

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：30111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790046

研究課題名（和文） イムノリポソームによる DDS を利用した動脈プラークの治療戦略

研究課題名（英文） Strategy for therapy of atherosclerotic plaque by drug delivery system using immune-liposomes

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

研究成果の概要（和文）： 動脈プラークに存在するマクロファージや泡沫細胞を特異的に認識する抗 LOX1 抗体を導入したイムノリポソームを作製し、動脈プラークの治療に有用であるかを検討した。この抗 LOX1 抗体修飾イムノリポソームのマウス動脈プラークへの薬物送達能は、未修飾リポソームに比べて優れ、長期投与による有意なプラーク縮小効果も観察された。本研究の成果は、抗 LOX1 抗体修飾イムノリポソームが動脈プラークの新しい治療戦略となりうることを示唆しており、今後の臨床応用への期待が大きい。

研究成果の概要（英文）： Liposomes modified with anti-LOX1 antibody (LOX1-liposomes) which recognizes macrophages and foam cells in atherosclerotic plaque were prepared and their efficacy for atherosclerotic therapy was examined. Targeting efficiency of LOX1-liposomes to atherosclerotic plaque of mice was greater than that of non-modified liposomes. Also, LOX1-liposomes containing anti-atherosclerotic drug significantly reduced atherosclerotic plaque of mice. This study suggests that LOX1-liposomes may be a new strategy for therapy of atherosclerotic plaque.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

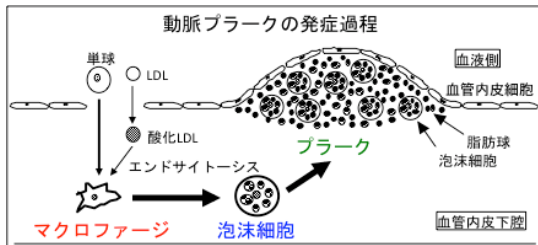
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム(DDS)、イムノリポソーム、動脈プラーク、マクロファージ及び泡沫細胞

1. 研究開始当初の背景

動脈プラークは下図の発症過程により大動脈、頸動脈や冠状動脈の局所に好発し、心筋梗塞や脳梗塞など重篤な疾患の引き金となる。動脈プラークすなわち動脈硬化症の治療は脂質合成阻害剤による血中脂質低下療法と外科的治療が主流だが、対症療法であるため治療効果は望ましくない。脂質合成阻害剤の投与により血中脂質レベルは低下するが、動脈プラークの形成を抑制するには至らず、プラークの縮小は期待できない。血管拡張術後のプラークの再発予防にも脂質合成阻害剤が使用されるが、著効は認められず90%以上の確率で再発する。研究代表者らは、抗炎症薬やACAT阻害剤が、血管内皮下でプラーク形成に関わるマクロファージと泡沫細胞に直接作用し、両細胞中の脂質蓄積を抑制することでプラークを縮小することを報告した(Tauchi et al., J. Pharm. Sci., 1999)。しかし、上述のように動脈プラークは血管局所に形成されるため、プラーク中の薬物濃度を有効値にするには高投与量が必要であり、副作用発現が大きな問題であった。その後、主作用増強と副作用回避の観点から、ドラッグデリバリーシステム(DDS)の研究を開始し、リポソームを用いて抗炎症薬を動脈プラークへ送達することでプラーク形成を効率的に抑制するDDSを世界で初めて開発した(Chono et al., J. Drug Targ., 2005 など)。現在、動脈プラークの治療にDDSを応用する研究は、モデル動物の作製に長時間を要することから敬遠されており、国内外において研究代表者のグループのみで遂行されている。



2. 研究の目的

研究代表者は、前述のように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送達し、マクロファージの泡沫化を阻害することでプラーク形成を直接抑制するドラッグデリバリーシステム(DDS)を開発してきた。また、近年、動脈プラークの病態研究が進み、抗OX40抗体や抗LOX1抗体などがプラーク内のマクロファージ及び泡沫細胞を特異的に認識することがわかってきた。そのため、これらの特異的抗体を導入したイムノリポソームを開発できれば、よりアクティブなDDSを構築できることを着想した。本研究では、薬物送達能を更に向上させるため、プラークに存在するマクロファ

ージや泡沫細胞を認識する特異的抗体を導入したイムノリポソームを新規作製し、イムノリポソームが動脈プラークの新しい治療戦略として有用であるかを検討した。

3. 研究の方法

(1)抗LOX1抗体修飾イムノリポソームの調製：動脈プラーク内のマクロファージや泡沫細胞が特異的に認識するLOX1抗体で表面修飾したイムノリポソームをRopesらの方法

