

We have examined the effect of gene therapy with 7ND plasmid in animal models of vascular injury. Balloon-induced endothelial denudation in rat carotid artery causes neointima formation. Expression of MCP-1 and CCR2 in the injured artery was significantly higher on days 3, 7, and 28 than that in contralateral non-injured artery [11]. Three days before the balloon injury, rats were injected with empty plasmid or 7ND plasmid into hindlimb muscles. Gene therapy with 7ND plasmid reduced monocyte/macrophage infiltration and inhibited proliferation of neointimal cells [11]. Similar therapeutic effect was observed in another balloon injury model in carotid arteries of cynomolgus monkeys. The effect of 7ND gene therapy was confirmed in other animal models in which nonconstrictive polyethylene cuff was placed around the femoral arteries in mice and cynomolgus monkeys [12]. In these models, 7ND gene therapy suppressed infiltration of macrophage and proliferation of smooth muscle cell in the neointima 7-day after cuff placement. Cross-sectional intima/media ratio 28-day after cuff placement was significantly reduced by 7ND gene therapy. These data indicated that 7ND plasmid transfection into hindlimb muscles is a valid anti-inflammatory strategy to inhibit local inflammation in the vascular wall to prevent restenosis after PCI.

Based on these findings, we have formulated a stent coated with 7ND plasmid to examine the effect of local delivery of 7ND to inhibit neointima formation. A 15-mm-long stainless-steel balloon-expandable stent was dipcoated under sterile conditions with multiple thin layers of biocompatible polymer (polyvinyl alcohol [PVOH], GOHSENOL EG-05, Nippon GohseiInc). The polymer solution additionally contained either 7ND cDNA plasmid, plasmid encoding beta-

galactosidase or polymer without plasmid as a control [13]. Gene transfer of beta-galactosidase by this gene-eluting stent system was confirmed in rabbit femoral arteries stented with β -galactosidase gene-eluting stent Fig. (2A). The 7ND gene-eluting stents inhibited macrophage infiltration surrounding stent struts 10 days after stenting in rabbit femoral arteries. In cynomolgus monkeys, 7ND gene-eluting stent or stent without plasmid was placed in the iliac arteries. After 6-month observation, in-stent neointima formation was significantly less in arteries stented with 7ND gene-eluting stents Fig. (2B). In these studies, the biocompatible polymer and plasmid DNA coating material used did not cause any adverse reactions during a 1-month observation period in rabbits and during a 6-month observation period in nonhuman primates. These findings suggest that anti-MCP-1 gene therapy via 7ND gene-eluting stents may be clinically relevant and further clinical trials are warranted.

NANOPARTICLE-MEDIATED GENE DELIVERY SYSTEM

Above described gene therapy using intramuscular injection of 7ND plasmid was dependent on the expression of 7ND in the skeletal muscle and release into the circulation. Transduced 7ND protein was detectable in the plasma *in vivo*, which interfered MCP-1/CCR2 signaling to inhibit monocyte/macrophage chemotaxis into the inflamed vascular wall. Although intramuscular 7ND transfection showed no notable side effects, we have been developing nanoparticle-mediated plasmid gene transfer to raise the specificity of gene delivery and reduce possible off-target effects of extrinsic 7ND gene.

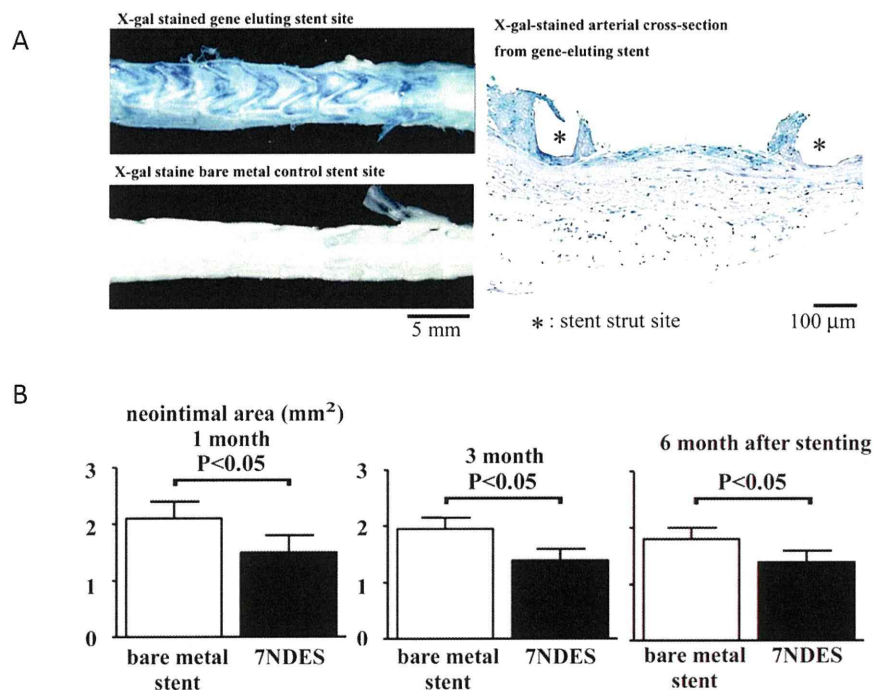


Fig. (2). A, Transgene expression in the rabbit iliac artery stented with gene-eluting stent. Left, Macroscopic image of the luminal surface of X-gal-stained iliac arteries stented with β -galactosidase gene-eluting stent (upper left) or bare stent (lower left). Right, a cross section of X-gal-stained artery stented with β -galactosidase gene-eluting stent. B, Inhibitory effect of 7ND gene-eluting stents (7NDES) on in-stent neointima formation in iliac arteries of monkeys. Neointima area at 1, 3, and 6 months after stenting (n=6 each).

We have employed poly lactic-co-glycolic acid nanoparticle (PLGA-NP) that is formed by emulsion solvent diffusion method as previously reported [14-18].

PLGA polymer is shown to be biocompatible and biodegradable. An average diameter of PLGA-NP was 200 nm. Fluorescein isothiocyanate (FITC, Dojindo laboratories, Kumamoto, Japan) containing PLGA-NP (FITC-NP) was prepared for the examination of *in vivo* distribution of nanoparticles. *In vivo* distribution of FITC-NP was examined after intravenous administration into C57Bl/6J mice from the tail vein. Two hours after injection, mononuclear cells that took FITC-NP into cytoplasm were observed in the peripheral blood. Flow cytometry showed that FITC-NP was taken up by CD11b⁺ monocytes Fig. (3A).

We prepared PLGA-NP containing 7ND plasmid (7ND-NP, content of 7ND plasmid 0.40 wt%) and PLGA-NP containing GFP plasmid (GFP-NP, content of GFP plasmid 0.32 wt%) using the same method and tested nanoparticle-mediated gene transfer in cultured mouse monocyte cell line J774A.1 (DS Pharma Biomedical, Suita, Japan). J774A.1 was maintained in RPMI 1640 medium containing 5% fetal bovine serum. For gene transfer, J774A.1 was incubated with 20 μ g/mL GFP plasmid conjugated with conventional transfection reagent according to the manufacturer's protocol (Fugene®, Roche Applied Science) or GFP-NP that contained 3 μ g/mL GFP plasmid for 1 hour and then, medium was changed. Twenty-four hours after GFP-NP treatment, RNA was extracted and reverse transcribed and gene expression was quantified by real time polymerase chain reaction (RT-PCR). GFP and GAPDH primer, which are mixed

with probes as TaqMan® Gene Expression Assays, were commercially available and purchased from Applied Biosystems. RT-PCR showed equivalent GFP expression in cells after conventional gene transfer as well as nanoparticle-mediated gene transfer Fig. (3B). These results suggest that PLGA-NP-mediated delivery of plasmid DNA results in the expression of the gene. Then we examined the effect of nanoparticle-mediated 7ND gene therapy on MCP-1-induced monocyte chemotaxis in murine abdominal macrophages *ex vivo*. Thioglycolate elicited macrophages were collected from abdominal cavity 4 days after injection of 7ND-NP or Empty-NP. Migration of macrophages was examined by Boyden's chamber method. Pretreatment with 7ND-NP significantly inhibited MCP-1-induced macrophage chemotaxis compared with Empty-NP Fig. (3C), suggesting the autocrine effect of 7ND in the macrophages themselves.

At the time of writing, we have been examining the effect of nanoparticle-mediated 7ND gene delivery on several vascular disease models based on the above results. Nanoparticle-mediated 7ND gene delivery has shown inhibitory effects on monocyte/macrophage infiltration into atherosclerotic lesions, lesion progression, and plaque instability in hypercholesterolemic mice. Intravenous treatment of nanoparticulated 7ND plasmid significantly reduce total amount of plasmid DNA required, in compared with intramuscular injection of naked 7ND plasmid, in order to regulate monocyte/macrophage chemotaxis (unpublished observations, Egashira and Matoba). These findings support the concept of novel nanoparticle-mediated gene delivery system Fig. (4).

