

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 14 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860397

研究課題名(和文) 診断と治療を包括的に実行するための新規ナノ・マイクロバブルの開発

研究課題名(英文) Development of nano/microbubbles for ultrasound mediated theranostics

研究代表者

小田 雄介(Oda, Yusuke)

帝京大学・薬学部・助手

研究者番号：80505941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：微小気泡の超音波診断・治療への応用に関して、粒子径や構成成分などが異なる微小気泡を用いた系統的な特性評価に関する研究はほとんど進められていない。そこで、本研究では、超音波診断・治療に適した微小気泡の開発に向けた製剤設計について検討した。まずはじめに、微小気泡粒子径の影響を検討した結果、診断と治療の両機能を有する微小気泡は、数 μm 前後のサイズが適していることが判明した。次に、構成成分の影響を検討した結果、DSPCなどの脂質を用いることで、安定な微小気泡を調製可能であることが見出された。

研究成果の概要(英文)：Development of nano/microbubbles for the ultrasound diagnostics and ultrasound mediated drug/gene delivery is important in order to establish effective ultrasound mediated theranostics. We find that the size of nano/microbubble is important factor to the stability and drug/gene delivery efficacy.

研究分野：薬物送達学

キーワード：ナノ・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

近年、治療 (Therapeutics) と診断 (Diagnostics) を合わせた造語「Theranostics」が注目を集めており、2011年には「Theranostics」と題した学術誌が刊行された。さらにそのインパクトファクターは非公式ながら 5.09 を記録したことからこの分野の注目度の高さをうかがわせる。Theranostics の利点としては、疾病の診断から治療を一度で終了できることから、時間の短縮が期待できる。これは医療従事者の手間を省けるのみならず、患者にとっても複数回の来院が不要となり大きなメリットとなる。また、ひとつのデバイスで完了することから、医療費の節約にもつながると考えられる。このような Theranostics を可能とするためには、診断と治療の両機能を有するデバイスの開発が必須となる。

マイクロバブルは心エコーや肝腫瘍病変における超音波造影剤として用いられている。このマイクロバブルは微小気泡を外殻で被覆することで安定化されており、診断用超音波を照射すると微小気泡が超音波を反射することで造影効果を発揮する。一方で、診断用超音波とは異なる周波数の治療用超音波を照射すると、気泡の圧壊に伴い細胞穿孔が可能となる。この細胞穿孔法は超音波照射条件をコントロールすることで穿孔の可逆・不可逆を選択可能であり、10 年ほど前から薬物・核酸・たん白質のデリバリー法 (可逆的細胞穿孔) や殺細胞技術 (不可逆的細胞穿孔) が報告されてきた。これらのことから、マイクロバブルと超音波の組み合わせは Theranostics を達成しうる有望な手段として期待されている。しかしながら、これらのマイクロバブルは超音波診断用に開発されたものであり、治療用に開発されたバブル製剤は未だ存在しないこのような背景のもと、申請者らは治療用バブル製剤としてサブミクロンサイズのリポソーム型ナノバブルを開発した。ナノバブルは粒子径を小さくすることにより深部組織への到達性に優れており、既存のマイクロバブルと治療用超音波を利用した遺伝子導入法よりも高い遺伝子発現が得られる。このように治療に特化したナノバブルは高いデリバリー効率を持つ一方で、造影剤としての機能はその小ささ故に診断用超音波を反射しにくく、マイクロバブルほどの造影能を得られないと考えられる。すなわち、診断用にはある程度の粒子径を持つマイクロバブルが優れており、治療用には粒子径の小さなナノバブルが優れていると考えられる。これらのことから、「Theranostics」を目的としたバブル製剤には粒子径のコントロールが重要であると考えられる。

2. 研究の目的

ナノ・マイクロバブルの気泡成分・外殻成分を変更することなく、サイズのみをコン

ロール可能な新規ナノ・マイクロバブル調製法を確立し、超音波造影・超音波治療に最適な粒子径を模索する。

3. 研究の方法

3-1. ナノ・マイクロバブルの調製

脂質組成が Distearoylphosphatidylcholine (DSPC) : Distearoylphosphatidylethanolamine methoxypolyethyleneglycol (DSPE-PEG2k-OMe) =94 : 6 (モル比) からなるリポソームを逆相蒸発法により調製した。このリポソーム懸濁液を濃度の異なるグリセロール溶液で希釈し、脂質濃度を 1 mg/mL とした。このリポソーム懸濁液 10 mL をホモジナイザーチューブに入れ、蓋を締めた後に、チューブ内空気をパーフルオロプロパンに置換した。その後、ホモジナイザーで攪拌 (6,000 rpm, 1 分) し、ナノ・マイクロバブルとした。

3-2. ナノ・マイクロバブルの特性評価

調製したナノ・マイクロバブルを動的光散乱法により、粒子サイズを測定した。また、ナノ・マイクロバブル中のパーフルオロプロパン含有量を GC-MS を用いて算出した。

3-3. ナノ・マイクロバブルの超音波造影

減圧脱気した PBS 500 μ L をビーカーに入れ、スターラーで攪拌しながら水浴で 37 とした。小動物用超音波造影装置 (VEVO2100) を用いて超音波造影しながら、ナノ・マイクロバブル 100 μ L を添加し、経時変化を撮像した。なお、超音波造影にはコントラストモードを使用し、多重反射部分を避けて撮像した。

3-3. ナノ・マイクロバブルを用いた超音波遺伝子導入

マウス大腸がん細胞株 (Colon-26) を OptiMEM で懸濁し、細胞濃度を 4×10^5 個/mL とした。この細胞懸濁液 250 μ L にルシフェラーゼ発現プラスミド DNA (5 μ g/mL) 100 μ L と調製したナノ・マイクロバブル (1 mg/mL) 60 μ L を添加し、OptiMEM (を加えて全量を 500 μ L とした。この液に対して超音波照射装置 (Sonopore KTAC-4000) を用いて超音波照射 (Frequency 2 MHz, Intensity 2.5 W/cm², Duty 10 %, Duration 10sec., Burst Rate 2 Hz) した。その後、細胞を培地で洗浄し、48 穴プレートに移した後に、24 時間培養した。細胞を PBS で洗浄し、Lysis buffer (0.05 % Triton X-100, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.8), 2 mM EDTA) 100 μ L/well を添加した。次に - 80 と室温で凍結融解を 2 回繰り返すことで細胞溶解液とし、ルシフェラーゼ活性を測定した。

3-4. 脂質組成の影響の検討

脂質組成が Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), DSPC : DSPE-PEG2k-OMe =94 : 6 (モル比) からなるリポソームを逆相蒸発法により調製し、PBS で希釈し、脂質濃度を 1 mg/mL とした。このリポソ-

ム懸濁液 2 mL を 5 mL-バイアル瓶に入れ、バイアル瓶内の空気をパーフルオロプロパンに置換した。キャップをした後に、パーフルオロプロパン 7.5 mL で加圧し、バス型超音波洗浄槽を用いて超音波照射することで、ナノ・マイクロバブルを調製した。このナノ・マイクロバブルの特性を評価するため、粒子径を動的散乱法、パーフルオロプロパン保持量をガスクロマトグラフィにて評価した。

3-5. 脂質組成の異なるナノ・マイクロバブルの安定性評価

500 mL の脱気 PBS にナノ・マイクロバブル 1 mL を添加し、超音波造影装置を用いて超音波強度を指標に経時変化を測定した。また、in vivo における安定性を評価するため、各種ナノ・マイクロバブルをパーフルオロプロパン量として、7.39 μ L 尾静脈内投与し、1 分後、血中に残存しているパーフルオロプロパン量をガスクロマトグラフィにより測定した。

3-6. in vivo における遺伝子導入

各種ナノ・マイクロバブル（パーフルオロプロパンとして 7.39 μ L）とルシフェラーゼ発現プラスミド 100 μ g を尾静脈内投与し、経頭蓋的に超音波照射した。1 日後、脳を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。なお、データは脳重量で補正した。

3-7. アクティブターゲティング型マイクロバブルの調製

トランスフェリン (TF) をバッファーで溶解し、濃度を 1 mg/mL とした。この TF 溶解液を 2 mL-バイアル瓶に入れ、バイアル瓶内の空気をパーフルオロプロパンで置換した。キャップした後に、パーフルオロプロパン 4 mL で加圧し、バス型超音波洗浄槽を用いて超音波照射することで、マイクロバブルを調製した。

3-8. アクティブターゲティング型マイクロバブルの機能性評価

Colon-26 細胞 (1×10^6 cells/mL) 250 μ L をチューブに入れ、蛍光ラベルしたマイクロバブル 100 μ L と培地を加え、全量を 500 μ L とした。37 $^{\circ}$ C で 30 分培養後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、フローサイトメトリー解析または共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

3-9. ナノ・マイクロバブルの凍結乾燥化

3-4 と同様の方法で DSPC からなるナノ・マイクロバブルを調製後、凍結乾燥し、粒子径・パーフルオロプロパン保持量を指標に評価した。

4. 研究成果

各種グリセロール濃度 (0% ~ 80%) を用いて、ナノ・マイクロバブルを調製し、粒子

径を測定した結果、0.5 から 15 μ m のナノ・マイクロバブルが調製された。このことから、グリセロール濃度をコントロールすることにより、ナノ・マイクロバブルの粒子径を制御可能であることが示された (図 1)。これはグリセロールにより粘度が増すことで、液中に巻き込まれる気泡が大きくなることに起因すると考えられた。本実験から、外殻成分や気体成分を変更することなく粒子径を制御可能なナノ・マイクロバブル調製法が確立された。この方法を用いることで、外殻成分や気体成分を変更することなく粒子径の影響を調査することが可能と考えられる。また、外殻成分のみや気体成分のみが異なるナノ・マイクロバブルを調製可能と考えられ、それぞれの影響をより詳細に検討できると期待される。

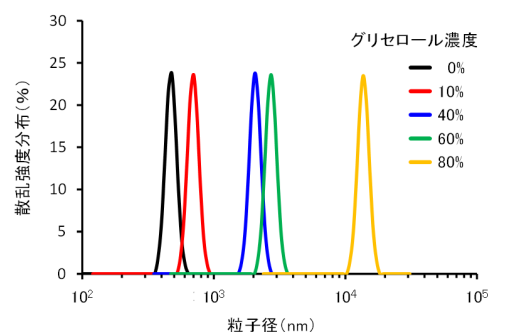


図 1 ナノ・マイクロバブルの粒子径

次にこれらのナノ・マイクロバブルを用いて超音波造影能を評価した。その結果、0.5 μ m のナノバブルでは、5 分後に造影効果の消失が認められた。一方、3.3 μ m および 15 μ m のマイクロバブルでは 60 分経過後も造影効果が認められた。また、相対的超音波強度を比較したところ、0.5 μ m のナノバブルの消失が最も早く、粒子径の増加に伴い相対的超音波強度の低下が抑制されることが判明した (図 2)。なかでも、マイクロバブル粒子径 3.3 μ m 以上では、相対的超音波強度低下の抑制が認められた。これらの結果から、数 μ m 以上の粒子径を持つマイクロバブルは安定性が高いことが示唆された。これらのことから、粒子径の大きなマイクロバブルの消失が遅くなった可能性が考えられる。

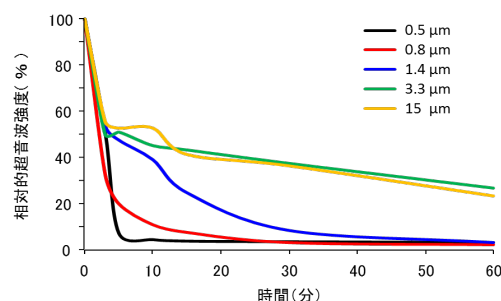


図 2 粒子径の異なるナノ・マイクロバブルによる超音波造影能の評価

次に超音波を用いた遺伝子デリバリーにおよぼすナノ・マイクロバブルの粒子径の影響について検討した。レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ発現プラスミド DNA を用いて遺伝子発現量を測定した。その結果、0.5 μm のナノバブルを用いた群では高いルシフェラーゼ活性が認められ、粒子径の増加に伴い、ルシフェラーゼ活性の低下が認められた (図 3)。また、0.5 μm のナノバブルを用いた群では 15 μm のマイクロバブルを用いた群より 50 倍高いルシフェラーゼ活性を示した。このことから、遺伝子デリバリーに関して、粒子径の小さなナノバブルが有利であることが示唆された。

