

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32643

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560264

研究課題名(和文)がん指向性ナノバブルを利用した低侵襲的早期超音波がん診断・治療システムの構築

研究課題名(英文)Development of theranostics for cancer with tumor targeted bubbles and ultrasound

研究代表者

鈴木 亮 (Suzuki, Ryo)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：90384784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん組織内の血管内皮細胞をターゲティングし、がんの早期診断や超音波治療に適用可能なバブルの開発を試みた。この目的を達成するためには、血中安定性に優れたバブルを開発する必要がある。そこで本研究では、バブルの殻組成を最適化し、血中安定性が高く、がん組織内の新生血管内皮細胞に結合するペプチドを修飾したバブルの開発に成功した。今回の研究で開発したバブルを利用することで、効果的ながんの早期超音波診断や超音波治療につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we succeeded to develop novel bubbles with long half-life as ultrasound imaging agent. In addition, we modified the targeting peptide (cyclic RGD) on the bubbles. These bubbles could effectively bind to human umbilical endothelial cells (HUVEC) as a model of neovascular endothelial cells in tumor tissue. From these results, it is expected that the developed bubbles would be applied for ultrasound imaging agents and therapeutic agents for cancer.

研究分野：薬物送達学

キーワード：超音波 がん 診断 治療

1. 研究開始当初の背景

近年、体外からがん組織に超音波エネルギーを集束し、がんを加熱凝固させる治療用超音波装置(強力集束超音波(HIFU))が開発され、新たながん治療法として臨床応用されている。このHIFUは、低侵襲的治療法として期待されているものの、超音波適用部位付近の皮膚の火傷や治療時間が長いなどの問題が指摘されている。そこで申請者は、ナノバブルをがん組織に投与し、皮膚への火傷を誘導しない低強度超音波照射によるがん治療法を開発した。さらに、この療法で生き残ってしまったがん細胞を効率よく拒絶するため、強力な抗原提示細胞である樹状細胞をがん組織内に投与することで、がん治療効果を増強することに成功した。しかし、この方法はがん組織内にバブルや樹状細胞の投与が必要であるため、患者負担が大きい。そこで、腫瘍血管内皮細胞ターゲティング型バブルの全身投与により腫瘍の新生血管に集積したバブルへの超音波照射によるがん新生血管傷害療法を開発が急務となっている。

2. 研究の目的

本研究では、がん組織内の新生血管内皮ターゲティング型バブルと診断用超音波を利用した早期がん診断法の開発と治療用超音波を利用したがん組織血管傷害療法による早期がん治療法を開発を行う。

3. 研究の方法

3.1 がん新生血管内皮細胞を標的としたバブルの調製方法

ジステアロイルフォスファチジルコリン(DSPC)およびポリエチレングリコール(5k)修飾ジステアロイルフォスファチジエタノールアミン(DSPE-PEG(5k))混合液(各10 mg/mL(生理食塩水), 100 uL)、cRGDまたはcRADペプチド修飾DSPE-PEG(3.4k)(1 mg/mL, 172 uL)、プロピレングリコール(45 uL)および生理食塩水(583 uL)をバイアル内添加し、パーフルオロプロパンでバイアル内を満たし、振とう装置(VialMixer)で45秒間激しく浸透し、気泡を調製した。このバイアルを15分間静置し、大きなバブルを除去するためバイアルの下層から小さなバブル懸濁液のフラクションを回収した。バブルの個数濃度はコールターカウンターを用いて計測した。

3.2 ターゲティング型バブルのがん組織集積性の評価

メラノーマ細胞をマウスの後肢の皮内に移植し、9日後にマウス麻酔下で後眼窩の静脈よりバブル懸濁液を 1×10^7 個/マウスとなるように投与し、がん組織をBモード、コントラストモードで撮像した。今回の検討では、がん組織内を流れているバブル由来の超音波造影シグナルを検出するため、バブル投与10分後にがん組織に向けバブルを崩壊で

