

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12531

研究課題名(和文)免疫吸着療法に代わる自己抗体選択的除去ナノ分子システムによる拡張型心筋症の治療

研究課題名(英文) A nanosystem as an alternative to immunoadsorption plasmapheresis and its application in the treatment of dilated cardiomyopathy

研究代表者

姜 貞勲 (KANG, JEONG-HUN)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：50423512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、特定の血中免疫グロブリンG(IgG)を選択的に除去するナノ分子システムを創製し、拡張型心筋症の治療に応用することである。Eat-meシグナルの一種であるホスファチジルセリンをナノ分子の本体に導入し、IgGと親和性が高いプロテインGをナノ分子表面に修飾した。ナノ分子はマクロファージ細胞に対し高い認識能を示し、心筋炎マウスモデルに投与すると、心筋炎と拡張型心筋症の発症を著しく抑制した。

研究成果の概要(英文)：The ultimate aim of this study is to develop a nanosystem that can remove blood immunoglobulin (IgG) and to apply the treatment of dilated cardiomyopathy. The eat-me signal phosphatidylserine was involved in nanosystems for their specific recognition by macrophage, and the protein G was grafted on the surface of nanosystems for the IgG-specific binding. The nanosystem showed high-affinity binding to macrophage cells. After intravenous injection into myocarditis model mice, nanosystems inhibited the occurrence of myocarditis and dilated cardiomyopathy.

研究分野：人間医工学

キーワード：生体制御・治療 生体材料 ナノ材料

## 1. 研究開始当初の背景

心室の拡大と収縮力の低下を特徴とする拡張型心筋症は、心臓移植を受けなかった場合の予後は非常に不良であり、5年生存率は50%未満である。このため、症状が軽度な段階で治療を開始し症状の進行を抑制することが、近年の拡張型心筋症の治療戦略であり、遮断薬、アンジオテンシン受容体阻害薬、アンジオテンシン変換酵素阻害剤などの薬物療法が第一選択肢である。

近年、拡張型心筋症患者における血中の抗心筋自己抗体(免疫グロブリン G (IgG))の陽性率は約9割であり、IgGの中でもサブクラス3 (IgG3)の陽性率が約6割と非常に高いことが報告されている。IgG3は拡張型心筋症の進行を著しく悪化させる病因物質になるため、薬物療法と共に、血中の抗心筋自己抗体 IgG3の除去は症状の軽快に有効とされている。血中 IgGの除去に最も汎用されるのが免疫吸着療法(アフェレシス療法)であり、拡張型心筋症の改善が多数報告されている。しかしながら、週2~3回、2~3時間、定期的・継続的(3ヶ月ごと)に通院し、IgGの除去を行う必要があり、拡張型心筋症患者の生活の質(QOL)を低下するとともに社会活動も制限する。したがって、拡張型心筋症患者のQOLの向上には、免疫吸着療法に代わる新たな血中 IgG 選択的除去システムの創製が不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究では、免疫吸着療法に代わる新たな血中 IgG 選択的除去ナノ分子システムを創製し、拡張型心筋症における治療効果を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) ナノ分子システムは、生体内に存在するマクロファージ本来の高い IgG 分解能力を利用するものである。マクロファージに対す

るナノ分子の選択性を高めるために、eat-me シグナルの一種であるホスファチジルセリンをナノ分子の本体に導入した。

(2) マクロファージは免疫複合体を形成した IgG を Fc 受容体を介して効率よく取り込むが、IgG を分解から保護して血中にリサイクルする機能も有している。IgG を選択的に認識して取り込み、マクロファージの分解経路へ誘導するために、IgG と親和性が高いプロテイン G をナノ分子表面に修飾した(図1)。

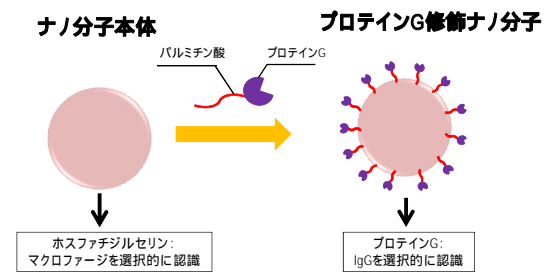


図1. ナノ分子システムの模式図。

(3) Raw264.7 マクロファージ細胞、ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞、ヒト肝癌由来の HepG2 細胞、およびマウスメラノーマ B16 細胞を用いて、マクロファージ細胞に対するナノ分子システムの特異的な認識能力を調べた。

(4) ナノ分子システムによる拡張型心筋症の治療効果を評価するために、ブタ心筋ミオシンの初回投与から10と17日目に、ナノ分子システムを尾静脈により投与した。21日目に心臓を摘出し、ヘマトキシリン・エオシン染色法(HE染色法)を用いて拡張型心筋症の治療効果を評価した。

## 4. 研究成果

(1) ホスファチジルセリン含有ナノ分子は、Raw264.7 マクロファージ細胞に対し高い認識能力を示したが、ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞、ヒト肝癌由来の HepG2 細胞、およびマウスメラノーマ B16 細胞に対する認識能力は低かった(図2)。

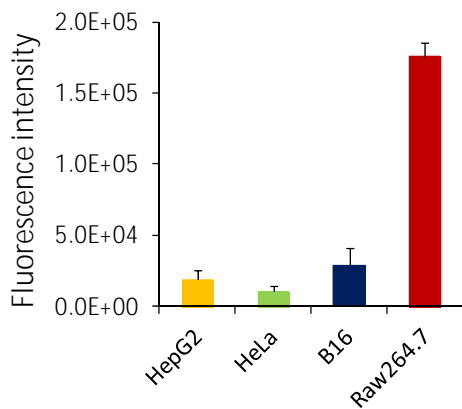


図 2. マクロファージ細胞に対するプロテイン G 修飾ナノ分子の選択性。結果はタンパク質 (mg) あたりの蛍光強度である。

(2) プロテイン G 修飾によるナノ分子のサイズとゼータ電位の変化は確認できなかった。プロテイン G 修飾ナノ分子は IgG と結合したが、結合した IgG はマクロファージに対するナノ分子の認識に影響を与えなかった。興味深いことに、IgG と結合したナノ分子がマクロファージによって貪食されるとマクロファージの炎症反応を抑え、炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、および TNF- $\alpha$ ) の産生を抑制した (図 3)。

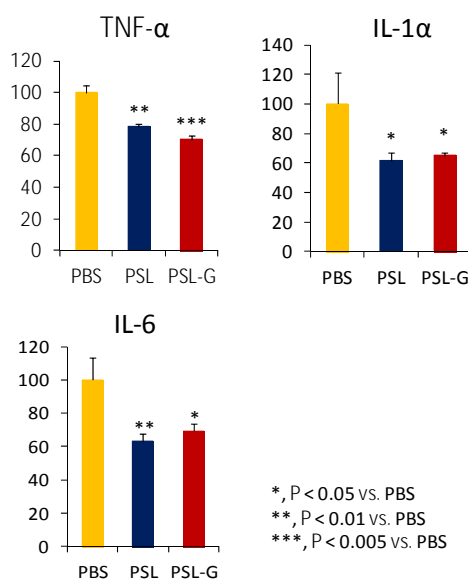


図 3. INF- $\gamma$  により刺激されたマクロファージに対する抗炎症効果。PBS、対照群；PSL、ナノ分子本体添加群；PSL-G、プロテイン G 修飾ナノ分子添加群。

(3) プロテイン G 修飾ナノ分子を心筋炎マウスモデルに投与すると、PBS 投与群とナノ分子本体を投与した群に比べ、心筋炎と拡張型心筋症の発症を著しく抑制した。

以上の結果から、プロテイン G 修飾ナノ分子は血中 IgG 除去に有効であり、拡張型心筋症を含め、炎症性自己免疫疾患の治療に応用可能であることを示唆する。

## 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 3 件)

Riki Toita, Takahito Kawano, Masaharu Murata, Jeong-Hun Kang, Anti-obesity and anti-inflammatory effects of macrophage-targeted interleukin-10-conjugated liposomes in obese mice, *Biomaterials*, 査読有, Vol. 110, 2016, pp 81 - 88, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.09.018

Daisuke Asai, Masaharu Murata, Riki Toita, Takahito Kawano, Hideki Nakashima, Jeong-Hun Kang, Role of amino acid residues surrounding the phosphorylation site in peptide substrates of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2), *Amino Acids*, 査読有, Vol. 48, 2016, pp 2875 - 2880, DOI:10.1007/s00726-016-2345-6

Riki Toita, Sunarso, Ahmed Nafis Rashid, Kanji Tsuru, Kunio Ishikawa, Modulation of the osteoconductive property and immune response of poly(ether ether ketone) by modification with calcium ions, *Journal of Materials Chemistry B*, 査読有, Vol. 3, 2015, pp 8738 - 8746, DOI:10.1039/c5tb01679g

[学会発表](計 4 件)

姜 貞勲, マクロファージを標的とする IL-10 修飾リポソームの抗肥満・抗炎症効

果、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年  
12 月 1 日、パシフィコ横浜（神奈川県）

戸井田 力、炎症性疾患治療を指向した  
マクロファージ機能制御剤の基礎評価、第  
68 回日本生物工学会大会、2016 年 9 月 28  
日、富山国際会議場（富山県）

姜 貞勲、マクロファージを標的とする  
eat-me シグナルナノ分子、第 32 回日本 DDS  
学会学術集会、2016 年 6 月 30 日、グランシ  
ップ（静岡県）

姜 貞勲、マクロファージを選択的に認識す  
る機能性ナノ分子の創製、BMB2015(第 38 回日本  
分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会合同大  
会)、2015 年 12 月 1 日、神戸国際展示場(兵  
庫県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：リポソーム組成物及び炎症性疾患用治  
療剤

発明者：姜 貞勲、村田 正治

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016 - 252224

出願年月日：2016 年 12 月 27 日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

姜 貞勲 (KANG Jeong-Hun)

国立研究開発法人国立循環器病研究セン  
ター研究所・室長

研究者番号：50423512

### (2) 研究分担者

戸井田 力 (TOITA Riki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・研  
究員

研究者番号：40611554