リピッドバブルと超音波による セラノスティクスと遺伝子・核酸デリバリー

東京薬科大学 薬学部 薬物送達学教室^{*1)}・帝京大学 薬学部 薬物送達学研究室^{*2)}

高橋葉子^{*1)}・丸山一雄^{*2)}・根岸洋一^{*1)}

Gene and nucleic acid delivery and theranostics with lipid bubbles and ultrasound

For clinical applications of genes and nucleic acids as medicines, a development of delivery technology is a major challenge. Recently, various delivery systems controlled physical energies, such as ultrasound, pressure, electric force, magnetic force, electric force, and light, have been developed. In particular, there is an increasing interest in ultrasound-mediated gene and nucleic acid delivery due to its safety. The use of ultrasound in combination with nano/microbubbles allows for enhanced effects not only of imaging but also of gene and nucleic acid delivery. We developed lipid bubbles entrapping an ultrasound contrast gas and evaluated the efficacies of lipid bubbles as tools for gene and nucleic acid delivery. In this review, we describe current knowledge and future perspectives of ultrasound theranostics, which refers to the combination of diagnosis and therapy, and discuss the feasibility of lipid bubbles for therapeutic delivery of genes and nucleic acids.

遺伝子・核酸医薬が臨床応用されるうえで、標的組織および標的細胞へのデリバリー技術の開発は重要課題である。近年、物理エネルギーのなかでも超音波を利用したデリバリーシステムはその安全性の高さから注目されており、ナノバブルやマイクロバブルを併用することで、造影効果のみならず薬物・遺伝子・核酸デリバリー効果の増強の可能性が示されている。筆者らは、超音波造影ガスを封入したリピッドバブルを開発し、種々の疾患モデルマウスを用いて遺伝子・核酸デリバリーツールとしての有用性を評価してきた。本稿では、超音波による診断と治療を融合したシステム(セラノスティクス)構築に向けた現状について概説するとともに、筆者らが開発したリピッドバブルによる遺伝子・核酸デリバリー効果とその治療への応用を紹介する。

Yoko Endo-Takahashi^{*1)}, Kazuo Maruyama^{*2)}, Yoichi Negishi^{*1)}

Keywords: Ultrasound, theranostics, nanobubble

1. はじめに

遺伝子・核酸医薬により、疾患関連遺伝子の発現や遺伝子産物の機能を特異的に制御することは、遺伝性疾患や難治性疾患の有用な治療法として期待されている。米国を中心に盛んに研究開発が進められており、2018年8月には世界初の siRNA 医薬も承認され注目された。本邦でも同薬の承認が近いとされているほか、近年は国内企業における開発も本格

化している。

遺伝子・核酸医薬の開発において重要視されるものの1つが、標的組織・細胞への送達技術である。核酸の安定性・有効性を向上させる化学修飾技術のほかに、標的組織への安全かつ効率的な送達を可能とするドラッグデリバリーシステム(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、近年では物理的エネルギー(超音波・圧力・電気・磁力など)を利用した DDS 技術の研究も注目されている。なかでも超音波は、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・骨折など種々の疾患

^{*1)} Department of Drug Delivery and Molecular Biopharmaceutics, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

^{*2)} Laboratory of Drug and Gene Delivery Research, Faculty of Pharma-Sciences, Teikyo University

治療においてもすでに汎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)を誘導し、その際に細胞外の薬物・遺伝子が細胞内に導入されることが見出されている¹⁻³⁾。表1に示すように、治療分子に応じて、バブル製剤あるいは治療分子自体への工夫、また超音波エネルギー条件の最適化は必要であるものの、超音波とバブル製剤の併用は実用可能な汎用性の高い技術として疾患治療への応用に向けた研究開発が展開されている。

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。超音波セラノスティクスを実現していくためには、高解像度な造影を可能とし、かつ効率のよい薬物・遺伝子送達においても最適化された新規バブル製剤の開発が必要である。

