

研究要旨

HB-EGF を標的としたイムノリポソームによる不全心筋細胞に対する
選択的分子導入技術法の開発

研究要旨

本年度は、研究代表者・分担研究者と共同で、膜結合型HB-EGFが不全心にて発現が増加していることを見出した。そこで、私たちが開発した抗HB-EGF抗体を用いて、抗HB-EGF抗体修飾リポソーム（抗HB-EGF抗体結合リポソーム）を作成し、これまで困難であった心筋細胞への導入やHB-EGF高発現がん細胞への細胞内送達を可能にするための新技術の開発をおこなった。ラット培養心筋細胞へのアデノウイルス発現ベクターによるヒト型HB-EGF発現条件の検討を行った。ラット培養心筋細胞において、ヒトHB-EGF及びマウスHB-EGF遺伝子が感染用量依存的にmRNAレベルで発現した。培養心筋細胞において、ヒト型HB-EGFの高発現が認められ、抗HB-EGF抗体結合リポソームの機能評価実験に使用可能であることが明らかになった。

A. 研究目的

本研究の目的は、抗HB-EGF抗体を用いて、抗HB-EGF抗体修飾リポソーム（抗HB-EGF抗体結合リポソーム）を作成し、これまで困難であった心筋細胞への導入やHB-EGF高発現がん細胞への細胞内送達を可能にするための新技術の開発をおこなうことである。今年度は、in vitroの検討から不全心筋細胞における特異的分子導入条件の検討を行い、in vivoへの検討準備を行った。

B. 研究方法

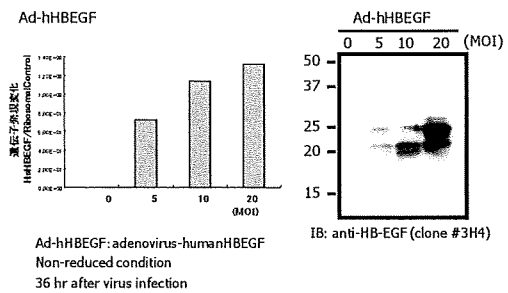
1) ラット培養心筋細胞へのアデノウイルス発現ベクターによるヒト型HB-EGF発現条件検討

ラット培養心筋細胞にアデノウイルス発現ベクターによりヒトHB-EGF又はマウスHB-EGFを効率よく発現させる条件を検討するとともにその時の内在性HB-EGF発現に及ぼす影響を確認した。

C. 研究結果

1) ラット培養心筋細胞におけるヒトHB-EGF又

ラット培養心筋細胞における
ヒトHB-EGF遺伝子mRNA・蛋白発現量の検討



培養心筋細胞でのヒトHB-EGF発現の
容量依存性変化と局在の検討



はマウス HB-EGF の mRNA 発現量を調べたところ、ラット培養心筋細胞において、ヒト HB-EGF 及びマウス HB-EGF 遺伝子が感染用量依存的に mRNA レベルで発現した。

D. 考察

今後、ヒト HB-EGF 過剰発現するマウス心不全モデルを用いて、in vivo における抗 HB-EGF 抗体結合リポソームが効率的に心筋細胞へ取り込まれるかについての準備も同時に進めている。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

E. 結論

抗 HB-EGF 抗体修飾リポソームの細胞内取り込み促進作用は、HB-EGF 高発現が認められる不全心筋細胞や婦人科腫瘍（卵巣がん、子宮がん、乳がん細胞）への選択的デリバリーに有用である可能性が示唆された。抗 HB-EGF 抗体修飾リポソームに薬物や siRNA のような核酸を封入することにより、画期的な治療薬の開発に繋がる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1: Tsukamoto O, Fujita M, Kato M, Yamazaki S, Asano Y, Ogai A, Okazaki H, Asai M, Nagamachi Y, Maeda N, Shintani Y, Minamino T, Asakura M, Kishimoto I, Funahashi T, Tomoike H, Kitakaze M. Natriuretic peptides enhance the production of adiponectin in human adipocytes and in patients with chronic heart failure. **J Am Coll Cardiol.** 2009 Jun 2;53(22):2070-7.

2: Asai M, Tsukamoto O, Minamino T, Asanuma H, Fujita M, Asano Y, Takahama H, Sasaki H, Higo S, Asakura M, Takashima S, Hori M, Kitakaze M. PKA rapidly enhances proteasome assembly and activity in in vivo canine hearts. **J Mol Cell**

Cardiol. 2009 Apr;46(4):452-62.

3: Tamaki Sawada, Tetsuo Minamino, Hai Ying Fu, Mitsutoshi Asai, Keiji Okuda, Tadashi Isomura, Satoru Yamazaki, Yoshihiro Asano, Ken-ichiro Okada, Osamu Tsukamoto, Shoji Sanada, Hiroshi Asanuma, Masanori Asakura, Seiji Takashima, Masafumi Kitakaze, Issei Komuro. X-box binding protein 1 regulates brain natriuretic peptide through a novel AP1/CRE-like element in cardiomyocytes **J Mol Cell Cardiol.** 2010 in press

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許出願中 1 件

特許出願準備中 1 件

2. 実用新案登録

現在のところなし

3. その他

特記すべきことなし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究報告書

ナノサイズリポソームを用いた急性心筋梗塞治療法の開発（19-ナ-一般-011）

分担研究者 高島 成二

研究要旨

HB-EGF を標的としたイムノリポソームによる不全心筋細胞に対する
選択的分子導入技術法の開発

研究要旨

本年度は、抗HB-EGF抗体修飾リポソーム（抗HB-EGF抗体結合リポソーム）を作成し、これまで困難であった心筋細胞への導入やHB-EGF高発現がん細胞への細胞内送達を可能にするための新技術の開発をおこなった。HB-EGF高発現心筋細胞では、抗HB-EGF抗体修飾リポソームによる効率の良い細胞内取り込みが生じることを見出した。新しい治療薬、診断薬等の開発、及び遺伝子の構造、機能等の解析等への抗HB-EGF抗体修飾リポソームの応用が期待できる。

A. 研究目的

本研究の目的は、抗HB-EGF抗体を用いて、抗HB-EGF抗体修飾リポソーム（抗HB-EGF抗体結合リポソーム）を作成し、これまで困難であった心筋細胞への導入やHB-EGF高発現がん細胞への細胞内送達を可能にするための新技術の開発をおこなうことである。今年度は、*in vitro*の検討から不全心筋細胞における特異的分子導入条件の検討を行い、*in vivo*への検討準備を行った。

B. 研究方法

1) 蛍光標識された抗HB-EGF抗体結合リポソームを用いた心筋細胞への取り込み条件検討

37℃と4℃でのインキュベーション温度の違いによる細胞内へのリポソーム取り込み、リポソームは細胞表面に接着するが細胞内への取り込みは行われないことが知られている。これを利用して、新生仔ラットより心筋細胞を単離し培養48時間後に、ヒトまたはマウスHB-EGF、LacZアデノウイルスを感染させ、36時間後に蛍光標識された抗HB-EGF抗体結合リポソーム（HB-EGF-PEG-liposome）またはコントロールリポソーム（PEG-liposome）を無血清培地の心筋細胞に加え、37℃または4℃で4時間インキュベーションした。PBSで細胞を洗浄し培地中のリポソームを除

去したのち、細胞を溶解して蛍光強度を励起波長549nm、発光波長592nmで測定した。

2) siRNAを包含させた抗HB-EGF抗体結合リポソームのHB-EGF発現細胞への取り込み条件検討

ヒト型HB-EGF発現細胞への抗HB-EGF抗体結合リポソームの細胞内への取り込みを利用して、蛍光色素ではなくsiRNAを包含させた抗HB-EGF抗体結合リポソームを作成し、Vero細胞（HB-EGF安定発現細胞株）、Hela細胞（アデノウイルス発現系）、ラット培養（アデノウイルス発現系）での内在性遺伝子としてLaminA/C遺伝子を選択し、本遺伝子に対する抗HB-EGF抗体結合リポソームによる遺伝子抑制の検討を行った。

C. 研究結果

1) 蛍光標識された抗HB-EGF抗体結合リポソーム取り込み条件を検討した結果では、37℃で抗HB-EGF抗体結合リポソームとインキュベーションした場合は、アデノウイルス濃度依存的に蛍光強度の増加が認められた。コントロールリポソームではほとんど変化を認めなかった。またLacZやマウスHB-EGFアデノウイルスを感染させた心筋細胞でも、抗HB-EGF抗体リポソームとインキュベ

ートした場合でも蛍光強度の変化は見られなかった。一方、4℃で抗 HB-EGF 抗体結合リポソームとインキュベートした場合、ヒト HB-EGF を発現する心筋細胞では、蛍光強度の濃度依存的な増大を認めたが、37℃のそれに比して2-3倍低い蛍光強度であった。ここでもマウス HB-EGF を発現する心筋細胞では蛍光強度の変化を認めなかった。これらのことからヒト HB-EGF を発現する心筋細胞では、抗 HB-EGF 抗体リポソームが特異的にヒト HB-EGF に結合し、細胞内に取り込まれていることが明らかとなった。

2) siRNA の検討を行う際に様々な制約から抗 HB-EGF 抗体結合リポソームの設計を変更し、なるべく必要であることがわかり、現在再度リポソームに対する指摘条件検討を行っている。

E. 考察

抗 HB-EGF 抗体リポソームが有するヒト HB-EGF を特異的に認識する機能とともに、蛍光色素は心筋細胞内に取り込まれることが判明したが、導入分子として生理活性を有する形で薬剤を導入したり、siRNA を細胞内に到達させたりすることができるかが重要な鍵となってくる。現段階では、各導入分子に対する指摘リポソームの条件検討を行っている段階にあり、その作業が終了し次第 HB-EGF 高発現細胞への導入の影響を最終的に確認することが可能になるものと考えられる。

E. 結論

抗 HB-EGF 抗体修飾リポソームの細胞内取り込み促進作用は、HB-EGF 高発現が認められる不全心筋細胞や婦人科腫瘍（卵巣がん、子宮がん、乳がん細胞）への選択的デリバリーに有用である可能性が示唆された。抗 HB-EGF 抗体修飾リポソームに薬物や siRNA のような核酸を封入することにより、画期的な治療薬の開発に繋がる可能性がある。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1: Asai M, Tsukamoto O, Minamino T, Asanuma H, Fujita M, Asano Y, Takahama H, Sasaki H, Higo S, Asakura M, Takashima S, Hori M, Kitakaze M. PKA rapidly enhances proteasome assembly and activity in in vivo canine hearts. **J Mol Cell Cardiol.** 2009 Apr;46(4):452-62.

2: Tamaki Sawada, Tetsuo Minamino, Hai Ying Fu, Mitsutoshi Asai, Keiji Okuda, Tadashi Isomura, Satoru Yamazaki, Yoshihiro Asano, Ken-ichiro Okada, Osamu Tsukamoto, Shoji Sanada, Hiroshi Asanuma, Masanori Asakura, Seiji Takashima, Masafumi Kitakaze, Issei Komuro. X-box binding protein 1 regulates brain natriuretic peptide through a novel AP1/CRE-like element in cardiomyocytes **J Mol Cell Cardiol.** 2010 in press

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許出願中 1 件

特許出願準備中 1 件

2. 実用新案登録

現在のところなし

3. その他

特記すべきことなし。

分担研究報告書

ナノサイズリポソームを用いた急性心筋梗塞治療法の開発（19-ナノ一般-011）

研究分担者 浅沼博司 近畿大学附属病院 講師

研究要旨

研究分担者は主にラットを利用した慢性心不全モデル・虚血心モデルを作成してその病態を解析してきた。本研究は、リポソーム化アミオダロンの障害心筋への選択的集積増強、心臓保護作用増強・副作用軽減効果を見検討した。代表研究者と他の分担研究者（朝倉正紀）と共同で動物実験を実施し、リポソーム化アミオダロンが心筋梗塞後の致死的不整脈を軽減することを明らかにした。本リポソーム化薬剤の開発は心筋梗塞治療に対する新たな治療の確立に貢献することが期待できる。

A. 研究目的

研究代表者と協力してラット心筋虚血再灌流モデルを作成し、リポソーム化アミオダロンの障害心筋への選択的集積増強、心臓保護作用増強・副作用軽減効果を検討した。

B. 研究方法

1. 抗不整脈薬アミオダロンの障害心筋への選択的集積による心臓保護作用の増強ならびに副作用軽減の検討

1-1) リポソームの虚血再灌流後心筋への集積の検討

ラット心筋虚血再灌流モデルは、Bullard et al., Basic Res Cardiol. (2005)の方法に従って作製した。具体的には、9週齢のWister系ラットをペントバルビタール50mg/kg腹腔内投与で麻酔を行い、気管内挿管を行い人工呼吸開始した後、鼠径静脈にカニューレーションを行い、静脈路を確保する。開胸した後、左冠動脈左前下行枝（LAD）を結紮し虚血心を作製し、心電図をモニターし、心室細動発症時には心臓を直接マッサージする。5分後、結紮を開放し再灌流を行う。蛍光標識リポソームは再灌流10分前から静脈内投与をおこなった。投与3時間後に、組織学的検討ならびにin vivoイメージングにて虚血再灌流領域へのリポソーム集積を評価し、TTC染色にて心筋梗塞サイズを測定した。

1-2) リポソーム化アミオダロンの血行動態へおよぼす影響の検討

ラットを用いて、アミオダロンとリポソーム化アミ

オダロンの血圧、脈拍に及ぼす影響を用量依存的に検討した。

1-3) リポソーム化アミオダロンの致死的不整脈軽減効果の検討

上記のラット虚血・再灌流モデルを用いて、アミオダロン、リポソーム化アミオダロンの心筋梗塞サイズに及ぼす影響を検討した。さらに、麻酔開胸犬を用いて、アミオダロン、リポソーム化アミオダロンの心室細動抑制効果を検討した。

C. 研究結果

1-1) リポソームの短時間虚血再灌流後心筋への集積の検討

In vivoイメージング法を用いた観察の結果、リポソームが心筋虚血再灌流特異的に集積していることが分かった。また、蛍光標識リポソームを用いた組織学的にも、心筋梗塞部位への特異的集積が確認できた。

1-2) リポソーム化アミオダロンの血行動態へおよぼす影響の検討

アミオダロン投与により、用量依存的に全身血圧ならびに脈拍数の低下が認められた。アミオダロンと比較して、リポソームアミオダロンの血圧低下効果ならびに徐脈化は著しく軽減した。

1-3) リポソーム化アミオダロンの致死的不整脈軽減効果の検討

アミオダロン単独投与と比較して、リポソーム化アミオダロンは致死的不整脈である心室頻拍・心室細動の発生頻度を有意に抑制した。

“Increased Aortic Stiffness is a Risk of Left Ventricular Diastolic Dysfunction Even in Normotensive Subjects.”

D. 考察

本研究では、アミオダロンのリポソーム化による障害心筋への選択的集積、心臓保護作用増強ならびに副作用軽減を明らかにした。アミオダロンは高用量投与で、甲状腺機能障害・肺機能障害などの副作用を呈するため、リポソーム化による薬効増強・副作用軽減が期待できる。心筋梗塞後は重篤な不整脈により予後の悪化が認められるため、本リポソーム化薬剤の開発は心筋梗塞治療に対する新たな治療の確立に貢献する。

E. 結論

本研究では、アミオダロンのリポソーム化による障害心筋への選択的集積、心臓保護作用増強ならびに副作用軽減を明らかにした。今後、企業との連携を視野に入れながら、前臨床試験を進めていく。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Asanuma H., Kitakaze M.. Carperitide and adiponectin--how are they connected each other to benefit acute decompensated heart failure? *Circ J.* 73, 2206-7(2009).
2. Sasaki H., Asanuma H. (5人略) Asakura M., Kim J., Minamino T., Takashima S. (4人略) Kitakaze M.. Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase. *Circulation.* 119, 2568-77 (2009).
3. Takahama H., Minamino T., Asanuma H. (7人略) Asakura M., Kim J., Takashima S. (3人略) Kitakaze M.. Prolonged targeting of ischemic/reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats. *J Am Coll Cardiol.* 53, 709-17.(2009).

2. 学会発表

1. Maeda M, Hasegawa T, Kanzaki H, Kim J, Ohara T, Asakura M, Asanuma H., Takahama H, Amaki M, Hashimura K, Kitakaze M. American Heart Association, Scientific Session 2009 (Nov. 14-18, 2009, Orlando, USA)

2. 高濱博幸, 南野哲男, 佐々木英之, 藤田雅史, 朝倉正紀, 浅沼博司, 北風政史
第57回日本心臓病学会学術集会
(平成21年9月18-20日、北海道)
一般演題
リポソーム化アデノシンを用いた新しい心筋梗塞薬物治療薬の開発 -イヌ虚血再灌流モデルによる検討-

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
以上特記すべき事項なし

特記すべき事項なし

分担研究報告書

ナノサイズリポソームを用いた急性心筋梗塞治療法の開発（19-ナ-一般-011）

研究分担者 朝倉 正紀 国立循環器研究センター 医長

研究要旨

研究分担者は主にラットを利用した慢性心不全モデル・虚血心モデルを作成してその病態を解析してきた。本研究は、リポソーム化アミオダロンの障害心筋への選択的集積増強、心臓保護作用増強・副作用軽減効果を見検討した。代表研究者と他の分担研究者（浅沼博司）と共同で動物実験を実施し、リポソーム化アミオダロンが心筋梗塞後の致死的不整脈を軽減することを明らかにした。本リポソーム化薬剤の開発は心筋梗塞治療に対する新たな治療の確立に貢献することが期待できる。

A. 研究目的

本年度も研究代表者と協力してラット心筋虚血再灌流モデルを作成し、リポソーム化アミオダロンの障害心筋への選択的集積増強、心臓保護作用増強・副作用軽減効果を検討した。

B. 研究方法

1. 抗不整脈薬アミオダロンの障害心筋への選択的集積による心臓保護作用の増強ならびに副作用軽減の検討

1-1) リポソームの虚血再灌流後心筋への集積の検討

ラット心筋虚血再灌流モデルは、Bullard et al., Basic Res Cardiol. (2005)の方法に従って作製した。具体的には、9週齢のWister系ラットをペントバルビタール 50mg/kg 腹腔内投与で麻酔を行い、気管内挿管を行い人工呼吸開始した後、鼠径静脈にカニューレーションを行い、静脈路を確保する。開胸した後、左冠動脈左前下行枝（LAD）を結紮し虚血心を作製し、心電図をモニターし、心室細動発症時には心臓を直接マッサージする。5分後、結紮を開放し再灌流を行う。蛍光標識リポソームは再灌流 10分前から静脈内投与をおこなった。投与 3時間後に、組織学的検討ならびに in vivo イメージングにて虚血再灌流領域へのリポソーム集積を評価し、TTC 染色にて心筋梗塞サイズを測定した。

1-2) リポソーム化アミオダロンの血行動態へおよぼす影響の検討

ラットを用いて、アミオダロンとリポソーム化アミオダロンの血圧、脈拍に及ぼす影響を用量依存的に検討した。

1-3) リポソーム化アミオダロンの致死的不整脈軽減効果の検討

上記のラット虚血・再灌流モデルを用いて、アミオダロン、リポソーム化アミオダロンの心筋梗塞サイズに及ぼす影響を検討した。さらに、麻酔開胸犬を用いて、アミオダロン、リポソーム化アミオダロンの心室細動抑制効果を検討した。

C. 研究結果

1-1) リポソームの短時間虚血再灌流後心筋への集積の検討

In vivo イメージング法を用いた観察の結果、リポソームが心筋虚血再灌流特異的に集積していることが分った。また、蛍光標識リポソームを用いた組織学的にても、心筋梗塞部位への特異的集積が確認できた。

1-2) リポソーム化アミオダロンの血行動態へおよぼす影響の検討

アミオダロン投与により、用量依存的に全身血圧ならびに脈拍数の低下が認められた。アミオダロンと比較して、リポソームアミオダロンの血圧低下効果ならびに徐脈化は著しく軽減した。

1-3) リポソーム化アミオダロンの致死的不整脈軽減効果の検討

アミオダロン単独投与と比較して、リポソーム化アミオダロンは致死的不整脈である心室頻拍・心室細動の発生頻度を有意に抑制した。

D. 考察

本研究では、アミオダロンのリポソーム化による障害心筋への選択的集積、心臓保護作用増強ならびに副作用軽減を明らかにした。アミオダロンは高用量投与で、甲状腺機能障害・肺機能障害などの副作用を呈するため、リポソーム化による薬効増強・副作用軽減が期待できる。心筋梗塞後は重篤な不整脈により予後の悪化が認められるため、本リポソーム化薬剤の開発は心筋梗塞治療に対する新たな治療の確立に貢献する。

E. 結論

本研究では、アミオダロンのリポソーム化による障害心筋への選択的集積、心臓保護作用増強ならびに副作用軽減を明らかにした。今後、企業との連携を視野に入れながら、前臨床試験を進めていく。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sasaki H., Asanuma H. (5人略) Asakura M., Kim J., Minamino T., Takashima S. (4人略) Kitakaze M.. Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase. *Circulation*. 119, 2568-77(2009).
2. Takahama H., Minamino T., Asanuma H. (7人略) Asakura M., Kim J., Takashima S. (3人略)

Kitakaze M.. Prolonged targeting of ischemic/reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats. *J Am Coll Cardiol*. 53, 709-17.(2009).

2. 学会発表

1. Maeda M, Hasegawa T, Kanzaki H, Kim J, Ohara T, Asakura M, Asanuma H, Takahama H, Amaki M, Hashimura K, Kitakaze M. American Heart Association, Scientific Session 2009 (Nov. 14-18, 2009, Orlando, USA) "Increased Aortic Stiffness is a Risk of Left Ventricular Diastolic Dysfunction Even in Normotensive Subjects."
2. 高濱博幸, 南野哲男, 佐々木英之, 藤田雅史, 朝倉正紀, 浅沼博司, 北風政史
第57回日本心臓病学会学術集会
(平成21年9月18-20日、北海道)
一般演題
リポソーム化アデノシンを用いた新しい心筋梗塞薬物治療薬の開発 -イヌ虚血再灌流モデルによる検討-

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
以上特記すべき事項なし

分担研究報告書

ナノサイズリポソームを用いた急性心筋梗塞治療法の開発（19-ナ-一般-011）

北風政史 国立循環器研究センター 部長

研究要旨

研究分担者は主にラットを利用した慢性心不全モデル・虚血心モデルを作成してその病態を解析してきた。本研究は、リポソーム化アミオダロンの障害心筋への選択的集積増強、心臓保護作用増強・副作用軽減効果を見検討した。代表研究者と共同で実験プロトコルの企画・立案やデータ解析をおこない、リポソーム化アミオダロンが心筋梗塞後の致死的不整脈を軽減することを明らかにした。本リポソーム化薬剤の開発は心筋梗塞治療に対する新たな治療の確立に貢献することが期待できる。

A. 研究目的

本年度も研究代表者と協力してラット心筋虚血再灌流モデルを作成し、リポソーム化アミオダロンの障害心筋への選択的集積増強、心臓保護作用増強・副作用軽減効果を見検討した。

B. 研究方法

1. 抗不整脈薬アミオダロンの障害心筋への選択的集積による心臓保護作用の増強ならびに副作用軽減の検討

1-1) リポソームの虚血再灌流後心筋への集積の検討

ラット心筋虚血再灌流モデルは、Bullard et al., Basic Res Cardiol. (2005)の方法に従って作製した。具体的には、9週齢のWister系ラットをペントバルビタール 50mg/kg 腹腔内投与で麻酔を行い、気管内挿管を行い人工呼吸開始した後、鼠径静脈にカニューレーションを行い、静脈路を確保する。開胸した後、左冠動脈左前下行枝（LAD）を結紮し虚血心を作製し、心電図をモニターし、心室細動発症時には心臓を直接マッサージする。5分後、結紮を開放し再灌流を行う。蛍光標識リポソームは再灌流 10 分前から静脈内投与をおこなった。投与 3 時間後に、組織学的検討ならびに in vivo イメージングにて虚血再灌流領域へのリポソーム集積を評価し、TTC 染色にて心筋梗塞サイズを測定した。

1-2) リポソーム化アミオダロンの血行動態へおよ

ぼす影響の検討

ラットを用いて、アミオダロンとリポソーム化アミオダロンの血圧、脈拍に及ぼす影響を用量依存的に検討した。

1-3) リポソーム化アミオダロンの致死的不整脈軽減効果の検討

上記のラット虚血・再灌流モデルを用いて、アミオダロン、リポソーム化アミオダロンの心筋梗塞サイズに及ぼす影響を検討した。さらに、麻酔開胸犬を用いて、アミオダロン、リポソーム化アミオダロンの心室細動抑制効果を検討した。

C. 研究結果

1-1) リポソームの短時間虚血再灌流後心筋への集積の検討

In vivo イメージング法を用いた観察の結果、リポソームが心筋虚血再灌流特異的に集積していることが分った。また、蛍光標識リポソームを用いた組織学的にても、心筋梗塞部位への特異的集積が確認できた。

1-2) リポソーム化アミオダロンの血行動態へおよぼす影響の検討

アミオダロン投与により、用量依存的に全身血圧ならびに脈拍数の低下が認められた。アミオダロンと比較して、リポソームアミオダロンの血圧低下効果ならびに徐脈化は著しく軽減した。

1-3) リポソーム化アミオダロンの致死的不整脈軽

減効果の検討

アミオダロン単独投与と比較して、リポソーム化アミオダロンは致死的不整脈である心室頻拍・心室細動の発生頻度を有意に抑制した。

D. 考察

本研究では、アミオダロンのリポソーム化による障害心筋への選択的集積、心臓保護作用増強ならびに副作用軽減を明らかにした。アミオダロンは高用量投与で、甲状腺機能障害・肺機能障害などの副作用を呈するため、リポソーム化による薬効増強・副作用軽減が期待できる。心筋梗塞後は重篤な不整脈により予後の悪化が認められるため、本リポソーム化薬剤の開発は心筋梗塞治療に対する新たな治療の確立に貢献する。

E. 結論

本研究では、アミオダロンのリポソーム化による障害心筋への選択的集積、心臓保護作用増強ならびに副作用軽減を明らかにした。今後、企業との連携を視野に入れながら、前臨床試験を進めていく。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Utsunomiya H., Nakatani S. (5人略) Kitakaze M.. A simple method to predict impaired right ventricular performance and disease severity in chronic pulmonary hypertension using strain rate imaging. International journal of cardiology (in press).2009
2. Tsukamoto O., Fujita M. (9人略) Minamino T., Asakura M. (3人略) Kitakaze M.. Natriuretic peptides enhance the production of adiponectin in human adipocytes and in patients with chronic heart failure. Journal of the American College of Cardiology 53(22): 2070-2077.2009
3. Takahama H., Minamino T., Asanuma H. (7人略) Asakura M., Kim J., Takashima S.(3人略) Kitakaze M.. Prolonged targeting of ischemic/reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats. Journal of the American College of Cardiology.

53(8):709-717.2009

4. Sasaki H., Asanuma H. (5人略) Asakura M., Kim J., Minamino T., Takashima S. (4人略) Kitakaze M.. Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase. Circulation.119(19):2568-2577.2009
5. Minamino T., Kitakaze M.. ER stress in cardiovascular disease. Journal of molecular and cellular cardiology.2009

2. 学会発表

1. The 15th International Symposium on Atherosclerosis: The Biology of Atherosclerosis. (June 12-18,2009,Boston, USA)
 - 1) Kitakaze M.. Roles of Inflammation and Endoplasmic Reticulum Stress in the Progression and Rapture of Atherosclerotic Plaques.
 - 2) Kitakaze M.. A role of Endoplasmic Reticulum Stress in the Pathophysiology of Atherosclerotic Plaques.
2. American Heart Association, Scientific Session 2009.(Nov.14-18,2009,Orlando,USA)
 - 1) Maeda M., Hasegawa T., Kanzaki H., Kim J., Ohara T., Asakura M., Takahama H., Amaki M., Hashimura K., Kitakaze M.. Increased Aortic Stiffness is a Risk of Left Ventricular Diastolic Dysfunction Even in Normotensive Subjects.
 - 2) Takahama H., Kitakaze M., Asai T., Minamino T. Targeting of Ischemic/reperfused Myocardium by Liposomal Amiodarone Reduced Ventricular Fibrillation in Rats
3. 第36回国際生理学会大会 (平成21年7月27日)
一般演題
 - 1) Takashima S., Seguchi O., Yamazaki S., Asakura M., Kitakaze M.. The role of cardiacMLCK in sarcomer development in cardiomyocytes”
 - 2) Sasaki H., Asanuma H. (3人略) Asakura M.,

Kim J, Minamino T, Takashima S. (5人略)
Kitakaze M. Metformin therapy is associated
with improved cardiac function and improved
insulin resistance in dogs?

4.第74回日本循環器学会総会・学術集会
(平成22年3月5～7日)

- 1) Tomoike H., Kim J., Asakura M., Yoshida A.,
Mori M., Maeda M., Kitakaze M. Current
Status of Pathophysiology of Dilated
Cardiomyopathy in Japan-Reports from the
Research Committee of the Investigation of
Idiopathic-Cardiomyopathy.
- 2) Takashima S., Asano Y., Fujita M., Minamino T.,
Komuro I., Kitakaze M. Familial Bradycardia
Caused by the Mutation of Inward Rectifier
Potassium Channel.
- 3) Sanada S., Kitakaze M. A Novel Therapeutic
Strategy against Cardiac Failure Based on
Cardioprotective Mechanisms of
Preconditioning: Brief Phosphodiesterase-3
Inhibition and Transient PKA Activation.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む)

1、特許取得

心臓特異的キナーゼの心不全診断および治療への
応用

公開番号：特開2009-242388

公開日：2009年10月22日

出願番号：特願2009-056423

出願人：国立循環器病センター総長 第一三共
株式会社

出願日：2009年03月10日

発明人：北風政史、高島成二、瀬口理、朝倉正紀、
大塚敏明、中丸健治、合田明日香

2、実用新案登録

現在のところなし

3、その他

特記すべき事項なし

分担研究報告書

ナノサイズリポソームを用いた急性心筋梗塞治療法の開発（19-ナノ-一般-011）

堀 正二 大阪府立成人病センター 総長

研究要旨

研究分担者は主にラットを利用した慢性心不全モデル・虚血心モデルを作成してその病態を解析してきた。本研究は、リポソーム化アミオダロンの障害心筋への選択的集積増強、心臓保護作用増強・副作用軽減効果を見検討した。代表研究者と共同で実験プロトコルの企画・立案やデータ解析をおこない、リポソーム化アミオダロンが心筋梗塞後の致死的不整脈を軽減することを明らかにしました。本リポソーム化薬剤の開発は心筋梗塞治療に対する新たな治療の確立に貢献することが期待できる。

A. 研究目的

本年度も研究代表者と協力してラット心筋虚血再灌流モデルを作成し、リポソーム化アミオダロンの障害心筋への選択的集積増強、心臓保護作用増強・副作用軽減効果を見検討した。

B. 研究方法

1. 抗不整脈薬アミオダロンの障害心筋への選択的集積による心臓保護作用の増強ならびに副作用軽減の検討

1-1) リポソームの虚血再灌流後心筋への集積の検討

ラット心筋虚血再灌流モデルは、Bullard et al., Basic Res Cardiol. (2005)の方法に従って作製した。具体的には、9週齢の Wister 系ラットをペントバルビタール 50mg/kg 腹腔内投与で麻酔を行い、気管内挿管を行い人工呼吸開始した後、鼠径静脈にカニューレーションを行い、静脈路を確保する。開胸した後、左冠動脈左前下行枝（LAD）を結紮し虚血心を作製し、心電図をモニターし、心室細動発症時には心臓を直接マッサージする。5分後、結紮を開放し再灌流を行う。蛍光標識リポソームは再灌流 10 分前から静脈内投与をおこなった。投与 3 時間後に、組織学的検討ならびに in vivo イメージングにて虚血再灌流領域へのリポソーム集積を評価し、TTC 染色にて心筋梗塞サイズを測定した。

1-2) リポソーム化アミオダロンの血行動態へおよぼす影響の検討

ラットを用いて、アミオダロンとリポソーム化アミオダロンの血圧、脈拍に及ぼす影響を用量依存的に検討した。

1-3) リポソーム化アミオダロンの致死的不整脈軽減効果の検討

上記のラット虚血・再灌流モデルを用いて、アミオダロン、リポソーム化アミオダロンの心筋梗塞サイズに及ぼす影響を検討した。さらに、麻酔開胸犬を用いて、アミオダロン、リポソーム化アミオダロンの心室細動抑制効果を検討した。

C. 研究結果

1-1) リポソームの短時間虚血再灌流後心筋への集積の検討

In vivo イメージング法を用いた観察の結果、リポソームが心筋虚血再灌流特異的に集積していることが分った。また、蛍光標識リポソームを用いた組織学的にても、心筋梗塞部位への特異的集積が確認できた。

1-2) リポソーム化アミオダロンの血行動態へおよぼす影響の検討

アミオダロン投与により、用量依存的に全身血圧ならびに脈拍数の低下が認められた。アミオダロンと比較して、リポソームアミオダロンの血圧低下効果ならびに徐脈化は著しく軽減した。

1-3) リポソーム化アミオダロンの致死的不整脈軽減効果の検討

アミオダロン単独投与と比較して、リポソーム化アミオダロンは致死的不整脈である心室頻拍・心室細動の発生頻度を有意に抑制した。

D. 考察

本研究では、アミオダロンのリポソーム化による障害心筋への選択的集積、心臓保護作用増強ならびに副作用軽減を明らかにした。アミオダロンは高用量投与で、甲状腺機能障害・肺機能障害などの副作用を呈するため、リポソーム化による薬効増強・副作用軽減が期待できる。心筋梗塞後は重篤な不整脈により予後の悪化が認められるため、本リポソーム化薬剤の開発は心筋梗塞治療に対する新たな治療の確立に貢献する。

E. 結論

本研究では、アミオダロンのリポソーム化による障害心筋への選択的集積、心臓保護作用増強ならびに副作用軽減を明らかにした。今後、企業との連携を視野に入れながら、前臨床試験を進めていく。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Taneike M, Yamaguchi O, Nakai A, Hikoso S, Takeda T, Mizote I, Oka T, Tamai T, Oyabu J, Murakawa T, Nishida K, Shimizu

T, Hori M, Komuro I, Shirasawa T, Mizushima N, Otsu K. Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. *Autophagy*. 2010 (In press).

2. Mizote I, Yamaguchi O, Hikoso S, Takeda T, Taneike M, Oka T, Tamai T, Oyabu J, Matsumura Y, Nishida K, Komuro I, Hori M, Otsu K. Activation of MTK1/MEKK4 induces cardiomyocyte death and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2010 ;48(2):302-9.

2. 学会発表

特記事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

現在のところなし

2. 実用新案登録

現在のところなし

3. その他

特記すべき事項なし

研究要旨 本研究では、心筋梗塞に伴う致死的不整脈の治療薬であるアミオダロンのリポソームへの封入の最適化を試みた。本年度は、リポソーム脂質組成と薬物封入効率の関係、薬物添加量と薬物封入効率の関係について検討し、アミオダロンのリポソーム化に適す脂質組成を決定した。本研究で開発したリポソーム化アミオダロンは、不整脈治療薬としては初のリポソーム DDS 製剤として期待される。

A. 研究目的

心筋梗塞に伴う致死的不整脈の治療薬であるアミオダロンのリポソーム化を試みた。アミオダロンは、強力な不整脈抑制効果をもつが、重篤な副作用が課題となっている。そこで本研究では、アミオダロンの心筋梗塞部位への選択的集積による不整脈抑制作用の増強ならびに副作用軽減を目的とし、リポソーム化アミオダロンの開発を行った。本年度は主にリポソーム化アミオダロンの構成脂質組成について検討を実施した。

B. 研究方法

リポソーム化アミオダロンの調製

アミオダロンを含む様々な組成の脂質混合溶液を調製した後、薄膜法によって混合脂質フィルムを作成した。リン酸緩衝スクロース溶液を加えて水和し、リポソームを調製した。

C. 研究結果

リポソーム化アミオダロンの開発

アミオダロンのリポソーム脂質 2 重膜相への封入効率を指標にし、アミオダロンのリポソーム化に適す基本構成脂質の組成について検討した。POPC/コレステロールを基本組成とし、アミオダロンを 10 モル%添加して調製したリポソーム化アミオダロンは、粒子径が 102 nm、表面電位が -3.7 mV であり、その際の封入効率は 80%以上であった。このリポソーム化アミオダロンを用い、

実験動物において不整脈抑制効果を検討することにした。

D. 結論

【リポソーム化アミオダロンの開発】

本年度の研究成果により、リポソームの物性ならびに薬物封入効率に優れるリポソーム化アミオダロンの調製が可能となった。本研究で開発したリポソーム化アミオダロンは、不整脈抑制作用の増強ならびに副作用軽減に繋がる不整脈治療薬としては初のリポソーム DDS 製剤になりうる可能性がある。

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表: 書籍記入用

(代表及び研究分担者の業績一覧)

課題名 : ナノサイズリポソームを用いた急性心筋梗塞治療法の開発

お名前 : _____ 南野 哲男 _____

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
南野哲男	重症心不全を理解するー心筋代謝の面から	北風政史	重症心不全の予防と治療	中外医学社	日本	2009	251-261
Asai, T. and Oku, N.	Angiogenic Vessel-Targeting DDS by Liposomalized Oligopeptides.	Volkmar Weissing	Methods in Molecular Biology	Humana Press	New York, USA	2010	335-347
北風政史	心臓力学とは何か?	北風政史	重症心不全の予防と治療	中外医学社	日本	2009	1-12
北風政史	慢性心不全の内科的治療ーACEI, ARB	北風政史	重症心不全の予防と治療	中外医学社	日本	2009	228-233
朝倉正紀 北風政史	虚血性心疾患	小室一成 北風政史 室原豊明 山下武志	ファーマナビゲーターーβ遮断薬編	メディカルレビュー社	日本	2009	50-59
浅沼博司 北風政史	循環器系の身体所見	北風政史	重症心不全の予防と治療	中外医学社	日本	2009	62-71

研究成果の刊行に関する一覧表

(代表及び研究分担者の業績一覧)

課題名 : ナノサイズリポソームを用いた急性心筋梗塞治療法の開発

お名前 : 南野 哲男

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	頁	出版年
Asai M, Tsukamoto O, Minamino T (7人略) Takashima S (1人略) Kitakaze M	PKA rapidly enhances proteasome assembly and activity in in vivo canine hearts	J Mol Cell Cardiol	46	452-462	2009
Takahama H, Minamino T (10人略) Takashima S (3人略) Kitakaze M	Prolonged targeting of ischemic/reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats	J Am Coll Cardiol	53	709-717	2009
Ishii, T., Asai, T., Urakami, T., Oku, N.	Accumulation of macromolecules in brain parenchyma in acute phase of cerebral infarction/reperfusion.	Brain Res.			2010 (in press)
Murase, Y., Asai, T., Katanasaka, Y., Sugiyama, T., Shimizu, K., Maeda, N., Oku, N.	A novel DDS strategy, "dual-targeting", and its application for antineovascular therapy.	Cancer Lett.	287	165-171	2010
Shimizu, K., Osada, M., Takemoto, K., Yamamoto, Y., Asai, T., Oku, N.	Temperature-dependent transfer of amphotericin B from liposomal membrane of AmBisome to fungal cell membrane.	J. Control. Release	141	208-215	2010
Shimizu, K., Kinouchi Shimizu, N., Hakamata, W., Unno, K., Asai, T., Oku, N.	Preventive effect of green tea catechins on experimental tumor metastasis in senescence-accelerated mice.	Biol Pharm Bull.	33	117-121	2010

Urakami, T., Sakai, K., Asai, T., Fukumoto, D., Tsukada, H., Oku, N.	Evaluation of O-[(18)F] fluoromethyl-d-tyrosine as a radiotracer for tumor imaging with positron emission tomography.	Nucl. Med. Biol.	36	295-303	2009
Urakami, T., Kawaguchi, A.T., Akai, S., Hatanaka, K., Koide, H., Shimizu, K., Asai, T., Fukumoto, D., Harada, N., Tsukada, H., Oku, N.	In vivo distribution of liposome-encapsulated hemoglobin determined by positron emission tomography.	Artif. Organs	33	164-168	2009
Koide, H., Asai, T., Hatanaka, K., Shimizu, K., Yokoyama, M., Ishida, T., Kiwada, H., Oku, N.	Elucidation of accelerated blood clearance phenomenon caused by repeat injection of PEGylated nanocarriers.	Yakugaku Zasshi	129	1445-1451	2009
浅井知浩, 奥直人	リポソーム DDS の医療応用.	血管医学	10	373-380	2009
Iijima M, Matsuzaki T, Kadoya H, Hatahira S, Hiramatsu S, Jung G, Tanizawa K, and Kuroda S.	Bio-nanocapsule-based enzyme-antibody conjugates for ELISA.	Anal. Biochem.	396	257	2010
Kang JH, Oishi J, Kim JH, Ijuin M, Toita R, Jun B, Asai D, Mori T, Niidome T, Tanizawa K, Kuroda S, Katayama Y	Hepatoma-targeted gene delivery using a tumor cell-specific gene regulation system combined with a human liver cell-specific bionanocapsule.	Nanomedicine Feb	3号	印刷中	2010
真下 永、黒田俊一	ぶどう膜炎治療におけるドラッグデリバリーシステムの可能性	眼科	51	891-899	2009
Mizushima, H., Wang, X., Miyamoto, S., and Mekada, E.	Integrin signal masks growth-promotion activity of HB-EGF in monolayer cell cultures..	J. Cell Sci.	122	4277-4286	2009

Mekada, E. and Iwamoto, R.	HB-EGF	UCSD-Nature Molecule Pages.	237	247-258.	2008
Min K Asakura M (7 人略) Asanuma H (1 人略) Minamino T (5 人略) Furukawa H (1 人略) Takashima S (1 人略) Kitakaze M	Identification of genes related to heart failure using global gene expression profiling of human failing myocardium	Biochem. Biophys. Res. Commun.	393	55-60	2010
Tsukamoto O Fujita M (9 人略) Minamino T Asakura M (3 人略) Kitakaze M	Natriuretic peptides enhance the production of adiponectin in human adipocytes and in patients with chronic heart failure	Journal of the American College of Cardiology	53	2070-2077	2009
Sasaki H Asanuma H (5 人略) Asakura M (1 人略) Minamino T Takashima S (4 人略) Kitakaze M	Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase	Circulation	119	2568-2577	2009
Shintani Y Takashima S (2 人略) Kitakaze M	Extracellular protein kinase CK2 is a novel associating protein of neuropilin-1	Biochemical and biophysical research communicatios.	385	618-623	2009
Minamino T Kitakaze M	ER stress in cardiovascular diseases.	Journal of molecular and cellular cardiology.		Nov. 12 [Epub ahead of print]	2009
Asanuma H Kitakaze M	Carperitide and Adiponectin — How Are They Connected Each Other to Benefit Acute Decompensated Heart Failure? —	Circ J	73	2206-2207	2009

ナノサイズリポソームを用いた新しい心筋梗塞治療法の開発

大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学
南野哲男

<はじめに>

近年、糖尿病やメタボリック症候群などの動脈硬化性疾患発症リスクの高い患者が増加しているため、今後、狭心症や心筋梗塞患者数の発症増加が予想される。急性心筋梗塞は依然死亡率の高い疾患であり、新しい治療法の開発は循環器医が取り組むべき重要な課題である。急性心筋梗塞に対する治療法は、1) 閉塞血管の早期再灌流による血流再開、2) 薬物補充療法による梗塞領域の傷害心筋の保護である。早期再灌流に関しては、経皮的経管冠動脈形成術（いわゆる“風船療法”）が広く普及しているが、傷害心筋に対する薬物的補充療法は確立されていないのが現状である。基礎実験の結果や小規模臨床試験において、アデノシンやエリスロポエチンなどが心筋梗塞サイズを縮小させることが報告されている。しかし、心筋梗塞部位への特異的薬物送達方法がないため、副作用が高頻度に発症することが予想されるため、実地臨床へのトラスレーションが進んでいない。そこで、私たちは、ナノサイズリポソームが心筋梗塞部位へ集積する性質を有することに着目して、新しい心筋梗塞治療の開発をおこなっている。すなわち、リポソームを用いることにより、心保護薬剤を心筋梗塞部位へ効率よく送達することが可能になるため心保護作用が増強すると同時に、副作用の発現が軽減することが期待できる。

<アデノシンの心筋虚血再灌流障害抑制作用>

心筋虚血再灌流障害は血流途絶による虚血に起因する障害と再灌流そのものが生存心筋を傷害することによって生じると考えられている(1)。その発生メカニズムには、活性酸素発生や細胞内カルシウム過負荷などの複数の要因が関与することが知られている。ヌクレオシドの一つであるアデノシンは心筋細胞、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞に存在するアデノシン受容体を介して、多様な生理作用を呈する(2)。アデノシンA₁受容体を介して、心筋細胞においてカテコラミン過負荷や細胞内カルシウム過負荷を抑制する。また、アデノシンA₂受容体を介して、冠血流増加作用、白血球からの活性酸素産生抑制、血小板活性化抑制作用を有する。そのため、アデノシンは心筋虚血再灌流障害に対して心筋保護的に作用することが期待される。実際、動物を用いた心筋梗塞（心筋虚血再灌流）モデルにおいて、アデノシン投与は心筋梗塞サイズを著明に軽減することが報告されている(3)。これらの基礎的検討結果に基づいて、近年、心筋梗塞患者を

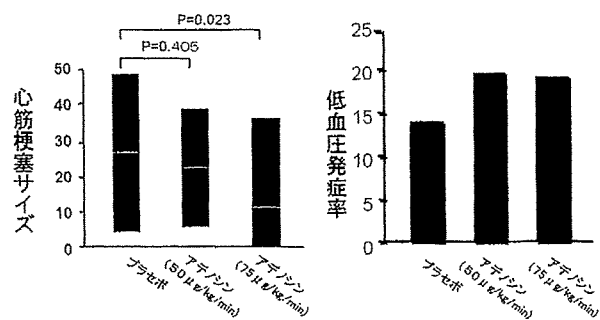


図1. アデノシンは心筋梗塞サイズを用量依存性に抑制する(臨床試験)

J Am Coll Cardiol. 2005 Jun 7;45(11):1775-80 より作図

対象とした大規模臨床試験が行なわれた(4)。臨床試験においても、アデノシンの静脈内投与は心筋梗塞サイズを用量依存性に縮小させることが認められたが、同時に、血圧低下も引き起こすため、広く臨床応用されていないのが現状である(図1)。

<ナノサイズリポソームの心筋梗塞部位への特異的集積>

リポソームはEPR効果によりがん組織へ集積するため、リポソーム製剤は主にごん治療の新しい薬剤として注目されているが、循環器疾患治療への応用は限られている。心筋虚血再灌流領域では、激しい炎症が生じており、心筋梗塞後早期にP-セレクトリンやICAM-1などの接着分子の発現が認められる。このため、同領域はactive targetingの良い標的になりうる。また、興味深いことに、

梗塞後心臓では、心筋虚血再灌流領域での血管透過性が非常に亢進していることが報告されている(5、6)。そのメカニズムとしては、血管内皮細胞の物理的損傷によるものと血管間隙の増加によるものが考えられる。これらのことから、ナノサイズリポソームを用いることにより癌組織と同様に心筋虚血再灌流領域を対象としたactiveならびにpassive targetingが期待できる。そこで、私たちは、蛍光標識したポリエチ

レングリコール装飾リポソーム(ステルスリポソーム)を心筋梗塞作成ラットに静脈内投与し、心臓への集積を評価した。ラット心筋梗塞モデルは、左冠動脈を30分間閉塞後、再灌流することにより作成した。再灌流開始5分前から開始後5分までの計10分間、大腿静脈より蛍光色素標識化リポソームを投与し、3時間後にin vivo imagingを用いて心臓への集積を評価した。心筋壊死領域はTTC(triphenyltetrazolium chloride)染色により同定した。その結果、TTC染色により評価した心筋壊死領域ならびにその周辺領域、すなわち閉塞した左冠動脈の支配領域に一致してリポソームが集積する一方、非心筋梗塞部位ではリポソームの集積は認められなかった(図2)。定量的解析においても同様の実験結果が得られた。心筋壊死領域では血管内皮細胞の破綻が頻繁に認められるが、その周辺領域では血管内皮細胞の解剖学的破綻は認められず、血管内皮細胞間の間隙増加が認められるのみであることが多い。しかし、心筋虚血再灌流領域では、血管内皮細胞の形態的破綻の無い状況においても、血管透過性が亢進することが報告されており、リポソームの集積はこれらの血管透過性亢進を介して認められたものと考えられる。すでに心筋細胞の不可逆的変化が生じている心筋壊死領域のみならず、生存の可能性が高い傷害心筋が存在する周辺領域に対してもリポソーム集積が認められることは治療効果を考慮する際には大変重要な所見である。以上より、リポソームによる心筋保護薬剤の傷害心筋への特異的送達が可能となり、心筋虚血再灌流障害軽減効果が期待できる。そこで、虚血再灌流障害に対する心保護作用が認められるアデノシンのリポソーム化を検討することにした。

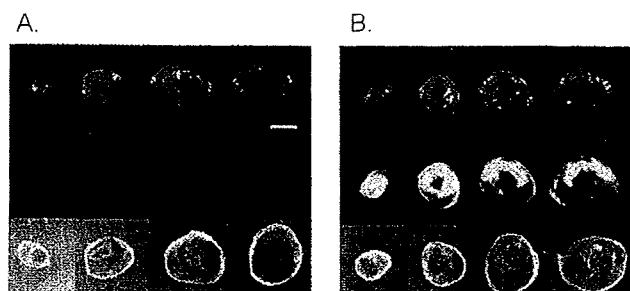


図2. リポソームの心筋虚血再灌流領域への集積

ラット虚血再灌流モデルを使用。上段:明視野像、中段:蛍光定量像、下段:TTC染色像。再灌流前に蛍光標識リポソーム(A)あるいは非蛍光標識リポソーム(B)の経静脈的投与を行った。蛍光標識リポソームを投与したラットではTTC染色で示す梗塞領域に一致した蛍光色素の集積が認められる。