

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790600
 研究課題名（和文） 不安定プラークを特異的に検出する新規ナノテクノロジー動脈硬化診断法の開発
 研究課題名（英文） diagnostics development of unstable atherosclerosis based on new technology
 研究代表者
 小川 弘子（OGAWA HIROKO）
 岡山大学・岡山大学病院・助教
 研究者番号：70423283

研究成果の概要（和文）：

動脈硬化の早期に診断・治療のために、動脈硬化の病態の主体となる炎症を標的としたリポソームによる診断・治療法の開発を目標とした。シアリル Lex 系抗原修飾リポソームの動脈硬化マウス投与により、蛍光内包リポソームによる in vivo imaging 像はプラーク安定化の変化を評価することができる可能性があることが示した。また、薬剤内包リポソームは効果的にプラーク安定化に寄与する可能性がある事が示した。

研究成果の概要（英文）：

Detection of vulnerable plaque is a promising strategy for atherosclerosis imaging. Vulnerable plaque is characterized by the infiltration of inflammatory cells. SLX-Lipo-statin attenuated the inflammation of atherosclerotic lesions in vivo, which was monitored non-invasively. We demonstrated that E-selectin-targeted liposomes can be a powerful tool for the detection of and the treatment for atheromatous plaques with the advantage of non-invasive and repeatable assessment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：循環器内科学、イメージング学、分子生物学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：イメージング、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は、心筋梗塞や脳梗塞を中心とした血管系疾患の発症に深く関わる。近年、動脈硬化に伴う疾患は更に増加しており、動脈硬化を早期に診断し、適切な治療を行うことが求められている。動脈硬化には安定プラークと不安定プラークの2種類があり、不安定プラークは被膜が薄く破綻をきたしやすく、心血管系疾患や脳血管障害を起こす危険性が高い。

動脈硬化を CT や MRI でプラークの部位や大きさを判定する方法や CAVI や PWV など血管の硬さを判定する方法があり、存在

動脈硬化を CT や MRI でプラークの部位や大きさを判定する方法や CAVI や PWV など血管の硬さを判定する方法があり、存在

診断としては非常に有用である。しかしプラークの質的診断法はまだ確立していない。血管内視鏡や血管内超音波法なども行われているが、非常に侵襲的な方法であり、精度も低い。また、実験的に試みられている方法もあるが、まだ確立した方法はない。

2. 研究の目的

不安定プラークは心血管系疾患や脳血管障害を引き起こす本体であるが、まだ有効な診断技術がない。動脈硬化の病態は炎症を主体としているので、炎症を標的としたリポソームを不安定プラークに特異的に結合させることにより、危険な動脈硬化を体外から検出する診断法を開発する。さらに、薬剤の内包化によりドラッグデリバリーシステム(DDS)として使用でき、直径 100 ナノメートルの動脈硬化標的リポソームによる新しい動脈硬化治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 動脈硬化巣に発現する分子に対する特異的抗体をリポソーム表面に抗体を修飾することにより、不安定プラークに特異的な集積をするリポソームを作成する。
- (2) 動脈硬化疾患モデルマウスを用いて、高脂肪食の負荷または、薬剤による加療を行い、その過程を *in vivo* imaging を用いて経時的に観察を行う。
- (3) 金コロイドを内包したリポソームを用いて電子顕微鏡で観察する。
- (4) 薬剤を内包したリポソームを動脈硬化疾患モデルマウスに投与し、プラークの質的变化を経時的に観察し、治療効果の判定を行う。

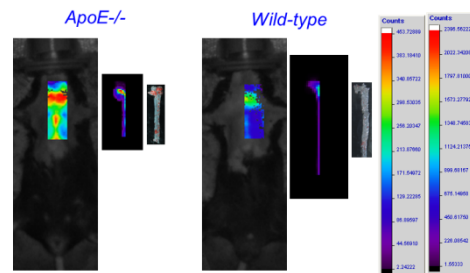
4. 研究成果

- (1) 不安定プラークを標的とするリポソームにより、危険な動脈硬化を体外から検出する診断法の開発

①不安定プラークに特異的な集積をするリポソームの作成と *in vivo* imaging

プラーク内皮に発現している細胞接着分子の CD40 に対する抗体を市販のラベリングキットを用いて、リポソームに修飾した。次に、生体内でのリポソームの確認と *in vivo* imaging を行った。動脈硬化モデルとしてアポリポrotein E 欠損マウスに Western Type Diet を負荷したマウスを用いた。作成した抗体修飾 Cy3 蛍光内包リポソームと、既に市販されている E-selectin と特異的に結合するシアリル Lex 系抗原 (SLX) 修飾リポソームを、それぞれマウスに尾静注し、24 時間後に観察を行った。実体顕微鏡下に摘出した大動脈を摘出し、蛍光顕微鏡で観察を行った。また、Cy3 蛍光内包リポソームを投与したマウス大動脈の薄切切片を作成し、HE 染色、脂肪染色、膠原線維染色、炎症細胞の免疫染色を行った。抗体修飾リポソームと SLX 修飾リポソームとの比較を行ったところ、動脈硬化モデルマウスへの投与において、SLX 修飾リポソームの方が動脈硬化巣への到達が良いと考えられた。

図 1. リポソームによる動脈硬化の検出



- ②プラークへのリポソームの到達機序金コロイドを内包したリポソームを動脈硬化モデルマウスに静注後、大動脈の電顕用ブロックを作成した。超薄切標本を電子顕微鏡を用いて観察し、金コロイドがどの細胞に到達しているかを確認した。内皮細胞内にリポソームにより運ばれたと考えられる金コロイドの集積を確認することができた。

- (2) 薬剤内包リポソーム作成と効果の検討

①薬剤内包リポソームの作成

高脂血症の治療薬として広く用いられているプラバスタチンをリポソームに内包化し

た。その他、スタチン系薬剤を含め、検討を行ったが、内包化が行えなかった。

②薬剤内包リポソームによる動脈硬化モデルマウスの治療効果判定

WTD 負荷 ApoE K0 に蛍光内包リポソームを静注 24 時間後、in vivo imaging を行い、同程度の動脈硬化を呈したマウスを薬剤内包リポソームとコントロールリポソームを投与する 2 群に分け、各リポソームを 3 回投与した。その後、再度、蛍光リポソーム静注 24 時間後、in vivo imaging を行い、薬剤投与群で、シグナルの低下を認めた。プラークの安定化を確認するため、大動脈を摘出し、RNA を抽出した。リアルタイム PCR 法を用いて、マトリックス分解酵素やサイトカインについて、定量評価を行った。薬剤内包リポソーム投与群で、マトリックス分解酵素の発現が低下していた。これらのことから、今回の蛍光内包リポソームによる in vivo imaging 像はプラーク安定化の変化を評価することができる可能性があることが示せた。また、薬剤内包リポソームは効果的にプラーク安定化に寄与することができる可能性がある事が示せた。

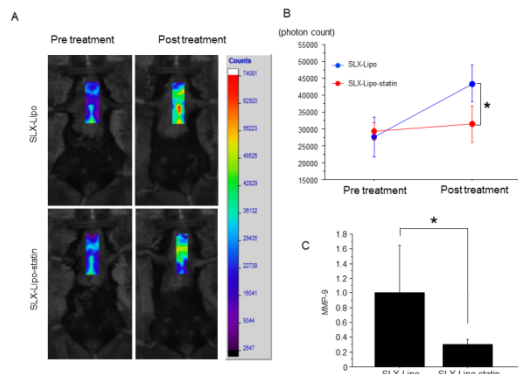


図2. 薬剤内包リポソームによるプラークの安定化

- A. 薬剤内包リポソーム投与前後における in vivo imaging によるシグナル評価
 B. 薬剤内包リポソーム投与前後における in vivo imaging によるシグナルの定量評価
 C. 薬剤内包リポソーム投与後の大動脈における MMP-9 発現の定量評価

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 3 件)

- ① Tumor growth inhibitory effect of ADAMTS1 is accompanied by the inhibition of tumor angiogenesis. Obika M, Ogawa H, Takahashi K, Li J, Hatipoglu OF, Cilek MZ, Miyoshi T, Inagaki J, Ohtsuki T, Kusachi S, Ninomiya Y, Hirohata S. Cancer Sci. 2012; 103(10):1889-97. (査読有)
- ② Distribution pattern of urine albumin creatinine ratio and the prevalence of high-normal levels in untreated asymptomatic non-diabetic hypertensive patients. Ohmaru N, Nakatsu T, Izumi R, Mashima K, Toki M, Kobayashi A, Ogawa H, Hirohata S, Ikeda S, Kusachi S. Intern Med. 2011;50(16):1621-9. (査読有)
- ③ Olmesartan reduces arterial stiffness and serum adipocyte fatty acid-binding protein in hypertensive patients. Miyoshi T, Doi M, Hirohata S, Kamikawa S, Usui S, Ogawa H, Sakane K, Izumi R, Ninomiya Y, Kusachi S. Heart Vessels. 2011;26(4):408-13. (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

- ④ 小川弘子、廣畑聡、小比賀真就、幡中邦彦、伊藤浩、佐田政隆、草地省蔵
 Impact of Collagen Gene Deficiency on the Intimal Hyperplasia after Angioplasty
 第 76 回日本循環器学会学術集会、2012 年 3 月 18 日、福岡
- ⑤ 小川弘子、三好亨、土井正行、廣畑聡、草地省蔵、小出典男
 発作性心房細動の出現率に対する arterial stiffness 増加の影響
 第 58 回日本臨床検査医学会、2011 年 11

月 19 日、岡山

- ⑥ 小川弘子、三好亨、土井正行、廣畑聡、
草地省蔵、小出典男
虚血性心疾患患者による CAVI と冠動脈
硬化、左心機能の関連性の検討
第 58 回日本臨床検査医学会、2011 年 11
月 19 日、岡山
- ⑦ 三好亨、土井正行、小川弘子、廣畑聡、
草地省蔵、小出典男、伊藤浩
ARB 内服中高血圧患者に対するカルシ
ウム拮抗薬もしくは利尿剤の追加が
Augment index へ与える影響
第 58 回日本臨床検査医学会、2011 年 11
月 19 日、岡山
- ⑧ 小川弘子、大丸奈月、中津高明、泉礼司、
間島圭一、土岐美沙子、小林亜紗子、廣
畑聡、池田敏、草地省蔵
非糖尿病性未治療高血圧患者における
UACR の分布と high-normal の頻度
第 58 回日本臨床検査医学会 2011 年 11
月 18 日、岡山
- ⑨ 廣畑聡、小比賀真就、幡中邦彦、小川弘
子、三好亨、石井裕子、坂本かおり、草
地省蔵、伊藤浩、二宮善文
急性冠症候群患者における血清
ADAMTS-1 レベルの上昇
第 58 回日本臨床検査医学会、2011 年 11
月 18 日、岡山
- ⑩ Hiroko Ogawa, Tomoko Yonezawa,
Masataka Sata, Satoshi Hirohata,
Toshitaka Oohashi, Shozo Kusachi,
Norio Koide, Yoshifumi Ninomiya
The role of $\alpha 556$ chains of Type IV
Collagen In Restenosis After
Angioplasty.
第 43 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、
2011 年 7 月 16 日、札幌
- ⑪ Natsuki Ohmaru, HIroko Ogawa,
Toshitaka Oohashi, Rauch Uwe,
Yoshifumi NIinomiya, Shozo Kusachi

Neurocan-GFP, a novel probe for
hyaluronan in atherosclerotic
plaques.

第 43 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、
2011 年 7 月 16 日、札幌

- ⑫ Satoshi Hirohata, Cilek Mehmet,
Masanari Obika, Hiroko Ogawa,
Hatipoglu Faruk, Toru MIyoshi, Shozo
Kusachi, Yoshifumi NIinomiya
Endothelial cell-specific Early
Immediate Response Gene Expression
in Hypoxia.
第 43 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、
2011 年 7 月 15 日、札幌

[その他]

ホームページ等

<http://okayama-u-sougounaika.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 弘子 (OGAWA HIROKO)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：70423283

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし