

タイトル：がん治療における標的超音波造影剤によるアポトーシスの誘導

著者：Lauren J. Jablonowski, Averie M. Palovcak, and Margaret A. Wheatley, PhD
(Pharmaceutical Engineering, 2014, vol 34, No 4, p70-80)

翻訳：京都大学大学院医学研究科 薬剤疫学分野 博士研究員
栗原 亮介 (Ryohsuke KURIHARA)

本稿は、特異的リガンドを結合した超音波造影剤のがん細胞標的能を調査する概念実証研究について述べる。これは学生のポスター発表の研究である。

アメリカがん協会によると、2013年に、約35%が死に至る新しいがんの症例が160万人以上で診断されると予測されている¹。悪性腫瘍の治療には多くの課題が存在する。腫瘍は、変形して漏出する腫瘍血管、高い細胞密度、腫瘍組織の異常な組成および構造、細胞外マトリックスの組成、およびリンパ排液構造の欠如を含む複数の原因から生じる高い間質圧によって特徴付けられる²⁻³。これらの課題を克服するため、我々は以前、超音波 (ultrasound; US) 照射時にナノ粒子、つまり nanoshards (n-Sh)、に砕け散り、その薬剤充填断片が腫瘍内部へ向かう、マイクロバブルから成る薬剤充填超音波造影剤 (Ultrasound Contrast Agents; UCA) を開発した⁴⁻⁸。我々の基盤となるシステムとしてマイクロサイズのUCAを用いる利点は、腫瘍血管において超音波ビームによってUCAに働く放射圧が、慣性キャビテーションによって引き起こされるUCA崩壊に伴う力と共に、UCAを漏れやすい細孔に向かって押し出し、効率的な治療的送達を目的とした腫瘍内へのn-Sh放出が期待できることである。本研究では新たな戦略として、がん細胞表面受容体に結合することで致命的な結果を生じさせる標的化リガンドを用いたこれらの薬剤の機能化を検討する。これは、UCA表面に腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand; TRAIL) を結合することで達成できる。重要な仮説は、TRAIL結合UCA薬剤の超音波促進 *in situ* 慣性キャビテーションが、腫瘍標的TRAILを持つ機能化されたn-Shを産生することである。血管系を出て、がん細胞表面受容体に結合すると、TRAILは標的治療を目的とした経膜シグナル伝達を介して細胞のアポトーシスを起こす。

定着腫瘍において、急速な血管形成のため、直径が 100~780 nm の細孔を持つ漏出性の毛細血管の発達が複数の研究で示されている²。リンパ排液の欠如に加え、血管拡張剤、一酸化窒素および血管内皮増殖因子のような腫瘍特異的な血管作用因子は、循環しているナノ粒子の腫瘍間質内への蓄積を促進し、このプロセスは血管透過性・滞留性亢進 (Enhanced Permeability and Retention; EPR) 効果と呼ばれる。9名の研究者が薬物治療にEPRを利用する方法を研究している^{2, 10, 11}。しかしながら、全体的にEPRの確実性は、遅い蓄積 (最大6

時間までの)、そして腫瘍のタイプごとに一致しない血管透過性の度合により限定されてしまい、かつ、EPR 効果を示さないいくつかの腫瘍においては完全に除外されてしまう¹¹⁻¹³。したがって、多くの研究は、固形腫瘍への薬物送達に対して別の標的方法の開発に焦点を当てており^{3,14,15}、本研究では、リガンドターゲティングおよび集束超音波によるターゲティングの両方を検討する。

