

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282139

研究課題名(和文)急性脳梗塞のターゲティングによる画像診断と薬物治療のためのキャリアー設計

研究課題名(英文)A novel drug and contrast agent targeting to brain acute ischemic stroke.

研究代表者

横山 昌幸 (Masayuki, Yokoyama)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：20220577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：高分子キャリアーを用い、脳梗塞局所に造影剤・薬物をターゲティングすることで、新規画像診断法および新規薬物治療のProof of conceptが本研究の目的である。
高分子ミセル及び非ミセル形成高分子の2種類のMRI造影剤を合成し、それを用いてラット急性期脳梗塞モデルでの血流再開後の病変部位への集積挙動をMRIで観察した。再開直後から急激に高分子造影剤は梗塞部位に集積し、長時間にわたって高解像度でコントラストの高い像を与えた。その像は、血栓溶解治療の際にt-PAが集積して出血リスクの高い部位を診断できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We aim to establish a proof of concept of novel targeting to acute brain ischemic stroke using macromolecular MRI contrast agents. We successfully prepared two types of contrast agents; polymeric micelle type and non-micelle forming type. Using these agents, we observed their significantly rapid accumulation at the ischemic sites in T1-weighted MR images. Owing to very distinct images with a long-time-lasting character, MRI analyses by the use of macromolecular contrast agents may realize risk prediction of brain hemorrhage induced by the t-PA therapy that is conducted against acute brain ischemic stroke.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：急性期脳梗塞 MRI 造影剤 高分子ミセル 高分子 脳保護薬 ターゲティング

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は日本人死亡原因の第4位であるが、麻痺等の後遺症による QOL 低下は最も深刻である。脳卒中の約 3/4 を占める急性期脳梗塞に対する治療の重要性は極めて高い。急性期脳梗塞に対し、組織プラスミノゲン活性化因子(t-PA)治療が日本でも 2005 年から実施され、図 1 に示すように予後改善に有効であるが、表 1 左に示すように問題点も多い。

	障害なし	軽～中度の障害	重度の障害	死亡	症候性頭蓋内出血
対照	26%	26%	27%	21%	1.2%
t-PA投与	39%	21%	23%	17%	7.1%

New Eng. J. Med., 333, 1581-7 (1995)

図1 t-PAによる急性期脳梗塞治療の効果

その問題の第一は症候性頭蓋内出血で、第二に発症から 4.5 時間の t-PA 使用制限である。(2012 年 9 月に 3 時間から 4.5 時間に拡大された) この脳出血はかなり致死的な副作用であり、t-PA 投与群の 7.1% は対照に比べて有意に高く、r-PA が脳出血を誘起していることを示す。この脳出血のリスクと 4.5 時間制限のために、急性期脳梗塞患者の t-PA 適用割合は 2～5% 程度と低い。(4.5 時間への拡大と急性期対応体制の整備により、この割合が 10% を越える病院も出現するようになった) また、2014 年には血管内治療との組合せによって、更なる予後改善が得られたが (MR CLEAN trial として有名)、t-PA を先行させ、その血栓溶解が不成功であった場合に血管内治療を施す方式であり、依然として t-PA 治療の重要性は極めて高い。脳出血を減少させ、t-PA 治療適用患者割合を増やし、脳梗塞治療成績を改善することが、強く求められている。表 1 右に示す解決策の現状では、A の診断法では CT, MRI で既に起きた脳出血は検出できても、t-PA 治療の出血危険性予測をする画像診断法はない。一方 B では、脳保護薬が 160 種類以上臨床で試されたが、国際的認可された薬は皆無である。この現状の中、本研究者は薬物と造影剤を脳梗塞部位にターゲティングすることで、問題点を克服するという新規なアプローチを考案した。

表1 t-PA急性脳梗塞治療の問題点と本研究による解決

現状の問題点	本研究による解決
1. 脳出血(患者の6%)	A. 脳出血を予測する診断法の開発 (脳出血の危険性の高い患者を t-PA 治療から除外する)
2. 治療ウィンドウ(発症から投与までの制限時間)が短時間と短い*	
3. 適用患者の割合が 2～5% と低い	B. 脳神経保護薬、止血薬の開発
4. 予後改善率がまだ低い	

