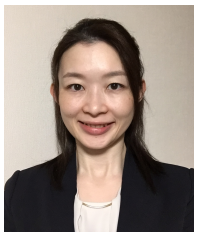
薬 剤 学, **79** (4), 182–186 (2019)

≪若手研究者紹介≫



リポソーム技術と超音波技術の融合による セラノスティクスシステム構築を目指して

髙 橋 葉 子* Yoko Endo-Takahashi
東京薬科大学 薬学部 薬物送達学教室

1. は じ め に

筆者が初めて「薬剤学」というものに触れたのは，学部生の講義であった．しかし，当時真面目に講義を聴講するタイプではなかったこともあり，強いインパクトを受けたというよりも，ようやく薬学部であることを実感できたと考えた程度であった．3年次の研究室配属を決める際には，もともと薬剤師職よりも薬を創る研究職に興味があったため，漠然と薬剤系を考えだし，武田にいた凄い先生がいるらしいとの噂を聞き，製剤設計学教室を希望した．幸運にも配属が決定し，岡田弘晃教授（現東京薬科大学名誉教授，岡田 DDS 研究所所長），湯淺宏助教授（現昭和大学客員教授），尾関哲也講師（現名古屋市立大学教授），高島由季助手（現准教授）のご指導のもと研究生活がスタートすることとなった．春休みの基礎実習の間は，卒業間近の修士2年の先輩にご指導いただいた．その先輩は卒業間近にもかかわらず，深夜や休日まで実験をしていたこと，また国家試験直前のはずの先輩も研究室にきて実験を教えて下さったことに驚くとともに，自らの手で結果を導く研究というものはそれ程面白いものなのだろうと，興味が高まったことはよく覚えている．

4年次には，カチオン性ペプチドを利用した遺伝子デリバリーの研究に携わらせて頂いた．もちろん当時は先輩の指導のまま手を動かすことばかりであったが，自分達が作ったものが新たなドラッグデリバリーシステム（DDS）として遺伝子治療に貢献し得るという期待感，教科書に答えの載っていないことを自らの手で明らかとしていく達成感からか，実験はもちろんのこと，関連内容を勉強することも非常に楽しかった．その他にも，研究室行事に参加したり企画したりと，先生方や先輩方，同期達と充実した卒論研究生活を送ることができた．

企業の研究職を希望していたため，当然のように大学院進学を志望した．しかしながら，勉強が得意ではなかった筆者は，大学院入試の成績も微妙であったため，研究室の定員超過により行く先が未定となってしまった．その際，拾っていただいたのが新槇幸彦教授（元東京薬科大学）の薬物送達学教室である．岡田先生にもお口添え頂けたこともあり，無事に大学院進学後の所属が確定した．本学には，教員が各学年数名の学生を担当し，指導・助言を行うアドバイザー制度と呼ばれる制度があるが，新槇先生は筆者が1年次からのアドバイザーでもあった．これも有難いご縁だなと思ったが，まさかそのまま就職することになるとは当時は夢にも思っていなかった．当時，新槇先生，根岸洋一講師（現教授），坂本宜俊講師（現松山大学准教授），四元聡志助手（現東京薬科大学生命科学部助教）により，リポソーム技術を利用して，遺伝子導入のみならず，免疫賦活化，アポトーシス誘導など様々な現象の研究が進められていた．筆者が進学する数か月前に根岸先生が着任されていたこともあり，着任したばかりの先生

*2007年東京薬科大学大学院博士前期課程修了，2007年同大学助手，2012年博士（薬学）取得，同年助教．11th Liposome Research Days Conference The Young Investigator Award，第8・14回日本超音波治療研究会若手研究者優秀賞他．連絡先：〒192–0392 東京都八王子市堀之内1432–1 E-mail: endo@toyaku.ac.jp

に他の研究室から進学した大学院生がつくという自然な流れから，リポソームと超音波技術の融合による遺伝子・核酸デリバリーの研究に携わることとなった．今回は，この大学院進学時から従事している超音波を利用した遺伝子・核酸デリバリー研究について紹介させて頂く．

