

博士論文

ラット頸動脈内膜肥厚モデルにおけるナノ医療の検証

谷口 良輔

目次

要旨 P. 4

序文

アテローム性動脈硬化症、内膜肥厚の問題 P. 5

内膜肥厚に対する従来の薬物治療とその限界 P. 7

ナノサイズキャリアーを DDS に用いたナノ医療 P. 7

内膜肥厚におけるナノ医療 P. 8

本研究の着眼点、仮説、実験概要 P. 9

PIC-nanocarrier、NC-6300 の血中滞留性、臓器分布 P.12

実験① 内膜肥厚病変におけるナノ粒子の集積性の検証

方法①

Cy5-labeled PIC-nanocarrier の合成 P. 16

動物モデルの作成 P. 18

PIC-nanocarrier の投与 P. 20

PIC-nanocarrier 集積のイメージングによるマクロ評価 P. 20

PIC-nanocarrier 集積の組織学的評価 P. 21

統計解析 P. 23

結果①

PIC-nanocarrier の集積性(マクロ評価)	P. 24
PIC-nanocarrier の集積性(マイクロ評価)	P. 28
PIC-nanocarrier とマクロファージ・SMC の局在性	P. 32

実験② 内膜肥厚病変における epirubicin 含有ナノミセル(NC-6300)の治療効果の検証

方法②

Epirubicin 含有ナノミセル(NC-6300)の合成	P. 36
NC-6300 集積の評価	P. 39
NC-6300 の薬理学的効果	P. 39
統計解析	P. 40

結果②

内膜肥厚病変における NC-6300 の集積性	P. 41
NC-6300 の薬理学的効果	P. 43

考察	P. 46
----	-------

結論	P. 54
----	-------

謝辞	P. 55
----	-------

引用文献	P. 56
------	-------

ラット頸動脈内膜肥厚モデルにおけるナノ医療の検証

東京大学大学院医学系研究科外科学専攻 血管外科

指導教員 渡邊聡明教授

谷口良輔

要旨

動脈硬化病変に対する drug delivery system (DDS) の開発のため、ラット内膜肥厚モデルに各種サイズのナノ粒子を全身投与し、直径 40 nm のナノ粒子が既存の内膜肥厚病変に特異的に集積することを明らかにした。更にこのサイズ効果のエビデンスに基づき、適切なサイズの epirubicin 内包ナノ粒子を投与することにより内膜肥厚抑制効果も示した。複雑なリガンドや抗体等を用いず、単純なサイズ調整のみで内膜肥厚病変への特異的集積性を証明した本研究は新たな知見であり、ヒトの動脈硬化病変とラット内膜肥厚病変との相同性から、ナノ粒子を用いた本 DDS はヒトにおける動脈硬化関連疾患の治療に応用できると考える。

序文

アテローム性動脈硬化症、内膜肥厚の問題

アテローム性動脈硬化症(atherosclerosis)の発生に関しては諸説あるが、従来の血管傷害反応説[1]では①血管内皮傷害、②内膜肥厚、③リポ蛋白の沈着、④マクロファージによる貪食(泡沫細胞形成)、⑤プラーク・線維性被膜形成がその主なメカニズムとされている。

この結果として動脈は狭窄もしくは閉塞に至り、更にプラーク破綻等がリスクとなり、脳血管疾患、冠動脈疾患、末梢動脈疾患等のいわゆる動脈硬化関連疾患が生じる[1]。これら動脈硬化関連疾患は現在主要欧米先進国における死亡原因のトップであり[2]、本邦においても食生活の欧米化に伴い増加し、現在は悪性新生物に次ぐ死亡原因となっている[3]。

治療の第一選択は薬物療法が基本となることが多く、様々な薬剤が開発・適用されている[4]。しかしながら、これらが十分な効果を発揮できない難治性の症例も多く、アウトカムの改善のために血管内カテーテル治療や外科的手術等の侵襲的治療を余儀なくされることがある。具体的には急性心筋梗塞・狭心症に対する経皮的冠動脈インターベンション(percutaneous coronary intervention:PCI)または冠動脈バイパス術(coronary artery bypass grafting:CABG)[5]、重症下肢虚血(critical limb ischemia:CLI)に対する下肢バイパス術などが挙げられる[6]。ただし、これらによる治療効果も永続的なものではなく、その後には生じ得る内膜肥厚(intimal hyperplasia)が大きな再燃要因として立ちはだかる[7, 8]。

前述の血管傷害反応説によると、内膜肥厚の発生メカニズムは、血管に傷害が加わり内

皮細胞が剥皮されると血小板凝集が起こることから始まる[9]。同時に中膜における平滑筋細胞 (smooth muscle cell: SMC) が局所での増殖を始める[10]。増殖した SMC は血小板由来成長因子 (platelet derived growth factor: PDGF) などにより内弾性板を越えて内膜側に遊走し、更に局所で増殖する[11]。これに SMC による細胞外基質 (extracellular matrix: ECM) の合成が加わり内膜肥厚が形成される[10] (図 1)。

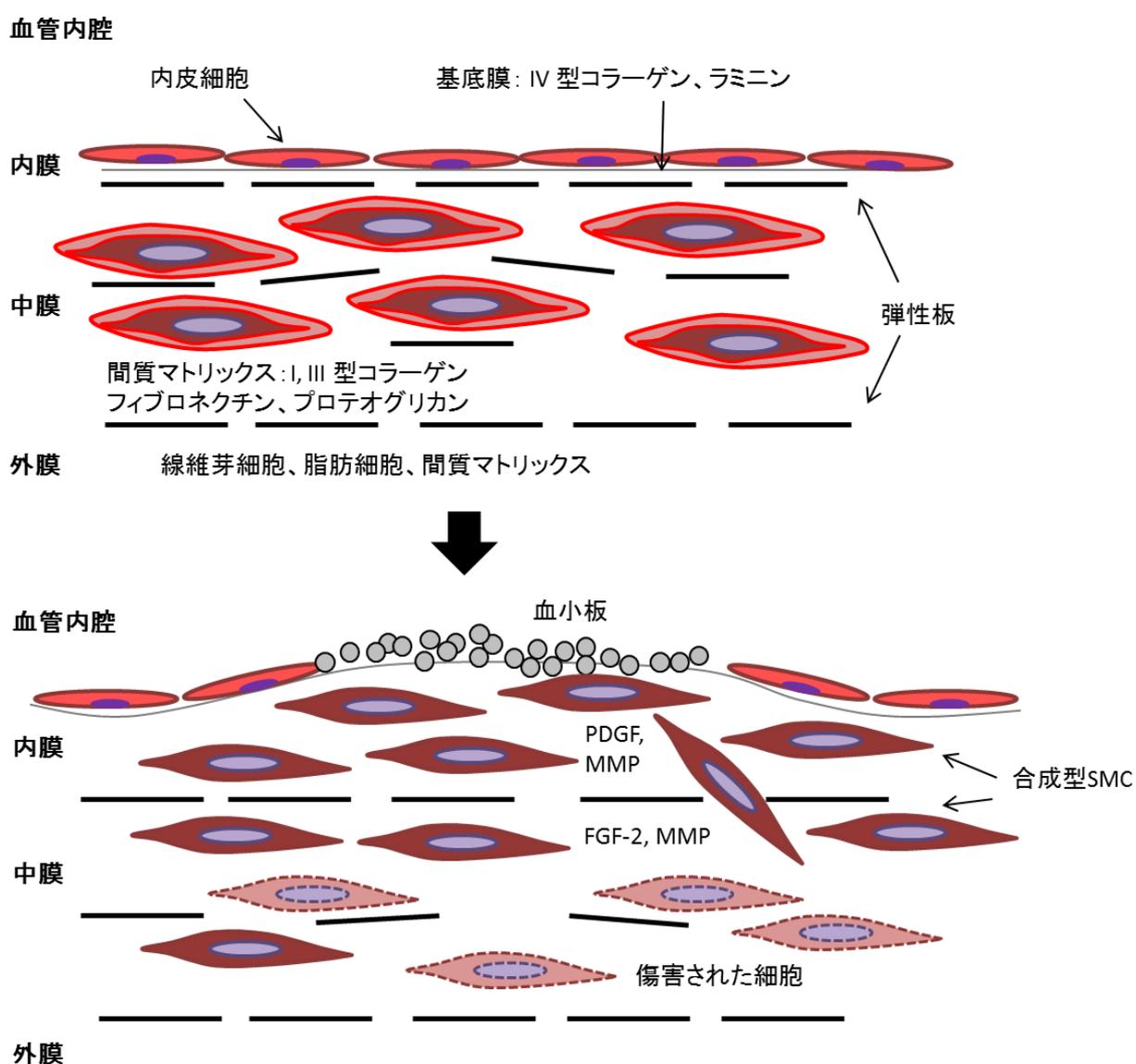


図 1 内膜肥厚 (intimal hyperplasia) の発生メカニズム
血管障害に対する反応 (response to injury) として中膜の平滑筋細胞 (SMC) は内膜側に遊走し増殖する。

内膜肥厚に対する従来の薬物治療とその限界

内膜肥厚に対する薬物治療の歴史上、エポックメイキングであったのは 1990 年代後半の薬物溶出ステント (drug eluting stent: DES) の登場である[12]。これは PCI で使用されていた従来のベアメタルステント使用後の再狭窄を打開するものとして開発され、シロリムス(ラパマイシン)やパクリタキセルなどの SMC 増殖抑制作用を持つ薬剤をステントにコーティングすることで、ステント留置後に生じる内膜肥厚を抑制した[13, 14]。DES は実臨床において内膜肥厚の抑制に成功した一例ではあるが、薬剤の投与形式はあくまでも局所投与ということになる。一方で、全身投与可能な薬剤で、DES と同様の内膜肥厚の抑制効果を示すものは少ない。

従来の薬物治療の限界の一つとして、低分子量薬剤の全身への非特異的な拡散性により、治療を要する病変部位への選択的分布が困難であることが挙げられる。局所での有効濃度を上げるためには必然的に投与量を増やさざるを得ず、他の臓器への副作用が問題となる。そこで薬剤の体内分布を量的・空間的・時間的に制御し、その治療対象である疾患部位に選択的に送り込む(ターゲティングする)手法、すなわち有効なドラッグデリバリーシステム (drug delivery system: DDS) の必要性が生じた。

ナノサイズキャリアーを DDS に用いたナノ医療

このようなターゲティング治療を可能にする薬物運搬体(ドラッグキャリアー)には、①病変に選択的に集積すること、②キャリアー自体の安定性が適度に制御可能であること、③血中

滞留性に優れること(すなわち生体内で異物として認識されず貪食を免れ、かつ腎糸球体で濾過されない(約10 nm以上のサイズである)こと)が求められる。これを実現すべく、ナノ単位で精密に設計された様々な高機能化ドラッグキャリアーの開発が進み、近年では直径100 nm前後のナノサイズキャリアー粒子(nanocarrier)を用いたDDSにより疾患を治療する、いわゆるナノ医療(nanomedicine)が癌治療領域を中心として開発・研究されてきた[15-18]。元来このナノ医療が癌治療の分野において進んだのは、癌の病理学的特徴である過剰な血管新生、未熟な血管構造、リンパドレナージの障害を基盤としたenhanced permeability and retention (EPR) 効果が背景となっている[19]。つまり、癌組織における新生血管の血管内皮には、正常組織には見られない十から数百nmの間隙が存在し、適度の大きさのnanocarrierを用いれば、長時間の血中滞留性を得ると同時に、癌組織に対しては血管内皮間隙を介しての受動的集積を得ることが出来ることになる。

内膜肥厚におけるナノ医療

2000年代以降、本研究の対象となる病態である内膜肥厚を含めた血管疾患に対してもこのナノ医療に関する研究が増えてきた[20-29]。動物モデルを用いた研究では、ナノキャリアーを用いたDDSによる内膜肥厚の抑制効果が報告されている。しかしこれらの研究の問題点や未解決点としていくつかの事項が挙げられる。

まず一つ目として薬剤の投与方法がある。一部の例外はあるものの、ほとんどの研究においては局所投与の形式がとられている。具体的には病変部の前後を遮断した状態で血管

内カテーテルより薬剤を直接散布する方法[21, 22, 25, 26, 29]や、血管を露出した状態で周囲に直接散布する方法[23]などである。これらは臨床的には PCI や手術等の補助的な治療として位置づけられるものであり、侵襲性が前提となる。非侵襲性を指向するという観点においては静脈内投与や経口投与などの全身投与系での実験系が望ましいと言えよう。

二つ目の問題としては薬剤投与のタイミングが挙げられる。過去の研究において薬剤投与は内膜肥厚誘導のための血管傷害直後に行われている[20-29]。血管に傷害が加わると先述のように直後から内膜肥厚形成のための様々な反応が起こるので、これらの研究はいわば超急性期における介入ということになる。なおかつ、傷害が加わった時点では内膜肥厚そのものは形成されていないので、現実の動脈硬化疾患のように既に内膜肥厚が形成されている病態に対する治療としては成立しない。

最後に、内膜肥厚を対象とした過去の研究では、nanocarrier の集積特性および集積のメカニズムに関して具体的に検証したものが少ないことも問題点として挙げられよう。内膜肥厚病変と癌病変は病理組織学的に異なるので、nanocarrier の集積性に関しては先述の EPR 効果だけでは説明できない。有効な DDS、治療の確立のためには nanocarrier の集積性に関する基礎的知見が必要であると考えられる。

本研究の着眼点、仮説、実験概要

動脈硬化性病変においては血管内皮によるバリアー機能が程度の差こそあれ障害されており、内皮下の内膜組織では細胞間を埋める形で細胞外マトリックス(extracellular matrix:

ECM) が分布し、更に脂質やカルシウム等が沈着している[30]。つまり、内膜細胞や沈着物を含め、内膜の ECM は内皮細胞の欠損部を通して直接血流にさらされていることとなる。ECM の分子間には組織液を含む微細な間隙が存在する[10]。これは適度なサイズの物質であれば血流を介して内膜組織へ到達できる可能性を示唆している。そこで、適切にサイズ調整された nanocarrier を全身投与すれば、動脈硬化性病変の内膜に特異的に侵入し、分布するという仮説を立てた。

本研究では、次の二点を目的とした。一つ目は完成された内膜肥厚病変におけるナノ粒子の集積特性を明らかにすること。二つ目は薬剤搭載ナノ粒子を全身投与し、既存の内膜肥厚の更なる形成を抑制できるかを明らかにすることである。これを検証するために、まずはサイズの異なる nanocarrier を、バルーンカテーテル傷害により頸動脈に内膜肥厚を誘導したラットモデル[31]に投与し、特定のサイズの nanocarrier が内膜肥厚病変に特異的に集積するかを検証した。このサイズ効果の検証のため、nanocarrier のサイズが厳密に管理できることが必要であった。更に、血中において十分な時間その構造を保ち、血中滞留性も良くなければならなかった。これらの条件を満たす nanocarrier として、以前の研究においてその合成法と構造の安定性が確立されている中空型ポリオンコンプレックスナノキャリアー (polyion complex hollow nanocarrier: PIC-nanocarrier) を用いることとした[32, 33] (図 2)。この PIC-nanocarrier は生体適合性に優れるポリエチレングリコール (PEG) とポリアミノ酸由来の荷電性セグメントからなる荷電性高分子の静電相互作用による自己組織化集合体である。PIC-nanocarrier は合成の段階でポリマー初期濃度を調整することにより厳密なサイズ管理

が可能であり、かつ化学架橋をかけることにより、血流等の厳しい生態環境内においてもその構造を維持することが出来る[34]。更に、PIC-nanocarrierはその表面に Cy5 等の蛍光色素を付与することで、レーザー共焦点顕微鏡等を用いたイメージングにおいてその視認性を高めることが可能である。

続いて、この PIC-nanocarrier のサイズ効果の検証結果に基づき、内膜肥厚病変への集積に適切なサイズを有し、かつアントラサイクリン系薬剤である epirubicin を内包するナノミセル製剤 NC-6300[35, 36]をラット内膜肥厚モデルに全身投与した。そしてこの NC-6300 による epirubicin のデリバリーがラットモデルにおける内膜肥厚病変に及ぼす治療効果を検証した。

