

12. 抗癌剤封入バブル製剤と超音波照射による癌治療・診断

川上 茂

Key words : ドラッグデリバリーシステム, がん治療,
超音波, マイクロバブル製剤, ターゲティング

*長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科
医療科学専攻 展開医療薬学講座
医療情報解析学分野

緒 言

新しい創剤技術, 画期的新薬の開発, 薬物治療の高度化においては, 薬物体内動態の精密制御, 至適化を可能とする高機能化された新しいドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術の開発, 導入が不可欠である. また, がん微小環境が生み出すがん組織の heterogeneity の制御ががん治療において重要視されており, 中でも, 腫瘍関連マクロファージは, 転移, 癌免疫, 血管新生などががん増殖において中心的な役割を担うものの, 有効な DDS の開発は進んでいない. 近年, 国内外において DDS 領域では, 生体障壁を回避し感染するウイルスなどが持ち得ない機能として, 超音波や光などの外部刺激に応答するナノ DDS による精密なピンポイントでのターゲティングの実現が大きく注目されている. がんをターゲットとした薬物デリバリー法は, 抗がん剤をピンポイントでがん細胞へ送達させることにより, 少ない投与量で安全かつ効果的ながん化学療法を可能にする.

外部刺激の中でも超音波は, 診断のみならず治療への広い応用が期待されている. 高感度な診断や効率の良い治療のためには, 機能性マイクロバブル製剤の開発が重要である. 本研究では, 抗がん剤封入マイクロバブル製剤を開発し, 腫瘍部位への超音波照射による外部刺激に基づき, 疾病の標的部位において薬理作用の増強が可能となる超音波応答性 DDS の開発を行った.

方 法

ドキシソルビシン封入マイクロバブル製剤 (DLMBs) の調製: クロロホルムに溶解した 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DSPG), ならびに *N*-(Carboxymethyl)polymethacrylate (CMC) をモル比 7 : 2.5 で混合し, クロロホルムを減圧下留去し, デシケーター中において真空下で一晩乾燥させた. 最終脂質濃度が 3 mg/ml となるようにドキシソルビシンを溶解させた 5% グルコース溶液を加え 60 分間, 65 °C で攪拌した. 次に, 5 ml バイアルに移し, パーフルオロプロパンガスをバイアル中に充満させ, 密封した. 最後に良く攪拌することで, DLMBs を得た.

超音波エコー特性の測定: Vevo 2100 (Visual Sonic 社, カナダ) を用いて *in vitro* ならびにマウスメラノーマ B16BL6 細胞を皮下移植して作製した担がんモデルマウスを用いて評価を行った. 細胞取り込み特性の評価: B16BL6 細胞へのドキシソルビシン取り込み特性について共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon 社) を用いて観察した.

B16BL6 細胞に対する細胞毒性の評価: MTT アッセイにより評価を行った.

臓器中ドキシソルビシン濃度の定量: 臓器を摘出し, ホモジナイズを作製後, 酸性条件下でイソプロパノール抽出を行い, ドキシソルビシンの蛍光を測定した.

抗腫瘍効果および副作用の評価: 担がんモデルマウスの腫瘍径の測定ならびに体重測定を行った. プロトポルフィリン IX (PpIX) 封入マンノース修飾バブルリポソーム (ManBL) の調製: クロロホルムに溶解した 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DSPC), PEG2,000-DSPE-mannose 誘導体¹⁻⁴⁾ をモル比 94 : 6, 総脂質 : 薬物のモル比 10 : 1 の割合で混合し, 過去の我々の報告の手順にしたがって調製した¹⁻⁴⁾.