2. ナノバブルと超音波併用による細胞・動物組織への siRNA 導入

遺伝子・核酸医薬の開発において，標的組織へ安全かつ効率的な送達を可能とする DDS 技術の開発が必須であると考えられている．安全性の観点から，ウイルスを用いない人工化合物をキャリアとする技術が盛んに研究されているが，筆者が携わることとなったのは，近年注目されている超音波の物理的エネルギーを利用した DDS 技術の研究であった．超音波は，臨床現場において，造影による診断はもちろんのこと，結石・腫瘍・骨折・血栓症・本態性振戦など種々の疾患治療においても既に利用されている医療技術である．これまでに，超音波造影剤であるマイクロバブルと治療用超音波（0.5〜3 MHz）を併用することで，バブルの振動（オシレーション）と圧壊（キャビテーション）が誘導され，それに伴う細胞膜透過性の亢進が起こり，低侵襲的に細胞外の薬物・遺伝子が細胞内に導入されることが見出されている．このように超音波は，診断（Diagnostics）と治療（Therapeutics）の両者に利用可能であり，診断と治療を融合したシステムであるセラノスティクス（Theranostics）を構築するうえで有望な物理エネルギーとして注目されている．しかしながら，マイクロバブルは診断用に開発された造影剤であり，その粒子サイズが大きく組織深部移行性が低いこと，殻の構成成分に安全面で懸念があること，標的指向性が欠如していることなど，DDS 製剤として改良の余地が多くあった．それらの課題を克服し得るものとして，根岸先生，帝京大学の丸山一雄教授（現特任教授，株式会社ウェルセラ代表取締役），鈴木亮助手（現教授），滝沢知子助手（元帝京大学）との共同研究で開発が進められていたのがリポソーム技術を基盤としたバブル製剤であった．筆者が大学院に進学した頃には，血中安定性や滞留性に優れたポリエチレングリコール（PEG）修飾リポソームに超音波造影ガス（パーフルオロプロパン）を封入したナノサイズのバブル製剤（ナノバブル）が開発され，プラスミド DNA（pDNA）を用いて細胞内導入ツールとしての検討が進められはじめていた段階であった．筆者はその低分子核酸への応用として，small interfering RNA（siRNA）導入ツールとしての有用性評価がテーマとなった．進学とともに研究室も変わり，少なからず不安もあったが，これらの内容を根岸先生にご説明頂いた際には，その新たな技術に大きな魅力を感じ，その開発に自分が携われる期待と高揚感が不安を上回っていた．

筆者自身の研究がスタートした際は，筆者と同様に他の研究室より進学された修士 2 年の先輩によって，本学での遺伝子導入ツールとしての評価系が立ち上げられていた頃であった．その先輩より，リポソームの調製，バブル化の方法，*in vitro* での評価系などの基礎技術を全て教えて頂いた．その先輩もやはり夜でも休日でも熱心に研究されており，研究においても，さらには就職活動においても，多くの相談にのっていただいた．筆者の大学院時代に大きな影響を与えた 1 人であり，大変感謝している．まずは，その先輩が pDNA を導入していた条件を基に，培養細胞に対し，ナノバブルと pDNA，siRNA の混合溶液を添加し，超音波照射を行った．初めは思うような抑制効果が得られなかったが，siRNA 条件，超音波照射条件等を広く検討したところ，10 秒という極めて短時間の照射で高濃度の血清存在下においても細胞内導入効果が認められ，導入に伴う細胞への傷害性も低いことが示された[1]．今思えば，論文等も参考にしたとはいえ，力ずくともいえる勢いでひたすら条件検討を行っていたように思うが，有意な抑制効果が得られた時の達成感は非常に大きかった．また，ナノバブルと超音波の併用による siRNA 導入法は，低温条件下においても導入効果の顕著な減少は認められず，そのメカニズムにエンドサイトーシスがほぼ関与していないことも明らかとした．さらに，共焦点顕微鏡観察により，超音波照射直後には細胞内へと siRNA が送達されることも確認された．遺伝子導入の基礎研究において汎用される方法は，遺伝子とカチオン性化合物の複合体を形成させ，アニオン性を帯びた細胞膜と相互作用し，エンドサイトーシスを介して導入するものである．この場合，導入に一定の時間を要するうえ，生体内タンパク質との相互作用，およびカチオン性キャリアからの遺

伝子の解離しにくさなどによる導入効率の低下が懸念される．これに対し，超音波の物理的エネルギーにより，遺伝子・核酸を瞬時に細胞内へと直接導入可能な本法は，生体へ適用した際にも，遺伝子・核酸の安定性を損なうことなく，短時間で様々な組織の細胞を標的にし得る導入法となることが期待された．

ナノバブルと超音波照射を併用したsiRNA導入法の*in vivo*における有用性を評価するため，骨格筋への適用を試みた．蛍光タンパクであるGFPおよびDsRedを発現させた脛部筋組織へ，siRNA（siGFP）とナノバブルの混合溶液を筋肉内投与し，その直後に投与部位への超音波照射を行った．回収した筋組織切片を蛍光顕微鏡により観察したところ，配列特異的なGFPのみの発現抑制効果が認められた[1]．さらには，内在性遺伝子であるGSK-3βに対するsiRNAの導入を同様に試みたところ，ウェスタンブロット法により，その配列特異的な抑制効果が認められ，本法が*in vivo*においても有用な導入ツールとなることが示された．この*in vivo*までのデータをもって，初めての論文作成，投稿をする頃には，既に博士前期課程を修了し，助手としての研究生活が始まっていた．企業での研究者を目指し，就職活動も終えていた筆者であったが，有難くも新槇先生より助手として残らないかというお話を頂いた．非常に悩んだが，興味のより高まっていた自身の研究に引き続き携わることができるという運とタイミングの良さに感謝して，アカデミック研究者としての道に進む決断をした．職員となってからは，時間的にも体力的にも大学院生の頃のように力ずくというわけにもいかず，実験のペースが急激に低下してしまった．しかしながら，先生方のご助言もあり，できるだけ早い段階での学位取得を目標に，恥ずかしながらこの頃になってようやく効率的な進め方を意識するようになったと思う．上述の研究成果が初の論文となった時の感動は大きく，研究推進の更なるモチベーションへと繋がった．

3. 全身投与を介した遺伝子・核酸導入に適したナノバブルの開発

前項に示したように，標的組織への局所投与と体外からの超音波照射によるsiRNA導入効果が認められた．*In vivo*で効果が得られたことを嬉しく思うと同時に，次は全身投与を介しても有用なsiRNA導入ツールとしたいと考えるようになった．血管内投与での有用性を示すことができれば，直接投与し難い深部組織や血管内皮細胞などへの遺伝子・核酸導入が可能となり，本法による核酸治療の対象疾患の可能性も大きく広がる．さらには，ナノバブルの超音波造影剤としての適用も期待されたためである．しかしながらsiRNAなどの低分子核酸は，分解・排泄されやすいことから，導入の効率化を図るためには，核酸の生体内安定性を高めることが重要と考えられた．そこで，ナノバブルへ核酸を搭載することにより，投与後の核酸の安定性向上のみならず，導入の駆動力となるナノバブルと核酸の血管内挙動を一致させ得る新たなナノバブルの開発に着手した．

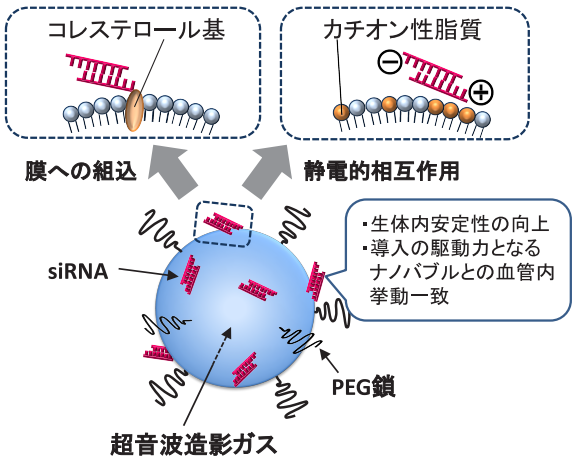


図1　ナノバブルへのsiRNA搭載法

ナノバブルへの核酸の搭載法として，次の2つを検討した．コレステロール修飾核酸のコレステロールをナノバブルの膜に組み込む方法と，負電荷を有する核酸と正電荷脂質との相互作用を利用して膜表面に搭載させる方法である（図1）．コレステロール修飾siRNAのコレステロール基をナノバブル膜に組み込むことで，RNase存在下において，コレステロール修飾siRNA単独よりも安定性が向上することが明らかとなった．これは，ナノバブル粒子の内外に多くのsiRNAを保持することが可能となり，PEGによりナノバブル外表面に形成される水和層の存在もあり，RNaseの影響を受け難くなったためと考えられた．しかしながら，容易にナノバブル膜へのsiRNAの組み込みが可能ではあるものの，超音波照射による膜からの放出効率に改善が必要であった．

一方，カチオン性脂質含有ナノバブルへの siRNA の搭載においては，超音波照射に伴い容易に放出が可能であり，より効率的に siRNA によるレポーター遺伝子の配列特異的な遺伝子発現抑制効果が示された[2]．本法では，ナノバブル調製後に siRNA と相互作用させるため，siRNA の配列ごとにナノバブルを再調製する必要もなく，利便性は高いといえる．超音波造影ガスの保持能，超音波造影効果，遺伝子・核酸搭載能および導入能，傷害性などを指標に，カチオン性脂質の種類や組成比，調製溶媒などの最適化を図り，pDNA やマイクロ RNA（miRNA）のキャリアとしても適用可能であることを明らかとした[3,4]．それらの *in vivo* における有用性評価のため，下肢虚血モデルに対し，血管新生に関与する pDNA（bFGF），あるいは miRNA（miR-126）を搭載させたナノバブル投与と虚血筋組織への超音波照射を試みた．その結果，いずれのナノバブルを用いた場合においても，診断用超音波との併用により下肢虚血部位における造影効果，治療用超音波との併用により各種血管新生因子の有意な上昇とそれに伴う血流回復効果が得られることを明らかとした[3,4]．また，中性脂質で構成されたナノバブルを用いた場合には，同様の血流改善効果が認められなかった．この結果より，全身投与を介した遺伝子・核酸導入では，ナノバブルへの搭載による体内挙動の一致と生体内安定性の向上が重要であり，これらが導入効率，および治療効率の向上に繋がるものと考えられた．さらに，血流量の低下している下肢虚血部位における造影効果が得られたことは，遺伝子・核酸搭載ナノバブルが造影剤として適用可能であることのほか，虚血後に認められる側副血行路のような微細な血管を介しても，ナノバブルが標的部位へ到達可能であったことを示している．これらより，本ナノバブルは，下肢以外の心臓や脳などの虚血部位はもちろん，血管新生の盛んな腫瘍組織などに対しても，全身循環を介した効率的な診断・治療を可能とする画期的ツールとして期待される．本項までの研究成果をもって，無事に学位取得となり，大きな目標の一つが達成された．

4. ナノバブルと超音波による血液脳関門オープニング

一般に，全身循環を介した脳内への薬物送達には血液脳関門（BBB）が大きな障壁となっており，既存の中枢神経疾患治療薬の脳への移行量は僅かと言われている．近年，マイクロバブルを静脈内投与後，頭蓋外から集束超音波（FUS）を照射することで，一時的に BBB の透過性が亢進することが報告され，新たな治療法として期待が集まっている．2015 年にはカナダのグループにより，その翌年にはフランスのグループにより，マイクロバブルと超音波による BBB オープニングに伴う抗がん剤送達と脳腫瘍治療効果が複数報告されている．本システムは，脳腫瘍に限らず多くの中枢神経疾患治療においても，その有用性が期待されている．筆者らのナノバブルと FUS 併用によっても，マウス脳組織の一時的な血管透過性亢進が可能であることを明らかとしていた．そこで，ナノバブルと FUS 併用による脳組織への遺伝子導入の検討に着手した．ナノバブルとルシフェラーゼをコードした pDNA の混合溶液をマウス尾静脈より投与し，左半球に FUS を照射した．その結果，照射部位における遺伝子発現が観察された．さらに，*in vivo* イメージングシステムにより評価した結果，遺伝子発現は FUS 照射領域に限局したものであることが明らかとなった．脳への更なる遺伝子導入効率の向上を目指し，脳組織への集積性が知られる Angiopep-2 ペプチド（Ang2）に着目し，ナノバブル表面のペプチド修飾を試みた．調製した Ang2 修飾ナノバブルは，受容体特異的な脳血管内皮細胞との相互作用性，投与後の脳組織への集積性が認められた[5]．さらに，Ang2 修飾ナノバブルによる脳組織の超音波造影効果を検討したところ，コントロールペプチド（Ang7）修飾ナノバブル投与時と比較し，その造影輝度が若干増強することが示された．さらに，カチオン性脂質含有ナノバブルに Ang2 修飾を施し，核酸搭載と標的組織への集積のいずれも可能とするナノバブルの調製を試みた．その結果，表面に pDNA を搭載した状態においても，その標的指向性は維持されており，さらにその遺伝子導入効果は，Ang7 修飾ナノバブルと比較し，有意に高いことが明らかとなった（図 2）．

上述の結果より，ナノバブルに標的指向性を付与することで，超音波造影においても遺伝子導入においてもより有用なツールとなることが示唆された．また，標的指向性と遺伝子・核酸搭載の両者を可能とするバブル製剤は，疾患部位への高濃度な遺伝子・

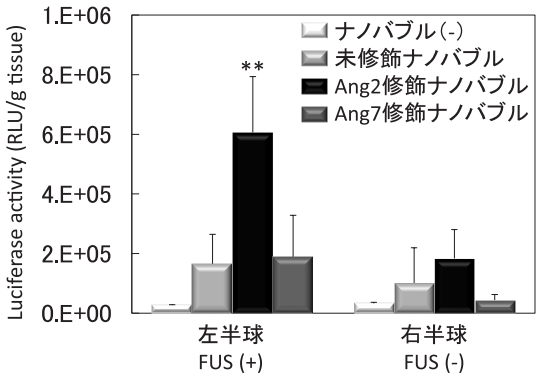


図 2　pDNA 搭載 Ang2 修飾ナノバブルと FUS 併用による脳組織への遺伝子デリバリー
**Statistically different from other groups ($p < 0.01$; one-way ANOVA and Tukey post hoc test).

核酸の集積に寄与し，治療効率の更なる改善に繋がるものと期待される．今後さらに，疾患モデルを用いた有用性評価を行うことで，本法による中枢神経疾患治療への応用展開を図っていきたい．

5. お　わ　り　に

以上，本稿では，これまで筆者が従事してきたナノバブルと超音波を利用した遺伝子・核酸デリバリーの研究について紹介した．今後も，DDS 製剤としての機能のみならず，超音波造影剤としても機能するバブル製剤の開発を進め，有用なセラノスティクスシステムの構築に繋げていきたいと考えている．

本研究成果は，新槇先生，根岸先生の熱心なご指導，丸山先生，鈴木先生の多くのご助言はもちろん，薬物送達学教室の多くの先輩方，同期，後輩，そして学生諸子の多大なご協力により得られたものである．また，岡田先生をはじめとする製剤設計学教室の先生方や先輩方にも，学部卒業後も常に気にかけて頂いていた．ご支援頂いた全ての方々，さらには理解を示してくれた家族にも，この場をかりて感謝申し上げたい．最後に，このような大変貴重な寄稿の機会を与えていただき，心より御礼申し上げます．

引　用　文　献

1) Y. Negishi, Y. Endo, T. Fukuyama, R. Suzuki, T. Takizawa, D. Omata, K. Maruyama, Y. Aramaki, Delivery of siRNA into the cytoplasm by liposomal bubbles and ultrasound, *J. Controlled Release*, **132**, 124–130 (2008).
2) Y. Endo-Takahashi, Y. Negishi, Y. Kato, R. Suzuki, K. Maruyama, Y. Aramaki, Efficient siRNA delivery using novel siRNA-loaded Bubble liposomes and ultrasound, *Int. J. Pharm.*, **422**, 504–509 (2012).
3) Y. Endo-Takahashi, Y. Negishi, A. Nakamura, D. Suzuki, S. Ukai, K. Sugimoto, F. Moriyasu, N. Takagi, R. Suzuki, K. Maruyama, Y. Aramaki, pDNA-loaded Bubble liposomes as potential ultrasound imaging and gene delivery agents, *Biomaterials*, **34**, 2807–2813 (2013).
4) Y. Endo-Takahashi, Y. Negishi, A. Nakamura, S. Ukai, K. Ooaku, Y. Oda, K. Sugimoto, F. Moriyasu, N. Takagi, R. Suzuki, K. Maruyama, Y. Aramaki, Systemic delivery of miR-126 by miRNA-loaded Bubble liposomes for the treatment of hindlimb ischemia, *Sci. Rep.*, **4**, 3883 (2014).
5) Y. Endo-Takahashi, K. Ooaku, K. Ishida, R. Suzuki, K. Maruyama, Y. Negishi, Preparation of Angio-pep-2 peptide-modified Bubble liposomes for delivery to the brain, *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 977–983 (2016).