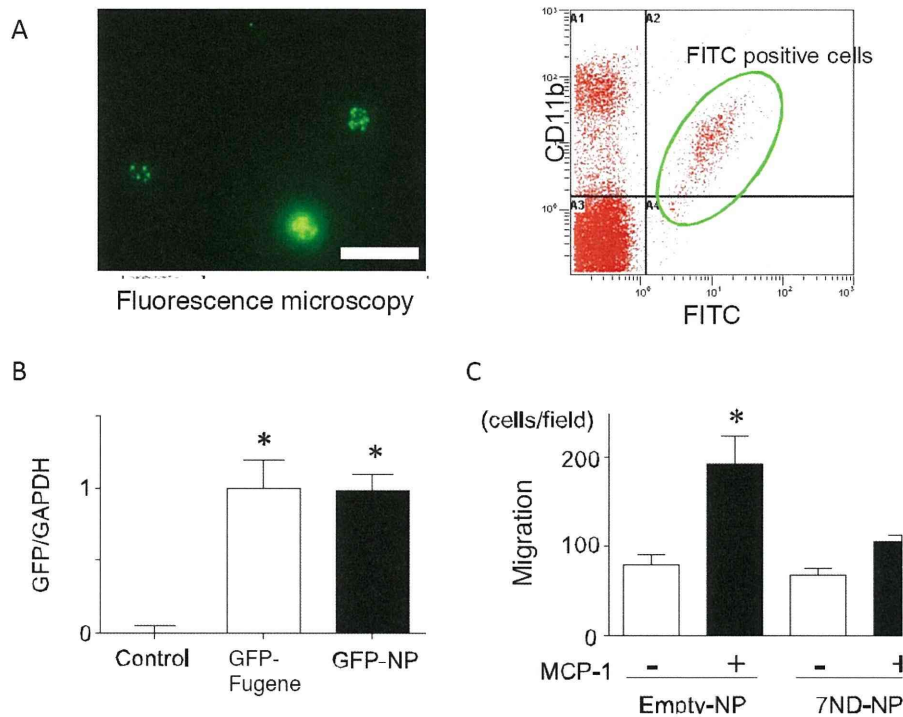


Fig. (3). A, Left, fluorescent micrograph of peripheral blood 2 hours after intravenous administration of FITC-NP. Scale bar indicates 50 μ m. Right, flow cytometry showed that FITC positive cells presented CD11b⁺ monocytes. B, cultured macrophages (J774A.1) were incubated with Fugene-conjugated GFP plasmid (GFP-Fugene) or nanoparticulated GFP plasmid (GFP-NP) for 1 hour. RT-PCR showed GFP expression was comparable between two transfection methods. * $p < 0.01$ vs control. C, chemotaxis of thioglycolate-elicited macrophages was suppressed by pretreatment with nanoparticulated 7ND plasmid. * $p < 0.001$ vs control (Empty-NP, MCP-1(-)).

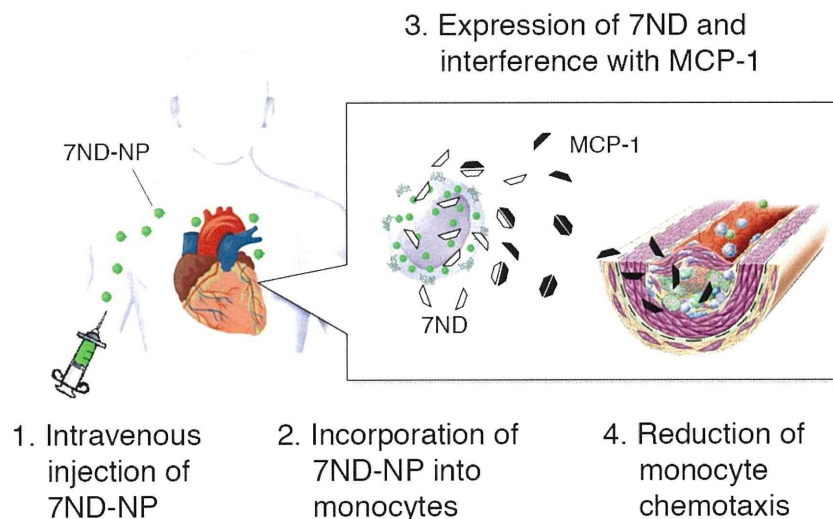


Fig. (4). Therapeutic strategy of nanoparticle-mediated 7ND gene therapy consists of these 4 steps. 1) Intravenous injection of nanoparticulated 7ND plasmid (7ND-NP). 2) Incorporation of 7ND-NP into peripheral monocytes. 3) Expression of 7ND and Interference with MCP-1 in autocrine/paracrine manner. 4) Reduction of monocyte chemotaxis, which inhibits inflammation in the vascular wall.

SUMMARY

Monocyte/macrophage-mediated inflammation plays an important role in the development of cardiovascular diseases including atherosclerosis and vascular remodeling after injury. Gene therapy targeting MCP-1/CCR2 signals are potent therapeutic strategy, for which novel nanoparticle-mediated gene delivery system extends the efficacy of anti-inflammatory gene therapy to treat cardiovascular diseases.

REFERENCES

- [1] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
- [2] Gu L, Okada Y, Clinton S, *et al.* Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 1998; 2: 275-281.
- [3] Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in *ccr2*^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998; 394: 894-897.
- [4] Zhang Y, Rollins BJ. A dominant negative inhibitor indicates that monocyte chemoattractant protein 1 functions as a dimer. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 4851-4855.
- [5] Ni W, Egashira K, Kitamoto S, Kataoka C. New anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates atherosclerosis in *Circulation* 2001.
- [6] Egashira K, Koyanagi M, Kitamoto S, *et al.* Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy inhibits vascular remodeling in rats: Blockade of mcp-1 activity after intramuscular transfer of a mutant gene inhibits vascular remodeling induced by chronic blockade of no synthesis. *Faseb J* 2000; 14: 1974-1978.
- [7] Inoue S, Egashira K, Ni W, *et al.* Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein e-knockout mice. *Circulation* 2002; 106: 2700-06.
- [8] Kastrati A, Mehilli J, Pache J, *et al.* Analysis of 14 trials comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents. *N Engl J Med* 2007; 356: 1030-9.
- [9] Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001; 2: 108-15.
- [10] Mukaida N, Harada A, Matsushima K. Interleukin-8 (il-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (mcaf/mcp-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; 9: 9-23.
- [11] Usui M, Egashira K, Ohtani K, *et al.* Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy inhibits restenotic changes (neointimal hyperplasia) after balloon injury in rats and monkeys. *Faseb J* 2002; 16: 1838-40.
- [12] Egashira K, Zhao Q, Kataoka C, *et al.* Importance of monocyte chemoattractant protein-1 pathway in neointimal hyperplasia after periarterial injury in mice and monkeys. *Circ Res* 2002; 90: 1167-72.
- [13] Egashira K, Nakano K, Ohtani K, *et al.* Local delivery of anti-monocyte chemoattractant protein-1 by gene-eluting stents attenuates in-stent stenosis in rabbits and monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2563-8.
- [14] Kimura S, Egashira K, Nakano K, *et al.* Local delivery of imatinib mesylate (sti571)-incorporated nanoparticle ex vivo suppresses vein graft neointima formation. *Circulation* 2008; 118: S65-70.
- [15] Kubo M, Egashira K, Inoue T, *et al.* Therapeutic neovascularization by nanotechnology-mediated cell-selective delivery of pitavastatin into the vascular endothelium. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2009; 29: 796-801.
- [16] Nakano K, Egashira K, Masuda S, *et al.* Formulation of nanoparticle-eluting stents by a cationic electrodeposition coating technology: Efficient nano-drug delivery via bioabsorbable polymeric nanoparticle-eluting stents in porcine coronary arteries. *JACC Cardiovasc Interv* 2009; 2: 277-83.
- [17] Oda S, Nagahama R, Nakano K, *et al.* Nanoparticle-mediated endothelial cell-selective delivery of pitavastatin induces functional collateral arteries (therapeutic arteriogenesis) in a rabbit model of chronic hind limb ischemia. *J Vasc Surg* 2010; 52: 412-420.
- [18] Chen L, Nakano K, Kimura S, *et al.* Nanoparticle-mediated delivery of pitavastatin into lungs ameliorates the development and induces regression of monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension. *Hypertension* 2011; 57: 343-350.

■ 総説 ■

食物中オキシステロール
(酸化コレステロール)と動脈硬化*中野 覚¹ 佐藤 敬² 江頭 健輔¹

はじめに

現在、日本は食生活の欧米化および超高齢・成熟社会により、心筋梗塞、狭心症、脳卒中、末梢動脈疾患などの動脈硬化性疾患が増加し、死因と寝たきりの主たる原因となっており、全死因の30%を占めるまでになった。動脈硬化性疾患の発症の最も重要な因子が高LDLコレステロール血症を含む脂質異常症であることは確立されている。本邦でも「動脈硬化性疾患予防ガイドライン2007年度版」が発表され、高LDLコレステロール血症は冠動脈疾患の重要な危険因子であり、冠動脈疾患、脳梗塞の発症を予防するためには、高LDLコレステロール血症を中心とした脂質異常の改善をする必要があることがエビデンスレベルAとして勧告・推奨されている。さらに、LDLの酸化物である酸化LDLが動脈硬化性病変の進展に重要な関わりを持っていることが知られている¹⁾。

本稿では、LDLの酸化変性を誘導することが知られている食事に含まれる酸化(劣化)コレステロール(オキシステロール)とそれに起因する動脈硬化性病変の進展および動脈硬化性病変の不安定化と破綻のメカニズムについて概説する。

食事由来のオキシステロール

オキシステロール(oxysterol)は酵素的あるいは非酵素的にコレステロール(Cholest-5-en-3 β -ol)が酸化されることによって生ずる。食事由来のオキシステロールは後者の非酵素的(自動酸化)な活性酸素種(reactive oxygen species)との酸化反応によって生じ、例えば、コレステロールを含有する肉や卵黄の過剰な加熱やそれらを保管している際に産生されることが報告されている²⁾。その主な産生物にはヒドロキシコレステロール(7-hydroxycholesterol)、エポキシコレステロール(5,6-epoxycholesterol)、ケトコレステロール(7-ketocholesterol)などが知られている。内因性のオキシステロールも生体内産生されることが報告されているが、外因性のオキシステロールに比べ極めて微量であることが示唆されている。

また、培養細胞あるいは動物実験においてオキシステロールは極めて多様な生理活性、細胞毒性を示すことが報告されている。さらに、アルツハイマー型認知症などの神経変性疾患、がんだけでなく、動脈硬化性疾患の進展にも関与していることが示唆されているが³⁾、その詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない。

* Dietary Oxysterols and Atherosclerosis

¹ 九州大学大学院医学研究院循環器病先端医療研究開発学(〒812-8585 福岡市東区馬出3-1-1) Kaku Nakano, Kensuke Egashira: Department of Cardiovascular Research, Development, and Translational Medicine, Kyushu University

² 九州大学大学院医学研究院循環器内科学 Kei Sato: Department of Cardiovascular Medicine, Kyushu University

