

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10709

研究課題名（和文）TEMPO-RNPによる動脈硬化における酸化ストレス発生の予防

研究課題名（英文）Protective factors in the arteriosclerosis by newly synthesized radical-containing nanoparticles to prevent the oxidation stress

研究代表者

滝川 知司 (Takigawa, Tomoji)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60450227

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：動脈硬化の形成に関し酸化ストレス状態をコントロールすることで動脈硬化の進行を抑制する効果が期待できる。我々は、強いフリーラジカル消去作用をもつ新規DDS化フリーラジカル消去剤（TEMPO-RNP）を開発し、脳保護作用により脳梗塞を抑制することを明らかにした。ラット頸動脈内膜肥厚モデルに対する、TEMPO-RNPを用いた動脈硬化予防効果の検証が目的とする。

TEMPO-RNPは病変特異的な分布を示し、新生内膜肥厚および血管狭窄を抑制した。TEMPO-RNPにより血管壁局所での活性酸素産生の抑制や抗炎症効果（炎症細胞浸潤抑制、接着因子発現制御）の関与が認められ、動脈硬化抑制作用が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TEMPO-RNPは抗炎症効果（炎症細胞浸潤抑制、接着因子発現制御）により、血管壁局所での活性酸素産生の抑制し、動脈硬化作用を有した。TEMPO-RNPは生体親和性も高く生体内で安定的に抗酸化作用を発揮できる特性を持つため、血管形成術後病変や動脈硬化性疾患に対して選択的に効果を発揮する薬剤となりうる。

酸化ストレス障害から波及する様々な病態への更なる発展治療への応用・開発が進むことも予想される。現在、TEMPO-RNPを用いた脳梗塞再灌流におけるフリーラジカル障害予防の臨床研究（AMED）が進行しており、安全性の担保により、動脈硬化予防における臨床応用も期待できる。

研究成果の概要（英文）：Free radicals and reactive oxygen species are related to progression of arteriosclerosis. We developed a core-shell-type nanoparticle, termed a radical-containing nanoparticle (RNP) to deliver antioxidant nitroxyl radicals such as 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO). We evaluated the ability of TEMPO-RNP radicals to arteriosclerosis and scavenge free radicals using rat arteriosclerotic model. TEMPO-RNP showed the lesion-specific distribution, and suppressed neointimal hyperplasia and stenosis of the arteries. By reducing the production of superoxide anion in the arterial wall, TEMPO-RNP had the protective effect against arteriosclerosis by its anti-inflammatory actions. TEMPO-RNPs could be a promising anti-arteriosclerotic agent with their enhanced ability to scavenge free radicals and reduced toxicity.

研究分野：脳神経外科

キーワード：TEMPO-RNP フリーラジカル 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性関連疾患（虚血性脳卒中、虚血性心疾患など）は、現在多くの先進国における主要な死因となっている。頸部頸動脈、頭蓋内動脈、冠動脈、末梢動脈などの動脈硬化性病変に対して、バルーンやステントを用いた血管形成術が行われているが、一定の割合で術後再狭窄や閉塞が発生し問題となる。組織学的に血管形成術後の再狭窄や動脈硬化の初期病変の本体は新生内膜肥厚であることが知られており、中膜平滑筋の内膜への迷入・増殖を伴う。また、動脈硬化は、脳梗塞、心筋梗塞、末梢動脈の狭窄および閉塞性疾患などに関与する重要な因子であり、これらの疾患が発生した際は、再発予防のための抗血小板療法のみならず、高血圧、糖尿病、脂質代謝異常、喫煙、飲酒、運動不足などのメタボリックファクターの厳重な管理が必要となる。しかし、これらの管理は循環器内科、循環器外科、代謝内分泌内科、総合診療科、脳神経外科、神経内科など多科に渡る管理が必要であり、厳密な管理をコントロールすることは非常に困難な状況である。

メタボリックファクターによる動脈硬化の発生には、血管内皮細胞の酸化ストレス障害（活性酸素種（Reactive Oxygen Species; ROS））が重要な役割を果たしていることが知られており、生体内の酸化ストレス状態をコントロールすることで、メタボリックファクターによる全身の動脈硬化を抑制する効果が期待できる。近年我々のグループは、酸化ストレスに対し強いフリーラジカル消去作用をもつニトロキシラジカル（2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl:TEMPO）をミセル化した新規DDS化フリーラジカル消去剤Radical-containing nanoparticle (RNP)（図1）を開発し、脳虚血再灌流障害においてRNPが血中から脳組織内に移行して、高い脳保護作用により脳梗塞を抑制することを明らかにした。RNPはミセル化によりTEMPO単体投与による問題点（短い半減期、低血圧毒性）を克服し、生体親和性も高く生体内で安定的に抗酸化作用を発揮できる特性がある。

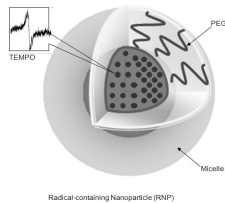


図1: Radical-containing nanoparticle (RNP)

2. 研究の目的

本研究では、これまで半減期の短さや毒性によりフリーラジカル消去剤としての応用が困難であったニトロキシラジカル(TEMPO)を、DDS化フリーラジカル消去剤 RNP により克服し、酸化ストレス障害の抑制による全身性動脈硬化性病変の治療法を研究する、ということである。本研究の目的は、血管壁局所での ROS を TEMPO-RNP で消去することにより、新生内膜肥厚が抑制されるとの仮説をもとに、ラット頸動脈内膜肥厚モデルに対して RNP を投与し、その血管保護効果に関して検証することとした。

3. 研究の方法

(1) モデル動物の作成

Balloon injury modelであるラット頸動脈内膜肥厚モデルを使用した。既報の通りの方法でモデルを作成した。

RNP投与群をBalloon injury 直後にRNP3mg/kg を経静脈投与し、その後14日目まで隔日で同量を経腹腔投与したものとし、Control群はRNPの代わりにPBSを投与したものとした。共に術後14日目にsacrificeし以下の比較を行った。

(2) RNPの病変局在分布の確認

Balloon injury直後にRNPを投与し、その4時間後にsacrificeしたものと、Balloon injury14日後にRNPを投与し、その4時間後にsacrificeしたものに関して、総頸動脈の切片をRNPの標識色素であるRhodamineの蛍光免疫染色を行い、RNP分布を評価した。

(3) RNPのROS除去効果の確認

血管壁でのROS産生に関してDihydroethidium (DHE) の染色を行い、RNP群とControl群で比較した。

(4) RNPの血管保護効果の検証

新生内膜に関する形態学的評価

新生内膜の肥厚程度に関して、中膜あたりの内膜の面積比 (Intima/Media ratio) を、血管狭窄度の評価として、中膜断面積あたりの内腔の面積比 (Residual ratio) を評価した。

(5) RNPの血管保護メカニズムの検証

血管壁炎症反応の評価

血管壁の炎症細胞浸潤を評価する目的でiba-1、iNOS、接着因子を評価する目的でCD62の蛍光免疫染色を評価した。

レクチン様酸化LDL受容体 (LOX-1) 発現の評価

血管壁のLOX-1発現に関して、蛍光免疫染色で評価した。

4. 研究成果

(1) RNPの病変局在分布の確認

Balloon injury直後にRNPを投与し、その4時間後にsacrificeしたサンプルでは、injury側の中膜全体にRNPが分布していたが、正常側ではRNPの分布は確認できなかった。Balloon injuryから14日後にRNPを投与し、その4時間後のサンプルでも、速やかに新生内膜内にRNPが浸透している所見を認めた。RNPは病変部に特異的な分布を示した。

RNPの平均粒子径は約30nmであるが、そのサイズ上の特性によりballoon injuryによる血管内皮および細胞外マトリックスの微小な間隙を通して中膜内および新生内膜内にRNPが浸透している可能性がある。動脈硬化病変や血管形成術後病変でも血管内皮損傷は認められるため、RNPの同病変に対するドラッグデリバリーシステムとしての有効性が示唆された。

(2) RNPのROS除去効果の確認

Control群では血管壁全層にROS産生を示すDHEの赤色蛍光が強く発現していたのに比較して、RNP群では内腔側の新生内膜部分に陽性部分を認める以外は蛍光が明らかに低下していた。RNPによる血管壁局所でのROS除去効果が示された。

(3) RNPの血管保護効果の検証

新生内膜肥厚に対する影響

Intima/Media ratioの比較では、Control群に比較してRNP群で有意に低値であり、Residual ratioの比較では、RNP群でControl群に比較して有意に高値であった。RNP群で新生内膜肥厚が抑制され、かつ血管狭窄の程度も軽度であったと言える。

(4) RNPの血管保護メカニズムの検証

血管壁炎症細胞浸潤の評価

蛍光免疫染色での検討において、マクロファージのマーカーであるIba-1、炎症誘導に関与するM1マクロファージのマーカーであるiNOSではいずれもRNP群でControlに比較して陽性細胞が減少していた。

RNPは病変特異的な分布を示したが、そのメカニズムとしてRNPの平均粒子径が30nmであることが関与していると考えられる。血管形成術後病変や動脈硬化性病変には微細な血管内皮損傷が認められており、RNPのサイズ上の特性により微小な細胞外マトリックスの間隙を通して病変に浸透していくことが可能となっていることが予想される。

RNPの血管保護効果に関しては、血管壁局所ROSの除去作用により平滑筋の増殖・迷入に関与するレドックス感受性転写因子が抑制された可能性があり、また抗炎症作用により、炎症血管で起こりうる様々な変化 (接着因子の亢進、マクロファージの活性化など) がRNPにより抑制されている可能性が考えられる。

ラット頸動脈内膜肥厚モデルにおいて、RNPは病変特異的な分布を示したとともに、新生内膜肥厚および血管狭窄を抑制した。その作用メカニズムとして血管壁局所でのROS産生の抑制や抗炎症効果 (炎症細胞浸潤抑制、接着因子発現制御) が関与していると考えられた。DDS化フリーラジカル消去剤RNPを用いた治療システムで全身の動脈硬化の抑制が示されることが明らかになれば、今後動脈硬化性病変に対して新たな切り口からの治療を行うことにつながり、脳梗塞や虚血性心疾患、末梢動脈閉塞性疾患などの予防において多大な貢献をもたらすことが期待できる。また、動脈硬化性病変に対するDDS化フリーラジカル消去剤RNPの導入が成功することにより、酸化ストレス障害から波及する様々な病態への更なる発展治療への応用・開発が進むことも予想される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡部大輔
2. 発表標題 新生内膜肥厚に対するレドックスナノ粒子を用いた治療に関する基礎的研究
3. 学会等名 日本脳循環代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸島愛樹
2. 発表標題 脳梗塞急性期血栓回収療法における抗酸化ナノメディシン(RNP)による脳保護療法の開発
3. 学会等名 日本脳循環代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡部大輔
2. 発表標題 血管形成術後新生内膜肥厚病変に対するレドックスナノ粒子の血管保護効果に関する検討
3. 学会等名 日本脳神経外科学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山本 哲哉 (Yamamoto Tetsuya) (30375505)	横浜市立大学・医学研究科・教授 (22701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	丸島 愛樹 (Marushima Aiki) (40722525)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	
研究 分担者	高野 晋吾 (Takano Shingo) (50292553)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
研究 分担者	伊藤 嘉朗 (Ito Yoshiro) (90733014)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	
研究 協力者	渡部 大輔 (Watanabe Daisuke)	筑波大学・医学医療系・大学院生 (12102)	