(Ropes et al., J. Liposome Res., 1999)に従って調製した。イムノリポソームの粒子径は150 nmとなるよう、エクストルージョン法にて調整した。薬物を含有させる場合は、マクロファージ及び泡沫細胞における脂質蓄積を抑制するデキサメタゾンを用いた。また一部の実験では、蛍光ラベルしたイムノリポソームを調製した。比較には、未修飾リポソームを用いた。

(2)動脈プラークモデルの作成：ApoE欠損マウス(♂、8週令)に高コレステロール食を12週間与え、動脈プラークモデルマウスを作成した。プラーク形成は、胸部大動脈組織切片のMOMA-2染色及びOil Red O染色により確認した。動脈プラークモデルマウスでは、いずれの染色にもポジティブであった(図1A)。普通食で同様に飼育した正常マウス(図1B)はこれらの染色にネガティブであった。

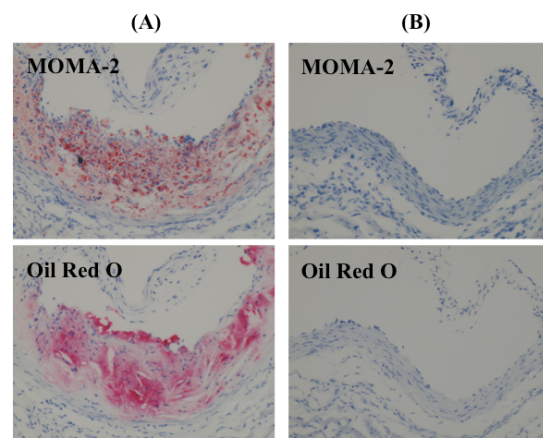


図1

(3)イムノリポソームのプラークへの集積性の評価：イムノリポソームを動脈プラークモデルマウスに静脈内投与し、2時間後に心臓及び弓部から腹部までの大動脈を摘出し、プラークに集積したイムノリポソームを蛍光イメージングにより評価した。

(4)デキサメタゾン含有イムノリポソームの長期投与による効果の評価：デキサメタゾン含有イムノリポソーム(50 µg/kg)を動脈プラークモデルマウスに週1回ずつ7週間にわたり静脈内投与した。最終投与の翌日に、2時間後に弓部から腹部までの大動脈を摘出し、トリミングののちに縦に切り開き、Oil

Red O 染色を施した。染色面積を計測し、病変率を求め、プラーク縮小効果の指標とした。

(5)イムノリポソームの *in vitro* 取り込みの評価:イムノリポソームを *in vitro* でマクロファージ及び泡沫細胞に適用し、2 時間後の細胞内取り込みを共焦点レーザー顕微鏡像により評価した。

(6)デキサメタゾン含有イムノリポソームの *in vitro* 作用の評価:デキサメタゾン含有イムノリポソームを *in vitro* で、酸化 LDL 共存下のマクロファージあるいは酸化 LDL を予め取り込ませた泡沫細胞に適用し、24 時間後の細胞内脂質量を測定した。

4. 研究成果

(1)イムノリポソームのプラークへの集積性:未修飾リポソーム(A)及びイムノリポソーム(B)をモデルマウスに投与したときのプラークへの分布を図2に示す。イムノリポソームは未修飾リポソームに比べ、弓部から腹部大動脈のプラークに集積しやすいことが明らかとなった。

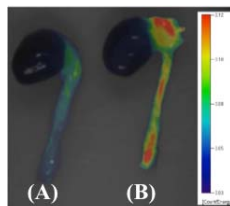


図2

(2)デキサメタゾン含有イムノリポソームの長期投与による効果:デキサメタゾン含有未修飾リポソーム及びイムノリポソームをモデルマウスに長期投与したときの病変率を図3に示す。未修飾リポソーム及びデキサメタゾン溶液では、プラークの縮小はみられなかったが、イムノリポソームでは約 50%の有意なプラーク縮小効果が観察された。

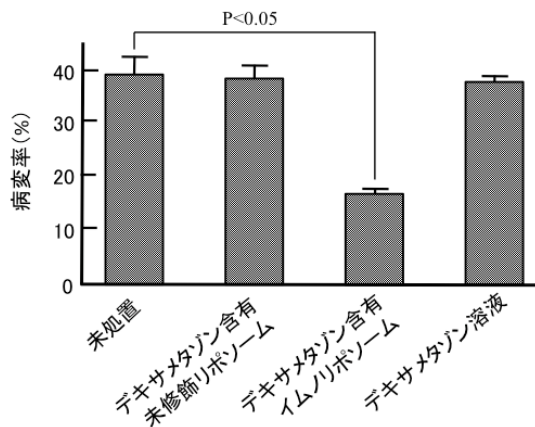


図3

(3)イムノリポソームの *in vitro* 取り込み:未修飾リポソーム(A)及びイムノリポソーム(B)を *in vitro* でマクロファージ及び泡沫細胞に適用したときの細胞内取り込みを図4に示す。いずれの細胞においても、イムノリポソームの取り込みは、未修飾に比べ高値で

