

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19384

研究課題名(和文) PPAR を標的とするプラーク破綻に対する革新的ナノ医療の研究開発

研究課題名(英文) PPAR $\gamma$ -targeting Nanomedicine for the Treatment of Atherosclerotic Plaque Rupture

研究代表者

古賀 純一郎 (Junchiro, Koga)

九州大学・循環器病未来医療研究センター・学術研究員

研究者番号：10746142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではナノ技術を応用したPPAR アゴニストの単球・マクロファージへの効率的送達によりプラーク破綻を予防しうるか検討を行った。ポリ乳酸グリコール酸共重合体を基材としたナノ粒子にピオグリタゾン(PIO)を封入し高脂肪食及びアンジオテンシン Ⅱ負荷を行ったApoE欠損マウスに静脈内投与した結果、プラーク破綻後に形成されるburied fibrous cap数の減少、線維性被膜の増厚を認めた。近赤外線プローブを用いた分子イメージングの結果、ピオグリタゾンナノ粒子によりMMPならびにカテプシンの活性が抑制されることが示され、ピオグリタゾンナノ粒子がプラーク破綻を予防する機序のひとつと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Objective Inflammatory monocytes/macrophages produce various proteinases and induce rupture of atherosclerotic plaques. We have tested a hypothesis that nanoparticle-mediated delivery of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist pioglitazone to monocytes/macrophages inhibits plaque ruptures.  
Approach and Results Poly(lactic-co-glycolic-acid) nanoparticles (NPs) were prepared for targeting delivery to monocytes/macrophages. Weekly intravenous administration of pioglitazone-NPs decreased buried fibrous caps, suggesting healed ruptures, in the brachiocephalic arteries of ApoE $^{-/-}$  mice with a high-fat diet and angiotensin II infusion. Pioglitazone-NPs also inhibited the activity of proteases and decreased expression of inflammatory cytokines in macrophages.  
Conclusions Nanoparticle-mediated delivery of pioglitazone inhibited macrophage activation and plaque ruptures in ApoE $^{-/-}$  mice. These results demonstrate a promising strategy to prevent atherosclerotic plaque ruptures.

研究分野：循環器内科学

キーワード：分子血管学 動脈硬化 ナノメディスン

### 1. 研究開始当初の背景

我が国は未曾有の高齢化社会を迎え、動脈硬化性疾患による死亡者数は増加の一途を辿っている(平成26年、厚生労働省人口動態統計)。申請者はこれまで動脈硬化性疾患の機序解明に係る一連の研究を通じ、アンジオテンシン や血管内皮成長因子(VEGF; vascular endothelial growth factor)が単球・マクロファージを介する炎症を介し動脈硬化の病態を促進することを報告してきた(Koga J et al. *Hypertens Res* 2008, Koga J et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009)。特に代表的な単球走化因子MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1)に着目し、MCP-1受容体CCR2(C-C chemokine receptor-2)を発現する活性化単球・マクロファージが動脈硬化プラーク破綻を引き起こすことを明らかにした(Katsuki S, Koga J et al. *Circulation.* 2014)。

以上の結果は単球・マクロファージが動脈硬化性疾患の予防・治療における標的細胞となりうることを示すものである。特に動脈硬化プラークの破綻は引き続く血栓形成を引き起こし、心筋梗塞を含む致死性心血管イベントの一因となることから、単球・マクロファージ活性化の制御によるプラーク破綻予防が可能となれば生命予後を改善する革新的治療となることが期待される。そこで、申請者は抗炎症作用を有するPPAR<sub>γ</sub>(peroxisome proliferator-activated receptor-γ)アゴニストによる単球・マクロファージ活性化制御はプラーク破綻を予防するとの仮説を立てた。