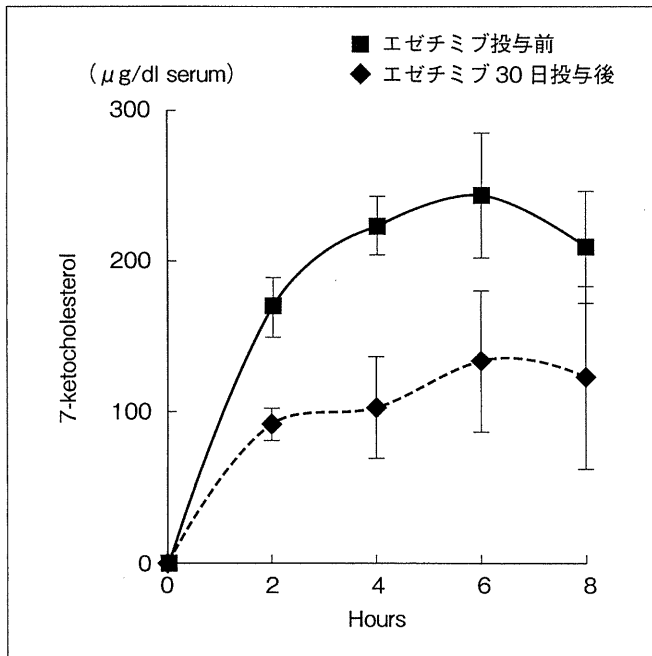


図1 エゼチミブの食事由来オキシステロールの吸収抑制効果

健康人にエゼチミブ 10 mg/body/day を投与し、エゼチミブ投与前後においてオキシステロールの一つである 7-ケトコレステロール (400 mg) をテストミールに混ぜて負荷をし、コントロール期とエゼチミブ 30 日投与時期にそれぞれ経時的に血中 7-ケトコレステロール濃度の推移を測定した。(文献⁶⁾より改変して引用)

オキシステロールは酸化 LDL の形成に寄与する

生体内でのコレステロール (Cholest-5-en-3 β -ol) は、リン脂質、糖脂質とならび細胞膜の必須構成成分であり、またステロイドホルモン合成に必須な重要な化合物であるのは周知の事実である。しかし、食生活の欧米化による過剰なコレステロールの摂取により LDL コレステロール値は増加し、その結果、冠動脈疾患の相対リスクが上昇する。食事由来、あるいは胆汁由来のコレステロールは、小腸の刷子縁の膜表面に多く発現している Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) 蛋白から吸収される⁴⁾。NPC1L1 は 13 回膜貫通型蛋白であり、コレステロール、インスリン、Liver X receptor, PPAR δ などが発現が制御されることが知られている。また、NPC1L1 ホモ欠損マウスは野生型に比べ、コレステロール吸収は約 80% 抑制されたことが報告されており、このことから、

NPC1L1 はコレステロールの吸収にクリティカルな分子であるといえる。エゼチミブは新規に開発された NPC1L1 阻害剤であり、コレステロールの小腸での吸収を抑制することが知られている。さらに、コレステロールの生合成に重要な酵素である HMG-CoA reductase の阻害薬であるスタチンと同等の血中 LDL コレステロール低下作用を有しており、また安全性も高いことから、次世代の脂質異常症の治療薬として注目を集めている。

オキシステロールもコレステロールと同様の経路で生体内に吸収されることがいくつかのグループによって報告されている^{5,6)}。さらに、吸収されたオキシステロールはカイロミクロン/レムナントに取り込まれ、肝臓に運ばれ、その後、流血中の LDL コレステロールに移行する。剖検例においてもオキシステロールは動脈硬化病変を有する動脈に高濃度に蓄積していることが明らかになっている⁷⁾。

詳細なメカニズムは明らかではないが、オキシステロールを含む LDL は酸化変性を受けやすく、脂質異常症・高血圧・高血糖などによって酸化ストレスが亢進し、酸化 LDL が生成され、動脈硬化病変が進展することが考えられている⁶⁾。オキシステロールを含有する LDL が酸化されやすいことを示唆するデータとして、健康人 4 名にオキシステロールの一つとして知られている α エポキシコレステロールを 400 mg 負荷し、ベースラインおよび負荷 8 時間後にそれぞれ LDL 分画を単離し、1.5 μ mol/l の硫酸銅を用いて化学的に酸化させたところ、LDL に含まれるコレステロール量は同等にもかかわらず、ベースラインに比べ α エポキシコレステロール負荷 8 時間後の LDL は、より早く酸化 LDL に変性することが示されている。また、LDL 受容体欠損マウスおよび ApoE 欠損マウスにオキシステロール含有食をそれぞれ 4 か月および 7 か月間負荷したところ、大動脈の動脈硬化病変が正常食に比べ有意に増悪することを明らかにした⁶⁾。さらに、食事中に含まれるオキシステロール (7-ケトコレステロール、 α エポキシコレステロール) が動脈硬化の進展の一因となっていることがウサギ動脈硬化モデルを用いて明らかにされた。また、Staprans

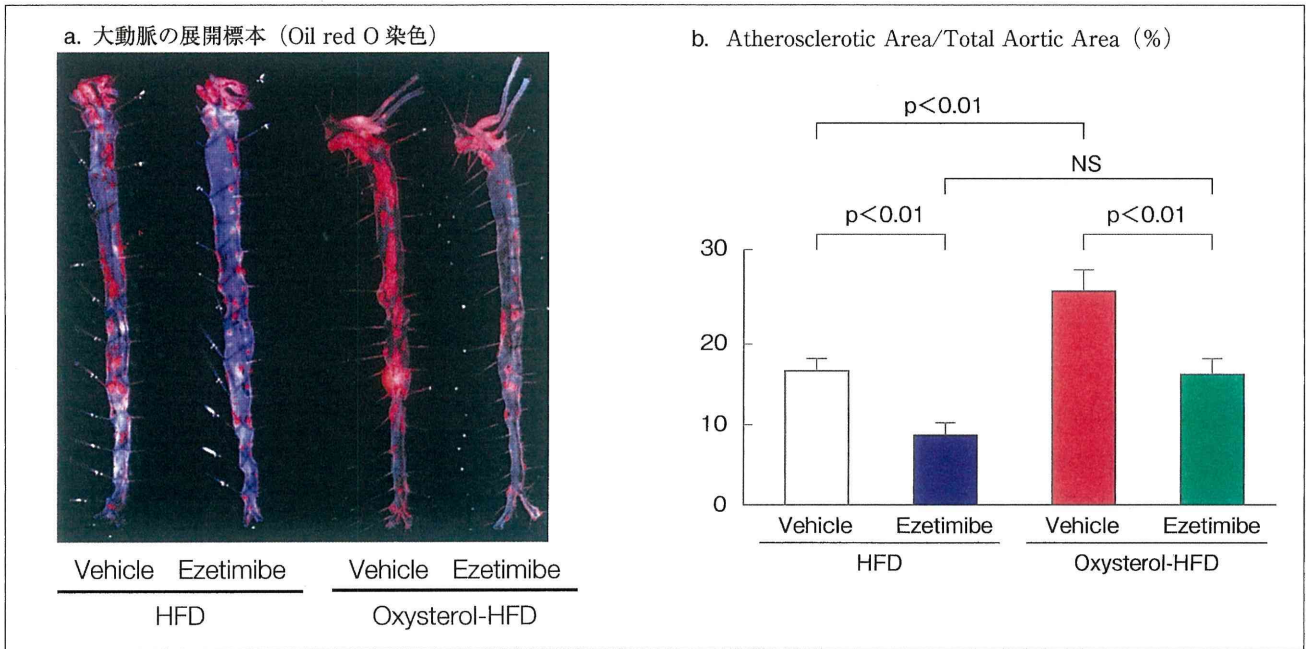


図2 ApoE欠損マウスの高脂肪食あるいはオキシステロールを含む高脂肪食負荷後の大動脈における動脈硬化の進展とエゼチミブによる動脈硬化進展抑制効果
大動脈における動脈硬化病変をオイルレッドO染色で評価した。データは平均±標準誤差で示した。

らは、健常人に酸化コレステロール(α エポキシコレステロール, 7-ケトコレステロール)を経口で摂取させると、血中カイロミクロンおよびLDL中のオキシステロールレベルが上昇し、それをエゼチミブが抑制するということを示した(図1)⁸⁾。しかしながら、食事に含まれるオキシステロールが動脈硬化病変の進展に関わる直接的な機序を解明した研究は、これまでのところない。そこで、今回われわれは食事に含まれるオキシステロールによる動脈硬化進展とそのメカニズムについて研究を行った。

エゼチミブはオキシステロールによる動脈硬化の進展を抑制する

まずわれわれは、200度に熱したガスオーブンでコレステロールを2時間加熱し、全コレステロール中約7%オキシステロールを含有するコレステロールを作製した。高脂肪食あるいはオキシステロール含有高脂肪食をApoE欠損マウスに8週間与え、さらに高脂肪食開始後4週目からアンジオテンシンII持続投与を行ったところ、高脂肪食に比べオキシステロール含有高脂肪食群で有意に動脈硬化病変が増加した。しかし、同時にエゼ

表1 血清中の脂質パラメータおよび酸化LDLレベル

	HFD		Oxysterol-HFD	
	溶媒	エゼチミブ	溶媒	エゼチミブ
総コレステロール (mg/dl)	631±31	275±16*	695±40	247±26*
カイロミクロン (mg/dl)	93±9	18±1*	84±16	13±1*
VLDL-コレステロール (mg/dl)	311±17	105±8*	347±24	84±10*
LDL-コレステロール (mg/dl)	205±16	122±9*	242±8	118±13*
HDL-コレステロール (mg/dl)	23±1	30±1*	21±1	31±3*
酸化LDL (μ g/dl)	151±49	63±14	129±14	45±9

* p<0.05. vs. 溶媒群

チミブ5mg/kgを経口投与すると、オキシステロールによる動脈硬化病変進展が抑制された(図2)。大動脈における遺伝子発現をRT-PCRにより解析したところ、オキシステロール含有高脂肪食によって単球の活性化に関連するInterleukin-1(IL-1), Monocyte Chemoattractant Protein-1(MCP-1), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)の発現亢進が認められた。さらに、動脈硬化病変部位におけるマクロファージ抗体である抗Mac-3

表 2 ApoE 欠損マウス腕頭動脈におけるプラーク破綻頻度と線維性被膜の菲薄化

ApoE 欠損マウス	急性プラーク破綻(1病変当たり)	埋没線維性被膜(1病変当たり)	線維性被膜厚
高脂肪食 8 週間	13%	1.2±0.2	4.00±0.38 μm
高脂肪食 8 週間 + アンジオテンシン II 4 週間	64%	2.8±0.4	1.64±0.29 μm

抗体および抗 MCP-1 抗体で免疫組織化学的に解析すると、オキシステロール群ではマクロファージの浸潤および MCP-1 の発現増強が認められ、エゼチミブの投与でそれらが抑制することが示された。また、血中の総コレステロール、LDL-コレステロールおよび酸化 LDL は、オキシステロールの負荷の有無によって差は認められなかった(表 1)。

さらに、血中のサイトカインを網羅的にマルチプレックスアレイによって解析すると、オキシステロール負荷によって単球の活性と炎症に関与していることが知られている MCP ファミリー、および Macrophage inflammatory protein (MIP) ファミリーの上昇が認められ、エゼチミブの投与によりその効果は抑制された。

以上のことから、オキシステロールによる動脈硬化病変の進展の主たるメカニズムは、単球の活性亢進および遊走促進によるマクロファージの浸潤による単球/マクロファージ関連の炎症であることが示された。

食事に含まれるオキシステロールは動脈硬化病変を不安定化させる

薬剤溶出ステントを含めた冠動脈に対するインターベンション(percutaneous coronary intervention; PCI)の発達に伴い、再狭窄は劇的に減少した⁹⁾。しかし、急性冠症候群(acute coronary syndrome; ACS)の頻度は変わらず、生命予後も改善しないことが明らかになっている。ACSの発生機序は冠動脈における動脈硬化性病変の不安定化とそれに引き続き起こる線維性被膜の破綻、血栓形成と考えられており¹⁰⁾、動脈硬化病変の不安定化と破綻の予防が心筋梗塞発生率の低下、生命

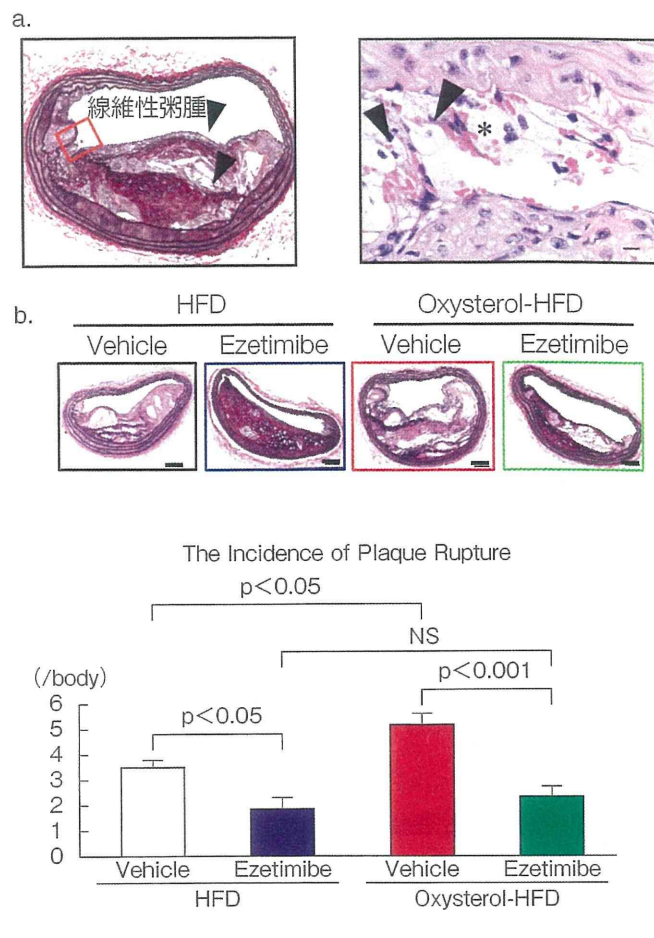


図 3 新規動脈硬化病変破綻モデルの病理学的特徴とオキシステロールによる動脈硬化病変の破綻促進とエゼチミブによる抑制効果

a. 左：マウス新規動脈硬化病変破綻モデルの腕頭動脈の Elastica Van Gieson 染色像。矢頭は壊死性コアを覆う動脈硬化病変内に埋没する線維性被膜を示す。右：左図の連続切片をヘマトキシリンエオシン染色し、囲み部位の拡大像。破綻部位(*)には動脈硬化病変内の出血(矢頭)が認められる。

b. オキシステロール含有高脂肪食を与えたマウスでは、腕頭動脈中の動脈硬化病変の破綻の頻度は通常の高脂肪食(high fat diet; HFD)と比べ有意に増加した。スケールバーは 100 μm。エゼチミブの投与により、動脈硬化病変の破綻が抑制された。データは平均±標準誤差で示した。

予後改善につながることを期待されている。したがって、生命予後改善のためには ACS の原因である不安定化した動脈硬化病変の破綻を予防することが重要である。ApoE 欠損マウス、LDL 受容体欠損マウスやバルーン傷害モデル動物など、いわゆる動脈硬化症のモデルといわれている動物においては動脈硬化病変の破綻は病理学的に観察

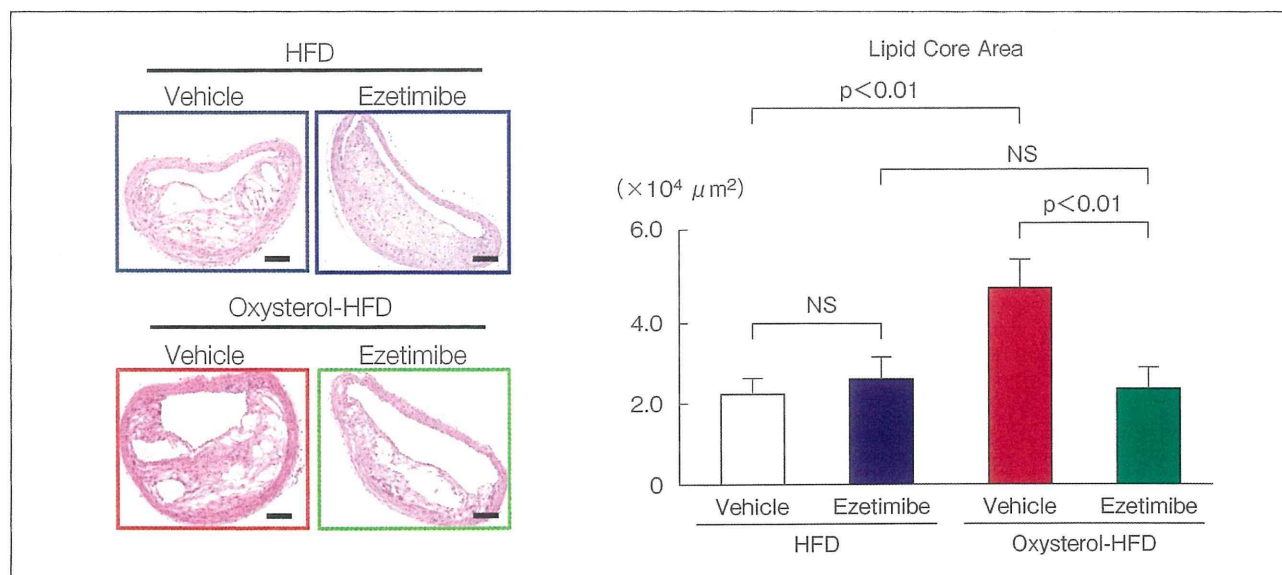


図4 オキシステロールによる動脈硬化病変の不安定化とエゼチミブによる抑制効果

オキシステロール含有高脂肪食を与えたマウスでは、腕頭動脈中の動脈硬化病変の脂質沈着 (lipid core) 面積は通常の高脂肪食 (high fat diet; HFD) と比べ有意に増加した。さらに、エゼチミブの投与により、動脈硬化病変の破綻が抑制された。スケールバーは 100 μm。データは平均±標準誤差で示した。

されず、動脈硬化病変の不安定化と破綻のメカニズムを解明する適切なモデルとは言えない。そこで、われわれは 16~18 週齢の ApoE 欠損マウスに 8 週間高脂肪食を負荷し、さらに高脂肪食開始後 4 週目から osmotic mini pump の腹腔内埋め込みによるアンジオテンシン II 持続投与 (1.9 mg/kg/day) を追加することにより、腕頭動脈に急性動脈硬化病変破綻 (acute atherosclerotic plaque rupture)、および治癒した動脈硬化病変破綻を示唆する動脈硬化病変内に埋没した線維性被膜数 (healed fibrous caps overlaying necrotic core) が有意に増加する動脈硬化病変破綻モデルの作製に成功した (表 2)。同モデルでは、動脈硬化病変の不安定化の指標として、線維性被膜の菲薄化 (fibrous cap thinning)、脂質の沈着、マクロファージの浸潤も認められた (図 3)。さらに、食事に含まれるオキシステロールの動脈硬化の不安定化と破綻に及ぼす影響とエゼチミブによる抑制効果を検討した。動脈硬化病変破綻モデルに通常の高脂肪食およびオキシステロール含有高脂肪食をそれぞれ与えたところ、オキシステロール含有高脂肪食を与えたマウスでは、腕頭動脈中の動脈硬化病変の破綻の頻度が有意に増加した (図 3)。さらに、エゼチミブの投与により、動脈硬化

病変の安定化と脂質の沈着の低下がもたらされた (図 4)。以上のことから、食事に含まれるオキシステロールが動脈硬化病変の不安定化と破綻に重要な役割を担っていることが示唆された。

おわりに

今回、われわれは食事由来のオキシステロールにより動脈硬化病変形成が促進、不安定化および破綻することを明らかにした。また、その病態機序には、オキシステロールによる単球/マクロファージ関連の炎症の誘導が重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、エゼチミブの投与によりこの単球/マクロファージ関連の炎症を抑制し、その結果オキシステロールによって誘導される動脈硬化病変の進展、不安定化および破綻を予防し得ることを明らかにした。さらに、血清酸化 LDL 値の上昇が認められなかったことから、オキシステロールの動脈硬化進展、炎症促進作用には酸化 LDL 仮説だけでは説明ができないオキシステロール独自の経路が存在することが示唆された。また、オキシステロールの体内での動態や、個々の食物にどの程度のオキシステロールが含有されているかなど、未だ不明な点は多く、今後、さらに研究を進めていく必要はあるが、

ファーストフードや電子レンジなどの利用により日本人の食事に含まれるコレステロールの量と質は大きく変化しており、ACSの一次予防にコレステロール吸収阻害薬の積極的な使用も考慮する必要があるだろう。

文 献

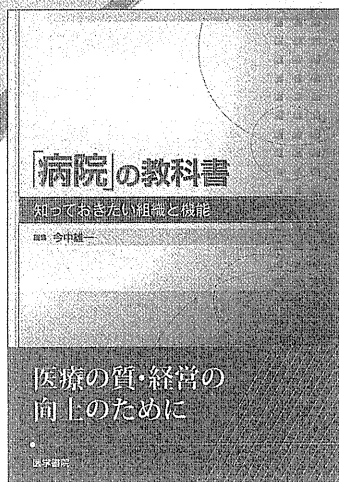
- 1) Steinberg D, Lewis A: Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 95: 1062-1071, 1997
- 2) Brown AJ, Jessup W: Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 142: 1-28, 1999
- 3) Jusakul A, Yongvanit P, Loilome W, et al: Mechanisms of oxysterol-induced carcinogenesis. *Lipids Health Dis* 10: 44, 2011
- 4) Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, et al: Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 303: 1201-1204, 2004
- 5) Osada K, Sasaki E, Sugano M: Lymphatic absorption of oxidized cholesterol in rats. *Lipids* 29: 555-559, 1994
- 6) Staprans I, Pan XM, Rapp JH, Feingold KR: Oxidized cholesterol in the diet is a source of oxidized lipoproteins in human serum. *J Lipid Res* 44: 705-715, 2003
- 7) Garcia-Cruset S, Carpenter KL, Guardiola F, et al: Oxysterol profiles of normal human arteries, fatty streaks and advanced lesions. *Free Radic Res* 35: 31-41, 2001
- 8) Staprans I, Pan XM, Rapp JH, et al: Ezetimibe inhibits the incorporation of dietary oxidized cholesterol into lipoproteins. *J Lipid Res* 47: 2575-2580, 2006
- 9) Babapulle MN, Eisenberg MJ: Coated stents for the prevention of restenosis: part I. *Circulation* 106: 2734-2740, 2002
- 10) Libby P: Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104: 365-372, 2001

病院の経営・管理に欠かせない知識を完全網羅!

「病院」の教科書

知っておきたい組織と機能

編集 今中雄一



診療報酬体系、DPC、診療情報管理、介護保険、医療関連法規など、病院の経営・管理に携わる方が知っておくべき事項を漏らすことなく解説。また、医療安全の取り組みについても具体的に教示。病院内の専門職種や各部門の概説により、病院の組織と機能を把握することができる。病院職員の研修、病院経営者対象のセミナーの教科書にも最適。これからの病院経営者・管理者必読の書。

●B5 頁248 2010年 定価3,990円(本体3,800円+税5%) [ISBN978-4-260-00595-1]

消費税率変更の場合、上記定価は税率の差額分変更になります。



医学書院

〒113-8719 東京都文京区本郷1-28-23

[販売部] TEL: 03-3817-5657 FAX: 03-3815-7804

E-mail: sd@igaku-shoin.co.jp http://www.igaku-shoin.co.jp 振替: 00170-9-96693

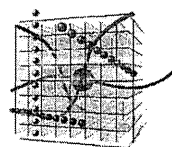
携帯サイトはこちら



血管医学から 先端医療研究開発への展開

Kensuke Egashira © 江頭健輔

九州大学大学院医学研究院循環器内科学



Summary

生命科学としての血管医学の重要性は、①血管の形態と機能制御が臓器ならびに生命の維持に不可欠であること、②超高齢化によって血管病の増加が著しく、国民死亡率と医療費の増加に繋がっていること、③血管医学研究が血管病だけでなく生活習慣病や老化などのメカニズム解明につながることで、などから明らかである。

医学の研究成果を先端医療開発へ展開する取り組み（出口を見据えた研究開発）は国策として推進されている（橋渡し研究支援促進プログラム、スーパー特区）。血管医学から先端医療開発への展開には、血管を「診る」、「創る」、「護る」、ことに関する独創的な技術に基づく研究開発体制の構築が必要だろう。そうして医療の低侵襲化と効率化が進むことにより、生活の質と予後の改善をもたらす安心安全医療がもたらされることを期待する。

Key words

- ◎血管医学
- ◎臨床橋渡し研究
- ◎血管生物学
- ◎ナノテクノロジー
- ◎先端医療開発

はじめに

血管医学研究の主たる領域を占める動脈硬化性疾患（急性心筋梗塞、狭心症、脳卒中、末梢動脈疾患など）の分子細胞メカニズムに関する研究は2000年以降を振り返ってみるだけでも目覚ましいものがある。新しいコンセプトが構築され、疾患の理解が深まっている。興味あることに、動脈硬化のメカニズムの中心的役割を果たす単球/マクロファージの挙動が肥満の内臓脂肪細胞における単球/マクロファージの挙動と類似していることがわかってきた。このことは、血管医学の研究成果が他領域の疾患メカニズム解明に貢献できることを意味している。また、血管医学から生命科学を開拓していけば、その成果を臨床医学へ還元できることも示唆している。そして、血管医学研究成果の一部は動脈硬化性疾患の先端医療開発へ応用されつつある。

今回、本誌「血管医学」創刊10周年記念号の企画として、血管医学の成果を先端医療研究開発に展開するプロセスの概説をテーマとして与えられた。そこで、僥倖ながら不肖私が血管医学研究を通して得た教訓と、先端医療研究開発の道程を紹介することにした。

血管医学研究を通じて得た教訓

私の独断と偏見であり、一般化できるとは決して思わないが、私なりに得た教訓を記載してみる。一部でも読者の参考になれば幸いである。

1. 自分の頭で考えること！オリジナルに徹すること！筋の通った研究をすること！

研究人生の最初は指導者(mentor)の考えに沿って、与えられたテーマをすでにあるルールの上を走る汽車のように実験を進めることがほとんどであろう。しかし、一旦独立した研究者を目指したなら、自分自身の頭で考えることが肝要である。ヒトの考えを参考にしても良いが、決して真似はしないこと！

2. 権威を疑うこと！

権威ある高名な研究者が言うことや権威ある教科書に記載されていることが正しいとは限らない。新しい発見やブレイクスルーは権威を疑うことから始まる、と私は考えている。それが科学の進歩につながる。

3. 新しい方法・技術の導入に逡巡しないこと！

新しければ何でも良いわけではないが、自分の研究に有利になると思えば、どしどし取り入れること！やってみることが重要である。

4. 一流紙を目指した研究をすること！

Nature, Science, Cell などインパクトファクターが高い超一流紙を目指すに越したことはないが、少なくとも自分の研究領域の一流紙を目指した研究をすることは重要である。

5. 独自のテーマを決めたら迷わず専念すること！

40歳(前半)までに、自分のテーマを決めること！そして一定の評価を獲得するために、適切な方法・技術に基づいて着実に研究成果を挙げることが重要である。自分の研究や概要の内容に、インパクトのある

「発見」や「コンセプト」を明示できることを目指していただきたい。

論文になるからと言って、あれこれ手を出さないこと！あやふやな根拠で論じた成果は、その根拠が後に誤りであったとされた場合、無意味になる。たとえば、ある経路 A の阻害薬を使うことが主目的の研究は、その経路 A の阻害作用が後に非特異的と判断されたら、そのすべてが無意味になる。

独創的研究を堅実に実行し成果を発表し続けていると、ほかの研究者がその仕事を発展させてくれる！すべてを自分でやらなくてはいけないことはない。

6. 流行に乗っても良いが自分の道を誤らないこと！

流行の研究に手を出しても良いが、自分の道を忘れないこと！自分の足元を見ること！

7. 努力は凡人の唯一の武器である！

世間には凡人のほうが多い。凡人が研究という世界で生きていくためには努力が唯一の武器ではないだろうか。才能×努力=成果であると考えればいい。

「血管医学」の重要性

血管に視点をおいた「血管医学」の重要性は以下のように要約される。

第1に、血管の形態と機能がシステムとして正常に作動することが臓器ならびに生命の維持に不可欠であることは言うまでもない。内皮細胞機能不全が心血管イベントの独立した予測因子となること、血管系のシステム欠損によって臓器の形成不全・機能不全が生じることが明らかにされている。心不全は血管病と同様に代表的循環器疾患であるが、その多くは冠動脈疾患(急性心筋梗塞症など)を基盤として発症する。心筋梗塞後リモデリングや高血圧性肥大心において、血管が適切に機能しないと心不全に陥る。大規模臨床試験で心血管病の予後を改善することが示されているアンジオテンシン変換酵素(angiotensin-converting enzyme :

ACE)阻害薬やアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬(angiotensinⅡreceptor blocker;ARB),スタチン,ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (preoxisome proliferator-activated receptor γ ;PPAR γ)アゴニストなどは共通に血管内皮機能を改善させることも血管医学の臨床的重要性を一層高めるものである。

次世代医療として期待されている血管新生/再生療法は健全な血管系の発生/分化を伴わなければ成立しない。健全な血管では血管壁構成細胞群(内皮,平滑筋,線維芽細胞)が相互に機能し合って,循環,細胞遊走/増殖,凝固/線溶などが正常に機能するようにはたっている。さらに,炎症・免疫疾患,造血異常,腫瘍などの病態形成にも血管系の存在は必須である。

第2に,日本における超高齢化による高齢者の増加は人類未経験状況に達している。これによって,血管医学の臨床的重要性が高まっている。虚血性心疾患だけでなく,脳血管疾患・腎疾患・末梢血管疾患・大動脈瘤・網膜疾患などの血管病の増加が著しく,国民死亡率と医療費に占める割合はきわめて大きい。

したがって,血管病の診断と治療に関する知識は循環器専門医だけでなく,それ以外の内科医にとっても重要になってきた。また,これらの血管病の診療や研究に携わる医師・研究者は内科系以外の診療科(血管外科,眼科,腫瘍内科・外科)にも所属しているので,血管病の診療や研究開発には診療科の垣根を越えた横断的体制が必要だろう。

第3に,血管病は現代の国民病ともいえる生活習慣病と密接に関連する。脂質異常症,高血圧症,糖尿病,メタボリックシンドロームなどの生活習慣病の治療においては単に脂質,血圧,血糖,体重の値をコントロールするだけでなく,全身の「血管保護」を意識した血管合併症の管理が生命予後の改善につながる。動脈硬化性狭窄の治療として,バルーンやステントで拡張する血管インターベンション治療が普及しているが,インターベンション治療そのものは患者の生命予後を改善しないことが認識されつつある。薬剤溶出ステントは再狭窄抑制には効果的であるが,安全性の懸念

