

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461131

研究課題名(和文) 虚血再灌流傷害の超低侵襲非臨床ブタモデルの新規開発とミトコンドリア標的ナノ医療

研究課題名(英文) Development of New Less Invasive Preclinical Conscious Mini-pig Model of Ischemia-reperfusion Injury and Mitochondria Targeting Nano-therapy

研究代表者

中野 覚 (Nakano, Kaku)

九州大学・循環器病未来医療研究センター・准教授

研究者番号：30420607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：再灌流療法の普及により、急性期の死亡率は減少した。しかし、再灌流が不可逆的な再灌流傷害を生じさせ、梗塞サイズの縮小効果を減少させる。ミニブタに対し外科的に左前下降枝にカフオクルーターを留置した。覚醒後、ピタバスタチン封入ナノ粒子製剤を静脈内投与し、左前下降枝を60分間閉塞させ、再灌流させた。24時間後に梗塞サイズを測定したところピタバスタチン封入ナノ粒子製剤群はピタバスタチン単独群と比し、梗塞サイズが有意に減少した。遠隔期においても左室リモデリングを抑制した。低侵襲覚醒ミニブタを用いたピタバスタチン封入ナノ粒子製剤は心筋虚血再灌流に対する心保護作用を有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Early reperfusion therapy is a standard strategy to reduce MI size. However, reperfusion induces ischemia-reperfusion (IR) injury, which reduces the therapeutic effects of reperfusion therapy. Mini-pigs were surgically implanted with a pneumatic cuff occluder at the left circumflex coronary artery. The LCx was occluded for 60 minutes, followed by 24 hours of reperfusion under conscious conditions. Intravenous administration of pitavastatin-NP containing of pitavastatin 5 minutes before reperfusion significantly reduced infarct size; by contrast, pitavastatin alone (8 mg/body) showed no therapeutic effects. Cardiac magnetic resonance imaging performed 4 weeks after IR injury revealed that pitavastatin-NP reduced the extent of left ventricle remodeling. NP-mediated delivery of pitavastatin to IR-injured myocardium exerts cardioprotective effects on IR injury without apparent adverse side effects in a preclinical conscious pig model.

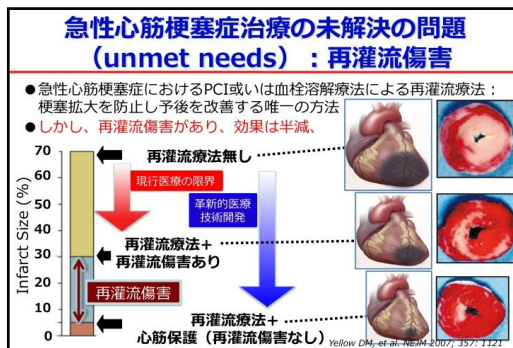
研究分野：循環器内科学

キーワード：分子心臓学 ナノメディシン

## 1. 研究開始当初の背景

急性心筋梗塞症 (AMI) を含む冠動脈疾患による全世界の年間死亡数は 720 万人 (WHO 統計 2012 年) であり、死因の第一位である。再灌流療法 (PCI など) の普及により、急性期の死亡率は減少した。しかし、再灌流そのものが不可逆的な心筋細胞壊死 (再灌流傷害) を生じさせ、梗塞サイズの縮小効果を減少させる。つまり、現行の医療で最善を尽くしても AMI 患者の長期予後は依然として改善されない未解決の課題 (unmet needs) が存在する。従って、再灌流傷害を抑制する革新的心筋保護作用療法の開発は重要な医学的課題である。

現在に至るまで、再灌流傷害抑制薬の開発成功例はない。非臨床試験の段階で 1) 十分な用量の検討がなされていない、2) 不適切な疾患モデル (麻酔下、開胸) を用いていたことが原因であり、再灌流傷害抑制薬を実用化するには、より患者の病態に近い疾患モデルを開発し、臨床応用を見据えた非臨床試験を実施することが重要である (ESC Position Paper, 2013)。



再灌流傷害には、再灌流に伴う酸化ストレスや心筋細胞内カルシウム過負荷、pH の急激な正常化などによる直接的な心筋細胞傷害や、これらに引き続き起るミトコンドリア膜透過性遷移孔 (mitochondrial permeability-transition pore : mPTP) の開口、および炎症が関わっている。この過程でアポトーシスや mPTP の開口を制御する Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK) pathway の活性化や、抗炎症作用が再灌流傷害を抑制する鍵として注目されている。現在までに様々な薬物による梗塞サイズ縮小効果が報告されているが、未だに臨床的に実用化されているものはない。中でもスタチン製剤は脂質低下作用の他に多面的効果 (pleiotropic effects) により梗塞サイズを縮小することが動物実験で示されている。スタチンの再灌流障害を抑制する機序としては RISK pathway の活性化や抗炎症作用、酸化ストレス作用などが関与していると考えられている。しかし、primary PCI を受ける AMI 患者に対する経口スタチンの効果をみた最近の報告では、梗塞サイズの縮小効果はみられなかった。この一因としては再灌流時に経口投与したのでは虚血領域で十分な血中薬物濃度が得られないことが考えられる。

従って、虚血部位に選択的にスタチンを送達できるような Drug delivery system (DDS) の開発が望まれる。我々は過去に薬物封入 poly-lactide-glycoide copolymer (PLGA) ナノ粒子を用いる事で薬物を病変に選択的に送達できることをウサギやマウスなどの下肢虚血モデルや静脈グラフト不全モデル、肺高血圧モデルで示した。また最近、我々はラットの虚血-再灌流モデルを用いて静脈内投与したピタバスタチン封入 PLGA ナノ粒子製剤が虚血-再灌流部位に選択的に送達され、用量依存性に梗塞サイズを縮小することを明らかにした。これらの基礎研究で PLGA ナノ粒子は血管透過性の亢進した組織や単球などの炎症細胞に取り込まれることで、病変に選択的に送達されることが明らかにされた。一方、ブタの心臓はサイズ、解剖学的特徴、心拍数などがヒトの心臓と類似していることから、近年、虚血-再灌流傷害の橋渡し研究においてはブタを用いた実験が行われており、様々な薬物、手技が再灌流傷害を抑制し梗塞サイズの縮小をもたらすことが示されている。しかし、これらは全て吸入ガス麻酔下で施行されており、吸入ガス麻酔薬自体による心筋保護作用の影響が無視できない。これらの結果を受け、本研究では非臨床試験として無麻酔下、心筋虚血-再灌流ミニブタモデルを作製し、ピタバスタチン封入ナノ粒子製剤による再灌流時の心筋梗塞サイズ縮小効果を検討する。従って、再灌流傷害の抑制には心筋保護が問題解決のための適切なアプローチである。我々は、ナノ医工薬学に基づいた生体吸収性ポリマー (PLGA) ナノ粒子によるナノ薬物送達システム (ナノ DDS) を開発してきた (Kimura, Nakano, Egashira. Circulation, 2008, Nakano, Egashira. JACC, 国際特許公開)。ラット虚血再灌流モデルにおいて、ナノ粒子を再灌流時に静脈内投与すると、虚血部位に選択的に集積することを確認した。また、虚血時の ROS 産生を模した過酸化水素刺激培養心筋細胞 (ミトコンドリア分画の蛍光) およびマウス心筋虚血部位 (透過型電子顕微鏡) においてミトコンドリアに選択的に送達されることを見出した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、患者の病態に近い虚血再灌流傷害の超低侵襲非臨床ブタモデルを開発し、我々が開発した「ナノ DDS 医療」を実用化することである。具体的には以下の 2 点を中心に研究開発を行った。

### (1). 虚血再灌流傷害の超低侵襲非臨床ブタモデルの開発

覚醒後 (閉胸、安静時) カフオクルーダーを閉塞させると ST 上昇が認められ、解剖学的にも心筋梗塞が生ずることを明らかにした。本研究開発では、麻酔薬による心筋保護や血行動態への影響を無くすために覚醒、安静時に心筋虚血再灌流傷害が可能な超低侵

襲非臨床ブタ虚血再灌流モデルを開発する。

## (2). ナノ DDS による新規医療の開発

すでにマウスモデルで有効性が認められたピタバスタチン封入ナノ粒子製剤を上記モデルを用いて、臨床試験での最適な用量・用法を探索し、ブタ非臨床 POC を取得し、臨床試験の橋渡しを行う。

本研究開発は、我々が世界に先行して開発した「ナノ DDS 技術」を駆使して心筋虚血再灌流傷害の革新的ナノ医療の実用化を目指すものである。

本研究開発で用いるナノ粒子の特許は既に出願している。製造工程に独自性があり、他の研究者らが模倣することは困難である。超低侵襲ブタモデルは、より臨床に近い状況で薬効を評価することが可能であり、臨床試験で POC 取得する可能性が格段に増加する。九州大学病院 ARO 次世代医療センターと連携し、本基礎研究から橋渡し研究、臨床試験とシームレスな開発戦略を立ててナノ医療の実用化を目指す。新規ナノ DDS によって有効な治療法の無い「心筋虚血再灌流傷害」を心筋保護により抑制し、心保護作用が実現されれば、臨床的意義は大きい。

## 3. 研究の方法

本研究開発では心筋虚血再灌流傷害に対する超低侵襲非臨床ブタモデルの開発を行い「ナノ DDS 医療」の非臨床 POC を取得し、臨床試験実施への橋渡しの基盤とする。

ブタの心臓は大きさ、解剖学的特徴、心拍数、血行動態などがヒトの心臓と類似していることから、臨床への橋渡し研究においてはブタを用いた薬効評価が重要である (Nakano, Egashira. JACC, 2009, Tsukie, Nakano. J Atheroscler Thromb, 2012)。

ミニブタ (4~6 ヶ月以上、体重 10~15 kg、雄) を購入、飼育および馴化を行い、異常がないことを確認した上で試験に供した。飼育室は温度 18~26 °C、湿度は 40~70%、12 時間照明 (6:30~18:30) に設定した。給餌は固定飼料を 1 日 2 回、飲水は自動給水装置により水道水を自由に与えた。ミニブタはケタミン投与により麻酔導入した。気管チューブを挿管し、イソフルラン気化器に接続した麻酔器にて麻酔を維持した。肋間切開にて開胸し、心膜を切開して心臓を露出させた。カフオクルーダーを左回旋枝に取り付け、心電図電極を胸部右外側部皮下と腹部左外側部皮下に留置した。血圧測定用カテーテルを左大腿動脈より腹部大動脈内に挿入した。血圧、および心電図のテレメトリー送信機の本体は腹腔内の腹壁に固定した。また、薬物投与および採血用のカテーテルを左頸静脈に挿入し、その対側を皮下を通して背部に出し、カテーテル内はヘパリンナトリウム添加整理食塩水で満たした上で、皮膚に固定した。手術後には抗菌薬 (セファメジン) を筋肉内投与

した。術翌日 (約 16 時間後) 無麻酔下にカフオクルーダーを用いて LCx を閉塞した。心臓が虚血状態であることを心電図の ST 上昇により確認した。虚血発生 60 分後にカフオクルーダーを解放して再灌流させた。

## (1). ピタバスタチン封入ナノ粒子製剤の梗塞サイズ縮小効果

すでに、ブタ虚血再灌流傷害の超低侵襲非臨床ブタモデルを用いてピタバスタチン封入ナノ粒子製剤のブタ心筋虚血再灌流モデルへの静脈内単回投与で梗塞サイズの縮小効果を認め、さらに、心電図異常 Q 波の出現防止が軽減される事を確認した。一方、ピタバスタチン単独を 8 mg/body 投与した場合は梗塞サイズの縮小は確認されなかった。よって、本研究開発ではさらに、マウスモデルで有効性が得られたピタバスタチンカルシウムとして 4、8、16 および 32 mg/body の用量でブタ虚血再灌流モデルにおいて有効性を確認し、非臨床 POC を取得し、医師主導治験での最適な臨床用量・用法を探索する。

## (2). 代償性心拡大 (心臓リモデリング) の評価

高精度心エコー装置 (Philips 社製) 血管造影装置 (Philips 社製) を駆使し、3 次元イメージングによって心筋虚血再灌流モデル作製前から投与後 4 週まで経時的に心機能、心筋灌流、微小血管形態等の解析を生体レベルで評価する。CsA-NP のミトコンドリアへの作用を明らかにするため、形態学的解析 (顕微鏡) を行う。

## (3). 薬物動態の解明

臨床試験の実施に必須な薬物動態試験を行う。薬物動態はバリデートされた LC/MS/MS の分析システムを用いて行う。カテーテルを用いて経時的に心筋をサンプリングし、同一個体での組織内 CsA 濃度の経時変化を解明する。

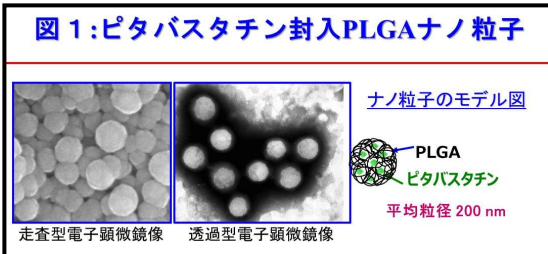
## (4). テレメトリスシステムを用いた血行動態評価

CsA-NP の血行動態の改善を経時的に確認するため、自由活动下においてテレメトリスシステム (Primetech) を用いて血圧および心電図変化、不整脈発生頻度を計測する。いずれも大動物 (ブタ) を用いないと不可能な研究であり、臨床試験 (治験) 実施時の重要な基礎データを得る。

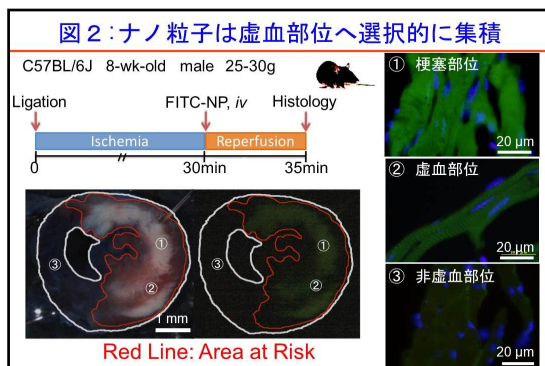
## 4. 研究成果

平均分子量 20,000 で乳酸:グリコール酸比が 75:25 の共重合体からなる PLGA (和光純薬工業株式会社、大阪) をナノ粒子の基材として、ポリビニルアルコール (PVA-403; クラレ、大阪) を分散材として使用した。蛍光マーカー、フルオレセインイソチオシアネート (FITC; 同仁化学、東京) を封入した PLGA ナノ粒子 (FITC-NP) またピタバスタチンカルシウムを封入した PLGA ナノ粒子を、水中エマルジョン溶媒拡散法により製造した。

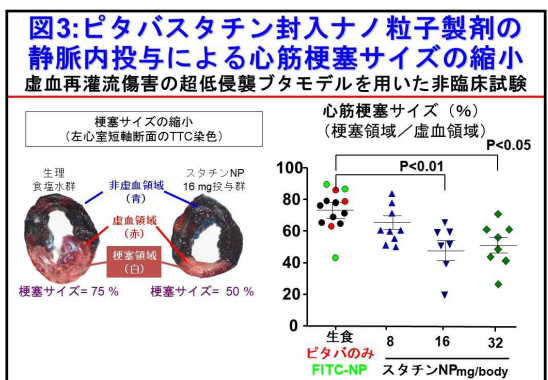
FITC-NPは4.0%(重量比)のFITCを含有し、ピタバスタチン封入ナノ粒子製剤は10%(重量比)のピタバスタチンカルシウムを含有した。蒸留水に懸濁したナノ粒子のサンプルを粒径解析のために用いた。平均粒径はいずれも200nmであった。粒子表面の電荷解析はZetasizer Nano(シスメックス、兵庫)を用いて行い、いずれもアニオン性であることを確認した(図1)。



次に、マウス虚血再灌流モデルにおいて、ナノ粒子を再灌流時に静脈内投与すると、虚血部位に選択的に集積することを確認した(図2)。また、虚血時のROS産生を模した過酸化水素水刺激培養心筋細胞(ミトコンドリア分画の蛍光)およびマウス心筋虚血部位(透過型電子顕微鏡)においてミトコンドリアに選択的に送達されることを見出した(図2)。



さらに、本研究開発において、患者の病態に近い虚血再灌流傷害の超低侵襲非臨床ブタモデルを開発するとともに、薬剤封入PLGANANO粒子製剤の非臨床POCを取得した。具体的には、覚醒後(閉胸、安静時)カフオクルーダーを閉塞させるとST上昇が認められ、解剖学的にも心筋梗塞が生ずることを明らかにした。生理食塩水群、FITCナノ粒子群、ピタバスタチンカルシウム群およびピタバスタチン封入ナノ粒子製剤群を設けた。コントロール群



(生理食塩水群およびFITCナノ粒子群)と比しピタバスタチンカルシウムとして8、16および32mg/body群において梗塞サイズが有意に減少することを明らかにした(図3)。一方、ピタバスタチンカルシウム原体8mg/body群は梗塞サイズを減少させなかった。このことから臨床試験における適切な用量はヒトの体重を60kgと換算した場合、8-16mg/bodyが至適用量であると考察される。

**薬物動態**  
血漿中および心臓組織でのピタバスタチン濃度をLC-MS/MSにて測定を行った。血漿中のCmaxは941±341、AUCは521±106であった。心臓組織においては、ピタバスタチン単独群とピタバスタチン封入ナノ粒子製剤投与群において有意な差は認められなかった。

**血行動態評価**  
虚血再灌流前後、テレメトリスシステムを用いて、血圧、心電図、心拍数を経時的にモニターした。いずれの群においても臨床的に意義のある変化は認められなかった。

**結論**  
ナノ粒子製剤によるピタバスタチンの虚血再灌流領域に対するDDSは本研究開発によって作製されたミニブタモデルにおいて、重篤な副作用無く、心保護作用が得られることが明らかになった(非臨床POC取得)。将来的に、本ナノ粒子製剤を心筋梗塞患者に対して承認申請されるよう橋渡し研究を行っていく予定である。

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6件)  
Mao Y, Koga J, Tokutome M, Matoba T, Ikeda G, Nakano K, Egashira K, Nanoparticle-mediated delivery of pitavastatin to monocytes/macrophages inhibits left ventricular remodeling after acute myocardial infarction by inhibiting monocyte-mediated inflammation. Int Heart J. 査読有、印刷中、2017

Nakano Y, Matoba T, Tokutome M, Funamoto D, Katsuki S, Ikeda G, Nagaoka K, Ishikita A, Nakano K, Koga J, Sunagawa K, Egashira K, Nanoparticle-Mediated Delivery of Irbesartan Induces Cardioprotection from Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Antagonizing Monocyte-Mediated Inflammation. Sci Rep. 査読有、6、2016、29061、DOI: 10.1038/srep29601.

Ishikita A, Matoba T, Ikeda G, Koga J, Mao Y, Nakano K, Takeuchi O, Sadoshima J, Egashira K,

Nanoparticle-Mediated Delivery of Mitochondrial Division Inhibitor 1 to the Myocardium Protects the Heart From Ischemia-Reperfusion Injury Through Inhibition of Mitochondria Outer Membrane Permeabilization: A New Therapeutic Modality for Acute Myocardial Infarction.、 J Am Heart Assoc.、 査読有、 5(7)、 2016、 e003872、 DOI: 10.1161/JAHA.116.003872.

Ichimura K, Matoba T, Nakano K, Tokutome M, Honda K, Koga J, Egashira K, A Translational Study of a New Therapeutic Approach for Acute Myocardial Infarction: Nanoparticle-Mediated Delivery of Pitavastatin into Reperfused Myocardium Reduces Ischemia-Reperfusion Injury in a Preclinical Porcine Model.、 PLoS One.、 査読有、 11(9)、 2016、 e0162425、 DOI: 10.1371/journal.pone.0162425.

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.、 査読有、 10(7)、 2016、 20467、 DOI: 10.1038/srep20467.

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.、 査読有、 2015、 e013451、 DOI: 10.1371/journal.pone.0132451.

〔学会発表〕(計1件)

中野覚、松本拓也、的場哲哉、前原喜彦、中西洋一、白源正成、入江伸、江頭健輔：新規ナノ DDS の研究開発およびナノ医療の創製、第二回 J-ISCIP 学術集会 国際心血管薬物療法学会日本分会（招待講演）2016年06月25日～26日、阿波観光ホテル（徳島県・徳島市）

〔図書〕(計1件)

Nakano K, Koga J, Egashira K, Therapeutic Angiogenesis. Chapter 16; Nanoparticle-mediated Endothelial Cell-selective Drug Delivery System. Springer. 2017、印刷中

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://cdic.kyushu-u.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中野 覚 (NAKANO, Kaku)

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・准教授

研究者番号：30420607