

超音波刺激応答型リポソームを用いたドラッグデリバリーシステムの構築

河端伸哉¹・仁宮一章²・清水宣明²

¹〒920-1192 金沢市角間町 金沢大学

²〒920-1192 金沢市角間町 金沢大学環日本海域環境研究センター

Shinya KAWABATA¹, Kazuaki NINOMIYA² and Nobuaki SHIMIZU²:

Development of novel drug delivery system with ultrasound-mediated thermosensitive liposomes

1. 緒言

がん治療法の一つに抗がん剤を用いた化学的療法があるが、副作用による患者への負担が大きいことが問題となっている。これは十分量の抗がん剤をがん組織に送達させるためには、抗がん剤の大量投与が必要となり、正常な組織に対しても作用してしまうためである。この問題を解決するために、抗がん剤を効率よくがん組織のみに送達させることが不可欠であり、その方法として薬剤投与の最適化を目指した技術・方法論であるドラッグデリバリーシステム(DDS)を導入した治療法が、新規のがん治療法として検討されている。しかし従来の DDS 治療では、臨床において十分な治療効果を得ることが困難とされていた。

近年、より高効率で副作用の少ない次世代型 DDS 治療として、光・超音波・磁気などの物理エネルギーを利用した治療システムと抗がん剤の DDS 治療とを融合させたピンポイント抗がん剤投与システムが提案されている。この治療システムでは従来の DDS 治療と比較して、①物理エネルギーによって薬剤効果が増強される、②薬剤効果を空間的に制御できる、③薬剤効果を時間的に制御できるといった利点があり、より選択的に標的細胞を狙い撃ちでき、非侵襲的ながん治療が可能となる。

本研究では、非侵襲的ながん治療を目指した DDS 治療として超音波刺激応答型 DDS の構築を目的とする。我々は超音波照射に伴い発生する超音波キャビテーションによる局所的な温度上昇に注目した。そこで温度応答性高分子を修飾したリポソームを作製し、超音波照射時の薬剤放出機能について評価した。また構築した超音波刺激応答型リポソーム系の *in vitro* での抗腫瘍効果について検討した。

2. 理論

2.1 リポソーム

リポソームとは、生体膜成分であるリン脂質によって構成され、内側に水相をもつ脂質二分子膜(ラメラ構造)で形成される小胞体である(Fig.1)。リポソームには薬剤キャリアとして、①毒性がほとんどなく、抗原性が低い、②様々な表面修飾が容

易であり、標的化が簡単に行える、③生体で代謝される、④薬剤だけでなく遺伝子なども封入できるといった利点が挙げられる。

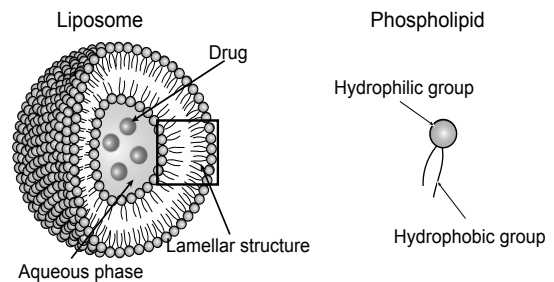


Fig.1 Structure of phospholipid and liposome.

2.2 温度応答性高分子

温度応答性高分子とは、ある温度によって性質を変える高分子をいう。低温では親水性で水に溶解するが、下限臨界溶液温度(LCST)と呼ばれる温度以上になると疎水性となり不溶化して白濁・沈殿する(相転移現象)。Fig.2 にその様子を示す。この温度応答性高分子を利用して、温度応答機能を付加したリポソームを作製することができ、内包物の放出を温度によって制御することが可能となる。

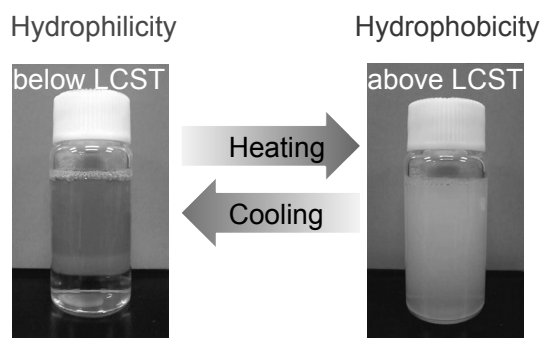


Fig.2 Phase transition of thermosensitive polymer.

3. 実験

3.1 温度応答性高分子修飾リポソームの作製

本研究では、超音波刺激に応答するナノキャリアを作製するために、リポソームの膜表面に温度応答性高分子を修飾させた。まず凍結乾燥リン脂

質(DMPA:DPPC:Chol=10:40:50(モル比))20 mg、温度応答性高分子 2C₁₂-poly(NIPAM-co-NIPAM)20 mg に、薬剤モデルとして蛍光試薬である 10 mM カルセイン溶液 500 μ l を混合し、これを 4°C で 3 時間攪拌する。攪拌後、遠心分離(20000 rpm, 40 min, 25°C)によって洗浄し、未内包のカルセインと未反応の温度応答性高分子を除去し、カルセインを内包した温度応答性高分子修飾リポソーム(TSP-Lipo)を得た。

温度応答性高分子の修飾を確認するため、ブロックインキュベータを用いて 25~42°C の範囲で 15 分間加温した。加温後、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて、カルセインの蛍光強度(Ex:490 nm, Em:520 nm)を測定することにより、温度による内包物の放出制御を評価した。

3.2 温度応答性高分子修飾リポソームの超音波応答性

薬剤放出機能の評価

リポソーム懸濁液を PBS で OD₅₄₀=1.0 となるように希釈し、希釈した懸濁液 1 ml に PBS 1 ml をさらに加え、35 mm dish に添加し、超音波(1 MHz, 100% Duty 比, 30 sec)を任意の強度(0.1~0.5 W/cm²)で照射した。照射後、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて、カルセインの蛍光強度(Ex:490 nm, Em:520 nm)を測定することで、超音波による内包物の放出制御を評価した。

超音波照射時の溶液温度の測定

PBS 2 ml を 35 mm dish に添加し、サーモメータを dish の溶液中にセットし、温度が安定するまで待つ。温度が安定したことを確認し、超音波(1 MHz, 100% Duty 比)を任意の強度(0.1~0.5 W/cm²)で照射し、照射開始時から 120 sec まで 10 sec 毎に温度を測定した。

3.3 Doxorubicin 内包超音波刺激応答型リポソームの作製

本研究では、抗がん剤として協和発酵より発売されているアドリアシン[®]注用 10 を用いた。

まず Doxorubicin(DOX)10 mg を生理食塩水 5 ml で溶解し、2 mg/ml DOX 溶液を作製し、凍結乾燥リン脂質 20 mg、温度応答性高分子 20 mg に、2 mg/ml DOX 溶液 500 μ l 加え、これを 4°C で 3 時間攪拌する。攪拌後、遠心分離(20000 rpm, 40 min, 25°C)による洗浄を 3 回行い、未内包の DOX と未反応の温度応答性高分子を除去し、DOX 内包超音波刺激応答型リポソーム(TSP-Lipo)を得た。

3.4 超音波照射条件の検討

超音波照射によって放出した DOX 量

作製したリポソーム懸濁液を生理食塩水で希釈

し、35 mm dish に 2 ml 添加する。このとき、リポソーム懸濁液に内包されている DOX 濃度は約 20 μ M に調整した。超音波(1 MHz, 100% Duty 比, 30 sec)を任意の強度(0~0.5 W/cm²)で照射した。照射後、遠心分離(15000 rpm, 20 min)し、上澄みの吸光度を測定(測定波長:480 nm)し、検量線から放出した DOX 濃度を求めた。

超音波照射単独の細胞損傷効果

4 \times 10⁵ cells/dish となるように 35 mm dish に 2 ml ずつ細胞懸濁液を播種し、37°C、5%CO₂ で 24 時間培養した。培養後、新しい培地に交換し、超音波(1 MHz, 100% Duty 比, 30 sec)を任意の強度(0~0.5 W/cm²)で照射し、24 時間培養した。培養 24 時間後の生細胞数をトリパンブルー染色により測定した。

