

## 論文の内容の要旨

論文題目 選択的細胞内気泡化による非侵襲超音波がん治療

氏名 石島 歩

腫瘍に集中的に治療薬を送達するドラッグデリバリーシステム(DDS: Drug Delivery System)は、がん治療を効果的に行う手法として注目を集めている。しかしながら、化学的作用と薬剤のサイズ制御のみで薬剤を患部に送達する仕組みでは、従来の薬物治療による副作用の解消、患者のQOL (quality of life)向上、がん根治の効果に限界がある。また、放射線、超音波、レーザーを用いた物理エネルギーによる治療では病巣部のみを破壊することは困難である。そこで、近年では薬剤により細胞レベルでの標的を行い、薬剤を物理エネルギーによって活性化させることで、従来の物理エネルギーを利用した組織レベルの治療法を細胞レベルにまで落とし込む、ダブルターゲティング治療が注目されている。これにより細胞レベルの高度な標的選択性、物理エネルギーと薬剤の相乗効果、治療効果の空間的及び時間的制御性が期待されている。薬剤活性を行う物理エネルギーとして、超音波は、生体構造の複雑さに起因する音響特性の不均質性による位相乱れの効果が小さく、疾患部においてコヒーレントな集音を行うことが可能となる。さらに、位相制御(ビームフォーカシング)によってsub-mm – mmオーダの空間分解能で照射領域を制御することが可能である。この超音波に対する応答性を備えるナノ粒子として、相変化ナノ液滴(PCND: phase-change nano-droplet)が知られている。PCNDはPFC (perfluorocarbon)が脂質膜で覆われた液滴で、EPR (enhanced-permeability and retention)効果によって腫瘍血管外に到達することが可能である。さらに、超音波が照射されることによって液滴状態からマイクロバブルに気泡化する特性を有する。これらの特性を利用して、PCNDの薬剤運搬体や造影剤への利用が試みられてきた。そして、能動標的分子

と抗がん剤をPCNDに搭載させることで、標的細胞への細胞膜標的、気泡化による薬剤放出を実現し、がん治療法としての有用性が先行研究で示されてきた。

一方で、選択的に標的細胞内部へPCNDを導入して気泡化させることで、高い細胞傷害効果が得られ、薬剤を含まない形で、気泡化作用のみを用いたがん治療が実現可能であると期待される。選択的細胞内気泡化を実現する構成要素は超音波、PCND、能動標的分子の3つである。抗体などの能動標的分子をPCNDに修飾し、標的化PCNDによって、がん細胞選択的なPCNDの標的を実現する。エンドサイトーシスによって、PCNDが細胞内に移行し、超音波照射によって細胞内で気泡化し、細胞傷害作用を引き起こす。さらに、細胞内気泡化によって抗原性を有する物質が細胞外へ放出され、免疫系が活性化されることで、腫瘍免疫作用による長期間および全身性の抗腫瘍効果が期待される。そこで、本研究の目的を、標的化PCNDと超音波を用いた選択的細胞内気泡化による非侵襲がん治療法の実現とする。第2章では、細胞内気泡化に用いるPCNDの超音波応答性及び気泡化挙動に関して基礎検討を行う。第3章では、標的化PCNDの標的性能を*in vitro*で検証する。第4章では、選択的細胞内気泡化の細胞傷害作用に関する検討を*in vitro*で行う。第5章では、本研究により明らかとなった細胞内気泡化の有効性をもとに、がん治療における有用性、臨床応用への課題や発展性について議論する。

第2章ではPCNDの気泡化挙動を高速度観察し、生成気泡の気泡寿命を測定することによって、標的化PCNDとして使用する高沸点PCNDの超音波応答性及び生成気泡挙動解析を行った。加えて、PCNDの内部組成と周囲温度を変化させ、生成気泡の気泡寿命制御について検討した。PCNDは内部がPFCの液滴で、安定性や気泡化しやすさなどは内部PFCの沸点が影響を与えている。先行研究において、広く用いられている内部組成はPFP (perfluoropentane)で、その沸点は29°Cである。37°Cにおいて準安定な状態で存在しているため、超音波に対する応答性は高いが、細胞内に導入した場合には、超音波を照射せずとも自発的に気泡化してしまうことが懸念される。一方で、57°Cの沸点を有するPFH (perfluorohexane)や、沸点40°CのPFPとPFHを1:1で混合した液滴は過熱状態にないため、超音波に対する応答性は悪いが、自発的に気泡化してしまうことはない。そこで、安全性の観点から、細胞内気泡化に用いるPCNDとして高沸点PCNDが有用と考える。しかしながら、気泡化挙動に関する先行研究は低沸点PCNDのものが多く、細胞内気泡化に高沸点PCNDを用いるには、まず、高沸点PCNDの超音波応答性(気泡化の有無、気泡寿命)を評価する必要がある。評価方法としては気泡化の高速度撮影が有用であることが先行研究において示されている。そこで、細胞内気泡化に用いる高沸点PCNDの超音波応答性および生成気泡挙動解析を行うことを目的とし、周囲温度と沸点の関係を変動させ、過熱状態PCNDと過熱状態にないPCNDについて、気泡化の高速度観察、生成気泡寿命の測定を行った。沸点の異なる三種類のPCNDを異なる周囲温度条件において、超音波照射を行い(5 MHz, 5サイクル, 最大負圧7.3 MPa), 高速度撮影した(1 Mfps, 101枚)。周囲温度が37°Cにおいて過熱状態にないPCNDは、高速度撮影結果より、パルス条

件(5 cycle)において気泡化可能であり、気泡寿命は10  $\mu$ s以下であった。一方で、過熱状態にあるPCNDに由来した生成気泡は、安定して気泡のまま存在し続けた。PCNDが過熱状態であるか否かが生成気泡の寿命に大きく影響を与え、周囲温度を変化させることで気泡寿命を制御可能であった。パルス超音波によって、高沸点PCNDは気泡化することから、細胞内気泡化を引き起こすPCNDとして機能することが考えられた。

第3章では標的化PCNDの標的性能に関する評価を行うことを目的に、PCNDと抗 EREG (epiregulin)抗体である9E5を組み合わせた9E5修飾PCNDを作成し、フローサイトメトリ解析による標的性能の定量的評価実験及び共焦点顕微鏡観察による細胞内移行の評価実験を行った。まず、標的化PCNDの構成について簡単に説明する。PCNDとして、内部組成比率がPFPとPFHの1:1であるビオチン化PCNDを使用した。上記の内部組成を選定した理由は熱に対する安定性と超音波に対する応答性を担保するためである。9E5を能動標的およびPCNDの細胞内導入を実現するために用いた。EREGは上皮成長因子受容体(EGFR: epidermal growth factor receptor)のリガンドであり、脂質アンカー膜タンパク (pro-EREG)として存在し、タンパク分解開裂を経て溶液中に解離される。9E5のPCNDへの修飾にはビオチン-ストレプトアビジン-ビオチン結合を用いた。EREGの発現レベルが高い細胞(DLD1)と低い細胞(AGS)の二種類を用いて、それぞれの細胞に対する標的性能を評価した。共焦点顕微鏡観察によって、1-3 hで9E5修飾PCNDはDLD1細胞内に移行し、細胞内でPCNDが凝集した様子が観察された。フローサイトメトリによる9E5修飾PCNDの標的性能の定量的評価によって、98%のEREG高発現がん細胞に対して選択的に9E5修飾PCNDが細胞内移行することが明らかとなった。

第4章では標的化PCNDの選択的細胞内気泡化の細胞傷害作用に関する検討を行うことを目的とし、細胞内気泡化による傷害作用の可視化、細胞内気泡化の傷害作用の選択性評価、細胞内気泡化と細胞外気泡化の傷害効果の比較評価を*in vitro*で行った。構築した高速度撮影系を用いて、細胞内気泡化の高速度観察を行い、がん細胞破壊現象を可視化した。さらに、構築した超音波照射系を用いて最大で94%のがん細胞を傷害可能であることを示した。また、細胞内気泡化と細胞外気泡化の傷害作用の比較を通して、細胞内にPCNDを導入することで、PCNDの気泡化音圧閾値が低下することを示した。さらに、細胞内気泡化によって、標的細胞からのATP (adenosine triphosphate)とHMGB1 (high-mobility group box 1)の放出が確認された。ATPとHMGB1はDAMPs (damage-associated molecular patterns)として知られ、腫瘍免疫反応を促進させる効果を有する。よって、細胞内気泡化は全身性抗腫瘍効果を有する可能性があり、原発巣に対する局所療法としてのみならず、転移がんに対する抗腫瘍効果が期待される。

本論文では、標的化PCNDと超音波を用いた、薬効が機械的作用である選択的細胞内気泡化による非侵襲がん治療法の実現に向けて、*in vitro*での選択的細胞内気泡化の原理検証を行い、本手法の有効性を示した。今後、臨床応用可能な治療技術として確立するためには、動物モデルにおける細胞内気泡化の有効性と安全性を検証する必要がある、

他にも多くの課題が残されている。これらの課題を解決することによって、細胞内気泡化治療が新規超音波がん治療技術として多くの患者を救い、医療の発展に貢献することを期待する。