

## 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5月20日現在

機関番号：17102  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790861  
 研究課題名（和文） **単球M1/M2分化制御による大動脈瘤進展・破裂に対する新しいナノ治療法の研究開発**  
 研究課題名（英文） Development of Novel Nano-medicine for Aortic Aneurysm regulating Monocyte/Macrophage M1/M2 Polarity  
 研究代表者  
 的場 哲哉（MATOBA TETSUYA）  
 九州大学・大学病院・講師  
 研究者番号：20448426

## 研究成果の概要（和文）：

申請者は ApoE 欠損マウスを用いた大動脈瘤モデルを用いて、大動脈瘤の進展における炎症性 Ly6C<sup>high</sup> 単球/マクロファージの役割を確認し、ナノ粒子を用いた末梢血単球へのスタチンの送達により、炎症性単球の動員を抑制し、大動脈瘤の進展を抑制が可能である事を示した。

## 研究成果の概要（英文）：

The applicant showed the role of inflammatory Ly6C<sup>high</sup> monocytes/macrophages in the development of abdominal aneurysm, and showed that nanoparticle-mediated delivery of a statin into circulation monocyte inhibited the recruitment of inflammatory monocytes and the development of abdominal aneurysm in an ApoE-deficient mouse model.

## 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	3,300,000	990,000	4,290,000

## 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：分子血管病態学、大動脈瘤、マクロファージ、ナノ医療

## 1. 研究開始当初の背景

## 【本邦の動脈硬化性疾患と大動脈瘤】

我が国は超高齢化社会を迎え、動脈硬化性疾患（心筋梗塞、脳卒中、末梢動脈疾患など）が死因の約 1/3 を占めるに至っている（平成 21 年、厚生労働省人口動態統計）。その中でも大動脈瘤は、50 歳以上の男性の 4～8%、女性の 1% に生じ、破裂に至れば 50% の患者が病院到着前に死亡し、周術期死亡と合わせて 80～90% の総死亡となる、極めて予後不

良の疾患である。

現行の内科的治療（スタチンおよび ACE 阻害薬など）では、大動脈瘤進展・破裂の予防効果は無い。破裂のリスクが高い大動脈瘤患者に対してステントグラフト留置術が低侵襲医療として導入され、その効果が期待されているが、大動脈瘤の拡大そのものは防止できない、晩期合併症（malapposition）により生活の質（QOL）が低下する、ことが問題となっており、根治的治療法とはなり得て

いない。従って、大動脈瘤の進展・破裂の機序に即した革新的低侵襲治療法の研究開発は未解決 (unmet needs) の医学的課題である。

### 【大動脈瘤進展・破裂の病態における炎症と炎症性 M1 マクロファージの役割】

申請者の研究グループは、ApoE 欠損モデルマウスの大動脈瘤モデルを用いて、その発生において MCP-1/CCR2 経路を介する炎症性 M1 マクロファージが必須の役割を果たすことを明らかにした (Ishibashi M, Circ Res 2004, Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005)。しかし、大動脈瘤の進展・破裂の病態における炎症性 M1 および抗炎症性 M2 マクロファージの役割は不明である。

### 【大動脈瘤治療標的としての単球/マクロファージ M1/M2 分化制御】

M1 マクロファージへの分化は、酸化 LDL や TLR の活性化を介した NF- $\kappa$ B の活性化で制御される。一方、PPAR $\gamma$  活性化などにより、抗炎症性 M2 マクロファージへの分化が誘導される。M2 マクロファージは創傷治癒型マクロファージとも称され、抗炎症性サイトカインや TGF- $\beta$  を代表とする線維化シグナルを活性化する。

すなわち、単球の炎症性 M1 への分化を抑制し、抗炎症性 M2 への分化を誘導することにより、炎症およびマトリックスの新生/分解バランスを改善し、大動脈瘤の進展・破裂を予防できる可能性がある。

