

1ヶ月以内とする。

6.2 標準溶液の調製

約1 mgの Cyclosporin Aを秤量してメタノールを10 mL加え溶解して、0.1 mg/mLの標準溶液を調製する。調製した溶液は適当量に小分けした後に冷蔵庫（管理温度：2 ~ 8 °C）に保存する。使用期限は、1ヶ月以内とする。

6.3 投与液の調製

6.3.1 投与液 A：[3H] Cyclosporin A 含有リポソーム製剤 A

試験委託者より提供された[3H] Cyclosporin A 含有リポソーム製剤 Aをそのまま使用する。

6.3.2 投与液 B：[3H] Cyclosporin A 含有リポソーム製剤 B

試験委託者より提供された[3H] Cyclosporin A 含有リポソーム製剤 Bをそのまま使用する。

6.3.3 投与液 C：[3H] Cyclosporin A 投与液

6.4 投与量及び投与方法

非絶食下の雄性ラットにステンレス製注射針とポリプロピレン製シリンジを使用して尾静脈内に投与液 A、投与液 B 又は投与液 C を下表の用量で投与を行う。動物群構成及び投与条件を下表に示す。

投与終了後の残余の投与液は放射化学的純度測定に使用するまで室温、遮光下で保存する。

6.5 投与液の放射化学的純度及び高分子画分の割合の測定

投与終了後に、投与液 A、投与液 B 又は投与液 C の投与液中[3H] Cyclosporin Aの放射化学的純度を以下の項目に従って測定する。ただし、投与液 A 及び投与液 B はゲルろ過法を用いて投与液中の高分子画分の割合を測定する。

6.5.1 純度測定用試料溶液の調製

投与液中[3H] Cyclosporin Aの純度測定用試料溶液を調製する (n=1)。HPLC からの放射能の回収率を算出するために、調製した溶液 20 µL (n=1) を放射能測定容器に移して、直接法により放射能を

測定する。

6.5.2 高分子画分確認用試料溶液の調製

20 µL (各 n=1) の投与液 A 及び投与液 B をそのまま高分子画分確認用試料溶液として使用する。ゲル濾過カラムからの放射能の回収率を算出するために、高分子画分確認用試料溶液** µL (n=1) を放射能測定容器に移して、直接法により放射能を測定する。

6.5.3 HPLC 分析（放射化学的純度測定）

標準溶液 (n=1)、純度測定用試料溶液 (n=1) の順に分析する。純度測定用試料溶液中の Cyclosporin A の保持時間の確認は標準溶液中の Cyclosporin A の保持時間と比較することにより行う。また、HPLC における放射能の回収率を確認するために、分析中の HPLC からの溶出液を全量回収し、重量を測定する。回収液の一部（約 20 g, n=1）を放射能測定容器に分取し、重量を測定した後に直接法により放射能を測定する。注入放射能に対する比率 (%) として回収率を求める。

カラム：Vydac C18 (4.6×250 mm)

カラム温度：60 °C

オートサンプリング温度：10 °C

移動相 A：0.01% TFA 移動相中に 30%

移動相 B：移動相 B：CH₃CN 移動相中に 70%

流速：1.0 mL/min

検出：UV 215 nm

RI 検出器：

セルサイズ：0.5 mL

液体シンチレータ：Ultima-Flo AP

シンチレータ流速：3 mL/min

データ取り込み間隔：12 秒間

分析時間：1 分間

分析時間：1 分間

注入量：30 µL

6.5.4 放射能分布の測定

高分子画分確認用試料溶液を以下の手順で処理する。

1. 予め、20 mL の溶出バッファーで平衡化したゲル濾過カラムに** µL の高分子画分確認用試料溶液を負荷する。

2. ** mL の溶出バッファーを負荷して、低分

子あるいは高分子画分を含んだ溶出液を放射能測定容器に 0.5 mL 間隔で**分間採取する。採取した溶出液は直接法により放射能を測定する。負荷した放射能に対する比率 (%) として回収率を求める。

6.6 試料採取及び調製

6.6.1 血液及び血漿中放射能濃度の測定

単回静脈内投与後、ラットより以下の採取時点で血液を採取する。

採取時点： 投与後 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 時間

各採取時点で、無麻酔下で頸静脈より 26 ゲージの注射針を装着したヘパリンナトリウム処理済みの注射筒を用いて約 0.2 mL の血液を採取する。血液は P. P. 製チューブに移して速やかに氷冷下で保存する。血液 0.05 mL (n=1) を燃焼コーンに移して燃焼法により放射能を測定する。残余の血液は遠心分離 (約 10,000×g, 4° C, 3 分) して血漿を得る。血漿は P. P. 製チューブに移して速やかに氷冷下で保存する。血漿 0.05 mL (n=1) を燃焼コーンに移して燃焼法により放射能を測定する。

6.6.2 組織内放射能分布の測定

単回静脈内投与後、試料採取予定時刻の 10 分前からイソフルラン吸入麻酔下においてラットの全身を刈毛し、所定時点でイソフルラン麻酔下、二酸化炭素の過剰吸入により致死させる。屍体の口腔、耳孔、鼻腔及び排泄口を 2%CMC-Na 及び 10%CMC-Na を用いて塞いだ後、ドライアイス-ヘキサン浴で予備凍結し、冷凍庫 (管理温度- 25 ~ - 15° C) で保存する。予備凍結した屍体は 2%CMC-Na で包埋し、ドライアイス-ヘキサン浴で凍結ブロックを作製する。凍結ブロックは、切片作製まで冷凍庫 (管理温度- 25 ~ - 15° C) で保存する。作製した凍結ブロックをクライオマイクロトームで粗切した後、粘着テープを貼付し、1 匹につき 3 面 (左面、左傍正中面及び正中面) の 40 µm 厚切片を作製する (ただし、以下に規定した定量する組織が 3 面の切片で観察できないと判断した場合は、当該組織の確認が可能な切片を追加する)。得られた切片をクライオマイクロトーム内 (約- 20° C) で 3 日間凍結乾燥させた後に、放射能標準とともにイメージングプレートに密着させてシールドボックス

ス内で 16 時間曝露する。なお、放射能濃度が非常に高く、著しいフレアーが観察された場合には該当する部分をアルミホイル等で遮蔽し、再曝露を実施する。曝露終了後、イメージアナライザで画像解析を行い、全身オートラジオルミノグラムを作成する。また、6.8.4 項に従い放射能標準を用いて下記の組織について組織中放射能濃度 (Counts/mm²) を算出する。なお、2 例のうち動物番号の小さい 1 例を採用動物とし、その他のもう 1 例については、予備凍結時又は切片採取時に凍結した動物が破損し切片採取が困難になった場合の予備試料採取用として予備凍結までの操作を採用動物と同様に実施する。

定量する組織：

- | | | |
|----------------------|------------------|--------|
| 1： 血液 | 2： 脳 | 3： 精巣 |
| 4： 精巣上体 | 5： 筋肉 | 6： 皮膚 |
| 7： 脂肪 (腎臓周囲) | 8： 心臓 | 9： 胸腺 |
| 10： 睪臓 | 11： 甲状腺 | 12： 骨髄 |
| 13： 腸間膜リンパ (リンパ節として) | 14： 顎下腺 (唾液腺として) | 15： 脾臓 |
| 16： 副腎 | 17： 腎臓 | 18： 肺 |
| 19： 肝臓 | 20： 胃 | 21： 小腸 |
| 22： 大腸 | | |

6.7 試料の保存

残余の血漿、予備試料採取用の屍体、切片及び切片採取後の凍結ブロックは、試験終了まで冷凍庫 (管理温度：- 25 ~ - 15° C) で保存する。残余の投与液、純度測定用試料溶液及び高分子画分確認用試料溶液は試験終了まで冷蔵庫 (管理温度：2~8° C) で保存する。なお、試験終了後の試料の最終処理については、試験委託者と協議の上決定する。

6.8 放射能測定法

投与液、純度測定用試料溶液、高分子画分確認用試料溶液、HPLC からの溶出液及びゲル濾過カラムからの溶出液の放射能は直接法により測定する。血液及び血漿の放射能は燃焼法により測定する。HPLC による放射能の測定は、on-line 法により測定する。切片はオートラジオルミノグラフィにより放射能を測定する。

6. 8. 1 直接法

測定試料は試料に 10 mL の液体シンチレータ (Hionic-Fluor) を混合して調製する (HPLC からの溶出液は除く)。放射能の測定は LSC で行い、測定時間は 5 分間とする。測定は 2 回以上とし、再現性が確認された最初のデータを採用とする。各試料の放射能は測定試料の測定値 (Gross 値) から BG 値を減算することにより算出する。また、定量限界値 (Gross 値) は BG 値の 2 倍値とする。なお、BG 試料は液体シンチレータ (Hionic-Fluor) のみとし測定試料前に 3 本の測定を行い、その平均値を BG 値とする。