本実験から、ナノ・マイクロバブル粒子径の低下に伴い、安定性は低下し、遺伝子・薬物デリバリー効率は亢進することが示された。このように外殻成分や気体成分を変化させることなくナノ・マイクロバブル粒子径を簡易的に制御可能な調製法はナノ・マイクロバブルの設計において新たな知見をもたらすと期待される。今後、このナノ・マイクロバブル調製法を用いて外殻成分や気体成分の影響を検討することで、超音波セラノスティクスに最適な粒子設計が可能になるものと考えられる。本研究においては、超音波セラノスティクスを構築する上で、ナノ・マイクロバブル粒子径の制御が重要であることが示唆された。

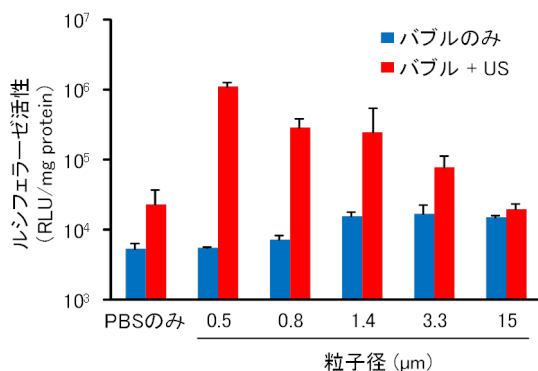


図 3 粒子径の異なるナノ・マイクロバブルによる遺伝子導入

次に、ナノ・マイクロバブル構成殻成分の影響について検討した。DMPC、DPPC、DSPC からなるナノ・マイクロバブルを調製し、含有しているパーフルオロプロパン量を測定した。その結果、DMPC、DPPC、DSPC の順にパーフルオロプロパン量の増加が認められ、DSPC からなるナノ・マイクロバブルにおいて最も高い値を示した。この結果は、アシル基の延長に伴い、疎水性が増大することで疎水性の気体であるパーフルオロプロパンとの親和性が増したためと考えられた。

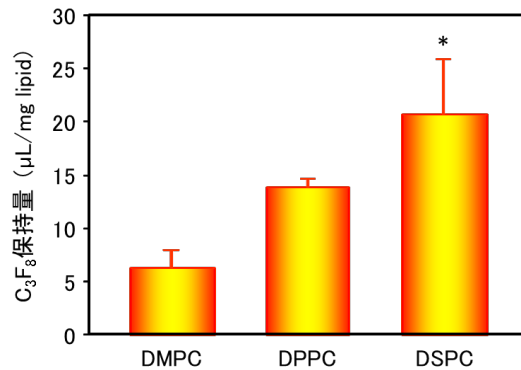


図 4 脂質組成の異なるナノ・マイクロバブルのパーフルオロプロパン保持量

次に生体内における安定性を評価することを目的として、パーフルオロプロパンとして同量のナノ・マイクロバブルをマウス尾静脈内投与した。その結果、DSPC からなるナノ・マイクロバブルにおいて、高い血中パーフルオロプロパン量を示した。このことから、DSPC を構成成分とすることで安定なナノ・マイクロバブルを調製可能であることが示唆された。さらに、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ発現プラスミド DNA とナノ・マイクロバブルを投与し、脳に向けて経頭蓋的に超音波照射した結果、DSPC からなるナノ・マイクロバブルにおいて効果的な遺伝子導入が可能であった (図 5)。このように、高いルシフェラーゼ発現が得られたのは、圧壊の核となるナノ・マイクロバブルがマウス生体内において安定に存在したためと考えられた。

