

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461135

研究課題名(和文) ナノ医薬学融合に基づくPPAR ナノ医薬による難治性心血管病の革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of PPARgamma-activating Nano-Medicine for Cardiovascular Diseases

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： ナノ粒子・ドラッグデリバリーシステム(ナノDDS)技術とPPAR アゴニストの融合によって、心血管病に対する革新的PPAR ナノ医療の橋渡し研究を行った。

動脈硬化性プラーク破綻モデルマウスにおいて、PPAR ナノ医薬(ピオグリタゾン封入ナノ粒子)は動脈硬化性プラークを安定化させ、その作用は末梢血中の炎症性Ly6Chigh単球の減少、大動脈組織のM1マクロファージ減少、M2マクロファージの増加と相関した。

心筋虚血再灌流モデルにおいて、PPAR ナノ医薬の再灌流時静脈内投与は、心臓に浸潤する単球/マクロファージを抑制し、心筋梗塞領域を縮小した。

研究成果の概要(英文)： We carried out translational research projects based on the nanoparticle-mediated drug delivery system and PPAR-gamma agonists to develop a novel Nano-medicine for cardiovascular diseases.

In a mouse model of plaque rupture, PPAR-gamma nano-medicine stabilized atherosclerotic plaques, through a reduction in the number of Ly6C inflammatory monocytes in the peripheral blood and M1 inflammatory macrophage and an increase in M2 macrophage in the aortic tissue.

In a mouse model of myocardial ischemia-reperfusion (IR) injury, PPAR-gamma nano-medicine inhibited monocyte recruitment to IR heart and reduced infarct size.

研究分野：循環器内科学

キーワード：血管生物学 ドラッグデリバリーシステム トランスレーショナルリサーチ 循環器・高血圧

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国は超高齢化社会を迎え、心血管病（虚血性心疾患、大動脈疾患、末梢動脈疾患、脳卒中など）が死因の約 1/3 を占めるに至っており（平成 21 年、厚生労働省人口動態統計）、特に現行の医療では十分に治療効果を得ることが出来ない未解決の難治性心血管病に対する革新的治療法の研究開発は重要な医学的課題である。

(2) 【PPAR γ アゴニストの心血管保護作用】ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体(PPAR) γ アゴニスト作用を有するチアゾリジン誘導体は 2 型糖尿病治療薬として世界的に広く臨床で使用されている。一方、代謝改善・血糖降下作用以外に以下のような心血管保護作用、抗炎症作用が示されている。この様なチアゾリジン誘導体の心血管保護作用を活用して、心血管イベントの抑制効果をもたらすには限界がある。なぜならば、チアゾリジン誘導体の経口投与は体液貯留、心不全等の副作用をもたらすからである。

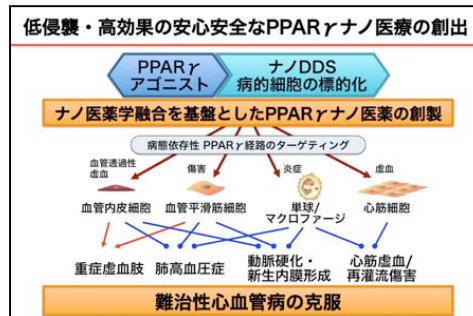
- 血管内皮細胞：内皮型 NO 合成酵素活性化 (Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25:1810)
- 血管平滑筋細胞：増殖抑制 (J Clin Invest 1996;98:1897)、血管弛緩 (Cell Metab 2008;7:215)
- 心筋細胞：低酸素／再灌流による細胞死抑制 (Diabetes Obes Metab 2009;11:1060)
- 単球／マクロファージ：申請者らの研究グループがケモカインレセプター CCR2 発現抑制を示した (Hypertension 2002;40:687)。

(3) 【ナノ DDS による心血管細胞、炎症細胞の標的化】申請者らは高分子ポリマー (PLGA) ナノ粒子を用いたナノ DDS によって、治療因子が病的血管細胞や炎症細胞に選択的に送達されることを明らかにしてきた。ナノ DDS による病的血管細胞選択的標的化技術と PPAR γ アゴニスト作用を融合させることが出来れば標的細胞選択的に PPAR γ 活性化を介した心血管病治療効果を発揮できることから、上記課題を克服できると考えられた。

2. 研究の目的

- (1) 本研究の目的は、申請者らが世界に先駆けて研究開発したナノ DDS 技術と PPAR γ アゴニストの融合によって標的細胞選択的 PPAR γ 活性化を達成し、難治性心血管病に対する革新的 PPAR γ ナノ医薬の研究開発を行うことであった (図)。
- (2) すなわち、PPAR γ アゴニスト封入

PLGA ナノ粒子を作製し、動脈硬化マウスモデル、心筋虚血再灌流マウスモデルを含む、心血管病態モデルにおいて PPAR γ ナノ医薬の有効性を明らかにすることであった。

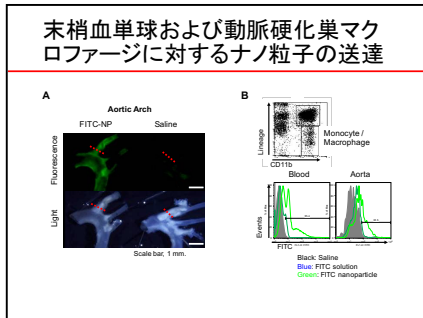


3. 研究の方法

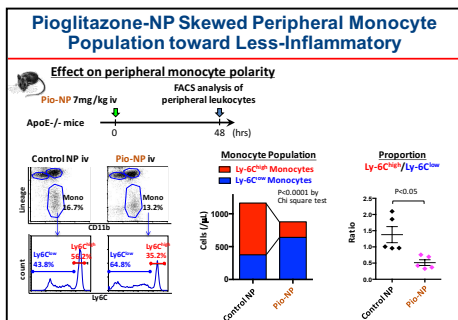
- (1) 【PPAR γ アゴニスト封入 PLGA ナノ粒子の作製】 PPAR γ アゴニストとしてチアゾリジン誘導体ピオグリタゾン、および PPAR γ アゴニスト作用を持つアンギオテンシン受容体拮抗薬であるイルベサルタンを選択し、ポリ乳酸/グリコール酸(PLGA)ナノ粒子に封入した。
- (2) コントロールとして FITC (フルオレセインイソチオシアネート) を封入した PLGA ナノ粒子を作成した。
- (3) 動脈硬化病変の炎症を介したプラークの不安定化は、急性冠症候群の原因となる重要な病態である。炎症性単球/マクロファージは matrix metalloproteinase を含む様々なプロテイナーゼを産生する。そして、活性化されたこれらのプロテイナーゼによる細胞外基質の分解は動脈硬化性プラークの機械的強度を弱め、結果としてプラークの破綻を引き起こす。本研究課題では、ApoE 欠損マウスに高脂肪食とアンギオテンシン II 注入を負荷する動脈硬化性プラーク破綻モデルにおいて、ピオグリタゾン・ナノ粒子の治療効果を検討した。
- (4) 急性心筋梗塞が発症早期に診断された場合、標準治療として冠動脈インターベンションによる早期再灌流療法（プライマリーPCI）が施行される。早期再灌流療法による心筋虚血再灌流は冠動脈血流の再開によって心筋梗塞の拡大を抑制する一方、急激な pH の変化、活性酸素種の産生はミトコンドリア不全、心臓の炎症など複数の機序を介して残存心筋において虚血再灌流傷害を惹起し、早期再灌流療法の梗塞サイズ縮小効果を制限する、克服すべき病態である。本研究課題では、冠動脈の結紮および再灌流による心筋虚血再灌流マウスモデルにおいて、イルベサルタン・ナノ粒子の治療効果を検討した。

4. 研究成果

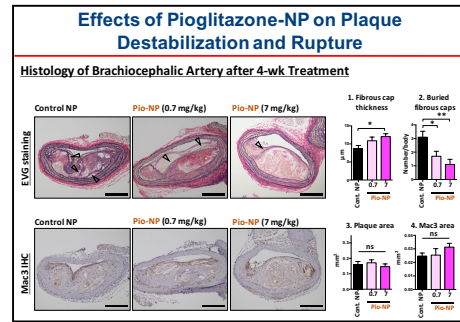
- (1) 【動脈硬化性プラーク破綻モデルにおける検討】動脈硬化性プラーク破綻モデルにおいて FITC ナノ粒子を静脈内投与し、それらが大動脈の動脈硬化病変へ取り込まれること、また、フローサイトメトリーにより、末梢血単球、および大動脈組織マクロファージに取り込まれることを示した (図)。



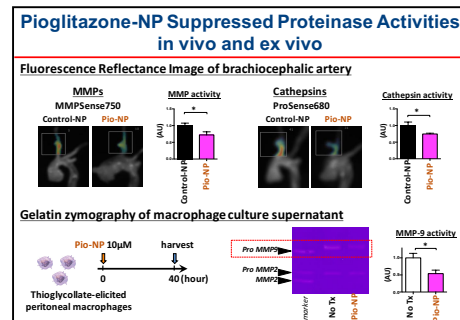
- (2) 次に、末梢血単球ポピュレーションに対するピオグリタゾンナノ粒子の効果を調べた。ピオグリタゾンナノ粒子を静脈内単回投与した2日後のフローサイトメトリーでは、炎症性サブセットである Ly-6C^{high} 単球は有意に減少し、一方で非炎症性の Ly-6C^{low} 単球は若干の増加傾向を示した。単球の総数では変化はなく、末梢血単球の極性 (Ly-6C^{high} 単球 / Ly-6C^{low} 単球) は非炎症性的方向へ有意に変化した (図)。



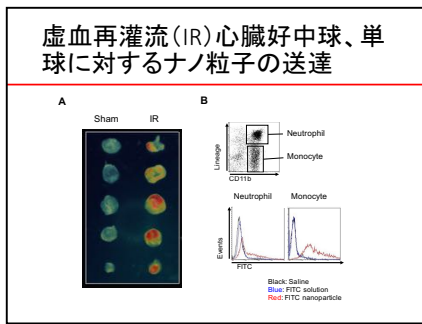
- (3) 動脈硬化性プラーク破綻モデルマウスにおいて、ピオグリタゾンナノ粒子あるいはコントロールナノ粒子の週1回投与を4週間行った後に安楽死させ、組織解析を行った。腕頭動脈の buried fibrous cap の数を数え、プラーク破綻の代理マーカーとした。ピオグリタゾン 1mg/kg の連日経口投与は buried fibrous cap の数、線維性被膜の厚さ、プラーク面積のいずれにも有意な変化をもたらさなかった。これに対して、等用量 (7mg/kg、週1回) のピオグリタゾンナノ粒子投与は有意に buried fibrous cap の数を減少させ、線維性被膜の厚さを増した (図)。



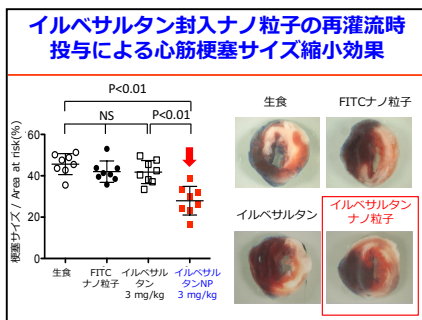
- (4) ここまでの結果から、ピオグリタゾンナノ粒子はマクロファージのプラークへの集積を減少させるのではなく、マクロファージを機能的に調節することで buried fibrous cap を減少させることが示唆された。プラークのマクロファージは、MMP やカテプシンなど、細胞外基質を劣化させてプラークを機械的に脆弱化させる各種のプロテイナーゼを産生する。我々は近赤外線蛍光プローブを用いた分子イメージングによって、ピオグリタゾンがこれらのプロテイナーゼを調整するかどうか調べた。ピオグリタゾンナノ粒子は腕頭動脈における MMP 活性を減少させた。動脈硬化に関連するもう1つの重要なプロテイナーゼであるカテプシンの活性も、同様にピオグリタゾンナノ粒子によって減少した (図)。



- (5) 結論として、ナノ粒子を介したピオグリタゾンの細胞内送達は、循環血中の炎症性単球を減少させ、病変マクロファージのプロテイナーゼ活性を抑制することによって、マウスの腕頭動脈でのプラーク破綻を減少させた。これらの結果から、PLGA ナノ粒子を用いた PPAR γ 標的治療が、冠動脈疾患患者において急性血栓性イベントを予防し、予後を改善させるための妥当かつ有望な治療戦略であることが示唆された。
- (6) 【心筋虚血再灌流傷害モデルにおける検討】マウス心筋虚血再灌流傷害モデルにおいて、FITC ナノ粒子の再灌流時静脈内投与の体内動態を検討した。PLGA ナノ粒子は、末梢血単球に取り込まれ、さらに虚血再灌流心臓組織に取り込まれた (図)。



- (7) イルベサルタンナノ粒子を投与し、各臓器におけるイルベサルタン組織濃度を同定すると、虚血心筋ではナノ粒子化により組織濃度が約 10 倍から 15 倍高く、また、脾臓、肝臓においてナノ粒子化による組織濃度の上昇が顕著であり、組織マクロファージによる取り込みを示唆すると考察された (図)。
- (8) 最終的にイルベサルタンナノ粒子による心筋梗塞サイズの縮小が確認され、これらは PPAR ガンマ活性化、炎症性遺伝子群の転写因子である NF- κ B の抑制を伴った (図)。これらの効果はケモカイン受容体 CCR2 欠損マウスでは認めず、イルベサルタンナノ粒子の効果が MCP-1/CCR2 を介した炎症の抑制によることが示唆された。



- (9) イルベサルタンナノ粒子は、ナノ粒子化による薬剤送達の向上により強力な抗炎症効果を発揮し、心筋虚血再灌流傷害による心筋梗塞の縮小効果を示した。現在の急性心筋梗塞に対する早期再灌流療法の治療効果を改善する補助療法としての開発が期待される。

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 7 件)

- ① 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^{-/-} Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016; 36(3): 491-500. 査読有、10.1161/ATVBAHA.115.307057.

- ② 的場哲哉、江頭健輔：特集 新しい循環器病のバイオマーカー -臨床的意義を理解する- 5. 今後の展望 b. ナノ粒子・薬剤送達システムによる新しい動脈硬化性疾患治療. *Heart View メジカルレビュー社* 2015; 19(12): 284-289、査読無、なし

- ③ 的場哲哉、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 日本 DDS 学会* 2015; 30(4): 299-308、査読無、なし

- ④ 的場哲哉、古賀純一郎、中野覚、江頭健輔：急性心筋梗塞に対するナノ DDS の開発. *最新医学* 2015; 70(11): 2197-2204、査読無、なし

- ⑤ 的場哲哉、香月俊輔、中野覚、江頭健輔：冠動脈疾患治療を目指したナノ・ドラッグデリバリーシステムの開発. *J-ISC 会誌「心血管薬物療法」* 2015; 3(1) 57-61、査読無、なし

- ⑥ Katsuki S, Matoba T, Nakashiro S, Sato K, Koga JI, Nakano K, Nakano Y, Egusa S, Sunagawa K, Egashira K: Nanoparticle-Mediated Delivery of Pitavastatin Inhibits Atherosclerotic Plaque Destabilization/Rupture in Mice by Regulating the Recruitment of Inflammatory Monocytes. *Circulation.* 2014; 129(8): 896-906. 査読有、10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002870.

- ⑦ Matoba T, Sato K, Egashira K: Mouse models of plaque rupture. *Curr Opin Lipidol.* 2013; 24: 419-425. 査読有、10.1097/MOL.0b013e3283646e4d.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 的場哲哉：ナノ粒子・ドラッグデリバリーシステムを急性心筋梗塞治療に応用する. 第 5 回日本バイオマテリアル学会九州ブロック講演会、2015 年 9 月 18 日、九州大学先端物質化学研究所 (福岡)

- ② 中城総一、的場哲哉、古賀純一郎、中野覚、砂川賢二、江頭健輔：Nanoparticle-mediated Delivery of Pioglitazone Ameliorates Inflammation and Inhibits Atherosclerotic Plaque Rupture in Apolipoprotein-E Deficient Mice. 米

国心臓協会学術集会、2014年11月18日、シカゴ（米国）

- ③ 徳留正毅、的場哲哉、仲野泰啓、中野覚、砂川賢二、江頭健輔：
Nanoparticles-Mediated Delivery of Pioglitazone Reduces Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Antagonizing Monocyte-mediated Inflammation in Mice and Mini Pigs. 米
国心臓協会学術集会、2014年11月16日、シカゴ（米国）
- ④ Matoba T, Katsuki S, Sato K, Nakano K, Sunagawa K, Egashira K: Murine Model of Atherosclerotic Plaque Destabilization and Rupture in ApoE-Deficient Mice. 第45回日本動脈硬化学会総会・学術集会（招待講演）、2013年07月18日～19日、京王プラザホテル（東京）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

九州大学 大学院医学研究院 循環器内科学

<http://www.cardiol.med.kyushu-u.ac.jp>

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・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

江頭 健輔 (EGASHIRA, Kensuke)

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・教授

研究者番号：60260379