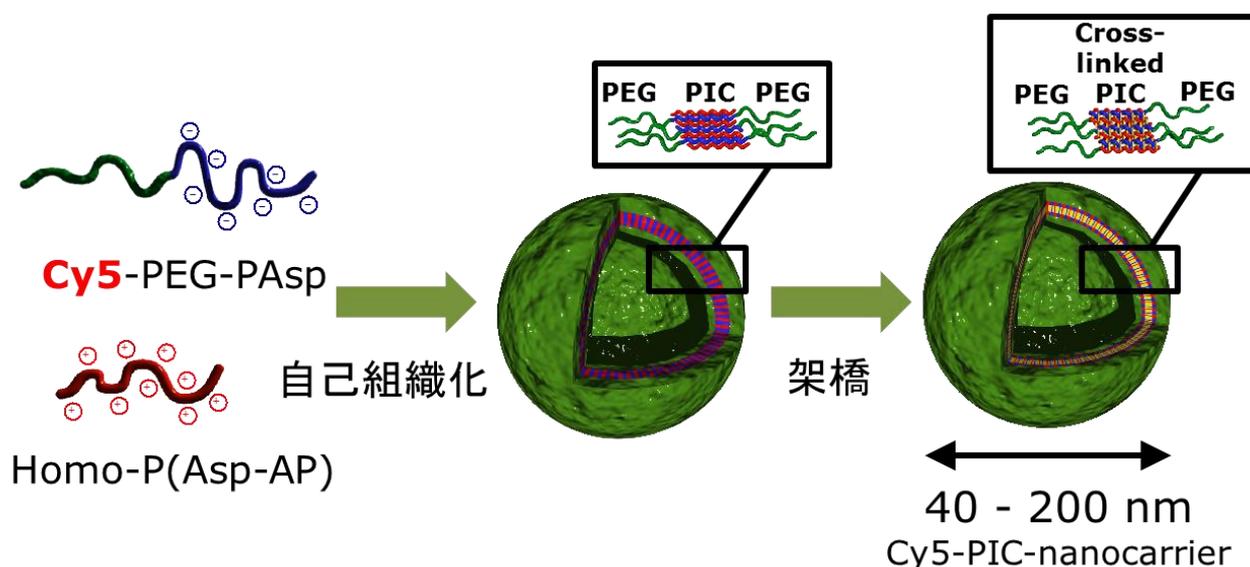


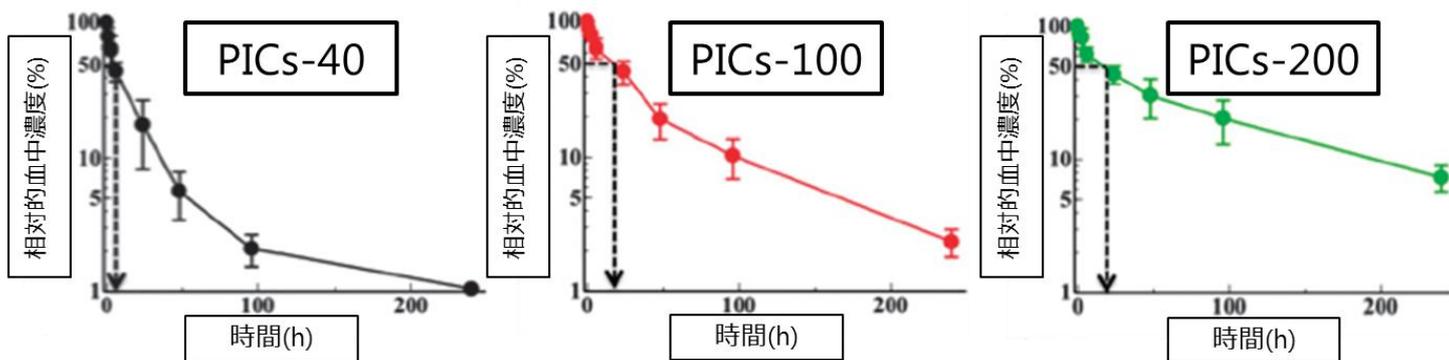
図2 Cy5-labeled PIC-nanocarrier

荷電性高分子同士の静電相互作用による自己組織化集合体であり、生体適合性に優れたポリエチレングリコール(PEG)を外殻に持つ。更にサイズ調整が容易、血中滞留性が良好であることを特徴とする。

PIC-nanocarrier、NC-6300 の血中滞留性

Anraku ら[33]による PIC-nanocarrier の薬物動態に関する既報から一部抜粋する。約 6 週齢の Balb/c nude マウスに 200 μ l/body の PIC-nanocarrier を投与して得られた血中濃度曲線から算出された PICs-40 の半減期は 4.7 時間であり、PICs-100 や PICs-200 (それぞれ 16.6、19.6 時間)と比べて相対的に短い、血液中にどれだけ薬物が残っているかを示す平均滞留時間 (mean residence time) に関しては 36.2 時間であり、十分な血中滞留性があることが分かる (図 3)。

また、PIC-nanocarrier の粒子直径による組織分布の特徴としては、150 – 200 nm の PIC-nanocarrier が腎臓や肝臓への組織分布が相対的に少なく、また大きいサイズほど脾臓で捕捉されるということが挙げられる (図 4)。



	PICs-40	PICs-100	PICs-200
半減期 (h)	4.7	16.6	19.6
平均滞留時間 (h)	36.2	51.2	71.0

図3 代表的な PIC-nanocarrier の血中動態

約6週齢の Balb/c nude マウスに 200 μ l/body の PIC-nanocarrier を投与して得られた相対的血中濃度曲線。いずれのサイズの PIC-nanocarrier も血中滞留性が良好であることが示されている。

蛍光強度で算出したAUC ($\times 10^9$ (p/s/cm²/g) x h)

粒子直径	血液	腎	肝	肺	脾
38 nm	210.0	2.3	19.0	4.8	5.5
102 nm	260.0	0.9	13.0	5.0	6.1
158 nm	309.0	0.4	8.8	1.5	11.0
197 nm	308.2	0.3	7.7	0.4	21.0
256 nm	238.3	6.4	11.0	0.3	24.0
298 nm	230.7	4.6	7.1	0.3	27.0

図4 PIC-nanocarrier の粒子直径による組織分布

IVIS imaging system により測定された蛍光強度をもとに、曲線下面積 (area under the curve: AUC) を算出。

NC-6300 の血中滞留性に関しては Harada ら[35]による NC-6300 の薬物動態に関する既報から一部抜粋する。エピルビシン換算量として 1mg/kg の NC-6300 もしくはエピルビシンを Wistar ラットに静脈内投与したとき、通常のエピルビシンの半減期が 0.45 時間であったのに対し、NC-6300 の半減期は 3.99 時間であり、血中滞留性が良好であった(図 5)。

また、臓器別の組織分布に関しては、エピルビシン(7mg/kg)を投与した場合と比べて NC-6300(20mg/kg、エピルビシン(7mg/kg)と等毒性の量)を投与した場合、血清、肝臓における遊離エピルビシンの相対量は高く、腎臓、肺、心臓における相対量は低かった(図 6)。

尚、肝障害に関しては NC-6300 とエピルビシン、それぞれ前述の量を 4 日毎に計 3 回投与した場合、NC-6300 群で投与 10-28 日目に AST、ALT、LDH の上昇を認めるものの、その後正常範囲に戻った。

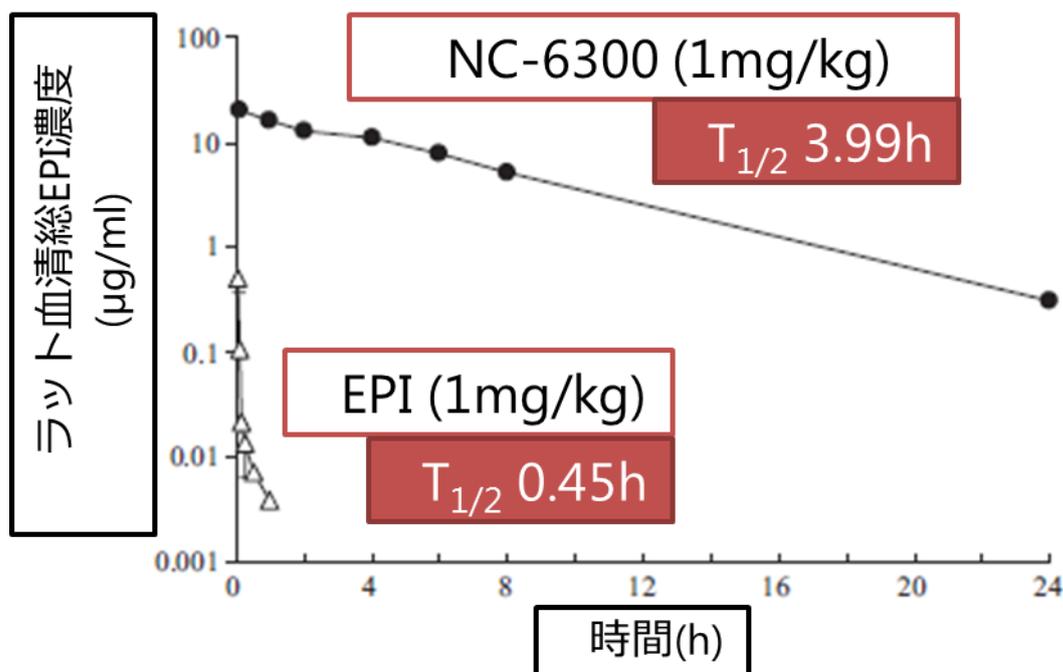


図5 NC-6300とエピルビシンの血中濃度曲線

エピルビシン換算量として1mg/kgのNC-6300もしくはエピルビシンをWistarラットに静脈内投与して得られた血液中濃度曲線から算出。濃度曲線の縦軸は総エピルビシン濃度であるので、NC-6300より放出された遊離エピルビシンは更にこの一部ということになる。

	AUC / Dose (µg/g tissue h/mg/kg bodyweight)				
	NC-6300			Epi	Ratio (a/c)
	遊離Epi (a)	総Epi (b)	遊離% (a/b x100)	遊離Epi (c)	
脾	29.0	146.5	19.8	22.4	1.3
腎	24.5	53.4	45.8	46.7	0.52
肝	100.2	230.4	43.5	18.8	5.3
肺	8.6	25.9	33.4	17.6	0.49
心	2.0	7.5	27.0	7.1	0.28
血清	9.7	113.8	8.5	0.21	45.9

図6 NC-6300とエピルビシンの組織分布

MDA-MB-231(ヒト乳癌)移植後の5週齢BALB/c nudeマウスにNC-6300を20mg/kgまたはエピルビシンを7mg/kgを投与し算出されたAUC(投与後5分、1、6、24、48、72、120、168時間後の血清・組織中濃度から得られた曲線を用いて台形公式により近似)。

実験① 内膜肥厚病変におけるナノ粒子の集積性の検証

方法①

Cy5-labeled PIC-nanocarrier の合成

内膜肥厚病変への nanocarrier 集積のサイズ効果を検証するために、粒子直径が 40 nm、100 nm、200 nm の Cy5-labeled PIC-nanocarrier (それぞれ PICs-40、PICs-100、PICs-200) を準備した[32]。以下特に記述がない限り PIC-nanocarrier は Cy5-labeled PIC-nanocarrier を指すものとする。

PIC-nanocarrier は既報に従い合成され、以下に概略を記す。まず block anioner: PEG-poly (α,β -aspartic acid) (PEG-P(Asp); M_n of PEG = 2000, DP of P(Asp) = 75)、block cationer: PEG- poly([5-aminopentyl]- α,β -aspartamide) (PEG-P(Asp-AP); M_n of PEG = 2000, DP of P(Asp-AP) = 82) と homo cationer: poly([5-aminopentyl]- α,β -aspartamide) (Homo-P(Asp-AP); DP of P(Asp-AP) = 82) を合成した。続いて PEG-P(Asp) に Cy5 mono-reactive dye pack (GE Healthcare, Tokyo, Japan) を用いて Cy5 (PEG-P(Asp)-Cy5) を標識化した。 $-\text{COO}^-$ 基と $-\text{NH}_4^+$ 基が 1:1 となるように PEG-P(Asp)-Cy5 と HOMO-P(Asp-AP) を混合し PIC-nanocarrier を合成した。PICs-40 の合成では PEG-P(Asp)-Cy5 と PEG-P(Asp-AP) を合計ポリマー濃度が 1 mg/ml となるよう 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) 中で混合した。PICs-100 と PICs-200 の合成では、PEG-P(Asp)-Cy5 と HOMO-P(Asp-AP) の

合計ポリマー濃度がそれぞれ 1 mg/ml と 3 mg/ml となるように 10 mM phosphate-buffer (pH 7.4) 中で混合した。最後に、得られた PIC-nanocarrier を 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (Wako pure chemical, Tokyo, Japan) により架橋し、その構造を補強した。

合成された PIC-nanocarrier は動的光散乱法によりそのサイズ分布を確認した(図 7)。

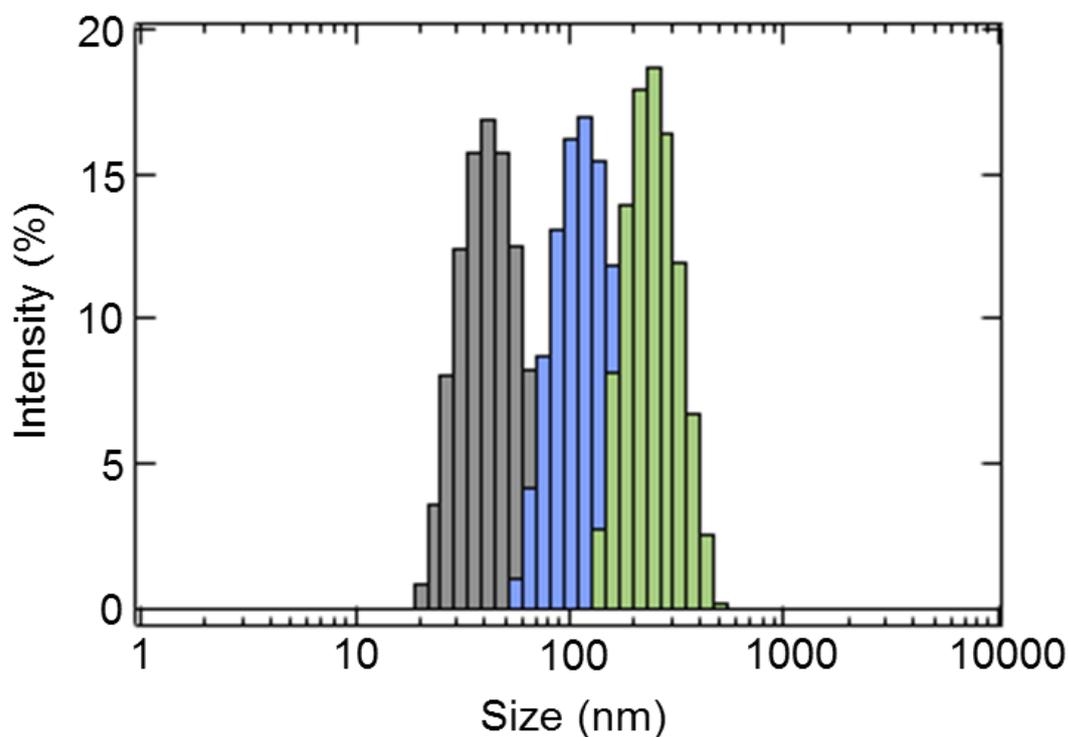


図 7 動的光散乱法測定による PIC-nanocarrier のサイズ分布
PICs-40(黒)、PICs-100(青)、PICs-200(緑)のサイズ分布が示されている。

動物モデルの作成

本研究における動物実験は全て東京大学動物実験実施規則に基づいて行われた。

体重 300 - 350 g の Sprague Dawley (SD) ラット、オス (Charles River Laboratories, Yokohama, Japan) を用いた。飼育中は餌そのものの自家蛍光の影響を抑えるためのアルファアルファ非含有の餌、ならびに水分がフリーアクセスの状態を与えられた。

手術は 2 - 2.5% のイソフルレン吸入による全身麻酔下に行われた (図 8)。十分な麻酔深度を得た後に頸部の除毛をし、頸部正中切開を置いた。前頸筋群を正中で分け、左外頸動脈を露出、4-0 絹糸によりテーピングした。この際、手術操作に伴う影響を減らすため、総頸動脈および内頸動脈の露出は最小限に留めた。左外頸動脈に小切開を置き、ここより 2Fr フォガティールバルーンカテーテル (Edwards Lifesciences, Irvine, CA, USA) を中枢側に挿入した。一定の圧力でバルーンを拡張、回転を加えながら引き抜き総頸動脈全長を擦過した。この擦過操作を 3 回繰り返したのち左外頸動脈よりバルーンカテーテルを抜去し、その中枢と末梢を 4-0 絹糸により結紮した。左総頸動脈が問題なく拍動しており、早期閉塞をきたしていないことを確認したのちに 5-0 ナイロンにより皮膚を閉創した。



図8 ラット頸動脈バルーン擦過モデルの作成
 2Fr バルーンカテーテルを用いて左総頸動脈全長に擦過傷害を加えた。

PIC-nanocarrier の投与

ラットへの投与に先立ち、PIC-nanocarrier 原液を PBS により希釈し、各シリーズにおいて PIC-nanocarrier の蛍光強度 (relative fluorescence units: RFU) が一定となるよう、蛍光分光光度計 NanoDrop 3300 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) により測定し調整した。続いて上述の如くラット頸動脈を擦過し、閉創した直後に PICs-40、PICs-100、又は PICs-200 を 300 μ l 尾静脈から静脈内投与した (各 n = 12)。また、これらとは別に、PICs-40、PICs-100、又は PICs-200 をバルーン傷害後 7 日目 (各 n = 12) もしくは 14 日目 (各 n = 12) に同様に全身麻酔下に尾静脈から投与した群を作成した。更に、PIC-nanocarrier 投与前の血管そのものの蛍光強度を計測するために、頸動脈バルーン傷害を加えるのみで PIC-nanocarrier を投与しない群も作成した (各 n = 4)。

PIC-nanocarrier の投与後 1、8 又は 24 時間後 (各 n = 4)、イソフルレンの過剰投与により犠牲死させ、直ちに検体を摘出した。両側総頸動脈全長およびそれらを繋ぐ大動脈弓を合わせて摘出し、血管内腔に血液が残らないように PBS により軽く洗浄した。

PIC-nanocarrier 集積のイメージングによるマクロ評価

PIC-nanocarrier の内膜肥厚病変への集積性を検証するのにあたり、IVIS[®] imaging system (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA) によるイメージングおよび蛍光強度測定を行った。IVIS[®] imaging system は生体の発する微弱な発光 (ルシフェラーゼ酵素発光) と蛍光 (FITC や Cy5 等の蛍光トレーサー) の両方を -90°C に冷却された CCD カメラで高感

度に検出し、生体内の遺伝子発現やタンパク質の挙動を生きたまま体外からモニタリングすることも可能にする装置である。

摘出した検体(両側総頸動脈とそれに連続する大動脈弓)を測定板に正面上向きに置き、IVIS[®] imaging system を用いて Fluorescence (蛍光) モード、excitation (励起) filter: 640 nm、emission (発光) filter: 680 nm の設定下で測定した。得られた2次元データを付属のソフトウェア Living Image[®] Software (Caliper Life Sciences)により定量化した。まず2次元画像により Region of interest (ROI) ツールを用いて左右それぞれの総頸動脈全長を選択し、測定範囲を指定した。続いてその範囲の平均(単位面積当たりの)蛍光強度 ($[p/s/cm^2/sr]/[\mu W/cm^2]$; p: photon, s: sec, sr: steradian)を自動算出した。この値から、バルーン傷害直後、7日目、14日目それぞれにおいて作成した PIC-nanocarrier 非投与群の検体(各 n = 4)における平均測定値を引く補正を行った。この補正により、血管自体のおよび測定板のわずかな自家蛍光が差し引かれ、集積した PIC-nanocarrier の純粋な測定値が算出されたことになる。

PIC-nanocarrier 集積の組織学的評価

IVIS[®] imaging system での評価ののち、検体から左総頸動脈を切離、3分割し凍結組織切片作製用包埋剤(Tissue-Tek[®] O.C.T[™] Compound, Sakura Finetek, Tokyo, Japan)に包埋し、液体窒素による凍結処理ののち-80℃下で保管した。これらを用いて、凍結マイクローム(CM1950, Leica, Nussloch, Germany)により、血管の走行に垂直に10 μm厚の切片を作

成し、細胞核染色を Hoechst 33342 (Invitrogen, Eugene, OR, USA) を用いて行った。作成したプレパラートはレーザー共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM 780, Jena, Germany) を用いて直ちに観察し、PIC-nanocarrier の局在を検証した。

PIC-nanocarrier の集積が明らかであったグループに関しては、更にマクロファージおよび SMC の免疫染色を行った。マクロファージの染色には抗 CD68 モノクローナル抗体 (T-3003, BMA Biomedicals, Augst, Switzerland) を用いた。また、傷害を受けた SMC は通常の収縮型 (contractile phenotype) から合成型 (synthetic phenotype) へと形質転化することが知られており [37]、バルーン傷害後の各段階において主体となる SMC を染色するために、バルーン傷害直後の PIC-nanocarrier 投与群には抗 α -smooth muscle actin (α SMA) モノクローナル抗体 (1A4, Dako, Glostrup, Denmark) を、バルーン傷害後 7、14 日目の PIC-nanocarrier 投与群には抗 embryonic smooth muscle myosin heavy chain (SMemb) モノクローナル抗体 (7602, Yamasa, Tokyo, Japan) を用いた。

免疫染色は以下のように行った。20 分間のブロッキング (Blocking One, Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) ののち、一次抗体に CD68 (1:100)、 α SMA (1:100)、又は SMemb (1:1000) を使用し、室温下で 30 分間インキュベートした。二次抗体には Alexa Fluor[®] 555 Goat Anti-Mouse IgG (1:300; ab150118, Abcam, Cambridge, UK) を使用し同様に室温下で 30 分間インキュベートした。最後に細胞核染色を Hoechst 33342 (1:100) により行い、レーザー共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM 780) により直ちに観察した。

更に、得られた画像データを Imaris software ver7.4.2 (Bitplane, Zurich, Switzerland) を用

いて、Cy5 (PIC-nanocarrier) とマクロファージ・SMC の 2 要素のみを抽出し、これらの共存性の定量評価を試みた。

統計解析

すべてのデータは平均値と標準偏差で記載した。平均値の差の検定は統計ソフトウェア JMP Pro 10.0.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて unpaired *t*-test を行い、 $P < 0.05$ を有意水準とした。

結果①

PIC-nanocarrier の集積性 (マクロ評価)

IVIS[®] imaging system による蛍光イメージングでは、PIC-nanocarrier がバルーン傷害直後に投与された場合、投与後 1、8 時間後では全てのサイズ (PICs-40、PICs-100、PICs-200) でバルーン傷害側に明らかな Cy5 発光が見られた (図 9-1)。蛍光強度の定量評価では、蛍光強度は投与後早めの段階でピークに達し、随所において非傷害側と比べて有意に高値であり、その後 24 時間後では減少傾向となった (図 9-2)。

一方、PIC-nanocarrier がバルーン傷害後 7 日目に投与された場合、PICs-40 投与群では投与後 1、8、24 時間後で明らかな Cy5 発光が認められたのに対し、PICs-100、PICs-200 投与群においては投与後いずれのタイムポイントにおいてもほとんど発光が認められなかった (図 10-1)。また、PIC-nanocarrier がバルーン傷害後 14 日目に投与された場合、PICs-40 群では投与後 8、24 時間後で明らかな Cy5 発光が認められたのに対し、PICs-100、PICs-200 投与群においては投与後いずれのタイムポイントにおいても発光がほとんど認められなかった (図 11-1)。蛍光強度の定量評価でも Cy5 発光のイメージングに矛盾しなかった。即ち、Cy5 発光が認められた群において、バルーン傷害側総頸動脈は非傷害側と比べて有意に高値であり、Cy5 発光が認められなかった群において、バルーン傷害側総頸動脈は非傷害側と比べて差を認めなかった (図 10-2、11-2)。

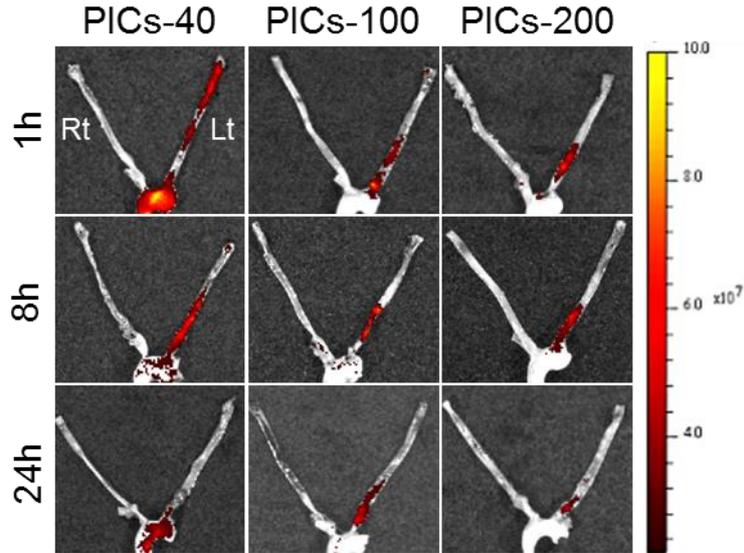


図 9-1 バルーン傷害直後投与群の IVIS[®] imaging system によるイメージング
全サイズの PIC-nanocarrier の集積が認められる。

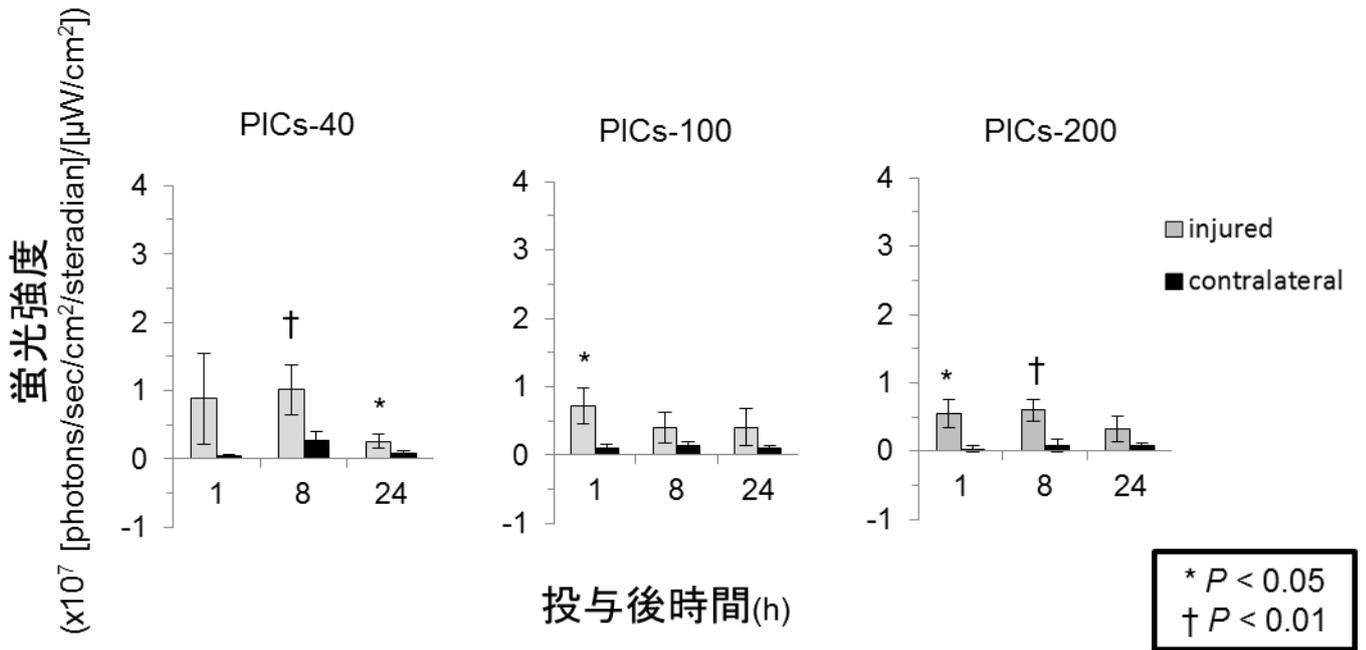


図 9-2 バルーン傷害直後投与群の蛍光強度の定量評価
全サイズにおいて比較的早い段階での集積が見られ、随所において非傷害側頸動脈と比べて有意な蛍光強度の上昇を認める(各 n = 4)。

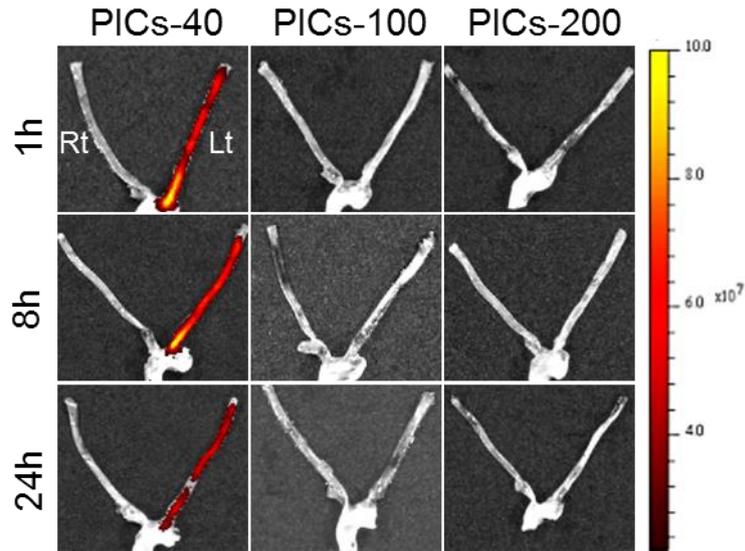


図 10-1 バルーン傷害後 7 日目投与群の IVIS[®] imaging system によるイメージング PICs-40 のみ傷害側頸動脈に明らかな集積を認める。

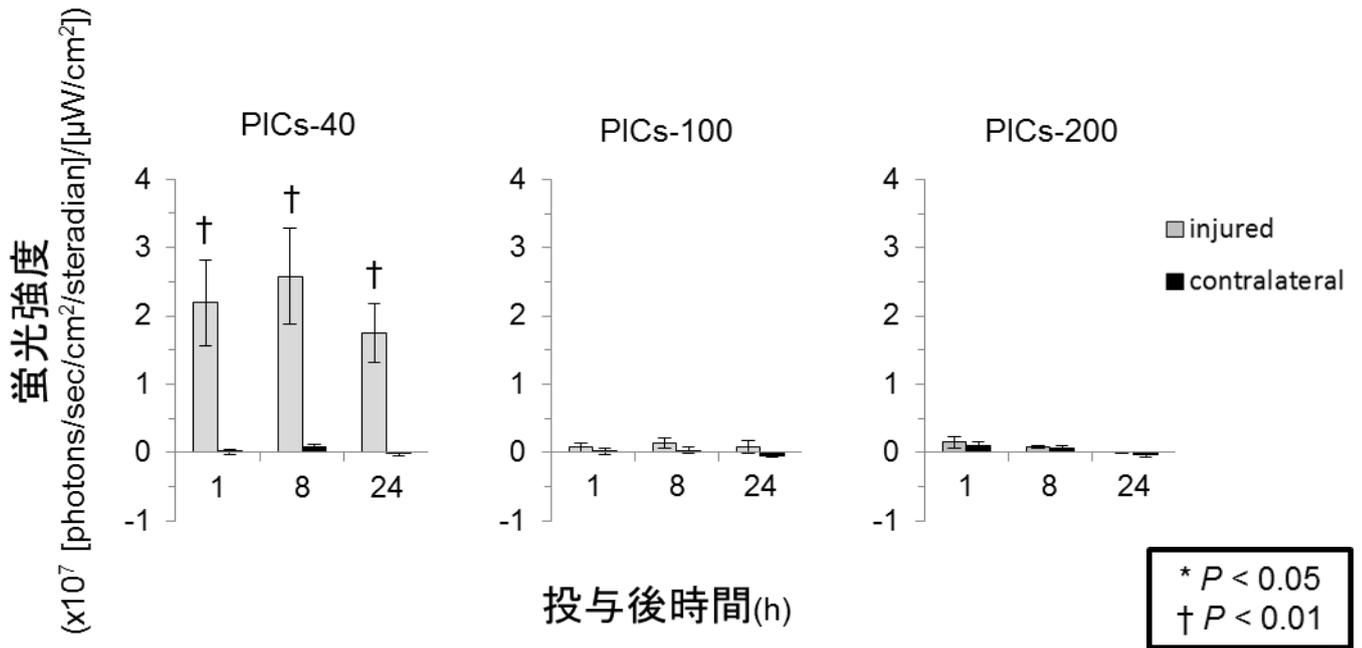


図 10-2 バルーン傷害後 7 日目投与群の蛍光強度の定量評価 PICs-40 では全ての時間において非傷害側と比べて有意な蛍光強度上昇を認める(各 n = 4)。

