

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102
 研究種目：基盤研究(B) (一般)
 研究期間：2013～2015
 課題番号：25293185
 研究課題名(和文)再灌流部位選択的ナノ薬物送達による虚血-再灌流傷害に対する革新的ナノ医療の創製

 研究課題名(英文) Research and development of innovative cardioprotective modality by nanoparticle-mediated targeting to inflammatory monocytes and IR myocardium

 研究代表者
 江頭 健輔 (Egashira, Kensuke)

 九州大学・学内共同利用施設等・教授

 研究者番号：60260379

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗炎症作用や心筋細胞死抑制作用のあるスタチン、ミトコンドリア傷害を予防するシクロスポリン、PPAR α アゴニスト(ピオグリタゾン、イルベサルタン)、ARB(ロサルタン)、などを用いて薬剤封入ナノ粒子製剤を作製し最適化を行った。これらの成果から、「心筋虚血-再灌流部位選択的ナノDDSは虚血 再灌流傷害を抑制し梗塞サイズを縮小する」という仮説を証明できた。さらに、ミトコンドリア傷害と炎症という2つの重大標的に同時に介入することによって、梗塞サイズが更に格段に縮小するという画期的成果が得られた。さらにブタモデルを用いた橋渡し研究により、ナノ粒子製剤の有効性と安全性が確認された。

研究成果の概要(英文)：In rat and pig IR models, poly(lactic acid/glycolic acid) (PLGA) nanoparticle incorporating FITC accumulated in the IR myocardium through enhanced vascular permeability, and in CD11b-positive leukocytes in the IR myocardium and peripheral blood after intravenous treatment. Intravenous treatment with PLGA nanoparticle containing pitavastatin (Pitavastatin-NP, 1 mg/kg) at reperfusion reduced MI size after 24 hours and ameliorated left ventricular dysfunction 4-week after reperfusion; by contrast, pitavastatin alone (as high as 10 mg/kg) showed no therapeutic effects. In mouse model IR model, treatment with nanoparticles incorporated with CsA (CsA-NP) pioglitazone, irbesartan and etc at the onset of reperfusion enhanced cardioprotection against IR injury by those drugs alone. Therefore, this nanotechnology-based platform can be developed as an innovative cardioprotective modality that may advance currently unsatisfactory reperfusion therapy for AMI.

研究分野：循環器内科学

キーワード：虚血再灌流傷害 急性心筋梗塞 再灌流療法 ナノテクノロジー ドラッグ・デリバリー・システム

1. 研究開始当初の背景

- 日本は超高齢社会に向かって世界の先頭を走り、医療分野では血管病(心筋梗塞、狭心症、脳梗塞、末梢動脈疾患 etc)が増加し、死因と医療費、寝たきりの主たる比率を占めている。その中でも急性心筋梗塞症(AMI)は患者の生命予後を脅かす最も重篤な心臓疾患である。
- AMI 発症急性期における再灌流療法の普及や内科的治療(β遮断薬、ACE-I、statins 等)の標準化によって、AMI 急性期(発症 1 ヶ月以内)の死亡率は著明に改善した(都市部の救命救急センターなどでは 1%以下)。その結果、梗塞後心不全患者が増加した(梗塞後心不全はアメリカで年間 600 万人、日本で年間 100 万人発症)。梗塞後心不全の生命予後は癌患者と概ね同等であることから、AMI 患者の長期死亡率は依然として高いままである(Yellon DM, N Eng J Med 2007;357:1121-1135)。従って、現行の医療で最善を尽くしても AMI 患者の長期予後は改善しないという、未解決の問題(unmet needs)が存在する。
- AMI の最も重要な予後規定因子は梗塞サイズであることから、現在、AMI の唯一の最適治療は早期再灌流療法による梗塞サイズの縮小である(Yellon DM, N Eng J Med 2007;357:1121-1135)。一方、再灌流そのものが不可逆的な心筋細胞壊死を促進し(再灌流傷害)再灌流療法の梗塞縮小効果を減少させる。即ち、現行の再灌流療法による梗塞サイズの縮小効果が不十分で有ることが、AMI 患者の長期予後が改善しない一因と考えられる。しかし、再灌流傷害を抑制し心筋梗塞サイズを効果的に縮小する革新的薬物療法は未だ開発されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が開発した「虚血—再灌流部位選択的ナノ DDS 技術」を活用して、「心筋虚血-再灌流部位選択的ナノ DDS は虚血—再灌流傷害を抑制し梗塞サイズを縮小する」という仮説を検証することである。ナノ粒子製剤開発の薬効薬理試験、製剤開発等を実施し、虚血—再灌流傷害に対する革新的ナノ医療を開発し、急性心筋梗塞患者に対する探索的臨床試験の基盤とする。

