

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 2 5 年 5 月 2 0 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390160

研究課題名（和文） 血管内皮細胞選択的ナノ DDS 技術を基盤とする革新的治療的血管新生療法の創製

研究課題名(英文) the development of novel therapeutic arteriogenesis by nanoparticle-mediated endothelial cell selective delivery system

研究代表者

江頭 健輔 (EGASHIRA KENSUKE)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：60260379

研究成果の概要（和文）：

日本は超高齢社会を迎え、重症虚血性疾患が激増している。現行の医療の治療効果は限界がある。本研究の目的は、我々が開発した「血管内皮細胞選択的ナノ DDS 技術」を活用して、重症虚血性疾患に対する革新的治療的血管新生療法を開発することである。研究成果に示したように、ヒト細胞実験と複数のモデル動物（マウス、ウサギ、サル）において有効性と安全性を明らかにした。今後は、実用化を目指して橋渡し研究を推進する。

研究成果の概要（英文）：

Currently, there is no effective medicinal therapy for severe ischemic diseases such as critical limb ischemia (CLI). We hypothesized that nanoparticle (NP)-mediated cell-selective delivery of statins to vascular endothelium would more effectively and integratively induce therapeutic arteriogenesis.

In a murine hindlimb acute ischemia model, intramuscular injection of polymeric NP resulted in cell-selective delivery of NP into the capillary and arteriolar endothelium of ischemic muscles for up to 2 weeks postinjection. NP-mediated statin delivery significantly enhanced recovery of blood perfusion to the ischemic limb, increased angiogenesis and arteriogenesis, and promoted expression of the protein kinase Akt, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and angiogenic growth factors. These effects were blocked in mice administered a nitric oxide synthase inhibitor, or in eNOS-deficient mice. In addition, similar therapeutic arteriogenesis was noted in rabbit and monkey models of hindlimb chronic ischemia.

In summary, NP-mediated cell-selective statin delivery may be a more effective and integrative strategy for therapeutic arteriogenesis in patients with severe organ ischemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：分子血管病態学、ナノテクノロジー、DDS、治療的血管新生

1. 研究開始当初の背景

日本は超高齢・成熟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、末梢動脈疾患 etc）が増加し、死因と医療費、寝たきりの原因の主たる比率を占めている。その中でも重症虚血性疾患（虚血性心不全、虚血肢）はQOLを著しく障害するだけでなく、予後不良の疾患である。現行の最善の治療を行っても症状が改善しない重症虚血性疾患の生存率は著しく不良（1年死亡率、重症虚血心=30%、重症虚血肢=25%）であり、癌患者の平均生存率より悪い。

一方、超高齢・成熟社会からの要請として、重症虚血性疾患に対する先端医療開発に基づく革新的低侵襲医療の実現が期待されている。重症虚血性疾患に対して側副血行路（arteriogenesis）を発達させることによって虚血組織の血流を回復させることを目指した“治療的血管新生療法”は、患者のQOLを改善し生命予後を向上させることが期待されることから、世界的に注目され臨床試験が実施された（総説：Losordo DW, Dimmeler S. *Circulation*. 2004;109:2487-2491）。

腫瘍血管新生（tumor angiogenesis）の分子細胞機序に則り血管増殖因子（VEGF, FGF, HGF のタンパク質あるいは遺伝子）を虚血組織に局所投与、あるいは、内皮前駆細胞等を投与する方法が基盤コンセプト（仮説）として30年前に提案された。しかし、期待に反して、臨床試験で有られた効果は殆ど無いか、有っても軽度であり、現時点で決定的な治療法として普及するには至っていない。その理由として、1）現行の方法では、血管新生（angiogenesis, vasculogenesis）は誘導されても側副血行路（arteriogenesis）が発達しないため血流回復が充分得られない；2）増量しても大きい効果を得られない、副作用

が生じる；3）患者から得られる細胞の血管新生能が著しく低下している、等が挙げられる。

そのため、腫瘍血管新生の機序に則った上記コンセプトは反省期にあるといえる。

これらの問題を克服し、イノベーション創出をもたらすには、虚血によって誘導される側副血行路（arteriogenesis）の分子細胞メカニズムに則り内因性血管新生因子の機能を統合的に制御する新たなドラッグデリバリーシステム（DDS）技術の開発が必須である。

申請者らは、治療的血管新生の過程において血管内皮細胞が最も重要な役割を果たすことから「血管内皮細胞選択的DDS技術」が問題解決のためのアプローチとして適切と考えた。そこで、ナノ工学融合技術を動員して本ナノDDS技術の開発に成功した。

また、ナノ粒子に封入する治療因子として内皮細胞を標的として血管新生促進作用を有するHMG-CoA還元酵素阻害剤（スタチン）を選択した。現在上市されている6種類のスタチンの中で最も血管新生作用が強いピタバスタチンを選択した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が開発した独自の「血管内皮細胞選択的ナノDDS技術」を活用して、重症虚血性疾患（重症虚血心、心不全、虚血肢 etc）に対する革新的低侵襲治療的血管新生療法を実現することである。ピタバスタチン封入ナノ粒子製剤開発の薬効薬理試験、製剤開発、等を実施し、重症虚血性疾患に対する探索的臨床試験の基盤とする。

3. 研究の方法

本研究では、以下の3点を明らかにするための研究計画を立案した。

1. 血管内皮細胞選択的DDS技術の検証と機序の解析
2. ピタバスタチンの血管内皮細胞選択的DDSの有効性試験
3. 上記成果の臨床橋渡し研究をウサギと霊長類モデルで実施

【研究体制と役割分担】

江頭が研究を総括する。中野と的場が細胞実験、動物実験、病理組織学解析等を担当する。

4. 研究成果

(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) 製ナノ粒子を作製した。蛍光マーカー (FITC)、あるいは、ピタバスタチンを封入した、平均粒径 200 nm の PLGA ナノ粒子を作製できた。臨床治験にも使用できる適正医薬品製造基準 (Good Manufacturing Practice) のピタバスタチン封入ナノ粒子製剤を製造した。

(2) 蛍光マーカー FITC (fluorescein isothiocyanate) 封入ナノ粒子の内皮細胞への選択的導入とピタバスタチン封入ナノ粒子の効果：

- ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) に FITC ナノ粒子を添加して 1 時間後、ナノ粒子が効率的に導入されることを確認した (導入効率=99-100%)。導入細胞を継続して培養した結果、FITC 陽性細胞が 3 日後、7 日後にも観察された。このことは、ナノ粒子がヒト血管内皮細胞に取り込まれ安定して長期間停留することを示唆する。
- 細胞内導入効率を血管内皮細胞と骨格筋筋肉細胞間で比較し、血管内皮細胞選択的導入を明らかにした。即ち、本ナノ粒子の血管内皮細胞選択的DDSの分子細胞機序にエンドサイトーシスが関与することを明らかにした。
- HMG-CoA 還元酵素阻害剤 (スタチン) は、血清コレステロール低下薬として世界的に用いられている。一方、スタチンはコレステロール低下作用とは独立した多面的な血管保護作用 (pleiotropic effects) を有する。その一つに血管新生促進作用があり、実際にスタチンの全身投与によって虚血組織の血管新生が促進されることが動物実験で報告されている。その作用機序として、eNOS 発現量ならびに活性の増加が関与する。しかし、スタチン間で血管新生促進能に差があるかどうかは不明である。そこで、ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) のスクラッチアッセイを用いて内皮再生能を評価し、ピタバスタチンがもっとも強力な血管内皮細胞再生能を有していた。

- HUVEC の血管新生アッセイ系を用いて、ピタバスタチン封入ナノ粒子の効果を評価した。ピタバスタチン封入ナノ粒子は、ピタバスタチンだけでは血管新生作用が生じない低濃度で血管新生効果を誘導した。ピタバスタチン封入ナノ粒子が細胞内に送達された後、ピタバスタチンが徐放 (細胞内 DDS) されることによって血管新生作用が惹起されたものと考えられる。

(3) マウスモデル実験：

マウス片側下肢虚血モデルを作製し、対照 (PBS 投与) 群、FITC 封入ナノ粒子投与群 (0.18 mg/100 μ L PLGA)、ピタバスタチン単独投与群 (0.01 mg/100 μ L, 0.4 mg/kg)、ピタバスタチン封入ナノ粒子投与群 (0.18 mg/100 μ L, 0.01 mg のピタバスタチン含有 PLGA) の 4 群に分け、それぞれの群でマウス下肢虚血モデルを作製時に下肢の 4 カ所に筋肉内注射を施し、3, 7, 14 日後に組織血流量を測定した。

内皮一酸化窒素 (NO) 合成の関与を明らかにするために、NO 合成酵素阻害剤である L-NAME の効果や eNOS 遺伝子欠損マウスを用いた。その結果、ピタバスタチン封入ナノ粒子治療による治療的血管新生の分子機序に eNOS 発現増強、血管増殖因子発現増強、が必須であることが明らかになった。

(4) ウサギモデル実験：

臨床応用に向けてウサギモデルでの評価を行った。このモデルの利点は、ヒトの閉塞性動脈硬化症患者と同様に、1) 慢性虚血モデルであること (マウスモデルは急性虚血である)；2) 側副血行路の発達を血管造影で検出できること、3) その機能を解析できること、である。

日本白色ウサギを用いて慢性下肢虚血モデルを作製した。下肢虚血誘導後 7 日目に生食、FITC 封入ナノ粒子、ピタバスタチン、あるいは、ピタバスタチン (0.5 mg/kg) 封入ナノ粒子を虚血筋肉に注射した。

FITC 封入ナノ粒子は 4 週間に渡り虚血筋肉の内皮細胞内皮細胞で検出されたことから、本ナノ粒子が虚血組織の血管内皮細胞に送達され、長く停留することが明らかになった。ピタバスタチン封入ナノ粒子投与群において血管造影で確認できる側副血行路の誘導が証明された。他の 3 群では側副血行路の誘導は確認できなかった。

さらに、ピタバスタチン封入ナノ粒子投与群においてのみ、電気刺激による筋肉運動によって誘発される虚血が予防された。このことは、ピタバスタチン封入ナノ粒子投与によって機能的な側副血行路が発達したことを示唆する。

(5) 霊長類 (サル) 下肢虚血モデル実験：

臨床応用に向けてサルモデルでの評価を行

った。このモデルの利点は、ヒトの閉塞性動脈硬化症患者と同様に、1) 慢性虚血モデルであること(マウスモデルは急性虚血である)、2) 側副血行路の発達を血管造影で検出できること、3) その機能を解析できること、である。

カニクイザル(3-4歳、体重4kg)を用いて下肢虚血モデルを作製した。ピタバスタチン封入ナノ粒子の側副血行路の発達に対する効果は血管造影法ならびにアンジオCT(Siemens社製ヘリカルCT、SOMATOM Sensation16)を用いて評価した。

下肢虚血誘導後7-10日目に生食、FITC封入ナノ粒子、ピタバスタチン、あるいは、ピタバスタチン(0.5mg/kg)封入ナノ粒子を虚血筋肉に注射した。ピタバスタチン封入ナノ粒子投与群において血管造影ならびにアンジオCTで確認できる側副血行路の誘導が証明された。他の3群では側副血行路の誘導は確認できなかった。

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8件)

- ① Nagahama R, Egashira K (6番目), 他4名: Nanoparticle-Mediated Delivery of Pioglitazone Enhances Therapeutic Neovascularization in a Murine Model of Hindlimb Ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32(10): 2427-2434.
DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.253823
- ② 的場哲哉、江頭健輔: ナノ粒子DDSを用いた血管新生治療法の開発 *Bio Clinica* 北隆館 2013; 28(5): 35-39
- ③ Chen L, Egashira K (11番目), 他9名: Nanoparticle-Mediated Delivery of Pitavastatin Into Lungs Ameliorates the Development and Induces Regression of Monocrotaline-Induced Pulmonary Artery Hypertension. *Hypertension.* 2011; 57(2): 343-350.
- ④ Masuda S, Egashira K (11番目), 他9名: Imatinib Mesylate-Incorporated Nanoparticle-Eluting Stent Attenuates In-Stent Neointimal Formation in Porcine Coronary Arteries. *J Atheroscler Thromb.* 2011; 18(12): 1043-1053
- ⑤ 中野覚、江頭健輔: 「血管内皮細胞選択的ナノDDS技術」を活用した低侵襲ナノ医療の開発. 臨床評価 臨床評価刊行会 2011; 39(2): 300-304
- ⑥ Oda S, Egashira K (8番目), 他6名: Nanoparticle-Mediated Endothelial Cell-Selective Delivery of Pitavastatin Induces Functional Collateral Arteries (Therapeutic Arteriogenesis) in a Rabbit Model of Chronic Hindlimb Ischemia. *J Vasc Surg.* 2010; 52(2): 412-420.
- ⑦ 中野覚、江頭健輔: 総説 ナノテクノロジーの循環器疾患への応用. 呼吸と循環 医学書院 2010; 58(5): 495-501
- ⑧ 江頭健輔: 血管医学から先端医療研究開発への展開. 血管医学 メディカルレビュー社 2010; 11(3): 55(227)-62(234)

[学会発表](計16件)

- ① Egashira K: Nanoparticle-mediated delivery of pitavastatin via pulse infusion drug delivery catheter attenuates neointima formation after balloon injury in porcine coronary arteries, The 4th Oriental Congress of Cardiology & The 5th AICT (招待講演) (2012年5月26日、上海国際会議中心、中国)
- ② Egashira K: Nanotechnology-Based DDS for Patients with Critical Limb Ischemia, The 2012 Annual Scientific Meeting of Taiwan Society of Lipids and Atherosclerosis (招待講演) (2012年9月23日、台北市福華國際文教會館、台湾)
- ③ 江頭健輔: ナノテクノロジーを用いた drug delivery system (ナノDDS) による心血管病に対する革新的治療実用化、第32回日本川崎病学会・学術集会(招待講演) (2012年10月13日、品川インターシティホール)
- ④ 江頭健輔: ナノテクノロジーを基盤とする動脈硬化プラーク破綻と虚血-再灌流傷害に対する新しい治療法の開発、第44回日本動脈硬化学会総会・学術集会(招待講演) (2012年7月20日、ヒルトン福岡シーホーク)
- ⑤ Egashira K: Impact of nanotechnology-based endothelial cell-selective delivery of pitavastatin for therapeutic angiogenesis in critical limb

- ischemia, XVI International Symposium on Atherosclerosis (Invited lecture) (2012年3月28日、Sydney Convention and Exhibition Centre、オーストラリア)
- ⑥ 江頭健輔：血管内皮細胞選択的ナノ DDS 技術を活用した重症虚血性疾患に対する革新的低侵襲ナノ医療、重症下肢虚血治療検討会 (2012年3月10日、グランド・ハイアット・福岡)
- ⑦ 江頭健輔：「ナノテクノロジー」を基盤とする新しい PCI デバイス、治療的血管新生と心筋梗塞治療-日本初の独創的医療機器・医薬品の開発を目指して-、第2回 Strategy and Treatment For Cardiovascular Disease (2012年2月25日、倉敷国際ホテル)
- ⑧ Egashira K : Nanotechnology-based endothelial cell selective DDS for therapeutic neovascularization, The Second Pacific Symposium on Vascular Biology (Invited lecture) (2011年11月1日、THE SHILLA JEJU、韓国)
- ⑨ 江頭健輔：ナノテクノロジーを基盤とする新しい治療的血管新生療法と心筋保護-日本初の独創的なナノ治療の実用化を目指して-、The 12th Vascular and Brain Conference 21世紀における血管病治療の新展開 (2011年9月30日、帝国ホテル大阪)
- ⑩ Egashira K : A New Therapeutic Modality for Ischemia-Reperfusion Injury: Nanoparticle-Mediated Delivery of Pitavastatin into Reperfused Myocardium Reduced Ischemia/Reperfusion Injury in Rats, The Annual Scientific Meeting of Taiwan Society of Lipids and Atherosclerosis 2011 and The 11th Taipei International Vascular Biology Symposium (Invited lecture) (2011年9月18日、振興医療財団法人振興醫院第二醫療大樓5樓、台湾)
- ⑪ Egashira K : Impact of nanotechnology-based endothelial cell-selective delivery of pitavastatin for therapeutic arteriogenesis in critical limb ischemia, The 9th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology (Symposium) (2011年8月25日、The Westin Chosun Busan、韓国)
- ⑫ Egashira K : New evidences: Phase IV trials and ongoing & future studies with pitavastatin, New evidences: Phase IV trials and ongoing & future studies with pitavastatin (Invited lecture) (2011年5月13日、CCIB-CENTRO DE CONVENCIONES INTERNACIONALES DE BARCELONA、スペイン)
- ⑬ Egashira K : Impact of Nanotechnology-based Drug Delivery on Treatment of Cardiovascular Disease, The Annual Scientific Meeting of Taiwan Society of Lipids and Atherosclerosis 2010 and The 10th Taipei International Vascular Biology Symposium (2010年8月15日、振興医療財団法人振興醫院第二醫療大樓6樓國際會議廳、台湾)
- ⑭ Egashira K : A new treatment for CAD: Nanotechnology-based Arteriogenesis and Angiogenesis, The 4th Oriental Congress of Cardiology & The 5th AICT (2010年5月30日、上海国際会議中心、中国)
- ⑮ 江頭健輔：血管内皮細胞選択的ナノ DDS 技術」を基盤とする革新的低侵襲治療的血管新生療法の実現のための橋渡し研究、第32回ヒューマンサイエンス バイオインターフェース-創薬のための知的相互交流- (2010年5月19日、全理連ビル)
- ⑯ Egashira K : Impact of nanotechnology-based selective delivery of pitavastatin for the development of innovative treatment of ischemic cardiovascular diseases, 7th Metabolic Syndrome, Type II Diabetes and Atherosclerosis Congress (2010年5月14日、La Salle des Ambassadeurs、モロッコ)
- 〔図書〕 (計1件)
- ① 江頭健輔、的場哲哉：ナノテクノロジー-血管生物医学事典 血管生物医学会 2011 ; 435-436
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計0件)

○取得状況 (計 1 件)

名称：スタチン封入ナノ粒子含有医薬組成物
発明者：江頭健輔
権利者：江頭健輔、九州大学
種類：特許
番号：第 4881385 号
取得年月日：平成 23 年 12 月 9 日
国内外の別：国内登録、国外審査中

[その他]

ホームページ等

http://www.med.kyushu-u.ac.jp/cardiol/1_sentaniryo/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江頭 健輔 (EGASHIRA KENSUKE)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：6 0 2 6 0 3 7 9

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：