

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業  
産学連携医療イノベーション創出プログラム 基本スキーム (ACT-M)  
事後評価報告書



## I 基本情報

研究開発課題名：（日本語） 未破裂脳動脈瘤のリスク評価を目指すマクロファージイメージング用新規 MRI 造影剤の開発  
（英語） Development of Novel MRI Contrast Agents for Macrophage Imaging Enables Risk Evaluation of Unruptured Cerebral Aneurysm

研究開発実施期間：2016年10月1日～2019年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語） 近藤 輝幸  
（英語） Teruyuki Kondo

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

（日本語） 国立大学法人 京都大学・大学院工学研究科 物質エネルギー化学専攻・教授

（英語） Department of Energy and Hydrocarbon Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University · Professor

## II 研究開発の概要

### 【背景と目的】

「くも膜下出血」は、一旦発症すると、現在の医学水準で最大限の治療を行っても、死亡率は 50% を超え、遷延性意識障害や半身麻痺などの後遺症が残ることが多く、社会復帰が難しく健康寿命を大きく損なう重篤な疾患である。また、生産年齢層（40～50 歳代）の突然死の主原因の一つであり、社会的損失が極めて大きい疾患である。しかしながら、その主原因である脳動脈瘤の破裂を回避する薬物治療法はなく、動脈瘤の大きさ（5～7 mm 以上）、部位（後方循環、前交通動脈など）、形状（Dome Neck Aspect 比が大、不整形など）という形態情報のみを判断基準とする外科的治療法のみが行われている。さらに、合併症リスク（～10%）を伴う高額な外科的治療法の適応判断基準は不十分と言わざるを得ず、「アンメットメディカルニーズ」に該当する疾患である。そこで本研究では、未破裂脳動脈瘤が血流ストレスに惹起される脳血管の慢性炎症性疾患であり、マクロファージがこの炎症反応を制御するという観点から、脳動脈瘤病変部位に高集積しているマクロファージの MRI 画像化を実現する「生体適合性ポリマー被覆ガドリニウム（Gd）ナノ粒子 MRI 造影剤」を開発し、脳動脈瘤の破裂リスクの評価と症例の層別化の実現、および外科的治療法の適応判断やタイミングなど、医師側の判断に極めて有用な情報を提供することを目的とする。日本は、医療アクセスの良さ（国民皆保険制度や脳ドックなど）と MRI の高い普及率により、未破裂脳動脈瘤が多く見つかる環境にあり、本研究の成功は、「くも膜下出血」という重篤な疾患に対し、日本が世界を先導する革新的医療システムの構築に繋がる。

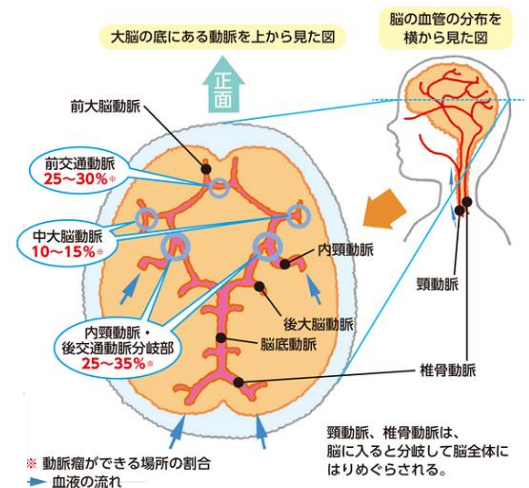


図 1. 脳動脈瘤ができやすい部位。  
(<http://www.ncvc.go.jp/cvdinfo/pamphlet/brain/pamph132.html> から引用)

### 【研究成果】

課題リーダーである近藤と JSR（株）が有するナノ粒子合成技術と評価法、青木グループによるラット動脈瘤モデルおよび破裂モデルの作製、松田グループによる MRI 撮像技術、早乙女による開発した造影剤およびその用途・適応症に対する知的財産権の管理という役割を担い、医学・工学・情報学連携・産学共同研究を推進した結果、MRI によるマクロファージイメージングに必須の「生体適合性ポリマー被覆ガドリニウム（Gd）ナノ粒子 MRI 造影剤」の開発に成功した。

まず、近藤グループが合成した Gd ナノ粒子について、JSR（株）のコア技術であるナノエマルジョン法により、ナノ粒子表面を生体適合性ポリマー被覆した結果、10 種類の新規「生体適合性ポリマー被覆 Gd ナノ粒子 MRI 造影剤」の合成に成功した。それぞれの Gd ナノ粒子について、水中および生理的条件下でのナノ粒子の安定性、細胞毒性、MRI 造影能、およびマクロファージ細胞株（RAW 264.7）への取り込み量を評価基準とし、マクロファージイメージングに最適と考えられる 2 種類の MRI 造影剤候補を選定した。

続いて、青木グループが作製したラット動脈瘤モデル（MRI の解像度に耐える約 3 mm の動脈瘤であり、経時的に増大する“active”な動脈瘤を誘発）に、選定した 2 種類の Gd ナノ粒子を尾静脈投与し、in vivo MRI 撮像を行った。その結果、松田グループでは、動脈瘤病変部位に高集積したマクロファージの MRI

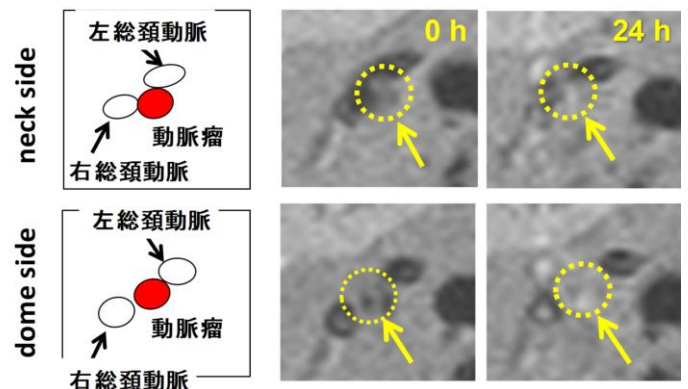


図 2. 生体適合性ポリマー被覆 Gd ナノ粒子造影剤を用いたラット動脈瘤モデルの MRI 画像。

撮像法として、血流シグナルを抑制した black blood 法が極めて有効であることを明らかにし、3～14 時間後に、それぞれ動脈瘤壁に高集積しているマクロファージの明瞭な MRI 画像を得た (図 2)。なお、MRI 撮像後にラットを犠牲死させ、免疫組織化学的検討を行った結果、動脈瘤壁の主として外膜にマクロファージの浸潤があること、および脳組織の lysate を調製し、Gd の脳組織への残存量を原子吸光光度計により計測した結果、Gd の脳組織への残存量は検出限界以下 (ppb) であることを確認している。

以上の評価結果に基づき、より効果的で非臨床試験を実施する第一候補の Gd ナノ粒子 MRI 造影剤について、非 GLP ではあるが、ラットでの安全性試験を兼ねた最大耐用量試験 (外部委託) を実施した。その結果、通常の投与量に対し、単回投与で 1/3 量および 1.2 倍量、また、反復投与量の総量として、2.3 倍量および 5.8 倍量のいずれの投与量でも、重篤な変化は観測されず、安全性を確認した。

既に、本学 iACT (医学部附属病院 臨床研究総合センター) の支援の下、PMDA との RS 戦略相談・事前相談を 2 回実施した。その際の PMDA からの助言に基づき、非臨床試験パッケージを策定し、PMDA との RS 戦略相談・対面助言を早期に実施する。また、「マクロファージイメージング剤」の知的財産については、京都大学・国立循環器病研究センター研究所、および JSR (株) により共同出願を完了した (特願 2019-103165)。

現在、外科治療を受けない多くの未破裂脳動脈瘤症例 (日本では過半数の症例) は、無治療のままである。破裂によるくも膜下出血の重篤さに鑑みると、破裂を抑制する新規治療薬候補の開発が不可欠であり、開発した MRI 造影剤は、新規治療薬候補の薬効を評価するサロゲートマーカーとしても有効に機能することが期待される。さらに、マクロファージは、脳動脈瘤だけでなく、動脈硬化を始めとする日本人の三大成人病 (がん、心臓病、脳卒中) + $\alpha$  という超高齢社会において飛躍的に増加することが危惧される重要な疾患の病態形成・進展に深く関与している (図 3)。従って、本研究で開発した新規「生体適合性ポリマー被覆 Gd ナノ粒子 MRI 造影剤」は、マクロファージが関与する多くの疾患の質的評価・画像診断に応用可能であり、日本発の「医療イノベーション」が創出される。

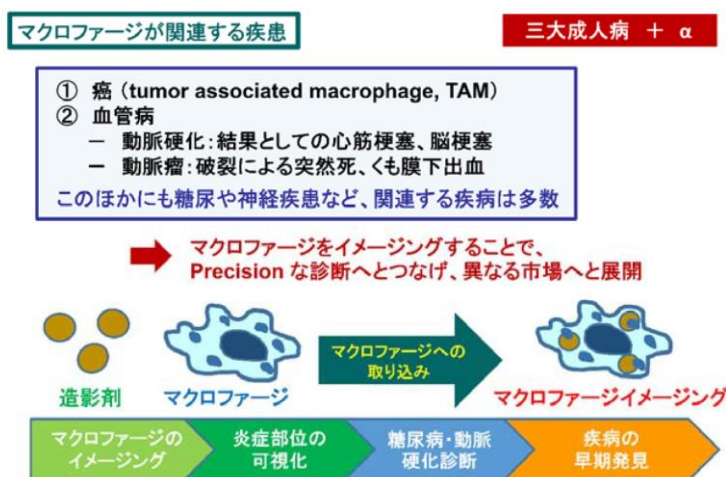


図 3. マクロファージイメージングの展開.

### 【競合性と優位性】

Hasan らは、超磁性酸化鉄 (SPIO,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ナノ粒子である Ferumoxytol を陰性 MRI 造影剤として、脳動脈瘤症例に経静脈投与した結果、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ナノ粒子を貪食したマクロファージの MRI 造影による画像化が可能であること、および非侵襲的にマクロファージが高集積した炎症が強く破裂リスクが高いと推測される動脈瘤の選別の可能性について報告している。しかしながら、Hasan らは、定量化に自作のソフトを使用しているため、他の研究施設では再現できないこと、また、精緻な経過観察による脳動脈瘤の増大・破裂をきたす病変とマクロファージイメージングによる陽性・陰性の判定、および定量値の相関解析は行われていない (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2012, 32, 1032-1038.)。

また、国内でも同様の医師主導治験が計画されたが、Ferumoxytol による致死性的アナフィラキシーショックの発症可能性に対し、FDA から安全性勧告が出され、Ferumoxytol を本来の適応症である腎性貧血症例以外に投与することが禁止され (FDA による black boxed warning 追加、2015 年 3 月)、医師主導臨床治験は、国内外を問わず、全て中止になった。

なお、超磁性酸化鉄 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ナノ粒子は、Ferumoxytol に限らず、全て「陰性」の MRI 造影剤であり、T2\* 強調 MRI 画像において、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ナノ粒子を貪食したマクロファージは黒く抜けて描出され、輝度の定量化が極

めて困難であるとともに、内在性の血中ヘモグロビンの Fe 由来の MRI 信号が観測されることから、このバックグラウンドノイズを削除するための画像処理 (Fe 造影剤投与前後での画像の subtraction) が必須である。しかしながら、脳動脈瘤壁の厚さは  $\sim 0.10$  mm であり、MRI の空間解像度と同程度であることから、この画像処理は MRI に熟練した専門家が行っても極めて困難であり、再現性も乏しいことが明らかになっている。従って、Ferumoxytol をマクロファージの MRI 画像化のための造影剤とする医師主導臨床治験が進んでいたとしても、活性な脳動脈瘤の指標となる「質的画像診断法」の確立は極めて困難であったと考える。

## **【Results of the Research】**

In this research and development, novel paramagnetic gadolinium nanoparticles as a positive MRI contrast agent were developed, successfully, which could realize case stratification of unruptured cerebral aneurysms through the selection of “active” one with considerable high risk of the rupture and prompt necessity of surgical treatment. These cases are thought to be major cause of subarachnoid hemorrhage. The development of the contrast agents could achieve appropriate therapeutic intervention in the case with high risk of aneurysm rupture, as well as diminishment of unnecessary therapeutic intervention, such as surgical craniotomy, in stable aneurysm with low risk of rupture.

(1) Ten candidates of paramagnetic gadolinium nanoparticles with surface modification by biocompatible and functional organic polymers were newly prepared as a positive MRI contrast agent to accumulate surrounding tissue of cerebral aneurysm, in which the particle size can be controlled, precisely. The physical properties of these candidates the physical properties such as those stabilities in water, size control, Gd content, and MRI relaxivity were clarified by dynamic laser scattering (DLS), transmission electron microscope (TEM), atomic absorption spectrometry and thermogravimetric-differential thermal analysis (TG-DTA) and 7T MRI. In addition, all nanoparticles candidates showed no cytotoxicity to macrophage cell lines.

(2) Effectiveness validation of the nanoparticles candidates as a positive MRI contrast agents was performed through  $T_1$ -weighted and  $T_2$ -weighted MRI images of suspension phantoms with various concentration of nanoparticles candidates, and longitudinal and transversal  $^1\text{H}$  relaxivity ( $r_1$  and  $r_2$ ) of water was calculated. Through all evaluation above, two nanoparticles candidates with stability in water, higher  $r_1/r_2$  values, and higher uptake ability in macrophages were selected, and *in vivo* MRI evaluation with cerebral aneurysm rat models established was carried out.

(3) Preparation of animal model was started to distinct acceptance or rejection of nanoparticles candidates as a positive MRI contrast agent which could detect lesion part of cerebral aneurysm. As the first step, optimization of the aneurysm model was promoted to induce enlarged lesion, and accordingly, definite verification of the effect of nanoparticles candidates through MRI was facilitated. In the concrete, the model was revised to prepare newly formation of vascular bifurcation through angiostomy of rat carotid arteries.

(4) Patent application regarding synthesis of novel biocompatible gadolinium nanoparticles as a positive MRI contrast agent for cerebral aneurysms was completed. Almost ten patents about gadolinium nanoparticles were found, but no application of them to a positive MRI contrast agent for cerebral aneurysms was found so far.

(5) Non-GLP safety assessment of the most superior nanoparticles was carried out, and no serious problems such as the death (rats) were not observed. The regulatory science pre-consultations for nonclinical study with PMDA were also carried out twice. Next face to face consultations with PMDA to establish a protocol package of the non-clinical study will be planned as soon as possible.

### III 事後評価総合所見

未破裂脳動脈瘤の破裂リスクを、マクロファージの浸潤を指標として非侵襲的に実現する MRI 造影剤の技術開発を推進し、動物実験にて動脈瘤壁に浸潤しているマクロファージが検出できたことは評価できます。また、当該技術は脳ドック等で発見される多くの未破裂脳動脈瘤症例から、適切な外科的治療適応症例を層別化する際に役立つことが期待できます。

一方、安全性試験など、非臨床試験での課題が存在するため、ナノ粒子の基礎データの蓄積を含めて臨床応用に用いる造影剤の開発に注力する必要があります。

今後、本課題の工学・医学・情報学による異分野融合に加え、企業との産学連携による成果が、将来的に新たな産業展開に寄与することを期待します。