

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790734

研究課題名 (和文) マクロファージ分化スイッチ制御による粥状動脈硬化プラーク破綻予防療法の研究開発

研究課題名 (英文) Development of new therapy to prevent plaque destabilization and rupture by regulating macrophage polarity

研究代表者

的場 哲哉 (MATOBA TETSUYA)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20448426

研究成果の概要 (和文)：

急性冠症候群の原因病態である動脈硬化プラーク不安定化と破綻には活性化 (M1) マクロファージが関与している。マクロファージ活性化形質の制御によりプラーク破綻が予防できると仮説し、マウスモデルにおいて検討を行った。PPAR-gamma アゴニストの単球選択的投与により、マクロファージの M1 分化を抑制し、ApoE-KO マウスにおけるプラーク破綻を予防する事ができ、新規治療のコンセプトを証明することができた。

研究成果の概要 (英文)：

Activated (M1) macrophage plays a primary role in atherosclerotic plaque destabilization and rupture. The author hypothesized that regulating macrophage M1/M2 polarity toward anti-inflammatory M2 enable to prevent atherosclerotic plaque destabilization and rupture. In ApoE-KO mice, nanoparticle-mediated monocyte-selective treatment with PPAR-gamma agonist inhibited macrophage M1 shift, and reduced incidence of plaque rupture in the brachiocephalic arteries. These results proved the concept of a new therapy for preventing plaque rupture, by regulating macrophage polarity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、プラーク破綻、マクロファージ、ナノ粒子

## 1. 研究開始当初の背景

薬剤溶出ステントを用いた経皮的冠動脈インターベンションは再狭窄を抑制したが急性冠症候群 (ACS) の防止効果はなく、安定狭心症患者の予後改善には無力である (Kastrati, NEJM 2007)。故に ACS の主因であるプラーク破綻を効果的に予防する新規

治療の研究開発は動脈硬化に基づく心血管病克服のための重要な課題である。

動脈硬化の分子機序において活性化 (M1) マクロファージの重要性が示されていることから、単球を標的としたマクロファージ分化スイッチ (M1/M2 polarity) 制御による新規治療法探索は適切なアプローチである。

## 2. 研究の目的

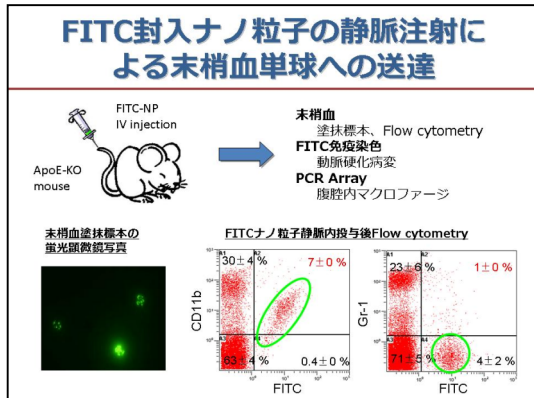
マクロファージ分化スイッチ (M1/M2 polarity) の制御により、動脈硬化の進展およびプラーク不安定化・破綻を予防出来るという仮説を立てた。マクロファージ分化スイッチ制御に有効な治療因子を単球選択性ナノ DDS を用いて単球選択的に送達することにより、低侵襲・高効果の新規プラーク不安定化・破綻の予防療法を研究開発し臨床応用への基盤とすることを本研究課題の目的とした。

具体的には以下の4つを目的とした。

- 1) 単球選択的ナノ DDS の生体内動態の検証
- 2) 単球選択的ナノ DDS によるマクロファージ分化スイッチ制御の検証
- 3) プラーク破綻が再現性良く生じるマウスモデルの確立
- 4) マクロファージ分化スイッチ制御によるプラーク不安定化・破綻の予防

## 3. 研究の方法および、4. 研究成果

1) 単球選択的ナノ DDS の生体内動態: まず、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。動脈硬化モデルである ApoE-KO マウスに FITC 蛍光色素を封入したナノ DDS を静注し、末梢血白血球および各種臓器を観察した。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)。

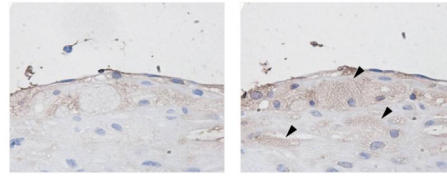


さらに、上記プラーク破綻モデルマウスにおいて、FITC 封入ナノ粒子の静脈注射後 48 時間のプラーク標本では、FITC の免疫染色陽性を認め、静注された PLGA ナノ粒子が、単球選択的に送達され、動脈硬化プラークへも分布することが示された (右上図)。

## FITCナノ粒子のプラーク内マクロファージへの送達

Negative control

FITC-immunostaining



Serial sections of brachiocephalic artery from ApoE-deficient mice one day after FITC-NP injection

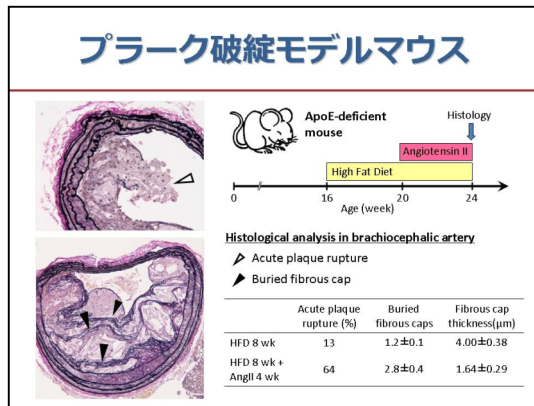
2) マクロファージ分化スイッチ制御: マウス腹腔マクロファージを培養し、PPAR- $\gamma$  アゴニストであるピオグリタゾン封入ナノ粒子を投与による、各種サイトカイン、接着因子、MMP、TIMP を含む遺伝子群の発現プロファイリングを PCR アレイおよびプロテインアレイにより検討したところ、既知の PPAR $\gamma$  制御を受ける遺伝子である ABCA1 の活性化とともに、M1 マクロファージで認められる MCP-1、RANTES などの遺伝子が抑制的に制御されることが明らかになった (下図)。