(遅発性血栓による急性心筋梗塞と心臓死)が払拭されていない点が問題であり,血管内皮再生不全による血栓性の亢進がその主因と考察されている。したがって,インターベンション治療の適応となる動脈硬化性疾患患者においても「血管保護」が患者の生命予後の改善にますます重要となってきた。

また,「ヒトは血管とともに老いる」と言われるように,老化と血管病は密接にかかわっている。したがって,血管医学の研究を推進することは,生活習慣病や老化による血管病のメカニズム解明と先端医療研究開発の促進につながるであろう。

最後に,血管医学の診療は内科学の基本領域であり,臨床医学としての重要性は大きい。また,その研究成果は広く臨床医学全体にフィードバックできることから,血管医学は生命科学としても重要な分野である。

血管医学研究に基づく先端医療の研究開発

血管病を克服する先端医療の研究開発には,血管を「診る」,「創る」,「護る」をキーワードとする研究を一体的に推進することが重要である。その成果として,たとえば急性心筋梗塞症の責任病変である不安定プラークの分子イメージングと低侵襲治療デバイスが同時に開発できれば,イメージング(診断)と予防・治療を一体的に行うことができるインターベンション治療法が実現するだけでなく,治療効果の評価を適切に行えることから,医療の低侵襲化(患者の負担軽減)と効率化を達成できる。生活の質(QOL)と予後の改善をもたらす安心安全医療がもたらされるであろう(図1)。

血管を「診る」新しい方法・技術の開発が期待されている。炎症マーカーである高感度CRPの有用性と限界はすでに認識されているので,次世代バイオマーカーや遺伝子診断法の探索が必須である。心血管イベントの発症リスクをより高い精度で予知し,個々の患者のリスクの層別化を可能にするバイオマーカーを策定する必要がある。そうなれば,患者ごとに適切な予防法,治療法を提示できるだけでなく,治療の効果を

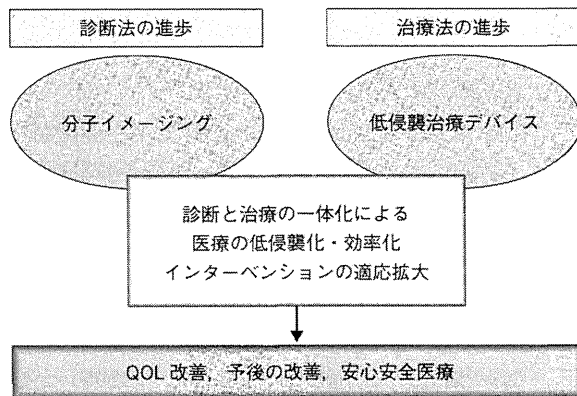


図1 血管インターベンションの将来像

—予後の改善をもたらす低侵襲安心安全医療—
分子イメージングと治療を一体的に行うことができれば、医療の低侵襲化(患者の負担軽減)と効率化を達成できる。生活の質と予後の改善をもたらす、安心安全医療がもたらされる。

評価できるので医療の効率化が推進される。

新しいイメージング法の開発もアンメットニーズを解決する革新技术として重視される。多列 CT や高性能 MRI の登場によって狭窄の非侵襲的診断は進歩したが、不安定プラークの診断能はいまだ不十分であり、現行の技術のさらなる向上、ならびに新しい介入技術の創出が必要である。この領域では分子イメージングを可能にする診断機器や、新しいドラッグデリバリーシステム(DDS)を活用した造影剤の研究開発が次世代技術として期待される。ナノ医工融合学に基づく DDS は癌の治療分野ではすでに実用化が始まっている。このような分子イメージング技術の開発によって、不安定プラーク部位の炎症・酸化脂質をターゲットにした分子イメージング技術が開発できれば、心筋梗塞の発症リスクが一定の精度でわかるようになるであろう。

血管を「創る」新しい治療法開発の研究も大きく進歩している。血管新生/再生は臓器の発生/再生に必須であり、癌も血管なしには成長できないことから、血管新生/再生の研究は医学全体に大きく貢献するものである。自己細胞や iPS・ES 細胞を用いた血管新生療法、医工学技術を駆使したハイブリッド人工血管、細胞シートを用いた血管新生/再生医療などの開発研究が進んでいる。

血管増殖因子(vascular endothelial growth factor ;

VEGF など)や自己骨髄細胞を用いた治療的血管新生療法は、日本の研究者らが世界に先駆けて開発し、臨床で有効性を示した点を強調したい。しかし、この方法による治療的血管新生療法は転換期を迎えていると言えるだろう。すなわち、臨床試験における効果のありなしに関して異なる結果が報告されている。その原因として、新生血管(angiogenesis)の機能が不十分で、かつ側副血行路(arteriogenesis = collateral circulation)の発達が不足であること、患者の細胞の血管新生能が不足していること、骨髄細胞が血管細胞に分化し血管新生を誘導(vasculogenesis)することはほとんどないこと、などが議論されている。その結果、先端医療として普及していないのが現状である。現在、血管増殖因子と細胞のハイブリッド治療や細胞シートを用いた方法などを用いて、臨床効果をさらに向上させる技術の開発が進んでいる。

われわれは、内皮細胞選択的ナノ DDS 技術が上記の臨床上の問題点を克服する新しい医学的対策になる、という仮説(図2)に基づいて、探索的研究開発を行った。その結果、HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるスタチンを封入したナノ粒子製剤がスタチンの血管新生能を格段に向上させ、かつ側副血行路を発達させること、さらに副作用を回避できる新規アプローチであることを、小動物だけでなくヒトに類似する霊長類モデルを用いて明らかにした。すでに、優良試験所基準(good

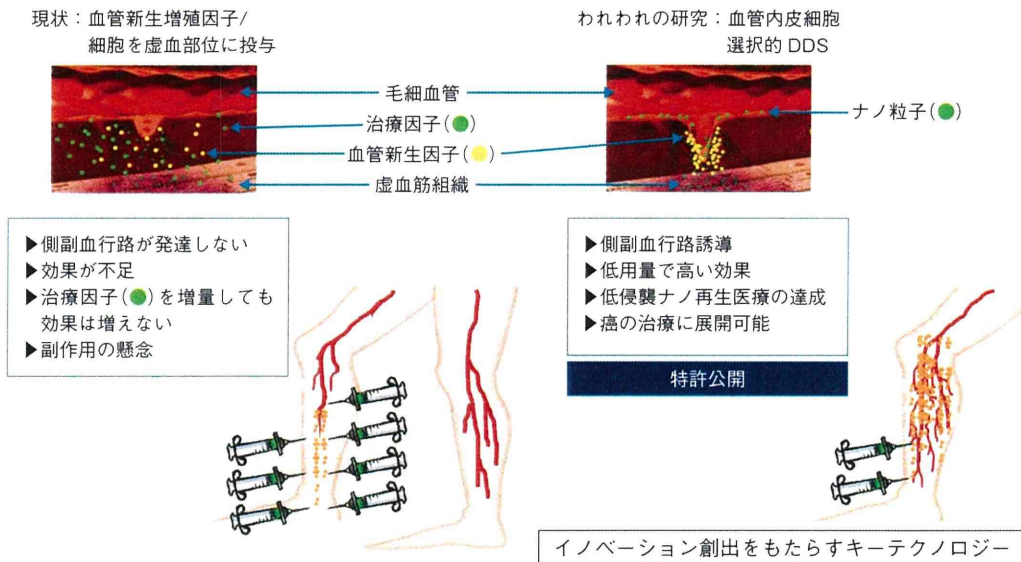


図2 内皮細胞選択的ナノ DDS 技術
—より効果的かつ安全安心の治療的血管新生(再生医療)を達成—

laboratory practice ; GLP)での安全性試験をほぼ終了し、臨床治験に向けて製造管理及び品質管理規則 (good manufacturing practice ; GLP)に準拠した治療薬の製造を開始した。九州大学橋渡し研究支援促進プログラムやスーパー特区の支援によって臨床治験を実施し、proof of concept (POC)を獲得した後、実用化を目指す予定である。

生活習慣病は、血管傷害を生じさせることによって臨床的に重要な病態となる。したがって、血管を「護る」治療法の開発は「血管医学」の大きなテーマである。われわれは血管を護る対策として抗炎症療法を提案し検証してきた。すなわち、単球走化性タンパク質-1(monocyte chemoattractant protein-1 ; MCP-1)のN末端欠失体(7ND-MCP-1)がMCP-1の強力な抑制因子として作用することを利用して、7ND-MCP-1遺伝子導入による抗MCP-1療法を開発した。この抗炎症治療によって動脈硬化の発生・進行の抑制とプラーク安定化がもたらされること、再狭窄反応(傷害後内膜肥厚)が抑制されることを、霊長類モデルを含

む実験動物を用いて明らかにした。7ND-MCP-1 遺伝子溶出型ステントの創製に成功し、同ステント内狭窄を抑制することを明らかにした。これらの研究によって、動脈硬化性疾患のメカニズムにおける新しいコンセプト(炎症仮説の証明)が構築できたと考えている。また、MCP-1の機能は多彩であり、平滑筋遊走増殖・線維化・血管新生に必須とされている。ほかの研究室との共同研究によって、抗MCP-1療法が高血圧性心疾患・心不全、重症腎疾患、脳血管障害、網膜疾患、病的血管新生、肺高血圧症、線維症、臓器移植後動脈硬化、などの難治性炎症性疾患にも有用であることを示す実験成果が報告されている(図3)。このような成果を基盤にして、ステント内再狭窄抑制を目的とした臨床試験を計画したが、①7ND-MCP-1の特許の有効期限の残りが少ないこと、②治療効果を出すには比較的少量の遺伝子プラスミドが必要であり製造費が高額となること、③新たなDDSとも考えられる薬剤溶出ステントが登場したこと、などの理由で2004年、臨床応用を断念した。そこで、われわれは高効

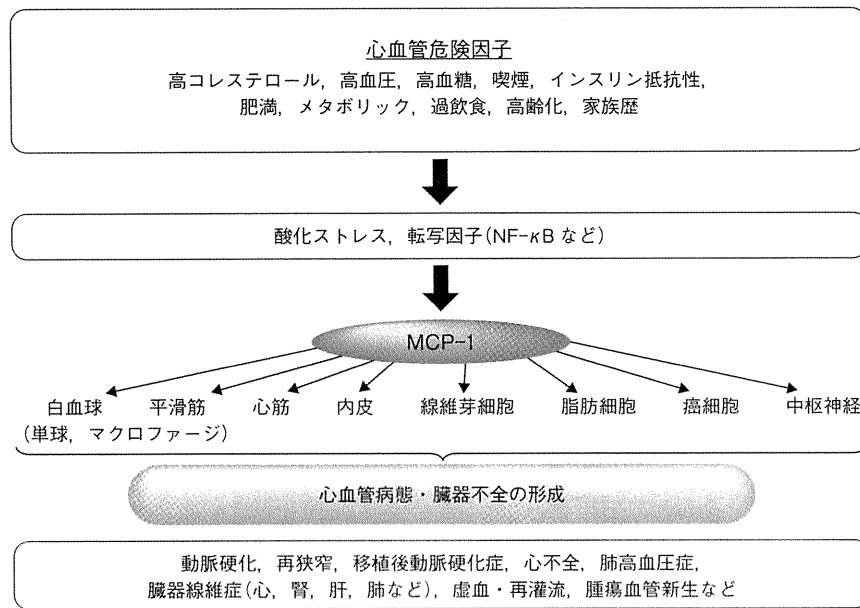


図3 MCP-1の分子病態的意義

果・低副作用の治療効果を発揮する独創的な技術を探
索し、その結果、ナノ DDS 技術を導入し開発するに
至った。もちろん、知的財産の確保にも十分配慮した。
以下にナノ DDS 技術によるステントならびにカテー
テルの研究開発の概要を述べる。

すでに報告されているように、ナノ粒子は、DDS
として機能し透過性の亢進した組織に送達される、細
胞内に受動的・能動的機序によって取り込まれる、な
どの特徴を有する。新規ナノ粒子溶出ステントの臨床
応用を鑑み、生体吸収性ポリマーを基材とする粉体ナ
ノ粒子を選択し薬剤・遺伝子を封入できることを確認
した。ステントの金属表面にコーティングするために、
カチオン電着コーティング法を新たに開発し、能動的
にナノ粒子をコーティングすることに成功した。この
独自の技術を活用して、薬剤を封入したナノ粒子の溶
出ステントを作製し、いくつかの候補薬剤封入ナノ粒
子溶出ステントの有効性が明らかになってきた。ここ
ではピタバスタチンカルシウム封入ナノ粒子溶出ステ
ント(スタチン NP)の成果を紹介する。ピタバスタチ

ンカルシウム封入ナノ粒子 180~200 μ g (ピタバスタ
チンカルシウムとして約 20 μ g) のコーティングに
よってブタ冠動脈モデルにおいてステント内狭窄が抑
制された。その抑制効果はすでに市販されているシロ
リムス溶出ステント (sirolimus-eluting stent : SES)
と同等であった。SES では内皮細胞修復不全による
血栓性の亢進や炎症・増殖亢進が認められるが、スタ
チン NP ではそのような SES の副作用は認められな
かった。すなわち、スタチン NP は市販の薬剤溶出ス
テント (CYPHER[®]) の安全性の懸念(副作用)を回避で
きるより安全な新規デバイスとなることが示唆された
(図 4)。本デバイスの実用化の可能性については、国
内外のデバイスメーカーと交渉中である。

仮に上記のような新規デバイスが実用化されれば、
それで血管内治療の臨床ニーズを十分満たすだろう
か？ 私は上記のようなステントは狭窄の治療には適
切に効果を発揮するが、高度狭窄を伴うことが少ない
不安定プラーク、あるいはステントの適応とならない
びまん性病変・小径病変の治療には不十分と考え、間

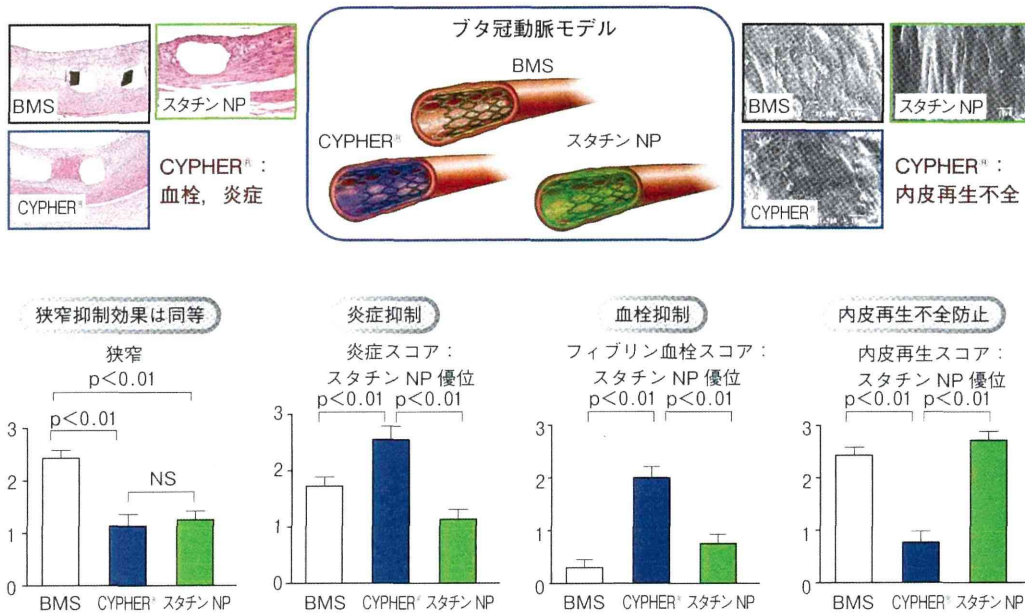


図4 スタチン封入ナノ粒子溶出ステント(スタチン NP)はシロリムス溶出ステント(CYPHER[®])の副作用を防ぎ血管代謝を安定化させる
BMS: bare metal Stent (金属ステント)

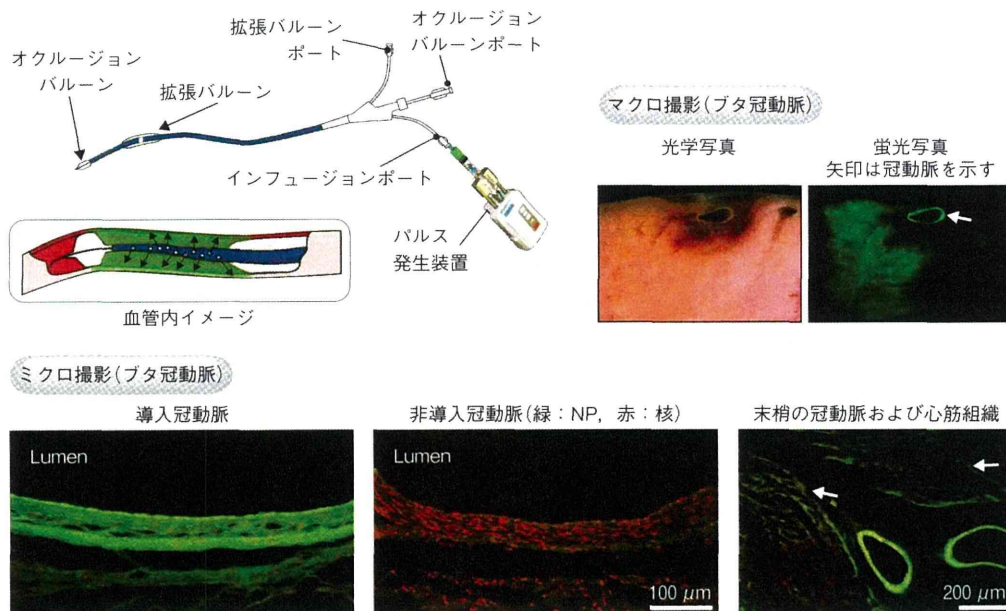


図5 間欠式脈波衝撃投与 DDS カテーテルを用いた血管内ナノ医療

欠式脈波衝撃投与 DDS カテーテルを考案した。すなわち、DDS カテーテルに間欠式脈波衝撃投与装置を組み合わせたものである(図5)。このカテーテルを用いて、ナノ粒子を脈波衝撃投与すると、通常の衝撃投与と比較してナノ粒子の血管壁への送達効率が格段に向上することがわかった。本デバイスの実用化を目指して、有効性試験を進めている。

おわりに

血管医学から先端医療研究開発への展開について私の取り組みを中心に概説した。橋渡し研究支援推進プ

ログラムやスーパー特区の仕組みを活用することによって、血管医学の研究成果の臨床橋渡し研究の取り組みを通じてイノベーションをもたらす日本発の独創的なナノ医療の研究開発を達成したいと考えている。

質の高い研究・教育の継続と、その成果の臨床医学・社会への還元は21世紀の大学に課せられた使命である。その目標達成のために、ナノ医工学融合を基盤とするナノ医療の研究開発を推進し、その成果を臨床応用し、社会に還元する橋渡し研究(出口を見据えた研究開発)を推進したい。

このような橋渡し研究の環境の整備によって、自然と次世代を担う人材が育成されるであろう。

特集

Small-vessel disease

Small-vessel diseaseと
肺高血圧症*阿部 弘太郎**
廣岡 良隆**
砂川 賢二***
江頭 健輔****

Key Words : pulmonary arterial hypertension, animal model, plexiform lesion

はじめに

肺高血圧症(pulmonary hypertension: PH)は安静時平均肺動脈圧が25mmHg以上を示す病態の総称である。肺高血圧症の病因はDana Point分類にも示されるように多岐にわたっているが、肺動脈性肺高血圧症(pulmonary arterial hypertension: PAH)とそれ以外の肺高血圧症(non-PAH)に大きく分類される¹⁾(表1)。実際の臨床の現場では肺疾患や左心不全に合併したnon-PAHに遭遇することが多いが、基礎疾患に対して適切な治療が行われると肺高血圧は軽減する。本稿では、近年さまざまな治療薬が開発されたにもかかわらず、いまだに原因不明かつ予後不良のPAHについて解説する。

肺高血圧症の病態生理

肺循環は、右心室から拍出されたすべての血流が流れ込む高流量循環である。しかしながら、体循環と比較して約1/8~1/6という低圧を保っている。肺循環が低圧を保つことができるのは肺循環の2つの特性による。1つ目の特性は、

表1 肺高血圧症の臨床分類(Dana Point, 2008)

1. 肺動脈性肺高血圧症(PAH)
 - 特発性、遺伝性、先天性心疾患、膠原病性、門脈性など
 - 1'. 肺静脈閉塞症および/または肺毛細血管腫
- 以下の病態を原因とする他の肺高血圧症(non-PAH)
2. 左心系疾患
 3. 肺疾患および/または低酸素
 4. 慢性肺血栓栓症
 5. 原因不明な多因子メカニズム

正常肺動脈壁は体循環と比較して、非常に薄く伸展性に富んでいることである。したがって、高流量の血流が流れ込んでも肺動脈が伸展することにより、急激な肺動脈圧の上昇には至らない。2つ目の特性は、肺循環が豊富な予備血管床をもっていることである。低圧系の肺循環の血流分布は重力の影響を強く受け、特に立位の場合の肺尖部の血流は肺底部と比較してきわめて低い。肺血流増加の際には、通常血流分布の少ない肺尖部への血流が増加することにより、急激な圧の上昇を防ぐことができる。正常の肺循環では、心拍出量が約4~5倍以上、または全肺血管床の80%以上を失うまでは肺動脈圧は大きく変化しないことが過去の生理学実験で明らかとなっている²⁾。つまり、心拍出量を一定とする

* Small-vessel disease and pulmonary arterial hypertension.