フローサイトメトリーによる DOX の定量化

4 \times 10⁵ cells/dish となるように 35 mm dish に 2 ml ずつ細胞懸濁液を播種し、37°C、5%CO₂ で 24 時間培養した。培養後、新しい培地(リポソーム懸濁液を遠心分離し、上澄みを取り除いた後、培地 1 ml で懸濁)を 2 ml 添加した。このときリポソーム懸濁液に内包されている DOX 濃度は約 20 μ M に調整した。超音波を 1 MHz, 0.5 W/cm², 100% Duty 比, 30 sec で照射した。照射後 30 min と 60 min、フローサイトメーターを用いて細胞内へ取り込まれた DOX 量を定量した(Ex:514.5 nm, Em:550 nm)。

3.5 超音波刺激応答型リポソーム系の *in vitro* での抗腫瘍効果

4 \times 10⁵ cells/dish となるように 35 mm dish に 2 ml ずつ細胞懸濁液を播種し、37°C、5%CO₂ で 24 時間培養した。培養後、新しい培地(リポソーム懸濁液を遠心分離し、上澄みを取り除いた後、培地 1 ml で懸濁)を 2 ml 添加した。このときリポソーム懸濁液に内包されている DOX 濃度は約 20 μ M に調整した。超音波を 1 MHz, 0.5 W/cm², 100% Duty 比, 30 sec で照射した。照射後 60min に PBS(-)で 2 回洗浄し、新しい培地 2 ml 添加し、6 時間培養した。培養 6 時間後の生細胞数をトリパンブルー染色により測定した。

4. 結果および考察

4.1 温度応答性高分子修飾リポソームの作製

作製した TSP-Lipo に温度応答性高分子が修飾されているかを確認した。その結果を Fig.3 に示す。温度応答性高分子を添加し作製した TSP-Lipo では LCST(37.5°C)を超えた温度でカルセインの放出が確認された。さらに温度が高くなるに伴い、カルセインの放出は増大した。しかし、温度応答性高分子が修飾されていないリポソーム(Lipo)では、同じように加温した場合であってもカルセインの放出は見られなかった。以上の結果から、作製した TSP-Lipo に温度応答性高分子が修飾され

ていることが確認できた。

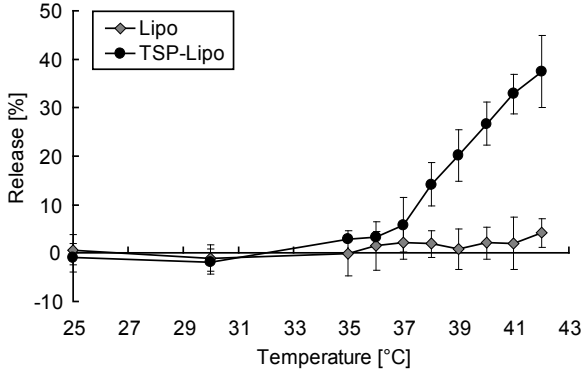


Fig.3 Release of calcein from liposome with increase in temperature

4.2 温度応答性高分子修飾リポソームの超音波応答性

薬剤放出機能の評価

作製した TSP-Lipo の超音波応答性について評価した。その結果を Fig.4 に示す。超音波照射 0.1 W/cm² の場合、TSP-Lipo、Lipo 両方ともにカルセインの放出はほとんど見られなかった。しかし 0.2 W/cm² 以上の超音波照射によって、Lipo と比較して TSP-Lipo からカルセインの放出が増大していることが確認できる。また照射強度の強さに比例して TSP-Lipo の放出率は増大しているが、Lipo の放出率は照射強度の強さによって放出率が增大することはなかった。以上の結果より TSP-Lipo は超音波刺激にตอบสนองし、内包物を放出することが示唆された。

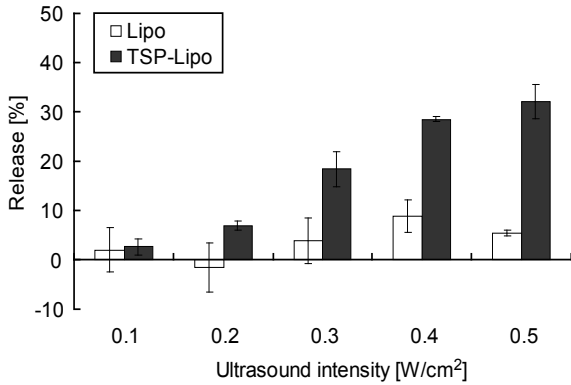


Fig.4 Increase in release of calcein by U.S. irradiation.