筆者らは、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)修飾リポソームに眼科領域で使用されている眼内長期滞留ガス(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(リピッドバブル)を開発し、遺伝子・核酸導入ツールとしての有用性を報告してきた^{4,5)}。本稿では、リピッドバブルを利用した超音波による遺伝子・核酸導入法とその疾患治療への応用の可能性、セラノスティクス製剤としての展望について紹介する。

2. リピッドバブルと超音波併用による細胞への遺伝子・核酸導入

マイクロバブルの存在により、低強度および短時間の超音波照射で効率よく細胞膜透過性の亢進が起これ、低侵襲的に薬物・遺伝子の細胞内導入が可能となることが報告されている⁶⁾。リピッドバブルによる遺伝子導入においても、同様の現象が起きているものと考えられる。実際に、種々の培養細胞に対し、リピッドバブルとプラスミドDNA(pDNA)、またはsiRNAの混合溶液を添加し、直ちに超音波照射を行ったところ、10秒という極めて短時間の照射で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^{4,5)}。超音波エネルギーを利用した遺伝子・核酸導入において、その細胞内導入効果と傷害性には、超音波照射条件が大きく影響する。顕著な傷害性を示すことなく、高い遺伝子発現効果を得るためには、超音波照射条件の最適化が必須である。COS-7細胞に対し、リピッドバブルと超音波によるpDNAとsiRNAの導入を試みた際、pDNA導入に伴う遺伝子発現は超音波照射強度依存的に増大した。一方、siRNAによる抑制効果には照射強度による顕著な差は認められなかった。これはpDNAとsiRNAの分子サイズの違いに起因するものと考えられた。このように、導入する分子サイズのほかにも、導入細胞、併用するバブル製剤の種類(組成)などによっても超音波照射の至適条件が異なると考えられるが、その最適化を行うことで、リピッドバブルは種々の細胞・組織に対する有用な遺伝子導入ツールになると期待される。

遺伝子導入の基礎研究において汎用されている方

表1 バブル製剤と超音波併用システムによる DDS

治療分子	分子サイズ	送達効率	疾患治療システムへの応用
低分子医薬 合成低分子化合物			・血管透過性亢進による標的組織移行性の増強 ・難溶性化合物への適用の可能性
中分子医薬 ペプチド医薬 核酸医薬 etc.			・バブル製剤との併用により、標的細胞内あるいは組織への移行が可能であるが、さらなる向上には、治療分子の生体内安定性の向上や標的指向性の付与が鍵
高分子医薬 遺伝子医薬 抗体医薬 生理活性タンパク質 etc.			・バブル製剤との併用により、標的細胞内あるいは組織への移行が可能であるが、さらなる向上には、治療分子のサイズ制御に加え、安定化が鍵

法は、遺伝子とカチオン性化合物の複合体を形成させることで、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、リピッドバブルと超音波の併用による本導入法は、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が示された。また、導入細胞の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遺伝子が送達されることも確認された。市販の導入試薬を用いても導入効率が低いことが知られる初代培養細胞においても、本導入法による遺伝子導入効果が認められている。これらは、いずれも超音波の物理的エネルギーにより、遺伝子を瞬時に細胞内へと直接導入可能であるためと考えられる。よって、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、短時間でさまざま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。

3. リピッドバブルと超音波併用による動物組織への遺伝子・核酸導入

遺伝子治療を成功させるためには、遺伝子・核酸を標的細胞に効率よくかつ安全に導入することが重要である。リピッドバブルと超音波照射を併用した導入法の *in vivo* における有用性を評価するため、種々の組織への適用を試みた^{5,7-12)}。

骨格筋を標的とし、脛部筋組織にルシフェラーゼ遺伝子、あるいは GFP 遺伝子をコードした pDNA とリピッドバブルの混合溶液を筋肉内投与し、直ちに体外より超音波照射を行った。5日後、超音波照射部位である筋組織を摘出し、ルシフェラーゼ活性の測定、あるいは蛍光顕微鏡による観察を行った。その結果、pDNA 単独投与、pDNA とリピッドバブルの混合溶液投与、pDNA 単独投与と超音波照射の併用、いずれの群においても遺伝子発現に顕著な差異が認められなかったのに対し、pDNA とリピッドバブルの混合溶液投与と超音波照射を併用し