## ピオグリタゾンナノ粒子によるマクロファージ遺伝子発現制御

Up-regulated Genes	Fold	Down-regulated Genes	Fold
ATP-binding cassette A1 (ABCA1)	1.91	BH3 interacting domain death agonist	0.53
CD44 antigen	1.80	CCL2/MCP-1	0.44
Endoglin	3.73	CCL5/RANTES	0.21
Kruppel-like factor 2	3.42	Fatty acid binding protein 3	0.52
Prostaglandin-endoperoxide synthase 1	2.81	Neuropeptide Y	0.17
		Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	0.48
		PPAR gamma	0.26
		Superoxide dismutase 1, soluble	0.44
		Secreted phosphoprotein 1	0.15

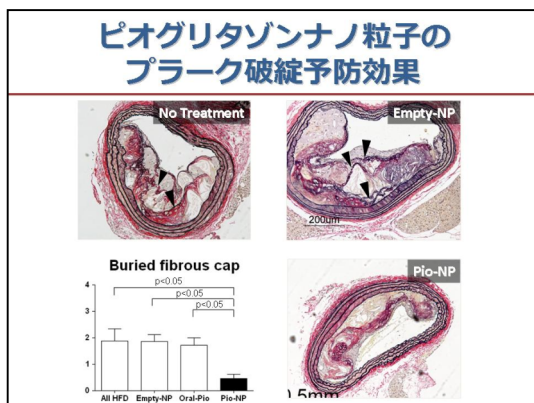
- Abdominal macrophage was collected 3 days after Pio-NP injection
- PCR array (SuperArray Bioscience, Co.) comparison between No Treatment and Pio-NP mice

3) プラーク破綻マウスモデルの作製: 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。病理学的に急性プラーク破綻および埋没した線維性被膜を評価でき、プラーク破綻イベントを定量化できた (次図)。



#### 4) プラーク不安定化・破綻の予防

上記モデルマウスを対照群および治療群に振り分け、治療因子を封入したナノ粒子による、プラーク破綻予防効果を検討した。臨床用量と同等 (1mg/kg/day) の経口ピオグリタゾンではプラーク破綻の予防効果を認めないが、同量のピオグリタゾン封入ナノ粒子の週1回経静脈的投与により、プラーク破綻が抑制された (下図)。



#### 【総括】

以上の結果から、単球選択的ナノDDSを用いたマクロファージ分化スイッチ (M1/M2 polarity) の制御により、粥状動脈硬化の進展およびプラーク破綻を予防するという新規治療戦略のコンセプトが動物モデルにおいて立証された。

#### 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4件)

- ①. Oda S, Nagahama R, Nakano K, Matoba T, Kubo M, Sunagawa K, Tominaga R, Egashira K: Nanoparticle-Mediated

Endothelial Cell-Selective Delivery of Pitavastatin Induces Functional Collateral Arteries (Therapeutic Arteriogenesis) in a Rabbit Model of Chronic Hindlimb Ischemia. *J Vasc Surg.* 査読有、2010; 52(2): 412-420.

- ②. Chen L, Nakano K, Kimura S, Matoba T, Iwata E, Miyagawa M, Tsujimoto H, Nagaoka K, Kishimoto J, Sunagawa K, Egashira K: Nanoparticle-Mediated Delivery of Pitavastatin Into Lungs Ameliorates the Development and Induces Regression of Monocrotaline-Induced Pulmonary Artery Hypertension. *Hypertension.* 査読有、2011; 57(2): 343-350.
- ③. 的場哲哉、江頭健輔: 特集: 急性冠症候群 (ACS) ACSのEBMに基づく薬物療法 スタチン系. 日本臨牀 2010; 68(4): 692-698
- ④. 的場哲哉、古賀純一郎、江頭健輔: プラーク破綻のナノ医療. 分子血管病 先端医学社 2009;10(2): 54(162)-58(166)

[学会発表] (計4件)

- ①. 的場哲哉: 単球選択的ナノDDSによる動脈硬化プラーク破綻治療、第10回 Cardiovascular Frontier Conference (2010年4月3日、東京)
- ②. Tetsuya Matoba, Kaku Nakano, Kenji Sunagawa, Kensuke Egashira: Nanoparticle-Mediated Monocyte-Selective Drug Delivery System for Treatment of Atherosclerotic Cardiovascular Disease、第19回 International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society (2010年9月26日、福岡)
- ③. Tetsuya Matoba, Kensuke Egashira: Nanoparticle-Mediated Monocyte-Selective Drug Delivery System for Treatment of Atherosclerotic Plaque Rupture、第18回日本血管生物医学学会学術集会 (2010年12月1日、大阪)
- ④. 的場哲哉、江頭健輔、古賀純一郎、砂川賢二: マクロファージ分化スイッチ制御による動脈硬化プラーク破綻の予防、第4回 Vascular Biology Innovation Conference (平成21年8月22日、東京)

[その他]  
ホームページ等  
[http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/  
details/K003703/index.html](http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003703/index.html)

## 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：