きる音圧の超音波(フラッシュエコー)照射を行い、フラッシュエコー照射前後の造影輝度の差分を指標にがん組織へのバブルの集積性を評価した。

3.3 超音波がん治療効果の評価

cRGDまたはcRAD(コントロールペプチド)修飾バブルをマウス麻酔下で後眼窩の静脈より 2×10^7 個/マウスとなるように投与し、13分後(以前の検討でバブルの腫瘍集積が確認できた時間)に治療用超音波(1 MHz、 4 W/cm^2)を照射した。その後、腫瘍を摘出し凍結切片を作成後、ヘマトキシリン・エオシン染色にて組織傷害性を評価した。

3.4 フォスファチジルグリセロール添加バブルの調製および血中安定性評価

各比率のDSPC:ジステアロイルフォスファチジルグリセロール(DSPG):DSPE-PEG(2k)を生理食塩水に懸濁し、3.1の方法にしたがってバブルを調製した。血中安定性評価に関しては、麻酔下で正常マウスの後眼窩の静脈よりバブル懸濁液を 2×10^7 個/マウスとなるように投与し、腎臓の血流造影を行うことで評価した。

3.5 培養血管内皮細胞への結合性評価

cRGDまたはcRAD修飾バブルの調製では、3.4の組成の脂質懸濁液に5%(モル比)となるようにペプチド修飾DSPE-PEG(3.4k)を添加するとともに蛍光物質(DiO)を添加して、バブルを調製した。このバブルを培養したヒト臍帯静脈内皮細胞に添加し、37°Cで30分間培養後、細胞を洗浄し、バブルの結合を蛍光顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

がん組織の新生血管内皮細胞には、

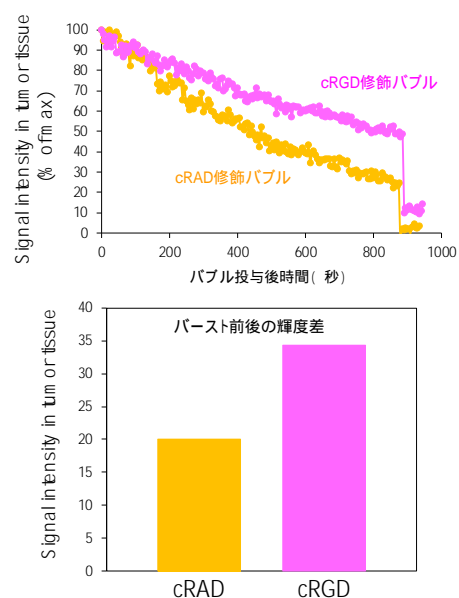


図1 cRGD 修飾バブルのがん組織集積性

インテグリンが高発現していることが知られている。このインテグリンに対して特異的に結合するペプチドとして cyclic RGD (cRGD) ペプチドが知られている。そこで今回の検討では、cRGD ペプチド修飾バブルを調製し、そのがん組織への集積を超音波造影により評価した(図1)。その結果、コントロールペプチド(cRAD)を修飾したバブルでは、がん組織への集積は低かった。一方、cRGD 修飾バブルでは、高い集積性が認められた。今回の検討では、ファージディスプレイ法で見出されている腫瘍血管内皮細胞に結合するペ