超音波照射時の溶液温度の測定

超音波キャビテーションによる局所的な温度上昇の他に、超音波照射時の超音波エネルギーが溶液中で熱エネルギーへと変換するため、超音波照射によって溶液温度が上昇する。そこで、超音波照射時にリポソーム懸濁液の溶液温度が LCST を上回っているかどうかを調べた。その結果、Fig.5 に示すように今回実験を行った照射条件下では、照射時間の増加に伴い温度は上昇したが、溶液の

温度が LCST に達することはなかった。以上の結果から超音波照射による TSP-Lipo から内包物の放出は、キャビテーションバブル圧壊時に形成される局所的な高温場によって、温度応答性高分子の相転移が起こり、リポソームが崩壊したと考えられる。

TSP-Lipo の超音波応答性が確認されたので、これ以降の実験では、TSP-Lipo のことを超音波刺激応答型リポソームと呼ぶことにする。

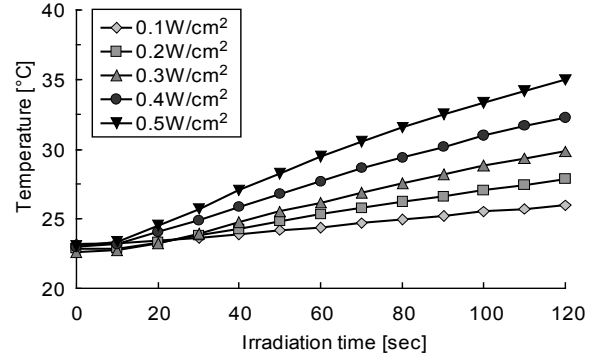


Fig.5 Temperature of solution rise during U.S. irradiation

4.3 DOX 内包超音波刺激応答型リポソームの作製

抗がん剤 DOX を内包した TSP-Lipo の熱応答性について評価した。その結果を Fig.6 に示す。LCST 以上の 42°C で加温した場合、TSP-Lipo から DOX を約 80% 放出したことから、蛍光試薬カルセインを用いた実験系と同様、DOX を内包した TSP-Lipo においても温度応答性高分子が修飾されていると考えられる。しかし、カルセインの実験系ではカルセインの放出が見られなかった Lipo から約 30% の放出が見られた。さらに LCST 以下の 37°C で加温した場合も、TSP-Lipo と Lipo の両方で約 20% の放出が見られた。本来ならば DOX の放出が起こらない温度、そして Lipo から DOX の放出が見られたことから、DOX がリポソームから漏出した可能性が考えられる。

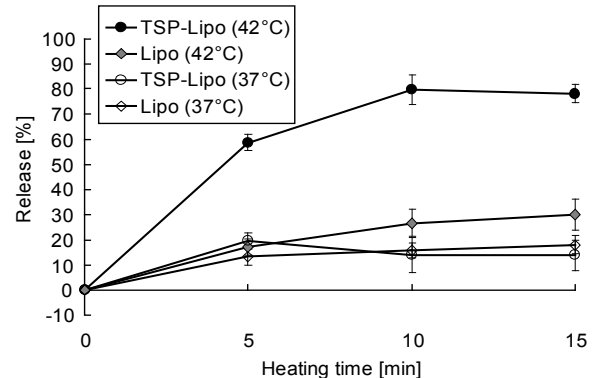


Fig.6 Time course of doxorubicin release

4.4 超音波照射条件の検討

超音波照射によって放出した DOX 量

DOX 内包超音波刺激応答型リポソームへ超音波照射を行い、dish に放出される DOX 濃度について評価した。その結果を Fig.7 に示す。対照(0 W/cm²)は超音波を照射せず、振動子の上に 30 sec 放置したグループであるが、dish には約 2 μM の DOX が放出されていた。リポソーム懸濁液に内包されている DOX 濃度は約 20 μM なので、10%の DOX は超音波を照射しなくても漏出したことになる。照射強度 0.3 W/cm² までは DOX の放出量に大きな差は見られなかったが、0.4 W/cm² 以上では TSP-Lipo の方が Lipo と比べて約 2 μM 以上多く DOX が放出した。

