

▶ 第37回日本心脈管作動物質学会

～ドラッグデリバリーシステム～
ナノサイズリポソームを用いた
新しい心筋梗塞治療を開発

ナノサイズリポソームは不完全な新生血管が豊富ながん組織や血管透過性が亢進した炎症部位へ集積するため、内封された薬剤は病変部位での特異的な効果の増強・持続が期待できる。一方、病変部位以外での作用は減弱するため副作用が軽減されることが期待できる。既に抗がん薬領域で臨床応用されているが、循環器領域でも研究が進んでいる。大阪大学医学系大学院/国立循環器病センター連携大学院の高濱博幸氏は、ラット虚血再灌流モデルにアデノシンのナノサイズリポソーム化による薬物送達を試みた結果、梗塞サイズが縮小し、全身の血行動態への影響は減弱したことを、仙台市で開かれた第37回日本心脈管作動物質学会(会長=東北大学大学院循環器病態学分野・下川宏明教授)で報告した。

アデノシンの
ナノサイズリポソーム化に成功

高濱氏が今回用いたアデノシンは、心筋梗塞巣に対するサイズ縮小効果が認められているが、半減期が1～10秒と短く、用量依存性に血圧低下や徐脈などの副作用を示す。同氏は、このアデノシンをナノサイズリポソーム化することによって、虚血再灌流後の内皮障害を背景に梗塞領域へのリポソーム集積が惹起され、心保護効果が増強されると仮定した。

同氏は、ポリエチレングリコール(PEG)修飾リポソーム内へのアデノシン封入に成功し、これをラットの虚血再灌流モデルに再灌流前から投与した。PEG修飾リポソームの滞留性や再灌流後の血管透過性の亢進を想定し、再灌流3時間後と72時

～標的治療遺伝子探索～

PECIが心不全の心筋リモデリングに関与

三重大学大学院ゲノム再生医学講座薬理ゲノミクスの田中利男教授のグループは、ゼブラフィッシュの容量負荷型心不全モデルを作製し、新規治療遺伝子の探索を行っている。そのなかで、Peroxisomal D3, D2-enoyl-CoA Isomerase(PECI)が心不全の治療に関与しており、PECIノックダウンによって心肥大や末梢循環量低下の改善、さらには生命予後にも良好な影響を与えることを見出した。この結果を、同グループの臧黎清氏が報告した。

心肥大関連ネットワークが存在

ゼブラフィッシュはマウス、ラットに続く第3のモデル動物として注目されている。胴体が透明なため内臓

間後に検討を行った。リポソームの組織への集積性については蛍光色素標識リポソームを使用し、梗塞サイズの評価はエバンスブルー、TTC二重染色により行った。

まず、梗塞領域におけるリポソームの集積性を分析したところ、再灌流3時間後、72時間後ともにTTC染色で明らかになった梗塞領域に一致して蛍光リポソームの集積が認められた。

血行動態への影響は軽減

アデノシン通常投与で見られる平均血圧の低下や徐脈といった副作用については、①PEG修飾フリーリポソーム群②PEG修飾リポソーム化アデノシン群③フリーアデノシン群の3群に分けて健常ラットに投与したところ、フリーアデノシン群で惹起された平均血圧の低下や徐脈といった血行動態の変化が、PEG修飾リポソーム化アデノシン群では減弱されていた。

梗塞サイズについては、①コントロール群②PEG修飾フリーリポソーム群③フリーアデノシン群④PEG修飾リポソーム化アデノシン群で比較したところ、PEG修飾リポソーム化アデノシン群では他群と比べて梗塞サイズが有意に縮小していた。また、この傾向は非選択的アデノシンブロッカーを投与することにより消失した。

以上の結果から、アデノシンをリポソーム化することで全身の血行動態への影響が減弱される一方で、有意な梗塞サイズの縮小効果が認められた。今後、高濱氏は臨床応用を目的とした研究を展開する予定である。

の観察が容易であり、発育が早いために発生のスクリーニングにも適している。ゲノムシンテニーではヒトと約80%の相同性があることが明らかにされている。

田中教授らのグループでは、このゼブラフィッシュを用いて容量負荷型心不全モデルを作製した。まずは既存の心不全治療薬の効果を検討したところ、β遮断薬を中心に心不全改善効果が認められた(図)。同グループは、大規模臨床試験でも良好な評価が得られているカルベジロールに着目し、同薬投与前後の遺伝子発現プロファイルを解析。DNAマイクロアレイを実施する際には、心臓特異的な遺伝子発現プロファイルが必要なため、Laser Capture Micro-

dissection(LCM)を実施した。

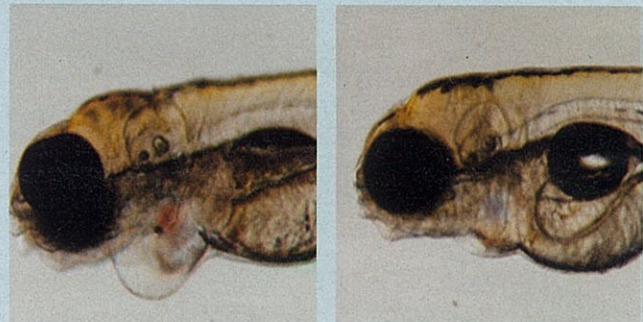
その結果、心不全の病態で発現が上昇し、カルベジロール投与により発現が減少する27遺伝子が同定された。次に、siRNAカクテルやMorpholinoアンチセンスにより各遺伝子のノックダウンモデルを作製し、心不全病態への影響を検討した結果、PECIが最も再現性がよく、心不全の治療に関与していると考えられた。このPECIノックダウンモデルでは、心肥大を有意に改善し、末梢循環量の増加も確認された。

また、Kaplan-Meier生存分析では、心不全モデルと比べてカルベジロール投与と同等にPECIノックダウンモデルで生命予後が改善した。

さらに同グル

ープは、心不全モデルとPECIノックダウンモデルでマイクロアレイ解析を実施。PECIノックダウンモデルで発現が増減した遺伝子を調べたところ、心血管系に関連する遺伝子ネットワークが示され、特に心肥大関連のネットワークが明らかになった。この結果から、同グループではPECIノックダウンモデルで心筋リモデリングの改善が誘導されていると推測し、さらに詳細な検討を進めている。

(図) 心不全モデルゼブラフィッシュ



心不全モデル

カルベジロール投与後

(三重大学大学院薬理ゲノミクス)

～EPC機能活性～

Rhoキナーゼ阻害による血管新生作用を
虚血下肢ラットで確認

低分子G蛋白質Rhoの標的蛋白質として同定されたRhoキナーゼは、血管リモデリングや心機能障害に関与することが示されている。また、Rhoキナーゼ阻害による臓器保護作用が報告されているが、その作用機序は不明な点が多い。獨協医科大学循環器内科の武島宏氏は今回、虚血下肢に対するRhoキナーゼ阻害作用を検討。Rhoキナーゼ阻害薬のファスジルを虚血下肢ラットモデルに投与した結果、血管内皮前駆細胞(EPC)の機能活性化を介した血管新生作用が確認されたことを報告した。

EPCの増加・機能活性を
介した作用

武島氏は、Wistarラットの左鼠径部から外腸骨動脈を根部で結紮切離し、虚血下肢ラットモデルを作製。コントロール群とRhoキナーゼ阻害群(ファスジル投与群、以下治療群)に分け、治療群については虚血下肢ラットモデルの作製時より100mg/kg/日でファスジルの投与を開始し、3週間経口投与した。下肢動脈血流量は、レーザードプラ法により測定。ラットから単核球細胞を分離し、血中のEPCコロニーアッセイの評価を行った。また、細胞表面の抗原量を測定できるフローサイトメトリー(FACS)法により、末梢血中の前駆細胞数としてCD34陽性細胞数やsca-1、c-kitなどを評価した。病理組織学的評価として、アイソレクチンB4による蛍光染色を行い、血管新生を評価し、さらにウェスタンブ

ロット法による血管内皮増殖因子(VEGF)やAngiopoietin(Ang)-1, 2, eNOSの発現を評価した。

その結果、まずレーザードプラ法では、治療群でのみ3週間後に下肢動脈血流量の増加が認められた。アイソレクチンB4によるcapillary densityの評価は、治療群で有意な増加が認められた。また、EPCアッセイについてはコロニー形成の増加が確認された。FACS解析では、治療群でsca-1陽性数やc-kit陽性数、さらにCD34陽性細胞数の著明な増加が認められた。ウェスタンブロット法による評価でも、治療群でVEGFやAng-1, 2, eNOSの発現亢進が認められた。

さらに、活性酸素産生酵素であるNADPHオキシダーゼを蛍光染色により確認したところ、治療群では有意な発現抑制が認められた。

以上の結果から、同氏は「虚血下肢ラットモデルにおいてRhoキナーゼ阻害薬ファスジルのEPC増加、および機能活性による虚血下肢の保存的血管新生作用が存在する可能性が示された」と述べた。

皆様の声をお寄せ下さい

日ごろの診療で感じたことや
小紙へのご意見・ご感想などをe-mail
あるいは郵送でお寄せください。

(送り先)

Medical Tribune編集部

E-mail: mt@medical-tribune.co.jp

電話: 03-3239-7213(編集部)

FAX: 03-3239-7226(FAXの場合、「編集部行き」とご明記ください)

住所: 〒102-0084 東京都千代田区
二番町2-1 二番町TSビル