あった。

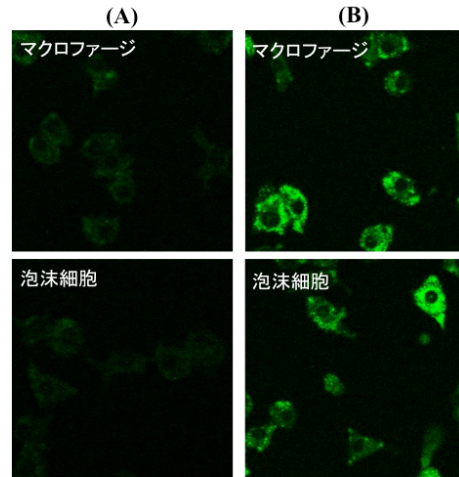


図4

(4)デキサメタゾン含有イムノリポソームの *in vitro* 作用:デキサメタゾン含有イムノリポソームを *in vitro* でマクロファージ(I)あるいは泡沫細胞(II)に適用したときの細胞内脂質量を図5に示す。イムノリポソーム、未修飾リポソーム及びデキサメタゾン溶液は、いずれも両細胞において、細胞内脂質量を有意に低下させた。特に、イムノリポソームでは、強力な脂質低下作用が観察された。

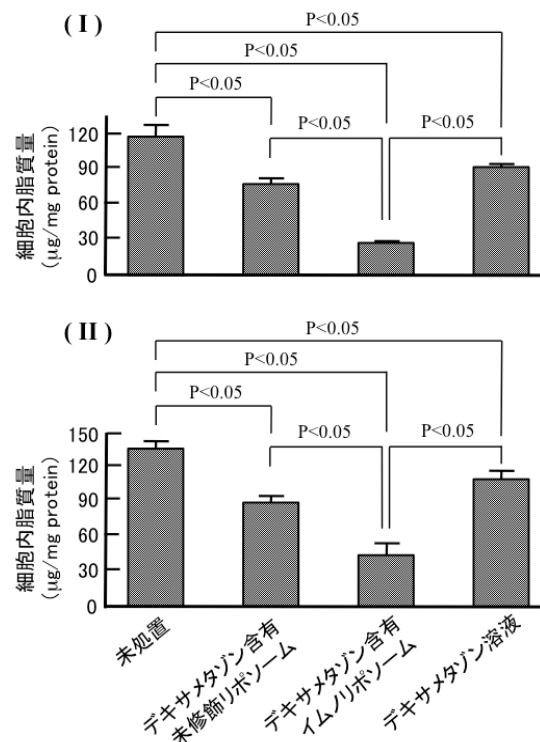


図5

(5)成果のまとめ：本研究では、抗 LOX1 抗体修飾イムノリポソームはマクロファージおよび泡沫細胞が存在する動脈プラークへデキサメタゾンを効率よく送達し、これら細胞の脂質蓄積を抑制することで動脈プラークの進展を抑制することが示された。これは、抗 LOX1 抗体修飾イムノリポソームが動脈プラークの治療戦略として魅力的な DDS であることを示唆しており、今後の臨床応用への期待が大きい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- ①丁野純男, 森本一洋: DDS 化のサイエンスと薬物治療, 道薬誌, **27**, 5-10, 2010.
- ②丁野純男: 薬剤師が知っておきたい DDS 製剤の機能とメカニズム, 薬局薬学, 印刷中
- ③丁野純男: ドラッグデリバリーシステムを利用した各種難治性疾患の新規治療戦略, 医薬品相互作用研究, 印刷中
- ④ Chono S and Morimoto K: Uptake characteristics of anti-LOX1 modified liposomes by macrophages and foam cells, J. Drug Targ., 投稿中
- ⑤ Chono S and Morimoto K: Efficient drug targeting to atherosclerotic lesions by anti-LOX1 modified liposomes, J. Control. Rel., 投稿中

〔学会発表〕(計 2 件)

- ①丁野純男, 森本一洋: リポソームの動脈硬化巣への集積性, 第 58 回北海道薬学大会, 2011. 5. 22(札幌)
- ②丁野純男: クスリの宅急便 ドラッグデリバリーシステム, 第 47 回冰雪セミナー, 2012. 1. 7(小樽)

6. 研究組織

(1) 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