6. 8. 2 燃焼法

燃焼コーンに移した試料は恒温器で約 70° C で 8 時間以上乾燥させて全自動試料燃焼装置で燃焼して測定試料を調製する。全自動燃焼装置では液体シンチレータ (Monophase S) を使用する。試料の燃焼の前後に、一定量の放射能を有する回収率測定用試料を燃焼して放射能を測定した値 (n=3) と直接法で測定した値 (n=3) を比較することにより全自動試料燃焼装置の放射能の回収率を確認する。放射能の測定は LSC で行い、測定時間は 5 分間とする。測定はいずれの測定時間も 2 回以上とし、再現性が確認された最初のデータを採用する。各試料の放射能は測定試料の測定値 (Gross 値) から BG 値 (dpm) を減算することにより算出する。また、定量限界値 (Gross 値) は BG 値の 2 倍値とする。なお、BG 試料は燃焼コーンのみを燃焼して液体シンチレータ (Monophase S) を加えたものとし、測定試料前に 3 本の測定を行い、その平均値を BG 値とする。

6. 8. 3 On-line 法

HPLC による放射能の検出は、RI 検出器に液体シンチレータ (Ultima-Flo AP) を ** mL/min の流速で送液して放射能を測定する。各試料の放射能は測定試料の測定値 (Gross 値) から BG 値を減算することにより算出する。また、定量限界値 (Gross 値) は BG 値の 2 倍値とする。なお、純度測定用試料溶液注入前に標準溶液を HPLC へ注入し、Background Run の機能を用いて測定した値を BG 値とする。

6. 8. 4 オートラジオルミノグラフィ

イメージアナライザを用いて感度 (PMT) 1000、ラティチュード L4 及び分解能 25 μm の測定条件でオートラジオルミノグラムを作成し、単位面積当たりのカウント (Counts/mm²) を測定する。放射能標準及び各組織の単位面積当たりのカウント (Counts/mm²) は各試料の測定値から BG 値を減算することにより算出する。なお、BG 値は切片周縁の所定の 3 箇所の単位面積当たりのカウント (Counts/mm²) の平均値から算出する。組織中放射能濃度の定量は、放射能標準 (Micro-scales, 半減期補正後の測定範囲: 25.2~614.7 MBq/mg) を用いて外部標準法で検量線を作成し単位重量あたりの放射能 (Bq/mg) に換算して組織中放射能濃度を求める。定量範囲は検量線の範囲内とし、定量下限値及び上限値については 6. 9. 6 項に従い放射能標準の下限値 (25.2 Bq/mg) 及び上限値 (614.7 Bq/mg) より算出する。

6. 9 データ処理法

データは表計算ソフト (Microsoft Excel 2000) を用いて計算する。

6. 9. 1 放射化学的純度の算出

放射化学的純度はクロマトグラム上の全放射能ピークの総面積値に対する [3H] Cyclosporin A のピーク面積の比率 (%) とする。ピーク面積の比率の算出は Flo-One ver. 3. 65 により実施する。

6. 9. 2 HPLC からの放射能の回収率の算出
放射化学的純度測定時の HPLC からの放射能の回収率 (RPH, %) は以下の式より算出する。

$$\text{RPH} = \frac{\text{Rel} \times \text{Wto}}{\text{Rto} \times \text{Wsam}} \times 100$$

Rel : 測定用溶出液中放射能 (dpm)

Wto : 溶出液全量の重量 (g)

Rto : HPLC への注入放射能 (dpm)

Wsam : 測定用溶出液の重量 (g)

6. 9. 3 投与液中の高分子画分の割合の算出

投与液 (リポソーム製剤) 中の高分子画分の割合 (Rd, %) は以下の式より算出する。

$$\text{Rd} = \frac{\text{Cd}}{\text{Sd}} \times 100$$

Cd： 高分子画分の放射能 (dpm)
Sd： ゲル濾過カラムから溶出した放射能の合計 (dpm)

6.9.4 ゲル濾過カラムからの放射能の回収率の算出

ゲル濾過カラムからの放射能の回収率 (Rgel, %) は以下の式より算出する。

$$R_{gel} = \frac{S_d}{R_{lord}} \times 100$$

Sd： ゲル濾過カラムから溶出した放射能の合計 (dpm)

Rlord： ゲル濾過カラムへの負荷放射能 (dpm)

6.9.5 血液及び血漿中放射能濃度の算出

血液及び血漿中放射能濃度 (C, ng eq./mL) は以下の式より算出する。

$$C = \frac{R_{bl} \times 100}{SA \times R}$$

Rbl： 血液または血漿中放射能濃度 (dpm/mL)

SA： 比放射能 (dpm/ng)

R： 全自動試料燃焼装置における試料燃焼前後の放射能の平均回収率 (%)

6.9.6 組織中放射能濃度の算出

組織中放射能濃度 (Ctis, ng eq./g) は以下の式より算出する。

$$C_{tis} = \frac{R_{tis} \times 60 \times 1000}{SA}$$

Rtis： 組織中放射能濃度 (Bq/mg)

SA： 比放射能 (dpm/ng)

6.10 試験結果の表示

1) 投与液中の [3H] Cyclosporin A の放射化学的純度 (%), 投与液 (リポソーム製剤) 中の高分子画分の割合 (%), HPLC からの放射能の回収率 (%) ならびにゲル濾過カラムからの放射能の回収率 (%) は四捨五入して小数第 1 位で表示する。

2) オートラジオグラフィの結果はオートラジオ

オートラジオグラフィの結果はオートラジオ

3) 血液及び血漿中放射能濃度 (ng eq./mL) は四捨五入して有効数字 3 桁で表示する。各時点の結果は個体値, 平均値及び標準偏差で表示する。血液又は血漿中の放射能が定量下限値未満の場合には, その濃度を「LLOQ」と表示する。3 例中の 1 例の濃度が定量下限値未満の場合には, その値を「0」として平均値及び標準偏差を算出する。3 例中の 2 例以上の濃度が定量下限値未満の場合には, 平均値を「BLQ」と表示する。

4) 組織中放射能濃度 (ng eq./g) は四捨五入して有効数字 3 桁で表示する。組織中放射能が定量下限値未満の場合は「LLOQ」と表示し, 定量上限値を超えた場合は「ULOQ」と表示する。

7. 最終報告書の作成

要約, 目的, 材料, 方法, 結果及び考察ならびに図表等からなる和文最終報告書の草案 1 部を作成し試験委託者に提出する。また最終報告書 1 部を作成し, その写し 1 部を試験委託者に提出する。

8. 資料の保存

試験計画書, 最終報告書ならびに実施中に得られた生データは, 株式会社ネモト・サイエンス つくば研究所資料保存施設にて試験終了後 10 年間保存する。

9. 試験計画の変更

試験計画内容を変更する場合は, 変更箇所及びその理由を明確にした試験計画変更書 1 部を作成する。また, 試験計画変更書の写し 1 部を試験委託者に提出する

(2) GMP リポソームの院内製造への取り組み

①GMP リポソーム製造装置のバリデーション (設備据付時的合成試験 (IQ)、運転時適格性試験 (OQ))
_GMP リポソーム製造装置について、以下の仕様項目についてバリデーション (IQ、OQ 試験) を行い、これに適合していることを確認し、文書化した。

GMP リポソーム製造装置一式は, 原料送液部 2 式, リポソーム製造装置 2 式, 透析装置 2 式及び付属装置 1 式により構成され, それぞれ以下の要件を満たすこと。

1) 原料送液部 2 式は, 1 式あたり以下の要件を満たすこと。

1-1 送液は、ペリスタルティック方式であること。
1-2 流量の調節範囲は、0.1~1000mL/時間以上であること。

1-3 最大吐出圧は、200kPa 以上であること。

1-4 ローラーは、4 チャンネル 12 ローラーであること。

1-5 3 ストップチューブ及び延長チューブを有すること。

1-6 送液のスタート及びストップ用フットスイッチを有すること。

2) リポソーム製造装置 2 式は、無菌対応リポソーム製造装置 1 式及びリポソーム製造装置（一般装置）1 式により構成され、それぞれ以下の要件を満たすこと。

2-1 無菌対応リポソーム製造装置 1 式は、以下の要件を満たすこと。

2-1-1 無菌対応リポソーム製造装置 1 式は、初期設定を行った洗浄不要のシングルユース（使い捨て）装置 8 台以上で構成されること。

2-1-2 納入機器毎に、滅菌した製造部であることの滅菌証明書を有すること。

2-1-3 直径 100nm~1000nm 以上の無菌リポソームを連続的に製造する機能を有すること。なお、無菌的にリポソームを製造する方法として、完成したリポソーム製剤を無菌フィルターでろ過する方法は不可とする。

2-1-4 作成されたりポソーム粒子の PDI（多分散指数）値は 1.0 以下であること。

2-1-5 最大流量は、2mL/秒以上であること。

2-1-6 運転条件により生成リポソームの粒子径を変更する機能を有すること。

2-1-7 製造部の外寸は、200mm×200mm×700mm (H) 以下であること。

2-1-8 リポソームの製造方法及び製造条件を開示すること。

2-1-9 製造プロセスのリポソーム製造に係る重要ファクターとなる点を開示し、それを記録する記録装置を有すること。また、記録装置は、21CFR Part 11 条文（米国連邦規則 21 条 11 章条文）に対応していること。

2-2 リポソーム製造装置（一般装置）1 式は、以下の要件を満たすこと。

2-2-1 直径 100nm~1000nm 以上のリポソームを連続的に製造する機能を有すること。

2-2-2 作成されたりポソーム粒子の PDI（多分散指数）値は 1.0 以下であること。

2-2-3 最大流量は、2mL/秒以上であること。

2-2-4 運転条件により生成リポソームの粒子径を変更する機能を有すること。

2-2-5 製造部の外寸は、200mm×200mm×700mm (H) 以下であること。

2-2-6 リポソームの製造方法及び製造条件を開示すること。

2-2-7 装置は、分解可能な構造であること。

2-2-8 製造プロセスのリポソーム製造に係る重要ファクターとなる点を開示し、それを記録する記録装置を有すること。

3) 透析装置 2 式は、3-1~3-5 の要件を満たす無菌対応装置 1 式及び 3-1~3-3 の要件を満たす一般装置 1 式とすること。

3-1 4 方向取付け対応のチューブポンプを有すること。

3-2 チューブポンプの最高送液速度は、内径 1/4 インチチューブ使用時において 1.5L/秒以上であること。

3-3 異常圧警報値を 3 点以上設定できるデジタル圧力モニターを有すること。

3-4 無菌的に製造できることを証明する資料を有すること。

3-5 無菌製造用としてのフローバスセットは、10 セット以上であること。

4) 付属装置 1 式は、電子天秤 2 式、リポソーム原料調整用装置 2 式、凍結乾燥機用ドライチャンバー 1 式、凍結乾燥機 1 式、真空ポンプ 1 式及びクリーンベンチ 1 式により構成され、それぞれ以下の要件を満たすこと。

4-1 リポソーム原料を計量する電子天秤 2 式は、1 式あたり以下の要件を満たすこと。

4-1-1 計量範囲は、0.01mg~250g 以上であること。

4-1-2 ひょう量の切換機能を有すること。

4-1-3 再現性は、0.1mg/0.03mg 以下であること。

4-1-4 ひょう量室は、180mm (W) × 160mm (D) × 250mm 以上であること。

4-2 リポソーム原料調整用装置 2 式は、1 式あたり以下の要件を満たすこと。

4-2-1 温度調節範囲は、室温 +5℃~200℃以上であること。

4-2-2 温度設定の最小桁は、1℃以下であること。

4-2-3 ブロック設置数は、2 ブロック以上であること。

4-2-4 外寸は、250mm (W) × 300mm (D) × 150mm (H) 以内であること。

4-3 凍結乾燥機用ドライチャンバー1式は、以下の要件を満たすこと。

4-3-1 2次冷媒循環方式により、棚温度を-40℃～30℃以上に調節する機能を有すること。

4-3-2 バイアル瓶を密栓する機能を有すること。

4-3-3 水位低下、センサー異常、オーバーヒート及び停電警報に対する自己診断機能を有すること。

4-3-4 庫内寸法は、300mm×300mm×350mm(H)以上であること。

4-3-5 不活性ガスに置換する機能を有すること。

4-3-6 過酸化水素による滅菌機能を有すること。

4-3-7 無菌的に凍結乾燥できること。

4-3-8 本院既存のクリーンベンチ（三洋電機㈱製 MCV-B161F）との接続機能を有すること。または、凍結乾燥機用のクリーンベンチを提供すること。

4-3-9 排気用バキュームポンプを有すること。

4-3-10 過酸化水素分解装置を有すること。

4-3-11 記録装置を有すること。

4-4 凍結乾燥機1式は、以下の要件を満たすこと。

4-4-1 トラップ冷却温度は、-40℃以下であること。

4-4-2 1回の除湿量は、3L以上であること。

4-4-3 真空ポンプ自動運転機能及び真空度監視機能を有すること。

4-4-4 トラップ寸法は、内径 200mm×高さ 300mm以上であること。

4-5 真空ポンプ1式は、以下の要件を満たすこと。

4-5-1 排気速度は、160L/min以上であること。

4-5-2 到達真空度は、1.0 Pa以上であること。

4-6 クリーンベンチ1式は、以下の要件を満たすこと。

4-6-1 外寸は、1700mm(W)×900mm(D)×2000mm(H)のそれぞれ±50mm以内であること。

4-6-2 清浄度は、ISOクラス5以上であること。

4-6-3 集塵効率は、0.3μm粒子にて99.99%以上であること。

4-6-4 作業面の材質は、SUS304であること。

(倫理面への配慮)

1) 研究対象者に対する人権擁護上の配慮、不利益、危険性の排除や説明と同意（インフォームド・コンセント）に関わる状況：本年度は人を対象とした研究を実施していないため、該当しない。

2) 実験動物に対する動物愛護上の配慮：本研究で行った全ての動物実験は、大阪大学実験動物倫理委員会の承認を受けており、適切な麻酔薬と適切なエンドポイントを設定し実験動物の動物愛護について

最大限配慮して実施した。

C. 研究結果

(1) 基礎的検討

1. 薬効薬理試験（学内で信頼性基準）

ラット心筋梗塞モデルを用い、再灌流時にリポソーム製剤、または製剤の静脈内単回投与を行った。製剤では心筋梗塞サイズ縮小効果はないが、リポソーム製剤で著明な心筋梗塞サイズ縮小効果を認めた。リポソーム製剤の心筋梗塞部位への集積によると考え、薬物動態試験で確認中である。

2. 薬物動態試験（信頼性基準）

3H標識製剤を封入したりポソーム製剤の体内分布を定量オートラジオグラフィ法で解析し、製剤体内分布と比較する。リポソーム化による心筋梗塞部位への製剤の集積効果も同様に検討中である。

3. GMPリポソーム製剤の組成・製造—PMDA相談

GMPリポソーム製剤の組成・製造については、PMDA相談を反映し、市販リポソーム製剤ドキシルと同様の組成で、ロット間の均一性を担保しつつ製造する。現在、製剤のリポソームへの封入効率を検討中である。

D. 考察

基礎的検討では、リポソーム製剤の用量設定、濃度測定の実験系構築、薬理薬効試験、薬物動態試験をおこなった。また、リポソーム製剤のGMP院内製造に向け、1) GMP基準受け入れ態勢の構築と手順書の作成、2) 阪大病院薬剤部にGMP基準対応リポソーム製造機を設置した。GMP基準対応リポソーム製造機では、低分子化合物、ペプチド、核酸製剤も封入可能なため、アカデミアシーズの早期探索臨床試験へのトランスレーショナルを著しく促進することが期待できる。

平成25年度、早期・探索的臨床試験拠点事業で整備されたGMPリポソーム製造装置で製造するリポソーム製剤のロット間の均一性試験を行う。また、薬効薬理試験の用量を基に、リポソーム製剤を用いた安全性薬理試験・毒性試験をGLPで実施する。

E. 結論

本年度は、リポソーム製剤の基礎的検討と、阪大病院薬剤部無菌製剤室に設置するGMP基準対応無菌リポソーム製造装置インフラ整備を中心に行っ

た。

本研究は、当初の実験計画に基づき順調に推移しており、来年度以降に実施予定の、安全性薬理試験・毒性試験に向けて万全の体制が整ったと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishii T, Asai T, Oyama D, Agato Y, Yasuda N, Fukuta T, Shimizu K, Minamino T, Oku N. Treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury with PEGylated liposomes encapsulating FK506. *FASEB Journal*. Vol.27:1362-1370, 2013
- 2) Takahama H, Shigematsu H, Asai T, Matsuzaki T, Sanada S, Fu HY, Okuda K, Yamato M, Asanuma H, Asano Y, Asakura M, Oku N, Komuro I, Kitakaz M, Minamino T. Liposomal Amiodarone Augments Anti-arrhythmic Effects and Reduces Hemodynamic Adverse Effects in an Ischemia/Reperfusion Rat Model. *Cardiovasc Drugs Ther*. Vol.27:125-132, 2013

2. 学会発表

なし

G 知的財産権の出願・登録状況

発明の名称：炎症性疾患治療用医薬組成物

出願番号：特願 2012-117077

出願日：平成 24 年 5 月 23 日

オキシム誘導体徐放性マイクロスフェア（ONO-1301MS）製剤の重症心不全への適応

分担研究者 宮川 繁 大阪大学大学院医学系研究科 講師

【研究要旨】

重症心不全患者の根本治療は心臓移植であるが、臓器移植法改定後においてもドナーの絶対的不足状態は変わらない。現在重症心不全患者には、埋め込み型補助人工心臓（LVAD）が実施されているが、社会復帰には尚、問題点が多い。また、長期培養を有する自己細胞移植療法は、汎用性および緊急使用の面で問題点も多い。これらに代わり、治療効果が高く、細胞培養を不要（セルフフリー）とする、低分子合成化合物の製剤化による心臓移植・LVAD装着の回避、およびLVAD離脱を目指した心臓の再生医療への期待は大きい。

低分子合成化合物であるオキシム誘導体の徐放性製剤（ONO-1301MS）を、心臓に直接投与（心筋内投与および心臓表面に貼付）することにより、各種内因性修復因子（HGF、VEGF、IGF-1、SDF-1 等）が産生促進される。その結果、骨髄細胞から梗塞部へ修復細胞が誘導されることにより、心機能の改善等に有効性があることを、各種重症心不全（虚血性心筋症および拡張型心筋症）モデルにおいて確認した。

今後は、臨床予定投与ルート（ゼラチンシートに ONO-1301MS を吸収させ心臓梗塞部に貼付）での、ブタ虚血心筋症（OMI）モデルにおける有効性を確認した後、非臨床試験項目を決定・実施し、平成 26 年度秋頃に First in human 試験を開始する予定である。

A. 研究目的

重症心不全（虚血性心筋症および拡張型心筋症）の治療に対し、従来的人工心臓、心臓移植療法や長期培養を有する自己細胞移植療法に代わるような、治療効果が高く、細胞培養を不要（セルフフリー）とする低分子合成化合物の製剤化により、汎用性の向上および緊急使用可能な心血管・心筋再生療法剤の開発を目的とする。

B. 研究方法

ONO-1301MS 剤心臓局所投与における各種重症心不全モデルで薬効薬理試験を実施し、有効性を確認している。

1) マウス左冠動脈結紮心筋梗塞モデルに対し、梗塞心筋周囲に ONO-1301MS（4 週間徐放剤）を直接筋注投与し、その効果を検討した。マウスを冠動脈結紮後に、ONO-1301MS（4 週間徐放剤）および ONO-1301 を含まない MS 剤を梗塞周辺部 2 か所に局所投与した。

2) 開心術によりアメイロイドコンストラクターをブタ心臓左回旋枝（LCx）の根部に埋め込み、4 週間後に冠動脈造影（CAG）を施行、LCx 完全閉塞を認め

たブタを対象とした。ONO-1301MS 剤（4 週間徐放剤）および ONO-1301 を含まない MS 剤を虚血周辺部の心筋内に投与し、2 群間比較を行った。

3) ONO-1301MS（3 週間徐放剤）を用いて、イヌ高速ペーシング（拡張型心筋症）モデルで誘発された拡張型心筋症モデルに対する心機能改善効果の検討を行った。心室ペーシングは 240 ビート/分で、4 週間処理を行い、4 週後に、ONO-1301 を含まない MS 群および ONO-1301MS 群の 2 群に分け、左室心筋内に投与を行った。

4) 心筋梗塞マウスへの ONO-1301MS（4 週間徐放剤）心臓貼付の治療効果に関して、骨髄由来細胞の影響について検討した。

5) δ -筋グリカン欠損自然発症拡張型心筋症モデルである J2N-K ハムスターに、ONO-1301MS（4 週間徐放剤）をアテロコラーゲン膜に浸透させたシートを心臓に直接貼付投与群、ONO-1301 を含まない MS 剤群、および正常群にて比較を行った。

6) 血管新生促進作用および心筋保護作用等を有する ONO-1301MS と筋芽細胞シート移植（SMBCT）との併用効果についてイヌ高速ペーシング（拡張型心筋症）モデルを用いて検討した。

(倫理面への配慮)

基礎的研究において、遺伝子改変動物、プラスミド DNA あるいは遺伝子導入ウイルス等を用いる場合は、使用に際して遺伝子組み換え生物などの使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律、カルタヘナ条約等各種法令・告示・通知に基づき研究を実施した。

動物操作に当たっては、本学の動物実験規定に従って行なった。

C. 研究結果

1) 28 日後の、生存曲線では、薬物投与群で有意な延長が認められ、心破裂を抑制し、心エコー図でも心機能改善効果が認められた。組織学的評価では、梗塞サイズの縮小、心筋細胞の肥大化、間質の線維化を抑制した。また 7 日目の免疫組織学的検査では毛細血管密度は薬剤投与群で増加し、HGF および VEGF の mRNA の増加が確認され、これらの作用は抗 HGF/抗 VEGF 抗体投与により減弱した。(論文 1)

2) ONO-1301MS 投与群では、多数の側副血行路が形成され、さらに NOGA システムによる拡張末期容量 (LVSDV) は、投与群で少なく心筋リモデリングを抑制した。さらに、8 週後に採取した心臓内虚血部位の CD31 陽性細胞は、投与群で有意に多数であった。ONO-1301MS は心筋内の血管新生を促進し、心筋リモデリングを抑制した。(論文 2)

3) 心エコー検査および心カテテル検査では ONO-1301MS 投与により有意な縮小作用を示した。また、組織学的検査において、心筋線維化面積および cell diameter は ONO-1301 投与により有意に縮小していた。電顕検査において、ミトコンドリアの変化が ONO-1301 投与により回復していた。これらの結果は、ONO-1301MS により誘導された幾つかの体内再生因子による血管新生・心筋再生効果によることが示唆された。(論文 8)

4) ONO-1301MS または ONO-1301 を含まない MS 剤をアテロコラーゲン膜に浸透させたシートを心臓表面に貼付することにより、ONO-1301MS 群で 4 週間後の梗塞周辺部において、SDF-1、HGF、VEGF は上昇していた。骨髄細胞を GFP 陽性細胞により置換したマウスを用いて、冠動脈完全閉塞心筋梗塞モデルに ONO-1301MS シート貼付し、2 ヶ月後に検討した結果、心筋梗塞部に GFP 陽性細胞が存在し、そのいくつかは毛細血管の構成部に存在していた。

また、ONO-1301MS 投与群において、LV 壁は肥厚し、梗塞面積は縮小しており、生存率の延長も認めた。ONO-1301MS の心筋貼付により、体内再生因子 (SDF-1) を産生促進し、骨髄細胞から梗塞部へ修復細胞を補充することにより、心筋梗塞を治癒することが示唆された。(学会発表 3)

5) ONO-1301 群で有意な生存率の延長、及び心エコー検査により、心機能の有意な改善効果が認められた。また、ONO-1301 投与により毛細血管数の増加とコラーゲン蓄積の減少が認められた。ONO-1301MS シートにより、拡張型心筋症発症により障害を受けた心筋を再生することが示唆された。(学会発表 2)

6) 心エコー検査においては、全ての項目で、ONO-1301MS 群および SMBCT 群は対照群に比し有意に改善していたが、併用群はさらに改善しており相乗効果が確認された。ONO-1301MS と SMBCT の併用群は、筋芽細胞シート移植 (SMBCT) の生着率を向上させ、重症心不全 (DCM) に対する治療法として効果的であることが示唆された。(学会発表 1)

D. 考察

虚血性心筋症および拡張型心筋症モデルを用いた ONO-1301MS 剤の心筋内投与およびアテロコラーゲンシートを用いた ONO-1301MS 剤懸濁の心臓貼付投与における有効性は、すでにマウス、ハムスター、イヌ、ブタモデルにおいて心機能、梗塞面積、線維化面積、生存率において確認しているが、臨床投与予定ルート (ゼラチンシートに ONO-1301MS を吸収させ心臓梗塞部に貼付) におけるブタ虚血性心筋症モデルでの有効性薬理試験は、現在実施中である。

E. 結論

今後、臨床投与予定ルート (ゼラチンシートに ONO-1301MS を吸収させ心臓梗塞部に貼付) における虚血性心筋症モデルにおいて、最少有効投与量の設定、長期有効性の確認、および最大耐量での有効性について検討をする予定である。これらの有効性薬理試験結果から、臨床試験開始に必要な非臨床試験項目を決定してゆく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) T. Shirasaka, S. Miyagawa, S. Fukushima, A. Saito, M. Shiozaki, N. Kawaguchi, N. Matsuura, S. Nakatani, Y. Sakai, T. Daimon, Y. Okita, Y. Sawa

A slow-releasing form of prostacyclin agonist(ONO1301SR) enhances endogenous secretion of multiple cardiotherapeutic cytokines and improves cardiac function in a rapid-pacing-induced model of canine heart failure

The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery (In press)2013

2. 学会発表

- 1) イヌOMIモデル；MS心臓貼付とネット併用（AHA2012発表）
- 2) ラットMCT誘発肺高血圧症モデル；MS静注（AHA2012発表）

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) ONO-1301MS心臓貼付法&ネット併用；
特願2012-208799
- 2) ONO-1301MS肺高血圧症；特願2012-238017

慢性心不全治療薬としてのHGFプラスミドの開発

研究分担者(研究代表者) 澤 芳樹 大阪大学大学院医学系研究科 教授
研究分担者 宮川 繁 大阪大学大学院医学系研究科 講師
研究協力者 森下 竜一 大阪大学大学院医学系研究科 寄附講座教授

[研究要旨]

大阪大学で発見された HGF*プラスミド（*ヒト肝細胞増殖因子/hepatocyte growth factor:HGF）は、各種の心不全モデル動物に対して、抗線維化作用、心筋細胞に対する抗アポトーシス作用、血管新生作用による心機能改善効果が認められている。今回我々は、この HGF プラスミドの臨床での安全性の確認と POC の取得を目標に、拡張型心筋症、拡張相肥大型心筋症、および虚血性心筋症を基礎疾患とする慢性心不全を対象として、開胸下で HGF プラスミドを心筋へ直接注入投与する医師主導治験を計画している。

本薬は遺伝子治療用医薬品であり治験の開始に先立って「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について」への適合について厚生労働省への確認申請が必要である。この確認申請書類の内、臨床部分の概要案は作成を完了、続いて安全性非臨床部分の完成を目指している。これと並行して PMDA 薬事戦略相談の書類準備も行っている。各種書類の準備を進め、臨床試験デザインの詳細について検討をしながら、本事業期間中の平成 26 年 7 月の医師主導治験の開始に向け、体制を整備中である。

A. 研究目的

大阪大学で発見されたHGF*プラスミド(*ヒト肝細胞増殖因子/hepatocyte growth factor:HGF)は国内企業(アンジェスMG株式会社 以下、アンジェス社)では、末梢動脈疾患やリンパ浮腫に対する血管・リンパ管新生促進薬としての開発がなされている薬剤であるが、またこのHGFプラスミドは各種の心不全モデル動物において抗線維化作用、心筋細胞に対する抗アポトーシス作用や血管新生作用による心機能改善効果が認められている。

慢性心不全では、内因性HGF量の低下がみられ、心筋細胞の変性、喪失、線維化等が生じている。HGFプラスミドの投与により一定期間持続的に産生したHGFは、オートクライン・パラクライン効果により内在性のHGFの産生をも増強させる。

本剤投与による治療は、国内で推定患者数100~250万人と言われ年々増加傾向にあるとされる慢性心不全に対するHGFの補充療法にあたり、病態の進行を抑え、心機能をもとの状態に近づけることで重症心不全患者の救命や生活の質(quality of life: QOL)を改善することが期待される。同時に、超高齢化社会における医療費の抑制にも資するものと期待する。

B. 研究方法

アンジェス社では、重症安定狭心症患者を対象に、HGFプラスミドのインジェクションカテーテルによる左室心筋内投与による第I相臨床試験を、米国にて実施しており、この時安全性に問題がなかった事が確認されている。重篤な有害事象はすべて本剤との関連性は否定されており、本剤との関連性の可能性ありと判断された副作用は、心室性頻脈1例1件(4mg群)であった。その他の有害事象や副作用に関しては投与手技かデバイス(心筋内投与用カテーテル)に関連するものであった。

今回我々は、拡張型心筋症、拡張相肥大型心筋症、及び虚血性心筋症を基礎疾患とする慢性心不全を対象として、開胸下でHGFプラスミドを心筋へ直接注入投与する医師主導治験(第I/II相臨床試験)を計画しているが、より確実な心筋内への投与方法であることから副作用の発生頻度も低くなりより安全であると考えている。同時に上記の米国での試験以上の効果が期待される。

医師主導治験(第I/II相臨床試験) 骨子

1) 概要: 開胸下で HGF プラスミドを投与し、投与後 6 ヶ月間、安全性及び有効性の評価を実施する。

- 2) 対象患者：拡張型心筋症、拡張相肥大型心筋症又は虚血性心筋症を基礎疾患とする慢性心不全と診断された患者
- 3) 投与量・方法：4.0mg の HGF プラスミドを 2mL に希釈調製し、MIDCAB により左室側壁の心筋 10 箇所投与する (1 部位あたりの投与量が 0.2mL)。
- 4) 目標症例数：まず 3 例で安全性を確認し (Step 1)、その後 6 (〜9) 例を追加 (Step 2)
- 5) 選択基準 (抜粋)：
 - ・ 20 歳以上 80 歳以下。
 - ・ NYHA 心機能分類 II、III 又は IV 度。
 - ・ 左室側壁に心機能の障害があり、当該病変の機能が改善することにより症状の改善が期待される患者。
 - ・ Step 1 では、安静時の左室駆出率が 35% 以上の患者。Step 2 では、左室駆出率を問わない。
 - ・ ジギタリス、利尿剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシ II 受容体拮抗薬や β 遮断薬等による内科的治療に抵抗性の患者。
 - ・ 冠動脈バイパス術、左室形成術、僧帽弁形成術、経皮的動脈植込み術等の外科的治療が適用されない患者。
- 6) 評価項目：
 - ・ 安全性
 - ・ 有効性評価：Gated-SPECT による駆出率、自覚症状、PVO₂ (運動耐容能、QOL (SF-36)、心エコー (血行動態)、BNP

(倫理面への配慮)

- 1) 研究対象者に対する人権擁護上の配慮、不利益、危険性の排除や説明と同意に関する状況：本年度は人を対象とした研究を実施していないため該当しない。今後予定される臨床試験においては「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について」(厚労省通知)、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」(GCP 省令)、ヘルシンキ条約などを厳守し被験者保護を最優先に実施する予定である。
- 2) 実験動物に対する動物愛護上の配慮：本研究で行ったすべての動物実験は、大阪大学実験動物倫理委員会の承認を受けており、最大限の配慮のもとに実施した。
- 3) 基礎的研究においては、遺伝子組み換え生物などの使用などの規制による生物多様性の確保に関する法律、カルタヘナ条約など各種法令・告示・通知に基づき研究を実施した。

C. 研究結果

本研究が当事業の重点シーズとして採択されたのは平成25年1月である。プロジェクト実現に向け開発プランのブラッシュアップ、進捗管理のもと平成25年4月までに確認申請用の臨床部分の概要案を作成した。25年6月末までに安全性非臨床部分の完成も目指しており、平成24年度はその為の必要情報の収集を主に行った。

品質部分に関しては治験薬提供企業であるアンジェス社より提供される予定であり、その為の契約の話し合いも進めた。品質、非臨床、臨床部分の確認申請文書を整えると平行して、PMDA薬事戦略相談対面助言に使用する資料も必要となってくる為、その準備も開始した。

D. 考察

本剤は遺伝子治療用医薬品であるため、治験の実施に先立ち、厚生労働省に「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について」への適合を確認する確認申請が必要である。まず、薬事戦略相談の対面助言で資料内容を相談して指針への適合を確認(確認申請)する事を計画しており、非臨床試験の充足性に関してもこの対面助言内で相談予定としている。非臨床安全性に関しては、アンジェス社が米国の試験と同投与経路にて行っており、本医師主導治験を行うにあたり、現行の非臨床安全性試験で十分と考えている。

医師主導治験ではMIDCABで用いられる小切開左開胸を施行し、HGFプラスミドを病変部位の心筋内に直接投与する。米国第I相臨床試験において、既にヒトへの投与がなされており、特に本剤による副作用は問題となっていないことや、手技的にもより確実に投与できるため、開胸下投与での本剤によるリスクが増強する可能性は低いと考える。

E. 結論

確認申請用の臨床部分の概要案を作成し、臨床部分及び安全性非臨床部分の完成を目指している。品質、非臨床、臨床部分の確認申請文書を整えると並行して、PMDA薬事戦略相談対面助言の準備も開始した。平成26年度の医師主導治験の開始に向け、タイムライン通りに進行中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

医師主導治験終了後速やかに臨床試験報告書を

作成するとともに、内容を論文にまとめ投稿予定である。

2. 学会発表

論文作成と平行して学会への発表も予定している。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 発明の名称：HGF遺伝子からなる医薬

PCT出願番号：PCT/JP96/02359

出願日： 1996年8月22日

出願人(権利者)：アンジェスMG株式会社

2) 発明の名称：心筋症遺伝子治療

PCT出願番号：PCT/JP/06947

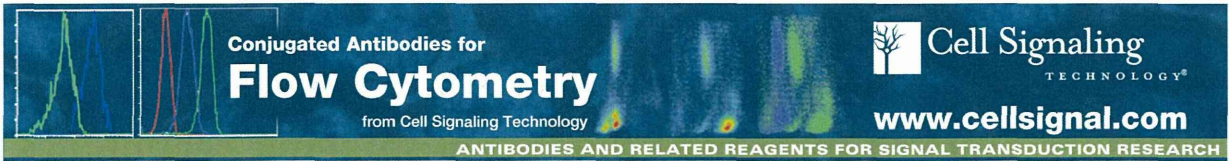
出願日： 2000年10月5日

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kotani M, Kikuta J, Klauschen F, Chino T, Kobayashi Y, Yasuda H, <u>Tamai K</u> , Miyawaki A, Kanagawa O, Tomura M, Ishii M.	Systemic Circulation and Bone Recruitment of Osteoclast Precursors Tracked by Using Fluorescent Imaging Techniques.	The Journal of Immunology	190(2)	605-612	2013
Endo M, Zoltick PW, Radu A, Qiujie J, Matsui C, Marinkovich PM, McGrath J, <u>Tamai K</u> , Uitto J, Flake AW.	Early intra-amniotic gene transfer using lentiviral vector improves skin blistering phenotype in a murine model of Herlitz junctional epidermolysis bullosa.	Gene Therapy	19(5)	561-569	2012
Hayashi H, Nakagami H, Takeichi M, Shimamura M, Koibuchi N, Oiki E, Sato N, Koriyama H, Mori M, Gerardo Araujo R, Maeda A, Morishita R, <u>Tamai K</u> , Kaneda Y.	HIG1, a novel regulator of mitochondrial γ -secretase, maintains normal mitochondrial function.	The FASEB Journal	26(6)	2306-2317	2012
Saga K, <u>Tamai K</u> , Yamazaki T, Kaneda Y.	Systemic administration of a novel immune-stimulatory pseudovirion suppresses lung metastatic melanoma by regionally enhancing IFN- γ production.	Clinical Cancer Research	19(3)	668-679	2013
<u>Nakagami H</u> , Nishikawa T, Tamura N, Maeda A, Hibino H, Mochizuki M, Shimosato T, Moriya T, Morishita R, Tamai K, Tomono K, Kaneda Y	Modification of a Novel Angiogenic Peptide, AG30, for the Development of Novel Therapeutic Agents.	J Cell Mol Med	16(7)	1629-1639	2012
T. Shirasaka, <u>S. Miyagawa</u> , S. Fukushima, <u>A. Saito</u> , M. Shiozaki, N. Kawaguchi, N. Matsura, S. Nakatani, Y. Sakai, T. Daimon, Y. Okita, <u>Y. Sawa</u>	A slow-releasing form of prostacyclin agonist(ONO1301SR) enhances endogenous secretion of multiple cardiotherapeutic cytokines and improves cardiac function in a rapid-pacing-induced model of canine heart failure	The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery	(In press)		2013

雑誌 (続き)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishii T, Asai T, Oyama D, Agato Y, Yasuda N, Fukuta T, Shimizu K, <u>Minamino T</u> , Oku N	Treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury with PEGylated liposomes encapsulating FK506..	The Journal of Immunology	27	1362-1370	2013
Takahama H, Shigematsu H, Asai T, Matsuzaki T, Sanada S, Fu HY, Okuda K, Yamato M, Asanuma H, Asano Y, Asakura M, Oku N, <u>Komuro I</u> , Kitakaz M, <u>Minamino T</u>	Liposomal Amiodarone Augments Anti-arrhythmic Effects and Reduces Hemodynamic Adverse Effects in an Ischemia/Reperfusion Rat Model	Clinical and Experimental Dermatology	27	125-132	2013

Ⅲ. 研究成果(別刷)



Conjugated Antibodies for
Flow Cytometry
 from Cell Signaling Technology

Cell Signaling
 TECHNOLOGY®
www.cellsignal.com

ANTIBODIES AND RELATED REAGENTS FOR SIGNAL TRANSDUCTION RESEARCH



Systemic Circulation and Bone Recruitment of Osteoclast Precursors Tracked by Using Fluorescent Imaging Techniques

This information is current as of May 19, 2013.

Manato Kotani, Junichi Kikuta, Frederick Klauschen, Takenao Chino, Yasuhiro Kobayashi, Hisataka Yasuda, Katsuto Tamai, Atsushi Miyawaki, Osami Kanagawa, Michio Tomura and Masaru Ishii

J Immunol 2013; 190:605-612; Prepublished online 14 December 2012;

doi: 10.4049/jimmunol.1201345

<http://www.jimmunol.org/content/190/2/605>

Supplementary Material <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2012/12/14/jimmunol.1201345.DC1.html>

References This article **cites 35 articles**, 10 of which you can access for free at: <http://www.jimmunol.org/content/190/2/605.full#ref-list-1>

Subscriptions Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: <http://jimmunol.org/subscriptions>

Permissions Submit copyright permission requests at: <http://www.aai.org/ji/copyright.html>

Email Alerts Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at: <http://jimmunol.org/cgi/alerts/etoc>

The Journal of Immunology is published twice each month by The American Association of Immunologists, Inc., 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3994. Copyright © 2013 by The American Association of Immunologists, Inc. All rights reserved. Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



Systemic Circulation and Bone Recruitment of Osteoclast Precursors Tracked by Using Fluorescent Imaging Techniques

Manato Kotani,^{*,†} Junichi Kikuta,^{*,†} Frederick Klauschen,[‡] Takenao Chino,[§] Yasuhiro Kobayashi,[¶] Hisataka Yasuda,^{||} Katsuto Tamai,[§] Atsushi Miyawaki,[#] Osami Kanagawa,^{**} Michio Tomura,^{***,††} and Masaru Ishii^{*,†}

Osteoclasts are bone-resorbing polykaryons differentiated from monocyte/macrophage-lineage hematopoietic precursors. It remains unclear whether osteoclasts originate from circulating blood monocytes or from bone tissue-resident precursors. To address this question, we combined two different experimental procedures: 1) shared blood circulation “parabiosis” with fluorescently labeled osteoclast precursors, and 2) photoconversion-based cell tracking with a Kikume Green-Red protein (KikGR). In parabiosis, CX₃CR1-EGFP knock-in mice in which osteoclast precursors were labeled with EGFP were surgically connected with wild-type mice to establish a shared circulation. Mature EGFP⁺ osteoclasts were found in the bones of the wild-type mice, indicating the mobilization of EGFP⁺ osteoclast precursors into bones from systemic circulation. Receptor activator for NF- κ B ligand stimulation increased the number of EGFP⁺ osteoclasts in wild-type mice, suggesting that this mobilization depends on the bone resorption state. Additionally, KikGR⁺ monocytes (including osteoclast precursors) in the spleen were exposed to violet light, and 2 d later we detected photoconverted “red” KikGR⁺ osteoclasts along the bone surfaces. These results indicate that circulating monocytes from the spleen entered the bone spaces and differentiated into mature osteoclasts during a certain period. The current study used fluorescence-based methods clearly to demonstrate that osteoclasts can be generated from circulating monocytes once they home to bone tissues. *The Journal of Immunology*, 2013, 190: 605–612.

Osteoclasts are the only somatic cells that can destroy or resorb calcified bone tissues. Although it has been established that they originate from monocyte/macrophage-

lineage hematopoietic precursors (1, 2), there is still controversy concerning their proximal precursors. Several studies have identified “osteoclast precursors” by detecting surface markers such as CD11b/Mac-1, Gr-1, receptor activator for NF- κ B (RANK), and c-Fms (3–5), and lipid mediators and some chemokines, including sphingosine-1-phosphate (S1P) and SDF-1/CXCL12, have been shown to be involved in controlling their migration and localization in bone tissues (6, 7). However, monocyte-lineage cells are plastic, and no exclusive definition of osteoclast precursors similar to that proposed for lymphoid cell lineage commitment has been established (8, 9). More importantly, it is still unclear whether osteoclasts are derived from circulating monocytes or from bone tissue-resident precursors that are fully committed to differentiate into osteoclasts. In general, most tissue-resident macrophages, including Langerhans cells in the skin and microglia in the brain, have the potential to self-renew locally under steady-state conditions (10–12), although these cells can also be repopulated from circulating monocytoic precursors under certain pathological conditions and after artificial ablation (10, 12). What about osteoclasts? Bone tissue is highly vascularized and large numbers of fenestrations in the vessel walls increase blood permeability in this region (13). These unique features of bone are assumed to affect the mode of recruitment of osteoclast precursors.

By visualizing live bone tissues by intravital multiphoton microscopy, we recently demonstrated the migration of osteoclast precursors to and from the bone marrow vasculature, a process that was critically regulated by S1P, a lipid mediator that is present at high levels in plasma (14, 15). Other reports have suggested that osteoclast precursors that are fully committed to differentiation into osteoclasts are cell cycle quiescent and seem to circulate from hematopoietic tissues via the bloodstream onto the bone surfaces, where they differentiate (4, 5). However, there is no direct evidence for the systemic circulation of osteoclast precursor monocytes.

^{*}Laboratory of Cellular Dynamics, World Premier International Research Center Initiative-Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan; [†]Japan Science and Technology Agency, Core Research for Evolutionary Science and Technology, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075, Japan; [‡]Institute of Pathology, Charité University Medicine Berlin, D-10117 Berlin, Germany; [§]Department of Stem Cell Therapy Science, Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan; [¶]Institute for Oral Sciences, Matsumoto Dental University, Shiojiri, Nagano 399-0871, Japan; ^{||}Planning & Development Group, Bioindustry Division, Oriental Yeast Co., Itabashi-ku, Tokyo 174-8505, Japan; [#]Laboratory for Cell Function and Dynamics, Brain Science Institute, RIKEN, Wako City, Saitama 351-0198, Japan; ^{**}Laboratory for Autoimmune Regulation, Research Center for Allergy and Immunology, RIKEN, Tsurumi, Yokohama City, Kanagawa 230-0045, Japan; and ^{††}Center for Innovation in Immunoregulatory Technology and Therapeutics, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshidakonocho-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8051, Japan

Received for publication May 11, 2012. Accepted for publication November 15, 2012.

This work was supported by Grants-in-Aid for Encouragement of Young Scientists (A) (22689030 to M.I.) and for Scientific Research on Innovative Areas (22113007 to M.I., 23113506 to M.T.) and by a Funding Program for World-Leading Innovative R&D on Science and Technology (FIRST Program) (to M.I.) from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan; by a Grant-in-Aid for Research on Allergic Disease and Immunology (H21-010 to M.I.) from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan; grants from the International Human Frontier Science Program (CDA-00059/2009 and RGY0077/2011 to M.I.); and by grants from the Takeda Science Foundation (to M.I.), the Cell Science Research Foundation (to M.I.), the Astellas Foundation for Research on Metabolic Disorders (to M.I.), the Nakajima Foundation (to M.I.), and the Sumitomo Science Foundation (to M.T.).

Address correspondence and reprint requests to Prof. Masaru Ishii, Laboratory of Cellular Dynamics, WPI-Immunology Frontier Research Center, Osaka University, 3-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. E-mail address: mishii@ifrec.osaka-u.ac.jp

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: BV/TV, bone volume/tissue volume; KikGR, Kikume Green-Red protein; RANK, receptor activator for NF- κ B; RANKL, receptor activator for NF- κ B ligand; S1P, sphingosine-1-phosphate; TRAP, tartrate-resistant acid phosphate.

Copyright © 2013 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/13/\$16.00

In the current study, to investigate whether circulating osteoclast precursors have the potential to differentiate into osteoclasts, we used two different experimental methods: a shared blood circulation “parabiosis” system (16, 17) and photoconversion-based cell tracking with a KikGR-Green-Red protein (KikGR). Parabiosis enables one to determine whether cells/molecules are circulating or not (16–18). KikGR is a photoconvertible GFP cloned from the coral *Favia favaus* whose emission changes from green to red upon exposure to violet light (19). We generated monocyte/osteoclast (RANK⁺)-specific KikGR-expressing mice, and cells in the spleen were marked by photoconversion to determine whether they can migrate to bones and differentiate into mature osteoclasts. These novel approaches using fluorescence imaging techniques are useful for tracking cellular dynamics in vivo (20–22).

Materials and Methods

Mice

CX₃CR1-EGFP knock-in mice (23) were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). RANK-Cre knock-in mice were generated as previously reported (24). The ROSA-CAG-lox-stop-lox-KikGR knock-in mice were generated at RIKEN and are described elsewhere (M. Tomura, A. Miyawaki, and O. Kanagawa, manuscript in preparation). These two strains were crossed to generate RANK promoter-driven KikGR-expressing mice (RANK-KikGR). All mice were bred and maintained under specific pathogen-free conditions at the animal facilities of Osaka University, and all animal experiments were performed according to Osaka University animal experiment guidelines using approved protocols.

Parabiosis

Parabiotic surgery was performed according to a previously published protocol (25). A CX₃CR1-EGFP knock-in mouse was surgically joined to a wild-type mouse. The two mice were housed together in a single cage for 1 wk preoperatively. At age 8 wk, the mice were anesthetized with isoflurane (Escain; Mylan, Canonsburg, PA). The dorsal and lateral aspects of each mouse were shaved and treated with hair-removal lotion (Epilat; Kracie Holdings, Tokyo, Japan). Matching skin incisions were made from the shoulder to the knee joint of each mouse. Approximate 1-cm incisions in the peritoneum were made in each mouse, and the mice were attached using 3-0 coated Vicryl (Ethicon, Somerville, NJ). Next, the dorsal and ventral skin was stitched through continuous suture, and the matching skin was sterilized using Iodine 10% solution (Meiji Seika Pharma, Tokyo, Japan). To ensure the animals' well-being for 4 wk, individual parabiotic mouse pairs were placed in clean cages, and food pellets were provided on the floor to minimize the strain of reaching for food while adjusting to parabiotic existence. Established shared blood circulation was confirmed by injection of Evans blue dye (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan). A total of 200 μ l 0.5% Evans blue dye in saline was injected intravenously into the sides of CX₃CR1-EGFP knock-in mice.

Receptor activator for NF- κ B ligand (RANKL) and FTY720 treatment

FTY720 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) was dissolved in DMSO (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). FTY720 solution was diluted in saline containing 30% fatty acid-free BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (5% FTY720 solution). Parabiotic pairs were injected i.p. with FTY720 solution for 3 d (3 mg/kg body weight) and GST-RANKL (Oriental Yeast, Tokyo, Japan) (20 μ g/pair) dissolved in saline for 2 d. RANKL-treated mice received vehicle (5% DMSO, 30% fatty acid-free BSA in saline) for 3 d and RANKL (20 μ g/pair) for 2 d. The mice were sacrificed 48 h after the last injection, and the femurs were harvested and analyzed by bone histomorphometry and immunofluorescence analysis.

Photoconversion

Single-cell suspensions of splenocytes were exposed to violet light (200 mW/cm²) with a 436-nm g-line band-pass filter using spot UV curing equipment (SP500; Usio, Tokyo, Japan). For spleen photoconversion, RANK-KikGR mice were anesthetized with isoflurane, and their fur was removed with an electric shaver. A midline incision was made in the abdominal skin to expose the spleen. The surrounding tissue was covered with aluminum foil to prevent unnecessary exposure, and then the spleen was exposed to violet light (200 mW/cm²) with a 436-nm g-line band-pass filter with spot UV curing equipment. The three sides of the spleen were

exposed for 10 min. The wound was closed with suture, and the matching skin was sterilized using Iodine 10%.

Flow cytometry analysis

Cells were washed with staining buffer [2% FBS and 0.03% sodium azide (both from Sigma-Aldrich) in saline]. The fluorescent cells were analyzed using a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Data were analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Immunofluorescence analysis

Femurs were removed and fixed through incubation overnight with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) in 0.1 M phosphate buffer. The samples were frozen in chilled hexane (Wako, Osaka, Japan) using dry ice. Then, sections (10 μ m thick) of nondecalcified femur were prepared using a Multi-Purpose Cryosection Preparation Kit (Section-Lab, Hiroshima, Japan, and Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) (26). The sections were subjected to fluorescence-based staining for tartrate-resistant acid phosphate (TRAP) using ELF97 substrate (Life Technologies, Carlsbad, CA). The samples were observed using a TCS-SP5 confocal microscope (Leica Microsystems) and were illuminated with a laser (wavelength: 405 nm for ELF97, 488 nm for EGFP and Green KikGR, and 561 nm for Red KikGR). Collagen-enriched bone matrices were visualized by the second harmonic emission from collagen fibers excited with infrared lasers. The sections were examined using a TCS-SP5 multiphoton laser microscope (Leica Microsystems) (wavelength 880 nm) driven by a Chameleon XR Sapphire laser (Coherent, Santa Clara, CA). Emission signals were obtained by setting the wavelength to 500–575 nm for ELF97, 500–550 nm for EGFP and Green KikGR, 575–625 nm for Red KikGR, and 430–450 nm for the second harmonic emission. Image analysis was performed using a fully automated, high-throughput method to measure the interface between trabecular bone and osteoclasts (14, 27). The “EGFP⁺ TRAP⁺ osteoclasts/total TRAP⁺ osteoclasts” ratio was calculated without manual intervention. An EGFP⁺ TRAP⁺ osteoclast indicated 25% of the area of an EGFP signal in a TRAP⁺ osteoclast. Threshold selection was optimized computationally.

Bone histomorphometry

Trabecular bone morphometry within the metaphyseal region of the distal femur was quantified by micro-CT (ScanXmate-RX; Comscantech, Kanagawa, Japan). Three-dimensional microstructural image data were reconstructed, and bone volume/tissue volume (BV/TV; %) ratio was calculated using TRI/3D-BON software (RATOC Systems, Tokyo, Japan). Bone morphometric analysis was performed as described previously (28).

Quantitative RT-PCR analysis

Total RNA and cDNA were prepared using a NucleoSpin RNA XS kit (TaKaRa, Shiga, Japan) and Superscript III reverse transcriptase (Life Technologies) according to the manufacturers' instructions. Real-time PCR analysis was performed with a Thermal Cycler Dice Real Time system (TaKaRa) using SYBR Premix EX Taq (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa). Gene expression values were calculated by the $\Delta\Delta$ Ct method using Gapdh as an internal control. The following primers were used: Rank, 5'-TCCCGACCAGAGATATCAGAAG-3' and 5'-CAGTCGGGATCAGTGTGAGGA-3'; and Gapdh, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' and 5'-TCCACCACCTGTGCTGTGA-3'. The Rank primer sequences were obtained using the Perfect Real-Time support system (TaKaRa).

Cell culture

To obtain osteoclast-like cells in vitro, bone marrow cells were obtained from the femurs and tibiae of C57BL/6J mice, and 5×10^4 of these were cultured for 48 h in 96-well plates in α -MEM (MP Biomedicals, Solon, OH) containing 10% FBS and 10 ng/ml human M-CSF (R&D Systems, Minneapolis, MN). Then the cells were cultured for 3 d in fresh medium containing 10 ng/ml human M-CSF and 50 ng/ml human RANKL (PeproTech, Rocky Hill, NJ). After being cultured for 5 d, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M PB and stained for TRAP (4, 5).

Statistical analysis

The Mann–Whitney rank sum test was performed using GraphPad PRISM software (GraphPad Software, La Jolla, CA) to calculate *p* values for highly skewed distributions. For Gaussian-like distributions, two-tailed *t* tests were used.

Distribution of materials

ROSA-CAG-lox-stop-lox-KikGR knock-in mice will be distributed from the RIKEN Bio-Resource Center Experimental Animal Division (<http://www.brc.riken.go.jp/lab/animal/en/>).

Results

Establishment of cross-blood circulation "parabiosis"

We generated parabiosis mouse pairs with heterozygous CX₃CR1-EGFP knock-in and wild-type mice. Because the chemokine receptor CX₃CR1 is known to be expressed in monocytoid cells, including osteoclast precursors (29), we were able to track the movement of osteoclast precursors between paired mice via the blood circulation. We showed by flow cytometry that $3.93 \pm 0.71\%$ (mean \pm SEM; $n = 3$) of all bone marrow cells in CX₃CR1-EGFP knock-in mice were EGFP⁺ (Fig. 1A). Such cells have been reported to readily differentiate into mature osteoclasts in vitro (15). We also showed that most of the mature TRAP⁺ osteoclasts in these mice expressed EGFP (Fig. 1Bd). Further, we confirmed that CX₃CR1-EGFP⁺ cells could efficiently differentiate into mature osteoclast-like cells and have potency for resorbing bone tissues (dentin slices) in vitro (Supplemental Fig. 1). These results confirmed that EGFP⁺ cells include osteoclast precursors. Four weeks after surgery, we checked the sharing of blood circulation between the paired mice by i.v. injection of 0.5% Evans blue dye in one side (data not shown). Flow cytometric analyses showed that EGFP⁺ cells were present in the bone marrow of the wild-type mice. These monocytes, which included osteoclast precursors, had migrated from CX₃CR1-EGFP knock-in mice via the bloodstream (Fig. 1C). The percentage of EGFP⁺ cells in wild-type mice [$0.32 \pm 0.09\%$ (mean \pm SEM), $n = 3$] was smaller than that in the joined CX₃CR1-EGFP knock-in mice (Fig. 1A). These results suggested that substantial numbers of CX₃CR1⁺ osteoclast precursors from wild-type mice remained without repopulation in the wild-type bone marrow, and recruitment and homing of monocytes into bone marrow tissues limited the number of EGFP⁺ osteoclast precursors in wild-type mice. We also checked sections of bone from joined wild-type mice (Fig. 1D). We detected mature EGFP⁺ TRAP⁺ osteoclasts lining the bone trabeculae (Fig. 1Dd, arrowhead), as well as TRAP⁺ osteoclasts (Fig. 1Dd, asterisks). We confirmed that EGFP⁺ osteoclasts originating from circulating precursors were localized along the eroded bone surface and participated in active bone resorption

(data not shown). These results clearly suggest that circulating CX₃CR1-EGFP⁺ osteoclast precursors could home to bone surfaces and differentiate into mature osteoclasts in situ.

The dynamic nature of osteoclast precursor migration

Next, we examined whether the mobilization of circulating osteoclast precursors was affected by bone-resorptive conditions. Intraperitoneal injection of recombinant RANKL has been shown to enhance osteoclastic bone resorption and potentially to induce osteopenia (30). After establishment of a shared blood circulation, RANKL (20 μ g/pair) or saline (control) was administered in 24-h intervals for 2 d to the sides of wild-type mice. The jointed pairs were killed 24 h after the last injection. In wild-type mice, bone mineral density, defined as the BV/TV ratio (%), was significantly reduced by application of RANKL (Fig. 2A, 2B).

To evaluate the contribution of circulating EGFP⁺ osteoclast precursors to RANKL-induced osteoclastogenesis, we first checked the number of EGFP⁺ cells in the bone marrow of wild-type mice. The number of EGFP⁺ cells was increased by RANKL treatment, indicating the increased recruitment of precursor monocytes into the bone marrow cavity (Fig. 2C). Next, we performed immunofluorescence analysis of sections of bone from control and RANKL-treated wild-type mice from the mouse pairs (Fig. 2D). Fluorescent image data were automatically processed as described in the *Materials and Methods* section to quantify objectively the proportion of TRAP⁺ osteoclasts that were also positive for EGFP; the proportion was significantly increased by RANKL application (Fig. 2E), indicating that the contribution of circulating precursors to osteoclast formation on the endosteum was increased under these conditions (Fig. 2F). These results suggest that sources of osteoclast precursors may change in association with several pathological bone conditions, including bone-resorptive disorders.

Next, we checked the effect of the S1P receptor agonist FTY720 on the proportion of osteoclasts that were EGFP⁺. As shown previously, migration of osteoclast precursors was regulated by blood S1P, and application of FTY720 may facilitate the recirculation of osteoclast precursors from bone to blood and thereby

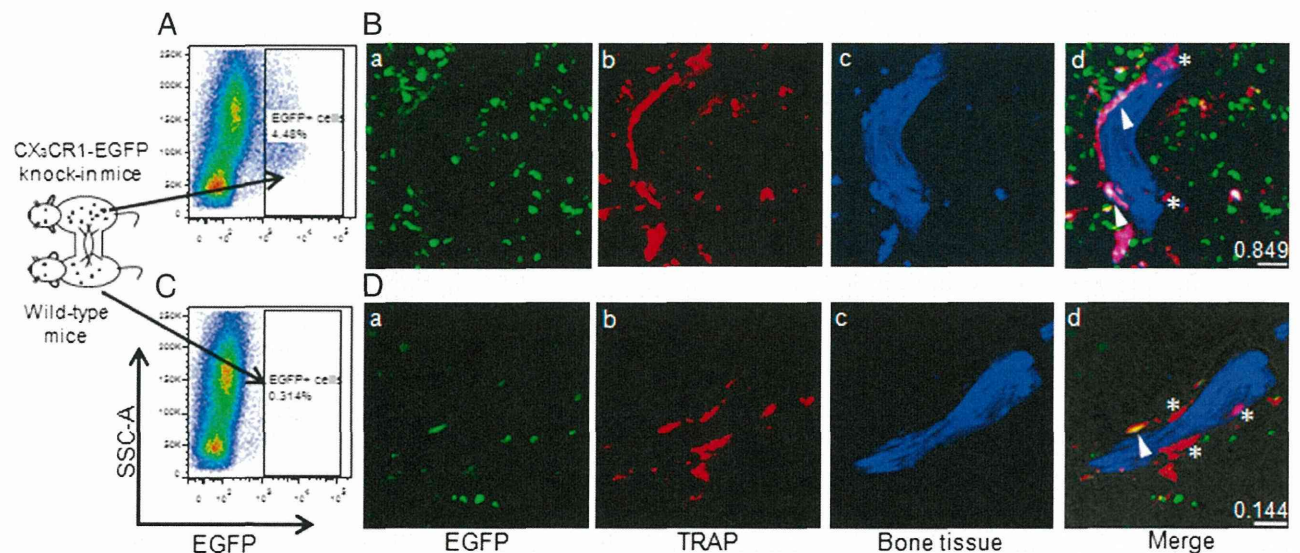


FIGURE 1. Generation of shared blood circulation in parabiotic animals. (A and C) Flow cytometric analysis of bone marrow cells from CX₃CR1-EGFP knock-in mice (A) and wild-type mice (C). Bone marrow cells were analyzed for EGFP expression. Three pairs of animals were independently analyzed and gave similar results. The results of one representative analysis are shown. (B and D) Femoral bone tissues from CX₃CR1-EGFP knock-in mice (B) and wild-type mice (D). Images of EGFP fluorescence (a), TRAP staining (b), second harmonic generation of bone tissue (c), and overlay with a transmission image (d). Arrowhead, mature EGFP⁺ TRAP⁺ osteoclast; asterisks, mature TRAP⁺ osteoclasts. The EGFP⁺ TRAP⁺ osteoclast/total TRAP⁺ osteoclast ratios are indicated by the white numbers in the bottom right corners. Scale bars, 30 μ m.