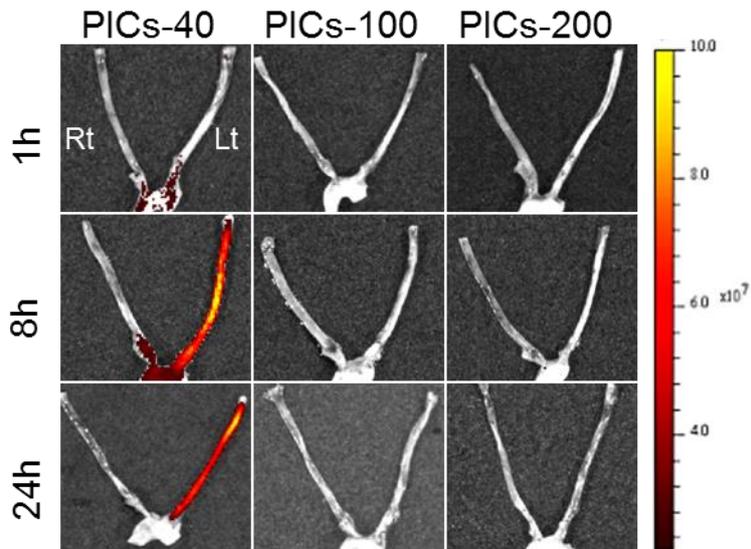


図 11-1 バルーン傷害後 14 日目投与群の IVIS[®] imaging system によるイメージング
PICs-40 のみ傷害側頸動脈に明らかな集積を認める。

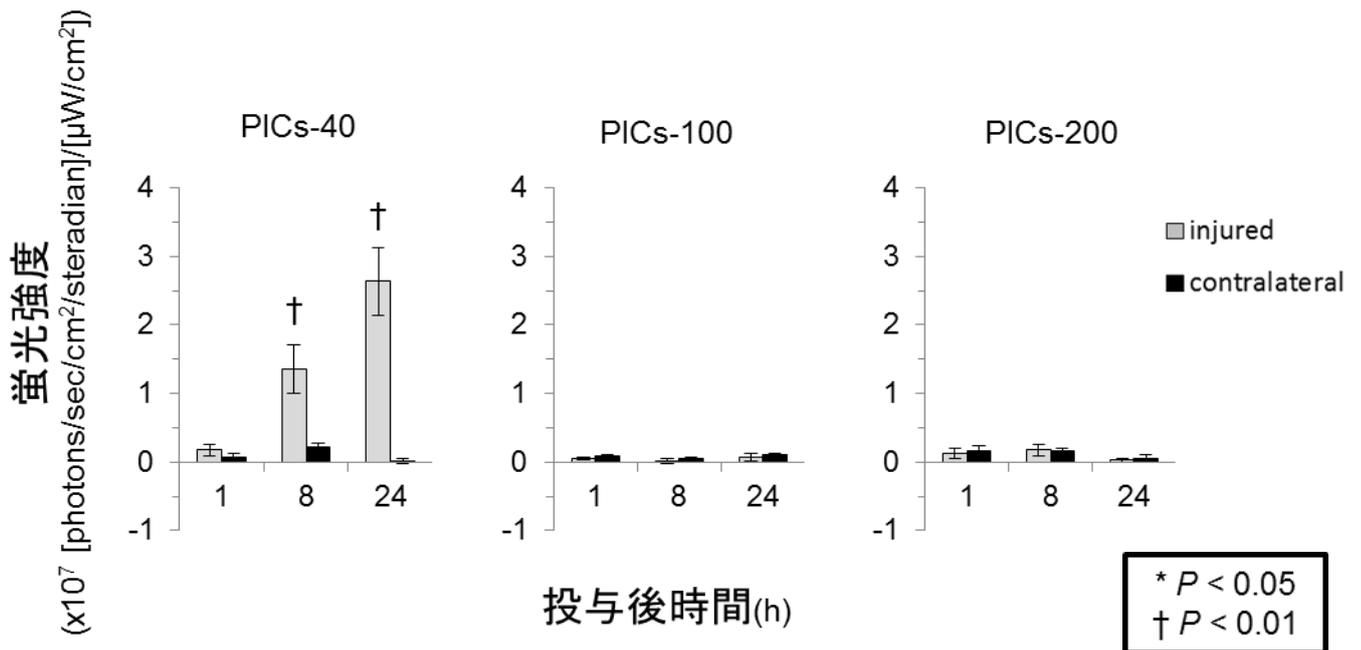


図 11-2 バルーン傷害後 14 日目投与群の蛍光強度の定量評価
PICs-40 では投与後 8、24 時間後において非傷害側と比べて有意な蛍光強度上昇を認める(各 n = 4)。

PIC-nanocarrier の集積性(マイクロ評価)

PIC-nanocarrier がバルーン傷害直後に投与された群においては、内膜肥厚は形成されておらず、PICs-40、PICs-100 および PICs-200 投与後 1 時間で Cy5 陽性粒子が中膜を中心に集積していた(図 12)。また Cy5 陽性粒子は投与後 24 時間の段階においても集積していた。

PIC-nanocarrier がバルーン傷害後 7 日目に投与された群においては、明らかな内膜肥厚病変が全ての検体において観察され、PICs-40 投与後 1 と 24 時間後においては Cy5 陽性粒子が内膜肥厚病変の血管内腔寄りに集積していた(図 13)。一方、PICs-100 および PICs-200 を投与した群においては投与後 1 もしくは 24 時間後においても Cy5 陽性粒子の集積を認めなかった。

PIC-nanocarrier がバルーン傷害後 14 日目に投与された群においては、内膜肥厚病変が更に形成されており、PICs-40 投与後 24 時間後においては Cy5 陽性粒子が内膜肥厚病変の血管内腔寄りに集積していた(図 14)。一方、PICs-100 および PICs-200 を投与した群においては 7 日目と同様、投与後 1 もしくは 24 時間後においても Cy5 陽性粒子の集積を認めなかった。

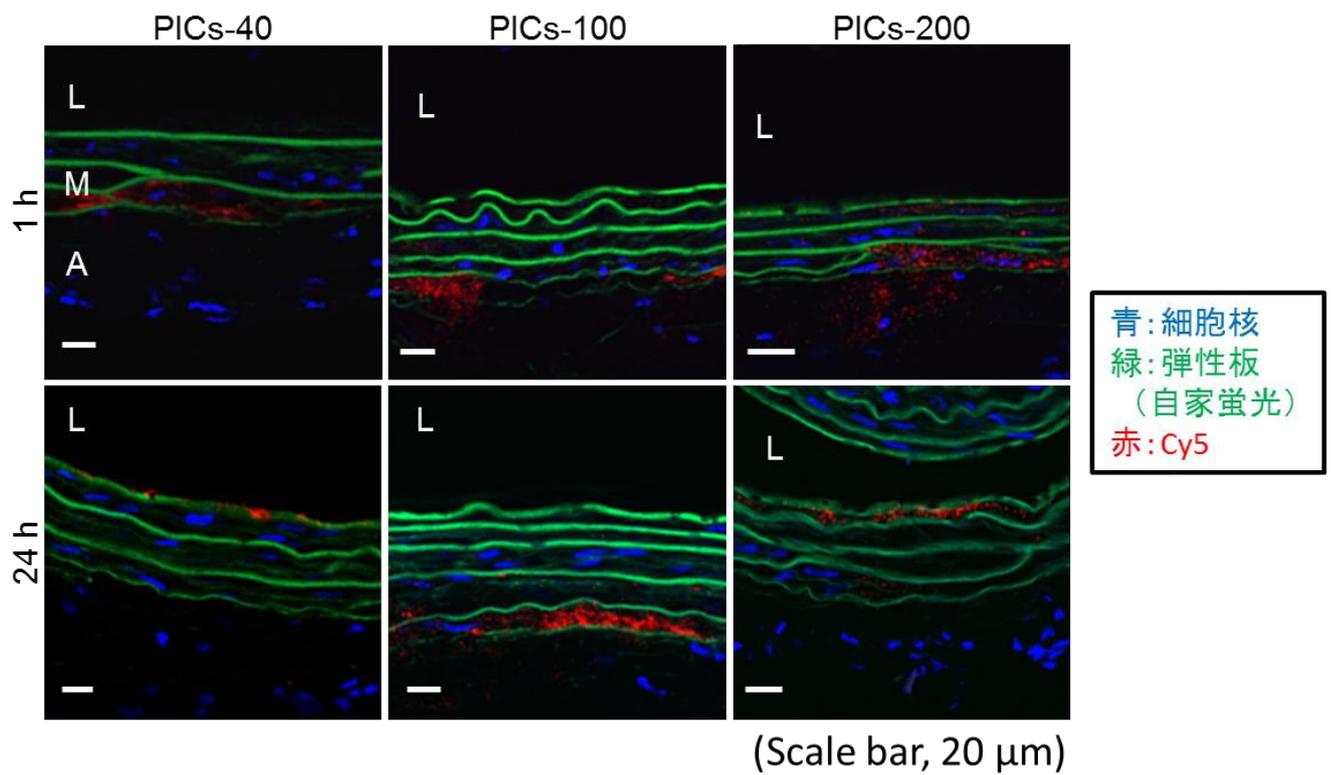


図 12 バルーン傷害直後投与群のレーザー共焦点顕微鏡によるマイクロ評価
 全てのサイズの PIC-nanocarrier において中膜(M)を中心とした Cy5 陽性粒子の集積を認める。弾性板は自家蛍光(緑)のみで描出される。(L:血管内腔、M:中膜、A:外膜)

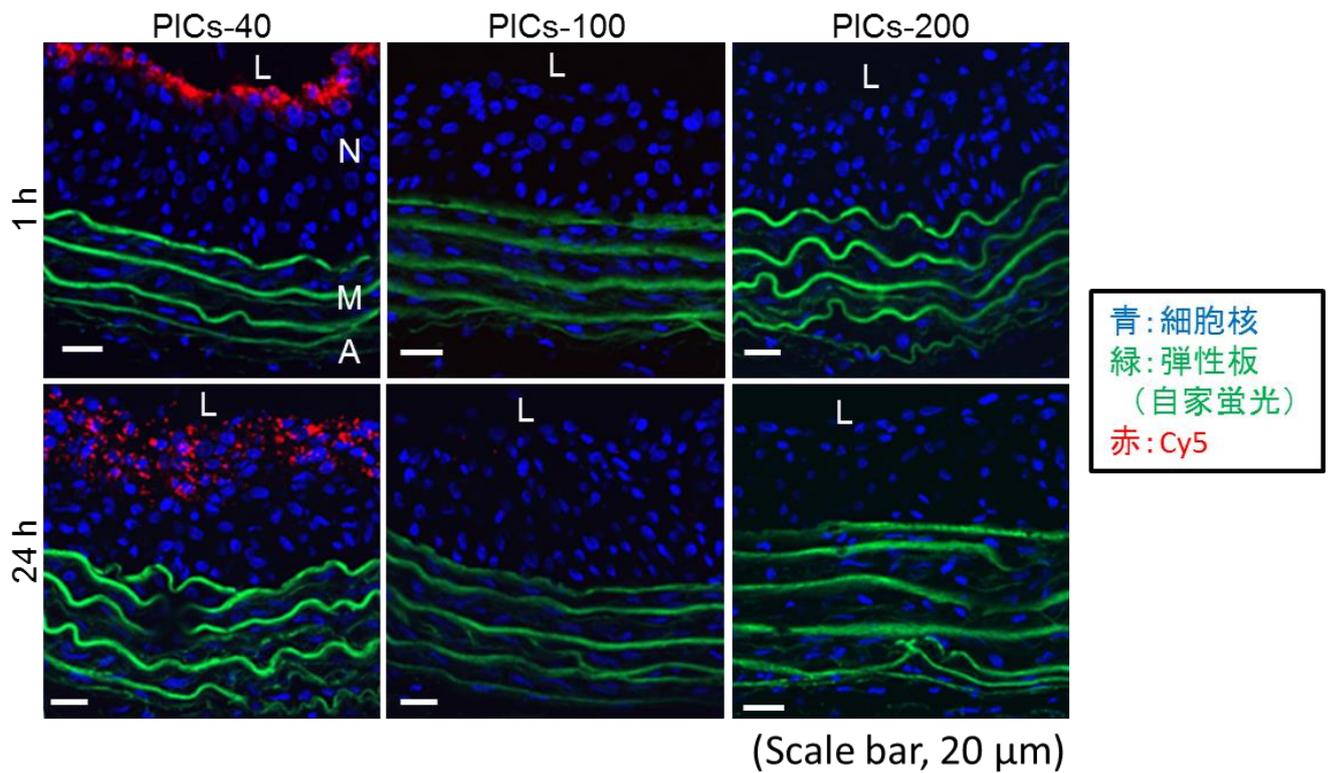


図 13 バルーン傷害後 7 日目投与群のレーザー共焦点顕微鏡によるマイクロ評価
 PICs-40 投与群においては内膜肥厚病変に Cy5 陽性粒子の集積を認め、時間経過に伴い
 中膜側に広がっている。PICs-100、PICs-200 投与群においては明らかな Cy5 陽性粒子を認
 めない。(L:血管内腔、N:新生内膜、M:中膜、A:外膜)

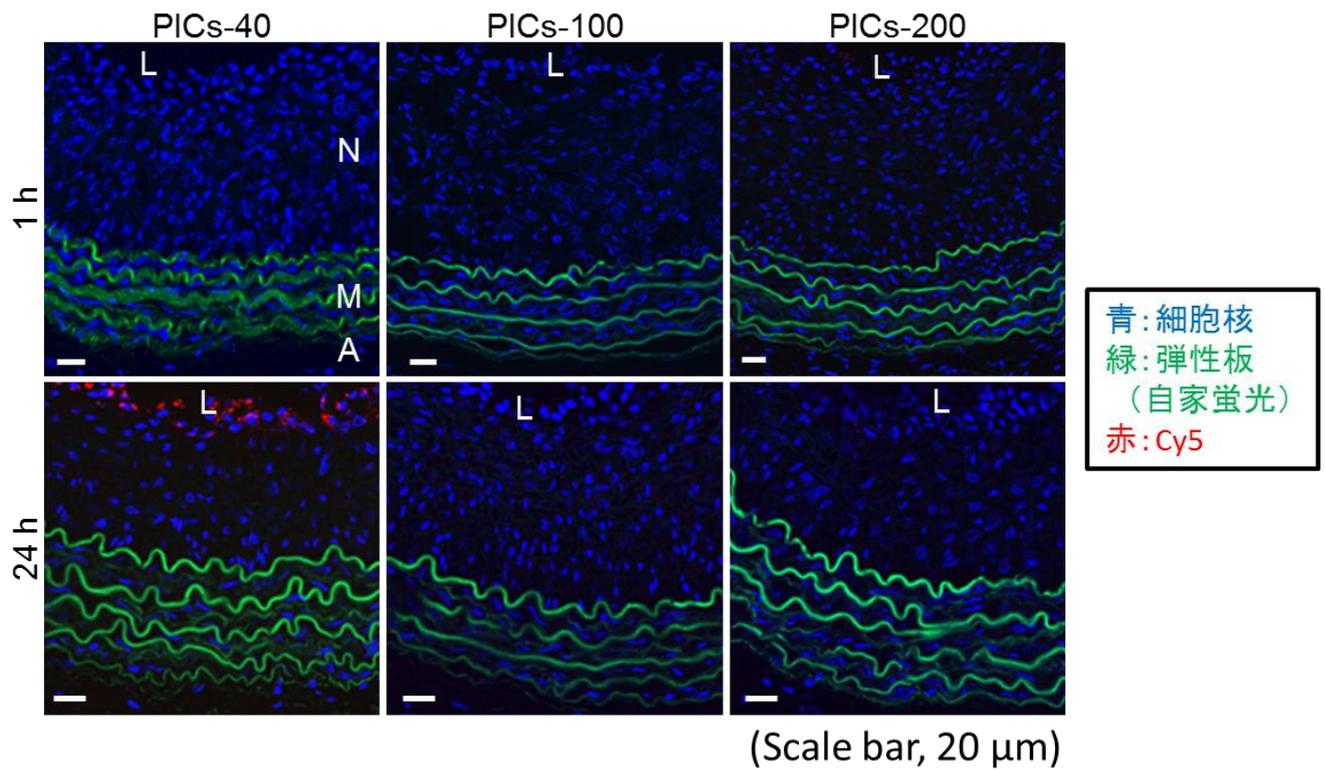


図 14 バルーン傷害後 14 日目投与群のレーザー共焦点顕微鏡によるマイクロ評価
 PICs-40 投与群においては投与後 24 時間では内膜肥厚病変に Cy5 陽性粒子の集積を認める。PICs-100、PICs-200 投与群においては明らかな Cy5 陽性粒子を認めない。(L: 血管内腔、N: 新生内膜、M: 中膜、A: 外膜)

