

201324047A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

重症肺高血圧症の予後と生活の質を改善するための安心安全の
ナノ医療製剤（希少疾病用医薬品）の実用化臨床試験
（H24－難治等（難）－一般－009）

平成25年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 江頭 健輔

平成26(2014)年5月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

重症肺高血圧症の予後と生活の質を改善するための安心安全のナノ
医療製剤（希少疾病用医薬品）の実用化臨床試験
（H24－難治等（難）－一般－009）

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 江頭 健輔

平成 26（2014）年 5 月

【目 次】

I.	研究組織	1
II.	総括・分担研究報告書	2
1.	研究の要約(概要)	2
2.	研究の必要性ならびに目的	4
3.	期待される効果：新産業創出と我が国産業の競争力強化	6
4.	独創的な点と特色	6
5.	研究計画・方法	7
6.	平成25年度の成果	9
7.	考察と今後の展開	10
8.	健康危険情報	11
9.	研究発表	11
10.	知的財産権の出願・登録状況	11
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	12
IV.	研究成果の刊行物・別刷	14

【研究組織】

※主任研究者：

江頭 健輔 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・教授

※分担研究者：

砂川 賢二 九州大学大学院医学研究院 循環器内科学・教授

中野 覚 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・准教授

的場 哲哉 九州大学病院 循環器内科・講師

中西 洋一 九州大学大学院医学研究院 呼吸器内科学・教授

九州大学病院 ARO 次世代医療センター（橋渡し拠点）・センター長

戸高 浩司 九州大学病院 ARO 次世代医療センター（橋渡し拠点）准教授

桑原 良宇 興和株式会社 医薬事業部 製品戦略センター・センター長

白源 正成 医療法人相生会 臨床薬理センター 博多クリニック・院長

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業))

【総括・分担研究報告書】

「重症肺高血圧症の予後と生活の質を改善するための安心安全のナノ医療製剤(希少疾病用医薬品)の実用化臨床試験」(H24-難治等(難)一般-009)

主任研究者 江頭 健輔

(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 教授)

1. 研究の要約(概要)

【研究の必要性、背景】

重症肺高血圧症は QOL の悪化をもたらす予後不良の希少難治性疾患である。現行の治療薬の有効性は限定的であり、より低侵襲かつ効果的で安全安心な医薬品の実用化が強く求められている。

また、ナノ Drug Delivery System (DDS) を活用した日本発の革新的な医薬品・医療機器開発は「新成長戦略 2009」のライフイノベーションによる健康大国戦略の優先施策である。

申請者らは、ナノ医工薬学融合技術に基づいて重症肺高血圧症の治療に有効なナノ DDS を開発した。HMG-CoA 還元酵素阻害薬(スタチン)の血管保護作用に注目して研究し、ピタバスタチン封入ナノ粒子(ピタバ NP)製剤の気管内投与、あるいは静脈内投与によって肺高血圧症モデルや急性肺傷害モデル、慢性閉塞性肺疾患モデルの病態が著明に改善することを明らかにした(Egashira K et al. Hypertension 2011 など)。

その成果を基盤にピタバ NP の GLP 基準での安全性試験を実施し、治験薬 GMP 製造を確立した。

【目的】

本研究の目的は重症肺高血圧症の予後と Quality of Life (QOL) を改善する低侵襲かつ安全・安心なピタバ NP 製剤を希少疾病用医薬品として実用化(国内での薬事承認を最終目標)するための臨床試験を行い、Proof of Concept (POC) を取得することである。

【研究計画・方法】

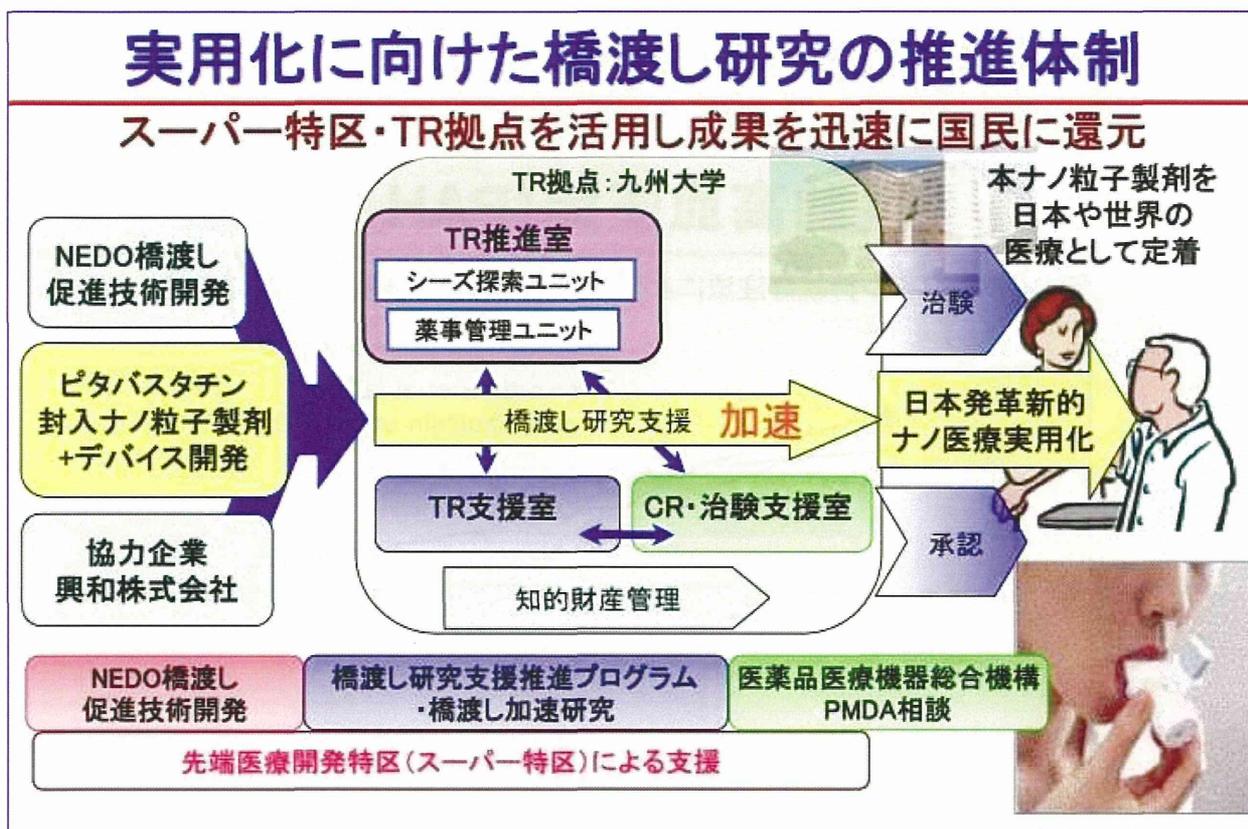
- (1) ピタバ NP 注射製剤を用いた第 I 相試験(治験)(単回静脈内投与試験、反復投与試験)
- (2) POC 取得のための探索的第 II 相試験の準備
- (3) ピタバ NP 吸入投与の治験を実施するための非臨床試験(製剤の最適化と安全性試験)

【独創性、特色など】

ピタバ NP が示す格段に優れた治療効果と低副作用の医薬品はこれまでに全く無いことから、独創性が極めて高い。ピタバ NP の国内外特許は各国で登録されつつある（国内特許登録、欧州特許登録、米国特許審査中、中国特許登録、その他は審査中）。

本研究は、先端医療開発スーパー特区の研究課題であり、九州大学に設備された分子イメージングシステムを活用することから、分子細胞病態の解析とナノ治療の効果を評価できるので、格段に優れた成果が期待できる。

図 1 実用化に向けた橋渡し研究の推進体制



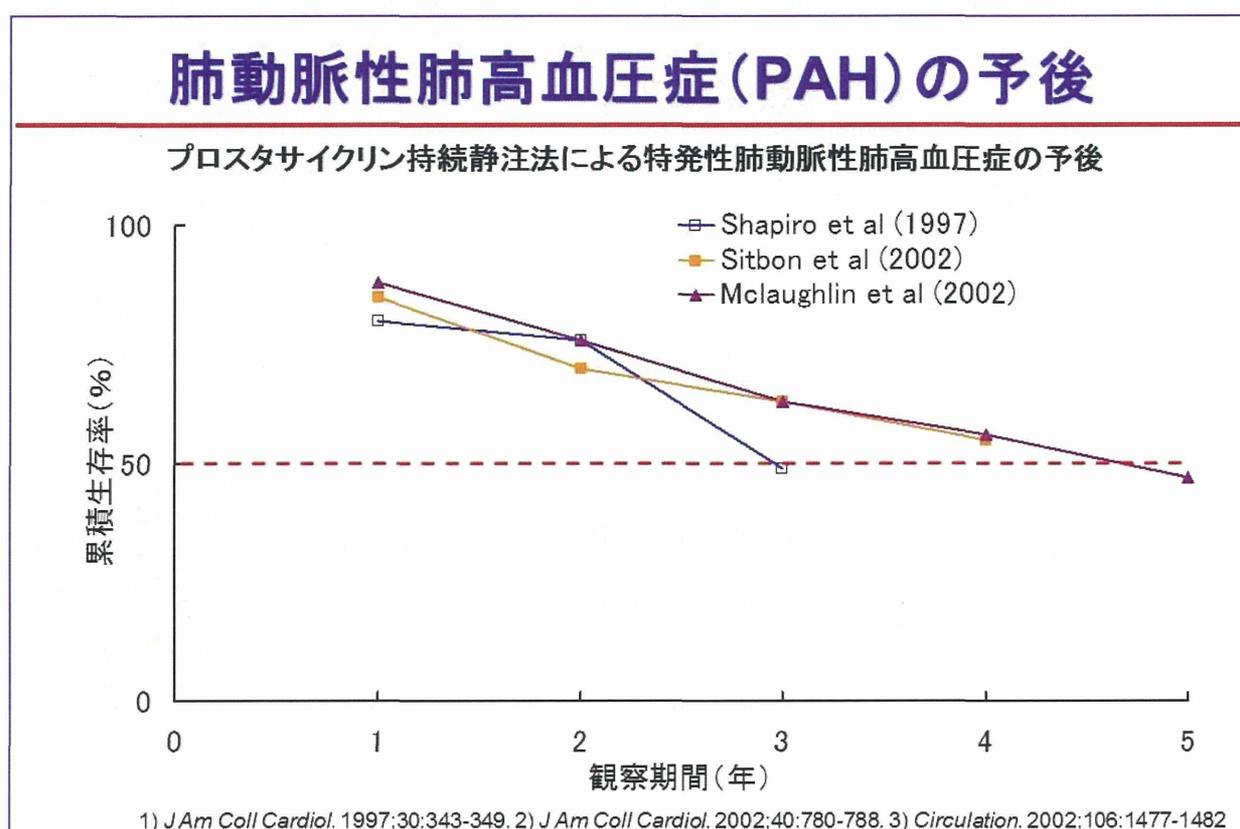
2. 研究の必要性ならびに目的

【必要性、背景】

重症肺高血圧症は QOL の悪化をもたらす予後不良の希少難治性疾患である。近年、プロスタサイクリン持続静注法や、ホスホジエステラーゼ V 阻害薬、エンドセリン受容体拮抗薬などの新しい治療法が導入されているが、その有効性は限定的で 5 年生存率は 50% 以下であり、長期的生命予後改善効果は未確立である（図 2）。

既存薬はいずれも血管拡張作用を主作用とする姑息的治療薬であり、臨床現場では根本的に肺細動脈病変の進行を阻止し、さらには、治癒に導くことの出来る、より低侵襲かつ効果的で安全安心な医薬品の実用化が強く求められている。

図 2 肺動脈性肺高血圧症（PAH）の予後



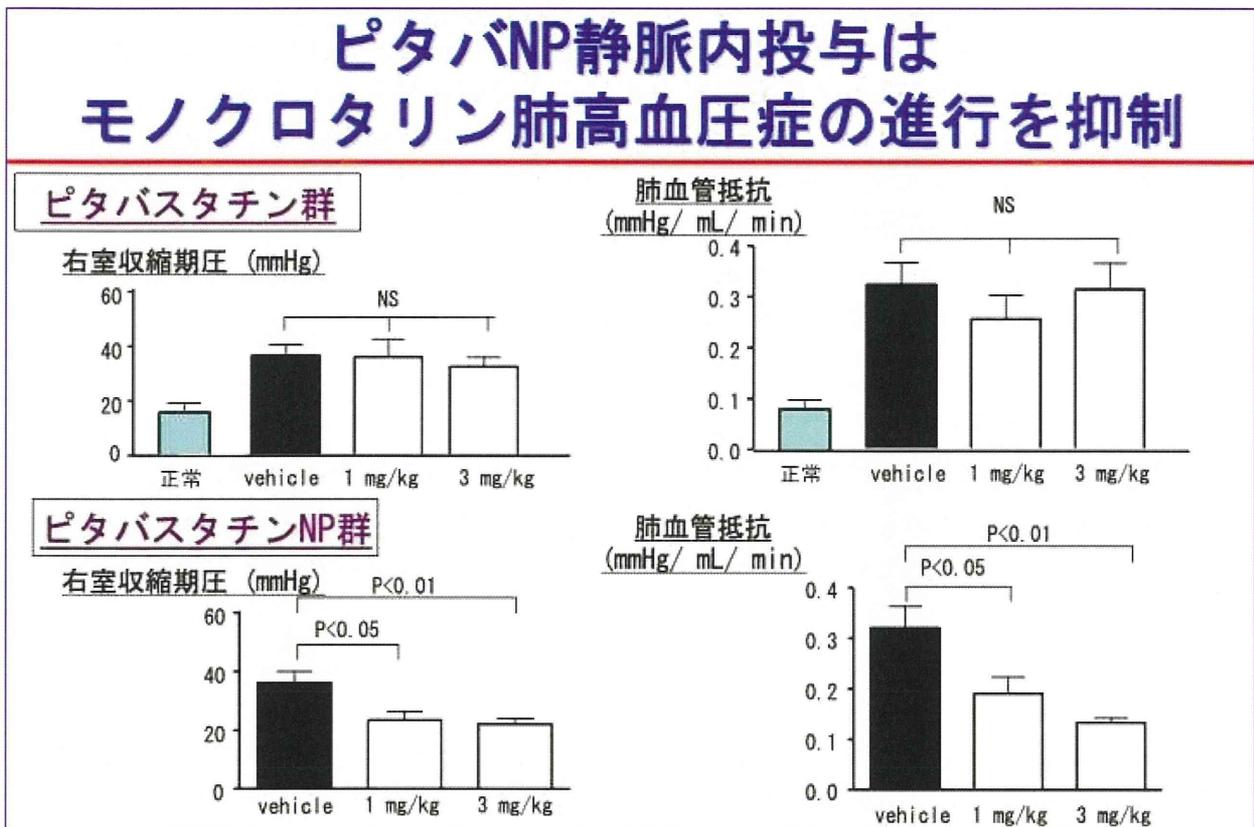
【問題解決のためのアプローチ】

ナノ DDS を活用した日本発の革新的な医薬品・医療機器開発は「新成長戦略 2009」のライフイノベーションによる健康大国戦略の優先施策であり、日本発世界標準医療につながる可能性がある。

申請者らは、難治性疾患克服事業（平成 21-23 年度、重点研究分野、スーパー特区研究）において、スタチン（HMG-CoA 還元酵素阻害薬）の血管保護作用に注目して研究し、（1）ピタバスタチンがもっとも強力な血管保護作用を有すること、（2）培養ヒト肺動脈細胞においてピタバスタチン封入ナノ粒子製剤（ピタバ NP）はピタバスタチン単独と比較して、より優れた増殖抑制作用を示すこと、（3）ピタバ NP 気管内投与によ

って肺高血圧症モデル（次ページの図：生命予後の改善に伴って右心室圧の低下が認められた）や急性肺傷害モデル、慢性閉塞性肺疾患モデルの病態が著明に改善すること、を明らかにした（Egashira K et al. Hypertension. 2011）。

図 3 ピタバ NP 静脈内投与による肺高血圧症進行抑制作用



【目的】

本研究の目的は重症肺高血圧症の予後と QOL を改善する低侵襲かつ安全・安心なピタバ NP 製剤を希少疾病用医薬品として実用化（国内での薬事承認を最終目標）するための臨床試験を行い、Proof of Concept (POC) を取得することである。具体的には、以下の臨床治験と非臨床試験を実施する。

- (1) ピタバ NP 注射製剤を用いた第 I 相試験（治験）（単回静脈内投与試験、反復投与試験）
- (2) POC 取得のための探索的第 II 相試験の準備
- (3) ピタバ NP 吸入投与の治験を実施するための非臨床試験（製剤の最適化と安全性試験）

3. 期待される効果：新産業創出と我が国産業の競争力強化

【期待される成果】

安心安全の革新的低侵襲ナノ医療の実現：

ピタバ NP 注射製剤あるいは吸入製剤の実用化によるピタバスタチンの病巣選択的送達が可能になれば、重症肺高血圧症に対する革新的低侵襲治療法となり、患者の QOL・生命予後の改善や早期社会復帰を可能とする高効果・低副作用の低侵襲医療が達成できる。日本発の革新的低侵襲ナノ治療が創出される点で臨床的意義は大きい。

本ナノ DDS 技術は肺高血圧症以外の難治性疾患（特発性間質性肺炎・肺線維症、びまん性汎細気管支炎）や閉塞性肺疾患、肺ガンの治療にも応用できることから（適応拡大）、臨床的ならびに市場的重要性が高い。

ピタバスタチン以外のコンセプトの異なる新薬とナノ DDS 技術の融合によって、全く新しいナノ粒子製剤の実用化も可能であり、将来性も高い。

国民・社会への貢献：

生活の質や予後を改善する高効果・低副作用の希少疾病用医薬品が実用化できる。

また、国際競争力を有する「世界標準」ナノ医療の誕生によって、新しい医療産業がもたらされ雇用が創出できることから、我が国の医療産業の競争力強化への貢献も極めて大きい。

【行政への貢献】

本研究は日本発の独創的なナノ医療を創出することに焦点を絞ったナノ医工薬学融合研究であるだけでなく、適切な日本企業の参加によって推進される産官学連携による実用化を目指した研究開発である。

新成長戦略 2010 のライフイノベーションによる健康大国戦略に沿った研究開発であり重要性は極めて高い。新産業の創出がもたらされることから、厚生労働科学に対する貢献は充分大きい。

4. 独創的な点と特色

ピタバ NP は気管内投与、あるいは静脈内投与によって、肺の責任病変に送達され、肺細動脈病変の進行を抑制するだけでなく、治癒に導くことが出来る効果を有している。このように格段に優れた治療効果と低副作用の医薬品はこれまでに全く無いことから、独創性が極めて高い。

ピタバ NP の国内外特許は各国で登録されつつある（国内特許登録、欧州特許登録、米国特許審査中、中国特許登録、その他は審査中）。

本研究は、先端医療開発スーパー特区の研究課題であり、九州大学に設備された分子イメージングシステム（256 列 Brilliance™ iCT、超音波診断装置 VEVO2100、血管造影装置、分子標的造影剤 nanotracker）を活用して、分子細胞病態の解析とナノ治療の効果を評価できるので、格段に優れた成果が期待できる。

5. 研究計画・方法

【実用化を目指した研究開発体制】

本研究開発は研究代表者の江頭が統括し、以下の課題を推進する：

- (1) ピタバ NP 注射製剤を用いた第Ⅰ相試験（治験）（単回静脈内投与試験、反復投与試験）
- (2) POC 取得のための探索的Ⅱ相試験の準備
- (3) ピタバ NP 吸入投与の治験を実施するための非臨床試験（製剤の最適化と安全性試験）

- 分担研究者の中西は、橋渡し拠点である ARO 次世代医療センターのセンター長として、医師主導治験のための倫理審査・臨床試験計画立案・薬事・試験物製造や管理などの業務支援を行う。
- 興和株式会社はピタバスタチン内服製剤（リバロ錠）の研究開発・販売の実績があり、ピタバスタチンに関する豊富な情報・経験を有することから、本研究開発について提携し、ピタバ NP 注射製剤の製造、吸入製剤の設計・開発および安全性試験などを担当する。
- 治験は文科省の橋渡し拠点である九州大学病院の ARO 次世代医療センターで行う。
- 承認申請資料のデータマネジメントなどは医薬品医療機器総合機構（PMDA）審査官の経験を持ち、レギュラトリーサイエンスの専門家である戸高が担当する。
- 承認に支障が生じないように、医師主導治験の実施に際しては規制当局である PMDA と適宜情報交換する。

【研究計画】

治験デザインや非臨床試験パッケージについては、PMDA の薬事戦略相談を行い、必要に応じて修正する。また、治験実施に当たっては、希少疾病用医薬品申請を行い、早期実用化を目指す。

(1) 医師主導治験の実施

- ① 第Ⅰ相単回静脈内投与試験：平成 24 年度
第Ⅰ相単回静脈内投与試験を実施する。
- ② 第Ⅰ相反復静脈内投与試験：平成 25 年度
第Ⅰ相単回静脈内投与試験終了後、第Ⅰ相反復静脈内投与試験を実施する。
- ③ 探索的Ⅱ相試験：平成 25～26 年度
第Ⅰ相反復静脈内投与試験終了後、探索的Ⅱ相試験を実施する。

(2) ピタバ NP の非臨床試験など

- ① ピタバ NP 注射製剤治験薬製造：平成 24 年度
医師主導治験のための治験薬製造を行う。
- ② 薬効薬理試験：平成 24～26 年度
薬効発現に最適な臨床における用法用量設定のための薬効薬理試験をマウス、ラット、ウサギ、サルなどで実施する。

③ 安全性試験：平成 24～25 年度

探索的Ⅱ相試験を実施する前に、GLP 基準下でマウス、ラット、イヌにおける 12 週間反復投与毒性試験を実施する。

(3) NK-104-NP 吸入製剤の開発と治験

① 吸入製剤処方検討：平成 24 年度

ピタバ NP をマイクロサイズに複合化するために最適な賦形剤と製造条件の検討を行って、吸入投与に最適な粒子径分布の吸入製剤を作製し、吸入製剤の再分散性の評価を行う。

② ピタバ NP 吸入製剤の試作：平成 25 年度

最適な処方を選択した NK-104-NP 吸入製剤の試作を行う。

③ ピタバ NP 吸入製剤の吸入デバイスの評価：平成 25～26 年度

選択した吸入製剤に適合する吸入デバイスを検討し、肺深部への送達の評価を行う。

④ ピタバ NP 吸入製剤の GMP 製造：平成 26 年度

ピタバ NP 吸入製剤の GMP 製造の検討を行う。

※静脈内投与による治験を先行実施し、静脈内投与による治療の早期実用化を目指す。同時に、より低侵襲で安全安心な吸入製剤を早期実用化するため、更なる製剤改良を継続検討する。

6. 平成25年度の成果

【当初の研究計画との比較】

- 薬理薬効試験（モノクロタリン誘導誘導肺高血圧症ラットモデル）において、進行し確立した肺高血圧病態をピタバスタチン封入ナノ粒子製剤が改善することが明らかにした。このことは、本治療によって現在治療法に限界のある肺高血圧症患者を治癒に導くことが出来る可能性を示唆している。
- 昨年度（平成24年度）の対面助言で合意して今年度（平成25年度）に実施した非臨床データ及び毒性試験の結果を基にして、平成25年11月11日にPMDAと薬事戦略相談を再度実施した。さらに、平成25年12月25日に「対面助言」を実施し、治験実施体制とデザインについて合意を得た。実施体制の再確認のために平成26年3月に再度相談を行い、最終合意に達した。平成26年7月に治験計画届を提出し、平成26年9月に第一相試験（医師主導治験）を開始する予定である。
- 当初の予定では、平成26年3月に治験届け提出、5月に第一相試験開始の見込みであったが、PMDAとの合意に時間を要したため治験開始が4か月遅くなった。

【実用化を目指した研究開発体制の進捗】

1. 特許1（スタチン封入ナノ粒子含有医薬組成物）：

日本特許登録、中国特許登録、米国、EU、インドなど順次登録予定

2. 特許2（肺疾患治療薬）：

日本特許登録、中国、香港、EU特許登録、米国、など順次登録予定

3. 医薬品医療機器総合機構（PMDA）との情報交換：

PMDAと薬事戦略相談ならびに対面助言を実施し治験実施体制とデザインについて合意を得た。即ち、第一相試験は、九州大学病院と医療法人相生会臨床薬理センター 博多クリニックの多施設体制で実施する。

【研究開発項目ごとの全体計画と年次計画の進捗】

1. 医師主導治験の実施：平成24～26年度

平成12月25日の「対面助言」において、第I相試験（単回投与）の実施体制とデザインについて合意を得た。

2. ピタバNPの非臨床試験等：平成24～26年度

GLP基準下でラットおよびイヌにおける2週間反復持続静脈内投与毒性試験、薬物動態試験などを実施した。この追加試験によって初回投与量を「より高用量」にすることができた。

3. ピタバNP吸入製剤の開発と臨床治験：平成24～26年度

選択した吸入製剤に適合する吸入デバイスを検討した。

7. 考察と今後の展開

(1) 医師主導治験の実施

① 第Ⅰ相単回静脈内投与試験

平成25年度にPMDAとの薬事戦略相談ならびに対面助言を完了した。平成26年度に、ピタバNP注射製剤を用いた持続点滴静脈内持続投与での第Ⅰ相単回投与試験を実施する。

その成果を受けて、平成27年度以降にPMDAと協議を行い、第Ⅰ相反復持続点滴静脈内投与試験を開始する予定である。

(2) ピタバNPの非臨床試験など

① ピタバNP注射製剤治験薬製造

第Ⅰ相単回持続点滴静脈内投与試験の開始に合わせ、平成25年度に治験薬の準備を行った。

② 薬効薬理試験

ラットモノクロタリン誘発性肺高血圧症モデルにおいて、ピタバNPの静脈内投与の有効性が明らかになった

さらに、ピタバNPの優位性を明らかにするために、既存の市販薬（PGI2アナログ、PDE阻害薬、cGMP刺激薬など）との比較研究を実施する。

③ 安全性試験

医師主導治験として行う第Ⅰ相単回持続点滴静脈内投与試験の実施に必要な安全性試験が終了した。

また、第Ⅰ相反復持続点滴静脈内投与試験の実施のためのピタバNPのイヌにおける14日間静脈内持続注入反復投与毒性試験および14日間回復試験を終了した。

(3) ピタバNP吸入製剤の開発と治験

継続して吸入性剤の製剤化技術を検討する。気管内投与の非臨床試験はほぼ完了しているので、製剤化に成功すれば、臨床試験開始の為のPMDAとの情報交換を実施できる。

8. 健康危険情報

なし

9. 研究発表

- 1) 国内 口頭発表： 5件
原著論文による発表： 0件
それ以外（レビュー等）の発表： 7件
- 2) 国外 口頭発表： 2件
原著論文による発表： 1件
それ以外（レビュー等）の発表： 1件

10. 知的財産権の出願・登録状況

出願 0件：

国内公開 0件

国際公開 0件

登録 0件：

【研究成果の刊行に関する一覧表】

(1) 学会誌など発表

<英文原著>

1. 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.

<Review>

1. Matoba T, Sato K, Egashira K: Mouse models of plaque rupture. ***Curr Opin Lipidol***. 2013; 24: 419-425.

(2) 口頭発表

<国内学会>

1. 先端医療研究セミナー（平成 25 年 4 月 9 日、東京）江頭健輔：難治性心血管病に対する革新的ナノ医療の実用化と臨床試験（特別講演）
2. 第 113 回日本外科学会定期学術集会（平成 25 年 4 月 11 日、福岡）江頭健輔：血管選択的 DDS ナノ粒子製剤の開発による重症虚血肢に対する治療的血管新生の実用化（ランチョンセミナー）
3. 第 4 回「新しい医療」講演会（平成 25 年 6 月 3 日、福岡）江頭健輔：難治性心血管病に対する革新的ナノ医療の実用化と臨床試験（特別講演）
4. 榊原記念病院定例講演会（平成 25 年 10 月 21 日、東京）江頭健輔：難治性心血管病に対する革新的ナノ医療の実用化と臨床試験（特別講演）
5. 第 8 回医療機器産業研究会 新たな医療機器開発の方向性と産業戦略（平成 26 年 3 月 31 日、東京）江頭健輔：臨床ニーズに基づく低侵襲医療機器開発と産学連携

<国際学会>

1. The Annual Scientific Meeting of Taiwan Society of Lipids & Atherosclerosis 2013 (September 14-15, 2013, Taipei) Egashira K: Nanoparticle-mediated targeting of pitavastatin for developing innovative therapeutic strategies in refractory cardiovascular diseases. (Invited lecture)

2. Scientific Sessions 2013 of the American Heart Association (November 16-20 2013, Dallas) Ichimura K, Nakano K, Nagaoka K, Matoba T, Egusa S, Sunagawa K, Egashira K: Nanoparticle-Mediated Targeting of Pitavastatin into Reperfused Myocardium Reduces Ischemia-Reperfusion Injury in a Preclinical Pig Model