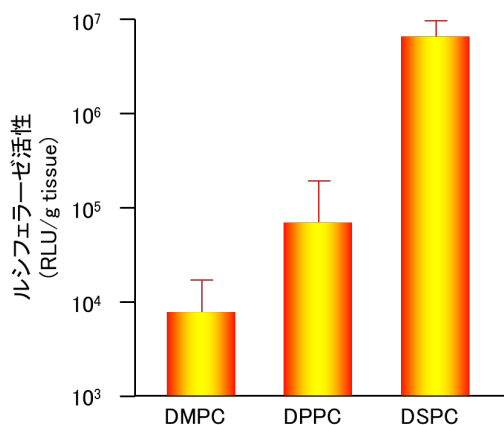
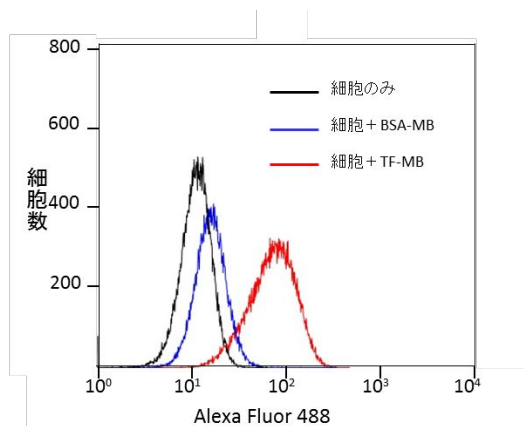


図 5 脳における遺伝子発現量

次に、アクティブターゲティング能を有するマイクロバブルの開発に着手した。TF 修飾マイクロバブルのアクティブターゲティング能を評価した。その結果、TF レセプターを発現している Colon-26 細胞に対して、TF 修飾マイクロバブルは結合能を有していることが明らかとなった (図 6)。さらに、このときの細胞への接着性はコントロールであるウシ血清アルブミン (BSA) 修飾マイクロバ

ブルでは観察されなかったことから、TF 特異的な結合であることが推察された。そこで、このことを評価するため、TF を用いた競合阻害実験を試みた。その結果、フリーの TF 添加により、TF 修飾マイクロバブルの結合性が著しく低下したことから、TF 修飾マイクロバブルの結合は TF レセプターを介したものであると考えられた。

さらに、TF を蛍光ラベルし、Colon-26 細胞に作用させた後に、共焦点レーザー顕微鏡により観察した結果、TF 修飾マイクロバブル添加群ではマイクロサイズの粒子の接着が認められた。以上のことから、TF 修飾マイクロバブルは、マイクロバブルの形態を維持した



状態でアクティブターゲティング能を有していることが示唆された。

図 6 TF 修飾マイクロバブルの Colon-26 細胞に対する結合性

次に、ナノ・マイクロバブルの凍結乾燥製剤化について検討した。様々な条件設定の結果、凍結乾燥前後で粒子径およびパーフルオロプロパン保持量に変化を与えない凍結乾燥法を構築した。なお、凍結乾燥ナノ・マイクロバブルは各測定の前直前に超純水 2 mL で復水したものを使用した。これらの結果から、一般的に長期保存可能とされる凍結乾燥法を用いたナノ・マイクロバブルが調製されたものと考えられた。

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 10 件)

Development of tissue-selective gene delivery system with ultrasound

Ryo Suzuki, Daiki Omata, Yusuke Oda, Mutsumi Sugii, Hitoshi Uruga, Johan Unga, Yoichi Negishi, Sanae Oda, Kazuo Maruyama

Asian J. Pharm. Sci., 2, 162-163 (2016) 査読有

Development of cell-targeting bubble liposomes for effective gene delivery with ultrasound

Mutsumi Sugii, Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Johan Unga, Daiki Omata, Hitoshi Uruga, Yoichi Negishi, Kazuo Maruyama

Asian J. Pharm. Sci., 2, 146-147 (2016) 査読有

Tumor growth suppression by the combination of nanobubbles and ultrasound

Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Daiki Omata, Norihito Nishiie, Risa Koshima, Yasuyuki Shiono, Yoshikazu Sawaguchi, Johan Unga, Tomoyuki Naoi, Yoichi Negishi, Shigeru Kawakami, Mitsuru Hashida, Kazuo Maruyama

Can. Sci., 107, 217-223 (2016) 査読有

Development of fluoros lipid-based nanobubbles for efficiently containing perfluoropropane

Yusuke Oda, Ryo Suzuki, Tatsuya Mori, Hideyo Takahashi, Hideaki Natsugari, Daiki Omata, Johan Unga, Hitoshi Uruga, Mutsumi Sugii, Shigeru Kawakami, Yuriko Higuchi, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida, Kazuo Maruyama

Int. J. Pharm., 20, 64-71 (2015) 査読有

Nonviral gene delivery systems by the combination of bubble liposomes and ultrasound

Daiki Omata, Yoichi Negishi, Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Yoko Endo-Takahashi, Kazuo Maruyama