PIC-nanocarrier とマクロファージ・SMC の局在

バルーン傷害直後に PIC-nanocarrier を投与した群では、左総頸動脈の免疫染色において、中膜中の SMC ほぼ全てが α SMA 陽性であった。また、PIC-nanocarrier 投与後 1 時間では CD68 陽性細胞は明らかでなかった。PIC-nanocarrier 投与後 1 時間では全てのサイズにおいて中膜を中心に Cy5 陽性粒子を認めたものの、中膜の α SMA 陽性細胞との共存性は明らかではなかった(図 15、16)。

バルーン傷害後 7 日目または 14 日目に PIC-nanocarrier を投与した群では、左総頸動脈の免疫染色において、内膜肥厚病変中に CD68 陽性細胞を散在性に認めた。また、内膜肥厚部の SMC のほぼ全てが SMemb 陽性であった。PICs-40 投与群では、内膜肥厚病変に集積した Cy5 陽性粒子は CD68 陽性細胞とも SMemb 陽性細胞とも概ね共存性を示さなかった(図 15、16)。

今回、共存性の定量評価を行う場合には以下の二つが問題となった。一つは免疫染色の手技的な問題上、一つ一つのプレパラートの染色度合い、つまり蛍光強度が微妙に異なるため、各要素、つまり細胞の領域の閾値を固定値で設定するのが難しいということである。もう一つは、閾値設定を自動設定にすると、閾値が低く設定されることが多く、共存領域が過大評価されてしまうということである。以上より、共存性に関しては客観的な定量評価は困難であり、定性的な判断にならざるを得ないと考えた。

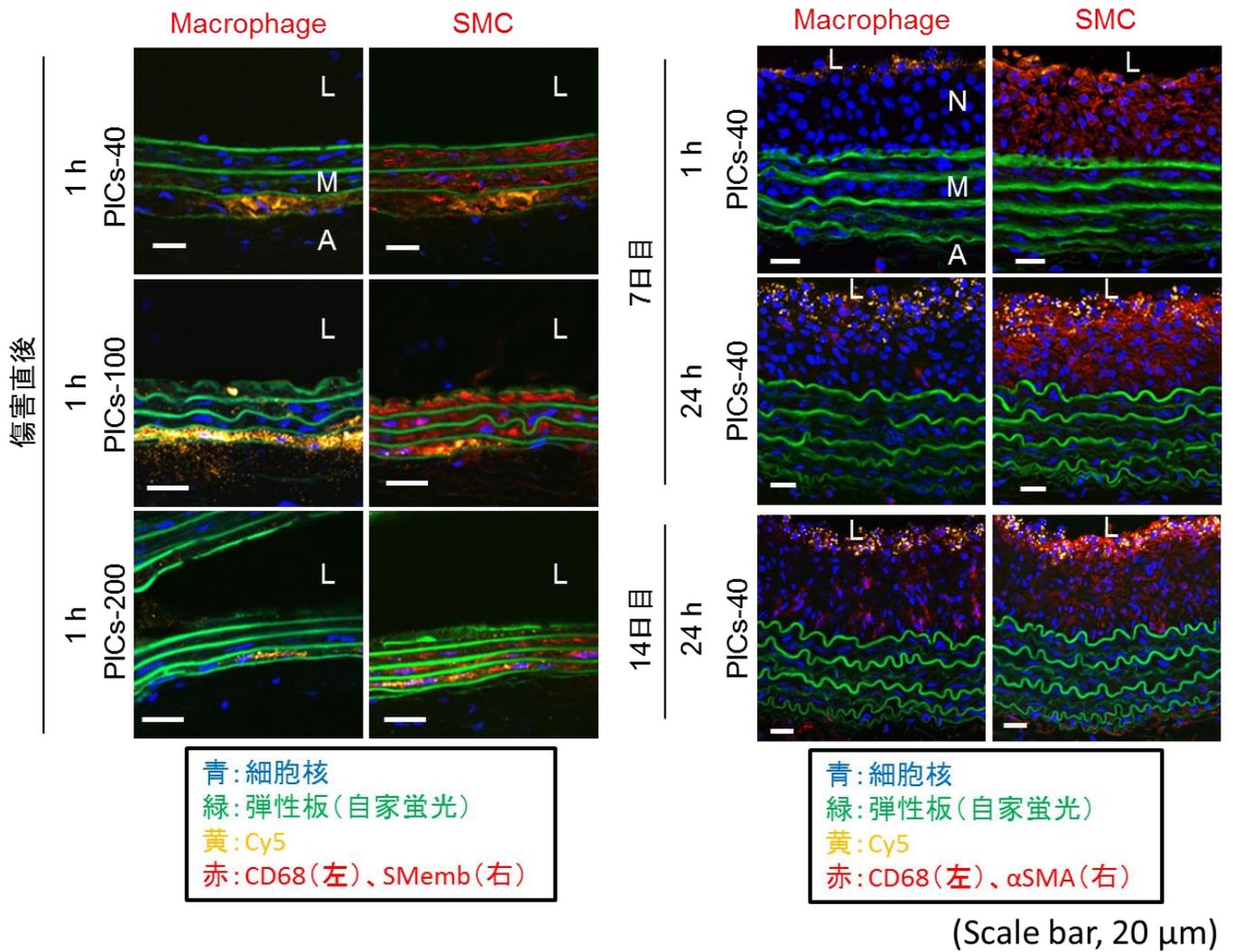
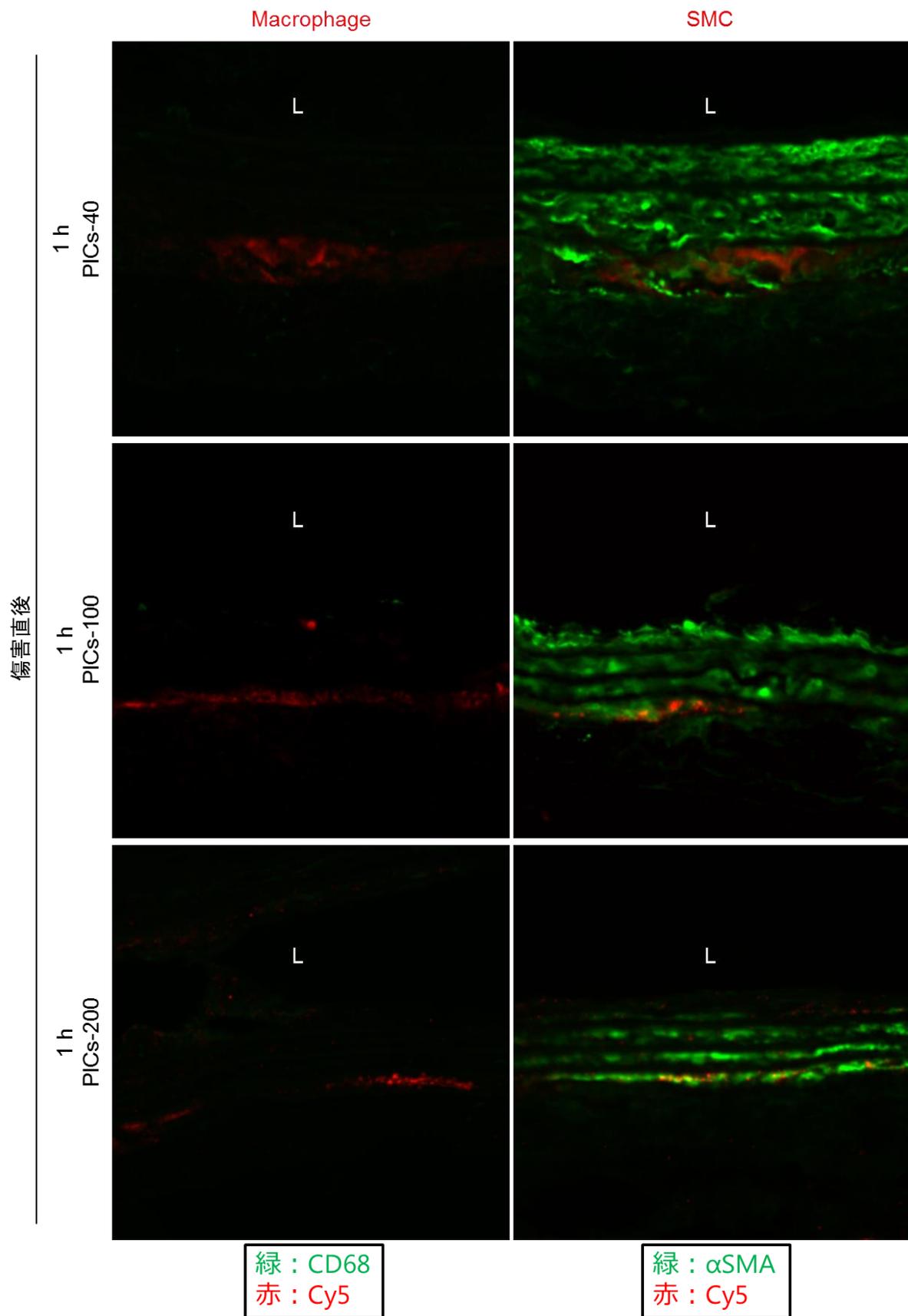


図 15 PIC-nanocarrier 投与後のレーザー共焦点顕微鏡による免疫組織学的評価
 バルーン傷害直後に PICs-40、PICs-100、PICs-200 を投与し 1 時間後に採取した検体(左段)および、バルーン傷害後 7 もしくは 14 日目に PICs-40 を投与し、1 か 24 時間後に採取した検体(右段)における免疫組織像である。Cy5 陽性粒子はマクロファージ(左)および SMC(右)のいずれとも概ね共存性を認めない。(L: 血管内腔、N: 新生内膜、M: 中膜、A: 外膜)



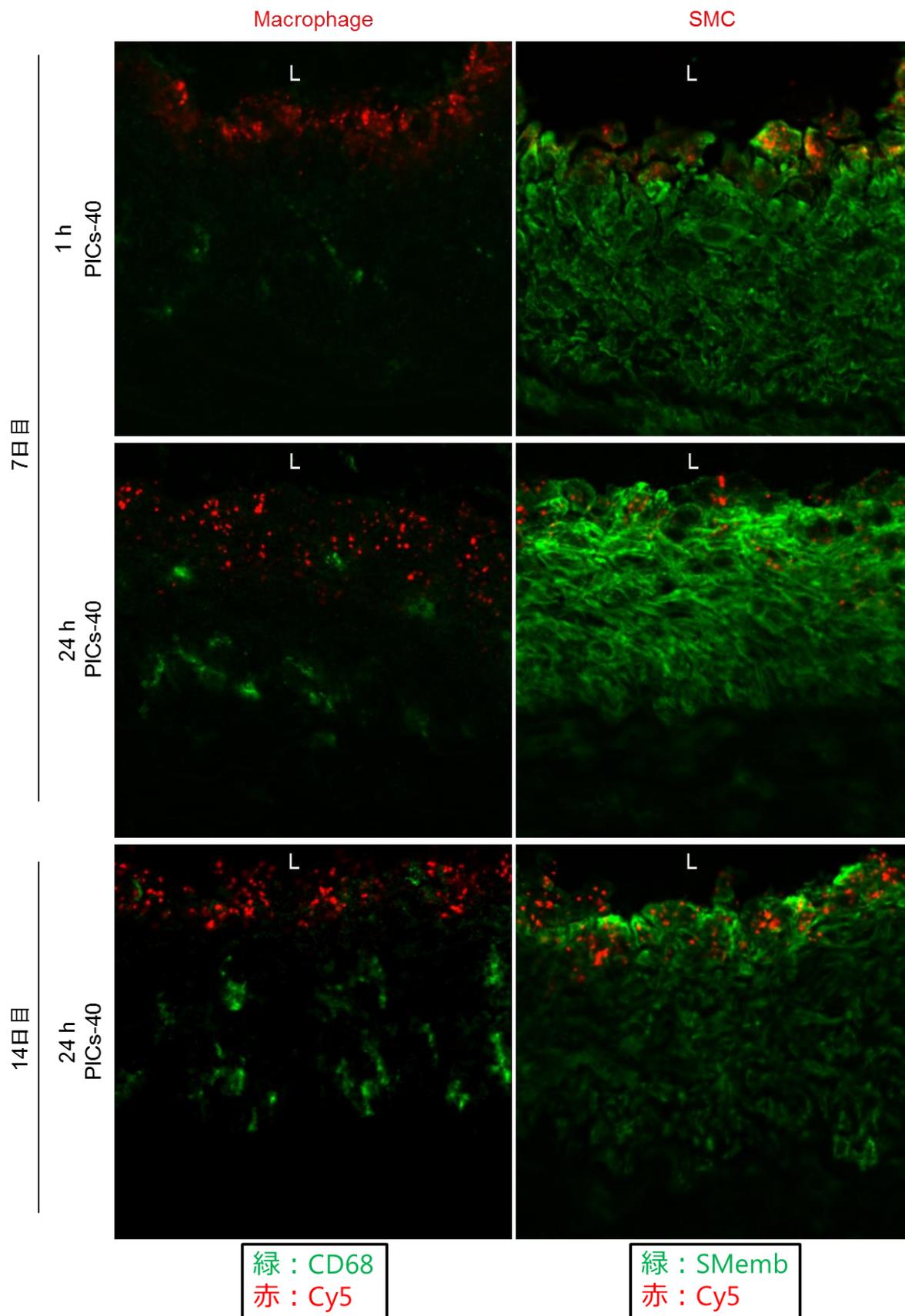


図 16 Imaris software を用いた免疫組織学的画像の解析
 マクロファージ(左)・SMC(右、ともに緑)と Cy5(赤)のみを抽出した。共存性、すなわち重なりを有する場合、黄色表示となる。Cy5 陽性粒子はマクロファージの分布とは独立して集積しており、SMC とも概ね共存していない。(L: 血管内腔)

実験② 内膜肥厚病変における epirubicin 含有ナノミセル(NC-6300)の治療効果の検証

方法②

Epirubicin 含有ナノミセル(NC-6300)の合成

Nanocarrier による epirubicin のデリバリーが新生内膜(neointima)に及ぼす影響を検証するために、epirubicin 含有ナノミセル(NC-6300)および Alexa Fluor[®] 647 を用いて標識化した NC-6300 (Alexa647-labeled NC-6300)を用いた[35, 36]。NC-6300 は既報に従い合成され、ナノキャリア株式会社 (Kashiwa, Japan)より無償提供された。Alexa647-labeled NC-6300 は以下のように合成された。

Poly(ethylene glycol)-poly(beta-benzyl-L-aspartate) block copolymer (PEG-PBLA)を既報に従い合成した[38]。PEG-PBLA 96 mg (4.8 μmol)と Alexa Fluor[®] 647 carboxylic acid, succinimidyl ester (Life Technologies, Eugene, OR, USA) 1 mg (0.8 μmol)を脱水 Dimethyl sulfoxide (DMSO)中、遮光 50 $^{\circ}\text{C}$ 下で 3 時間攪拌した。メタノールで膨潤した Sephadex LH-20 (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden)を用いてカラム精製し、さらに Spectra/Por[®] Dialysis Membrane (MWCO: 6000 – 8000; Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA)を用いて透析精製(外液:メタノール)した。内液をエバポレートし濃縮した後ベンゼン凍乾し、Alexa 647 標識 PEG-PBLA を得た。Alexa 647 標識 PEG-PBLA (全量)に対し、Hydrazine anhydrous (東京化成工業株式会社, Tokyo, Japan) 3.0 μL (96

μmol)を添加し、脱水 dimethylformamide (DMF) 中、遮光室温下で 3 時間攪拌した。氷冷ジエチルエーテルを用いて再沈後、減圧乾燥しヒドラジド化 Alexa 647 標識 PEG-PBLA を得た。ヒドラジド化 Alexa 647 標識 PEG-PBLA (全量) に対し、epirubicin 塩酸塩 83.5 mg ($144\mu\text{mol}$)を添加し、脱水 DMSO 中、遮光下 40°C で 3 日間攪拌した。メタノールで膨潤した Sephadex LH-20 を用いてカラム精製し、さらに Spectra/Por® Dialysis Membrane (MWCO: 6000 – 8000) を用いて透析精製 (外液: メタノール (室温) \rightarrow メタノール/水 (4°C) \rightarrow 水 (4°C)) した。内液を凍結乾燥し、Alexa 647 標識 epirubicin 導入 PEG-PBLA を得た (収量: 95.18 mg)。Alexa 647 標識 epirubicin 導入 PEG-PBLA と NC-6300 ポリマー (製剤を水で透析精製し添加物を除去した後凍結乾燥したもの) を重量比として 1:1 で混合しミセル化、Alexa647-labeled NC-6300 を得た。

Alexa647-labeled NC-6300 のサイズは動的光散乱法により約 49 nm であることが確認された (図 17)。

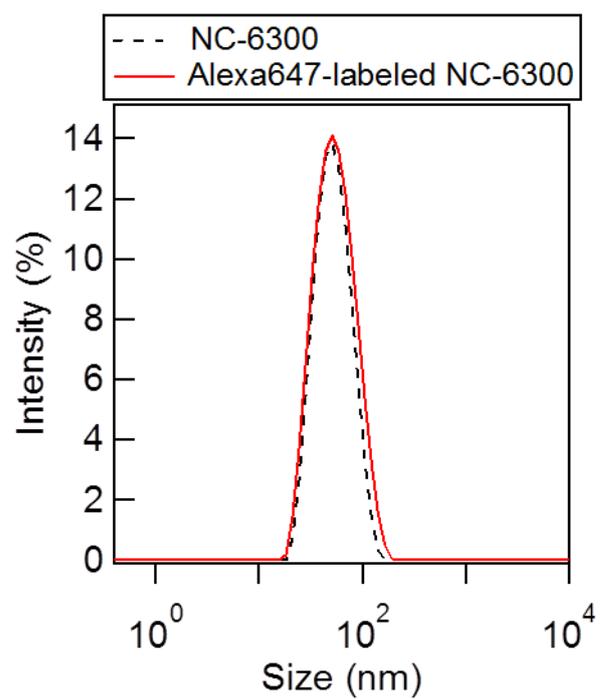


図 17 NC-6300 および Alexa647-labeled NC-6300 のサイズ分布
動的光散乱法による測定により共に約 49 nm であった。

NC-6300 の集積の評価

NC-6300 の動脈病変に対する薬理学的効果を検証する前段階として、その集積性に関する検証を Alexa647-labeled NC-6300 を用いて行った。ラット頸動脈内膜肥厚モデルを前述通り作成し、バルーン傷害後 7 日目に 9 mg/kg の Alexa647-labeled NC-6300 を尾静脈より全身投与した (n = 3)。投与 8 時間後、過量麻酔による犠牲死ののち検体 (両側総頸動脈とそれに連続する大動脈弓) を摘出した。IVIS[®] imaging system を用いて Fluorescence (蛍光) モード、excitation (励起) filter: 640 nm、emission (発光) filter: 680 nm の設定下で蛍光の有無を測定した。続いて左総頸動脈 (バルーン傷害側) を切除し、凍結組織切片作製用包埋剤に包埋し液体窒素による凍結処理ののち -80°C 下で保管した。これらを用いて、凍結マイクロームにより、血管の走行に垂直に 10 μm 厚の切片を作成し、マクロファージ染色には抗 CD68 モノクローナル抗体を、SMC 染色には抗 SMemb 抗体を、細胞核染色に Hoechst 33342 を用いて前述同様に免疫染色した。作成したプレパラートはレーザー共焦点顕微鏡を用いて直ちに観察し、Alexa647-labeled NC-6300 の局在を検証した。

NC-6300 の薬理学的効果

ラット頸動脈内膜肥厚モデルを前述の通り作成し、バルーン傷害後 7、10、13 日目 (計 3 回) に、6 mg/kg の NC-6300 (1.2 ml/kg, epirubicin 量; 18 mg/kg) を尾静脈より投与した (n = 4)。コントロール群として (NC-6300 製剤の添加基剤である) 10% スクロース/deionized water (DW、1.2 ml/kg) または DW に溶解した epirubicin (1.2 ml/kg, epirubicin 量; 18 mg/kg) を同

様にバルーン傷害後 7、10、13 日目(計 3 回)に尾静脈より投与した群を設けた (vehicle 群 および free epirubicin 群、各 n = 4)。

投与後ラットの体重は 2、3 日毎に計測された。初回投与から 14 日目 (バルーン傷害後 21 日)にイソフルレンの過量麻酔により犠牲死させた。大動脈を逆行性穿刺し、両側外頸静脈を離断したのち生理食塩水 40ml により 120 mmHg 圧で全身を灌流した。更に 4%パラホルムアルデヒド (PFA) 20ml により同圧で灌流固定し、左総頸動脈を中枢から約 5mm 間隔で 3 分割し摘出した。更に 4% PFA により 4℃ 下で半日以上固定し、パラフィン包埋した。4 μm 厚に作成した切片をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色した。

得られた標本から血管断面の neointima および中膜 (media) の面積をデジタルイメージ解析ソフトウェア (ImageJ, NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて計測し、その比 (intima/media area ratio) を算出した。更に、各切片における neointima 全体の細胞数を自動計測した。3 分割された区分の平均値をその総頸動脈の代表値とした。

統計解析

統計解析は実験①同様に行った。

結果②

内膜肥厚病変における NC-6300 の集積

IVIS[®] imaging system による蛍光イメージングでは、左総頸動脈全長に蛍光を認めた(図 18-1)。レーザー共焦点顕微鏡による免疫組織学的評価では、内膜肥厚病変全体に渡り Alexa647 陽性粒子が集積していた(図 18-2)。また、Alexa647 陽性粒子は内膜肥厚病変中の CD68 陽性細胞とも SMemb 陽性細胞とも共存性を示さなかった。

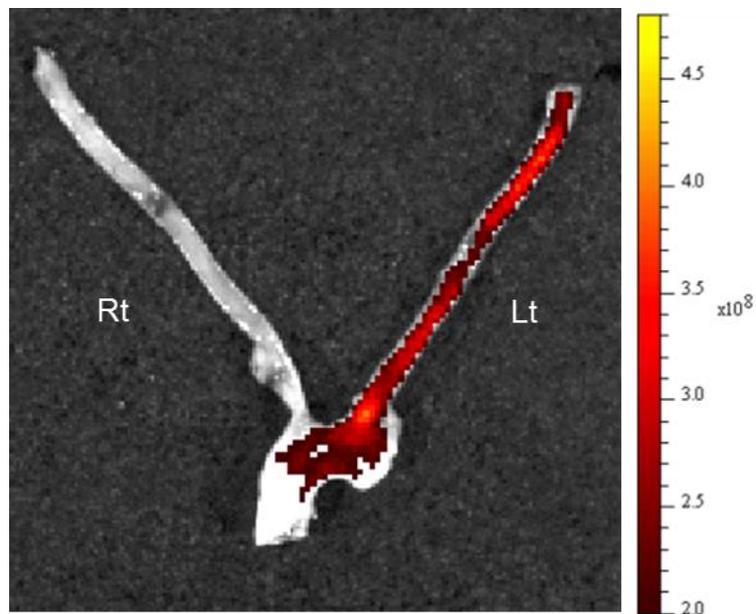


図 18-1 Alexa647-labeled NC-6300 投与後 IVIS[®] imaging system によるイメージング
傷害側頸動脈に集積を認める。

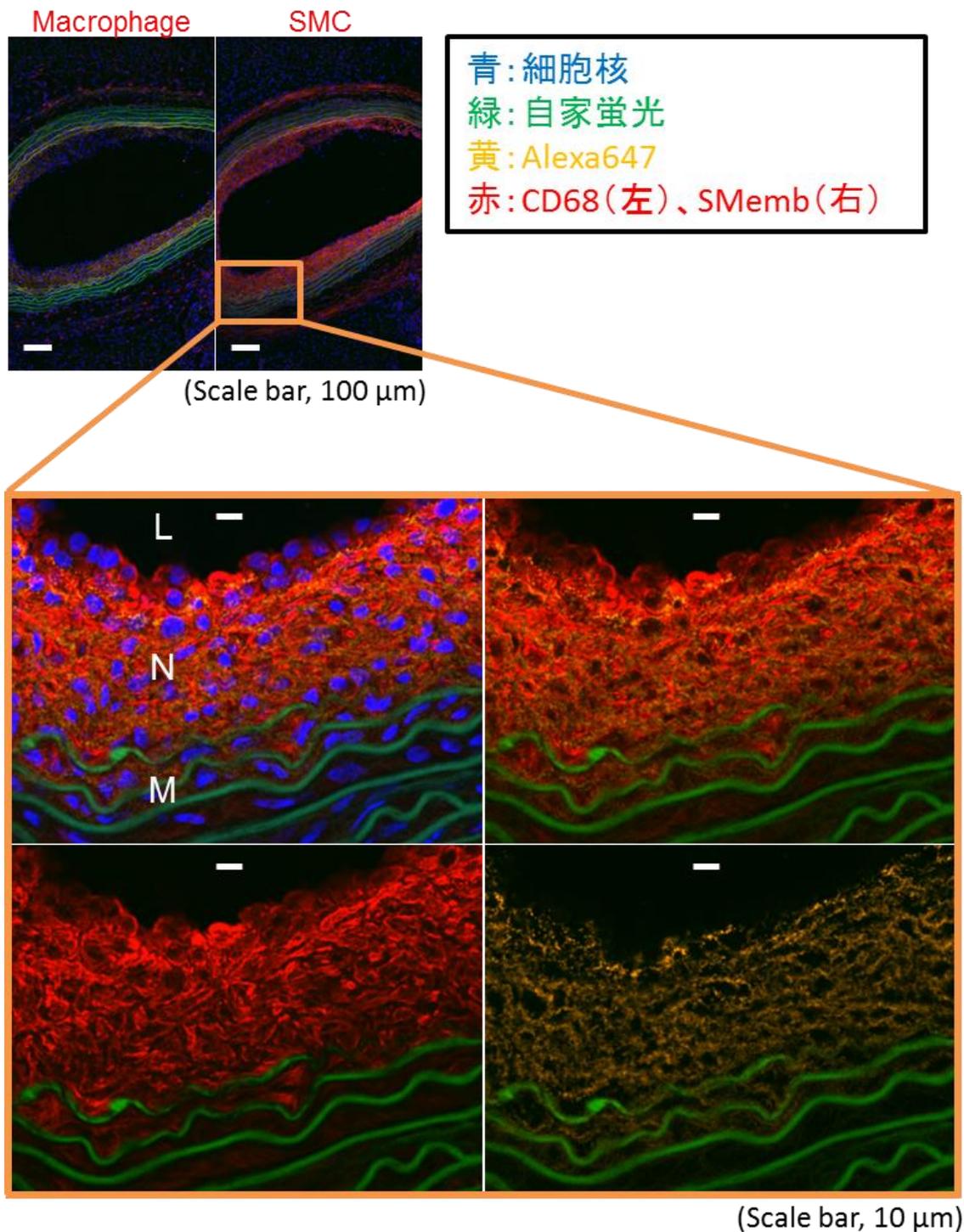


図 18-2 Alexa647-labeled NC-6300 投与後の免疫組織学的評価

バルーン傷害後 7 日目に Alexa647-labeled NC-6300 を投与し 8 時間後に採取した検体の免疫組織像である。下段は上段のオレンジ四角部を拡大した像であり、全体像(下段左上)、細胞核染色を除いたもの(下段右上)、細胞核染色と Alexa647 を除いたもの(下段左下)、細胞核染色と SMC を除いたもの(下段右下)が示されている。Alexa647 陽性粒子はマクロファージ(上段左)および SMC(上段右)のいずれとも共存性を認めない。(L:血管内腔、N:新生内膜、M:中膜)

NC-6300 の薬理学的効果

NC-6300 と free epirubicin の毒性は体重変化および生存性によって評価した(図 19)。Vehicle 群の体重は投与開始後も単調増加を続け、犠牲死の時点で相対的变化は 20%以上となった。また、NC-6300 群の体重も減少に転じることなく増加を続けたが、初回投与後 3 日以降は Vehicle 群と比べて有意に低かった。一方、free epirubicin 群の体重は 2 回目の投与の時点で減少に転じておりその後も減少を続け、投与開始 10 日目に全てのラットが死亡した。よって内膜肥厚病変の組織学的評価は NC-6300 群および Vehicle 群において行われた。

左総頸動脈の組織学的評価(HE 染色)では NC-6300 群と Vehicle 群の双方において内膜肥厚の形成を認めた(図 20)。しかし、計測した面積比 intima/media area ratio は NC-6300 群において有意に低値を示した($P < 0.05$ 、図 21)。更に、neointima 全体の細胞数も NC-6300 群の方が有意に低値であった($P < 0.001$ 、図 21)。

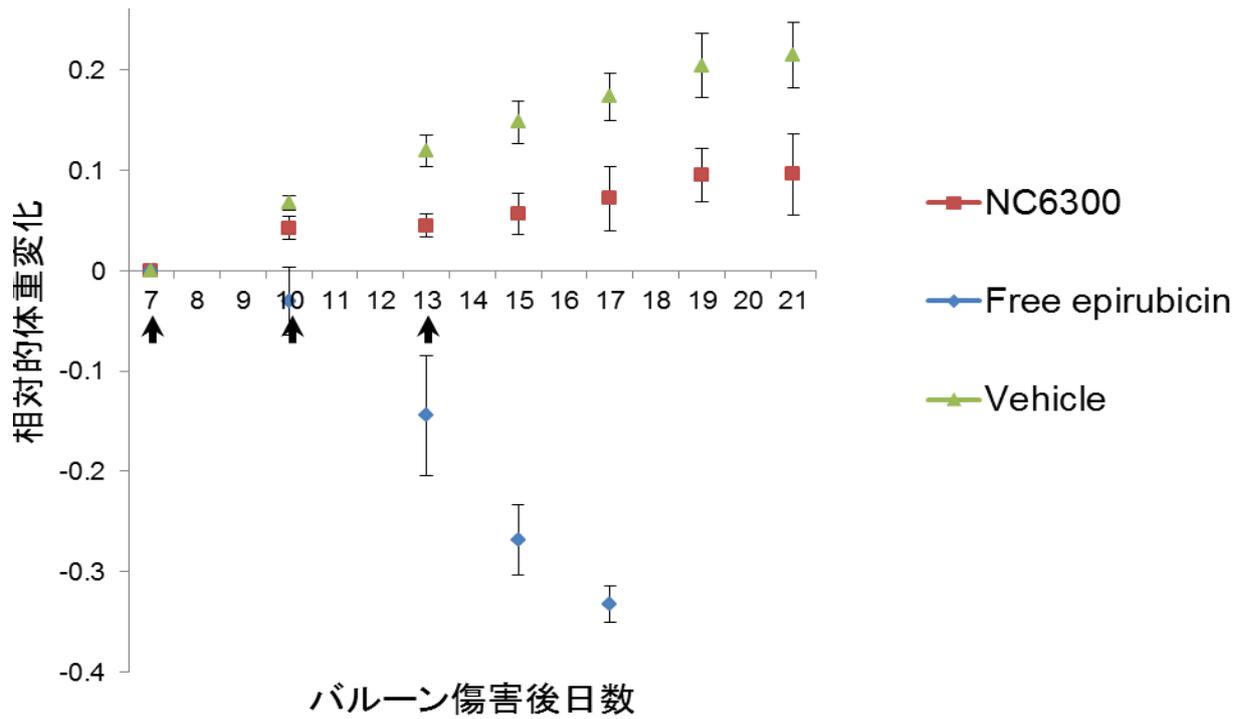


図 19 薬剤投与後の相対的体重変化

バルーン傷害後 7、10、13 日目に NC-6300、free epirubicin、vehicle (各 n = 4) のいずれかを投与した (黒矢印)。NC-6300 群は Vehicle 群より有意に低いものの持続的な増加を認めた。Free epirubicin 群は減少を続け、初回投与から 10 日以内に全匹死亡した。