*現所属: 長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 医療科学専攻 展開医療薬学講座 医薬品情報学分野

マンノースレセプターを発現するマウスマクロファージ由来細胞株 RAW264.7 細胞に対する細胞毒性：WST8 アッセイにより評価を行った。

細胞内取り込みの評価：PpIX の自家蛍光について共焦点レーザー顕微鏡で観察した。細胞内活性酸素の産生：蛍光プローブ DCF-DA を用い共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

物理化学的性質の測定：Zetasizer Nano ZS (Malvern 社, ドイツ) を用いて, 平均粒子径ならびに ζ 電位を測定した。

結 果

調製した DLMBs の平均粒子径は 1,022 nm, ζ 電位は 0.0031 mV であった。超音波造影ガスであるパーフルオロプロパンガスの封入量はドキソルビシンの添加量の増大に伴い増加がみられた。DLMBs の超音波エコー特性は、水溶液中において 10 分後でもみられた。一方、治療用超音波照射を行ったところ、バブル製剤の崩壊がみられ、40~60 秒後において超音波エコー特性は完全に消失した。次に、B16BL6 細胞への取り込みを共焦点レーザー顕微鏡により観察した。DLMBs (超音波非照射) の添加においては、ドキソルビシンの蛍光はほとんどみられなかったが、超音波照射を併用したところ、高い細胞取り込みがみられた (図 1)。

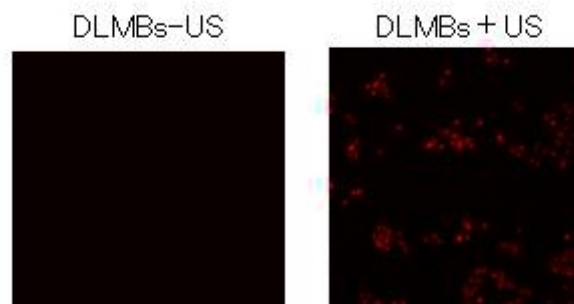


図 1. B16BL6 細胞へのドキソルビシン取り込み特性。

DLMBs-US (超音波非照射) 群と DLMBs + US (超音波照射) 群で比較した。超音波照射を行うことでドキソルビシンの高い細胞取り込みが認められた。

次に、細胞毒性を評価したところ、DLMBs 添加群 (超音波非照射群) に比べ、超音波照射を併用した群では、有意に高い細胞毒性が認められた。また、臓器中ドキソルビシン濃度に関して、腫瘍、心臓、肝臓を対象として検証を行った。腫瘍への超音波照射により、腫瘍中におけるドキソルビシン濃度の有意な増加がみられたが、心臓ならびに肝臓中のドキソルビシン濃度は、DLMBs 照射群 (超音波非照射群) と同程度であった。また、腫瘍径の経日変化を測定したところ、DLMBs 照射群 (超音波非照射群) ではごく僅かな腫瘍増大抑制効果が、DLMBs 投与と超音波照射併用群では、有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。副作用の指標となる体重の減少はいずれの群でも有意な差はなく、対照の非処置群と同程度の体重の増加がみられた⁹⁾。一方、PpIX 封入 ManBL の平均粒子径は 454.2 nm であった。RAW264.7 細胞における細胞障害性は、PpIX 封入 ManBL と超音波照射の併用群で有意に高い値を示した。また、PpIX の細胞取り込みを共焦点レーザー顕微鏡で調べたところ、PpIX 封入 ManBL (超音波非照射) ではほとんど取り込みが認められなかったものの、超音波照射と併用することで、高い PpIX の細胞取り込みがみられた。最後に、細胞障害性のメカニズムを検討するために、細胞内活性酸素種の発生を調べたところ、PpIX 封入 ManBL に比べ、PpIX 封入 ManBL と超音波照射の併用では、より多くの細胞で活性酸素種発生を示す蛍光が認められた。

考 察

超音波造影ガスの脂質粒子への封入は難しく、安定封入には脂質粒子を構成する脂質組成の選択が重要な因子である。我々は、これまでの検討により、PEG2000-DSPE により水溶性高分子 PEG2000 の微粒子表面への導入が必要であること、相転移温度の高い飽和脂肪酸、例えば、*N,N,N*-Trimethyl-2,3-di(stearoyloxy)propane-1-aminium (DSTAP)¹⁻⁴⁾、1,2-distearoyl-sn-glycero-3-dimethylammonium propane (DSDAP)^{5,6)}、DSPG^{7,8)} 等を組み合わせて膜流動性の低い微粒

子を調製することで、物理化学的性質の異なる様々なバブル製剤が調製できることを報告してきた。これらの情報を基に DLMBs の製剤設計を行った。今回調製した DLMBs は、ドキシソルビシンの添加量の増大に伴い超音波造影ガス封入量が増えたことから、ドキシソルビシンによりバブル製剤が安定化したものと考えられる。これは負電荷を有する DSPG と正電荷を有するドキシソルビシンが静電的相互作用による安定な微粒子膜の形成に寄与したものと推察される。また DLMBs は、超音波エコーによる検討から、超音波造影が可能であることが示された。一方、治療用超音波照射により速やかに造影機能が消失したことから、外部刺激により DLMBs 製剤の急速なバブル崩壊によるキャビテーションが誘導されていることが示唆された。局所によるキャビテーション誘導は、DLMBs と腫瘍への超音波照射の併用群において、腫瘍内におけるドキシソルビシン濃度が有意に高かったことや有意な腫瘍増殖抑制効果がみられたこととも良く対応するものである。また、DLMBs と腫瘍への超音波照射の併用群において肝臓や心臓におけるドキシソルビシン濃度の増大がみられなかったことから、DLMBs からのドキシソルビシンの放出は、腫瘍局所において限局されていたことが示唆される。このことは、DLMBs と超音波照射の併用群において、有意なマウス体重の減少効果が認められなかった結果とも良く対応するものである。このように、腫瘍への超音波照射による外部刺激を利用して腫瘍の抗がん剤濃度のみを増加させることができる本 DDS は、抗がん剤の適正使用において重要であると考えられる。