3. 研究の方法

【実用化を視野に入れた臨床橋渡し研究体制】

本研究では、研究計画として以下の 3 点を実施する。

1. 虚血-再灌流部位選択的 DDS 技術の検証と機序の解析
2. 薬剤封入ナノ粒子製剤の製造、設計、最適化と有効性試験
3. 上記成果の臨床橋渡し研究をブタモデル

ルで実施

先端医療開発スーパー特区の研究課題であり、九州大学に設備された分子イメージングシステム(256 列 Brilliance™ iCT、超音波診断装置 VEVO2100、血管造影装置、分子標的造影剤 nanotracker : 図参照)を活用して、分子細胞病態の解析とナノ治療の効果を評価できるので、格段に優れた成果が期待できる。

【研究計画】

(1) 生体吸収性ポリマー-PLGA ナノ粒子の製造:

水中エマルジョン溶媒拡散法を用いて生体吸収性高分子ポリマー(PLGA)製ナノ粒子を作製する。PLGA ナノ粒子に蛍光マーカー(fluorescein isothiocyanate : FITC)あるいは、薬剤(ピタバスタチン、シクロスポリン、イルベサルタン、ロサルタンなど)を封入する。

(2) 虚血-再灌流部位選択的 DDS 技術の検証と機序の解析:

- **生体での追跡実験**: 小動物(ラット、マウス)の 30 分虚血-再灌流モデルにおいて、再灌流時に FITC 封入ナノ粒子を投与する。経時的に心臓ならびに他臓器、血液をサンプリングし FITC シグナルを追跡する。

- **組織での薬物動態実験**: FITC 封入ナノ粒子の再灌流時静脈内投与の実験において、FITC の組織内シグナル強度を測定し、虚血-再灌流部位選択的に FITC 封入ナノ粒子が送達されるかどうかを明らかにする。さらに、薬剤封入ナノ粒子製剤を用いた同様の実験において、薬物の組織内濃度を経時的に測定し、薬物濃度が再灌流部位において高値であるかどうかを明らかにする。

- **虚血-再灌流部位心筋における細胞内局在実験**: FITC 封入ナノ粒子あるいは薬剤封入ナノ粒子製剤の再灌流時静脈内投与の実験において、ミトコンドリア分画と細胞質分画に分けて FITC/薬物濃度を測定し、ナノ粒子がミトコンドリア選択的に送達されるかどうかを明らかにする。

(3) 薬剤封入ナノ粒子製剤の製造、設計、最適化と有効性試験:

- これまでに行われた動物実験では、再灌流傷害によって再灌流療法の梗塞縮小効果が 50%程度キャンセルされると報告されている。従って、薬剤封入ナノ粒子製剤が有効であれば、梗塞サイズは 50%程度縮小することが期待される(図参照)。薬剤として、抗炎症作用や心筋細胞死抑制作用のあるスタチン、ミトコンドリア傷害を予防するシクロスポリン、PPAR アゴニスト(pioglitazone、irbesartan)を用いる。研究の過程で必要性の高い薬剤があれば、その薬剤を

- ナノ粒子化し研究に供する。
- 梗塞サイズは心筋梗塞領域/虚血領域の比で評価する。心機能は超音波診断装置 VEV02100 を用いて評価する。分子標的造影剤 nanotracker を用いて、matrix metalloproteinase や血管内皮細胞、白血球などの分子イメージングを行い機序の解析と治療効果の判定を行う。小動物用 CT スキャン装置を用いて、心臓リモデリングや血管新生を評価する。

ミトコンドリア膜透過性遷移孔 (mitochondrial permeability-transition pore : mPTP) の開口の役割：ミトコンドリア cytochrome C の細胞質内 leakage を Western blott を用いて評価、cyclophilin D 欠損マウスを用いる。

ミトコンドリア機能傷害イメージング：生体レベル実験や単利心筋細胞実験において、ミトコンドリア膜電位などの機能マーカーを用いて心筋細胞内ミトコンドリア機能傷害を明らかにする。

炎症細胞の役割：フローサイトメトリーを用いて活性化単球 (Ly6c 陽性) や修復性単球 (Ly6c 陰性) の役割を明らかにする。M1/M2 マーカーの解析を行う。ケモカインの蛋白発現を測定する。Liposome を用いて単球選択的に細胞死を誘導し単球の役割を明らかにする。摘出灌流心の実験によって炎症細胞浸潤の役割を明らかにする。

心筋細胞死・生存の分子マーカー：necrosis や apoptosis の分子マーカー (BCL, Bax, PI3 kinase, Akt) を定量する。

【ブタモデル心筋虚血-再灌流モデル】

臨床応用に向けて覚醒ミニブタモデルでの評価を行う。このモデルの利点は、分子イメージングシステム (256 列 Brilliance™ iCT、超音波診断装置 VEV02100、血管造影装置、分子標的造影剤 nanotracker) を活用して、分子細胞病態の解析とナノ治療の効果を評価できる点である。とくに、霊長類モデルを用いた検討は臨床応用に向けて重要な臨床的意義がある。

今まで用いられたブタモデルでは全身麻酔に加えて外科的開胸術下に心筋虚血-再灌流が実施されてきた。このような実験系では麻酔ならびに外科手術の影響は避けることが出来ないため、血行動態が不安定で、且つ、致死的不整脈の頻度も高く、その結果、同じ薬剤を用いても異なる結果が報告されることが少なくなかった。

これらの問題を克服するために、申請者らはミニブタを用いて覚醒下に心筋虚血-再灌流モデルを作製することに成功した。即ち、実験数日前に麻酔開胸下に冠動脈にカフオクルーダーを留置したブタモデルを用いて、覚醒下に心筋虚血-再灌流実験を行うことが出来る。さらに、手術時に埋め込んだテレメトリー装置を用いて動脈血圧と心電図を連続

測定できるので、冠動脈閉塞を心電図 ST 上昇で判断できる。

CT や血管造影、心エコーを用いて、ヒトの心筋梗塞患者と同様の画像診断を実施し、薬剤封入ナノ粒子製剤の有効性を明らかにする。

4. 研究成果

1. 薬剤封入ナノ粒子製剤の製造、設計、最適化と有効性試験：

研究計画の通り、複数の薬剤封入封入ナノ粒子製剤を作製し物性と機能の最適化を行った。最適化したナノ粒子製剤を用いて適切な分子細胞標的に理にかなった DDS を活用して梗塞サイズの画期的縮小するという革新的成果が得られた。具体的には、薬剤として抗炎症作用や心筋細胞死抑制作用のあるスタチン、ミトコンドリア傷害を予防するシクロスポリン、PPAR アゴニスト (ピオグリタゾン、イルベサルタン)、ARB (ロサルタン) などを用いた。

適切な遺伝子欠損マウス (cyclophilin D 欠損マウス、CCR2 欠損マウス、Bax 欠損マウス etc) を用いて、その成果の分子細胞標的を同定できた。超音波診断装置 VEV02100 や分子標的造影剤 nanotracker を用いて、matrix metalloproteinase などの分子イメージングを行い機序を解明できた。

これらの成果から、「心筋虚血-再灌流部位選択的ナノ DDS は虚血-再灌流傷害を抑制し梗塞サイズを縮小する」という仮説を証明できた。さらに、ミトコンドリア傷害と炎症という2つの重大標的に同時に介入することによって、梗塞サイズが更に格段に縮小するという画期的成果が得られた。

2. 橋渡し研究としての覚醒ブタ心筋虚血-再灌流モデル：

従来の前臨床試験の課題であった全身麻酔・外科手術による交感神経の活性化、致死的不整脈や血行動態の異常変動を克服するために、申請者らは覚醒下に心筋虚血-再灌流実験を実施することに成功した。即ち、冠動脈にカフオクルーダーを装着し冠動脈の閉塞を制御し、テレメトリー装置を用いて血圧・心拍数・心電図を連続的に記録測定した。その結果、致死性不整脈は5%以下に激減した。スタチン封入ナノ粒子製剤やピオグリタゾン封入ナノ粒子製剤によって用量依存的に梗塞サイズが縮小することを明らかにした。このようなブタを用いた臨床橋渡し研究により、ナノ粒子製剤の有効性と安全性が確認されたことから、臨床ステージへ進むことが可能に点で重要な臨床的意義がある。現在、規制当局である PMDA に医師主導治験の実行可能性について相談中である。

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7件)

Nagaoka K, Matoba T, Mao Y, Nakano Y, Ikeda G, Egusa S, Tokutome M, Nagahama R, Nakano K, Sunagawa K, Egashira K: A New Therapeutic Modality for Acute Myocardial Infarction: Nanoparticle-Mediated Delivery of Pitavastatin Induces Cardioprotection from Ischemia-Reperfusion Injury via Activation of PI3K/Akt Pathway and Anti-Inflammation in a Rat Model. PLoS One. 2015; 10(7)、査読有、10.1371/journal.pone.0132451. eCollection 2015.

Ikeda G, Matoba T, Nakano Y, Nagaoka K, Ishikita A, Nakano K, Funamoto D, Sunagawa K, Egashira K: Nanoparticle-Mediated Targeting of Cyclosporine A Enhances Cardioprotection Against Ischemia-Reperfusion Injury Through Inhibition of Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening. Sci Rep. 2016; 6: 20467、査読有、10.1038/srep20467.

Matoba T, Egashira K: Nanoparticle-mediated drug delivery system for cardiovascular disease. Int Heart J. 2014; 55(4): 281-286、査読有、https://www.jstage.jst.go.jp/article/ihj/55/4/55_14-150/_article

Katsuki S, Matoba T, Nakashiro S, Sato K, Koga JI, Nakano K, Nakano Y, Egusa S, Sunagawa K, Egashira K: Nanoparticle-Mediated Delivery of Pitavastatin Inhibits Atherosclerotic Plaque Destabilization/Rupture in Mice by Regulating the Recruitment of Inflammatory Monocytes. Circulation. 2014; 129(8): 896-906、査読有、10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002870.

Matoba T, Sato K, Egashira K: Mouse models of plaque rupture. Curr Opin Lipidol. 2013; 24: 419-425、査読有、10.1097/MOL.0b013e3283646e4d.

江頭健輔、中野覚、松本拓也、前原喜彦: シーズ成果報告 医薬品 急性心筋梗塞症治療用ナノ粒子製剤の実用化のための橋渡し研究. 臨床評価 臨床評価刊行会 2013; 41(1): 68-71、査読無、なし

江頭健輔、中野覚、松本拓也、前原喜彦: シーズ成果報告 医薬品 虚血肢治療用低侵襲ナノ粒子製剤の実用化. 臨床評価

臨床評価刊行会 2013; 41(1): 72-74、査読無、なし

〔学会発表〕(計14件)

江頭健輔: 未解決の難治性心血管病に対する革新的ナノ医療の実用化臨床試験(出口を見据えた研究開発). 第38回日本バイオレオロジー学会年会(招待講演) 2015年6月6日、学術総合センター(国立情報学研究所)(東京)

Tokutome M, Matoba T, Nakano Y, Nakano K, Sunagawa K, Egashira K: Nanoparticles-Mediated Delivery of Pioglitazone Reduces Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Antagonizing Monocyte-mediated Inflammation in Preclinical Animal Models. Scientific Sessions 2014 of the American Heart Association、2014年11月15~19日、シカゴ(アメリカ)

Ichimura K, Matoba T, Nagahama R, Nakano K, Sunagawa K, Egashira K: Nanoparticle-Mediated Delivery of Pitavastatin into Small Pulmonary Arteries by Intravenous Administration Attenuated the Progression of Already Established Monocrotaline-induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. Scientific Sessions 2014 of the American Heart Association、2014年11月15~19日、シカゴ(アメリカ)

Ishikita A, Matoba T, Ikeda G, Mao Y, Nakano K, Sunagawa K, Egashira K: Nanoparticle-Mediated Targeting of a Mitochondria Division Inhibitor, Mdivi-1, to the Mitochondria Induces Cardioprotection from Ischemia-Reperfusion Injury. Scientific Sessions 2014 of the American Heart Association、2014年11月15~19日、シカゴ(アメリカ)

Ikeda G, Matoba T, Nakano K, Sunagawa K, Egashira K: Nanoparticle-Mediated Simultaneous Targeting to Mitochondria and Inflammatory Monocytes Confers. Scientific Sessions 2014 of the American Heart Association、2014年11月15~19日、シカゴ(アメリカ)

Egashira K: Nanoparticle-mediated targeting of pitavastatin for developing innovative therapeutic strategies in refractory cardiovascular diseases. The Annual Scientific Meeting of Taiwan Society

of Lipids & Atherosclerosis 2014 and The 14th Taipei International Vascular Biology Symposium(招待講演) 2014年09月14~15日、台北(台湾)

Ichimura K, Nakano K, Nagaoka K, Matoba T, Egusa S, Sunagawa K, Egashira K: Targeting of Pitavastatin into Reperfused Myocardium Reduces Ischemia-Reperfusion Injury in a Preclinical Porcine Model. The 18th International Vascular Biology Meeting(招待講演) 2014年04月14~17日、みやこめっせ(京都)

Egashira K: Nanoparticle-mediated Targeting of Pitavastatin for Developing Innovative Therapeutic Strategies in Refractory Cardiovascular Diseases. The 18th International Vascular Biology Meeting(招待講演) 2014年04月14~17日、みやこめっせ(京都)

江頭健輔: 臨床ニーズに基づく低侵襲医療機器開発と産学連携. 第8回医療機器産業研究会 新たな医療機器開発の方向性と産業戦略(招待講演) 2014年03月31日、損保会館(東京)

江頭健輔: 難治性心血管病に対する革新的ナノ医療の実用化と臨床試験. 榊原記念病院定例講演会(招待講演) 2013年10月21日、榊原記念病院(福岡)

Egashira K: Nanoparticle-mediated targeting of pitavastatin for developing innovative therapeutic strategies in refractory cardiovascular diseases. The Annual Scientific Meeting of Taiwan Society of Lipids & Atherosclerosis 2013(招待講演) 2013年09月14~15日、台北(台湾)

江頭健輔: 難治性心血管病に対する革新的ナノ医療の実用化と臨床試験. 第4回「新しい医療」講演会(招待講演) 2013年06月03日、グランド・ハイアット・福岡(福岡)

江頭健輔: 血管選択的DDS ナノ粒子製剤の開発による重症虚血肢に対する治療的血管新生の実用化. 第113回日本外科学会定期学術集会(招待講演) 2013年04月11日、福岡国際会議場(福岡)

江頭健輔: 難治性心血管病に対する革新的ナノ医療の実用化と臨床試験. 先端医療研究セミナー(招待講演) 2013年04月09日、慶應義塾大学(東京)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

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
循環器病未来医療研究センター・
循環器病先端医療研究開発学部門
http://www.med.kyushu-u.ac.jp/cardiol/1_sentaniryu/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江頭 健輔 (EGASHIRA, Kensuke)
九州大学 循環器病未来医療研究センター・
循環器病先端医療研究開発学部門・教授
研究者番号: 60260379

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

的場 哲哉 (MATOBA, Tetsuya)
九州大学病院・循環器内科・講師
研究者番号: 20448426