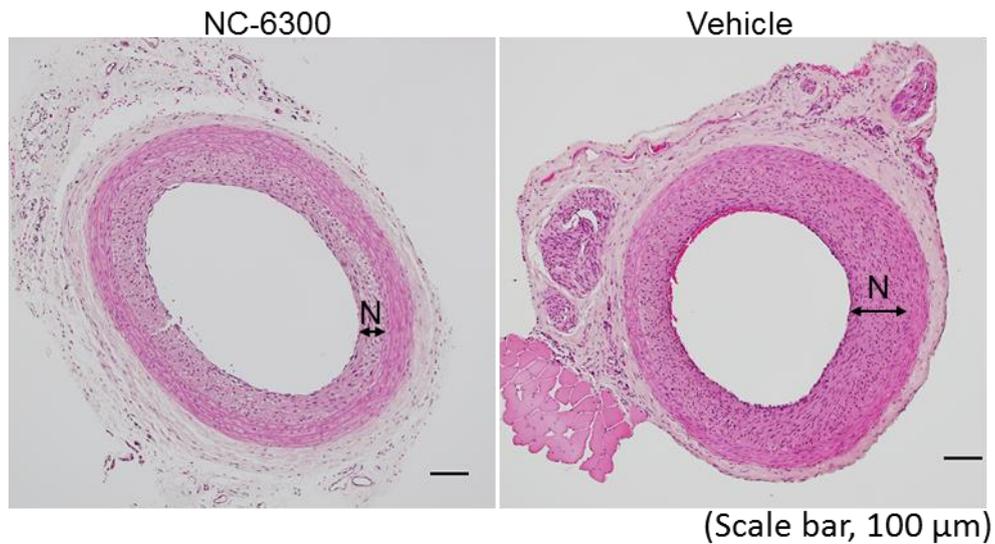


図 20 バルーン傷害側総頸動脈の組織学的評価(HE)
 初回投与から14日目(バルーン傷害後21日目)に摘出した検体の組織像。(N:neointima)

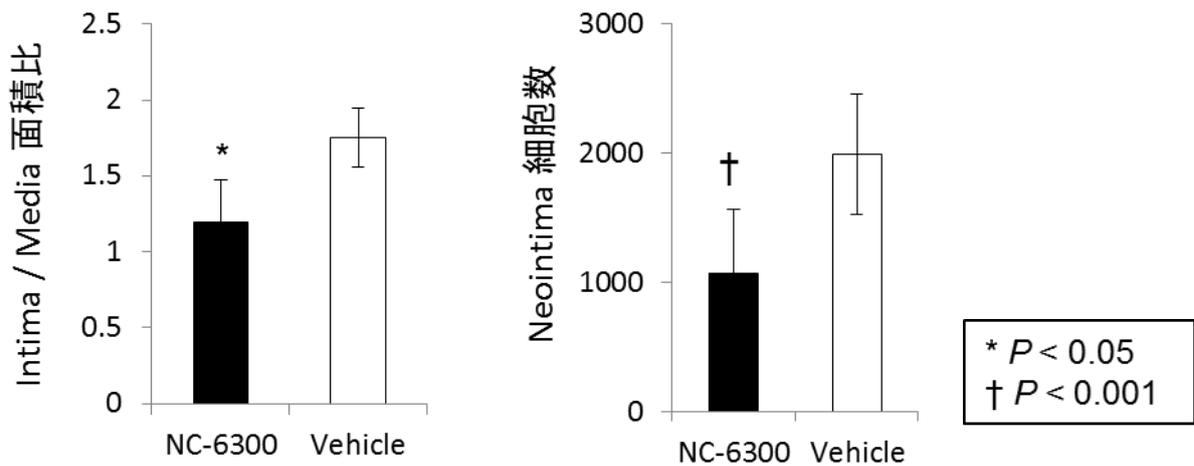


図 21 内膜肥厚病変と中膜の面積比(左)と内膜肥厚病変中の細胞数(右)
 いずれも NC-6300 群が Vehicle 群と比べて有意に低値である(各 n = 4)。

考察

本研究では、まずラット頸動脈バルーン擦過モデルを用いて内膜肥厚病変へのナノ粒子集積におけるサイズ効果を検証した。正常ラットの頸動脈において内膜は内皮細胞の単層構造から成る。頸動脈にバルーンカテーテル傷害を加えると、高い再現性をもって内膜肥厚が惹起される[10]。ラット頸動脈内膜肥厚病変はヒトにおける動脈硬化の初期病変と類似しているため[39]、本研究で用いた擦過モデルは動脈硬化の病態生理研究において広く用いられている[20-24]。ラット頸動脈バルーン擦過モデルにおける内膜肥厚の形成に関する病態は以前の研究によりかなり明らかになっている[10, 40]。概要を述べると、まずバルーン擦過によって内皮の単層が剥皮されると同時に中膜の細胞に傷害が加わる。これに対する反応として中膜の SMC の一部が増殖を始め、傷害後 2 日目頃にそのピークを迎える。更に 4 日目には増殖した SMC の一部が内膜との境である内弾性板の間隙を通り抜けて内膜側に遊走し、内膜において増殖する。内膜における SMC の細胞増殖はその後徐々に減少し、2-3 週間後には定常状態に戻る。また、内膜組織中の SMC は ECM の合成も同時に行いこれが貯留する。よって、増殖した SMC と貯留した ECM により内膜肥厚病変は形成される[1]。

要するにバルーン傷害後約 4 日で内膜肥厚病変が出現し始め、更に数日後には明確なものとして認識されることとなる。本研究の最終目標は既存の動脈硬化病変に対する特異的な DDS の開発であるため、明確に認識できる内膜肥厚病変を伴う動脈を実験対象に

する必要があった。そのため本研究では PIC-nanocarrier をバルーン傷害後 7 日や 14 日後にも投与するプロトコルを採用した。従来の研究[20-29]では nanocarrier をバルーン傷害直後に投与するプロトコルがほとんどであることから、本研究のデザインは、より現実の病態に近似したものであると言える。

実際、PIC-nanocarrier 投与時に内膜肥厚病変が形成されているか否かでその集積性は明らかに異なる挙動を示した。バルーン傷害直後に PICs-40、PICs-100 または PICs-200 を投与した時には、全サイズの PIC-nanocarrier が速やかに中膜を中心に集積し、24 時間後においても集積性を維持した。これはバルーン傷害に伴う血管壁の微小な構造変化に起因すると考えられる。加圧されたバルーンが頸動脈内腔を通過する際、全層性に機械的圧力を及ぼすこととなる。これにより、内皮細胞が剥皮されるだけでなく、内弾性板に微小な亀裂が生じることが知られている[41]。このような構造上の変化により各サイズの PIC-nanocarrier が内腔から中膜や外膜内に侵入できたと考える(図 22)。

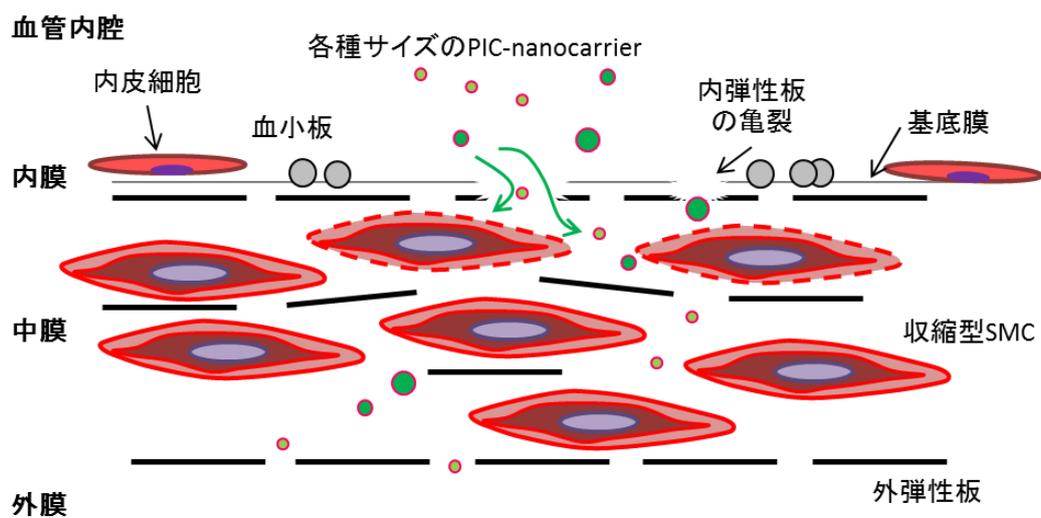
一方で、バルーン傷害後 7 日目や 14 日目に PIC-nanocarrier を投与した時には PICs-40 のみが内膜肥厚病変に明らかな集積性を示した。バルーン傷害に対する反応として内膜肥厚が新たに生じるので、内膜肥厚病変そのものには亀裂は存在し得ない。また、バルーン傷害後 7 日目や 14 日目の段階では血管内皮細胞の再生はほとんど見られないので[10, 40]、内膜肥厚病変における細胞や ECM は血流にさらされていることとなる。よって血中の PICs-40 が ECM 分子間の微細な間隙を経由して内膜肥厚病変内に侵入したことがその集積性から示唆される(図 22)。一方でより大きい粒子径をもつ PICs-100 や PICs-200 は ECM

分子間の微細な間隙に侵入出来なかったこととなる。また免疫組織学的な評価において、内膜肥厚病変内の PICs-40 は CD68 陽性細胞とも SMemb 陽性細胞とも概ね共存性を示さなかった。内膜病変を構成する細胞のほとんどが SMC であり、その他わずかなマクロファージしか存在しないことから、前述の所見は PICs-40 の殆どが ECM 分子間の微細な間隙内に局在することを意味する。これは先ほど述べた ECM 分子間の微細な間隙を經由して PICs-40 が内膜病変内に侵入するという仮説の裏付けとなった。尚、傷害後 7 日目と 14 日目を比べると、14 日目では投与後 1 時間では集積性が弱く、8、24 時間と時間がたつにつれて集積性が高くなった。これは、14 日目においては内膜肥厚病変がより厚いということ、また経時的な変化で ECM が安定化していることにより、PICs-40 が血管内腔より侵入するのに時間を要したと考えられる。

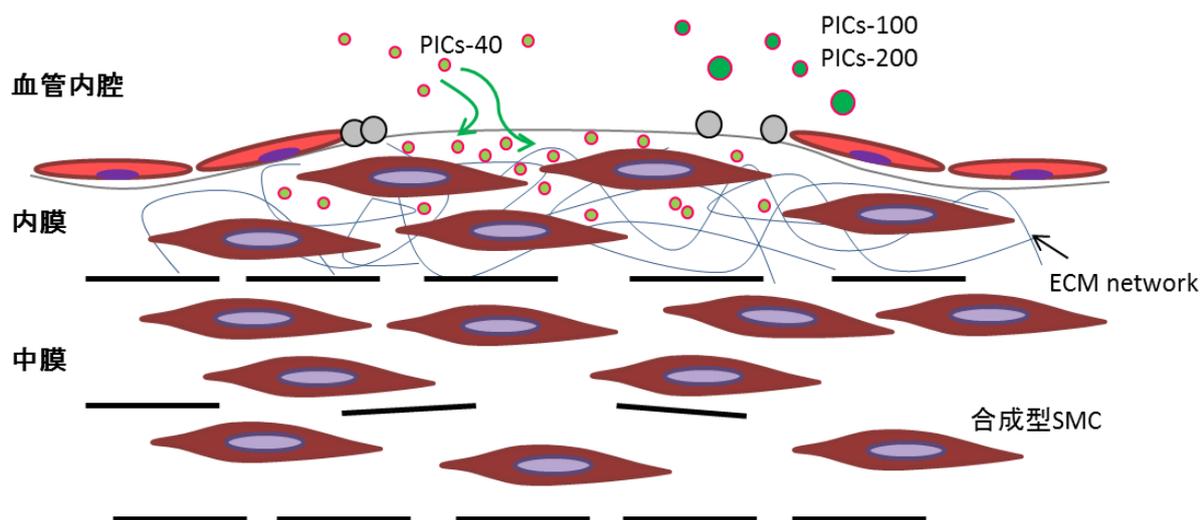
もう一つ PICs-40 の集積性に関して明らかとなった特徴として、内膜肥厚病変内に留まる時間が長いということが挙げられる。バルーン傷害後 7 日目に投与した群では、投与後 1、8、24 時間において有意な集積を認めた。つまり、PICs-40 が局所に留まっていた時間が少なくとも 23 時間はあることとなる。同様の計算をすれば、バルーン傷害後 14 日目に投与した群においては局所での貯留時間が少なくとも 16 時間となる。有効な DDS のために、ナノ粒子がどれくらいの時間、病変に留まる必要があるかに関しては明確なエビデンスがなく、恐らくナノ粒子そのものの性質や、デリバリーされる薬剤によっても異なるものと考えられる。しかし、局所での貯留時間が 16 時間以上であれば、ある程度の持続的なドラッグデリバリーが得られ、内膜肥厚病変での細胞内取り込みの確率を増やすことが出来るであろう。よって、サイ

ズの異なる PIC-nanocarrier 間の集積性に関する異なる挙動を示した本実験は、40nm が内
 膜肥厚病変に特異的かつ持続的な DDS として適度な粒子径であることを示唆しているもの
 と考えられる。

バルーン傷害直後



バルーン傷害後7・14日目



外膜

図 22 バルーン傷害後のラット頸動脈への PIC-nanocarrier 集積のシェーマ

バルーン傷害直後には内皮の脱落、内弾性板の亀裂を介して各種サイズの PIC-nanocarrier が中膜を中心に集積すると考えられる(上)。一方、バルーン傷害後 7・14 日目では、内膜肥厚病変中の ECM 分子間の微細な間隙には PICs-40 のみが侵入し、集積すると考えられる(下)。

続いて、ここで得られた内膜肥厚病変における PIC-nanocarrier 集積のサイズ効果の知見に基づき、今度は薬剤を内包し、且つ同様の性質を持ったナノ粒子によるドラッグデリバリーを試み、内膜肥厚病変に対する薬理学的効果を検証した。本検証において、epirubicin 含有ナノ粒子である NC-6300 を用いた[35, 36]。Epirubicin の薬理学的効果に関しては、同じアントラサイクリン系抗腫瘍薬である、doxorubicin を内包した nanocarrier による内膜肥厚抑制作用が Uwatoku ら[20]により報告されており、十分期待できた。NC-6300 は PEG とポリアスパラギンによるブロック共重合体に共有結合した epirubicin で構成される。この化合物は水媒体において PIC-nanocarrier 同様、PEG 部を外殻に配列する形のナノミセルを形成し、その平均直径は約 49nm であった。PIC-nanocarrier での検証で得られた最適サイズの 40 nm よりはやや大きいものの、僅かな差であり、更にはその半減期も約 4 時間と十分な血中滞留性を有することから NC-6300 は PICs-40 と同様な挙動を示すと考えた。実際、バルーン傷害後 7 日目に全身投与された Alexa647-labeled NC-6300 は PICs-40 と同様に、内膜肥厚病変に明らかな集積を示した。更に免疫染色においても PICs-40 と同様に、CD68 陽性細胞とも SMemb 陽性細胞とも明らかな共存性を示さなかった。