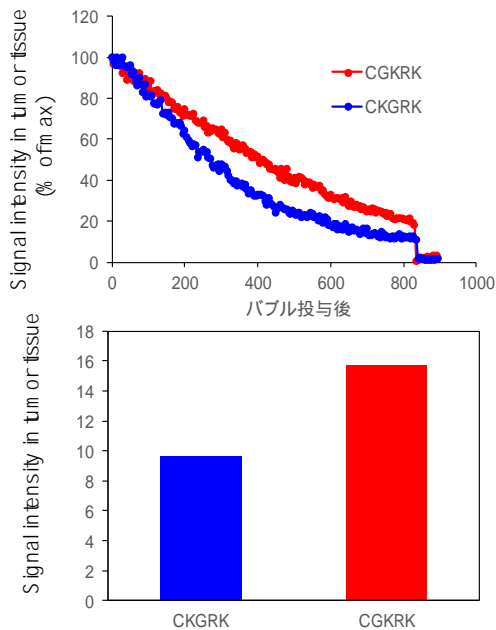


図2 CGKRK 修飾バブルのがん組織集積性

プチドとして知られている CGKRK を修飾したバブルを調製し、そのがん組織集積性を評価した(図2)。その結果 CGKRK 修飾バブルは、コントロールペプチド(CKGRK)ペプチド修飾バブルに比べ、がん組織効率よく集積することが明らかとなった。今回の検討では、2種類のペプチドを用いて、がん組織血管内皮細胞へのターゲティングの可能性を明らかとした。

次に、がん組織への集積性を有している cRGD 修飾バブルを用い、がん組織集積後のがん組織に向け治療用の超音波照射し、がん新生血管傷害によるがん治療効果の評価を行

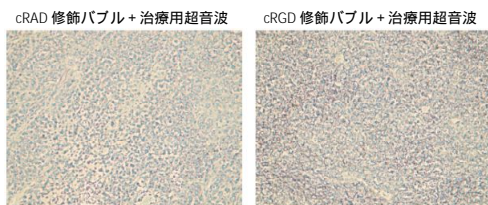


図3 ターゲティングバブルの静脈内投与後の超音波照射によるがん治療

った。しかし、残念ながらこの治療においてがん組織の傷害は観察されなかった(図3)。これは、がん組織に治療に必要な分量のバブルが集積しなかったためであると考えられた。そこで、バブルのがん組織へのさらなる集積性の向上を目的に、バブルの血中安定性の改善し、がん組織への集積後も安定に存在しうるバブルの開発を試みた。バブルの安定性には、気泡表面を覆っている殻の成分が大きく影響する。そこで、気泡の殻組成を変え、その安定性をまず *in vitro* の系で評価した。これまでの我々のバブルでは、殻の構成成分として主にフォスファチジルコリンを用いてきた。Lewis らは、フォスファチジルコリンとフォスファチジルグリセロールの相互作用により脂質膜の安定性が向上するとの報告している。そのため、バブルの殻組成に DSPG を添加することで、バブルの安定性を向上させることができると期待される。そこで、バブルの殻への DSPG 添加の影響を評価した。その結果、DSPG の添加量に依存し、超音波造影期間の延長が認められた。そこで、これらバブルの安定性を *in vivo* において評価をするため、全身投与後の腎臓血流の超音波造影輝度を指標に評価した(図4(A, B))。その結果、DSPG 添加量 4-5%までは添加量に依存して、消失半減期の延長が認められ、それ以上の添加量では飽和が認められた(図4(C))。このように、バブルの殻組成として DSPG を

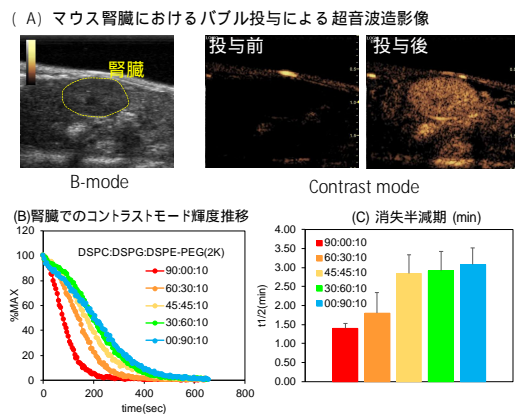


図4 マウス腎臓の血流造影

添加することで、バブルの血中安定性が向上すると思われた。そこで、この安定性の向上したバブル(DSPG 添加量 60%、蛍光(DiO)ラベル)に cRGD ペプチドを修飾し、*in vitro* において血管内皮細胞への結合性を評価した(図5)。その結果、cRGD ペプチド修飾により効率よく血管内皮細胞に結合することが明らかとなった。