しかし、実際には臨床で使用される用量のPPAR<sub>γ</sub>アゴニストは浮腫に代表される副作用のため循環器領域では使用しにくいことが多い。そこで我々が独自に開発したナノ技術を基盤とした薬剤送達システム(ナノDDS)を用い少量のPPAR<sub>γ</sub>アゴニストによる副作用を回避可能な新規治療の開発を試みた。これまで実際に臨床応用された炎症を標的とする抗動脈硬化治療は皆無であり、本システムによるプラーク破綻の予防が可能となれば動脈硬化性疾患の診療におけるイノベーションとなることが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究において我々は独自に開発したナノ技術を基盤とする薬剤送達システムを用い、PPAR<sub>γ</sub>アゴニストの単球・マクロファージへの効率的な送達をプラーク破綻を予防するかが明らかにする。具体的な目的は以下の通りである。

- (1). 生体吸収性ナノ粒子による単球・マクロファージへの選択的な薬剤送達を確認する。
- (2). ナノ粒子によるPPAR<sub>γ</sub>アゴニストの送達によりプラーク破綻が抑制されるか明らかにする。

- (3). プラーク破綻の抑制が可能であればPPAR<sub>γ</sub>活性化による単球・マクロファージの機能変化とその詳細な分子機序を明らかにする。

### 3. 研究の方法

- (1). ピオグリタゾン封入PLGAナノ粒子の作成: PLGA(乳酸・グリコール酸共重合体; poly-lactic co-glycolic acid)ナノ粒子は水中エマルジョン溶媒拡散法により作成した。PLGAナノ粒子の平均粒子径は247 nmであった。
- (2). ピオグリタゾン封入ナノ粒子の体内動態解析: PLGAナノ粒子投与後の体内動態を明らかにするため蛍光マーカー封入ナノ粒子を作成した。
- (3). 高脂血症マウスにおけるプラーク破綻抑制効果の検証: 申請者が作成したプラーク破綻モデルマウス(Katsuki S, Koga J et al. *Circulation.* 2014)を用いピオグリタゾンナノ粒子のプラーク破綻抑制効果を明らかにする。
- (4). ピオグリタゾンナノ粒子による単球・マクロファージ活性化制御機構の解明: ピオグリタゾンナノ粒子によるプラーク破綻抑制効果が明らかになれば、本ナノ粒子の単球・マクロファージへの作用を明らかにするため、末梢血中のLy-6Cを高発現する炎症性単球数をフローサイトメトリーにて評価する。また、培養マクロファージを用い炎症性マクロファージ関連分子(IL-1, iNOS等)の発現、炎症性マクロファージへの分化に関わるSTAT1、STAT6のリン酸化状態をreal-time PCR、western blottingで評価する。
- (5). PPAR<sub>γ</sub>活性化によるMMP活性抑制機序の解明: MMP(Matrix metalloproteinase)はコラーゲンを含む細胞外基質を分解しプラークの脆弱化を惹起する。申請者はピオグリタゾンナノ粒子がマクロファージMMP活性に与える影響を分子イメージング、ザイモグラフィの手法を用い明らかにする。

### 4. 研究成果

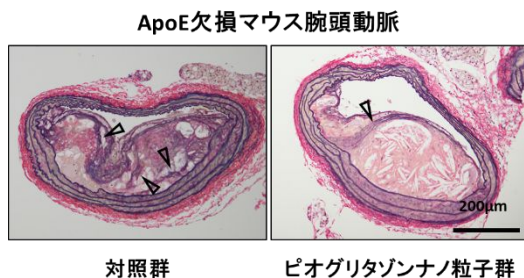
- (1). PLGAナノ粒子は静脈内投与後、末梢血単球ならびにプラークマクロファージへ送達される: 蛍光マーカーFITC (fluorescein isothiocyanate)を封入するPLGAナノ粒子を作成し、8週間の高脂肪食負荷、4週間のアンジオテンシン投与を行ったApoE欠損マウスの尾静脈より血管内投与した。末梢血のフローサイトメトリーでは好中球、リンパ球に比べ単球への蛍光集積を認め(蛍光陽性率30.4%, 15.8% vs. 37.9%)、大動脈より単離した血球細胞においてはよりマクロファージ選択的に蛍光マーカーの集積を認めた(5.65%, 5.81% vs. 37.8%)。