内膜肥厚病変におけるナノ粒子の持続的な集積は、エンドサイトーシスを介しての細胞内取り込みを促し、その後エンドソームやリソソームにより酸性環境下に置かれることとなる。NC-6300 の場合、これらの酸性環境下で epirubicin が遊離される[35]。Epirubicin はデオキシリボ核酸 (DNA) のらせん構造内に入り込み DNA、リボ核酸 (RNA) の翻訳、転写を阻害することで細胞増殖を抑制するので、NC-6300 が内膜肥厚病変に対して薬理学的効果を

発揮するためには、病変形成に際し細胞増殖が重要な役割を担う時相において投与されなければならないと考えられた。先述のように、ラット頸動脈の内膜肥厚形成の過程において、SMC増殖はバルーン傷害直後から始まり、14日を過ぎてピークアウトするまで続く。よって、バルーン傷害後4から14日の間は、内膜中の細胞増殖が内膜肥厚形成の主要な促進要因となるため、細胞増殖を抑制するNC-6300の適切なデリバリーは内膜肥厚の形成を抑制し得る。バルーン傷害後7日目でAlexa647-labeled NC-6300が内膜肥厚病変に明らかな集積を示したので、NC-6300の投与はバルーン傷害後7から14の間が妥当と考え、最終的に7、10、13日目に投与することとした。

NC-6300の内膜肥厚における薬理的効果を検証するために、対照群として free epirubicin 群および vehicle 群の2群を設けた。しかし free epirubicin 群は投与開始から10日と生存することは出来なかった。一方、epirubicin 換算で等量の NC-6300 群および vehicle 群は観察期間中、体重を増加させた。この所見は NC-6300 が epirubicin の急性毒性を著明に減らしたことを意味しており、原因として二つのことが考えられる。一つ目の理由としては、NC-6300 は血中滞留性に優れ、PEG 外殻による“ステルス効果”[42]により epirubicin を内包したまま体循環を回ることが挙げられる。NC-6300 群ではこのステルス効果により epirubicin が緩徐にデリバリーされるが、free epirubicin 群では静脈内投与後、瞬時に全量の epirubicin がデリバリーされることとなる[35]。一般的に等量の薬剤で比較した場合、急速なデリバリーより緩徐なデリバリーによる薬剤分布の方が急性毒性を抑えることが出来ることは言うまでもない。毒性低下の二つ目の理由としては、NC-6300の内膜肥厚病変への

特異的な集積が挙げられる。これによって他の部位への分布が減少する可能性があり、結果として他臓器に対する副作用が減る。ただし、本研究においてはNC-6300の内膜肥厚病変への特異的な集積が、他の部位への epirubicin 分布量をどれくらい減らしたかについての定量的データはない。

本研究における最も重要な所見の一つは、NC-6300の全身投与によって、vehicle群と比べて有意に内膜肥厚が抑制されたということである。この結果は、十分量のNC-6300ミセルが静脈内投与後に内膜肥厚病変に集積し、局所で epirubicin を遊離し細胞内へのデリバリーに成功したことを示唆する。この epirubicin のデリバリーにより内膜肥厚病変における細胞増殖を抑制し、内膜肥厚形成を抑えた。組織像の形態学的評価においてもNC-6300群は vehicle群と比べて有意に内膜肥厚病変内の細胞数が少なく、その細胞増殖抑制効果の裏付けとなった。

最後に本研究における限界に関して言及する。その最たるものは動物モデルと実際のヒト病変との相違性と言える。今回用いたラット頸動脈バルーン擦過モデルでは、ヒト内膜肥厚病変における細胞・分子シグナルは高く再現されるが、マクロファージ・T細胞の関与は少なく、内膜への脂質沈着も見られない[10, 31, 40]。また今回DDSを検証した擦過後7-14日目のモデルをヒトに外挿する場合、内膜肥厚が見られ、かつSMCの細胞増殖もある程度見られるという観点で、亜急性期から慢性期の病変を想定している。一方、構造上の決定的な違いは、ヒトにおいては病変上に内皮細胞が見られるのに対し、今回のモデルでは再内皮化がほとんど見られていないということである。しかし、通常の内皮細胞間の tight

junction が約 20 nm 径であるのに対し、アポトーシスや分裂期にある細胞では 30 – 1000 nm 程度に拡大しているため[43]、今回の DDS は内皮下の内膜肥厚病変を十分ターゲットにすることが出来ると考えられる。

また、今回用いた PIC-nanocarrier と NC-6300 が全く同じ構造を有する nanocarrier ではないことが挙げられる。前者は内外を PEG に挟まれたポリイオンコンプレックス膜から成る、比較的強固な中空型 nanocarrier であるのに対し[32]、後者は PEG 外殻を同様に有するがエピルピシンを内核に内包するミセル型 nanocarrier である[36]。この構造上の差異により集積性が全く同等にはなり得ないが、本研究においてはあくまでも粒子径、PEG によるステルス効果、十分な血中滞留性の 3 点の相同性から外挿性は担保されると判断した。

3 つ目は、内膜肥厚病変における nanocarrier の集積のメカニズムは、あくまでも今回の共焦点顕微鏡の画像所見や過去の知見に基づいた推測であるということである。これを検証するには電子顕微鏡等を用いて更に微細な環境を評価することが必須であり、今後取り組むべき課題と考えている。また、今回の免疫組織学的評価から nanocarrier の、内膜肥厚病変の間質を主体とした受動的集積が示唆されたが、集積に影響を及ぼし得る生理活性物質等の検証はしていない。傷害後 7 日目と 14 日目の集積性の差異に関しても、この観点における評価は必要であり、更にはより後期の内膜肥厚病変をターゲットとした薬理学的効果の検証も今後の課題として挙げられる。

結論

本研究においてナノ粒子を用いた内膜肥厚病変に対する有効な DDS を実現するには、100 nm 以上ではなく 40 nm がナノ粒子直径として適切であることを示した。更にこのサイズ効果の検証に基づき、既存の内膜肥厚病変に対する epirubicin 内包ナノ粒子の薬理学的効果を示した。複雑なリガンドや抗体等を用いず、単純なサイズ調整のみで内膜肥厚病変への特異的集積性を証明した本研究は新たな知見である。ヒトにおける動脈硬化病変とラット内膜肥厚病変との相同性から、今回のナノ粒子を用いた DDS はヒトにおける動脈硬化関連疾患に対する治療に応用できると考え、今後更に有効な薬剤搭載ナノ粒子の開発が望まれる。

謝辞

本研究を遂行する機会及び御指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科外科学専攻腫瘍外科・血管外科 渡邊聡明教授、国際医療福祉大学血管外科 宮田哲郎教授(前東京大学医学部附属病院血管外科病院教授)、東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻兼医学系研究科疾患生命工学センター臨床医工学部門 片岡一則教授に深謝致します。本研究の遂行にあたり、御指導を賜りましたに東京大学医学部血管外科 重松邦広講師に深謝致します。また、本研究の材料合成に際し格別な御尽力を賜りました東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻 安楽泰孝助教に御礼を申し上げます。本研究の計画や実験手技の御指導、材料合成に際し格別な御尽力を賜りました東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻 千田司氏に御礼を申し上げます。

最後に、研究の計画や基礎的方法から結果の解釈、考察に至るまで日々懇切な御指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター臨床医工学部門 三浦裕助教ならびに東京大学医学部附属病院トランスレーショナル・リサーチセンター 小山博之特任准教授には格別の御礼を申し上げます。

引用文献

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature*.362:801-809(1993)
2. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: Systematic analysis of population health data. *Lancet*. 367:1747-1757(2006)
3. 厚生労働省 平成 25 年人口動態統計
4. Smith SC, Benjamin EJ, Bonow RO, Braun LT, Creager MA, Franklin BA, Gibbons RJ, Grundy SM, Hiratzka LF, Jones DW, Lloyd-Jones DM, Minissian M, Mosca L, Peterson ED, Sacco RL, Spertus J, Stein JH, Taubert KA, World Heart Federation and the Preventive Cardiovascular Nurses Association. AHA/ACCF Secondary Prevention and Risk Reduction Therapy for Patients with Coronary and other Atherosclerotic Vascular Disease: 2011 update: a guideline from the American Heart Association and American College of Cardiology Foundation. *Circulation*. 124:2458-2473(2011)
5. Levine GN, Bates ER, Blankenship JC, Bailey SR, Bittl JA, Cercek B, Chambers CE, Ellis SG, Guyton RA, Hollenberg SM, Khot UN, Lange RA, Mauri L, Mehran R, Moussa ID, Mukherjee D, Nallamothu BK, Ting HH, American College of Cardiology Foundation, American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. 2011

- ACCF/AHA/SCAI guideline for percutaneous coronary intervention. A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. *J Am Coll Cardiol.* 58:e44-122(2011)
6. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg.* 45 Suppl S:S5-67(2007)
 7. Dussallant GR, Mintz GS, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Popma JJ, Wong SC, Leon MB. Small stent size and intimal hyperplasia contribute to restenosis: A volumetric intravascular ultrasound analysis. *J Am Coll Cardiol.* 26:720-724(1995)
 8. Szilagyi DE, Elliott JP, Hageman JH, Smith RF, Dall'olmo CA. Biologic fate of autogenous vein implants as arterial substitutes: Clinical, angiographic and histopathologic observations in femoro-popliteal operations for atherosclerosis. *Ann Surg.* 178:232-246(1973)
 9. Born GV, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol.* 168:178-195(1963)
 10. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest.* 49:327-333(1983)
 11. Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, Ross R. Inhibition of

- neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science*. 253:1129-1132(1991)
12. Ozaki Y, Violaris AG, Serruys PW. New stent technologies. *Prog Cardiovasc Dis*. 39:129-140(1996)
 13. Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Abizaid AS, Feres F, Pinto IM, Seixas AC, Staico R, Mattos LA, Sousa AG, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW. Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: A quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. *Circulation*. 103:192-195(2001)
 14. Drachman DE, Edelman ER, Seifert P, Groothuis AR, Bornstein DA, Kamath KR, Palasis M, Yang D, Nott SH, Rogers C. Neointimal thickening after stent delivery of paclitaxel: Change in composition and arrest of growth over six months. *J Am Coll Cardiol*. 36:2325-2332(2000)
 15. Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y. Block copolymer micelles for drug delivery: Design, characterization and biological significance. *Adv Drug Deliv Rev*. 47:113-131(2001)
 16. Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2:347-360(2003)
 17. Ferrari M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*.

- 5:161-171(2005)
18. Davis ME, Chen ZG, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 7:771-782(2008)
 19. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *J Control Release.* 65:271-284(2000)
 20. Uwatoku T, Shimokawa H, Abe K, Matsumoto Y, Hattori T, Oi K, Matsuda T, Kataoka K, Takeshita A. Application of nanoparticle technology for the prevention of restenosis after balloon injury in rats. *Circ Res.* 92:e62-69(2003)
 21. Banai S, Chorny M, Gertz SD, Fishbein I, Gao J, Perez L, Lazarovichi G, Gazit A, Levitzki A, Golomb G. Locally delivered nanoencapsulated tyrphostin (AGL-2043) reduces neointima formation in balloon-injured rat carotid and stented porcine coronary arteries. *Biomaterials.* 26:451-461(2005)
 22. Reddy MK, Vasir JK, Sahoo SK, Jain TK, Yallapu MM, Labhasetwar V. Inhibition of apoptosis through localized delivery of rapamycin-loaded nanoparticles prevented neointimal hyperplasia and reendothelialized injured artery. *Circ Cardiovasc Interv.* 1:209-216(2008)
 23. Kapadia MR, Chow LW, Tsihlis ND, Ahanchi SS, Eng JW, Murar J, Martinez J, Popowich DA, Jiang Q, Hrabie JA, Saavedra JE, Keefer LK, Hulvat JF, Stupp SI,

- Kibbe MR. Nitric oxide and nanotechnology: A novel approach to inhibit neointimal hyperplasia. *J Vasc Surg.* 47:173-182(2008)
24. Chan JM, Rhee JW, Drum CL, Bronson RT, Golomb G, Langer R, Farokhzad OC. In vivo prevention of arterial restenosis with paclitaxel-encapsulated targeted lipid-polymeric nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:19347-19352(2011)
25. Kolodgie FD, John M, Khurana C, Farb A, Wilson PS, Acampado E, Desai N, Soon-Shiong P, Virmani R. Sustained reduction of in-stent neointimal growth with the use of a novel systemic nanoparticle paclitaxel. *Circulation.* 106:1195-1198(2002)
26. Danenberg HD, Golomb G, Groothuis A, Gao J, Epstein H, Swaminathan RV, Seifert P, Edelman ER. Liposomal alendronate inhibits systemic innate immunity and reduces in-stent neointimal hyperplasia in rabbits. *Circulation.* 108:2798-2804(2003)
27. Yang J, Zeng Y, Li Y, Song C, Zhu W, Guan H, Li X. Intravascular site-specific delivery of a therapeutic antisense for the inhibition of restenosis. *Eur J Pharm Sci.* 35:427-434(2008)
28. Joner M, Morimoto K, Kasukawa H, Steigerwald K, Merl S, Nakazawa G, John MC, Finn AV, Acampado E, Kolodgie FD, Gold HK, Virmani R. Site-specific targeting of nanoparticle prednisolone reduces in-stent restenosis in a rabbit model of established atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:1960-1966(2008)
29. Cyrus T, Zhang H, Allen JS, Williams TA, Hu G, Caruthers SD, Wickline SA, Lanza

- GM. Intramural delivery of rapamycin with $\alpha_v\beta_3$ -targeted paramagnetic nanoparticles inhibits stenosis after balloon injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*28:820-826(2008)
30. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med.* 368:2004-2013(2013)
31. Tulis DA. Rat carotid artery balloon injury model. *Methods Mol Med.* 139:1-30(2007)
32. Anraku Y, Kishimura A, Oba M, Yamasaki Y, Kataoka K. Spontaneous formation of nanosized unilamellar polyion complex vesicles with tunable size and properties. *J Am Chem Soc.* 132:1631-1636(2010)
33. Anraku Y, Kishimura A, Kobayashi A, Oba M, Kataoka K. Size-controlled long-circulating picosome as a ruler to measure critical cut-off disposition size into normal and tumor tissues. *Chem Commun (Camb).* 47:6054-6056(2011)
34. Kishimura A. Development of polyion complex vesicles (PICsomes) from block copolymers for biomedical applications. *Polymer J.* 45:892-897(2013)
35. Harada M, Bobe I, Saito H, Shibata N, Tanaka R, Hayashi T, Kato Y. Improved anti-tumor activity of stabilized anthracycline polymeric micelle formulation, NC-6300. *Cancer Sci.* 102:192-199(2011)
36. Takahashi A, Yamamoto Y, Yasunaga M, Koga Y, Kuroda J, Takigahira M, Harada M, Saito H, Hayashi T, Kato Y, Kinoshita T, Ohkohchi N, Hyodo I, Matsumura Y. NC-6300, an epirubicin-incorporating micelle, extends the antitumor effect and

- reduces the cardiotoxicity of epirubicin. *Cancer Sci.* 104:920-925(2013)
37. Thyberg J, Blomgren K, Hedin U, Dryjski M. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: An electron-microscopic and stereological study. *Cell Tissue Res.* 281:421-433(1995)
 38. Harada A, Kataoka K. Formation of polyion complex micelles in an aqueous milieu from a pair of oppositely-charged block copolymers with poly(ethylene glycol) segments. *Macromolecules.* 28:5294-5299(1995)
 39. Nakashima Y, Wight TN, Sueishi K. Early atherosclerosis in humans: Role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans. *Cardiovasc Res.* 79:14-23(2008)
 40. Clowes AW, Clowes MM, Fingerle J, Reidy MA. Regulation of smooth muscle cell growth in injured artery. *J Cardiovasc Pharmacol.* 14 Suppl 6:S12-15(1989)
 41. Steele PM, Chesebro JH, Stanson AW, Holmes DR, Dewanjee MK, Badimon L, Fuster V. Balloon angioplasty. Natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model. *Circ Res.* 57:105-112(1985)
 42. Gu F, Zhang L, Teply BA, Mann N, Wang A, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC. Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:2586-2591(2008)

43. Tarbell JM. Mass transport in arteries and the localization of atherosclerosis. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 5:79–118(2003)