た群においては、有意に高い遺伝子発現が認められた⁷⁾。さらに、*in vivo* イメージングシステム (IVIS) による解析結果より、この遺伝子発現は超音波照射部位にのみ限局しており、ルシフェラーゼ発現は少なくとも4週間持続していることが示された。また、GFP および DsRed を発現させた脛部筋組織へ、siRNA (siGFP) をリピッドバブルと超音波照射の併用により導入し、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⁵⁾。

遺伝子・核酸とリピッドバブルの筋肉内投与と超音波照射による導入効果が得られたことから、さらに疾患治療における有用性を評価すべく、下肢虚血モデルマウス、筋ジストロフィーモデルマウスへの応用を試みた。下肢虚血モデルマウスに対し、治療用遺伝子として、血管新生に関与することが知られる塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の遺伝子をコードした pDNA を虚血筋組織へ投与し、直後に超音波照射を行った。その結果、bFGF タンパク質発現の増大に伴う血管密度の上昇や血流の回復が認められた⁷⁾。この治療効果は、骨格筋において産生分泌されたタンパク質により、血管新生因子がパラクライン的に血管内皮細胞に作用し、血管新生活性が惹起されたものと考えられる。また、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) モデルマウスに対し、エクソンスキッピング誘導法に利用されるアンチセンスオリゴヌクレオチドであるモルフォリノ (PMO) の導入を試みた。DMD 患者へのエクソンスキッピング誘導療法は、遺伝子配列に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞内に導入し、スプライシングの過程で変異のあるエクソンをスキップすることで、ほぼ正常に機能するジストロフィンタンパク質の発現を誘導して筋機能の改善を図るのである。国内でも臨床試験が進行中であり、初の国産核酸医薬として期待が寄せられている。筆者らは、DMD モデルマウスの筋組織へ PMO とリピッドバブルを投与し、超音波照射を併用することで、治療の効率化が図れるか否かについて検討した。その結果、PMO 単独投与群と比較して、エクソンスキッピング誘導効率の有意な上昇が認められた。さらに、広範囲かつ均一なジストロフィンタンパク質

発現と、それに伴う筋細胞膜強度の増加が認められ、治療効率を改善できることを明らかにした⁸⁾。本法は、DMD治療における有望なDDSとして重要視されるのみならず、他の疾患に対するアンチセンス医薬品への適用拡大も期待される。

さらに、前述のような骨格筋への導入効果と同様に、リピッドバブルとpDNAの混合溶液の局所投与と超音波照射の併用により、関節滑膜、舌組織においてもレポーター遺伝子の発現上昇が確認されている^{9,10)}。さらには、腫瘍モデルマウスに対し、抗腫瘍効果を誘導するサイトカインとして期待されるIL-12をコードしたpDNAを腫瘍組織内に導入することで、顕著な腫瘍増殖抑制効果が認められた¹¹⁾。以上の結果より、リピッドバブルと超音波照射の併用は、さまざまな組織に適用可能な遺伝子・核酸導入法であり、新たな疾患治療法開発に貢献する技術であると考えている。

4. 全身投与を介した遺伝子・核酸導入に適したリピッドバブルの開発

本導入法を種々の組織に適用するにあたり、各組織の体表面からの深度、構造、構成細胞などの違いにより、超音波の伝達性は異なると考えられる。そのため、標的組織により超音波照射条件、リピッドバブルや遺伝子・核酸などの投与量の最適化が必要となる。また、標的組織や標的細胞に応じた投与経路の検討も重要といえる。前項に示した結果においては、標的組織への直接投与による導入効果が認められた。しかしながら、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・核酸導入の場合、さらには、広範囲にリピッドバブルや遺伝子・核酸をいきわたらせる必要がある場合などには、血管を介した全身投与が有用と考えられる。血管内投与が可能となることで、リピッドバブルの超音波造影剤としての適用も広がるものと期待される。これまでに筆者らは、血管を介した遺伝子デリバリーシステムとして、マウス尾静脈からのリピッドバブルと遺伝子の投与と標的組織への超音波照射の併用を試み、効率導入に成功している。