腫瘍の受動的ターゲティングは、受容体特異的リガンドを用いた能動的ターゲティングによって増強することができる。一方これは、血管系から薬剤充填輸送体の漏れを妨げる障壁、細胞表面の受容体に対する高い親和性リガンドの十分な提示および結合、および標的薬剤の内在化で遭遇する問題を含む、いくつかの課題が存在している¹³。また、がん細胞を破壊するために用いられる生物活性種の選択はもう一つの重要な要因であり、しばしば多剤耐性 (Multi-Drug Resistance; MDR) の出現によって無効化されてしまう高い毒性の生物活性種がもちいられる。しかし、がん細胞において独自にアポトーシスを誘導する特定の因子またはリガンドは、標的化および治療の両方の役割を果たすことで、これらの問題を回避する。そのようなリガンドの1つが TRAIL であり、いくつかのがん細胞のグループにおいて選択的に細胞死を誘導するが、正常細胞では細胞死を誘導しない。特に、TRAIL 感受性がん細胞は、細胞表面上に細胞死のための膜透過アポトーシスシグナルを核へ伝達する細胞死受容体 (DR4 / TRAIL-R1 および DR5 / TRAIL-R2) を発現している。しかし、正常細胞はこのシグナルを伝達しないデコイ受容体 (DcR1 および DcR2) を発現しており、このがん治療から正常細胞を効果的に保護する¹⁶⁻²²。臨床試験において TRAIL は、原因として示唆されている2つの機序の可能性のために予想を下回る働きであった^{16,23}。1つ目は、バイオアベイラビリティが正常細胞上のデコイ受容体への非有効的な吸着のため小さくなることである。2つ目は、一部のがん細胞株では、先天的または後天的な TRAIL 耐性の問題があり、有効性が限定されることである²⁴。また、いくつかの研究ではこの耐性を克服する方法を検討しており、TRAIL のアポトーシス活性を促進することができるプロテアソーム阻害剤や他の薬剤などの化合物を同定している²⁵⁻³⁰。TRAIL の非特異的結合活性に対処するため、本研究では主要なターゲティング技術として、通常用いられるリガンドターゲティングで見られるようながん細胞表面受容体への TRAIL 結合によって補強した、腫瘍部位特異的な超音波ターゲティングの使用を検討する。細胞死は、それに引き続いて、TRAIL 結合の直接の結果として生じる。

我々の研究室では、ダブルエマルジョンプロセスによってポリ乳酸 (polylactic acid; PLA) から作製した、超音波照射時のエコー輝度が高い、中空ポリマーマイクロスフェアを開発した^{7,31-35}。これらの PLA UCA は直径がおよそ 1–2 μm の球状で、*in vitro* において低濃度 (すなわち 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で評価した場合、およそ 20 dB のエコー輝度になる^{7,32,33}。また、医療撮影範囲内の超音波で薬物充填 UCA を粉砕でき、その断片 (n-Sh) は孔径が 400 nm の膜を透過することが示されている^{4,35}。これらの n-Sh を動的光散乱を用いて測定すると平均サイズは 350 nm であった^{4,35,36}。したがって、これらの結果は、特に入射した超音波ビ

ームによって細孔が拡大される場合、結果として生じた断片が血管新生腫瘍血管で見られる漏れやすい細孔 (< 400 nm 細孔直径) を強制的に透過できることを示唆している³⁷⁻³⁹。提案する結合 TRAIL を用いた超音波誘導 UCA を基礎とする送達機構を図 1 に示す。

提案されたメカニズムは、超音波に暴露されると UCA はキャビテートし、崩壊して n-Sh になるというものである。これは我々の実験的証拠によって裏付けられている^{4, 35, 36}。図 1 に示すように、UCA は超音波ビームに照射され血管壁に向かって押し出される音響放射力を受けるまで、血管系内を自由に通過する (1)。超音波ビームの振動波は、UCA ガスコアが圧力の変化にตอบสนองして膨張・収縮するため、キャビテーションを引き起こす (2)。十分に強い超音波パルスに曝された場合、UCA は慣性キャビテーションを受け、ポリマーシェルの破壊 (すなわち粉碎された UCA) (3) および n-Sh の *in situ* 生成をもたらす。UCA 破壊プロセスで放出されるエネルギーは血管壁の透過性を増強するのに十分である (4)。そして、断片を血管壁を透過させ固形腫瘍組織内部へ押し進める慣性キャビテーションに起因するマイクロバブルが崩壊した際に生じるマイクロジェットおよび剪断力の発生により、n-Sh は腫瘍間質に集積する (5)。そこで n-Sh が分解すると同時に、結合 TRAIL は細胞表面受容体に結合しアポトーシスの信号を送ることができる (6)。UCA を更に改良することで、ポリマーシェル内に生物活性分子を共にカプセル化することができ n-Sh の分解に応じて、持続的に局所に放出して、耐性を克服するための物質を送達するメカニズムを提供する。