本研究では、がん組織内の新生血管内皮ターゲティング型バブルと診断用超音波を利用した早期がん診断法の開発と治療用超音波を利用したがん組織血管傷害療法のためのバブルの開発を行った。今回の検討では、血中安定性の高いバブルの表面にがん新生

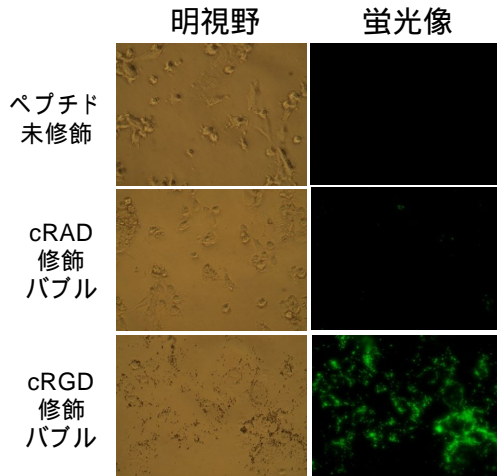


図5 cRGD 修飾 DSPG 含有バブルの培養血管内皮細胞(HUVEC)への結合

血管にターゲティングに必要な cRGD ペプチドを修飾した新たなタイプのバブルの開発を行い、培養したターゲット細胞に効率よく結合することを見出した。このことから、今回開発したバブルのがん組織の早期超音波診断および治療への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Suzuki R, Oda Y, Omata D, Nishiie N, Koshima R, Shiono Y, Sawaguchi Y, Unga J, Naoi T, Negishi Y, Kawakami S, Hashida M, Maruyama K. Tumor growth suppression by the combination of nanobubbles and ultrasound. **Cancer Sci.**、査読：有、2016; 107: 217-223.
2. Suzuki R, Klibanov AL. Co-administration of Microbubbles and Drugs in Ultrasound-Assisted Drug Delivery: Comparison with Drug-Carrying Particles. **Adv Exp Med Biol.**、査読：有、2016; 880: 205-220
3. Omata D, Negishi Y, Suzuki R, Oda Y, Endo-Takahashi Y, Maruyama K. Nonviral gene delivery systems by the combination of bubble liposomes and ultrasound.、査読：有、**Adv Genet.** 2015; 89: 25-48
4. Kurosaki T, Kawakami S, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Sasaki H, Yamashita F, Hashida M. Kidney-selective gene transfection using anionic bubble lipopolyplexes with renal ultrasound irradiation in mice. **Nanomedicine.**、査読：有、2014; 10: 1829-1838.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Suzuki R., Oda Y., Omata D., Maruyama K. Cancer therapy by the combination of ultrasound mediated hyperthermia and immunotherapy. EUFUS2015, 2015.10.15-10.16 (Royal Geographic Society London、ロンドン、英国)
2. Suzuki R., Novel strategy for ultrasound diagnostics and therapeutics, The 6th Asian Congress of Hypothermic Oncology (招待講演), 2014.9.5 (AOSSA、福井県福井市)
3. 鈴木 亮、ナノ気泡を利用した超音波 DDS の開発、第 30 回日本 DDS 学会学術集会 (招待講演) 2014.7.30 (慶応義塾大学薬学部・東京都港区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：セラノスティクス用のバブル製剤及びその使用方法

発明者：丸山一雄、鈴木 亮、ウンガヨハン、小俣大樹

権利者：学校法人帝京大学

種類：特許

番号：特願 2015-117793 号

出願年月日：2015 年 6 月 10 日

国内外の別：国内 (PCT 出願準備中)

取得状況 (計 0 件)

〔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

鈴木 亮 (Ryo Suzuki)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：90384784

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし