍結乾燥操作に影響しなかった。

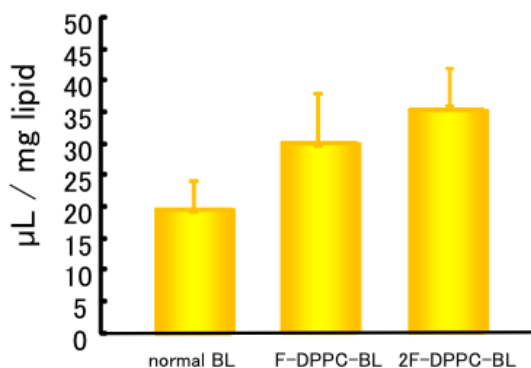


図1 パーフルオロプロパンガスの封入に対するフッ化リン脂質のフッ素原子数の影響

(3) 凍結乾燥バブルリポソームの機能評価  
凍結乾燥製剤化によるガス封入量、サイズの変化、超音波造影効果(図2)、Colon-26細胞に対する pCMV-Luc の遺伝子導入効果には、ほとんど差は無かった(図3)。

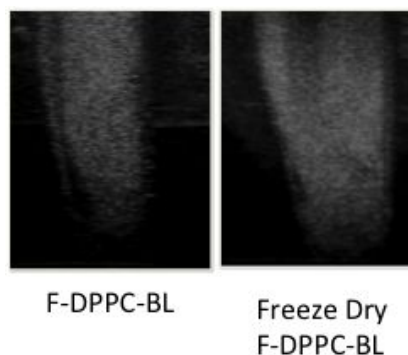


図2 In Vitro における超音波造影

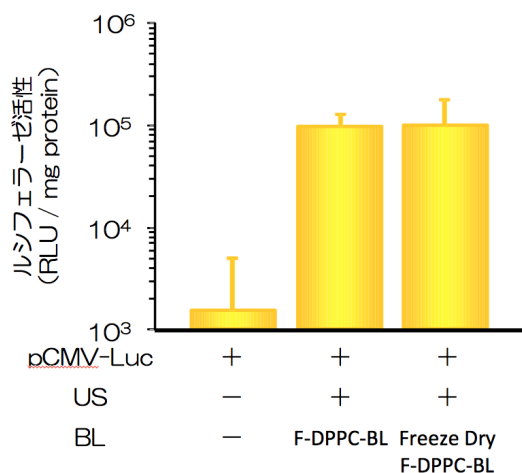


図3 凍結乾燥バブルリポソームによる遺伝子導入 凍結乾燥前後の比較

以上の結果より、バブルリポソームの特性を損なうことなく凍結乾燥製剤化に成功した。これらの結果は、バブルリポソームの実用化に向けて大きな前進となる。

### 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 2 件)

Kono Yusuke, Kawakami Shigeru, Higuchi Yuriko, Maruyama Kazuo, Yamashita Fumiyoshi, Hashida Mitsuru. Anti-tumor effect of NF-κB decoy transfer by mannose-modified bubble lipoplex into macrophages in mouse malignant ascites. Cancer Science 査読有 in press 2014

Ren Koda, Jun Koido, Naoto Hosaka, Shinya Onogi, Takashi Mochizuki, Kohji Masuda, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama. Evaluation of active control of Bubble liposomes in a bifurcated flow under

various ultrasound conditions, Advanced Biomedical Engineering, 査読有, 3, 21-28, 2014

〔学会発表〕(計 6 件)

丸山一雄 超音波セラノスティクスシステムの開発, 第16回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ, 2013年12月25~26, 東京

丸山一雄, 超音波セラノスティクス(THERANOSTICS), 第13回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム(招待講演), 2013年5月11日, 帝京大学

Kazuo Maruyama, Yusuke Oda, Ryo Suzuki, Gene Delivery System by Cavitation of Bubble Liposome and Ultrasound in Cancer Therapy, 8th International Symposium on Cavitation, 2012年8月14~16日, シンガポール

〔図書〕(計 0 件)

無し

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

無し

取得状況(計 0 件)

無し

名称:

〔その他〕

ホームページ

<http://www.teikyo-dds-lab.com>

## 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

無し

### (3) 連携研究者

無し