本研究は、標的リガンド TRAIL でコートした UCA の開発について述べる。これらの薬剤は、腫瘍部位でアポトーシスを誘導する死細胞受容体を標的とする TRAIL 結合 n-Sh を生成する潜在力を持っている。成功した場合、これらの UCA は、現在の化学療法が抱えるバイオアベイラビリティの減少や全身毒性および MDA を含む多くの障害を克服することができる薬剤となり、その結果、固形悪性腫瘍患者らにより一層貢献するであろう。

方法

超音波造影剤 (UCA) の調製

UCA は既に確立した水/油/水 (w/o/w) エマルションプロセス⁷を用いて調製した。簡単に述べると、10 mL の塩化メチレン、0.05 g の樟脳、および 0.5 g の PLA (100 DL 7E, Evonik, Birmingham, AL) を 50 mL のビーカーに加え、ポリマーを完全に溶解させるため 15 分間攪拌した。そして、1 mL の 0.4 M カルバミン酸アンモニウム溶液を有機相へ加え、氷上で 30 秒間、3 秒のパルス間に 1 秒停止で超音波処理 (Misonix XL2020) した。そして、最初のエマルションを 4°C に保った 50 mL の 5% ポリビニルアルコール (poly(vinyl alcohol); PVA) (25 kDa, 88% mol hydrolyzed) 溶液へ加え、二番目のエマルションを作製するため、9500 rpm で 5 分間ホモジナイズ (Brinkman PT 3100 Polytron) した。ホモジナイズの後、100 mL の 2% イソプロパノールを加え、有機物質を蒸発させるため 375 rpm で 90 分間室温で攪拌した。残った UCA 溶液は 5000 rpm で 5 分間遠心分離した後、ペレットを回収し、有機物質を除く

ためヘキサンで3回洗浄した。20分間乾燥させた後、UCAを蒸留水で洗浄し、遠心分離し、液体窒素で急速凍結し、その後-80°Cで少なくとも2時間凍結した。凍結UCA溶液は水性コア材料を除くため48時間凍結乾燥させ、このようにして空気で膨らんだ空洞マイクロカプセルを形成した。

標的リガンドによるUCAの機能化

マイクロバブルを作製すると、図2で見られるように、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) が提供している反応を活性化し触媒するN-(3-(ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩 (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride; EDC) およびn-hydrosulfosuccinimide (NHS) を用いて、TRAIL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を長さ0.81 nmのN-β-マレイミドプロピオン酸ヒドラジド (N-beta-Maleimidopropionic acid hydrazide; BMPH) スペーサーアーム (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) とマレイミド反応によってUCA表面に結合した。

簡単に述べると、架橋用溶液(1 mLの蒸留水(distilled water; dH₂O)中に14.86 mgのBMPH、1 mLのdH₂O中に19.17 mgのEDC、および1 mLのdH₂O中に12 mgのNHS)を調製しながら、60 mgのUCAを4 mLの0.1 M 2-モルホリノエタンスルホン酸(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid; MES) 緩衝液(pH 5.2) (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) で懸濁した。つぎに、これらの溶液をUCA懸濁液に加え、30分間回転させて攪拌した。活性化したUCAを5分間5000 rpm(相対遠心力2599.35 g)で5分間遠心分離し、未反応のEDCを除去するため洗浄し、1.2 μgのTRAILを含んだ4 mLのリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline; PBS)の溶液で再懸濁し、90分間回転させて攪拌した。TRAILを結合したUCA (TRAIL-UCA)を遠心分離し(5000 rpmで5分間)、dH₂Oで3回洗浄し、液体窒素で急速凍結した後、48時間凍結乾燥した。非修飾のコントロールUCAに加え、観察結果が共有結合ではなく単に表面に吸着したTRAILに起因するものである可能性を説明するため、化学架橋剤であるEDCおよびBMPHを除いた結合手順に従い、追加のコントロール群(リンカーなしのコントロール)を作製した。上記の吸着したTRAILはおそらく細胞培養物と接触した際に容易に溶離し、遊離TRAILが放出されるだろう。

UCAの物理的および音響的特性評価

TRAIL結合群およびコントロール群が機能化UCAとして実現できるか調べるために形態学的および音響学的に評価した。UCAの表面形態を評価し、また、サイズが結合工程時に実質的に変わっていないことを確認するため、Philips FEI XL30 Environmental SEMを用いて走査型電子顕微鏡(Scanning Electron Microscope; SEM)画像を撮影した。簡単に述べると、1 mgのUCAを導電性粘着テープを用いてアルミニウムスタブの上にマウントし、SEMイメージングのために、白金-パラジウムで40秒間スパッタコートした。マイクロバブルを保持した各SEMスタブ上の任意の位置から3枚の画像を取得した。UCAの直径は、NIHのImageJ画

