

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2011

課題番号：23659416

研究課題名（和文）劇症型心筋炎の画期的診断法・治療法の開発

研究課題名（英文）Development of image diagnosis and treatment for fluminant myocarditis

研究代表者

南野 哲男（MINAMINO TETSUO）

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：30379234

研究成果の概要（和文）：劇症型心筋炎を呈する自己免疫性心筋炎の平均生存期間は4-12カ月であり、極めて予後不良である。生存率改善のためには、早期診断による早期治療の開始や新たな治療法の確立が期待される。本事業では、心筋炎部位での血管透過性が亢進し、ナノサイズ粒子が心臓に集積することを見出した。次に、免疫抑制剤 FK506 単独と比較して、リポソーム化した FK506 は、劇症型心筋炎ラットモデルにおいて、心機能低下を著明に抑制することに成功した。リポソーム化免疫抑制剤は劇症型心筋炎に対する有効な治療法になることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：The prognosis of fluminant myocarditis due to autoimmune myocarditis is poor. Thus, the development of new treatment for fluminant myocarditis is medical unmet need. We found that nano-size particles were accumulated in myocarditis hearts. Then, we have developed FK506 (an immunosuppressant drug) coated with nano-size liposome. In rat myocarditis model, we found that liposomal FK506 prevented the cardiac dysfunction more than FK506 did. Liposomes are promising for developing new treatments for fluminant myocarditis.

交付決定額

（金額単位：円）

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子心臓病態学、劇症型心筋症、ドラッグデリバリー

## 1. 研究開始当初の背景

劇症型心筋炎を呈する巨細胞性心筋炎の平均生存期間は4-12カ月であり、極めて予後不良である。生存率改善のためには、早期診断による早期治療の開始が必要である。しかし、現状では、臨床症状、身体的所見、血液生化学検査、胸部レントゲン、心電図、心エコー図などの非特異的所見による総合的診断が行われており、心筋炎特異的診断方法は存在しない。心内膜心筋生検もサンプリング・エラーが大きいため信頼性が低い。また、実地臨床現場では、自然軽快までの血行動態維持が中心であり、心筋炎の原因に対する介入や炎症性物質による心筋機能抑制からの

解放に対する治療法は確立されていない。実際、劇症型心筋炎の急性期死亡率は42%に達する。以上より、劇症型心筋炎の早期診断や治療の確立に対する”unmet needs”が存在する。

## 2. 研究の目的

劇症型心筋炎は予後不良の疾患であるが、特異的診断法ならびに有効な治療法は確立されていない。申請者らは、劇症型心筋炎を呈するミオシン感作によるラット自己免疫性心筋炎モデルにおいて、心臓での血管透過性が著しく亢進していることを見出した。血管透過性亢進部位ではナノサイズ粒子が血

管より漏出し、血管外に滞留する性質を利用して、1) 生体適合性ガス封入バブル(ソナゾイド®)を用いた心筋炎に対する新規診断法の開発、2) 心筋炎部位での薬剤集積効果を期待した免疫抑制剤封入リポソーム製剤による新規治療法の開発をめざす。本研究は、ナノテクノロジーを用いる斬新なアイデアに基づいた劇症型心筋炎に対する画期的診断法・治療法の開発を目的としており、かつ、その成果は実地臨床に直結する。

### 3. 研究の方法

(1) 実験的自己免疫性心筋炎モデルの心臓における血管透過性亢進に関する実験(南野・松崎・真田)

9週齢の雄性ルイスラットにブタ心室筋ミオシンを抗原として感作を行った。すなわち、ブタ心室筋ミオシンと完全フロイドアジュバント(Mycobacterium tuberculosis: 20 mg/mL)を等用量混ぜて最終ミオシン濃度5 mg/mLの懸濁液を調整し、ラットの両足底にその懸濁液を0.1 mLずつ皮下注射し、自己免疫性心筋炎モデルを作製した。蛍光実体顕微鏡を用いて摘出心臓を観察した結果、自己免疫性心筋炎群では、蛍光色素ビーズ(100ならびに1000 nm)が強く集積する部分があるものの、ほぼ全周にわたって蛍光色素ビーズの集積増加が明らかに認められた。以上より、劇症型心筋炎を呈するヒト巨細胞性心筋炎のモデルである実験的自己免疫性心筋炎では、炎症にともない血管透過性が亢進していることが明らかになった。早期診断の可能性を検討するため、ミオシン感作後早期(感作後3, 7, 12, 15日)にビーズ集積の有無を検討する。さらに、微量の生体適合性封入ナノサイズリポソームの開発を行い、心臓超音波検査による心筋炎診断の確立をめざした。

(2) 生体適合性ガス封入ナノバブル(ソナゾイド®)を用いた劇症型心筋炎の診断方法の開発(南野、松崎)

心臓超音波装置を用いて、既存の造影用バブルソナゾイド(直径2~3ミクロン)を静脈内投与後の心筋コントラスト画像の輝度の経時的变化を評価し、心臓での炎症の程度を評価し、劇症型心筋炎の造影用バブルとして使用可能か否かの検討をおこなった。

(3) 免疫抑制剤封入リポソーム製剤の心筋炎モデルへの効果検討(南野、真田、松崎)  
①. 凍結乾燥FK506封入リポソーム製剤の作製

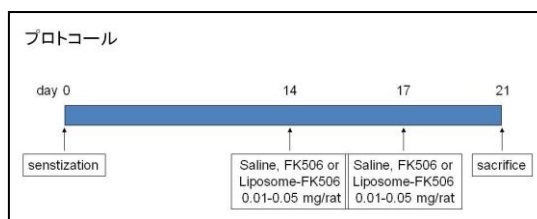
脂質膜をTAPS緩衝液で懸濁し超音波処理する。超音波処理によってできたミセル懸濁液からコール酸ナトリウムを限外濾過で除去することによりリポソームが形成される。このリポソーム溶液をTAPS緩衝液で限外濾過にかけ未反応のBS3を除いた後、リポソーム表面のBS3により親水性化処理して、凍結

乾燥を行った。

②リポソーム化FK506作製方法: HEPES緩衝液で希釈したFK506注射液(アステラス製薬)(最終濃度0.02-0.10 mg/mL)を用いて、脂質量2.0 mg当たり1 mLで再水和する。再水和後、室温で30分静置後、限外濾過で未内包の薬剤を除去する。

③. 実験プロトコール

実験的自己免疫性心筋炎モデルでは、心機能は感作後14日から悪化し、21日にピークになることを確認している。リポソーム化FK506投与群(0.01, 0.02, 0.05 mg/dL)、FK506単独(同量)投与群、リポソーム投与群、生理食塩水投与群を作成する。第14日と17日に、尾静脈より合計2回投与する。



④. 評価方法

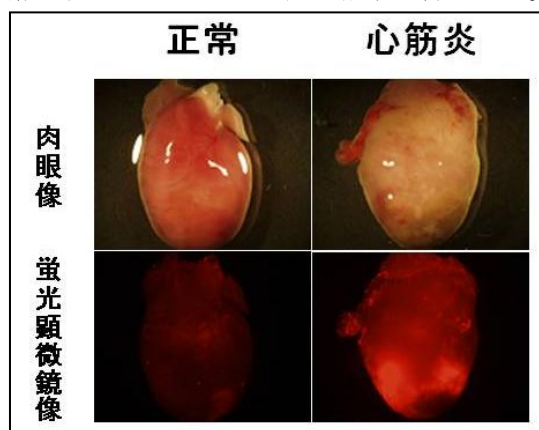
血行動態評価ならびに病理組織評価を行う。

1) 血行動態評価: 第21日にラットをペントバルビタールで麻酔し、右大腿動脈にカテーテルを挿入して平均血圧を測定する。心機能指標(左室内圧、左室拡張末期圧、dP/dt max、dP/dt min)はトランスデューサー付カテーテルを右総頸動脈から左室に挿入して測定する。