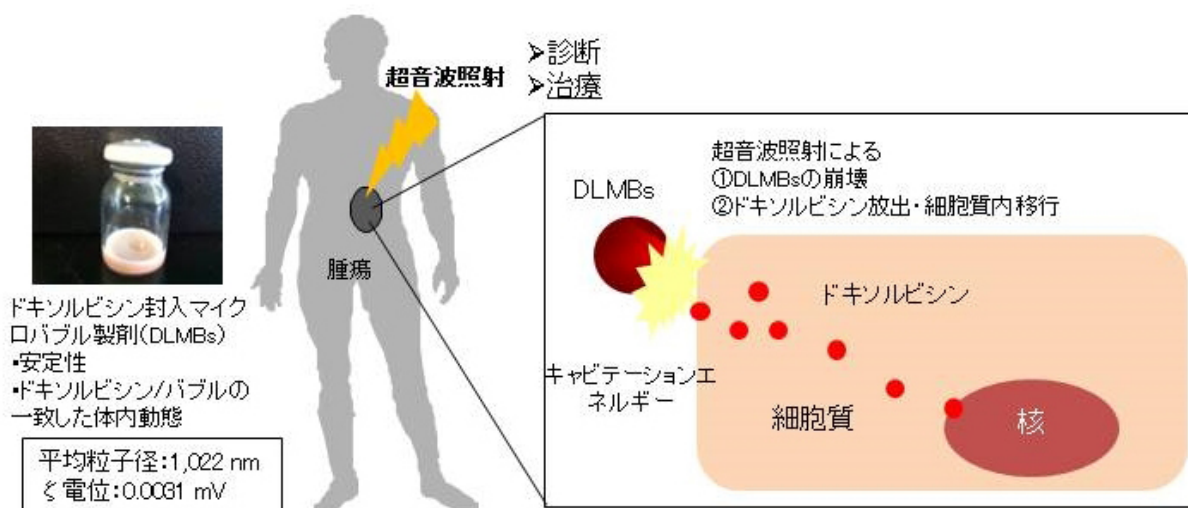


図2. 抗癌剤封入バブル製剤と超音波照射による癌治療・診断。

体外から照射した超音波により DLMBs が崩壊し、キャビテーションエネルギーによる一過性の細胞穿孔により放出されたドキシソルビシンの細胞内移行が促進される。

以上、本研究において開発した DLMBs は、超音波によるがんの診断・治療において有効な DDS 製剤となる可能性が示された (図2) 9)。

超音波増感剤は、超音波照射による活性酸素種の結果、細胞障害性を発揮させることができると考えられている。腫瘍関連マクロファージは、がん治療において重要な標的細胞である。腫瘍関連マクロファージには、マンノースレセプターが高発現しているため、ManBL による細胞認識能を利用することで高い薬理効果が期待できると考えた。そこで、PpIX 封入 ManBL の開発を行った。PpIX 封入 ManBL は、これまで我々が報告した ManBL とほぼ同じ平均粒子径を示し、PpIX 封入は粒子径に影響を及ぼさないことが示された。また、本研究において PpIX 封入 ManBL と超音波照射の併用により、マクロファージにおいて有意に高い PpIX 細胞内取り込みと細胞障害性がみられた。また、細胞障害メカニズムを検討したところ、PpIX 封入 ManBL と超音波照射の併用では、高い細胞内活性酸素の発生がみられ、その関与が示唆された。以上、腫瘍関連マクロファージを標的とした超音波増感剤による細胞死誘導の可能性が示された。超音波照射装置の開発は非常に進んでおり、今後、超音波による診断・治療法の開発を進めていく上では、標的指向性を有する高機能なバブル製剤の開発が鍵を握ると考えられる 10)したがって、今回得られた超音波応答性 DDS に関する知見は、超音波を利用した新しいがんに対する診断・治療法の開発において有益な基礎的情報を提供するものと期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、帝京大学薬学部の丸山一雄、京都大学大学院薬学研究科の樋口ゆり子および九州保健福祉大学薬学部の和田光弘である。

文 献

- 1) Un, K., Kawakami, S., Suzuki, R., Maruyama, K., Yamashita, F. & Hashida, M. : Development of an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier for DNA vaccine therapy. *Biomaterials*, **31** : 7813-7826, 2010.
- 2) Un, K., Kawakami, S., Yoshida, M., Higuchi, Y., Suzuki, R., Maruyama, K., Yamashita, F. & Hashida, M. : The elucidation of gene transferring mechanism by ultrasound-responsive unmodified and mannose-modified lipoplexes. *Biomaterials*, **32** : 4659-4669, 2011.
- 3) Un, K., Kawakami, S., Higuchi, Y., Suzuki, R., Maruyama, K., Yamashita, F. & Hashida, M. : Involvement of activated transcriptional process in the efficient gene transfection using unmodified and mannose-modified bubble lipoplexes with ultrasound exposure. *J. Control. Release*, **156** : 355-363, 2011.
- 4) Un, K., Kawakami, S., Yoshida, M., Higuchi, Y., Suzuki, R., Maruyama, K., Yamashita, F. & Hashida, M. : Efficient suppression of ICAM-1 using ultrasound-responsive and mannose-modified lipoplexes inhibits acute hepatic inflammation. *Hepatology*, **56** : 259-269, 2012.
- 5) Kono, Y., Kawakami, S., Higuchi, Y., Maruyama, K., Yamashita, F. & Hashida, M. : Tumour-associated macrophage targeted NF-kappaB decoy transfection with mannose-modified bubble lipoplexes inhibits tumour growth in tumour bearing mice. *J. Drug Target.*, **22** : 439-449, 2014.
- 6) Kono, Y., Kawakami, S., Higuchi, Y., Maruyama, K., Yamashita, F. & Hashida, M. : Anti-tumor effect of NF-kappaB decoy transfer by mannose-modified bubble lipoplex into macrophages in mouse malignant ascites. *Cancer Sci.*, **105** : 1049-1055, 2014.
- 7) Kurosaki, T., Kawakami, S., Higuchi, Y., Suzuki, R., Maruyama, K., Sasaki, H., Yamashita, F. & Hashida, M. : Development of anionic bubble lipopolyplexes for efficient and safe gene transfection with ultrasound exposure in mice. *J. Control. Release*, **176** : 24-34, 2014.
- 8) 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*, **10** : 1829-1838, 2014.
- 9) Abdalkader, R., Kawakami, S., Unga, J., Suzuki, R., Maruyama, K., Yamashita, F. & Hashida, M. : Evaluation of the potential of doxorubicin loaded microbubbles as a theranostic modality using a murine tumor model. *Acta Biomater.*, **19** : 112-118, 2015.
- 10) Kawakami, S. & Hashida, M. : Glycosylation-mediated targeting of carriers. *J. Control. Release*, **190** : 542-555, 2014.