** Kohtarō ABE, M.D., Ph.D. & Yoshitaka HIROOKA, M.D., Ph.D.: 九州大学大学院医学研究院先端循環制御学講座(☎812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1); Department of Advanced Cardiovascular Regulation and Therapeutics, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka 812-8582, JAPAN

*** Kenji SUNAGAWA, M.D., Ph.D.: 九州大学大学院医学研究院循環器内科学講座

**** Kensuke EGASHIRA, M.D., Ph.D.: 九州大学大学院医学研究院循環器病先端医療研究開発学講座

表2 Heath & Edwardsの肺高血圧病理所見の分類

Grade	病理学的特徴	
1	中膜肥大	
2	細胞内膜反応/増殖	
3	求心性層状内膜病変	} 新生内膜
4	叢状病変 (plexiform lesion)	
5	拡張病変	
6	壊死性動脈炎	

と、理論的には約80%以上の肺動脈内腔が完全閉塞しない限り肺動脈圧の上昇は起きないことになる。肺高血圧症は、肺動脈圧が上昇することにより定義されている疾患群である。心拍出量が一定とした場合、肺高血圧症を発症した段階で、すでに全肺血管床の80%以上が閉塞した状態である。肺高血圧症の血管病変部位としては、病初期では200 μ m以下の肺小血管の狭窄もしくは閉塞により、肺動脈圧の上昇が生じるとされている。肺動脈圧の上昇のみの段階では、患者は無症状であることが多い。肺動脈圧が高い状態が持続すると肺動脈主幹部の伸展性も低下し、右心系への後負荷が増大する。右心室に対して圧負荷および容量負荷がかかることにより、息切れや下腿浮腫といった右心不全症状が顕著となり、はじめて診断されることが多い。

次に、肺高血圧症の病態である肺血管内腔の狭窄および閉塞は、どのような要素により生じるのであろうか。一般的に、肺血管内腔面積を減らす主要な要因として、①肺小血管の収縮、②炎症・増殖・アポトーシスといった血管リモデリング、③血栓、の3つがあげられる。これらの要因の中で、血栓に関しては多くの病理検体の検索の結果、肺血栓塞栓症による肺高血圧症を除き、肺高血圧症の病態に主たる役割ではないと考えられている。したがって、肺高血圧症の発生と進行の機序に関する研究は、過収縮とリモデリングのメカニズムを中心にこれまで行われてきた。

肺高血圧症の 肺小血管における病理組織像

肺高血圧症の肺小血管において、どのような病理組織の変化があるのか解説する。1958年、HeathとEdwardsは、先天性心疾患に伴う肺動脈

性肺高血圧症の肺小血管病変を重症度に従って6段階に分類し、肺病理組織標本上に現れた最も重篤な病変をその症例の重症度と定めた³⁾(表2)。初期の段階では中膜肥厚が起こり、進行とともに内膜層が細胞性肥厚から線維性肥厚を起こし、末期になると叢状病変(plexiform lesion)をはじめとするさまざまな病理組織を示す。この報告で特記すべき点は、2例の特発性肺動脈性肺高血圧症患者が含まれており、これらは先天性心疾患に伴う肺動脈性肺高血圧症と類似した病理形態を示した。現在、Heath & Edwards分類は先天性心疾患に伴う肺動脈性肺高血圧症のみに使用すべきとの意見もあるが、形態学的には、特発性肺動脈性肺高血圧症の患者と判別することは困難である。したがって、筆者は、Heath & Edwards分類は肺動脈性肺高血圧症全体の肺血管病変の病理組織の分類として使用できると考えている。

血管収縮とリモデリングの どちらが肺動脈上昇の主たる要因か?

Heathらによると、病理組織において肺小動脈の閉塞をきたすほどの血管リモデリングを認めるのは、肺動脈性肺高血圧症の末期であった。このことから、段階的に進行する肺血管壁のリモデリングは、中膜肥厚した肺血管平滑筋の過収縮による肺動脈圧の上昇の結果であるという仮説が生まれた。したがって、1980年代以降、肺高血圧症に対する治療として、さまざまな血管拡張物質が試された。具体的には、カルシウム拮抗薬やアデノシンなどの血管拡張薬による急性拡張反応試験が頻繁に行われるようになり、患者は“反応群”と“非反応群”に分類された。Reevesらは、“反応群”は肺高血圧症の比較的早期であり、“非反応群”は肺血管リモデリングを中心とした進行例であるという仮説を立てた⁴⁾。1990年代に入ると、プロスタサイクリン(PGI₂)、一酸化窒素(NO)、エンドセリン(ET)といった新しくかつ肺動脈に作用する血管作動物質が次々と発見されたことにより、肺動脈の収縮物質と拡張物質の不均衡が、肺動脈過収縮をひき起こすと考えられるようになった⁵⁾。

このように、肺血管過収縮が肺動脈圧を上昇

させる主たる要因であるという仮説のもと、肺血管拡張薬が肺高血圧症の治療の中心となっていた。しかしながら、この10年でこの概念が大きく変化することになる。Sitbonらは、中等度の肺高血圧症患者におけるカルシウム拮抗薬の慢性効果を追跡調査したところ、“反応群”はたったの13%程度であった⁶⁾。また、新しく開発された血管拡張薬であるエンドセリン受容体拮抗薬、ホスホジエステラーゼ5阻害薬は、急性肺血管拡張効果が乏しいが、慢性投与によって肺高血圧抑制効果を認めたことから、過収縮ではなく肺血管リモデリングが主要原因と考えられるようになった。近年、この肺血管リモデリングは、肺血管過収縮などによる肺動脈の血行動態と無関係に腫瘍性増殖が起こるという新たな概念(cancer paradigm)に基づき検討されている⁷⁾。この概念に至ったのは、進行例で特徴的とされるplexiform lesionには、遺伝子異常をもつ異常増殖した内皮細胞が存在し、アポトーシス抵抗性などの癌細胞に特徴を数多く認めたことがあげられる。肺高血圧症の新たな治療薬として注目を集めているイマチニブやソラフェニブのようなチロシンキナーゼ阻害薬は、この腫瘍性増殖を起こす肺血管リモデリングを抑制する目的で臨床応用されている⁸⁾。

肺小血管病変の 病態解明をする上での問題点

ここまで過収縮とリモデリングを主体とした肺小血管病変の病態について述べたが、ここからは病態解明の基礎研究について解説する。肺高血圧症の血管病変を解析するためには、ヒト肺動脈性肺高血圧症の病理標本もしくは疾患動物モデルの解析という2つのアプローチがある。前者のヒト肺動脈性肺高血圧症の病理標本のみでは、肺高血圧症の病態の全容解明はおそらく困難である。その理由として、

- ① 進行した段階で診断されることが多いため、病初期の生検組織のサンプルを入手することは困難である。
- ② 生検は侵襲的な方法のため、経時的に血行動態と組織採取を行うことはほぼ不可能である。
- ③ 患者はすでに治療を受けている状態である

ことがほとんどであるため、得られた情報から治療薬の影響を除外することは困難である。

以上の理由から、肺動脈性肺高血圧症の病態生理を解明する上で欠かせないのが、ヒト肺動脈性肺高血圧症動物モデルであった。

従来の肺高血圧症動物モデル

これまで肺高血圧症動物モデルとして、モノクロタリン誘発性肺高血圧症ラットモデルと低酸素誘発性肺高血圧症ラット・マウスモデルが頻用されてきた。しかしながら、これらのモデルの肺小血管では、進行例で特徴的な新生内膜(Heath & Edwards分類のグレード2, 3)やplexiform lesion(Heath & Edwards分類のグレード4)を認めず、病態モデルとしての妥当性について長い間疑問視されてきた。

モノクロタリン誘発性肺高血圧症モデルは著明な肺高血圧をひき起こすため、肺高血圧の中心的なモデルとして頻用されてきた。モノクロタリン(monocrotaline)は、*Crotalaria spectabilis*という植物の種子から抽出された毒性の物質である。モデルの作成方法であるが、オスラットに対して60mg/kgのモノクロタリンを1回皮下投与すると、3週間後に著明な肺高血圧および右心不全を示す。通常、肺組織には肺動脈内皮細胞の障害と血管周囲を中心とした炎症細胞の浸潤と、Heath & Edwards分類のグレード1の中膜肥厚を認める。しかしながら、このモデルには、内膜の増殖やplexiform lesionといったHeath & Edwards分類のグレード2以上の肺小血管病変を認めない。また、モノクロタリンは腎不全、肝不全といった多臓器障害をひき起こすため、肺動脈性肺高血圧症の適切なモデルではないことは明らかであった⁹⁾。次に、低酸素誘発性肺高血圧モデルであるが、このモデルもモノクロタリン誘発性肺高血圧症モデル同様広く使用されてきた。10%程度の低酸素下でラットやマウスを飼育すると、2~3週後に軽度から中等度の肺高血圧を呈する。病理組織学的には軽い中膜肥厚を認めるのみで、末期の肺動脈性肺高血圧症の適切なモデルとはいえない¹⁰⁾。したがって、肺高血圧症の進展機序の解明および新しい治療法の開発にあたり、著明な肺高血圧と典型的な病