### 4. 研究成果

(1) 劇症型心筋炎心臓モデルにおける血管透過性の亢進

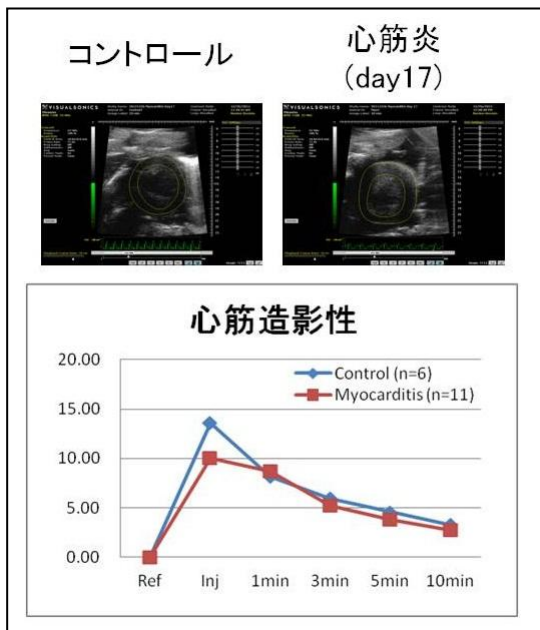
正常ラット、心筋炎ラットに蛍光ビーズ(100 nm)を静脈内投与後、蛍光顕微鏡で心臓を観察した。正常心臓と比較して、心筋炎心臓では、蛍光強度の明らかな増強が認められた。同様に、蛍光ビーズ(1000 nm)の静脈内投与においても同様の結果が得られた。



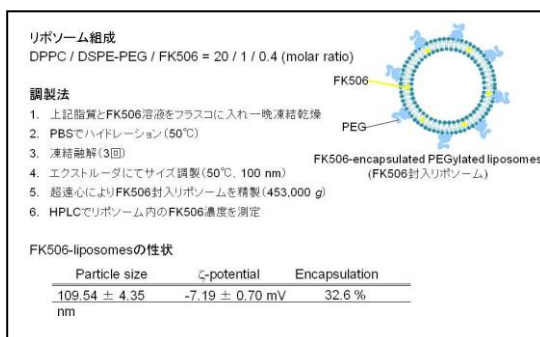
以上より、炎症による血管透過性亢進が認められ、ナノサイズリポソームによる心筋炎部位特異的集積・薬物送達が期待できた。

(2) 生体適合性ガス封入ナノバブル(ソナゾイド®)を用いた劇症型心筋炎の診断方法の開発(南野、松崎)

既存の造影用バブルソナゾイド(直径 2~3 ミクロン)を用いた検討では、コントロール心臓と心筋炎心臓に心臓超音波で評価した心筋造影性に有意な差は認められなかった。



(3) K506 封入リポソームの調整法と性状  
FK506 封入リポソーム作製のため、リポソーム構成リン脂質ならびに FK506 の組成の検討をおこなった結果、DPPE / DSPE-PEG / FK506 = 20 / 1 / 0.4 (molar ratio) が最適であることが明らかになった。また、作製された FK506 封入リポソームの粒子径(109 ± 4 nm)、ゼータ電位(-7.2 ± 0.7 mV)、封入率(32.6%)であった。

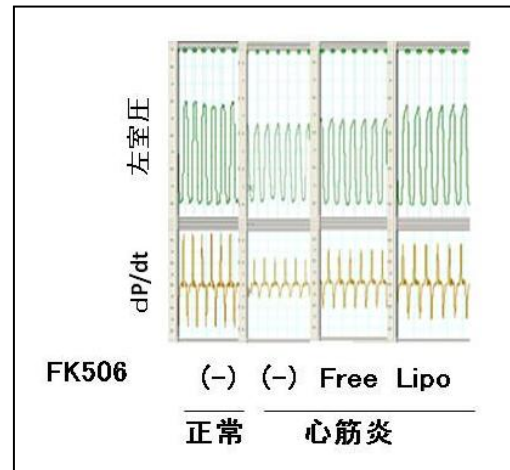


(4) リポソーム化 FK506 による心機能低下抑制効果

① 血行動態に及ぼす影響

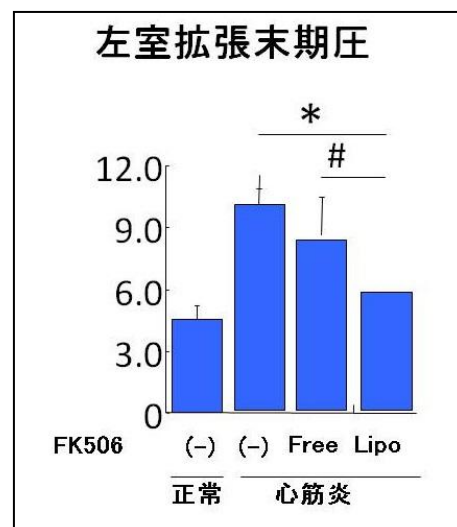
1) 代表例

ブタミオシン感作後 21 日目における左室圧、左室 LVdP/dt を示す(下図)。感作 21 日後、左室圧ならびに LV dP/dt の低下を認めた。FK506 単独投与と比較して、リポソーム化 FK506 静脈内投与により、左室圧ならびに LV dP/dt の低下が有意に抑制された。