像処理ソフトウェアを用いてこれらの画像より測定した。簡単に述べると、研究者が4つのマイクロバブルの画像をこれらの代表的な画像から任意に選択し、ImageJソフトウェアを用いてこれらのマイクロバブルの直径を測定し、結果はUCAの種類ごとに平均した。用量および時間応答試験は、前述のように^{5-7, 32, 34}、5 MHz、直径 12.7 mm、50.8 mm の長さで球状に集束させたシングルエレメント超音波トランスデューサー（Panametrics, Waltham, MA）を用いて、我々の研究室にある特注の音響検査システムでおこなった。このトランスデューサーを37°Cに加温した蒸留水が入った浴槽に浸漬し、50 mLの温かいPBS（37°C）で満たした特注のサンプル管の音響窓を通して焦点を合わせた。パナメトリクス パルサー レシーバは100 Hzのパルス繰り返し周波数（pulse repetition frequency; PRF）でサンプルに超音波照射するために使用した。つぎに反射信号の受信および増幅は40 dBでおこない、デジタルオシロスコープ（LeCroy, Chestnut Ridge, NY）に入力し、カスタムLabViewプログラムを用いてコンピューターで解析した。ベースライン測定値は、サンプル測定時のバックグラウンド量を示すために、磁性攪拌子を回転させながらPBSから取得した。つぎに、試験のために3 mgのUCAを800 µLのPBS中で懸濁した。累積用量反応を決定するため、20 µLのUCA懸濁液をサンプル管に30秒ごとに加え、音響信号を各時点で測定した。超音波ビーム中で循環している間の経時的時間応答または安定性は、40 µLのUCA懸濁液を50 mLの新鮮な温かいPBSで満たされたサンプル管へ加え、音響信号を15分間まで毎分測定した。これらの試験はトリプリケートでおこない、その結果はこれらの測定値の平均とした。

***In vitro* におけるUCAからの超音波誘導 Nanoshard の生成**

音響試験で超音波誘導 n-Sh を生成する TRAIL-UCA の潜在能力を示した後、これまで我々の研究室で n-Sh 生成に用いた方法を用いて^{4, 36}、UCA に超音波処理をした。簡単に述べると、滅菌した6ウェルのポリスチレン組織培養プレートを上述した音響浴槽の水-空気界面で固定した。水中トランスデューサーを、焦点がウェル内になるような距離で、上に向かってプレートのウェルの中へ送信するように再配置した。漏れやすい血管系を模倣するため、400 nmの細孔を有するポリエステルの Transwell メンブレンインサート（Corning, Lowell, MA）（細孔密度は 4×10^6 pores/cm²、直径 24 mm）をウェルに挿入した。ウェルの底で5 mLのTRAIL-UCAを3 mLのPBSで懸濁し、つぎにTranswellを挿入し、さらに3 mLのPBSをインサートの上部から加えた。そしてウェルを50.8 mmの距離（トランスデューサーの焦点距離）で、トランスデューサー上の中心に置き、液体-空気界面のエネルギー反射を最小限にし、定常波がサンプル内で形成されるのを防ぐためゴム栓を液体の上位に置いた。つぎに、サンプルを100 HzのPRFで30分間超音波処理し、実験で使用するため上部のチャンバーより10分毎に200 µLのサンプルを採取した。コントロールは、超音波処理なしで30分間この設定でインキュベートした。

***in vitro* における TRAIL 結合UCAの細胞死誘導能評価**

最後に、*in vitro* における研究で、TRAIL-UCA および TRAIL n-Sh によって誘導される標的アポトーシス活性を評価する。上述した n-Sh 試験の”上清”を採取し、遠心分離し、そして細胞培養液に懸濁した。94%RPMI1640、5%FBS および 1%ペニシリン/ストレプトマイシン抗生物質を含有する培地中で、48 ウェルプレート（複数の処置を容易にするため）に MDA-MB-231 乳がん細胞を 80%コンフルエンスまで増殖させた。TRAIL 耐性群である 3T3 線維芽細胞は実験が可能な 30%コンフルエンスまで増殖させた。