超音波照射単独の細胞損傷効果

培養細胞 HepG2 に対する超音波単独の細胞損傷効果について確認した。その結果を Fig.8 に示す。対照(0 W/cm²)は超音波を照射せず、振動子の上に 30 sec 放置したグループである。照射強度が 0.1 W/cm² や 0.2 W/cm² では細胞の生存率はほぼ 100% であり、細胞死は誘導されなかった。しかし 0.3 W/cm² 以上の照射強度において生存率の低下が見られたが、0.5 W/cm² で超音波照射を行った場合でも生存率が約 70% だったことから、照射強度の増強によって生存率が極端に低下するという事はなかった。

以上の結果から、超音波刺激応答型リポソーム系の *in vitro* での抗腫瘍効果を行うための照射条件を 1 MHz、0.5 W/cm²、100% Duty 比、30 sec とした。

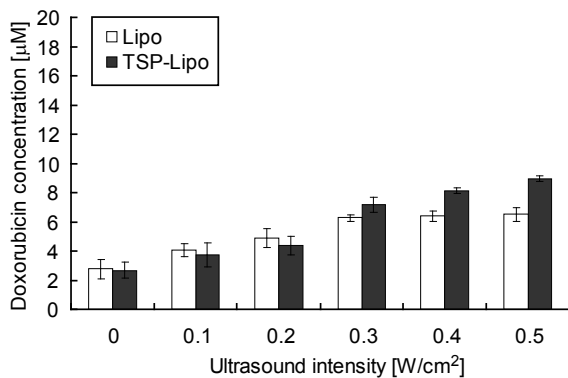


Fig.7 Effect of ultrasound intensity on doxorubicin release. U.S. was irradiated for 30 sec.

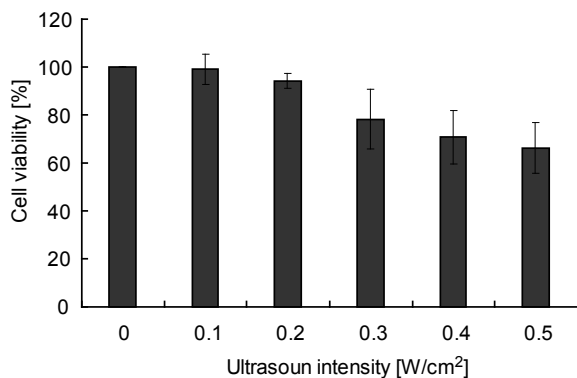


Fig.8 Effect of ultrasound intensity on cell viability. U.S. was irradiated for 30 sec.

フローサイトメトリーによる DOX の定量化

超音波照射によって細胞への薬剤の取り込みが促進することが知られている。そこでフローサイトメーターを用いて、決定した照射条件の超音波照射によって細胞内に取り込まれた DOX 量を蛍光として評価した。照射後 30 min の結果を Fig.9(A)に、60 min の結果を Fig.9(B)に示す。照射後 30 min では、DOX を内包したリポソームで処理した 4 つのグループのヒストグラムはすべて重なっていた。この結果から、30 min では超音波照射による DOX の取り込みを促進させるのに十分な時間ではなかったと考えられる。