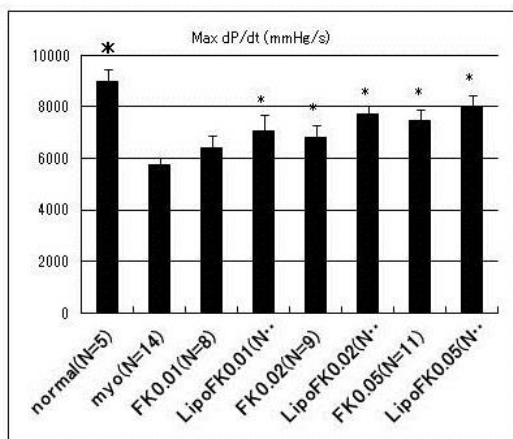


2) 左室拡張末期圧・左室 LVdP/dt に及ぼす影響

ブタミオシン感作後 21 日目における左室拡張末期圧を示す(下図)。感作 21 日後、左室拡張末期圧の上昇を認めた。FK506 単独投与と比較して、リポソーム化 FK506 静脈内投与により、左室拡張末期圧の上昇が有意に抑制された。



FK506 単独、または、FK506 封入リポソームは用量依存的に左室 L<sub>v</sub>dP/dt の低下を抑制することが明らかになった。興味深いことに、FK506 単独少量 (0.01 mg/rat) では左室 dP/dt の低下は抑制できないが、FK506 封入リポソームでは左室 dP/dt の低下を抑制できた。以上より、リポソーム化による免疫抑制剤 FK506 の効果増強が期待できた。



#### (5) 考察

①生体適合性ガス封入バブル (ソナゾイド®) を用いた心筋炎に対する新規診断法の開発

心筋炎心臓では 100-1,000 nm の蛍光粒子が蓄積することを示した。素早い臨床応用を考慮し、市販の生体適合性ガス封入バブルにて検討をおこなったが、心エコー上、正常心臓と心筋炎心臓で違いは認められなかった。現在、ソナゾイドよりサイズが小さい生体適合性ガス封入バブルの開発を試みており、検討を継続していく。

②心筋炎部位での薬剤集積効果を期待した免疫抑制剤封入リポソーム製剤による新規治療法の開発

リポソーム化による免疫抑制剤 FK506 の効果増強が確認できた。今後、創薬に向けて、大阪大学医学部附属病院設置予定である GMP 基準対応リポソーム製造機にリポソーム化 FK506 を作製し、PET マイクロドーズ試験実施のための準備を進めていく。

#### 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 2 件)

- ① Ishii T, Asai T, Oyama D, Fukuta T, Yasuda N, Shimizu K, Minamino T, Oku N. **Amelioration of cerebral ischemia-reperfusion injury based on liposomal drug delivery system with asialo-erythropoietin.** J Control Release. 2012 Feb 10. (In press) 査読有
- ② Nishikawa K, Asai T, Shigematsu H, Shimizu K, Kato H, Asano Y, Takashima S, Mekada E, Oku N, Minamino T. **Development of anti-HB-EGF immunoliposomes for the treatment of breast cancer.** J Control Release. 2011 Oct 14. (In press) 査読有

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

発明の名称：炎症性疾患治療用医薬組成物

発明者：南野哲男、小室一成、松崎高志、奥直人、浅井知浩、富海英

権利者：国立大学法人大阪大学、静岡県効率大学法人

種類：特許

出願番号：特願 2012-117077

出願日：平成 24 年 (2012 年) 5 月 23 日

国内外の別：国内

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

南野 哲男 (MINAMINO TETSUO)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：30379234

(2) 研究分担者

真田 昌爾 (SANADA SHOJI)

大阪大学・保健センター・講師

研究者番号：70593797

松崎 高志 (MATSUZAKI TAKASHI)

大阪大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：90456939