表 A に示されるように、両方の細胞タイプの個々のバッチを、各処置媒体およびコントロールを用いた 7 つの異なる処置で暴露した。各処置を含む培地で細胞を 6 時間インキュベートし、細胞運命は Live/Dead Cytotoxicity Assay (Invitrogen, Grand Island, NY) および蛍光顕微鏡を用いて評価した。画像は各ウェル全体から代表的な画像だと考えられる任意の 3 点を取得した。細胞運命は NIH ImageJ の中でカスタマイズしたマクロを使用して計算した。簡単に述べると、画像中のすべての細胞を数え、生細胞（緑）または死細胞（赤）のいずれかに指定した。そして、これらの代表的な画像の中で、生細胞と比較して死細胞の割合を決定することで細胞死を算出した。

統計解析

統計解析は、GraphPad Prism ソフトウェアを用いておこない、一元配位分散分析法は有意性（95%信頼水準）を決定するために使用し、スチューデント t 検定は、個々の群比較に使用した。エラーバーは、Standard Error About the Mean (SEAM) を表す。

結果

UCA の物理的および音響的特性評価

得られた TRAIL-UCA および非修飾ブランク UCA を、超音波ビーム中における音響増幅や安定性および修飾前後の表面形態で特徴づけた。図 3 に示すように、SEM 画像より、結合前後の画像は滑らかで球状の UCA を示しており、TRAIL の結合は表面形態に大きな影響を与えないことが示された。

また、これらの SEM 画像を UCA の直径測定に使用し、その結果を図 4 に示す。ブランク UCA ($0.871 \pm 0.097 \mu\text{m}$) およびリンカーなし TRAIL-UCA ($0.871 \pm 0.097 \mu\text{m}$) の平均直径は等しいが、SEM 画像よりリンカーなしコントロール群の粒度分布の変化が示されている。TRAIL を結合した UCA ($1.190 \pm 0.072 \mu\text{m}$) の平均直径はコントロールと比較して顕著に大きかった ($p = 0.0153$)。これらのサイズ変化は、UCA シェルを作製する結合プロセス時の構造的変化によるものと予想される。それでも、これら薬剤の平均直径は 1 – 2 μm の望ましい範囲内であり、したがってこれらの実験条件を満たしている。

これらの薬剤が造影剤としての機能を維持しているかどうかを調べるため、音響増強および安定性を評価した。累積用量反応の結果を図 5a に示す。TRAIL-UCA 群において、同

用量のブランク PLA コントロールと比較して、12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の最大増強で 5 – 8 デシベル (decibel; dB) の減少が見られ、これはUCA シェルの性質が TRAIL のマレイミド結合時に変化したことを示唆している。この修飾によって減少が起こるにも関わらず、両方の試験群は、我々の以前の *in vivo* 研究³²での評価と同様に、臨床的に有用な超音波信号を反射することができ、TRAIL-UCA が依然として効果的な造影剤であることを示唆している。これらの群はブランク PLA コントロールと比較して、超音波ビーム中での安定性が減少しており、実際に、図 5 b は TRAIL 結合プロセスが音響学的に誘導される n-Sh 産生を現に増幅させていることを示唆している。音響半減期、つまり増強信号が半分になるまでの時間は、UCA の破壊によるものだと考えられる。比較として、この半減期は、結合 TRAIL-UCA ではおよそ 9 分間であり、表面に吸収した TRAIL-UCA はおよそ 12 分間であり、一方、コントロールのブランク UCA は 15 分間以上であった。しかしながら、結合 UCA とリンカーなしのコントロールとの間に、結合自体が UCA Shell の特性に大きな影響を与えることを示唆する十分な差異はない ($p > 0.05$)。概してこれらの結果より、SEM 画像では形態学的に目に見える変化が示されなかったことで、UCA が TRAIL と結合する水性環境が UCA の構造を変化させていることを示唆している。その結果は、また、超音波に曝されたときに砕け散る薬剤が依然として造影剤として機能することを示している。TRAIL-UCA が最大増強に達するのに必要とする用量が多い理由は、おそらく UCA の一部分が結合プロセス時に破壊され、無傷の UCA が低濃度になるからである。