* 2012年9月に日本でも4.5時間に延長された。

すなわち、ターゲティングされた造影剤による画像診断によって脳出血のリスク評価をし、従来法では t-PA 治療の適用にならなかった患者でも、この新診断法によってリスクが低いと判断された患者には r-PA 投与を行うこと、そして脳保護薬や出血抑制剤を梗塞部位にターゲティングすることで、予後の改善を促進するというアプローチである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、図 2 に示すように高分子キャリアを用い、脳梗塞局所に造影剤・薬物をターゲティングすることによって、急性期脳梗塞に対する新規画像診断法および新規薬物治療の Proof of concept である。急性脳梗塞による死亡及び後遺症(麻痺・歩行障害等)のための QOL 低下を抑制することは重要で、特に高齢社会の日本ではその重要度が高い。薬物ターゲティングはその大部分が、固形がんを対象として研究・開発されていて、本研究の脳梗塞を対象とする研究は極めて希少で、独自性が高い。

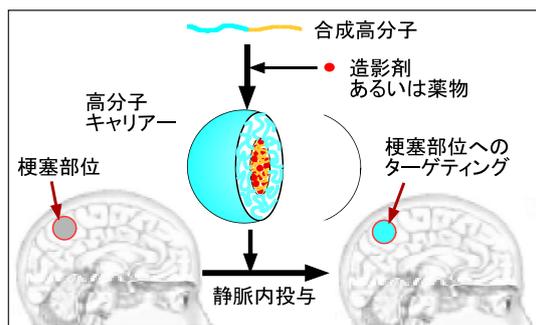


図2 高分子キャリアによる脳梗塞のターゲティング

血流が遮断される障害である脳梗塞へ血流を介してターゲティングする手法は一見矛盾しているように見える。しかし、虚血に対する生体反応によって、脳梗塞部位では高分子の透過性が亢進することは自明なこととして知られていた。(Stroke, 33, 2711-7 (2002)) 一方、t-PA 治療時の脳出血は、高分子である t-PA が脳組織へ透過して、MMP-9 を活性化し細胞外マトリクスを分解することが主な機構である。また、t-PA 注入は脳組織の高分子血管透過性をさらに亢進する。(J. Neurotrauma, 24, 745-52 (2007)) 以上の事実を総合すると、「t-PA と同じく高分子である MRI 造影剤が集積する部位が出血危険部位である」との仮説が合理性を有する。

当初の研究目標は

- (1) ターゲティング能のある造影剤を用いたラット急性期脳梗塞モデル画像診断
- (2) 止血剤、脳保護薬を含有したターゲティングキャリアシステムによるラット急性期脳梗塞モデルの治療

であったが、MRI による高分子造影剤の梗塞部位への集積挙動解析に大きな進展があり、(1)、特に MRI に集中して(光音響画像診断への研究時間もつぎ込んで)研究を展開することに變更した。

また、高分子造影剤の合成については高分子ミセル形成型とミセル非形成型の両タイプ、および 7 配位型と 8 配位型のキレート剤を用いた合成を当初予定どおり遂行した。ミセル非形成型の造影剤については、当初研究計画になかったミセル形成型との体内動態比較を行い、造影剤キャリアサイズが標的部位における造影剤の保持に及ぼす影響という新たな知見を得ることができた。

3. 研究の方法

(1) 高分子MRI造影剤の合成

図3に示す、(A)高分子ミセル形成型と(B)ミセル非形成型を合成した。(A)高分子ミセル形成型は平均直径20nmであり、ポリグルタミン酸(P(Glu))ベースの(B)ミセル非形成型よりもキャリアのサイズが大きい。

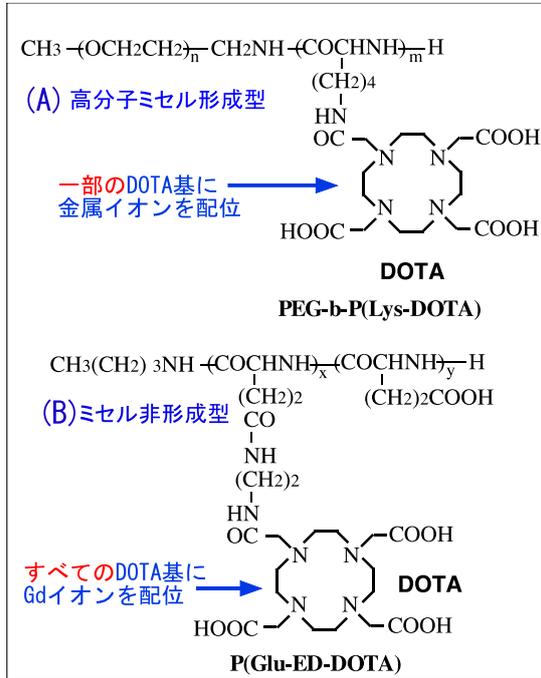


図3 高分子MRI造影剤の化学構造

高分子ミセル形成型は既知の方法で合成した。本研究で新たに設計したミセル非形成型は、図4に示したスキームで合成をした。

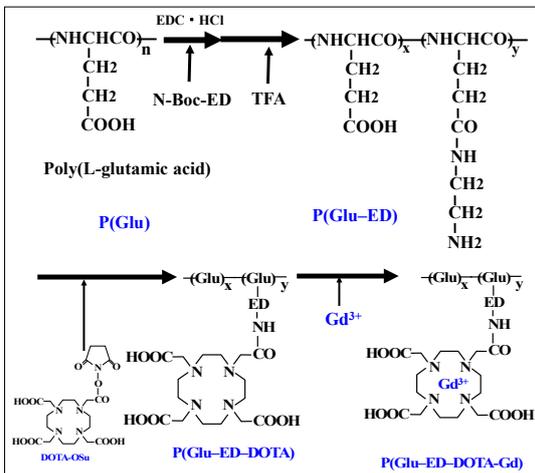


図4 ポリグルタミン酸ベースMRI造影剤の合成スキーム

図4スキームで用いているキレート剤は7配位のものである。元々低分子造影剤のキレート剤であるDOTAの一つのカルボキシル基を高分子への結合のために消費して7配位となったDOTA-OSuを用いている。高分子略号では「DOTA」を使っているが、7配位である。本研究では、Gdイオンを保持する能力がより高い8配位型のキレート剤を用いた造影剤合成も行った。キレート剤の化学構造と共に研究成果の項に示す。

(2) 脳梗塞モデルラットでのMRI撮像

急性期脳梗塞モデルはWistarラットを用い、図5Aに示すように中大脳動脈をナイロン糸で塞栓することによって作製した。手技は以下の2つを実施した

(a) 小泉法 ナイロン糸を塞栓する手技で、抜糸には、手術部を露出させる必要がある。よって、再開通直後のMRI撮像は不可能となる。小泉法を用いた場合には、図5Bの実験スケジュールでの(2)に示す、再開通1時間後に造影剤を投与してMRI撮像を開始する。

(b) 改良Memezawa法 ポリエチレンチューブPE10で作ったシースとその内側に挿入された3-0 ナイロン糸を血管に入れることで、内側のナイロン糸の抜糸をスムーズにする。再開通時には、再び手術面を開ける必要なく、体外に露出したシースを保持して内側のナイロン糸を引けば良いので、再開通直後からのMRI撮像が可能となる。この方法では図5Bの実験スケジュールでの(1)に示すように、再開通前に造影剤を投与する場合(高分子ミセル造影剤の場合)と、再開通直後に投与する場合(ミセル非形成高分子の場合)がある。

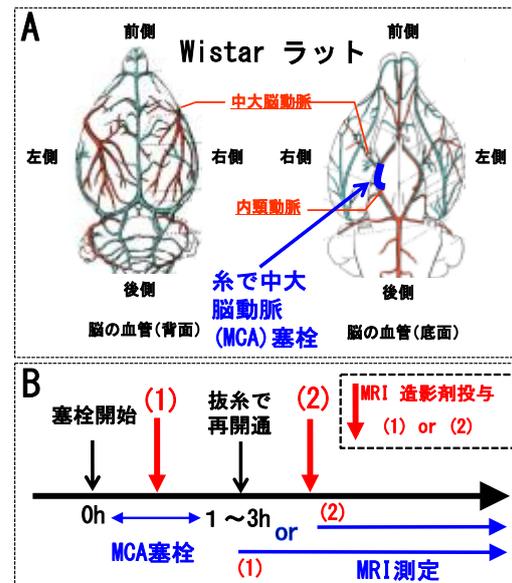


図5 急性期脳梗塞ラットのMRI測定 (A)中大脳動脈塞栓 (B)MRI撮像スケジュール

造影剤は0.033 mmol Gd/kgを尾静脈から約3分かけて投与する。対照とした低分子造影剤Gd-DTPAは臨床量の0.10 mmol Gd/kgを投与した。MRI撮像は、9.4T MRI装置(Bruker社製BioSpec 94/20USR型)にラット脳用のコイル(Model No.: 1P T10324V3)を装着して行った。撮像シーケンスは造影剤のGdイオンによって白いコントラストが得られるT1強調画像を中心に、Angiography、DWI、T2、T2*を撮像した。規定の時間(1~3時間)塞栓を続けた後に、ナイロン糸を抜糸して血流再開通をさせて3時間MRI撮像を継続した後に、麻酔から覚醒させて、血管閉塞24時間後に状態観察を行った。(図5Bの(2)の場合には再開通1時間後から3時間撮像した。)

4. 研究成果

(1) 高分子MRI造影剤の合成

新たに合成した非ミセル形成型の代表的なRunの組成を表2にまとめた。

表2 非ミセル形成型造影剤

P(Glu-ED-DOTA-Gd)の組成

Run	P(Glu) 分子量	ED 化率	Gd/DOTA
12	3.0 万	30.4%	71.1 %
15	1.1 万	32.6%	92.9 %
19	3.0 万	10.1%	72.8 %
22	10.0 万	19.6 %	94.3 %
23	9.9 万	28.9 %	73.3 %

これらの造影剤合成で問題点とその解決法は以下の通りである。

・P(Glu)主鎖の加水分解

造影剤のベースとなるポリグルタミン酸(P(Glu))はその前駆体となるポリ(γ-ベンジル-L-グルタメート)(PBLG)をメタンスルホン酸(MSA)で加水分解して、ベンジル保護基を外すことによって得た。MSAによる酸加水分解はペプチド合成にも用いられている常法であり、高分子主鎖の加水分解はないものと考えていたが、実際には多少起こることが判明した。すなわち、分子量8万程度のP(Glu)が得られるはずが、分子量3.0万になってしまった。そこであらかじめ分子量の大きなPBLGを合成し、主鎖の開裂が伴ってもGPCによる推定分子量が10.0万となるP(Glu)を得た。

・高分子溶解性の低下

分子量が3.0万のP(Glu)を用いた合成では各高分子の溶解性は問題にならなかったが、分子量10.0万のP(Glu)を用いた際には、合成の各ステップで溶解性が低いことが問題となった。この問題の解決は、溶媒の種類を変える(エチレンジアミンの結合反応の際に、溶媒をDMFからDMSOに変えた)、濃度を低くする(PBLGの酸加水分解)ことで行った。

・P(Glu)主鎖に結合したGdイオンの除去

GdイオンはDOTA基のみではなく、P(Glu)主鎖のカルボン酸にも配位することが分かった。Gdイオン配位後に透析しても、DOTA基の2倍に近いモルのGdイオンが見いだせるからである。そこで、EDTAによって主鎖カルボン酸に配位した余分なGdイオンを除くことに成功した。この成功の確認は、加えるEDTAのモル比(EDTA/DOTA)を増やしてゆくと、ほぼ一定のGd量がポリマー側に残存した観察による。

次に、同じく分子量約10万のP(Glu)に8配位型のDOTA誘導体を導入することを検討した。図6に用いたDOTA誘導体の化学構造を示す。(A)が上記で用いた7配位型のDOTA誘導体(DOTA-OSu)である。高分子との結合のために一つのカルボン酸を犠牲にしている。(B)は

東京化成に依頼合成した8配位型の活性エステル体で、DOTAが本来有するカルボン酸を保持しながら、高分子結合のための活性エステルを有している。(C)は同じく8配位型のDOTA誘導体であるが、(B)の前駆体で4つのカルボン酸にt-Bu保護基がついているものである。

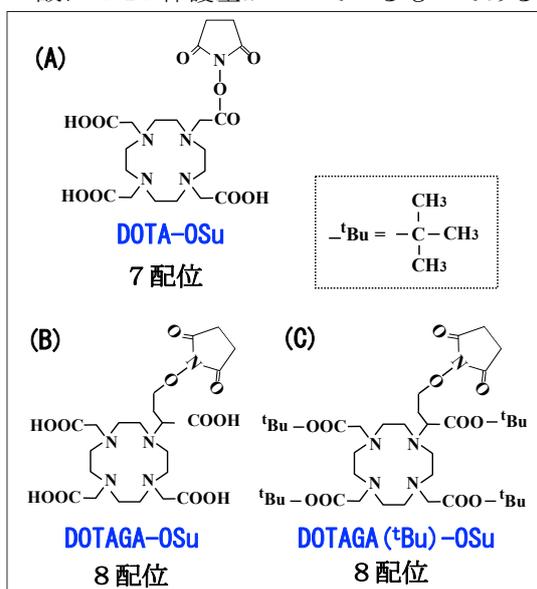


図6 DOTA誘導体キレート剤の化学構造

7配位の(A)の代わりに8配位の(B)を用いると、ポリマーの溶解性が低下し、未反応のエチレンジアミン残基もあった。そこで、(c)を反応させてからt-Bu保護基を外したところ、ポリマー溶解性の問題も、未反応エチレンジアミン残基の問題もなく、キレート基が結合したポリマーP(Glu-ED-DOTAGA)が得られ、これにGdイオンを導入することができた。

以上の合成を通して分かったことは、DOTAなどのキレート基を導入した高分子合成では溶解性の問題が大きいことである。従来、P(Glu)ベースの造影剤が報告されてきたが、ターゲティング性能を高めるために望ましい組成のものが合成されてきていなかった。従来の報告には記述されていなかったが、望ましい組成の欠如は合成時における溶解性の問題であったと推定される。その点においても、今回の造影剤合成で溶解性の問題を様々な手法で解決したことは、高分子造影剤の可能性を広げる大きな進歩であったと確信する。

(2) 脳梗塞モデルラットでのMRI撮像

従来の小泉法による中大脳動脈塞栓から改良Memezawa法に変えることによって、再開通直後からの(実際には再開通後5分後から計測した)MRI撮像が可能となった。3時間閉塞の場合の高分子ミセル造影剤によるMRI T1-強調画像を図7に示す。再開通後30分後には既に相当の画像コントラストが右梗塞半球に見られた。このコントラストは1時間、3時間経過するにつれて高くなっていることが分かる。また、造影剤のGdイオンによってもたらされる白い画像は、通常脳梗塞の病態診

断に用いる T2-強調画像(図 8)とは異なる画像を呈している。

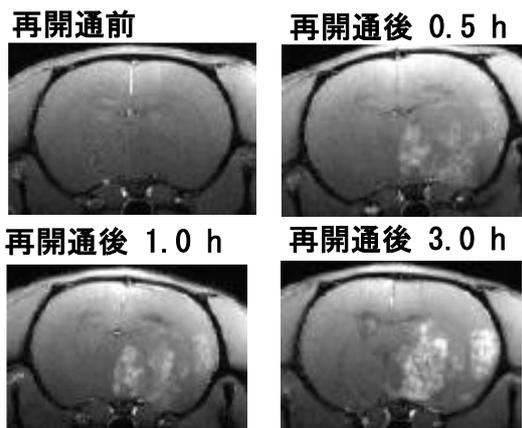


図 7 脳梗塞ラットの T1-強調 MRI

図 8 の T2 強調画像は病態が進行した際の浮腫、つまり血液から流入した水を表現しているとされている。この浮腫の一部に、図 7 の T1 強調画像で造影剤が集積している部分があることが分かる。よって、高分子ミセル造影剤によって得られた画像は、「高分子が選択的に透過しやすい部位」すなわち「t-PA が透過しやすく、脳出血の危険性が高い部位」である可能性がある。出血を伴う脳梗塞モデルによる検討を今後行ってゆく価値がある。

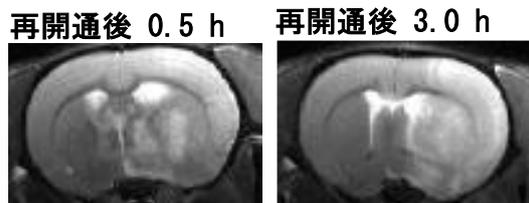


図 8 脳梗塞ラットの T2-強調 MRI

画像を定量的、経時的に解析した結果が図 9 である。図 9A には、造影剤が分布する部位の体積変化を示した。分布体積の広がり急速に進行する再開通後の 60 分とその後に続く緩やかな分布の広がりの 2 相性を示すことが分かった。また、T1 緩和時間の測定から造影剤の分布量の絶対値を求めた。結果を図 9B に示す。この再開通後 3 時間の集積量は 0.48 ± 0.08 %ID/g であった。固形がんへのターゲティングでは投与後 24 時間で 5%ID/g 位あればターゲティング効果があるとされている。この量は 3 時間当たりになると 0.6 ID% となる。ここで初めて、急性期脳梗塞部位での高分子物質に対する透過速度が EPR 効果による固形がんへの透過速度と同程度のものであることが判明した。

次に、閉塞時間を 1, 2, 3 時間と変えた場合を比較した。梗塞部位への集積量は梗塞時間が長い程大きくなる。これは、塞栓時間の長さによって脳梗塞の重症度が決まるとい、従来から知られてきた事実通りとなったが、興味深いのは、血管透過性を示し始める時間である。その結果を表 3 にまとめる。

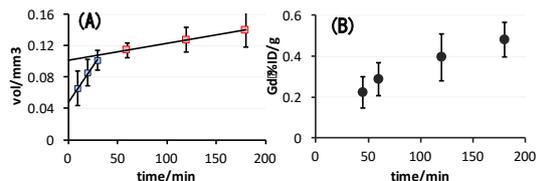


図 9 急性期脳梗塞部位への高分子ミセル造影剤の集積挙動(3 時間塞栓の場合)

表 3 血管透過性を示し始める時間

閉塞時間	漏出検出時間/h
3h(n=4)	3.1±0
2h(n=4)	2.2±0
2h(不完全梗塞)(n=4)	2.4±0.2
1h(n=3)	2.2±0.8
1h(不完全梗塞)(n=3)	2.2±0.3

表 3 では同じ閉塞時間でも、MRI Angiography で完全な血流途絶の場合と、塞栓により顕著に減少したが血流が残存している場合(不完全梗塞と表記)を分けて集計してある。不完全梗塞の場合には、閉塞時間が同じでも脳浮腫などの症状は軽くなり、血管透過性の亢進の程度も低い。しかし、血管透過性の亢進の開始時間は 2.2~2.4 時間と同一であった。閉塞時間が 3 時間の場合には、3.1 時間以降しか計測ができないので、3 時間の再開通以前に血管透過性亢進状態は準備完了であったと考えられる。従来の低分子造影剤を用いた血管透過性の亢進観察は、造影剤血液中濃度が急速に減少するので、経時的な観察は不可能である。血中半減期の長い(この造影剤の場合は 24 時間程度)高分子ミセル造影剤による経時的、かつコントラストの極めて高い MR 画像によって初めてこのような病態変化を観察することが可能となったのである。

次に、高分子ミセルより小さなサイズの造影剤である、非ミセル形成型の造影剤 P(Glu-ED-DOTA)の結果を図 10 に示す。再開通 1 時間後に、分子量の大きい Run 22 のみが黄色線内に高分子ミセル造影剤と同様に明確な集積が見られた。Run 12 ではほとんど集積が見られないのは、分子量が 3.0 万と小さいために血中濃度が急激に下がったためと考えられる。また、図 11 に示す Run 22 の時間経過を見ると、2 時間をピークとして白色の度合い、画像の鮮鋭度とも 3 時間では下がっていることが分かる。高分子ミセル造影剤では、逆に 3 時間の方が両者とも高くなっていた。この差は、脳梗塞部位での高分子ミセル造影剤の拡散が無視できるほど小さいのに対し、サイズが小さな P(Glu-ED-DOTA-Gd)は、周辺や血流に拡散する効果が大きいためと考えられる。MRI 造影に及ぼす造影剤サイズの効果を明らかにすることができた。

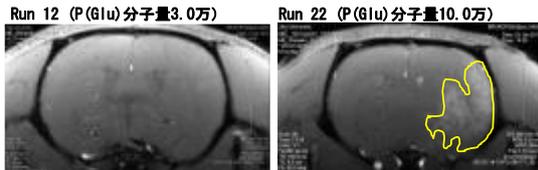


図 10 非ミセル形成型の造影剤の MRI 画像

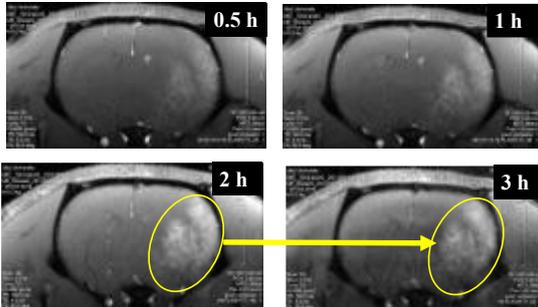


図 11 Run 22 MRI 画像の時間経過

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

①T. Nakamura, K. Shiraishi, M. Yokoyama, et al., Folate-Targeted Gadolinium-Lipid-Based Nanoparticles as a Bimodal Contrast Agent for Tumor Fluorescent and Magnetic Resonance Imaging, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 査読有, 37(4), 521-527 (2014)

②K. Shiraishi, Y. Maitani, K. Sakurai, M. Yokoyama, et al., Determination of polymeric micelles' structural characteristics, and effect of the characteristics on pharmacokinetic behaviors, *J. Controlled Release*, 査読有, 203, 77-84 (2015)

doi: 10.1016/j.jconrel.2015.02.017

③K. Shiraishi, Y. Maitani, K. Sakurai, M. Yokoyama, et al. Exploring the relationship between Anti-PEG IgM behaviors and PEGylated nanoparticles and its significance for accelerated blood clearance, *J. Controlled Release*, 査読有, 234, 59-67 (2016)

doi:10.1016/j.jconrel.2016.05.010

④K. Shiraishi, Z. Wang, D. Kokuryo, I. Aoki, M. Yokoyama, A polymeric micelle magnetic resonance imaging (MRI) contrast agent reveals blood-brain barrier (BBB) permeability for macromolecules in cerebral ischemia-reperfusion injury., *J. Controlled Release*, 査読有, 253, 165-171 (2017)

⑤H. Akai, K. Shiraishi, M. Yokoyama, K. Yasaka, M. Nojima, Y. Inoue, O. Abe, K. Ohtomo, S. Kiryu, PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle MRI contrast agent: Feasibility study of a Gd-micelle contrast agent for MR lymphography., *J. Magnetic Resonance Imaging*, Accepted

⑥白石貢一、横山昌幸、急性期脳梗塞部位へのターゲティングと物質移動病態生理学、

Drug Delivery System, 査読無し, 30, 317 - 326 (2015)

〔学会発表〕(計 9 件)

①白石貢一、王作軍、青木伊知男、国領大介、横山昌幸、急性脳梗塞 t-PA 治療に置ける出血リスクの定量的評価、第 9 回日本分子イメージング学会、2014 年 5 月

②白石貢一、王作軍、青木伊知男、国領大介、横山昌幸、急性脳梗塞再開通後の MRI 造影剤を用いた血管透過性評価、第 30 回日本 DDS 学会、2014 年 7 月

③白石貢一、王作軍、青木伊知男、国領大介、横山昌幸、急性脳梗塞の診断治療に向けた DDS 製剤開発、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月

④白石貢一、王作軍、横山昌幸、DDS を用いた脳梗塞診断、第 31 回日本 DDS 学会、2015 年 7 月

⑤ Masayuki Yokoyama, Macromolecular delivery to brain ischemic stroke, 2015 1st Annual International Symposium on Bio-Therapeutics Delivery Society, 2015 年 9 月

⑥白石貢一、王作軍、青木伊知男、国領大介、横山昌幸、高分子 MRI 造影剤を用いた急性期脳虚血の出性評価、第 10 回日本分子イメージング学会、2015 年 5 月

⑦白石貢一、王作軍、青木伊知男、国領大介、横山昌幸、A polymeric micelle MRI contrast agent detects enhanced BBB permeability in rat transient MACO model、第 43 回日本分子磁気共鳴医学会、2015 年 9 月

⑧ K. Shiraishi, Z. Wang, I. Aoki, D. Kokuryo, M. Yokoyama, Polymeric micelle MRI contrast agent exhibits hyper-permeable BBB in ischemic stroke-reperfusion injury, *European Society for Molecular Imaging*, 2016 年 3 月

⑨白石貢一、王作軍、横山昌幸、血液-脳関門を介した物質移動による脳疾患病態生理評価～イメージングによる診断治療を目指して～、第 32 回日本 DDS 学会、2016 年 6 月

〔図書〕(計 1 件)

横山昌幸、図解で学ぶ DDS 第 2 版、132-134、159-172、(株)じほう(2016)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 昌幸 (YOKOYAMA, Masayuki)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20220577

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

白石 貢一 (SHIRAISHI, Koichi)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 40426284

(4) 研究協力者 なし