リピッド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、体外より心臓または肝臓に超音波照射を施し、IVISによる解析を行ったところ、超音波照射部位において高い遺伝子発現が認められた¹²⁾。この遺伝子発現は、超音波照射部位に限局して誘導されていたことから、全身投与での適用においても本法は比較的容易に部位特異的な遺伝子導入が可能な方法となり得ることが示された。また、投与後わずかな時間の超音波照射で導入が完了するため、生体内で不安定な遺伝子を血管内投与した際にも高い効果が得られたものと考えられる。しかしながら、siRNAなどの低分子核酸は、より分解・排泄されやすいことから、さらなる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、リピッド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リピッドバブルと核酸の血管内挙動を一致させ得る新たなリピッドバブルの開発に着手した。

リピッドバブルへの核酸の搭載法として、次の2つの手法を検討した。コレステロール修飾核酸のコレステロールをリピッド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は、その修飾により投与後にHDLなどと結合することで生体内の安定性が向上することが知られている¹³⁾。コレステロール修飾siRNAのコレステロール基をリピッドバブル膜に組み込むことで、RNase存在下においても、コレステロール修飾siRNA単独よりも安定性が向上

図1 リピッドバブルへの核酸搭載法

することが明らかとなった¹⁴⁾。これは、リピッド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、内部に存在する siRNA はもちろんのこと、外表面に存在する siRNA においても、PEG により形成される水和相内に保持されていることで、RNase の影響を受けにくくなったためであると考えられた。この膜組み込み型のリピッドバブルと超音波照射を併用することで、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も認められた。一般的に、コレステロールの存在により膜の性質が変化することが知られているが、導入効果の得られた組み込み量(総脂質量に対し 0.4 mol%)では、超音波造影ガスの封入・保持には顕著な影響は認められなかった。しかしながら、容易にリピッドバブル膜への 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、カチオン性脂質を利用したリピッドバブルへの siRNA の搭載においては、超音波照射により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¹⁵⁾。本法では、リピッドバブル調製後に siRNA と相互作用させるため、搭載は外表面のみとなり、組み込み型と比較して搭載量の減少傾向がみられたものの、siRNA の配列ごとにリピッドバブルを再調製する必要もなく、利便性は高いといえる。さらに、静電的相互作用を利用していることから、siRNA に限らず負電性化合物のキャリアとして広く適用可能になるものと期待される。実際に、分子サイズの異なる pDNA や、同じく低分子核酸として近年治療への応用が期待されている miRNA のキャリアとして適用可能であることも明らかとした^{16~18)}。リピッドバブルの超音波造影ガスの封入および保持能、超音波造影能、遺伝子・核酸搭載能および導入能などは、カチオン性脂質の種類や組成比、調製溶媒により異なることも確認されているが、搭載を目的とする物質に応じてそれらの最適化を図ることで、有用なツールになるものと考えられる。

近年、マイクロバブルの基礎研究において、遺伝子・核酸を搭載可能なカチオン性マイクロバブルの研究が進められている^{19~21)}。しかしながら、こ

れらはいずれも 1~5 μm 程度と比較的サイズが大きく、組織深部への移行性が不十分となり、標的組織が限られる可能性が考えられる。一方、リピッドバブルは 500~800 nm 程度と非常に小さく、種々の標的への導入ツールとして有用であるといえる。遺伝子・核酸搭載型リピッドバブルの *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とされる pDNA (bFGF)、あるいは miRNA (miR-126) を搭載させたリピッドバブルの投与を試みた。その結果、いずれのリピッド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^{16~18)}。また、中性脂質で構成されたリピッド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、リピッド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つな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・核酸搭載リピッドバブルが造影剤として適用可能であることのみならず、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、リピッド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、本リピッドバブルは、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。