(3) 出版物

<総説>

1. 江頭健輔、中野覚：シーズ成果報告〈医薬品〉急性心筋梗塞症治療用ナノ粒子製剤の実用化のための橋渡し研究. 臨床評価 臨床評価刊行会 2013 ; 41(1) : 68-71
2. 江頭健輔、中野覚、松本拓也、前原喜彦：シーズ成果報告〈医薬品〉虚血肢治療用低侵襲ナノ粒子製剤の実用化. 臨床評価 臨床評価刊行会 2013 ; 41(1) : 72-74
3. 江頭健輔、中野覚：特集「九大病院の先端医療について」 重症肺高血圧症用ナノ粒子製剤の実用化と臨床試験. 九大医学部同窓会誌 学士鍋 九州大学医学部同窓会 2014 ; 170 : 10-11

<新聞報道>

1. 平成 25 年 5 月 19 日掲載、msn 産経ニュース「『私自身も難病に苦しんだ』首相が先端医療の現場視察」
2. 平成 25 年 5 月 19 日掲載、朝日新聞 「安倍首相、先端医療の輸出強調 九州視察で成長戦略説く」
3. 平成 25 年 5 月 20 日掲載、産経新聞「難病治療『私の天命』首相、九大病院を視察」
4. 平成 25 年 5 月 21 日掲載、九州大学ホームページ「安倍晋三内閣総理大臣が九州大学を視察」

【研究成果の刊行物・別刷】

○をつけた論文の別刷あるいは資料を次のページ以降に添付します。

Nanoparticle-Mediated Delivery of Pitavastatin Inhibits Atherosclerotic Plaque Destabilization/Rupture in Mice by Regulating the Recruitment of Inflammatory Monocytes

Shunsuke Katsuki, MD; Tetsuya Matoba, MD, PhD; Soichi Nakashiro, MD; Kei Sato, PhD; Jun-ichiro Koga, MD, PhD; Kaku Nakano, PhD; Yasuhiro Nakano, MD; Shizuka Egusa, PhD; Kenji Sunagawa, MD, PhD; Kensuke Egashira, MD, PhD

Background—Preventing atherosclerotic plaque destabilization and rupture is the most reasonable therapeutic strategy for acute myocardial infarction. Therefore, we tested the hypotheses that (1) inflammatory monocytes play a causative role in plaque destabilization and rupture and (2) the nanoparticle-mediated delivery of pitavastatin into circulating inflammatory monocytes inhibits plaque destabilization and rupture.

Methods and Results—We used a model of plaque destabilization and rupture in the brachiocephalic arteries of apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice fed a high-fat diet and infused with angiotensin II. The adoptive transfer of CCR2^{+/+}Ly-6C^{high} inflammatory macrophages, but not CCR2^{-/-} leukocytes, accelerated plaque destabilization associated with increased serum monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), monocyte-colony stimulating factor, and matrix metalloproteinase-9. We prepared poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles that were incorporated by Ly-6G-CD11b⁺ monocytes and delivered into atherosclerotic plaques after intravenous administration. Intravenous treatment with pitavastatin-incorporated nanoparticles, but not with control nanoparticles or pitavastatin alone, inhibited plaque destabilization and rupture associated with decreased monocyte infiltration and gelatinase activity in the plaque. Pitavastatin-incorporated nanoparticles inhibited MCP-1-induced monocyte chemotaxis and the secretion of MCP-1 and matrix metalloproteinase-9 from cultured macrophages. Furthermore, the nanoparticle-mediated anti-MCP-1 gene therapy reduced the incidence of plaque destabilization and rupture.

Conclusions—The recruitment of inflammatory monocytes is critical in the pathogenesis of plaque destabilization and rupture, and nanoparticle-mediated pitavastatin delivery is a promising therapeutic strategy to inhibit plaque destabilization and rupture by regulating MCP-1/CCR2-dependent monocyte recruitment in this model. (*Circulation*. 2014;129:896-906.)

Key Words: monocytes ■ myocardial infarction ■ nanoparticles ■ plaque ■ statins, HMG-CoA

Coronary heart disease is the leading cause of death worldwide, and at least 7 million patients die of this disease each year (386 324 people in the United States alone).¹ Acute myocardial infarction (AMI) is the most severe type of coronary heart disease and the most frequent cause of heart failure, and it impairs the quality of life and inflates medical costs. Timely and successful revascularization therapy for AMI reduces short-term mortality, and current standard medical therapy with angiotensin-converting enzyme inhibitors and β -blockers ameliorates the development of post-myocardial infarction heart failure. However, these recent advances in therapeutic intervention for AMI are associated with an increased prevalence of heart failure with high long-term mortality, which remains a serious concern.² In the United States, 5.1 million people experienced heart failure in 2010, and 274 601 people

died of heart failure in 2009.¹ Therefore, there is an urgent need for preventive treatment to avoid plaque destabilization and rupture, which directly cause AMI.

Clinical Perspective on p 906

Rupture-prone unstable atherosclerotic plaques feature monocyte/macrophage infiltration, lipid core formation, and fibrous cap thinning by matrix metalloproteinases (MMPs).³ Recent reports suggest that monocytes are functionally polarized into at least 2 major subsets: Inflammatory monocytes (CD14⁺⁺CD16⁻ in humans and Ly-6C^{high}CCR2⁺CX3CR1^{low} in mice) and anti-inflammatory monocytes (CD14⁺CD16⁺ in humans and Ly-6C^{low}CCR2⁻CX3CR1^{high} in mice).⁴ Inflammatory monocytes are found in the peripheral blood of patients with AMI,⁵

Received April 2, 2013; accepted November 15, 2013.

From the Department of Cardiovascular Medicine (S.K., T.M., S.N., J.K., Y.N., S.E., K. Sunagawa) and Department of Cardiovascular Research, Development, and Translational Medicine (K. Sato, K.N., K.E.), Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://circ.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002870/-/DC1>.

Correspondence to Kensuke Egashira, MD, PhD, FAHA, Department of Cardiovascular Research, Development, and Translational Medicine, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan. E-mail egashira@cardiol.med.kyushu-u.ac.jp

© 2013 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://circ.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002870

which suggests that they have a pathological role in plaque destabilization; however, substantial proof for a causative role of inflammatory monocytes in the pathogenesis of plaque destabilization and rupture is lacking.

HMG-CoA reductase inhibitors (statins) lower serum cholesterol levels and reduce cardiovascular events and mortality by 32% to 37% in primary prevention trials^{6,7} and 24% to 30% in secondary prevention trials.^{8,9} Data from clinical trials indicate that although the intensive use of statins reduces serum C-reactive protein levels and cardiovascular risk and attenuates the progression of coronary artery plaque,^{10–13} the risk reduction caused by on-label doses of statins remains insufficient to suppress AMI.¹⁰ In animals, plaque-stabilizing effects have been observed after high doses of statins.^{14–18} Statins exert multiple vasculoprotective effects on endothelial cells, vascular smooth muscle cells, and monocytes.^{19–21} Thus, we hypothesized that the controlled delivery of statins to inflammatory monocytes and atherosclerotic plaques might optimize the plaque-stabilizing effects of statins.

Recently, we developed a novel nanoparticle-mediated drug-delivery system (DDS) that is formulated from bioabsorbable poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) polymer, and we reported that nanoparticles were taken up by a variety of cells, such as monocytes, vascular smooth muscle cells, and endothelial cells. In addition, the nanoparticle-mediated DDS showed a significant enhancement in the therapeutic effects on ischemia-induced neovascularization^{22,23} and pulmonary arterial hypertension²⁴ in animal models compared with conventional administration. Nanoparticles are rapidly taken up by circulating monocytes and the mononuclear phagocytic system after intravenous administration,²⁵ and nano-sized contrast agents accumulate in atherosclerotic plaques.²⁶ To the best of our knowledge, no prior studies have addressed whether polymeric nanoparticles accumulate in unstable atherosclerotic plaques after intravenous administration or whether the nanoparticle-mediated delivery of pitavastatin has therapeutic effects on plaque destabilization and rupture in vivo. Therefore, we tested the hypotheses that (1) inflammatory monocytes play a causative role in plaque destabilization and rupture and (2) the nanoparticle-mediated delivery of pitavastatin inhibits plaque destabilization and rupture by targeting inflammatory monocytes.

Methods

Experimental Animals

Male apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice on the C57BL/6J genetic background were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). ApoE^{-/-}CCR2^{-/-} and ApoE^{-/-}CCR2^{+/+} mice with the same genetic background (C57BL/6J and 129/svjae hybrids) were used.²⁷ Animals were maintained on a 12-hour light-dark cycle with free access to normal rodent chow and water.

Diet Preparation

A high-fat diet that contained 21% fat from lard and was supplemented with 0.15% (wt/wt) pure cholesterol (Oriental Yeast, Tokyo, Japan) was prepared according to the formula recommended by the American Institute of Nutrition. Additional details can be found in the online-only Data Supplement.

Experimental Protocol

The study protocol was reviewed and approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences. The 4 sets of animal experiments are depicted in a schematic in Figure I in the online-only Data Supplement. Brachiocephalic arteries were isolated with the aortic arches. Isolated samples were fixed in 3.7% formaldehyde for histological and immunohistochemical analyses or were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for biochemical analysis. Additional details for each experimental protocol can be found in the online-only Data Supplement.

Histopathology and Immunohistochemistry

Histopathological and immunohistochemical evaluations were performed to quantify atherosclerosis and examine both plaque morphology and the mechanism of plaque destabilization and rupture. Atherosclerotic plaques were stained with oil red O, and cross sections of the brachiocephalic arteries and aortic root were stained with elastica van Gieson, antimacrophage surface glycoprotein Mac3, and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Additional details are provided in the online-only Data Supplement.

Flow Cytometry

Leukocytes from peripheral blood and the spleen and peritoneal cells were obtained from mice and analyzed with a FACSCalibur cytometer (Becton-Dickinson Biosciences, San Jose, CA). Additional details can be found in the online-only Data Supplement.

Preparation of PLGA Nanoparticles

PLGA nanoparticles encapsulated with FITC (FITC-NP), pitavastatin (pitavastatin-NP) and 7ND plasmid (7ND-NP) were prepared by use of an emulsion solvent diffusion method, as reported previously.^{22–24} Additional details can be found in the online-only Data Supplement.

In Vivo Kinetics of the Nanoparticles

Excised aortas from the atherosclerotic mice were intravenously injected with or without FITC-NP and were evaluated by stereoscopic and fluorescence microscopy. Sections of the brachiocephalic artery were evaluated by fluorescence microscopy or were stained with hematoxylin and eosin. Additional details can be found in the online-only Data Supplement.

In Situ Zymography

Gelatinase (MMP-2/gelatinase-A and MMP-9/gelatinase-B) activity was measured in unfixed frozen sections with quenched fluorescein-labeled gelatinase substrate (DQ gelatin; Invitrogen, Eugene, OR).²⁸ Additional details can be found in the online-only Data Supplement.

Gelatin Zymography

The lipopolysaccharide-induced gelatinase activity of RAW264.7 cells was measured with a gelatin Zymo electrophoresis kit (Primary Cell, Hokkaido, Japan) according to the manufacturer's directions. Additional details can be found in the online-only Data Supplement.

Real-Time Quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction

Real-time polymerase chain reaction amplification was performed with mouse cDNA with the use of the ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, CA), as described previously.²⁹ The polymerase chain reaction primers and TaqMan probes we used can be found in the online-only Data Supplement.

Chemotaxis Assay

The chemotactic activity of THP-1 cells in response to MCP-1 was measured by a Boyden chamber method, as described previously.³⁰ Additional details can be found in the online-only Data Supplement.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean±SE. For analysis of the number of buried/disrupted fibrous caps, differences were analyzed statistically by ANOVA followed by the Dunn multiple comparison test, and differences between 2 groups were analyzed with the Mann-Whitney test. For the other analyses, differences were analyzed statistically by ANOVA followed by post hoc Bonferroni or Dunnett multiple comparison tests. Differences between 2 groups were analyzed with an unpaired *t* test. *P*<0.05 was considered significant.

Results

Adoptive Transfer of Inflammatory Macrophages Accelerated Plaque Destabilization and Rupture

To clarify the role of inflammatory monocyte/macrophages in plaque destabilization and rupture, we first examined whether the adoptive transfer of inflammatory macrophages accelerates plaque destabilization and rupture in a murine model. We collected thioglycollate-induced peritoneal leukocytes from ApoE^{-/-}CCR2^{+/+} mice that contained Ly-6C^{high} inflammatory macrophages and from ApoE^{-/-}CCR2^{-/-} mice that contained <5% inflammatory macrophages (Figure IIA and IIB in the online-only Data Supplement).^{4,31} ApoE^{-/-} mice were assigned to the no-treatment group, the CCR2^{+/+} inflammatory macrophage group (1×10⁶ peritoneal leukocytes

from ApoE^{-/-}CCR2^{+/+} mice), or the CCR2^{-/-} leukocyte group (1×10⁶ peritoneal leukocytes from ApoE^{-/-}CCR2^{-/-} mice). The adoptive transfer of CCR2^{+/+} inflammatory macrophages tended to increase the incidence of disrupted/buried fibrous caps. The adoptive transfer of CCR2^{-/-} leukocytes significantly decreased the incidence of disrupted/buried fibrous caps compared with that of CCR2^{+/+} inflammatory macrophages (Figure 1A; Table 1). These results demonstrate that inflammatory macrophages responsible for plaque rupture are recruited from the circulation via MCP-1/CCR2 signaling, which suggests a role for peripheral Ly-6C^{high} monocytes as the precursor of inflammatory macrophages. Because splenic monocytes show a phenotype comparable to that of peripheral monocytes,³² we purified splenic monocytes from ApoE^{-/-} mice fed a high-fat diet and examined whether the adoptive transfer of splenic monocytes accelerated plaque destabilization and rupture in the same model. We confirmed ≈90% purity of splenic monocytes after negative selection using magnetic cell separation, ≈85% of which expressed a high level of Ly-6C (Figure IIIA in the online-only Data Supplement). Consistent with the data from the adoptive transfer of CCR2^{+/+} peritoneal macrophages, the adoptive transfer of splenic monocytes tended to increase the incidence of disrupted/buried fibrous caps (*P*=0.056; Figure IIIB in the online-only Data Supplement), which confirms the detrimental role of inflammatory monocyte/macrophage lineage in atherosclerotic plaque rupture (Figure IIIB in the online-only Data Supplement).

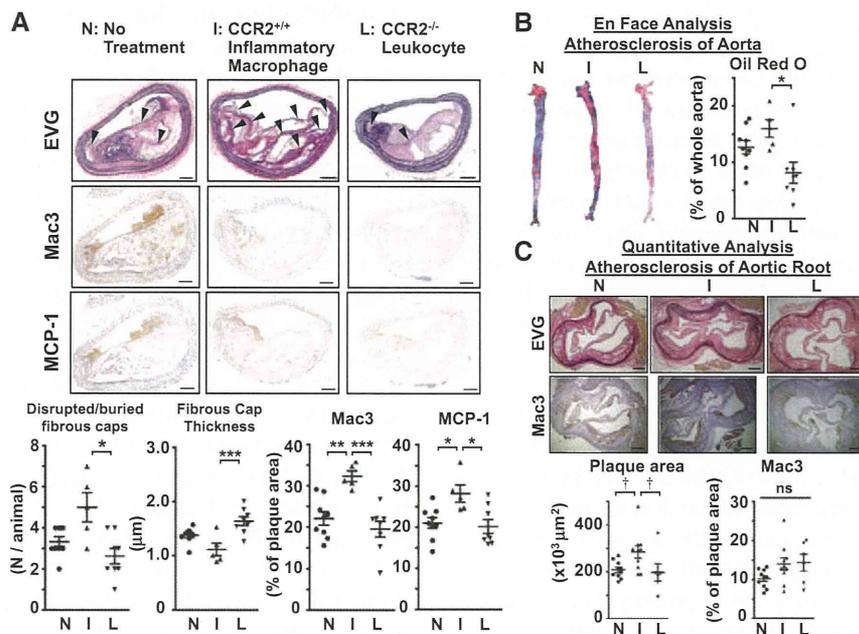


Figure 1. The adoptive transfer of inflammatory macrophages accelerated plaque destabilization and rupture. **A, Top,** Photomicrographs of atherosclerotic plaques in the brachiocephalic artery stained with elastica van Gieson (EVG), the antimacrophage surface glycoprotein Mac3, and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the no-treatment (N), CCR2^{+/+} inflammatory macrophage (I), and CCR2^{-/-} leukocyte (L) groups. Arrowheads indicate disrupted/buried fibrous caps. Scale bar=100 μm. **Bottom,** Quantitation of the number of disrupted/buried fibrous caps, fibrous cap thickness, and Mac3- and MCP-1-positive areas. Data are mean±SEM. **P*<0.05, ***P*<0.01, and ****P*<0.001 vs CCR2^{+/+} inflammatory macrophage group. **B, Top,** Photomicrographs of the intraluminal surface of the total aorta, stained with oil red O. **Bottom,** Quantitation of the percentage of oil red O-positive area compared with total luminal surface area. Data are mean±SEM. **P*<0.05 vs CCR2^{+/+} inflammatory macrophage group. **C, Top,** Photomicrographs of atherosclerotic plaques in aortic root stained with EVG or Mac3. **Bottom,** Quantitation of plaque size and Mac3-positive areas. Scale bar, 200 μm. Data are mean±SEM. †*P*<0.05 vs CCR2^{+/+} inflammatory macrophage group by 1-way ANOVA followed by Dunnett multiple comparison tests.