### 【単球選択的ナノ DDS】

単球/マクロファージ分化制御のための治療介入を実現するために、申請者らはポリ酪酸グリコール酸 (PLGA) ナノ粒子 (粒子径 160-200nm) を開発した。この PLGA ナノ粒子は、培養マクロファージに速やかに貪食され、透過型電子顕微鏡ではファゴソーム内で観察される。

本ナノ粒子のマウス静脈内投与後のフローサイトメトリ解析では、FITC 封入ナノ粒子取り込み細胞の 99% が単球マーカーである CD11b 陽性であり、末梢血中における単球選択性が示された。

これらの研究成果を基盤にして、申請者は単球/マクロファージの M1/M2 フェノタイプ分化制御により、大動脈瘤の進展および破裂を

予防出来るという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、独自の単球選択性ナノ DDS を駆使して単球/マクロファージの M1/M2 フェノタイプ分化制御を誘導することによって大動脈瘤の進展・破裂を予防する全く新しい治療法の研究開発を行い、動脈硬化性疾患に対する「世界標準」ナノ医療の創出の基盤とすることであった。

具体的には「単球/マクロファージの M1/M2 フェノタイプ分化制御により、大動脈瘤の進展および破裂を予防出来る」という仮説を、以下の項目において検証した。

- 1) 大動脈瘤モデルマウスの単球形質の検討
- 2) ナノ DDS の大動脈動脈硬化巣、大動脈瘤病変への送達
- 3) 単球選択的ナノ DDS によるマクロファージ分化制御の検討
- 4) 単球選択的ナノ DDS による大動脈瘤進展予防効果の検討

## 3. 研究の方法

### A. 単球選択的ナノ DDS によるマクロファージ M1/M2 分化制御の実証

予備検討において、PPAR $\gamma$  アゴニストであるピオグリタゾン封入ナノ粒子を ApoE 欠損マウスに静注し、3 日後に腹腔内マクロファージの遺伝子発現変化を PCR Array を用いて検討した。既知の PPAR- $\gamma$  標的遺伝子である ATP-binding cassette A1 (ABCA1) の発現誘導とともに、MCP-1/CCL-2、RANTES/CCL-5、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  など炎症性サイトカインの発現抑制、IL-4 など抗炎症性サイトカインの発現誘導を認め、これらの遺伝子発現パターンの変化は、ピオグリタゾン封入ナノ粒子による抗炎症性 M2 マクロファージへの分化誘導を示唆している。

これらの遺伝子発現変化が実際にマクロファージの機能 (サイトカイン産生能、遊走能、脂質貪食能など) を制御するか、培養上清の ELISA、Boyden chamber assay、脂肪染色などの ex vivo 解析を行う。

### B. ナノ DDS の大動脈動脈硬化巣、大動脈瘤病変への送達

高脂肪食を負荷した ApoE 欠損マウスは、大

動脈およびその分枝に動脈硬化を形成する。予備検討において、FITC 封入ナノ粒子を静脈注射 24 時間後の可視光および蛍光下の大動脈イメージ、およびその組織像から、PLGA ナノ粒子の大動脈動脈硬化病変への送達を認めた。

ナノ DDS 静脈注射後の全身臓器への分布の検討を行う。ナノ粒子化ヨード系造影剤 (N1177) は、PLGA ナノ粒子同様に末梢血単球に貪食され、CT による単球/マクロファージのイメージングに利用できることが知られている (Hyafil, Nature Med 2007)。

#### C. マクロファージ分化制御による大動脈瘤進展の予防、大動脈瘤退縮効果の検討

上述の検討から、単球選択的ナノ DDS による治療因子の導入により、末梢血単球の炎症性 M1 マクロファージへの分化を抑制し、抗炎症性 (創傷治癒性) M2 マクロファージへの分化を誘導する。これらの単球/マクロファージが実際に動脈硬化巣/大動脈瘤病変に遊走することにより、1) 炎症の消退、2) 細胞外マトリックス分解抑制および線維素の新生が得られ、大動脈瘤進展の予防および大動脈瘤退縮効果も得られるか検討する。

ピオグリタゾン封入ナノ粒子の経静脈投与による大動脈瘤進展抑制効果および大動脈瘤退縮効果を以下の項目で検討する。

1) 大動脈組織における遺伝子発現変化  
大動脈瘤形成前、後、破裂動脈瘤組織 (右図参照) より RNA を抽出し、PCR array により検討する。

2) 大動脈 (瘤) 組織の病理学的検討  
サイトカイン発現、マクロファージ浸潤、線維素、活性化 MMP 染色。

#### 4. 研究成果

##### 1) 大動脈瘤モデルマウスの単球形質の検討

高脂肪食 8 週間およびアンジオテンシン II 持続注入 4 週間で負荷した ApoE 欠損マウスは、腹部大動脈瘤、および大動脈分枝に動脈硬化病変を形成した。その間、末梢血白血球のフローサイトメトリーでは、炎症性活性化マーカー Ly6C 陽性単球の増加を認めた。

##### 2) ナノ DDS の大動脈動脈硬化巣、大動脈瘤病変への送達

FITC を封入した PLGA ナノ粒子 (径

150-200nm) 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 (+) Ly6G (-) の単球および CD11b (+) Ly6G (+) 好中球選択的に FITC の取り込みを認めた。FITC 封入ナノ粒子および FITC を静脈注射 24 時間後、動脈硬化病変組織像では、病変マクロファージに FITC 蛍光を認め、PLGA ナノ粒子は大動脈動脈硬化/大動脈瘤に対する薬剤キャリアになりうる事が示唆された。

##### 3) 単球選択的ナノ DDS によるマクロファージ分化制御の検討

PPAR $\gamma$  アゴニストであるピオグリタゾンを封入したナノ粒子を ApoE 欠損マウスに投与する事により、腹腔内マクロファージの遺伝子発現パターンは、ピオ抗炎症性 M2 マクロファージ優位に変化した (MCP-1/CCL-2、RANTES/CCL-5、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  の発現抑制、IL-4 の発現誘導)。また、ピタバスタチン封入ナノ粒子を投与する事により、末梢血において、同様に Ly6C 陽性炎症性単球の抑制を認めた。

##### 4) 単球選択的ナノ DDS による大動脈瘤進展予防効果の検討

ApoE 欠損マウスに高脂肪食を 8 週間、AngII を 4 週間負荷した腹部大動脈瘤モデルマウスの大動脈瘤病変では、MCP-1 発現、マクロファージ浸潤による炎症、MMP 活性化と細胞外マトリックス (Elastin) 分解による血管リモデリングを認める。

上記大動脈瘤モデルマウスにおいて、ピタバスタチンナノ粒子は大動脈径増大を抑制し、形態学的大動脈瘤の形成 (elastin 層の断裂、血腫の形成) を抑制した。

以上の検討から PLGA ナノ粒子が炎症性単球の動員を制御し、大動脈瘤進展予防を得るための DDS として有用である事が示された。この DDS 技術は、動脈硬化性疾患に対する「世界標準」ナノ医療の創出の基盤として他の動脈硬化性疾患へ応用し得る。

#### 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)

[学会発表] (計 1 件)

- ① Katsuki S, Matoba T (2 番目), 他 5 名 :  
Nanoparticle-Mediated  
Monocyte-Selective Delivery of  
Pitavastatin Prevents Abdominal  
Aortic Aneurysm Formation in  
ApoE-Deficient Mice、第 43 回日本動脈  
硬化学会総会・学術集会 (2011 年 7 月  
15 日、ロイトン札幌)

[図書] (計 1 件)

- ① 香月俊輔、的場哲哉、江頭健輔：ナノ粒  
子を用いた新規 **Drug Delivery System**  
(DDS)によるプラーク不安定化，破綻治  
療． **Heart View** メジカルビュー社  
2013 ; 17(4) : 76(408)-84(416)

[その他]

ホームページ等

[http://www.med.kyushu-u.ac.jp/cardiol/1\\_sentaniryō/staff/index2.html](http://www.med.kyushu-u.ac.jp/cardiol/1_sentaniryō/staff/index2.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

的場 哲哉 (MATOBA TETSUYA)  
九州大学・大学病院・講師  
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：