

200912011B

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

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

平成 19 年度～21 年度 総合研究報告書

主任研究者 南野 哲男

平成 22 (2009) 年 5 月

目 次

I. 総合研究報告		
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に関する研究-----		1
南野 哲男		
(資料) 新聞報道		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	17
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	26

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

総合研究報告書

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）

主任研究者 南野哲男 大阪大学大学院医学系研究科・講師

研究要旨 本研究では、1) 心臓保護薬剤アデノシンや抗不整脈薬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増強、心臓保護作用増強（心筋梗塞サイズ縮小・致死的不整脈減少）ならびに副作用軽減効果（血圧低下など）、2) バイオナノカプセル（BNC）を用いた心筋梗塞部位を標的とした新しいデリバリーシステム（DDS）の開発、3) HB-EGF を標的とした心不全・梗塞後心不全・婦人科系がんに対する新規 DDS の開発をおこなった。最初に、電子顕微鏡にて心筋梗塞部位を詳細に検討した結果、血管内皮構造の破綻を認め、がん組織と同様に、ナノサイズリポソームの同部位への集積が期待された。そこで、麻酔下ラット心筋梗塞モデルを用いて、蛍光標識リポソームや RI 標識リポソームを用いた検討をおこない、虚血再灌流部位への特異的集積を確認した。さらに、リポソーム化により、アデノシンの血圧低下や脈拍数低下が軽減され、心筋梗塞サイズ縮小効果や致死的不整脈軽減作用が増強されることをラットならびに大型動物（イヌ）にて確認した。また、慢性期心臓リモデリング抑制効果ならびに長期生存率改善効果も認めた。現在、共同研究企業にて、Feasibility 試験を行なう準備を行なっている。さらに、致死的不整脈に対する薬剤アミオダロンのリポソーム化にも成功し、ラット心筋虚血・再灌流時モデルにおいて、再灌流時リポソーム化アンカロン投与より、心室頻拍・心室細動発症を抑制した。以上より、リポソームを用いることにより心筋梗塞急性期における心筋障害を抑制することが可能であることを示し、画期的新薬の創出に貢献することが示された。

また、炎症部位周辺に引き起こされる EPR（Enhanced Permeability and Retention）効果と強い膜透過活性の相乗効果を期待して、TAT 膜透過ペプチドを提示した BNC を作製し、ルシフェラーゼ遺伝子（治療用遺伝子モデル）を封入して、同様にラットモデルに投与した。その結果、セレクチン認識抗体提示型 BNC よりも高い効率で患部の炎症部位周辺に BNC を送達することができ、有意な遺伝子発現を確認することができた。以上から、心筋梗塞部位自体への標的化にはセレクチン認識抗体提示型 BNC は適しているが、遺伝子治療などの心筋梗塞部位周辺への標的化には TAT 膜透過ペプチド提示型 BNC が適していることが強く示唆された。

さらに、膜結合型 HB-EGF が不全心・梗塞後心臓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。抗 HB-EGF 抗体修飾リポソームを用いると、HB-EGF を発現する細胞に特異的に、効率よく目的物質を導入することができることを見出した。さらに、従来は心筋細胞への物質の導入が困難であったが、HB-EGF を高発現させた心筋細胞では、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。HB-EGF 高発現ペロ細胞では、siRNA を封入した HB-EGF 結合リポソームにより標的遺伝子がノックダウンされた。ヒト乳がん細胞移植マウ

スでは、ドキソルビシン封入HB-EGF結合リポソームはその腫瘍体積を縮小させた。以上より、HB-EGF結合リポソームがHB-EGF高発現疾患に対する革新的な薬物送達技術になりうる（国際特許出願済）。心筋梗塞・心不全治療法の新たな開発にのみならず、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。

【研究分担者】

浅井 知浩 静岡県立大学 薬学部
講師

黒田 俊一 大阪大学産業化学研究所
生体応答科学研究部門
准教授

堀 正二 大阪府立成人病センター
総長

北風 政史 国立循環器病センター
臨床研究開発部 部長

朝倉 正紀 国立循環器病センター
臨床研究開発部 医長

金 智隆 国立循環器病センター
心臓血管内科 医長

浅沼 博司 近畿大学医学部付属病院
救急診療科 医学部講師

高島 成二 大阪大学 分子心血管医学
准教授

蜂須 麗 北海道システムサイエンス株式会社
バイオ事業本部
バイオ受託解析グループ
リポソーム学 研究員

目加田 英輔 大阪大学微生物研究所
生体防御研究部門
教授

朝野 仁裕 大阪大学 循環器内科学
助教

A. 研究目的

本研究の目的は、1) 心臓保護薬剤アデノシン・アミオダロンのリポソーム化による心臓保護作用増強ならびに副作用軽減効果、2) バイオナノカプセル (BNC) を用いた心筋梗塞部位を標的とした新しいデリバリーシステム (DDS) の開発、3) HB-EGF を標的とした心不全・婦人科系がんに対する新規 DDS の開発である。

B. 研究方法

1. 心臓保護薬剤アデノシ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

<要旨>

アデノシンは虚血再灌流障害に対して心臓保護作用を有することが知られているが、血管拡張作用・徐脈作用のため、臨床応用が進んでいない。本研究では、アデノシンのリポソーム化による心臓保護作用増強ならびに副作用軽減を検討した。

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。30分後、結紮を開放し再灌流を行うと心筋梗塞部位が誘導される。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。同時に、電子顕微鏡にて、心筋梗塞部位での血管内皮の破綻の有無を検討した。

1-2) リポソーム化アデノシンの血行動態へおよぼす影響の検討

ラットを用いて、アデノシンとリポソーム化アデノシンの血圧、脈拍に及ぼす影響を用量依存的(225-900・g/kg/min x 10 分間)に検討した。

1-3) リポソーム化アデノシンの心筋梗塞サイズ縮小効果・致死的不整脈軽減効果の検討

上記のラット心筋梗塞モデルを用いて、アデノシン、リポソーム化アデノシン(450・g/kg/min x 10 分間)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、アデノシン、リポソーム化アデノシンの心室細動抑制効果を検討した。

1-4) リポソーム化アデノシンの梗塞後左室リモデリング・生存率改善効果の検討

上記のとおり、心筋梗塞モデルを作成し、大腿静脈よりリポソーム化アデノシンを持続投与した。心筋虚血再灌流モデル作製日又はモデル作製翌日を起算日とし、生存率は3ヶ月間(14週間)観察した。

2. 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

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、間質性肺炎、肺線維症、甲状腺機能低下症などの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指し、リポソーム化アミオダロンの開発を行った。アミオダロンは脂溶性が高い化合物であることから、リポソーム化には脂質2重膜相への封入が有効であると考えた。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。調製したリポソーム化アミオダロンの粒子径は約100 nm、表面電位は中性、封入効率は80%以上であった。心筋梗塞部位ではEnhanced permeability and retention (EPR)効果による選択的デリバリーが可能であるため、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。

2-1) 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。

2-2) 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。

2-3) 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。

3. バイオナノカプセルを用いた心筋梗塞部位を標的とした新しいデリバリーシステムの開発

3-1) 抗体提示用 BNC (ZZ-BNC)

Staphylococcus aureus 由来 Protein A の IgG Fc 結合領域 (Z ドメイン) をタンデムに結合した分子 (ZZ ドメイン) を、ヒト肝臓特異的 BNC (オリジナル BNC) の外周に提示されている HBV 由来ヒト肝臓特異的レセプター部位 (Pre-S 領域) と遺伝子工学的に置換し、遺伝子組換え酵母で大量生産させた後、BNC と同じ手法で精製して抗体提示用 BNC (ZZ-BNC) を得た (Muraoka et al., 投稿中)。本 ZZ-BNC は、直径約 80nm のカプセル状粒子で、表面には ZZ ドメインが約 130 個提示されている (Iijima et al., 投稿中)。

3-2) 抗セレクチン抗体提示型 Cy7 標識 ZZ-BNC

ZZ-BNC の外周に露出している Lys 残基 (ϵ アミノ基) に対して Cy7 (近赤外波長蛍光分子) -NHS エステルを作用させて、Cy7-標識 ZZ-BNC を作製した。その後、セレクチン P 抗体を加えて、抗体-ZZ-BNC 間を結合した。

3-3) TAT 膜透過ペプチド提示 BNC

凍結乾燥した精製 ZZ-BNC をタンパク質濃度で 1 mg/ml となるように滅菌蒸留水に溶解した。ZZ-BNC 溶液 1 mg (タンパク質として 0.02 μ mol) に対して EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (NHS-Biotin, Thermo Fisher Scientific) を 0.67 mg (1.34 μ mol) を混和して室温で 1 時間反応させた。反応液を 10 ml Sephadex G-25 Fine (GE Healthcare, Niskayuna, NY, USA) を充填した Econo-Pac Disposable Chromatography Columns (BIO-RAD, Hercules, CA) に負荷後、PBS (-) により溶出した。NHS-Biotin の ZZ-BNC 表面への結合量は、EZ Biotin Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量した。得られた

biotin 標識 ZZ-BNC (bio 標識 BNC) はエッペンドルフチューブに 100 μ g (タンパク質量として) ずつ分注し、終濃度 5% (容量比) になるように 25% (容量比) sucrose 溶液を加えて凍結乾燥し、使用時まで -20°C にて遮光して保存した。

Neutravidin (NA, Thermo Fisher Scientific) とビオチン化 TAT 膜透過型ペプチド (biotin-YGRKKRRQRRR (bio-TAT, Invitrogen, Carlsbad, CA) を蒸留水で 1 mg/ml の濃度に溶解した。ビオチン化標識ペプチド 1 mg に対し NA をモル比で 1 : 0.1 の割合で混和し、室温で 30 分間反応させることによりペプチド-NA 複合体を形成させた。次いで bio 標識 BNC を ZZ-HBsAg L タンパク質と NA が同じモル数になるようにペプチド-NA 複合体に添加し、室温で 30 分反応後、TAT 膜透過ペプチド提示型 BNC を調製した。

3-4) ルシフェラーゼ発現遺伝子の封入

Jung ら (J Control Release (2008)) の方法に従って、Coatsome EL-01-D (脂質として) 300 μ g とルシフェラーゼ発現ベクター pCAG-Luc3 (CAG プロモーター利用: 静岡県立大学薬学部 奥先生より供与) 50 μ g 及び抗セレクチン抗体提示型/TAT 膜透過ペプチド提示型 ZZ-BNC (タンパク質量として) 100 μ g を複合体化して調製した。

3-5) 投与と観察

上記、BNC-脂質-DNA 複合体 (DNA 量 50 μ g) を生理食塩水で 1 ml とする。ラット心筋虚血再灌流モデルにおいて、30 分間の虚血の際、再灌流 5 分前から鼠径静脈のカニューレ部位よりインジェクターを用いて 100 μ l/min の速度で 10 分間 (1 ml) かけて同複合体を投与した。再灌流 48 時間後に、生理食塩水で冠動脈を灌流洗浄後、心臓摘出し、梗塞部位、梗塞境界部位、非梗塞部位を分別し、また脾臓 (陰性対照) を取り出した。

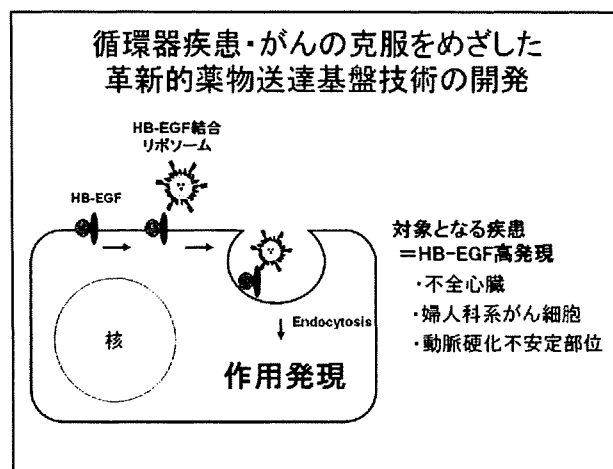
その後、各臓器をPBSで洗浄した後、組織の3倍量 ($\mu\text{l}/\text{mg}$ 組織タンパク質量) の Lysis Buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 7.8), 0.1% (v/v) Triton X-100, 2 mM EDTA) を加え、各組織を氷上で破碎し、 $15000\times g$, 4°C , 30分間遠心した。各破碎上清液の luciferase の発現レベルを調べるために、Luciferase Assay System (Promega) を用いて各臓器内のルシフェラーゼ活性測定を行った。具体的には、破碎上清液 $10\ \mu\text{l}$ にルシフェラーゼ基質 $100\ \mu\text{l}$ を加え、ルミノメーターを用いて 10 秒間発光量を測定した。また、タンパク質量は Micro BCA Protein Assay Kit (SIGMA) を用いて測定し、単位タンパク質量あたりのルシフェラーゼ活性 (RLU/mg タンパク質) で各破碎上清液のルシフェラーゼ活性を比較した。

4. HB-EGF を標的とした心不全に対する新規 DDS の開発

膜結合型ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子 (HB-EGF) は不全心筋細胞や婦人科腫瘍 (卵巣がん、子宮がん、乳がん) において発現が上昇しているため、HB-EGF をターゲットにしたイムノリポソームはこれらの疾患に対する有効なドラッグキャリアとなりうる可能性が高い。本研究では、不全心筋および婦人科腫瘍への選択的ドラッグデリバリーシステムを構築することを目的とし、HB-EGF に対する抗体を結合したイムノリポソームの開発を試みた。アフリカミドリザル腎細胞由来 Vero 細胞、HB-EGF を強制発現させた Vero 細胞 (Vero-H 細胞)、HB-EGF を高発現する MDA-MB-231 ヒト乳がん細胞などを用い、抗 HB-EGF 抗体修飾リポソーム (以下 Ab-PEG-L と略) の有用性を評価した。具体的には、インビトロにおける細胞への取り込み試験やインビボにおけるがん治療実験などを実施した。

4-1) HB-EGF 発現部位の観察

ラット心筋虚血再灌流モデルにおいて、再還流 12 時間および 24 時間後に心臓を摘出し、ホ



ルマリン固定後 OCT コンパウンドにて凍結封埋した。クライオスタット CM3050S (Leica) を用いて心臓の水平断面に $6\ \mu\text{m}$ の厚さで凍結切片を作成し、抗 HB-EGF 抗体 (M-18, SantaCruz) を用いて免疫染色を行なった。二次抗体には Alexa594 標識抗体 (Invitrogen) または HRP 標識抗体 (Dako) を用い、蛍光抗体染色では Hoechst33342 による核染色を、酵素抗体染色では DAB (3, 3' -diaminobenzidine) による発色後ヘマトキシリンによる対比染色を行なった。全ての染色法で、二次抗体のみ (一次抗体なし) の染色を陰性対照として用いた。蛍光抗体染色サンプルは共焦点レーザー顕微鏡 LSM5 PASCAL (Zeiss) を、酵素抗体染色サンプルはデジタルカラー CCD カメラ DP70 (オリンパス) を接続した倒立顕微鏡 IX70 (オリンパス) を用いて観察し、梗塞部位、非梗塞部位のそれぞれの代表的な染色像の画像を取得した。

4-2) マウス圧負荷心不全モデルにおける HB-EGF 発現の観察

マウスを麻酔下に開胸し、大動脈の縮窄による圧負荷心不全モデルを作製した。縮窄後一・四週間で HB-EGF 発現量を定量した。

4-3) HB-EGF 抗体の評価

これまでに報告された HB-EGF やジフテリア毒素の細胞内取り込みに関する研究、研究分担者の過去の実験データを詳細に解析し、DDS として HB-EGF を利用する妥当性、有効な条

件を検討した。また、HB-EGF を DDS の標的とした場合に、標的特異的リポソームに使用する抗 HB-EGF 抗体として最も優れたモノクローナル抗体クローンの選別を、結合特異性、結合の強さ、等の試験を実施して決定した。

HB-EGF 遺伝子の各種細胞での発現量は real-time PCR によって決定した。細胞表面における proHB-EGF 量は、¹²⁵I 標識ジフテリア毒素を用いた結合試験によって測定した。また抗体のマウス HB-EGF に対する結合性は、マウス HB-EGF を過剰発現した L 細胞に対する抗体の結合実験によって求めた。

HB-EGF は膜型前駆体 (proHB-EGF) として合成され、その後細胞表面でプロテアーゼにより切断を受けて、分泌型 HB-EGF となる。また、ジフテリア毒素は proHB-EGF に結合して、エンドサイトーシスによって細胞内に侵入し、毒性を発揮する。したがって、proHB-EGF は細胞内に物質を取り込むための受容体機能は保持していると考えられる。

4-4) 抗 HB-EGF 抗体修飾リポソームの開発

(1) 抗 HB-EGF 抗体修飾リポソームの調製
薄膜法によって作成した混合脂質フィルム (DPPC/コレステロール/PEG-DSPE/マレイミド化 PEG-DSPE) にリン酸緩衝液を加えて水和し、リポソームを調製した (蛍光標識リポソームを調製する際には、上記脂質に加え DiI-C₁₈ を混合した脂質フィルムを作成した)。凍結融解を 3 回繰り返した後、エクストルーダーを用いて粒子径を約 100 nm に調整した。(ドキシソルピシン (DOX) 内封リポソームを調製する際には、この時点でリモートローディング法により封入した。) 次に Fab' 化抗 HB-EGF 抗体をマレイミド化 PEG-DSPE と等モルとなるようにリポソーム溶液に添加し、4°C で 20 時間反応した。Fab' 化抗 HB-EGF 抗体の 10 倍モル量の 0.1 M N-エチルマレイミドを添加し、未反応のスルフヒドリル基を阻害した。セファロース担体を用いたゲル濾過により、Ab-PEG-L あるいは DOX を内封し

た Ab-PEG-L (以下 Ab-PEG-DOX と略) を精製した。

(2) 接着・取り込み試験

Vero 細胞、Vero-H 細胞、あるいは MDA-MB-231 細胞を 24-well プレートに播種し、前培養した。培養液を取り除き、DiI 標識 Ab-PEG-L あるいは対照の PEG リポソーム (以下 PEG-L と略) を含む非必須アミノ酸含有 MEM 培地を添加した。4 (接着試験) あるいは 37°C (取り込み試験) にて 4 時間インキュベートした後、PBS を用いて 3 回細胞を洗浄した。細胞溶解用緩衝溶液 [0.1% ドデシル硫酸ナトリウムを含むトリス-塩酸緩衝溶液] を加えることにより、細胞を溶解した。細胞溶解液は遠心チューブに回収し、1,000 g で 10 分間遠心後、その上清を回収した。サンプルの蛍光強度を蛍光光度計で測定した後、その強度をタンパク質量で補正した。

リポソームが細胞内に取り込まれていることの確認は、共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いた 3 次元解析によって行った。

4-5) ラット心筋細胞におけるヒト HB-EGF 発現の確認

ヒト HB-EGF、マウス HB-EGF を発現するアデノウイルスを心筋細胞に感染させ、36 時間または 48 時間後に細胞を回収し、心筋細胞においてこれらのリコンビナント蛋白質が発現しているかを、抗 HB-EGF マウスモノクローナル抗体 (クローン 3H4) を用いて非還元条件での Western Blot 法にて検討した。

引き続き、これらのアデノウイルス由来 HB-EGF が心筋細胞において細胞膜表面に発現しているかを検討した。ヒト HB-EGF、マウス HB-EGF を発現するアデノウイルスを心筋細胞に感染させ、36 時間後に 4% パラホルムアルデヒドで固定したのち前述のモノクローナル抗体 3H4 にて免疫染色を行った。抗体 3H4 は遊離型 HB-EGF を抗原としているため膜結合型では細胞外領域を認識する。そこで本実験では、Triton X-100 による permeabilization を行わず

、細胞膜表面に発現しているHB-EGFを認識できるように免疫染色を行った。

4-6) 抗HB-EGF抗体リポソームの心筋細胞内への取り込み

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た。さらに 36 時間後、蛍光標識された抗 HB-EGF 抗体リポソーム (HB-EGF-PEG-liposome; HSPC/Chol/DSPE-PEG/DSPE-PEG-mal/DiI=1/0.67/0.03/0.003/0.05) またはコントロールリポソーム (PEG-liposome; HSPC/Chol/DSPE-PEG/DiI=1/0.67/0.03/0.05) を無血清培地の心筋細胞に加え、37℃または 4℃で 4 時間インキュベートした。37℃インキュベートでは細胞内へリポソームが取り込まれ、4℃では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。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。

4-7) 抗HB-EGF抗体リポソームのヒト乳がん細胞内への取り込み

MDA-MB-231 ヒト乳がん細胞を 24-well プレートに播種し、前培養した。培養液を取り除き、DiI 標識 Ab-PEG-L あるいは対照の PEG リポソーム (以下 PEG-L と略) を含む非必須アミノ酸含有 MEM 培地を添加した。37℃にて 4 時間インキュベートした後、PBS を用いて 3 回細胞を洗浄した。細胞溶解用緩衝溶液 [0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを含むトリス-塩酸緩衝溶液] を加えることにより、細胞を溶解した。細胞溶解液は遠心チューブに回収し、1,000 g で 10 分間遠心後、その上清を回収した。サンプルの蛍光強度を蛍光光度計で測定した後、その強度をタンパク質量で補正した。

4-8) 抗HB-EGF抗体リポソームを用いたがん治療実験

雌性 BALB/c ノードマウスの左腹側部に MDA-MB-231 細胞を皮下移植し、固形がん担がんマウスを作製した。がん移植から 14, 21, 28 日後に Ab-PEG-DOX、対照として DOX を封入した PEG-L (以下 PEG-DOX と略) を尾静脈内投与した。腫瘍体積と体重変化をモニターし、がん治療効果の評価を行った。

【AEPO リポソームの開発】

5-1) AEPO リポソームの調製

薄膜法によって作成した混合脂質フィルム (DSPC/cholesterol/MPEG-DSPE) にリン酸緩衝液を加えて水和し、リポソームを調製した。凍結融解を 3 回繰り返した後、エクストルーダーを用いて粒子径を約 100 nm に調整した。一方で AEPO と DSPE-PEG-NHS を室温で一晩インキュベートし、DSPE-PEG-AEPO を調製した。リポソーム溶液に DSPE-PEG-AEPO を加え、65℃で 15 分間加温し、AEPO リポソームを調製した。

5-2) AEPO リポソームの細胞保護効果

ラット副腎髄質由来親クロム性細胞腫 PC12 細胞を 24-well plate に播種し、前培養した。PC12 細胞を神経様細胞へ分化させるために nerve growth factor (NGF) を添加し、5 日間培養した。培地交換後、NGF 非存在下で AEPO リポソームを添加し、さらに 5 日間培養した。MTT 法により生細胞数を測定し、細胞保護効果を評価した。

5-3) AEPO リポソームの再灌流障害抑制効果

栓子法により t-MCAO モデルラットを作製した。再灌流直後、PBS (-)、PEG リポソーム、AEPO、あるいは AEPO リポソームを尾静脈内投与し、24 時間後に運動能をスコア化して評価した。次に脳を摘出し、ラット用ブレインスライサーで中大脳動脈起支部を中心とし 2 mm にスライスした。2%TTC 溶液に脳スライスを浸して生細胞を染色し、OLYMPUS E-300 で撮影、ImageJ にて画像解析を行った。

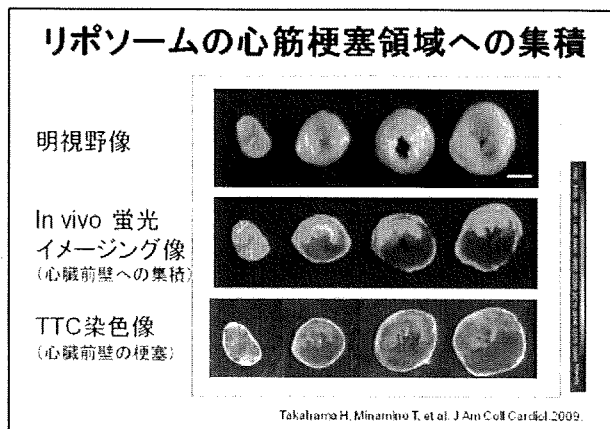
倫理面への配慮

本動物実験に関しては、大阪大学動物実験委員会の承認を得た後、大阪大学の定めた実験動物取扱指針に従って行った。

C. 研究結果

1-1) リポソームの虚血再灌流後心筋への集積の検討

電子顕微鏡にて心筋梗塞部位を詳細に検討した結果、血管内皮構造の破綻を認め、がん組織と同様に、ナノサイズリポソームの同部位への集積が期待された。実際、*n vivo* イメージング法を用いた観察の結果、TTC 染色によって確認しえた梗塞部位に一致して、リポソームが心筋梗塞部位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。



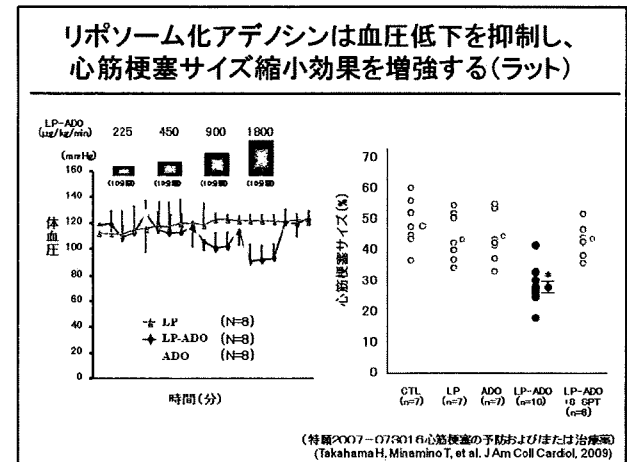
1-2) リポソーム化アデノシンの血行動態へおよび影響の検討

アデノシン投与により、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。アデノシンと比較して、リポソームアデノシ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) リポソーム化アデノシンの心筋梗塞サイズ縮小効果・致死的不整脈軽減効果の検討

アデノシン単独と比較して、リポソーム化アデノシンの心筋梗塞縮小効果は増強された。リポソーム化アデノシンによる虚血再灌流障害

抑制効果は、非選択的アデノシン受容体拮抗剤の同時投与にて消失した。さらに、麻酔開胸犬を用いた検討でも、リポソーム化アデノシン投与群では、有意に心筋梗塞サイズの縮小が認められた。さらに、興味深いことに、リポソーム化アデノシンは致死的不整脈である心室細動の発生頻度を有意に抑制した。

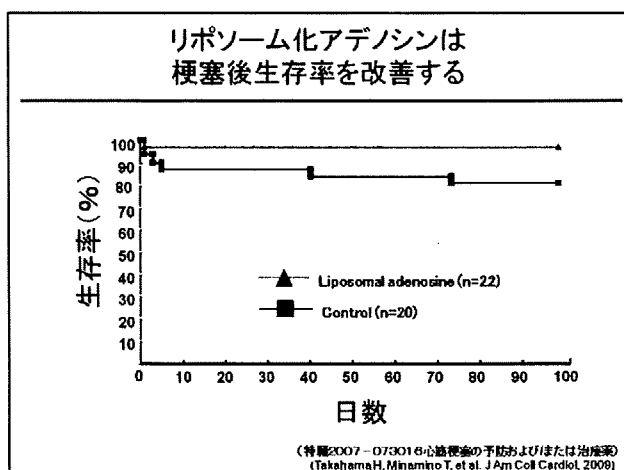


1-4) リポソーム化アデノシンの梗塞後左室リモデリング・生存率改善効果の検討

コントロール群 25 例、Liposomal adenosine 投与群 28 例で評価した。血圧 (SBP, DBP, MBP) はコントロール群でそれぞれ 128 ± 3 mmHg, 109 ± 3 mmHg, 115 ± 3 mmHg であった。Liposomal adenosine 投与群の血圧はそれぞれ 133 ± 3 mmHg, 111 ± 3 mmHg, 119 ± 3 mmHg を示し、コントロール群に対して変化は認められなかった。HR はコントロール群で 419 ± 7 beats/min であった。Liposomal adenosine 投与群の HR は 420 ± 7 beats/min を示し、コントロール群に対して変化は認められなかった。LVSP は Control 群で 131 ± 3 mmHg であった。Liposomal adenosine 投与群の LVSP は 136 ± 3 mmHg を示し、Control 群に対して変化は認められなかった。LVdP/dt はコントロール群で 7365 ± 258 mmHg/sec であった。Liposomal adenosine 投与群の LVdP/dt は 7773 ± 238 mmHg/sec を示し、コントロール群に対して軽度な上昇 (Control 群に対する変化率: 106%) が認められた。-LVdP/dt は Control

群で 5206 ± 217 mmHg/sec であった。Liposomal adenosine 投与群の $-LVdP/dt$ は 5794 ± 220 mmHg/sec を示し、コントロール群に対して軽度な上昇(コントロール群に対する変化率:111%)が認められた。LVEDP はコントロール群で 5.7 ± 1.2 mmHg であった。Liposomal adenosine 投与群の LVEDP は 4.5 ± 1.0 mmHg を示し、Control 群に対して軽度な低下(Control 群に対する変化率:79%)が認められた。

14 週間の生存率は、Control 群 86% (生存数:25/29 例)、Liposomal adenosine 投与群 100% (生存数:28/28 例) であった。Liposomal adenosine 投与群は Control 群に比べて生存率の有意な改善が認められた。



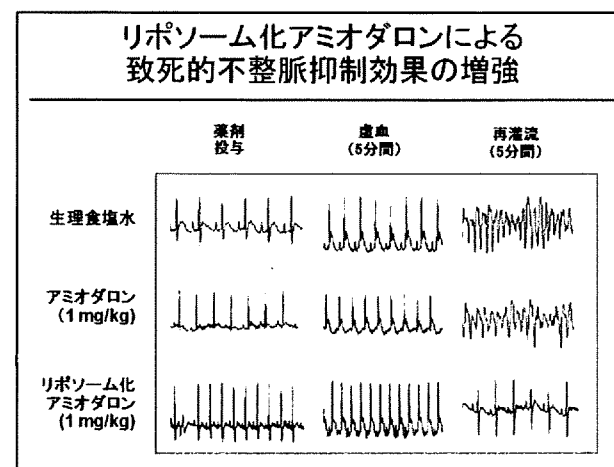
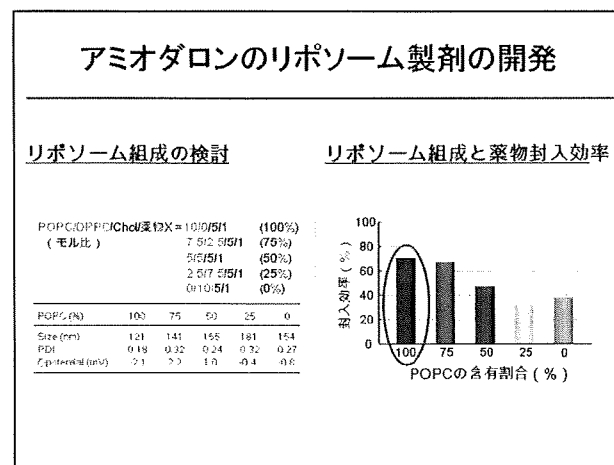
2. リポソームの短時間虚血再灌流後心筋への集積の検討

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。

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。その結果、アミオダロンのリポソーム化

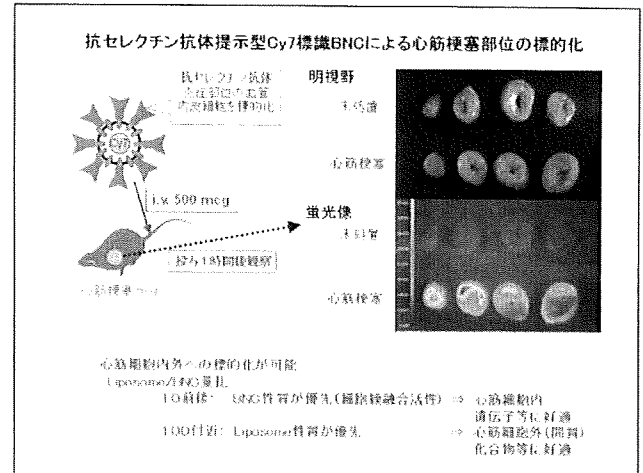
には不飽和脂肪酸 POPC が有用であることが明らかとなった。また、同様に封入効率を指標にし、アミオダロンの添加量について検討したところ、薬物添加量が 20 モル%以下において安定なリポソーム化アミオダロンを調製できることが明らかとなった。POPC/コレステロールを基本組成とし、アミオダロンを 10 モル%添加して調製したリポソーム化アミオダロンは、粒子径が 102 nm、表面電位が -3.7 mV であり、その際の封入率は 80%以上であった。このリポソーム化アミオダロンを用い、実験動物において不整脈抑制効果を検討することにした。

なお、リポソーム化アミオダロンの不整脈抑制効果は、本課題研究の研究代表者によって実施された。その結果、アミオダロンのリポソーム化により、アミオダロンと比較して不整脈の発生頻度低下効果と死亡率改善効果が得られている。



リポソーム化アミオダロンによる
致死的な不整脈抑制効果の増強

	心室細動 発生率	死亡率
生理食塩水	67% (4/6)	67% (4/6)
アミオダロン (1 mg/kg)	50% (3/6)	33% (2/6)
リポソーム化 アミオダロン (1 mg/kg)	17% (1/6)	0% (0/6)



3-1) 抗体提示用 BNC (ZZ-BNC)

抗セレクチン抗体提示型 ZZ-BNC による BNC-脂質-DNA 複合体 (DNA 量 50 μg), 及び陰性対照として未提示 ZZ-BNC による BNC-脂質-DNA 複合体 (DNA 量 50 μg) を用いて, ラット心筋虚血再灌流モデルに静脈注射したところ, 非梗塞部位でのルシフェラーゼ発現量を 100%とすると, 抗セレクチン抗体提示型 BNC は梗塞部位での遺伝子発現が有意に低かった。一方, 陰性対照 BNC は梗塞部位での発現は高かった。また, 両 BNC とも対照臓器の脾臓においては同程度に弱く発現していた。抗セレクチン抗体提示型 BNC は, 昨年度と同様な Cy7 蛍光標識 BNC による生体内イメージングの結果では, 有意に心筋梗塞部位に集積していた。以上の結果は, 心筋梗塞部位は極度の炎症が生じていて, 当該心筋細胞は抗セレクチン抗体提示型 BNC により遺伝子を導入されても発現させる能力が既に低下していると考えられた。そこで, 抗セレクチン抗体提示型 BNC は心筋梗塞部位への薬剤投与には適しているが, 遺伝子導入には不向きと考えられた。次に, 炎症部位を直接認識する抗セレクチン抗体を使用せず, EPR 効果と膜透過ペプチドを BNC に適用することで, 心筋梗塞部位近傍に遺伝子導入を行うことを目指した。

3-2) TAT 膜透過ペプチド提示型 BNC :

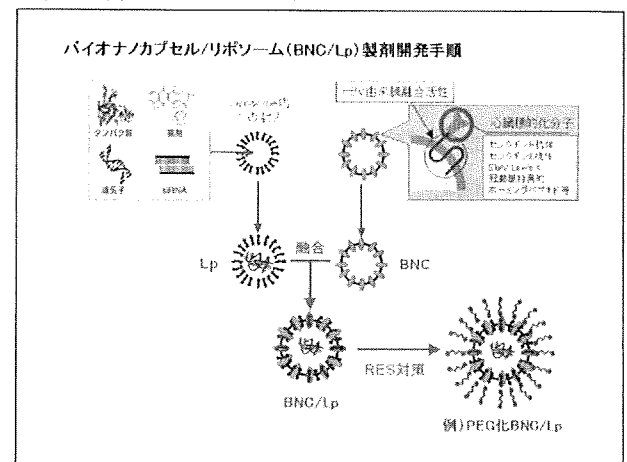
TAT 膜透過ペプチド提示型 BNC による BNC-脂質-DNA 複合体 (DNA 量 50 μg), 及び陰性対照と

して未提示 BNC による BNC-脂質-DNA 複合体 (DNA 量 50 μg) を用いて, ラット心筋虚血再灌流モデルに静脈注射した。その結果, 非梗塞部位のルシフェラーゼ活性に対して梗塞部位での同活性が TAT 膜透過ペプチド提示型 BNC 特異的に 5~10 倍上昇していた。

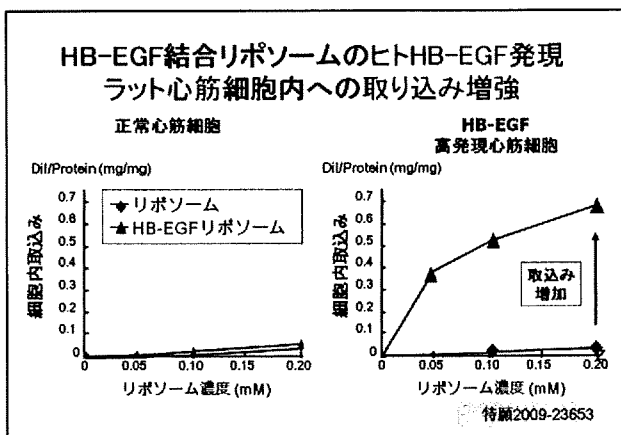
この結果から, TAT 膜透過ペプチド BNC が, EPR 効果によって炎症状態の心筋梗塞部位に侵入し, TAT ペプチドの効果により心筋梗塞部位近傍の心筋細胞にまでルシフェラーゼ発現ベクターを導入させたものと推察された。

3-3) 新しい BNC/Lp 複合体の遺伝子導入能 :

得られた BNC/Lp 複合体を DNA 量 (50 ng) で揃えて, 2 種類の約 5 × 10⁴ 個の培養細胞 (ヒト子宮頸部がん由来 HeLa 細胞 (BNC の非標的細胞), ヒト肝がん由来 Huh7 細胞 (BNC の標的細胞)) の培地に添加し, 48 時間後の細胞から細胞抽出液を作製し, Luciferase アッセイを行った。なお対照群として, 従来法で作製した BNC/Lp 複



ンキュベートした場合、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は、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。



4-6) DiI 標識 Ab-PEG-L を用いた取り込み試験

MDA-MB-231 細胞に対する Ab-PEG-L の細胞内導入について対照の PEG-L と比較検討を行った。その結果、Ab-PEG-L は濃度依存的に MDA-MB-231 細胞内に取り込まれ、また対照の PEG-L と比較して有意に多く取り込まれることが明らかとなった。

4-6) がん治療実験

MDA-MB-231 細胞を移植したヌードマウスにおいて Ab-PEG-DOX の治療効果を検討した。その結果、Ab-PEG-DOX は顕著な腫瘍退縮効果を示すことが明らかとなり、PEG-DOX と比較して有

意に高い治療効果を示した。副作用の一指標としてモニターした体重変化には顕著な影響が認められなかった。

5. AEPO リポソームの開発

5-1. AEPO リポソームの細胞保護効果

NGF によって神経様細胞に分化した PC12 細胞を用い、AEPO の抗アポトーシス活性を評価した。その結果、AEPO リポソームは対照の PEG リポソームや PBS と比較して有意に細胞死を抑制した。AEPO リポソームの細胞保護効果には濃度依存性が観察され、遊離の AEPO と比較して同等以上の効果があった。したがって、リポソーム表面に保持されている AEPO が PC12 細胞膜外の EPO 受容体に結合し、抗アポトーシス作用を誘導することが示唆された。

5-2. AEPO リポソームの再灌流障害抑制効果

t-MCAO モデルラットにおいて、AEPO リポソーム投与群は、AEPO 投与群に比べ、有意に高い細胞保護効果ならびに脳浮腫抑制効果を示した。対照の PEG リポソーム投与群にはまったく効果が認められなかった。神経病理学的評価の指標としてラットの運動能を評価したところ、AEPO リポソーム投与群は、他の投与群と比較して有意に高い治療効果を示した。

D. 考察

リポソーム化アデノシンの心筋梗塞サイズ縮小効果ならびに致死的不整脈軽減効果がラットのみならず大型動物（イヌ）でも確認できた。また、アデノシンによる血圧低下・徐脈化作用などの副作用も軽減された。さらに、リポソーム化アデノシン投与にて、梗塞後生存率の改善が認められた。以上より、リポソーム化アデノシンの優れた作用が明らかになったため、企業連携を視野に入れ、前臨床試験の開始を準備する。

さらに、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、間質性肺炎、肺線維症、甲状腺機能低下症などの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指し、リポソーム化アミオダロンの開発を行った。アミオダロンは脂溶性が高い化合物であることから、リポソーム化には脂質 2 重膜相への封入が有効であると考えた。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。調製したリポソーム化アミオダロンの粒子径は約 100 nm、表面電位は中性、封入効率は 80%以上であった。心筋梗塞部位では Enhanced permeability and retention (EPR) 効果による選択的デリバリーが可能であるため、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。

今回の結果は、抗 BNC 抗体及び抗アポトーシス関連抗原抗体による心筋梗塞部位及び近傍の免疫組織化学的解析が必須であるが、心筋細胞内にルシフェラーゼ発現ベクターが導入されて初めてルシフェラーゼが発現することから、次の様に解釈される。

まず心筋梗塞部位は極めて強い炎症が起っており、心筋細胞は正常な遺伝子発現が出来ないくらいにダメージを受けていると推察される。抗セレクチン抗体提示型 ZZ-BNC は、Active Targeting 機構により心筋梗塞部位に効率よく集積できるが、遺伝子発現を誘導することはできない。本 BNC は心筋梗塞部位の中心に薬剤を放出するのに適しているものと考えられる。この場合、膜融合活性の高いリン脂質によるリポソームを使用すれば心筋細胞内に、同活性の低いリン脂質を用いれば間質部分に投与できると考えられる。

次に、TAT 膜透過ペプチド提示型 BNC は、心筋梗塞部位の炎症作用により EPR 効果が誘導され、Passive Targeting 機構により心筋梗塞部位に集積し、その後、TAT 膜透過ペプチドの作用により梗塞部位近傍の心筋細胞にまで伝播・浸潤し、心筋細胞内での遺伝子発現が達成できると考えられる。つまり、抗セレクチン抗体提示型 ZZ-BNC 及び TAT 膜透過ペプチド提示型 BNC は、心筋梗塞治療において、どのような治療用薬剤（遺伝子を含む）を送達したいかによって使い分ける必要があり、その結果、心筋梗塞治療法の可能性を大きく広げるものと思われた。

リポソームに HB-EGF 特異性を持たせる分子としては、抗 HB-EGF 抗体の他に、ジフテリア毒素が考えられる。ジフテリア毒素は、それ自体が細胞内に取り込まれていく性質があり、DDS としてより有効な分子である可能性もあるが、分子間凝集が起こりやすいなどタンパク化学的には扱いにくい分子であり、創薬という点では解決すべき問題点が多い。本研究課題の分担者である浅井らによって HB-EGF 抗体が DDS リポソーム作製に使用可能であることが示されたので、今後は抗 HB-EGF 抗体を利用したリポソームに集中して開発をするのが妥当であることが示された。

現在使用中のモノクローナル抗体はマウス

HB-EGF に結合しないことから、動物を用いた *in vivo* DDS モデル実験には、マウス HB-EGF に結合するモノクローナル抗体を新たに準備する必要性が示された。しかし、作製を開始したヒト型 HB-EGF 発現マウスを用いると、現在 DDS に使用している抗体をそのまま用いて *in vivo* 実験が可能となるばかりでなく、本法による生体毒性を同時に調べることができるので、よりモデル系としては優れていると考えられる。今後は、ヒト型 HB-EGF ノックインマウスの作製を進め、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に使用したいと考えている。

抗HB-EGF抗体リポソームはヒトのHB-EGFを特異的に認識して心筋細胞内に取り込まれることから、ヒトHB-EGFの発現が亢進しているヒトの不全心筋では、抗HB-EGF抗体リポソームを用いての薬剤やsiRNAのデリバリーが期待できるものと考えられる。今後、ヒトHB-EGF過剰発現マウスを用いて、*in vivo*において抗HB-EGF抗体リポソームが効率的に心筋細胞へ取り込まれるかを検討していく予定である。さらに、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のみならず婦人科腫瘍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。

AEPOリポソームのデータが示すように、リポソームDDS技術の虚血再灌流障害への有用性が示唆された。今後、リポソームを含むナノ製剤を用いた治療戦略が、心筋梗塞や脳梗塞における虚血再灌流障害の新規治療薬開発に繋がることが期待される。

E. 結論

本研究では、心臓保護薬剤アデノシンや抗不整脈薬剤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。また、バイオナノカプセルを用いて心筋梗塞部位を標的とした新しいデリバリーシステムの開発をおこなった。さらに、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。本研究は、今後、循環器疾患に対するナノテクリポソームを用いた治療法開発の中心的グループとして知的財産創出・新しい医療開発に貢献したい。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

刊行に関する一覧表を参照。

2. 学会発表

- 1) Asai, T., Oku, N.: Angiogenic vessel-targeted liposomes for *in vivo* delivery of siRNA. Japan Society of Gene Therapy The 14th Annual Meeting 2008 (Sapporo, Japan) Educational Seminar V-1. 2008年6月14日
- 2) Asai, T., Oku, N.: Angiogenic vessel-targeted liposomal DDS for cancer treatment. 11th Liposome Research Days Conference (Yokohama, Japan) Program book, p.63. 2008年7月20日
- 3) 1.日本細胞生物学会総会 2008
ミニシンポジウム

1. Iwamoto R, Mekada E Role of ectodomain shedding for HB-EGF physiological functions.

- 4) 第 37 回心脈管作動物質学会(2008 年 2 月 2 日)
 <ナノサイズリポソームを用いた新しい
 急性心筋梗塞治療法の開発> (学会奨励賞受賞)
 高濱博幸, 南野哲男他
 血管 VOL31 NO. 1 18 ページ (2008)
- 5) 第 72 回日本循環器学会総会学術集会・ブレイク
 <Nano-size liposome coated with polyethylene
 glycol can deliver drugs to ischemia/reperfused
 myocardium>
 Tetsuo Minamino, Hiroyuki Takahama et al.
 Circulation Journal Vol. 72(Suppl. I), Page 15, 2008
- 6) 第 25 回日本 DDS 学会(2009 年 7 月 東京)
 シボゾウム 3 DDS の臨床応用<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>
- 7) XX World Congress ISHR (2010 年 5 月 京都)
 シボゾウム Protein processing and quality control.
 <Role of CHOP in Cardiac Hypertrophy and
 Failure>
- 8) 清水広介、宮澤壮一郎、刀坂泰史、浅井知造、
 久保直樹、秋田倫幸、丸田福門、宮川眞一、
 田中俊樹、奥 直人：標的化リポソームを用
 いた胃癌由来腹膜播種性転移がんに対す
 る治療。第 23 回日本 DDS 学会 (熊本) Drug
 Delivery System 22 P383、2007 年 6 月 15 日
- 9) Yasufumi Katanasaka, Tomohiro Asai, Hirotaka
 Naitou, Norio Ohashi, Naoto Oku: Analysis of
 BiP protein as a targeting molecule to tumor
 endothelium for drug delivery system. 34th
 Annual Meeting & Exposition of the Controlled
 Release Society (Long Beach CA) 2007 年 7 月
 10 日
- 10) 横田洵一、浅井知造、出羽毅久、南後 守、
 奥 直人：mTOR ノックダウンによるがん
 治療法の開発。平成 19 年度日本薬学会東海
 支部例会 (岐阜) 一般公演 D-12、2007 年
 12 月 8 日
- 11) 刀坂泰史、浅井知造、内藤博敬、大橋典男、
 奥 直人：BiP protein による VEGF-MAPK
 シグナルの制御。第 30 回日本分子生物学会
 年会/第 80 回日本生化学会大会 (横浜) 講演
 要旨集 P821、2007 年 12 月 14 日
- 12) Asai, T., Oku, N.: Angiogenic vessel-targeted
 liposomes for in vivo delivery of siRNA. Japan
 Society of Gene Therapy The 14th Annual
 Meeting 2008 (Sapporo, Japan) Educational
 Seminar V-1. 2008 年 6 月 14 日
- 13) Asai, T., Oku, N.: Angiogenic vessel-targeted
 liposomal DDS for cancer treatment. 11th
 Liposome Research Days Conference
 (Yokohama, Japan) Program book, p.63. 2008
 年 7 月 20 日
- 14) 重松宏和、浅井知造、南野哲男、浅野仁裕、
 高島成二、目加田英輔、奥 直人：HB-EGF
 標的化リポソームによる新規ターゲティ
 ング DDS の開発。第 25 回日本 DDS 学会 (東
 京)、プログラム予稿集、p.316、2009 年 7
 月 3 日
- 15) Takayuki Ishii, Takeo Urakami, Tomohiro Asai,
 Naoto Oku: Permeability increase in BBB
 before appearance of reperfusion injury in acute
 cerebral stroke. 36th Annual Meeting &
 Exposition of Controlled Release Society
 (Copenhagen, Denmark) TRANSACTIONS,
 4696-1、2009 年 7 月 21 日
- 16) Hirokazu Shigematsu, Tomohiro Asai, Tetsuo
 Minamino, Yoshihiro Asano, Seiji Takashima,
 Eisuke Mekada, Naoto Oku: Development of
 immunoliposomes targeting HB-EGF. 4th
 International Liposome Society Conference
 (London, UK) Abstracts, p.87、2009 年 12
 月 14 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

<出願>

発明の名称：心筋梗塞の予防および/または治療剤

出願番号：PCT/JP2008/00652

発明の名称：HB-EGF 結合性タンパク質複合体

発明者：南野哲男ら、他 4 名：出願番号：

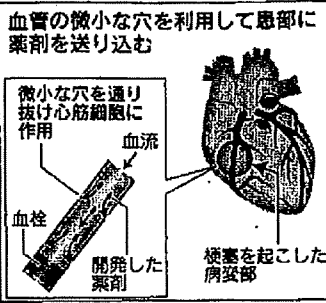
PCT/JP2010/51515: 特許出願日 2010 年 2 月 3

日

心筋梗塞の新薬剤

48時間内なら回復期待

大阪大学医学部の南野哲男助教授らの研究チームは、投薬による心筋梗塞(こうそく)の新しい治療法を開発した。血栓(血の塊)で血管が詰まっても微小な穴があることを突き止め、ここを通り抜ける薬剤を作った。動物実験で有効性を確かめた。発症後四十八時間以内に治療すれば回復が期待でき、将来、適応患者が大幅に広がる治療法になるとみている。



アスヒオファーマ、静岡県立大学、北海道システム・サイエンス(札幌市)、国立循環器病センターなどの共同研究による成果。

今後、製剤化し、新日本科学の協力を得て二年内以内に安全性や効果を検証する前臨床試験を始める。

南野助教授は急性の心

血管通り抜け治療

筋梗塞の患部を詳細に調べ、胸痛などの症状がでてから四十八時間後までなら、詰まった血管に微小な穴があることを発見した。

血液を再び流れやすくする薬を包み込んだ直径百μ(μは十億分の一)〜二百μの微粒子を注射する。製剤を静脈注射する。血管の小さな穴をしみ出るように通り抜け、血流が途絶えて死滅しかかっている心筋細胞に到達し、治療効果を引き出す。

血管を再び心筋梗塞の症状を引き起こしたモデルラットに投与した。三日後、梗塞の大きさが三割縮小した。イヌを

▼心筋梗塞(こうそく) 日本人の三大死因である虚血性心疾患を代表する病気。死亡者数は年間約五万人ともいわれる。動脈硬化などで心臓を取り囲む冠動脈の血流が減少し、心筋が虚血状態になって壊死(えし)し、心臓がうまく拍動しなくなる。胸を強く締め付けられる胸痛が十五分以上続く。治療を早く始めるほど救命率は高い。

使った実験では約六割小さくなった。心停止を起こす不整脈の心室細動の発生率も五〜八割下がった。

心筋梗塞の治療には、心筋細胞に血液が流れるように迂回(まわ)り、詰まった血管に小さな穴を突かせるカテーテル治療がある。血栓溶解剤を使う治療法もあるが、発症後数時間以内の患者が対象で、病院に担ぎ込まれるまでに時間がかかると適用外になる。

新手法は既存の治療法との併用も可能という。

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	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	奥 直人	DDS研究の進歩	バイオメエィカルリサーチプレス	日本	2008	13-18
朝倉正紀、浅沼博司、北風政史	冠血流調節と心筋虚血	杉本恒明、矢崎義雄	内科学第9版	朝倉書店	日本	2008	487-490
浅沼博司、北風政史	心筋虚血と心筋代謝異常	伊藤浩、吉川純一	新・心臓病診療プラクティス12 冠動脈疾患の病態に迫る	文光堂	日本	2008	128-135
北風政史	心筋疾患	相澤義房 今泉 勉 島本和明 友池仁暢 永井良三 松崎益徳	“心血管疾患診療のエクセレンス” 日本医学会雑誌 137特別号(1)	日本医学会	日本	2008	149-150
黒田俊一 (分担)	バイオナノカプセル	岡田弘晃 編集	機能性DDSキャリアの製剤設計	(株)CMC出版	東京	2008	1203-1210
南野哲男	重症心不全を理解する—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	27-32
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—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— 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
Asai, T. and Oku, N.	Angiogenic Vessel-Targeting DDS	Volkmar Weissing	Lisposomes Methods and Protocol	Humana Press	New York,	2010	335-347

	by Liposomalized Oligopeptides.		Vol. 1 Pharmaceu tical Nanocarriers		USA		
--	------------------------------------	--	--	--	-----	--	--