Advances in Genetics, 89, 25-48 (2015) 査読無

バブルリポソームと超音波技術を利用した治療と診断

丸山一雄、小俣大樹、鈴木 亮、小田雄介、澤口能一

ファインケミカル, 42, 39-43 (2013) 査読無

超音波セラノスティクス

丸山一雄、小田雄介、小俣大樹、鈴木 亮

薬剤学, 73, 194-202 (2013) 査読無

Novel Strategies for Ultrasound Diagnostics and Therapeutics by Micro/Nanobubbles

Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Daiki Omata, Yoshikazu Sawaguchi, Mutsumi Seki, Hitoshi Uruga, Tomoyuki Naoi, Yoichi Negishi, Kazuo Maruyama

Thermal Medicine, 29, 37-46 (2013) 査読有

バブルリポソームと超音波を用いて抗原送達した樹状細胞の免疫によるがん転移予防効果

小田雄介、鈴木 亮、関むつみ、小俣大樹、澤口能一、宇留賀仁史、丸山一雄

超音波テクノ, 25, 41-45 (2013) 査読無

Systemic delivery of miR-126 by miRNA-loaded Bubble liposomes for the treatment of hindlimb ischemia

Yoko Endo-Takahashi, Yoichi Negishi, Arisa Nakamura, Saori Ukai, Kotomi Ooaku, Yusuke Oda, Katsutoshi Sugimoto, Fuminori Moriyasu, Norio Takagi, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Yukihiko Aramaki
Scientific Reports, 4, 3883 (2013) 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

バブルリポソームの安定性におよぼす脂質組成の影響

小田雄介、鈴木 亮、小俣大樹、澤口能一、宇留賀仁史、関むつみ、根岸洋一、川上 茂、樋口ゆり子、橋田 充、丸山一雄
第 29 回日本 DDS 学会 埼玉

脂質組成の異なるバブルリポソームの特性評価

小田雄介、鈴木 亮、宇留賀仁史、小俣大樹、澤口能一、関むつみ、根岸洋一、丸山一雄
第 12 回 日本超音波治療研究会 東京

超音波造影と超音波遺伝子導入に対する微小気泡の粒子径の影響

石川 舞、小田雄介、鈴木 亮、三瓶芳莉、宇留賀仁史、小俣大樹、澤口能一、関むつみ、丸山一雄
第 12 回 日本超音波治療研究会 東京

微小気泡の粒子径が及ぼす超音波造影能と超音波遺伝子導入効率への影響

石川 舞、小田雄介、鈴木 亮、三瓶芳莉、宇留賀仁史、小俣大樹、澤口能一、関むつみ、丸山一雄
日本薬学会 第 134 年会 熊本

Brain Specific Gene Delivery by Bubble liposomes and Ultrasound

Y. Oda, R. Suzuki, D. Omata, Y. Sawaguchi, Y. Negishi, K. Maruyama
40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society Hawaii

微小気泡の粒子径が及ぼす超音波遺伝子導入への影響

三瓶芳莉、小田雄介、鈴木 亮、石川 舞、小俣大樹、Johan Unga、宇留賀仁史、関むつみ、根岸洋一、丸山一雄
第 30 回日本 DDS 学会 東京

ソノポレーションを駆使した樹状細胞への抗原送達法の開発とがん免疫療法への応用

小田雄介、鈴木 亮、小俣大樹、Johan Unga、丸山一雄
日本超音波医学会第 87 回学術集会 2014 年 5 月 9-11 日 横浜

フッ化リン脂質を利用したバブルリポソームの開発

小田雄介、高橋秀依、鈴木 亮、小俣大樹、

Unga Johan、宇留賀仁史、杉井むつみ、川上 茂、樋口ゆり子、橋田 充、丸山一雄
日本薬学会 第 135 年会 神戸

Feasibility of Bubble liposomes as ultrasound contrast agent; in vivo animal study

Yusuke Oda, Ryo Suzuki, Daiki Omata, Johan Unga, Hitoshi Uruga, Mutsumi Sugii, Kazuo Maruyama
World Molecular Imaging Congress Hawaii

〔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.teikyo-dds-lab.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田 雄介 (ODA, Yusuke)

帝京大学・薬学部・助手

研究者番号: 80505941

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: