

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：平成 19 年度～平成 20 年度  
 課題番号：19790532  
 研究課題名（和文） 動脈硬化プラーク破綻におけるマクロファージ・アポトーシスの役割解明と治療法  
 研究課題名（英文） Role of Macrophage Apoptosis in Atherosclerotic Plaque Rupture: Development of New Therapy  
 研究代表者  
 的場 哲哉（MATOBA TETSUYA）  
 九州大学病院・循環器内科・医員  
 研究者番号：20448426

## 研究成果の概要：

## 1. プラーク破綻モデルマウスの作成

本研究において 8 週間の高脂肪食を負荷した ApoE 欠損マウスに 4 週間アンギオテンシン II 持続負荷を行うことにより、腕頭動脈に高頻度の急性プラーク破綻（64%, n=11）および buried fibrous cap（ $2.8 \pm 0.4$ /個体, n=11）生じるマウスモデルを作成した。

## 2. マクロファージ選択的ナノ粒子の作成

マクロファージ選択的に治療因子を導入するため、径 200nm の poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA)ナノ粒子を作成した。FITC を封入した PLGA ナノ粒子(FITC-NP)をマウスへ静脈注射したところ、1 時間後の末梢血では CD11b(+)/Gr-1(-)の単球に選択的に FITC の取り込みを認めた。また、高脂肪食負荷を行った ApoE 欠損マウスに FITC-NP を静脈注射したところ、腕頭動脈・動脈硬化巣内のマクロファージに FITC 免疫染色を認め、PLGA ナノ粒子が単球、マクロファージ選択的キャリアとなることが示された。

3. PPAR- $\gamma$ アゴニストであるピオグリタゾン、マクロファージにおいてアポトーシスを誘導することが示されている(Thorp, Circulation 2007)。ピオグリタゾンを PLGA ナノ粒子に封入し、上記プラーク破綻モデルマウスに対する静脈内投与を行ったところ、4 週間後のプラーク破綻の減少を認めた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：血管病態学、動脈硬化、アポトーシス、ナノテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

心血管イベントの本体は冠動脈硬化プラークの破綻および冠動脈の血栓性閉塞である。

プラーク破綻をきたしやすい不安定プラークの特徴は、1) 脂質貪食マクロファージに由来する泡沫細胞のアポトーシスに伴う壊

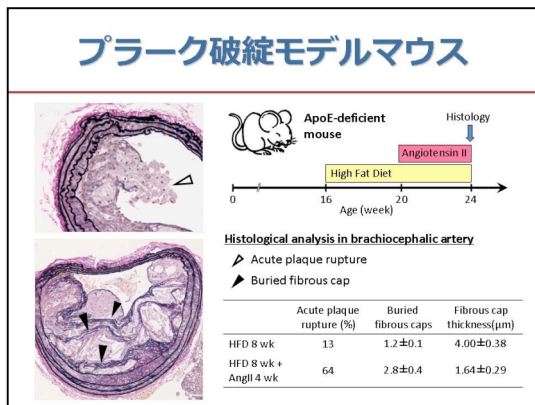
死性脂質コア (necrotic core) の形成、2) 脂質コアを覆う繊維性皮膜 (fibrous cap) の脆弱化であり、この過程においてマクロファージのアポトーシスおよび、それに伴う単球走化因子(MCP-1)、インターロイキンを始めとした各種サイトカインの放出および Matrix metalloproteinase (MMPs)の活性化が重要な役割を果たしていると考えられており、申請者は新規治療のターゲットとしてマクロファージのアポトーシスに着目した。

## 2. 研究の目的

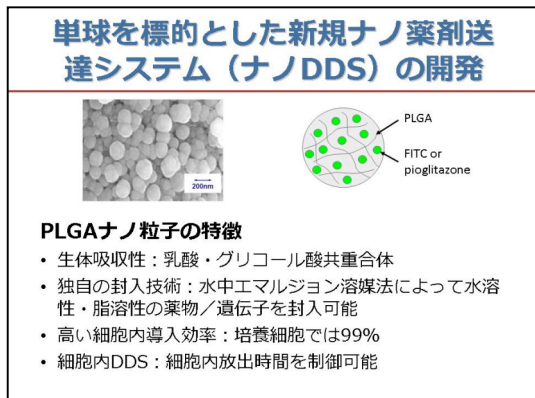
1) プラーク破綻が再現性良く生じる動物モデルの開発、2) 単球ターゲティング ナノ DDS 技術の開発、3) 単球選択的マクロファージ・アポトーシス誘導因子投与によるプラーク破綻予防効果の検討。

## 3. 研究の方法、4. 研究成果

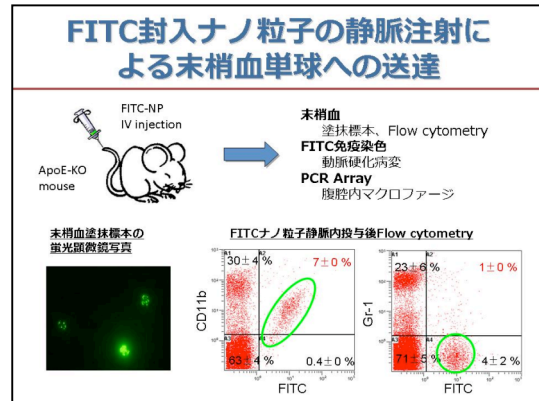
1) プラーク破綻マウスモデルの作製：申請者らは、高齢（16 週齢以降）の ApoE 欠損マウスに高脂肪食負荷（8 週間）およびアンジオテンシン II 持続負荷（4 週間）を行うことにより、腕頭動脈に高率にプラーク破綻を発症するモデルマウスを作成した。下図のように急性プラーク破綻および埋没した線維性被膜を組織学的に評価でき、プラーク破綻イベントを定量化できる（下図）。



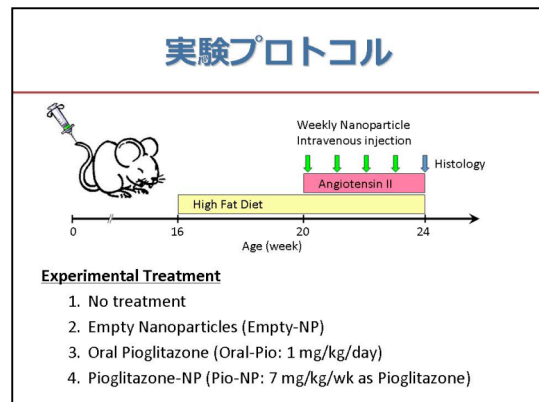
2) 単球ターゲティングナノ粒子の作成：生体吸収性ポリマー (PLGA) を用いて粒子径 200nm の単球指向性ナノ粒子を作製した（下図）。



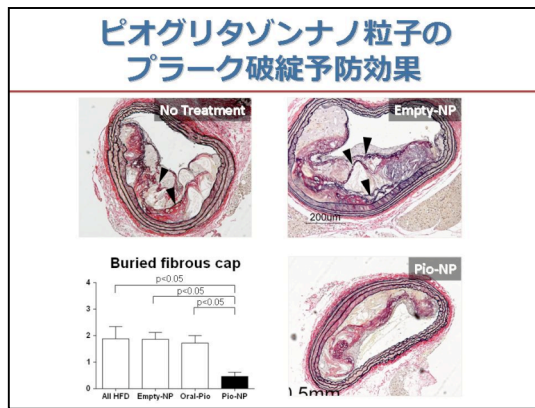
FITC 封入ナノ粒子が培養単球に効果的に導入されることを確認した。ApoE 欠損マウスにおいて、FITC ナノ粒子を単回静脈内投与したところ、末梢血単核球に取り込まれ、Flow cytometry では CD11b+/Gr-1- の単球に取り込まれることを確認した（下図）。



3) ピオグリタゾン封入ナノ粒子の作成：治療因子として、マクロファージにおいてアポトーシスを誘導することが示されている PPAR $\gamma$  アゴニスト、ピオグリタゾン (Thorp, Circulation 2007) を封入したナノ粒子を作製した。上述のプラーク破綻モデルマウスを未治療対照群、FITC ナノ粒子投与群、ピオグリタゾンナノ粒子投与群、経口ピオグリタゾン群の4群に振り分ける。ナノ粒子投与群では、ナノ粒子を週1回経静脈的に投与する。治療4週間後、生理データを収集、採血後に動物を犠牲にし、病理学的に①プラーク破綻、②プラーク性状（線維皮膜厚、マクロファージ数、MMP 発現）、等を解析した（下図）。



モデルマウス腕頭動脈の組織解析で、ピオグリタゾン封入ナノ粒子 (Pio-NP) がプラーク破綻を有意に抑制し、同用量の経口ピオグリタゾン (1mg/kg/day) では無効であることが明らかとなった（下図）。



#### 【総括】

本研究により、マクロファージにおいてアポトーシスを誘導するピオグリタゾンのナノ粒子化製剤静脈注射により、動脈硬化プラークの不安定化および破綻の抑制が可能である事が明らかとなった。機序の詳細について検討を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ①. Kubo M, Egashira K, Inoue T, Koga J, Oda S, Chen L, Nakano K, Matoba T, Kawashima Y, Hara K, Tsujimoto H, Sueishi K, Tominaga R, Sunagawa K. Therapeutic Neovascularization by Nanotechnology-Mediated Cell-Selective Delivery of Pitavastatin into the Vascular Endothelium. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 有、2009 in press.
- ②. Nakano K, Egashira K, Masuda S, Funakoshi K, Zhao G, Kimura S, Matoba T, Sueishi K, Endo Y, Kawashima Y, Hara K, Tsujimoto H, Tominaga R, Sunagawa K: Formulation of nanoparticle-eluting stents by a cationic electrodeposit coating technology: Efficient and safe nano-drug delivery via bioabsorbable polymeric nanoparticle-eluting stents in porcine coronary arteries. *J Am Coll Cardiol: Cardiovascular Intervention.* 有、2(4): 2009; 277-283.
- ③. Koga J, Egashira K, Matoba T, Kubo M, Ihara Y, Iwai M, Horiuchi M, Sunagawa K: Essential Role of Angiotensin II Type 1a Receptors in

the Host Vascular Wall, but Not the Bone Marrow, in the Pathogenesis of Angiotensin II-Induced Atherosclerosis. *Hypertens Res.* 有、31(9): 2008; 1791-1800.

- ④. 的場哲哉、古賀純一郎、江頭健輔、ケモカインと動脈硬化、医学のあゆみ、223(13)、1205-1210、2007
- ⑤. 的場哲哉、江頭健輔、海外文献紹介 *Angiology*、7(1)、66-67、2007

[学会発表] (計 10 件)

- ①. Kubo M, Egashira K, Oda S, Matoba T, Sunagawa K: Nanoparticle-Mediated Intracellular Delivery of Pitavastatin to Endothelial Progenitor Cells Ex Vivo Normalizes the Functional Activity for Therapeutic Neovascularization、第 73 回日本循環器学会総会・学術集会 (平成 21 年 3 月 22 日、大阪)
- ②. Tsukie N, Egashira K, Nakano K, Matoba T, Sunagawa K: Pitavastatin Incorporated Nanoparticle-Eluting Stent Attenuates In-Stent Stenosis, and Prevents Adverse Effects of Sildenafil-Eluting Cypher Stent in Porcine Coronary Artery Model、第 73 回日本循環器学会総会・学術集会 (平成 21 年 3 月 21 日、大阪)
- ③. Sato K, Egashira K, Katsuki S, Matoba T, Sunagawa K: Cholesterol-lowering therapy with the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe inhibits plaque destabilization and rupture in the brachiocephalic arteries of ApoE-deficient mice、第 73 回日本循環器学会総会・学術集会 (平成 21 年 3 月 20 日、大阪)
- ④. Matoba T, Egashira K, Koga J, Hara K, Tsujimoto H, Sunagawa K: Nanoparticle-mediated monocyte-selective transfection of dominant-negative monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) mutant gene reduced plaque rupture in apoE-deficient mice (シンポジウム)、第 15 回日本血管生物医学学会学術大会 (平成 20 年 12 月 3 日、石川)
- ⑤. Matoba T, Egashira K, Masuda S, Iwata E, Miyagawa M, Nakano K, Tsukie N, Sunagawa K: Mechanisms

Underlying Coronary Vasopsasm at Distal Arterial Segments of Sirolimus-Eluting Stent Implantation in a Porcine Model、Scientific Sessions 2008 of the American Heart Association (November 12, 2008, Orlando)

- ⑥. Matoba T, Egashira K, Koga J, Hara K, Tsujimoto H, Sunagawa K: Nanoparticle-based Monocyte-Selective Delivery of PPAR $\gamma$  Agonist Pioglitazone Inhibits Plaque Rupture in ApoE-Deficient Mice、Scientific Sessions 2008 of the American Heart Association (November 11, 2008, Orlando)
- ⑦. Koga J, Egashira K, Matoba T, Hara K, Tsujimoto H, Sunagawa K: Nanoparticle-Mediated Monocyte-selective Transfection of Dominant-Negative Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) Gene Reduced Plaque Rupture in ApoE-Deficient Mice、Scientific Sessions 2008 of the American Heart Association (November 11, 2008, Orlando)
- ⑧. Matoba T, Egashira K, Masuda S, Iwata E, Miyagawa M, Nakano K, Tsukie N, Sunagawa K: Animal study muzzles macrophages to reduce role in plaque rupture、AHA News Conference, Scientific Sessions 2008 (November 10, 2008, Orlando)
- ⑨. Matoba T, Egashira K, Masuda S, Iwata E, Miyagawa M, Nakano K, Tsukie N, Sunagawa K: Mechanisms Underlying Coronary Vasopsasm at Distal Arterial Segments of Sirolimus-Eluting Stent Implantation in a Porcine Model、第12回 Molecular Cardiovascular Conference (平成20年9月6日、北海道)
- ⑩. Matoba T: Monocyte-targeting Nanoparticle-based Delivery of Pioglitazone Inhibits Plaque Rupture in the Brachiocephalic Arteries of Apolipoprotein-E Deficient Mice、The 9th US-Japan-Asia Dialogue on Cardiovascular Diseases (平成20年8月23日、東京)

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/cardiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

的場 哲哉 (MATOBA TETSUYA)  
九州大学病院・循環器内科・医員  
研究者番号：20448426

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：