***in vitro* における TRAIL 結合 UCA の細胞死誘導能評価**

試験群において、細胞は、培地で懸濁した適切な無傷の UCA または n-Sh から成る改変した細胞培養培地で処置した。処置群は、無傷のリンカーなし TRAIL-UCA、30 分間超音波処理した後のリンカーなし n-Sh、無傷の結合 TRAIL-UCA および 30 分間超音波処理した後の結合 n-Sh である。コントロール群は、処置なし (ネガティブコントロール)、無傷のブランク PLA UCA (1 mg、ネガティブコントロール)、遊離 TRAIL (10 ng、結合工程で使用した最大 TRAIL 濃度を表すポジティブコントロール) である。

MDA-MB-231 乳がん細胞の live/dead アッセイの結果を図 6 に示す。予想されるように、両方のネガティブコントロール (6a – 処置なし、 $2.299 \pm 0.347\%$ 細胞死、6b – 無傷のブランク UCA、 $0.519 \pm 0.216\%$ 細胞死) においてわずかな細胞死があり、一方、ポジティブコントロールである遊離 TRAIL において多くの細胞死 ($32.820 \pm 0.796\%$) が見られる (6c)。細胞死は、赤く染まった細胞と、死細胞がプレートから剥がれその後の洗浄によって消失した大きな黒い部分の両方によって評価した。結合 TRAIL 群では、live/dead アッセイで無傷の UCA ($8.296 \pm 0.169\%$, 6d) と n-Sh ($38.420 \pm 0.020\%$, 6e) の両方において細胞死が示されている。感受性細胞の細胞死を誘導するのに結合 TRAIL n-Sh がよりいっそう効果的であることが図 6 において観察される。実際に、TRAIL 結合 n-Sh は無傷の UCA より顕著に細胞死を誘導した ($p < 0.0001$)。さらに、TRAIL 結合 n-Sh によって誘導される細胞死は遊離

TRAIL 処理よりも顕著に大きい ($p = 0.0098$)。しかしながら、この結果は消失した死細胞の大きな領域に基づく歪みかもしれない。我々の予想と一致して、リンカーなしのコントロール両群(6f – 無傷のリンカーなし UCA、 $2.397 \pm 0.299\%$ 、および 6g – リンカーなし n-Sh、 $2.020 \pm 1.358\%$)において、無処置の群(それぞれ $p = 0.8502$ および $p = 0.8608$)と大きく変わらず、細胞死がほとんどないことわかった。リンカーなしコントロール群の結果より、観察された細胞死効果は、物理的に接着した TRAIL の放出により偶発的に起きたものではなく、UCA 表面に結合しているものが活性化 TRAIL 分子であることを示している。

一方、図 7 で見られるように、TRAIL 非感受性 3T3 線維芽細胞において非常にわずかな細胞死が見られる。3T3 細胞を 30% コンフルエンスまで増殖させ処置を行った後は、いずれの試験グループにおいても非常に少ないが赤色に染まった死細胞が見られる。比較として、遊離 TRAIL グループ (c) もまたわずかな死細胞が見られ、TRAIL は非感受性正常細胞に対して影響を与えないことを示唆している。採取した画像の中では、すべての 3T3 線維芽細胞サンプルにおいて細胞死は 3% 以下であった (実際のパーセントを図 7 に示した)。これらのサンプルすべてにおいて、黒い部分は細胞が生存していない領域を表し、実験の間中変化はなかった。

考察

本概念研究の証明において、マレイミド化学を用いた結合は TRAIL を UCA に取り付ける効果的な方法であることを示し、予備実験で裏付けた^{40,41}。今回、我々はこれらの修飾 UCA が音響特性を維持し、耐性細胞ではなく、感受性細胞に対して細胞死を誘導することを示した。重要なことは、TRAIL-UCA への超音波処理により生成される n-Sh を処置した乳がん細胞が、試験グループ間で最大の細胞死を示したことである。この観察結果は、1つの UCA を n-Sh に粉砕することで大量の粒子が生成され、これらの粒子が1つの無傷の UCA が相互作用するよりも多くの感受性細胞に TRAIL を運ぶことができるという仮説と一致する。マイクロサイズの粒子との超音波相互作用のさらなる利点は、UCA を漏出する血管の壁に向かって押し出す放射圧、超音波誘導慣性キャビテーションによるUCAの破壊、キャビテーションによる局所的機械衝撃波の生成、マイクロジェット、フリーラジカル、局所的極端な温度 (5000 K まで)、既に漏れやすい血管系の一過性の破壊⁴²、および超音波による腫瘍血管系の透過性の増加を含む⁴³。これらの利点と組み合わせることで、我々の結果は、将来的にはナノ粒子の *in situ* 生成を支持するものである。二重機構ターゲティングを用いたシステムについて説明する。まず初めに n-Sh は超音波が腫瘍に焦点を当てている場所のみ生成され、次に表面に結合した TRAIL ががん細胞の細胞表面死受容体を標的とする。

