

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：14401
研究種目：挑戦的研究(萌芽)
研究期間：2017～2018
課題番号：17K19659
研究課題名(和文) 劇症型心筋炎に対する診断と治療の一体化開発

研究課題名(英文) Theranostic Development for myocarditis.

研究代表者

松崎 高志 (Matsuzaki, Takashi)

大阪大学・医学系研究科・特任講師(常勤)

研究者番号：90456939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、有効な診断・治療法がなく致死率が高い劇症型心筋炎に対し、ナノリポソームをプラットフォームとしたDDS技術を用い、診断と治療の一体化開発を目的とした。1) Gdキレート脂質を合成し、Gd標識リポソームの製造法を確立した。Gdリポソームは高い血中滞留性を示し、心筋炎心臓へ高濃度のGdを送達することから、MRIによる心筋炎の診断に有用となる可能性が示唆された。2) nAChR選択的アゴニストを内包リポソームの製造法を確立した。アンタゴニスト内包リポソームは心筋炎心臓への高い薬剤送達能を示し、心機能を有意に改善させたことから、心筋炎の新規治療薬として有用となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、有効な診断・治療法がなく致死率が極めて高い劇症型心筋炎に対し、ナノリポソームをプラットフォームとしたDDS技術を用い、診断と治療を一体化して開発するもので、劇症型心筋炎のアンメットメディカルニーズの解決に挑戦する高い社会的意義を有する。また、ナノリポソームDDSを診断法と治療法の共通プラットフォーム技術として利用することで、これまでの医療において別々の概念であった診断と治療が融合した全く新しい医療概念「Theragnosis (therapy + diagnosis)」を確立し、安心・安全な医療サービスを社会に提供することに貢献する。

研究成果の概要(英文)： In this study, using the nano-liposome-based platform DDS technology, we addressed the theranostic development for fatal myocarditis, where there are still unmet needs for specific diagnosis and effective treatment. First, we optimized the formulation and the production conditions for Gd-labeled liposome by microfluidic technique. The Gd liposome showed elevated blood retention and efficient delivery of Gd to the myocardial heart. These results suggest that Gd liposome may be valuable for early diagnosis of myocarditis with magnetic resonance imaging.

Second, we optimized the formulation and the production conditions for alpha7 nAChR agonist encapsulated liposome with microfluidic technique. The agonist liposome revealed significant increase in the level of agonist in myocardial heart and ameliorated cardiac functions in rat autoimmune myocarditis model. These results suggest that the agonist liposome may be a promising therapeutic strategy for the treatment of myocarditis.

研究分野：DDS、循環器内科

キーワード：心筋炎 DDS 診断と治療 nAChR選択的アゴニスト Gd

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

劇症型心筋炎は心筋を主座とした苛烈な炎症性疾患で、血行動態の急激な破綻により致死率が40%を超える重篤な予後不良の疾患である。そのため、早期診断による治療開始が重要であるが、特徴的な臨床所見がないため、リスクが高く診断精度の低い心筋生検に依存している。また、その主要な病因となるウイルス感染と自己免疫異常の鑑別は困難な場合が多く、自己免疫性に効果のある免疫抑制剤はウイルス感染を増悪するため、実地臨床では治療法選択に難渋し、治療タイミングを逸することが多い。そのため、(1)劇症型心筋炎の特異的診断法の開発、(2)ウイルス性・自己免疫性の何れにも有効な治療薬の開発は、重要なアンメットメディカルニーズとなっている。

このような中、申請者らは、劇症型を呈するラット自己免疫性心筋炎モデルにおいて、炎症による心臓の血管透過性の亢進を利用したDDSにより、(1)全身静脈内投与したナノリポソームが心筋炎心臓の炎症部位へ特異的に集積する、(2)免疫抑制剤FK506を内包するリポソーム製剤が、自己免疫性的心筋炎に対し有効な治療薬となることを示した(Okuda et al. PLoS One 2016)。本成果は、劇症型心筋炎に対するナノリポソームDDSの有効性を世界に先駆けて示したもので、ナノリポソームが治療薬としてのみならず、イメージング診断薬としても利用できる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、未だ有効な診断・治療法がなく致死率が極めて高い劇症型心筋炎に対し、ナノリポソームによる炎症部位へのdrug delivery system (DDS)を利用して、革新的な早期診断法と治療法を一体化して開発することを目的としている。診断法と治療法に同一プラットフォーム技術(ナノリポソームDDS)を用いることで、診断によって治療有効性を直接評価することが可能となり、根拠に基づく治療が可能となる。本研究は、ナノリポソームDDSの利用により、これまで別々であった診断と治療が一つに融合した新しい医療概念「Theragnosis (therapy + diagnosis)」の確立を目指すことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) Gd キレート脂質の開発

Gd と血中安定性の高いキレート複合体を形成する 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA)を、phosphoethanolamine (PE)類またはコレステロールに架橋結合したDOTA修飾脂質(キレート脂質)を合成する。Gdをキレート結合させ、Gd標識脂質(Gdキレート脂質)を作成する。

(2) Gd キレートリポソーム(Gdリポソーム)のインライン製造法の確立

市販リポソーム製剤の組成を参考にGdキレート脂質を5~15%程度添加し、平均粒子径が約100nmとなる製造条件(脂質組成、有機溶媒濃度、反応温度、流速、凍結乾燥条件)を最適化する。

(3) Gdリポソームの物性評価

物性評価:平均粒子径、粒度分布、相転移温度、Gd量、脂質量、残留溶媒量を測定する。

(4) nAChR 選択的アゴニスト内包リポソーム(アゴニストリポソーム)の製造法の確立

脂質組成および製造条件の最適化:市販リポソーム製剤Doxil[®]およびAmbisome[®]の脂質組成を元に、平均粒子径が100nm程度のアゴニストリポソームのインライン製造条件(脂質組成、有機溶媒濃度、反応温度、流速、凍結乾燥条件)を最適化する。

(5) アゴニストリポソームの物性評価

平均粒子径、粒度分布、相転移温度、アゴニスト量、脂質量等を測定し、物性評価を行う。

(6) Gdリポソームの薬物動態評価

血中動態評価:正常マウス(ラット)へ静脈内投与後の血中動態を、GdのICP-AES測定により行う。薬物動態パラメーター(C₀、C_{max}、T_{1/2}、AUC等)を算出する。

組織分布評価:劇症型心筋炎モデルへ静脈内投与後の経時的な心臓および主要臓器への集積量を、GdのICP-AES測定により行う。

(7) Gdリポソームの造影能の評価

自己免疫性の劇症型心筋炎モデルを用い、感作2週間後のパッチ状の早期の心筋炎画像をMRIによって検出可能か検討する。

(8) アゴニストリポソームの薬物動態評価

血中動態評価:正常マウス(またはラット)へ静脈内投与後の血中動態を、アゴニストのLC-MS/MS測定により行う。薬物濃度パラメーター(C₀、C_{max}、T_{1/2}、AUC等)を算出する。

組織分布評価:劇症型心筋炎モデルへ静脈内投与後の経時的な心臓および主要臓器への集積量を、アゴニストのLC-MS/MS測定により行う。

(9) アゴニストリポソームの薬効評価

in vitro 薬効評価:LPS刺激腹腔マクロファージの炎症性サイトカイン産生に対するアゴニストリポソームの50%阻害濃度(IC₅₀)をqPCR、ELISA法により測定する。

in vivo 薬効評価:ウイルス性または自己免疫性の両劇症型心筋炎モデルに静脈内投与し、心機能評価(心エコー、心臓カテーテル)、組織学的評価(心臓への炎症細胞浸潤、繊維化)、生化学的評価(心筋組織中の炎症性サイトカイン量)の測定により総合的な薬効評価を行う。

4. 研究成果

(1) Gd キレート脂質の開発

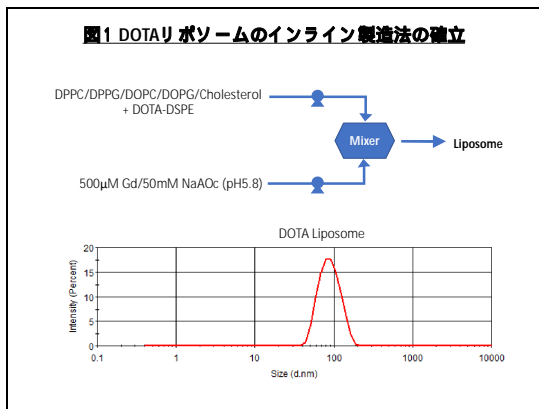
1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid mono-N-hydroxysuccinimide ester (DOTA-NHS-ester) を、アミノ基を有する 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DSPE) に架橋結合した DOTA 修飾 PE (キレート脂質) の合成を検討した。少量の DMSO に溶解した DOTA-NHS-ester を種々の有機溶媒中で PE と反応させた後、薄層クロマトグラフィー法により未反応の PE と DOTA 結合 PE を分離した。各反応条件での架橋結合効率を比較した結果、エタノールを溶媒として反応した場合、約 80% の高い架橋効率が得られることが明らかとなった。

表 1.

溶媒	反応温度 (°C)	反応時間 (h)	架橋効率 (%)
メタノール	RT	2	12
		16	32
クロロホルム	RT	2	5
		16	6
メタノール:クロロホルム=1:1	RT	2	7
		16	14
エタノール	RT	2	45
		16	79
		4°C	16

(2) Gd キレート脂質を含有するリポソーム (DOTA リポソーム) のインライン製造法の確立

HSPC/mPEG2000-DSPE/Cholesterol (Doxil®組成)、HSPC/DSPG/Cholesterol (Ambisome®組成)、DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/Cholesterol に DOTA-PE を全脂質量比 5~15% 添加した脂質を溶解したエタノールと、Gd を終濃度 500µM 溶解した 50 mM 酢酸バッファー (pH 5.8) をインラインで混合し、Gd が DOTA にキレート結合した Gd リポソームの作成を検討した。リポソーム製造条件 (脂質量、有機溶媒濃度、反応温度、流速等) を最適化した結果、DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/Cholesterol 組成に Gd キレート脂質を全脂質量比 10% 添加した脂質組成で、平均粒子径が約 80nm となるインラインリポソーム製造条件を最適化することに成功した。Gd リポソームは限外ろ過により 10% ショ糖溶液に溶媒置換後、0.22µm フィルターでろ過滅菌後凍結乾燥した (図 1)。

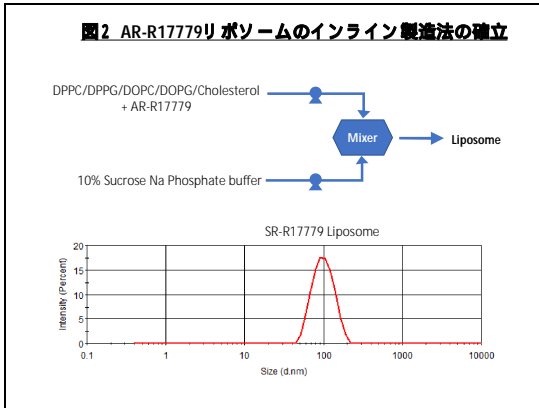


(3) Gd リポソームの物性評価:物性評価

Gd リポソーム中の Gd の定量法を、高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法 (ICP-AES) を用いて確立した。その結果、Gd の標識効率は約 86µg Gd/mg lipid で、DOTA-PE の標識効率は約 95% と極めて高いことが明らかとなった。一般に MRI 造影に用いる Gd の血中濃度が 0.1mmol/gd/kg (約 300µg Gd/ml) であることから、Gd リポソームは MRI 撮像において十分な造影効果を示すと予想された。

(4) nAChR 選択的アゴニスト AR-R17779 内包リポソーム (アゴニストリポソーム) のインライン製造法の確立

溶媒 (X) に溶解した AR-R17779 を脂質溶解液 (Y) にインラインで混和することにより、DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/Cholesterol の脂質組成で、AR-R17779 を脂質重量比で約 5% 内包し、平均粒子径が約 100nm、PDI=0.1 のアゴニストリポソームを製造することに成功した (図 2)。

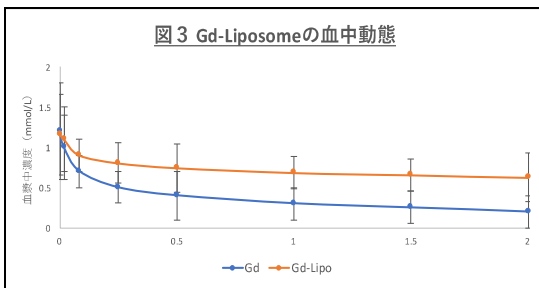


(5) アゴニストリポソームの物性評価

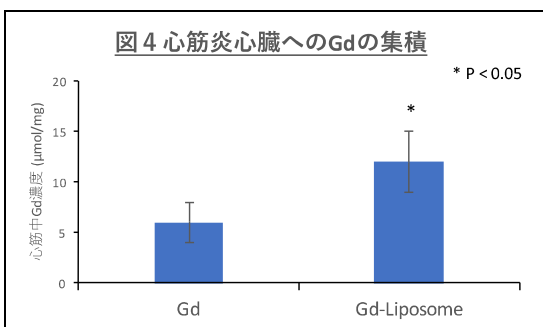
リポソームに内包された AR-R17779 の定量法を、C18 カラムを用いた LC-MS/MS 法により確立した。その結果、0.1 μ g \sim 2 μ g の範囲で定量可能な分析法を構築することに成功した。検出限界は 0.02 μ g/ml であった。

(6) Gd リポソームの薬物動態評価

血中動態評価：ラット血漿中の Gd および Gd リポソームの測定を、マイクロ波加熱による酸分解処理を用いた ICP-AES 測定により行った。その結果、Gd リポソームでは Gd のみの投与と比較し、T1/2 が約 2 倍、AUC が約 3 倍に増加し、血中滞留性が向上していることが明らかとなった。一方、C0 および Cmax には有意差は認められなかった (図 3)。

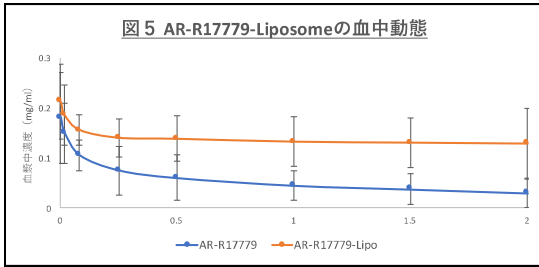


組織分布評価：自己免疫性心筋炎モデルへ静脈内投与後の心臓への集積量を、同様に ICP-AES 測定により行った。その結果、Gd リポソーム投与群では Gd 投与群と比較し、心筋炎心臓へ約 2 倍量の Gd が集積することが明らかとなった (図 4)。

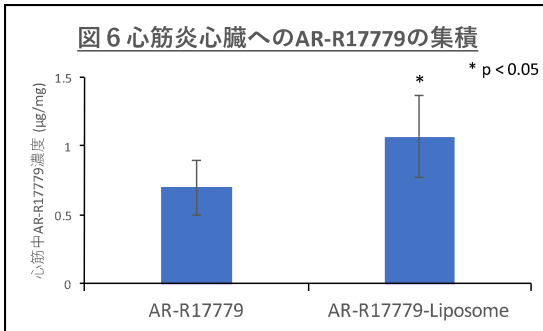


(7) nAChR 選択的アゴニストリポソームの薬物動態評価

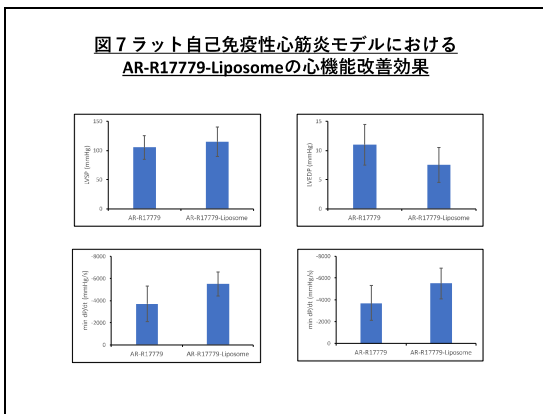
血中動態評価：ラットへ静脈内投与後の血中動態を、アゴニストの LC-MS/MS 測定により行った。その結果、アゴニストリポソーム投与群ではアゴニストのみの投与群と比較し、T1/2 と AUC が約 2.5 倍に増加することが明らかとなった。また C0 および Cmax に増加傾向が認められた (図 5)。



組織分布評価：自己免疫性心筋炎モデルへ静脈内投与後の心臓への集積量を、LC-MS/MS 測定により行った。その結果、アゴニストリポソーム投与群ではアゴニスト単独投与群と比較し、心筋炎心臓へ約 1.5 倍量の薬剤が集積していることが明らかとなった。



(3) nAChR 選択的アゴニストリポソームの薬効評価：自己免疫性心筋炎モデルに静脈内投与し、エコーによる心機能評価を行った。その結果、n 数が少ないため 有意差は認められなかったが、アゴニストリポソーム投与群ではアゴニスト単独投与群と比較し、心機能(LVEDP、max dP/dt および min dP/dt)に改善傾向が認められた(各 n=3)。今後 n 数を増やし解析を進める予定である。



以上の結果から、Gd リポソームは心筋炎心臓へ高濃度の Gd を送達し、MRI による心筋炎の診断に有用となる可能性が示唆された。また、nAChR 選択的アゴニストを内包するリポソームは、心筋炎心臓への高い薬剤送達能を示し、心機能を有意に改善させたことから、心筋炎の新規治療薬として有用となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shota Tsuchida, Takashi Matsuzaki, Masaki Yamato, Keiji Okuda, Hai Ying Fu, Ryo Araki, Shoji Sanada, Hiroshi Asanuma, Yoshihiro Asano, Masanori Asakura, Hiroyuki Hao, Seiji Takashima, Masafumi Kitakaze, Yasushi Sakata, Eisuke Mekada, Tetsuo Minamino, Anti-HB-EGF Antibody-Mediated Delivery of siRNA to Atherosclerotic Lesions in Mice, International Heart Journal, 査読有, 59(6), 2018, 1425-1431

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：所望の粒径を有するリポソームを製造するための方法および装置の開発
発明者：松崎 高志
権利者：国立大学法人大阪大学
種類：特許
番号：PCT/JP2018/ 40574
出願年：2018 年 10 月 31 日
国内外の別：国内および国外

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：富 海英
ローマ字氏名：Fu Hai Ying
所属研究機関名：大阪大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：特任助教（常勤）
研究者番号（8 桁）：70754646

研究分担者氏名：相楽 郁恵
ローマ字氏名：Sagara Ikue
所属研究機関名：大阪大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：特任研究員
研究者番号（8 桁）：40808474

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。