

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22791673

研究課題名（和文）：リポソームを併用した前眼部への遺伝子導入・薬物送達法の評価法の開発

研究課題名（英文）：Evaluation of gene transfer and drug delivery with liposome to anterior segment of eyes

研究代表者：内野 英輔 (UCHINO EISUKE)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：20398275

研究成果の概要（和文）：drug delivery や gene transfer の手段として超音波に micro bubble や bubble liposome を併用することでより効率的に遺伝子や薬物の導入が可能になった。その効果を定量的に評価することを目的として研究を行った。既に in vitro で得られた至適条件とほぼ同様の超音波照射条件が薬物、遺伝子の細胞内の取り込みに適していることがわかった。また眼組織の超音波照射に最適なプローブの形状に関する知見を得た。

研究成果の概要（英文）：By using ultrasonic irradiation with microbubbles uptakes of materials into cells increase than ultrasonic irradiation alone. Our aim is to evaluate the efficacy of ultrasonic irradiation to anterior ocular segment. We found optimal conditions of ultrasonic irradiation in vitro / in vivo, and suitable shape of ultrasonic probe.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 眼科学

キーワード：薬理学 マイクロ・ナノデバイス 超音波

## 1. 研究開始当初の背景

効果的な **drug delivery** や **gene transfer** の手段として、低エネルギーの超音波を利用した方法が注目されている。超音波照射時に発生する小さな気泡が細胞に当たることにより一時的に膜透過性が亢進し、細胞周囲の物質が効率的に取り込まれることを応用した方法である。さらにマイクロバブルを併用することにより、超音波照射単独よりも細胞への物質の取り込みが増加することが知られている。

*in vitro* の実験系、マウス、ラット、ウサギの眼球を用いた *in vivo* の実験系のいずれでも、超音波によって網膜の細胞内に遺伝子や薬物が導入可能であること、マイクロバブルの併用で導入効率が向上する (Sonoda S, Uchino E, et al, 2006, IOVS)。

さらに **bubble liposome** を使用することでより効率的に遺伝子や薬物の導入が可能になった。**bubble liposome** とは **PEG-liposome** にガスを封入したもので、外壁に **polyethylene glycol** が付加されており、その末端に様々な修飾を施すことができる。

これまで、角膜上皮細胞や前房内、網膜組織などの眼組織を対象として、低エネルギーの超音波照射と **bubble** を利用することで薬物や遺伝子が細胞内に導入・送達されることを証明してきた。しかしながら、角膜や前房水とい

った標的組織からは非常に微量のサンプルしか採取することができないため、通常の方法では測定できるサイトカインやタンパクの種類が限定されてしまう。そのため **drug delivery** や **gene transfer** の効果を定量的に評価することが非常に困難な状況であった。

## 2. 研究の目的

2005年-2006年度の科学研究費補助金によって確立した、ごく微量の涙液から多種類のサイトカインを同時に測定することのできる手技を応用して、**drug delivery** や **gene transfer** の効果を定量的に評価することを主たる目的とし、具体的には以下の項目を設定した。

- ① 低エネルギーの超音波照射および **Bubble liposome** を併用して、より効率的かつ安全に前眼部への **drug delivery** ・ **gene transfer** を可能にする方法を確立する。
- ② **drug delivery** と **gene transfer** による前眼部組織への効果を評価する方法を確立する。
- ③ 前眼部の難治性疾患への臨床応用の足がかりをつくる。

## 3. 研究の方法

これまで、角膜上皮細胞、前房内、網膜組織、癌組織を対象に、超音波と **bubble** を利用することで薬物・遺伝子

が細胞内に導入されることを証明し、その改訂で組織障害を起こすことなく効果的に薬物導入を行うことのできる超音波の照射条件や bubble 濃度の条件の知見を得てきた。これをもとに drug delivery、gene transfer 後のサイトカインや各種タンパクの定量を行う。

① 培養ヒト角膜上皮細胞での薬物送達の評価

薬物付加 bubble liposome を培養ヒト角膜上皮細胞に添加した後、至適条件で超音波を照射する。一定時間後に cytometric bead array を用いて同時に多種類のサイトカインの培養上清中の濃度を測定した。

② 培養ヒト角膜上皮細胞での遺伝子導入の評価

本法は薬物遺伝子に置き換えて利用することも可能であるため GFP plasmid を利用して、bubble liposome と GFP plasmid を培養ヒト角膜上皮細胞に添加した後に 10-20 秒、1W/cm<sup>2</sup> を中心にした条件で超音波を照射した。その後 GFP 遺伝子の導入効率を検討した。

③ in vivo での bubble liposome 併用超音波照射の評価

in vitro で培養角膜上皮細胞などの眼組織を対象として得られた知見をもとに、マウス眼球の前房内に薬物付加 bubble liposome / 遺伝子付加 bubble liposome を注射したあとに、10 - 20 秒、1 W/cm<sup>2</sup> を中

心にした条件で超音波の照射をおこなった。一定時間後に摘出した眼球組織や前房水の微量サンプルから、cytokine の定量をおこなった。

④ 超音波プローブの形状や発振方法、付加薬物および遺伝子の濃度と超音波発振の至適条件の決定

ここまでの研究結果を踏まえて、超音波の照射範囲、角度、duration、power、超音波プローブ先端の適切な大きさや形状など、眼球前眼部への超音波照射にとってもっとも適切な条件についての方向性を決定する。また、in vivo の前眼部組織における、遺伝子、各種薬物のもっとも効率的に導入できる適切な濃度についても検討する。

4. 研究成果

in vitro ならびに in vivo において、低エネルギー超音波照射、bubble liposome 併用効果の検討を行った結果、これまで我々が網膜組織や角膜組織に行って得られた超音波照射の至適条件とほぼ同様の照射条件（10 - 20 秒、1 W/cm<sup>2</sup>）が薬物、遺伝子の細胞内の取り込みに最も適しているという結果が得られた。さらに、眼組織の超音波照射に最適な超音波プローブの形状に関する知見を得た。

以上の結果から、bubble liposome を併用して低エネルギー超音波照射を行うことで薬物や遺伝子を効率的に細胞内に送達するためにもっとも適切と考

えられる諸条件を明らかにすることができた。今後超えるべきハードルはまだまだ高いと考えられるが、将来の難治性前眼部疾患に対する臨床応用への足がかりとなると考えている。

#### 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 1 件)

- ① Sonoda S, Tachibana K, Yamashita T, Shirasawa M, Terasaki H, Uchino E, Suzuki R, Maruyama K, Sakamoto T.

Selective gene transfer to the retina using intravitreal ultrasound irradiation, Journal of Ophthalmology、査読有、412752. Epub 2012 Jan 31

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

内野 英輔 (UCHINO EISUKE)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号 : 20398275