本研究で述べた UCA 作製のためのダブルエマルジョンプロセスは、薬剤、生物活性分子または他の化学種などのカプセル化に対して幅広い用途がある。疎水性種の超音波誘導送達、有機相中に薬剤を組み込むことで促進することができ、水相中に組み込む場合、親

水性種でも同様のことが言える^{5, 34, 36, 44}。我々が研究した一例は、PLA シェル内へのドキソルビシン (Dox) のカプセル化であり、共焦点顕微鏡を用いて可視化した^{33, 34}。Dox、5-フルオロウラシル、パクリタキセル、ボルテゾミブおよびアクチノマイシン D のような薬剤は、TRAIL と相乗的に作用し、また、耐性がん細胞を TRAIL 感受性の状態にすることが示されている^{25, 30, 45, 46}。ボルテゾミブまたはドキソルビシンのような生物活性分子の複合カプセル化は、これらの薬剤の効果的な治療を提供できる範囲を大いに広げることができるであろう。さらに、機能化 UCA から n-Sh を生産するための超音波パラメーターの最適化が進行中である。今後の研究では、TRAIL 機能化 UCA の可能性をさらに検討する。

本文以上

〈図表の説明〉

図1 高分子造影剤を用いた超音波誘導送達の概略図。青色の円はUCAを、黄色の星形は超音波誘導UCA崩壊を示し、黒色の線は機能付与したリガンドを表す（正確な縮尺ではない）。数字（1-6）は本文を参照のこと。

図2 TRAILをUCA表面に結合させるマレイミド反応

図3 UCAのSEM画像。a) 結合前のブランクUCA。b) 結合TRAIL-UCA。c) リンカーなしコントロールTRAIL-UCA。加速電圧5kV、スポットサイズ3、倍率2500×、スケールバー4 μ m。

図4 SEM画像より測定したUCAの平均直径。* $p = 0.0153$ 。

図5 UCAの音響評価。a) 各薬剤の音響増強、15 μ g/mlの量を加え30秒毎に読み取り、累積増幅はdBで表す。b) 各薬剤の音響安定性は、1で正規化し、測定値を毎分取り、点線は薬剤の半減期を示す。○ブランクPLA (n=3)、□リンカーなしTRAIL-UCA (n=1)、▽結合TRAIL-UCA (n=1)。

図6 様々な処置下におけるMDA-MB-231ヒト乳がん細胞の蛍光画像。緑色は生細胞を示し、赤色は死/アポトーシス細胞を示し、スケールバーは100 μ m。a) 無処置（ネガティブコントロール）、b) 無傷のブランクPLA UCA（ネガティブコントロール）、c) フリーTRAIL（ポジティブコントロール）、d) 無傷の結合TRAIL-UCA、e) 結合n-Sh、g) 無傷のリンカーなしTRAIL UCA、およびg) リンカーなしn-Sh。

図7 様々な処置下における3T3ヒト線維芽細胞の蛍光画像。a) 無処置（ネガティブコントロール、1.742 \pm 0.076%細胞死）、b) 無傷のブランクPLA UCA（ネガティブコントロール、2.548 \pm 0.016%）、c) フリーTRAIL（ポジティブコントロール、1.669 \pm 0.056%）、d) 無傷の結合TRAIL-UCA（2.753 \pm 0.051%）、e) 結合n-Sh（0.799 \pm 0.041%）、g) 無傷のリンカーなしTRAIL UCA（1.106 \pm 0.031%）、およびg) リンカーなしn-Sh（0.659 \pm 0.267%）。

表A TRAIL感受性およびTRAIL耐性細胞株の両方を用いた*in vitro*細胞実験における処置群。