5. リピッドバブルと超音波による 血液脳関門オープニング

近年、超音波造影剤である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、一時的に血液脳関門 (BBB) の透過性が亢進することが報告されている (図 2)²²⁾。一般に、脳には異物侵入防御機構の 1 つである BBB が存在しているために、全身循環を介した脳内への薬物送達、

図2 超音波とマイクロバブルによる BBB オープニング

極めて困難とされている。既存の中枢神経疾患治療薬の脳への移行量はわずかといわれ、今後の画期的新薬開発には BBB 透過が大きな障壁となっている。このような背景のもと、マイクロバブルと超音波による BBB オープニングに伴う薬剤送達に期待が集まっている。2015年11月には、カナダの脳外科グループにより、集束超音波を経頭蓋的に照射し、マイクロバブルのオシレーションを利用して BBB 透過性を亢進させることで、抗がん剤を送達させる治療が報告された²³⁾。翌年にはフランスのグループからも、頭蓋内に固定した超音波デバイスを利用した BBB オープニングによる脳腫瘍治療効果が複数報告されている²⁴⁾。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。アルツハイマー病やパーキンソン病などの中枢神経疾患に対し、遺伝子治療も魅力的な治療手段となると考えられている。しかしながら遺伝子治療においては、血管内皮細胞以外を標的とする場合には、血管壁の透過のみならず、標的細胞内へと導入可能な戦略が必要不可欠となる。そこで筆者らは、リピッドバブルと FUS 併用による脳組織への遺伝子導入の検討に着手した。

はじめにリピッドバブルと FUS 併用によって、BBB の透過性亢進が可能か検討した。BBB の透過性評価には、リピッドバブルと FUS 処理に伴うエバンスブルーの脳実質組織への漏出を肉眼的かつ定量的な解析にて行った。エバンスブルーは、血管内投与後には速やかに血清アルブミンと結合し、BBB を透過しない。このことを利用し、リピッドバブル

と FUS 併用に伴う BBB 透過性の有無について、エバンスブルーの脳内蓄積量を指標に評価した。その結果、冠状断面の照射部位(右脳)のみにおいてエバンスブルーの顕著な蓄積が観察された²⁵⁾。さらにリピッドバブルと FUS 処理後一定時間後にエバンスブルーを尾静脈内投与したところ、3時間後の投与では、エバンスブルー蓄積量は低値を示していた。このことから、リピッドバブルと FUS 照射を併用することで、BBB の透過性の亢進が可能であり、それは一時的であることが示された。また、他の高分子化合物として、蛍光ラベル化したデキストランを用いて検討したところ、その透過量は分子量の大きさに依存し、少なくとも 2000 kDa の分子は透過可能であることが示された。以上のことから、本法によりさまざまな高分子化合物の脳内送達が可能となることが判明し、脳への治療分子デリバリーシステムとしての有用性を明らかとした。

次に、リピッドバブルと FUS 照射による遺伝子導入効果について検討した。リピッド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、右半球に FUS を照射した。24時間後に導入組織を摘出し、ルシフェラーゼ遺伝子発現を測定した結果、非照射側と比較して、照射部位に依存した遺伝子発現が観察された。さらに、IVIS により全身におけるルシフェラーゼ遺伝子発現領域を観察した。その結果、*in vivo* および *ex vivo* での解析により、遺伝子発現は FUS 照射領域に制限されていることが明らかとなった。一方、FUS 非照射の場合では、ほとんど発現は観察されなかった。以上の結果より、リピッドバブルと FUS の併用法が、脳組織への pDNA の効率的な遺伝子導入を促進させる有用なツールとなると期待される。

脳へのさらなる導入効率化を目指し、リピッドバブルの表面修飾ペプチドとして、脳組織への集積性が知られる Angiopep-2 ペプチド (Ang2) に着目した²⁶⁾。調製した Ang2 修飾リピッドバブルは、*in vitro* の検討において受容体特異的な脳血管内皮細胞との相互作用性を示し、IVIS による解析においても、投与後の脳への集積が認められた²⁷⁾。さらに、ペプチド修飾による超音波造影能への影響はな

く、コントロールペプチド修飾リピッドバブル投与時と比較し、若干の造影輝度の増強が確認された。Ang2修飾リピッドバブルの有用性が確認されたことから、カチオン性脂質含有リピッドバブルに Ang2修飾を施し、核酸の搭載と標的組織への集積のいずれも可能とするリピッドバブルを調製した。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、さらにルシフェラーゼをコードした pDNA を搭載させ、FUS との併用によりその遺伝子導入効果を評価したところ、コントロールペプチド修飾リピッドバブルと比較し、脳組織における有意に高い遺伝子導入効果が得られることが明らかとなった。

上述の結果より、リピッドバブルに標的指向性を付与することで、疾患部位の超音波造影効果の向上、さらに導入の駆動力となるバブルの集積が可能となり、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ものと考えられる。また、標的指向性と核酸の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核酸の集積に寄与し、治療効率の改善につな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。

6. 治療用超音波の現状と展望

超音波は、非侵襲的、小型で簡便、比較的低コスト、かつリアルタイムの診断造影が可能であり、すでに幅広い領域で必要不可欠な診断手法となっている。さらに、治療用機器としても適用されており、低侵襲的に繰り返し利用可能であるため、セラノスティクスシステムに有望な物理エネルギーとして注目されている。近年、その進歩は目覚ましく、超音波ガイド下、あるいは MRI ガイド下において、コンピューター制御により、体外から標的部位に数 mm 単位で超音波エネルギーを集束可能な高密度集束超音波(HIFU)は、肝がん、前立腺がん、乳がん、

図3 現在用いられている治療用超音波機器と対象疾患

子宮筋腫などの焼灼療法として臨床応用されている。また、患部近辺での血栓溶解剤投与と超音波照射を可能とする超音波治療カテーテル装置も、欧米ですでに脳梗塞、肺塞栓症、深部静脈血栓症などの治療に利用されている。2016年には、本態性振戦の治療において、経頭蓋集束超音波装置が認可され、国内でも治験が進められている(図3)。このように、超音波診断・治療は広く普及し、開発も盛んに行われているが、残念ながら DDS に関する研究はその域まで進んでいない。また超音波造影剤においても、本邦ではレボピストが2016年より供給が停止されており、ソナゾイドが肝腫瘤性病変、乳房腫瘤性病変に使用されるのみであり、臨床医にはバブル製剤の開発が望まれている。超音波セラノスティクスの実現には、診断にも治療にも適したバブル製剤の開発が必要不可欠である。

筆者らが開発してきたリピッドバブルは、診断用超音波(数~15 MHz)の照射により、心臓、下肢、脳、腫瘍組織など、種々の組織における造影能を有することを確認している。今後も、DDS製剤としての機能のみならず、超音波造影能も有するバブル製剤の開発を進めていきたい。

7. おわりに

以上、本稿では、リピッドバブルと超音波を利用したセラノスティクスと遺伝子・核酸デリバリーの

図4 高機能化したリポッドバブル

可能性について紹介した。難治性疾患における画期的治療法として遺伝子・核酸治療が切望され、盛んに研究されているものの、それを可能とする有用なDDSの開発が大きな課題となっている。今回紹介したリポッドバブルは、種々の疾患部位に対する遺伝子・核酸導入における重要なツールになり得るものと考えられる。また筆者らは、本稿で紹介したAng2以外にも、機能性ペプチド、あるいは抗体を修飾した数種のターゲティングバブルの開発にも成功しているほか、搭載核酸の複合体化による細胞選択性の付与も試みており、種々の疾患に対する遺伝子・核酸治療効率の増強を目指している(図4)。今

後は、ターゲティングバブルと超音波を併用することで、厳密な時間的・空間的制御を可能とする有用なセラノスティクスシステムの開発につなげていきたいと考えている。

謝辞

本研究遂行にご協力いただいた昭和大学歯学部歯周病学教室 山本松男先生、菅野真莉加先生、東京医科大学病院消化器内科 森安史典先生、杉本勝俊先生、超音波照射に関する技術的なご指導をいただいた福岡大学医学部解剖学教室 立花克郎先生、ネッパジーン株式会社 早川靖彦氏、鈴木孝尚氏に感謝申し上げます。また本研究の遂行においてご協力いただきました東京薬科大学薬物送達学教室の学生諸子に御礼申し上げます。なお、本研究の一部は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)(Industrial Technology Research Grant Program(04 A05010))、日本学術振興会研費：萌芽研究(18650146、25560240、16K12916)、基盤研究(B)(20300179、23300193、18H03552)、若手研究(B)(21790164、24790173)、研究活動スタート支援(17H07128)の研究助成により遂行されたものであり、ここに深甚なる誠意を表します。

文献

- 1) Tachibana K., *et al.*, *JPN. J. Appl. Phys.*, **38**, 3014-3019(1999)
- 2) Lawrie A., *et al.*, *Gene Ther.*, **7**, 2023-2027(2000)
- 3) Unger E.C., *et al.*, *Echocardiography*, **18**, 355-361(2001)
- 4) Suzuki R., *et al.*, *J. Control. Release*, **117**, 130-136(2007)
- 5) Negishi Y., *et al.*, *J. Control. Release*, **132**, 124-130(2008)
- 6) Taniyama Y., *et al.*, *Circulation*, **105**, 1233-1239(2002)
- 7) Negishi Y., *et al.*, *Pharm. Res.*, **28**, 712-719(2011)
- 8) Negishi Y., *et al.*, *Mol. Pharm.*, **11**, 1053-1061(2014)
- 9) Negishi Y., *et al.*, *J. Drug Deliv.*, **2011**, 203986(2011)
- 10) Sugano M., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **422**, 332-337(2012)
- 11) Suzuki R., *et al.*, *J. Control. Release*, **142**, 245-250(2010)
- 12) Maruyama K., *et al.*, *Yakugaku Zasshi*, **127**, 781-787(2007)
- 13) Soutschek J., *et al.*, *Nature*, **432**, 173-178(2004)
- 14) Negishi Y., *et al.*, *J. Drug Target.*, **19**, 830-836(2011)
- 15) Endo-Takahashi Y., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **422**, 504-509(2012)
- 16) Negishi Y., *et al.*, *Mol. Pharm.*, **9**, 1834-1840(2012)
- 17) Endo-Takahashi Y., *et al.*, *Biomaterials*, **34**, 2807-2813(2013)
- 18) Endo-Takahashi Y., *et al.*, *Sci. Rep.*, **4**, 3883(2014)
- 19) Panje C.M., *et al.*, *Theranostics*, **2**, 1078-1091(2012)
- 20) Rychak J.J., *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **72**, 82-93(2014)
- 21) Fan C.H., *et al.*, *Sci. Rep.*, **6**, 19579(2016)
- 22) Hynynen K., *et al.*, *Radiology*, **220**, 640-646 (2001)
- 23) World first: blood-brain barrier opened non-invasively to deliver chemotherapy, <http://sunnybrook.ca/media/item.asp?c=1&i=1351&page=33939&f=blood-brain-barrier-focused-ultrasound-chemo>(最終閲覧日：2019年1月8日)
- 24) Carpentier A., *et al.*, *Sci. Transl. Med.*, **8**, 343re2(2016)
- 25) Negishi Y., *et al.*, *Pharmaceutics*, **7**, 344-362(2015)
- 26) Demeule M., *et al.*, *J. Neurochem.*, **106**, 1534-1544(2008)
- 27) Endo-Takahashi Y., *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 977-983(2016)