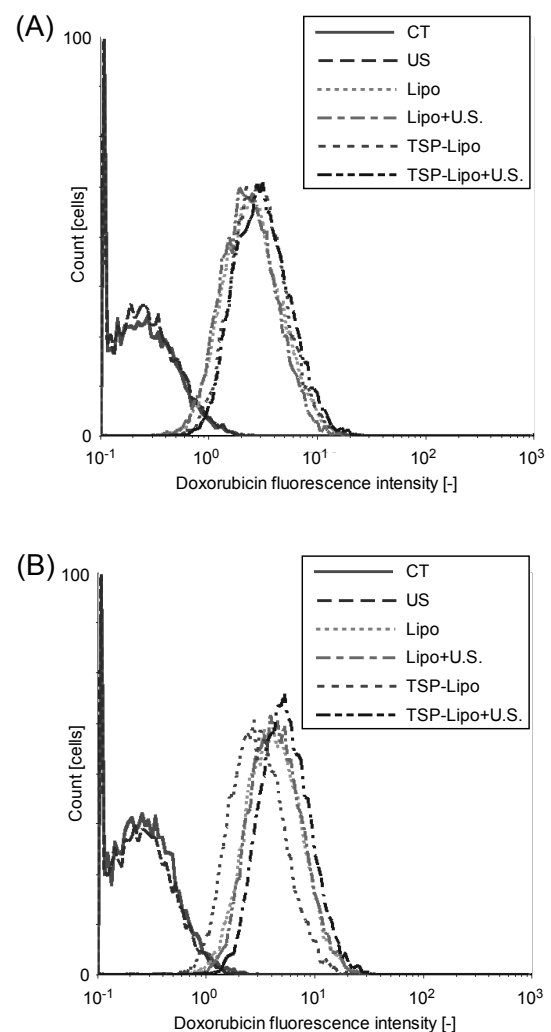


Fig.9 Flow cytometric measurements of DOX uptake at (A)30 min or (B)60 min after U.S. irradiation.

照射後 60 min では、TSP-Lipo+U.S.のヒストグラムが最も右にシフトしているのがわかる。これは超音波照射によって DOX の取り込みが促進した

ためと考えられる。しかし、同じように超音波を照射した Lipo+U.S.では Lipo のヒストグラムと重なっていた。これらの結果から、Lipo に超音波照射を行っても、DOX の取り込みが促進することはなく、TSP-Lipo に超音波照射を行い、照射後 60 min で他の処理法と比べて有意に細胞内へ DOX を取り込ませることが可能であった。

4.5 超音波刺激応答型リポソーム系の *in vitro* での抗腫瘍効果

最も抗腫瘍効果が期待できる条件下で超音波刺激応答型リポソームの抗腫瘍効果について検討した。結果を Fig.10 に示す。培養 6 時間において TSP-Lipo+U.S.で処理することで最も高い抗腫瘍効果を示した。Lipo、Lipo+U.S.、TSP-Lipo では約 80 ~ 85% の生存率だったのに対して、TSP-Lipo+U.S.は約 60%と生存率が大幅に低下した。これは TSP-Lipo+U.S.で最も細胞内に取り込まれた DOX 量が多かったため、アポトーシスが速やかに誘導され、培養 6 時間という短い時間で高い抗腫瘍効果が得られたと考えられる。

詳しいメカニズムは明らかとなっていないが、①超音波刺激応答型リポソームに超音波照射を行うことで大量の DOX を放出できる、②放出した DOX を超音波照射によって細胞内へ取り込ませる、以上超音波照射による相乗効果によって、HepG2 細胞内に DOX が大量に取り込まれ、アポトーシスを早期に誘導させたと考えられる。

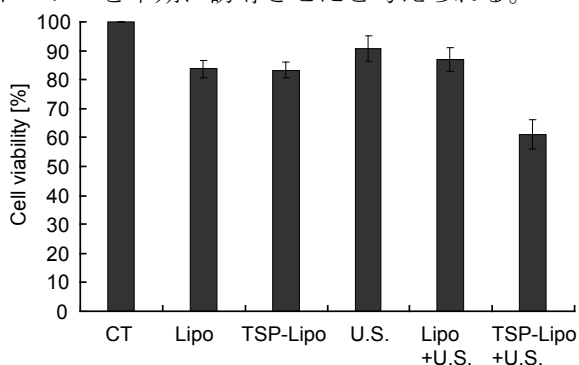


Fig.10 Cell viability of HepG2 exposed to U.S. and TSP-Lipo.

5. 結言

本研究によって得られた知見を以下に示す。

- 1) 超音波刺激応答型ナノキャリアとして、リポソームの膜表面に温度応答性高分子を修飾した温度応答性高分子修飾リポソームの作製に成功した。
- 2) 作製した温度応答性高分子修飾リポソームは超音波照射により内包物の放出を制御できることを確認した。
- 3) 超音波照射による内包物の放出には、キャビテーションバブル圧壊時の局所的な温度上昇が関与している可能性が示唆された。
- 4) 抗がん剤ドキシソルビン塩酸塩を封入したリポソームを作製し、構築した超音波刺激応答型リポソーム系の *in vitro* での有効性を確認した。

今後、超音波刺激応答型リポソーム系の *in vitro* での抗腫瘍効果について詳細なメカニズムを解析する必要がある。また、より選択的な治療を可能にするための技術として、作製した超音波刺激応答型リポソームへターゲティング機能を付加する必要がある。