大動脈壁への蛍光マーカー集積は7日間にわたり認められた。また、FITC 単独の投与では末梢血単球への集積はわずかに認められたが血管壁への集積は認めなかった。

次にピオグリタゾンナノ粒子の組織分布を明らかにするためピオグリタゾン封入ナノ粒子の血管内投与後、各組織におけるピオグリタゾン組織濃度を測定した。血清ピオグリタゾン濃度は投与後2時間後にピークに達し各臓器間の比較においては投与48時間後の時点で脾臓や腎臓に比べ大動脈においてピオグリタゾン組織濃度が高値であった。

(2). ピオグリタゾンナノ粒子の血管内投与は末梢血単球の抗炎症性・修復性マクロファージへの分化を促進する：血管内へ投与されたピオグリタゾンナノ粒子が単球活性化に及ぼす影響を明らかにするためフローサイトメトリーによる解析を行った。ピオグリタゾンナノ粒子単回投与48時間後の末梢血において炎症性単球マーカーLy-6Cを高発現する単球の割合が対照群に比べ有意に減少した。総単球数は変化なく、Ly-6C高発現単球の割合が減少したことからピオグリタゾンナノ粒子が抗炎症性・修復性単球への分化を促進したことが示唆された。

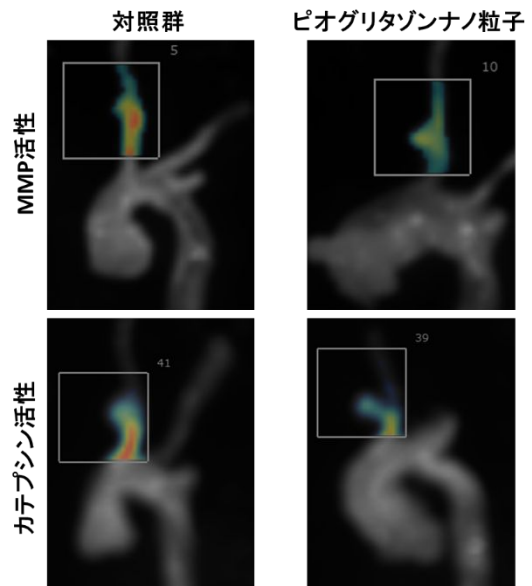
(3). ピオグリタゾンナノ粒子はApoE欠損マウスの腕頭動脈においてプラーク破綻に関連する病理組織像を改善した：ApoE欠損マウスに高脂肪食負荷ならびにアンジオテンシン投与を行うと、プラーク内出血や線維性被膜の断裂を含むヒト冠動脈のプラーク破綻部位に特徴的な所見に類似した病理像が腕頭動脈において観察される(Katski S, Koga J et al. *Circulation*. 2014)。本マウスにおいてピオグリタゾンナノ粒子を週1回(7 mg/kg/injection)、4週間投与した結果、プラーク破綻後に形成されるburied fibrous cap数の減少を認め(下図)、線維性被膜厚の増加を認めた。ナノ粒子化していないピオグリタゾン単独の連日経口投与では効果は認めなかった。ピオグリタゾンナノ粒子投与群においてはマクロファージの集積自体は対照群、ピオグリタゾン経口投与群と著変なかった。PPARアンタゴニストGW9662を



同時投与するとピオグリタゾンナノ粒子の効果が消失することからピオグリタゾンナノ粒子の作用はPPAR経路を介し発揮されたと考えられた。

(4). ピオグリタゾンナノ粒子は腕頭動脈プラークにおいてプロテアーゼ活性を抑制する：以上の結果はピオグリタゾンナノ粒子がマクロファージ集積を抑制するよりも集積したマクロファージ機能を修飾することで作用を発揮することを示唆するものと考えられた。プラーク内のマクロファージはMMPやカテプシンを代表とするプロテアーゼを放出し細胞外基質の分解を促進する。ピオグリタゾンナノ粒子がこれらプロテアーゼ活性を抑制するか否か明らかにするため、近赤外線プローブを用いた分子イメージングを行った。その結果、下図に示す通り、ピオグリタゾンナノ粒子はマウス腕頭動脈のMMP活性ならびにカテプシン活性を抑制した。

次に大動脈より単離したマクロファ



ージの遺伝子発現について検証した。ピオグリタゾンナノ粒子は抗炎症性・修復性マクロファージ関連分子であるarginase-1やinterleukin-10(IL-10)の発現を増加させた。一方、IL-6やMMP-9、MMP誘導蛋白EMMPRIN(extracellular MMP inducer)の発現はピオグリタゾンナノ粒子により減少した。

ピオグリタゾンナノ粒子によるPPAR $\gamma$ 経路の活性化がマクロファージ活性化を制御するか否かについて、チオグリコレート誘導性腹膜炎モデルマウスより単離した腹腔内マクロファージにおいても検討した。PCRアレイによる遺伝子発現プロファイルの解析ではピオグリタゾンナノ粒子はendoglin, KLF2(Krüppel-like Factor 2), ABCA1(ATP-binding cassette transporter A1),

and IL-4 などの抗炎症性・修復性マクロファージ関連分子の発現を増加させた。一方、炎症性マクロファージに関連する IL-1、MCP-1 ならびに RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) は EMMPRIN や MMP と同様、発現抑制を認めた。

- (5). ピオグリタゾンナノ粒子は腎臓 ENaC (Epithelial Na<sup>+</sup> Channel) の発現に影響を及ぼさない: 実臨床においてピオグリタゾン製剤の副作用として腎臓からの Na 吸収亢進に伴う体液貯留、心不全の増悪が知られている。冠動脈疾患を発症する症例の中には心不全を合併する場合も多く、急性血栓性イベントの予防のためにピオグリタゾンナノ粒子製剤を使用するにあたり、これら副作用の出現が懸念される。一方、ナノ粒子化に伴う薬剤の体内動態の変化により副作用を回避することができれば本製剤の適応拡大につながることを期待される。故に、ピオグリタゾンナノ粒子が腎臓の ENaC 発現に及ぼす影響について検討した。その結果、ピオグリタゾン単独の 4 週間経口投与では ENaC ならびに ENaC の発現増加を認めた一方、ナノ粒子化ピオグリタゾンではこれら ENaC の発現には有意な影響は与えなかった。

#### 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9件)

Nakano Y, Matoba T, Tokutome M, Funamoto D, Katsuki S, Ikeda G, Nagaoka K, Ishikita A, Nakano K, Koga J, Sunagawa K, Egashira K, Nanoparticle-Mediated Delivery of Irbesartan Induces Cardioprotection from Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Antagonizing Monocyte-Mediated Inflammation., *Sci Rep.*, 査読有、6、2016、29601、DOI: 10.1038/srep29601.

Ishikita A, Matoba T, Ikeda G, Koga J, Mao Y, Nakano K, Takeuchi O, Sadoshima J, Egashira K, Nanoparticle-Mediated Delivery of Mitochondrial Division Inhibitor 1 to the Myocardium Protects the Heart From Ischemia-Reperfusion Injury Through Inhibition of Mitochondria Outer Membrane Permeabilization: A New Therapeutic Modality for Acute Myocardial Infarction., *J Am Heart Assoc.*, 査読有、5(7)、2016、e003872、DOI: 10.1161/JAHA.116.003872.

Ichimura K, Matoba T, Nakano K, Tokutome M, Honda K, Koga J, Egashira K, A Translational Study of a New Therapeutic Approach for Acute Myocardial Infarction: Nanoparticle-Mediated Delivery of Pitavastatin into Reperfused Myocardium Reduces Ischemia-Reperfusion Injury in a Preclinical Porcine Model., *PLoS One.*, 査読有、11(9)、2016、e0162425、DOI: 10.1371/journal.pone.0162425. eCollection 2016.

Tanaka S, Matsumoto T, Matsubara Y, Harada Y, Kyuragi R, Koga J, Egashira K, Nakashima Y, Yonemitsu Y, Maehara Y, BubR1 Insufficiency Results in Decreased Macrophage Proliferation and Attenuated Atherogenesis in Apolipoprotein E-Deficient Mice., *J Am Heart Assoc.*, 査読有、5(9)、2016、e004081、DOI:なし

Mao Y, Koga J, Tokutome M, Matoba T, Ikeda G, Nakano K, Egashira K, Nanoparticle-mediated delivery of pitavastatin to monocytes/macrophages inhibits left ventricular remodeling after acute myocardial infarction by inhibiting monocyte-mediated inflammation., *Int Heart J.*, 査読有、印刷中、2016、DOI:なし

Nakano T, Fukuda D, Koga J, Aikawa M, Delta-Like Ligand 4-Notch Signaling in Macrophage Activation., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 査読有、36(10)、2016、2038-2047、DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.306926.

Nakashiro S, Matoba T, Umezu R, Koga J, Tokutome M, Katsuki S, Nakano K, Sunagawa K, Egashira K, Pioglitazone-Incorporated Nanoparticles Prevent Plaque Destabilization and Rupture by Regulating Monocyte/Macrophage Differentiation in ApoE<sup>-/-</sup> Mice., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 査読有、36(3)、2016、491-500、DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.307057.

Koga J, Matoba T, Egashira K, Anti-inflammatory Nanoparticle for Prevention of Atherosclerotic Vascular Diseases., *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis.*, 査読有、23(7)、757-765、DOI: 10.5551/jat.35113.

の場哲哉、古賀純一郎、中野覚、江頭健

輔、冠動脈疾患に対するナノ粒子・ドラッグデリバリーシステムの開発、Drug Delivery System、査読無、30(4)、299-308、DOI:なし

〔学会発表〕(計4件)

Koga J, Umezumi R, Egashira K, Macrophage Dynamin-related Protein1 Promotes Neointima Formation after Mechanical Injury in Mouse Femoral Arteries.、第5回 IRG (Inflammation and ReGeneration) Meeting、2017年01月06日~07日、品川プリンスホテル(東京都・港区)

Koga J, Umezumi R, Wang L, Nomura M, Egashira K, Macrophage Dynamin-related Protein1 Promotes Neointima Formation after Mechanical Injury in Mouse Femoral Arteries.、第24回 日本血管生物医学会学術集会、2016年12月08日~10日、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

Umezumi R, Koga J, Wang L, Nomura M, Egashira K, Macrophage Dynamin-related Protein1 Promotes Neointima Formation after Mechanical Injury in Mouse Femoral Arteries.、19th International Vascular Biology Meeting 2016、2016年10月30日~11月03日、ボストン(アメリカ)

Koga J、Nanotechnology-based anti-atherosclerotic therapy targeting monocytes-mediated inflammation.、The 13th. Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology. (招待講演) 2015年10月16日、釜山(韓国)

〔図書〕(計1件)

Nakano K, Koga J, Egashira K, Therapeutic Angiogenesis.、Nanoparticle-mediated Endothelial Cell-selective Drug Delivery System.、2017、印刷中

〔その他〕

ホームページ等

<http://cdic.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

古賀 純一郎 (KOGA, Junichiro)

九州大学・循環器病未来医療研究センター・循環器病先端医療研究開発学部門・学術研究員

研究者番号：10746142