

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：30111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13049

研究課題名（和文）次世代イメージングとDDSの融合が織りなす動脈プラーク高精度検出法創製への挑戦

研究課題名（英文）The detection of the artery plaque using the bioimaging and drug delivery system

研究代表者

丁野 純男（Chono, Sumio）

北海道薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90347790

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：動脈プラークの発症に関与するマクロファージおよび泡沫化細胞に特異的に発現しているレセプターに対する抗体を表面修飾したリポソームを調製し、動脈プラークの検出に有用なドラッグデリバリーシステムとなるかを検討した。この抗体修飾リポソームをマクロファージおよび泡沫化細胞に適用したところ、細胞内取り込み量は表面未修飾のコントロールリポソームに比べて有意に増大した。したがって、抗体修飾リポソームは動脈プラークに検査薬を標的指向化することができる新たなドラッグデリバリーシステムになりうることを示された。

研究成果の概要（英文）：The liposomes modified with specific antibody for macrophages and foam cells was prepared, and their efficacy as drug delivery system for detection and therapy of artery plaque was evaluated. Antibody-modified liposomes efficiently delivered drugs to macrophages and foam cells, compared with non-modified liposomes. This study suggests that antibody-modified liposomes are useful as drug delivery system for detection of artery plaque.

研究分野：ドラッグデリバリー

キーワード：イメージング 動脈プラーク 検査 抗体修飾リポソーム

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 動脈プラーク早期発見の重要性

動脈プラークは、大動脈、頸動脈や冠状動脈に好発し、心筋梗塞や脳梗塞など致死的な疾患の引き金となる。プラークを早期発見して適切に治療することは、医学的に極めて重要な要請であることは勿論、国民医療費高騰の抑制など社会的にも非常に大きな意義がある。

### (2) 動脈プラークの検査・診断の現況

現在、動脈プラークの視覚的な検査・診断は、超音波撮像が一般的であるが、体表面に近い頸動脈にしか適用できず、精度もそれほど高くはない。それゆえ、あらゆる動脈においてもプラークを高精度で検出できる実用的な方法の創製が切望されている。

### (3) 本研究立案の背景となる研究実績

代表者は、薬物運搬体であるリポソームを用いて抗炎症薬を動脈プラークへ選択的に送達し、プラーク形成を抑制する治療目的のドラッグデリバリーシステム(DDS)を世界に先駆けて開発してきた(Chono S. *et al.*, *J. Drug Targ.*, 2005 など原著 5 報、総説 2 報、著書 1 編)。

上記の学術的背景を踏まえ、代表者がこれまでに開発してきた治療目的の DDS を検査・診断目的の DDS へと新展開させることは、医学・社会への多大な波及効果を見据えた斬新なチャレンジであり、本研究計画を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

疾患の検査・診断に用いられる薬物について、病巣への移行性に乏しい場合には、その特異度や感度すなわち検査・診断精度に問題が生じることが指摘されている(Kozłowska *et al.*, 2009)。このような問題を解決する手段の一つとして、DDS の応用が挙げられる。DDS の技術を駆使し、検査薬・診断薬を特定の細胞に高い標的性をもたせて送達できれば、検査・診断精度の飛躍的な向上に大きな展望が拓ける。

本研究では、動脈プラークに対する優れた標的指向型 DDS の構築を目的とし、抗体修飾リポソームの調製とその機能の評価を行った。具体的には、動脈プラークの発症や進行に関与しているマクロファージ系細胞に着目し、これらの細胞表面に特異的に発現しているレセプターを認識する抗体で表面修飾したりポソームを調製するとともに、その標的指向性を *in vitro* 取り込み実験により評価した。加えて、将来的に抗体修飾リポソームに内封するイメージング精度に優れた検査薬・診断薬の構築を指向し、フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)現象を新たな手段として活用する次世代イメージング法の可能性を探った。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗体修飾リポソームの調製(Fig. 1)

抗体で表面修飾するため、先端にマレイミド基を付与したポリエチレングリコール鎖を導入したりポソームを薄膜水合法にて調製した(Robinson *et al.*, 1998)。動脈プラークの発症や進行に関与しているマクロファージ系細胞に対する特異的抗体に 2-iminothiolane (Traut's reagent) を加え、抗体をチオール化した。これをゲルする過または限る過し、未反応の Traut's reagent を除去した。得られたチオール化抗体とリポソームを混合し、遮光・室温条件下で一晩静置することで、リポソーム表面に抗体を修飾した。

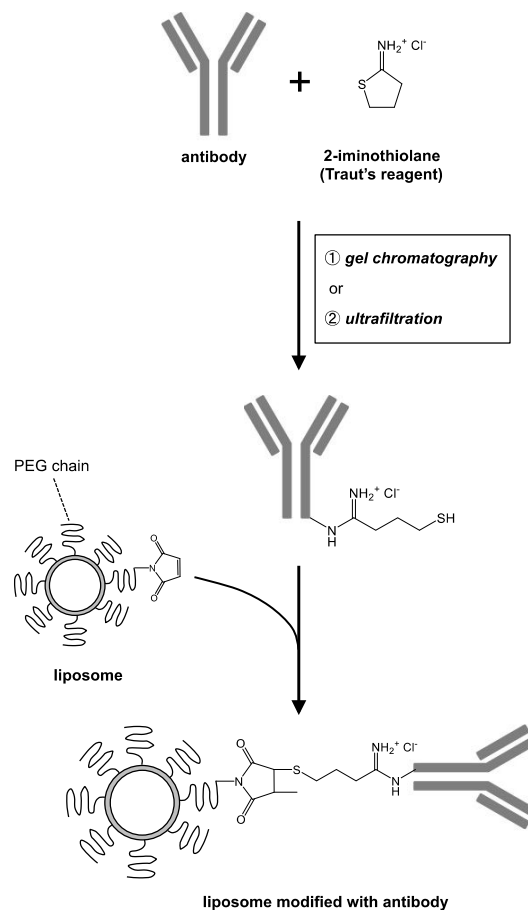


Fig. 1 Preparation of liposomes modified with antibody

### (2) *In vitro* 取り込み実験

マクロファージ系細胞として、RAW 264 細胞および細胞内にコレステロールエステルを蓄積した泡沫化細胞を用いた。泡沫化細胞は、RAW 264 に oxidized low density lipoprotein を加えて 24 時間培養することで誘導した(Fig. 2)。蛍光色素を封入した抗体修飾リポソームをこれらの細胞に適用し、一定時間培養した。培養後、細胞を溶解し、溶解液中の蛍光強度を測定することで、取り込み量を算出した。

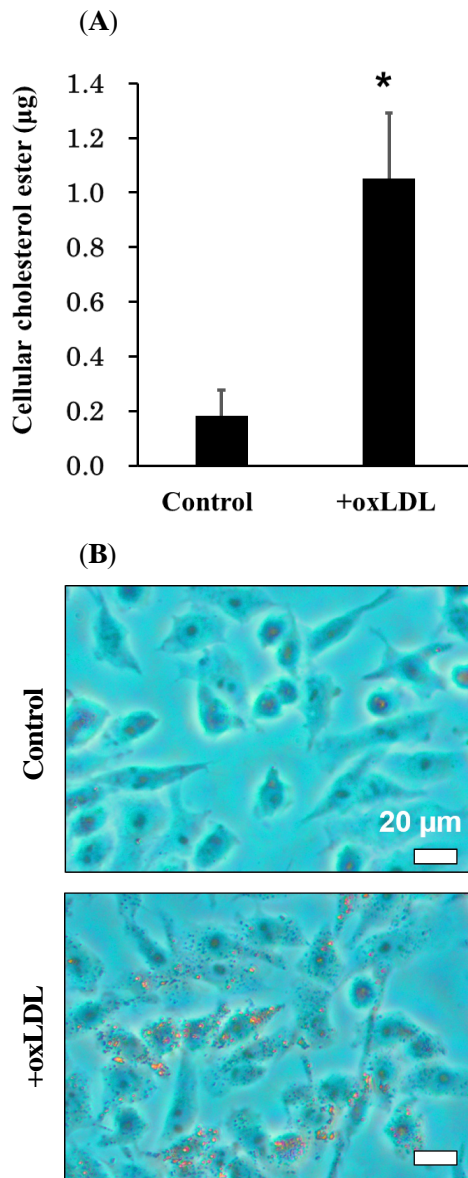


Fig. 2 The induction to foam cells formation by oxidized low density lipoprotein (oxLDL) stimulation to RAW264 cells. RAW264 cells were incubated with oxLDL (5 µg/10<sup>5</sup> cells) for 24 h at 37°C. (A) The cellular cholesterol ester was extracted and determined. Each data represents the mean ± S.D. (n=6). \**p*<0.01: significantly different from control. (B) Oil red O staining was performed. Scale bar = 20 µm.

### (3)次世代イメージング法の可能性探索

将来的には、抗体修飾リポソームに内封するイメージング精度に優れた検査薬・診断薬の構築が必要となる。ここでは、FRET現象を新たな手段として活用する次世代イメージング法の可能性を探った。動脈プラークは微細な病巣であるため、何らかの理由で抗体修飾リポソームから検査薬・診断薬が病巣のマクロファージ系細胞に到達する前に少しでも漏れてしまうと、バックグラウンド光信号が発生するため病巣を高精度に検出することが不可能となる。

FRET現象は、近接した2個の蛍光分子の

間で励起エネルギーが電磁波にならず、電子の共鳴により直接移動する現象である。そのため、一方の蛍光分子(供与体)で吸収された光のエネルギーによって他方の蛍光分子(受容体)にエネルギーが移動し、受容体から蛍光が放射される。このFRET現象が生体内でも観察できるならば、2種類の蛍光分子を検査薬・診断薬として用いることで、抗体修飾リポソームから蛍光分子が一部漏れ出したとしても、バックグラウンド光信号を検知することなく、病巣を高精度に検出できる筈である。

そこで、*in vitro*条件では分子同士が近接していればFRET現象を起こす2種類の蛍光分子(DiDおよびDiR)に着目し、これらの蛍光分子を近接状態にした微粒子を調製してマウスに静脈内投与した。投与後の体内動態を*in vivo*イメージング装置により観察し、FRET現象の有無を評価した。

## 4. 研究成果

### (1)調製した抗体修飾リポソーム

調製した抗体修飾リポソームの抗体修飾率、平均粒子径およびゼータ電位をTable 1にまとめて示す。未反応のTraut's reagentを除去する際に限外ろ過を用いることで、約50%の高修飾率の抗体修飾リポソームを調製することができた。

	Gel chromatography	Ultrafiltration
Modification (%)	11.3	53.8
Particle size (nm)	135	141
Zeta potential (mV)	-12.5	-13.8

### (2)抗体修飾リポソームの取り込み

マクロファージ系細胞による抗体修飾リポソームの取り込みをFig. 3および4に示す。RAW 264細胞(Fig. 3)と泡沫化細胞(Fig. 4)のいずれにおいても、抗体修飾リポソームの取り込みは未修飾に比べて有意に高値であった。したがって、抗体修飾リポソームは、動脈プラークに対する優れた標的指向型DDSになり得ることが示唆された。

### (3)FRET現象を応用したイメージング

詳細なデータは示さないが、蛍光分子であるDiDおよびDiRを近接状態にした微粒子をマウスに静脈内投与したところ、多くの臓器・組織においてFRET現象が観察された。したがって、DiDおよびDiRのみならず、FRET現象を呈する蛍光分子は、次世代のイメージングを牽引する優れた検査薬・診断薬となるだろう。今後、抗体修飾リポソームにFRET現象を呈する蛍光分子を内封することで、次世代イメージングとDDSを融合した

動脈プラーク高精度検出法が創製され、その実用化が大いに期待できる。

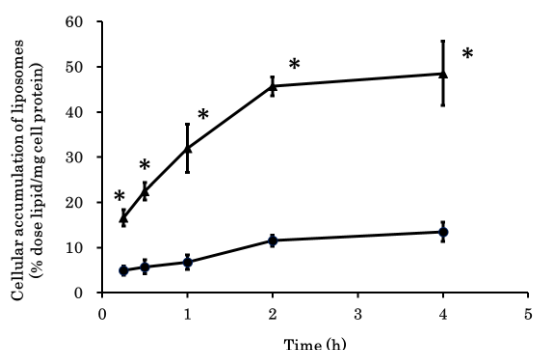


Fig. 3 Time profiles of cellular accumulation of antibody-modified (▲) and non-modified (●) liposomes in RAW264 cells. Liposomes (5 nmol phospholipid/well) were applied to RAW264 cells, followed by incubation at 37°C. At each time point after the incubation, the cellular fluorescence intensity was determined. Each point represents the mean ± S.D. (n=3-4). \* $p < 0.01$ : significantly different from non-modified liposomes.

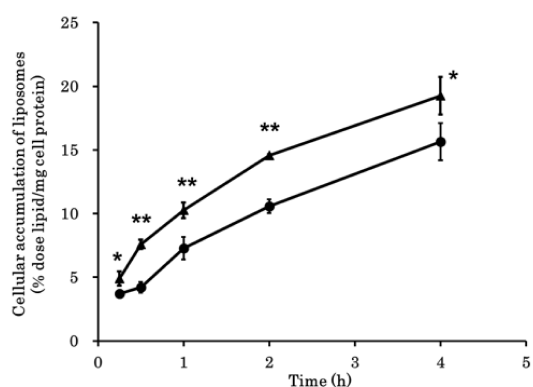


Fig. 4 Time profiles of the cellular accumulation of antibody-modified (▲) and non-modified (●) liposomes in foam cells. Liposomes (5 nmol phospholipid/well) were applied to foam cells, followed by incubation at 37°C. At each time point after the incubation, the cellular fluorescence intensity was determined. Each point represents the mean ± S.D. (n=3). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : significantly different from non-modified liposomes.

## 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)

Kaneko K, Togami K, Yamamoto E, Wang S, Morimoto K, Itagaki S, Chono S: Sustained distribution of aerosolized PEGylated liposomes in epithelial lining fluid on alveolus surface, *Drug Deliv. Transl. Res.*, 6, 565-571, 2016.

Chono S, Togami K, Itagaki S: Aerosolized liposomes with dipalmitoyl

phosphatidylcholine enhance pulmonary absorption of encapsulated insulin compared with co-administered insulin, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 43, 1892-1898, 2017.

Togami K, Kitayama A, Daisho T, Wang R, Tada H, Chono S: Tissue-clearing techniques enable three-dimensional visualization of aerosolized model compound and lung structure at the alveolar scale, *Biol. Pharm. Bull.*, 41, 24-28, 2018.

〔学会発表〕(計7件)

戸上紘平, 丁野純男: DPPC リポソームはインスリン未封入体よりも封入体の経肺吸収を優位に促進する, 第33年会日本DDS学会(京都), 2017.7.

石澤清心, 戸上紘平, 多田均, 丁野純男: ドラッグデリバリーシステムに用いるナノ粒子の体内分布特性評価を目的としたマルチスケールイメージング手法の確立, 日本薬学会第138年会(金沢), 2018.3.

金澤楓, 戸上紘平, 兼平幸宗, 多田均, 丁野純男: 肺線維症モデルマウスにおける薬物封入リポソーム肺投与後の肺内滞留性に関する検討, 日本薬学会第138年会(金沢), 2018.3.

石澤清心, 戸上紘平, 多田均, 丁野純男: FRET現象を応用したmulti-scale imagingによるDDSの機能評価法の確立, 日本薬学会第145回支部例会(札幌), 2018.5.

藏所楓, 兼平幸宗, 多田均, 丁野純男, 戸上紘平: 肺線維症発症時における肺投与型リポソームの肺内滞留性に関する検討, 日本薬学会第145回支部例会(札幌), 2018.5.

石澤清心, 戸上紘平, 多田均, 丁野純男: FRET現象を応用したmulti-scale imagingによるドラッグキャリアと内封薬物の体内分布評価法の確立, 日本薬剤学会第33年会(静岡), 2018.5.

石澤清心, 戸上紘平, 多田均, 丁野純男: ドラッグキャリアに用いるナノ粒子と内封薬物の体内分布評価のためのFRET現象を応用したmulti-scale imaging, 第34回日本DDS学会学術集会(長崎), 2018.6.

〔図書〕(計1件)

丁野純男: 新発想製剤学—剤形, その理論, そして臨床へ—第2版, 京都廣川書店, 2017.3.

〔その他〕

ホームページ等

<https://labs.hus.ac.jp/details.php?id=395>

招待講演

丁野純男: 「くすりの形と生体内運命、そしてドラッグデリバリーシステム」(2016.9.8, 天使大学, 天使大学・北海道薬科大学連携公開講座, 80名)

丁野純男: 「薬学の先進的技術 ~Drug

Delivery System～」(2016.10.8, 旭川西高校,  
旭川西高校 SSH・サイエンスハイレベルセ  
ミナー, 35名)

#### 記事など

丁野純男: 明日にかける 研究の軸足を「基  
礎的研究」と「臨床的研究」の双方に置いて  
～製剤・DDSを「作り」・「活かす」た  
めに～, 製剤機械技術学会誌, 25 (3), 37-44,  
2016.

丁野純男: 研究をやってみませんか?(1),  
道薬誌, 34 (12), 4-8, 2017.

丁野純男: 研究をやってみませんか?(2),  
道薬誌, 35 (1), 44-50, 2018.

丁野純男: 研究をやってみませんか?(3),  
道薬誌, 35 (2), 6-10, 2018.

丁野純男: 研究をやってみませんか?(4),  
道薬誌, 35 (3), 4-11, 2018.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

丁野 純男 (CHONO SUMIO)  
北海道科学大学・薬学部・教授  
研究者番号：90347790

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

戸上 紘平 (TOGAMI KOHEI)  
北海道科学大学・薬学部・准教授  
研究者番号：20582357

### (4)研究協力者

戦 修妍 (ZHAN XIUYAN)  
兼平 幸宗 (KANEHIRA YUKIMUNE)  
石澤 清心 (ISHIZAWA KIYOMI)  
蜂須 麗 (HACHISU REI)  
井上 新哉 (INOUE SHINYA)