

博士論文

急性下肢虚血に対するナノ粒子を用いた  
新たな治療戦略の探求

須原 正光

博士論文

急性下肢虚血に対するナノ粒子を用いた  
新たな治療戦略の探求

須原 正光

## 目次

略語一覧	… 5
要旨	… 6
序文	… 7
末梢動脈疾患治療の現状と問題点	… 7
ナノ製剤を用いたドラッグデリバリーシステム	…10
本研究の概要	…11
<b><u>実験 1 . 側副血行路の形成部位に関する検討</u></b>	
<方法>	…17
実験動物	…17
ラット急性下肢虚血モデルの作成	…17
下肢動脈造影	…19
下肢血流の評価	…20
統計解析	…20
<結果>	…21
下肢動脈造影	…21
下肢血流の評価	…24

<小括>	…25
<b>実験 2 . 側副血行路形成部位へのナノ粒子の集積性に関する検討</b>	
<方法>	…26
Cy-5 labeled PIC-nanocarrier の調製	…26
実験動物	…29
ラット急性下肢虚血群・sham-ope 群の作成と PIC-nanocarrier の投与	…29
蛍光イメージング	…30
組織学的評価	…30
<結果>	…33
Cy-5 labeled PIC-nanocarrier の調製	…33
蛍光イメージング	…34
組織学的評価	…38
<小括>	…44
<b>実験 3 . IL-1<math>\beta</math>内包 PIC micelle の調製と生理活性・集積性の検討</b>	
<内包薬剤の選定>	…45
<方法>	…47
IL-1 $\beta$ の charge conversion	…47

charge converted IL-1 $\beta$ の生理活性の検証	…48
IL-1 $\beta$ 内包 PIC micelle (PICs-IL) の調製	…49
PICs-IL の集積性の検討	…52
PICs-IL の血中滞留性の検討	…53
<結果>	…54
IL-1 $\beta$ の charge conversion	…54
charge converted IL-1 $\beta$ の生理活性の検証	…54
IL-1 $\beta$ 内包 PIC micelle (PICs-IL) の調製	…56
PICs-IL の集積性の検討	…58
PICs-IL の血中滞留性の検討	…59
<小括>	…60
考察	…61
結論	…71
謝辞	…72
引用文献	…73

略語一覽

<sup>1</sup> H-NMR	<sup>1</sup> H-nuclear magnetic resonance	IA	intraarterial
α-SMA	alpha-smooth muscle actin	IL	interleukin
ABI	ankle brachial index	IM	intramuscular
AFS	amputation free survival	iNF-κB	inhibitory nuclear factor kappa B
ASO	arteriosclerosis obliterans	IV	intravenous
ATCC	American Type Culture Collection	M- PBMNC	G-CSF mobilized peripheral blood derived mononuclear cell
BLA-NCA	β-benzyl-L-aspartate- <i>N</i> -carboxy anhydrides	MCP	monocyte chemotactic protein
BMC	bone marrow concentrate	MeO-	methoxy-
BMMNC	bone marrow derived mononuclear cell	<i>Mn</i>	number adjusted molecular weight
BMMSC	bone marrow mesenchymal stem cell	MRI	magnetic resonance imaging
CD	cluster of differentiation	<i>Mw</i>	weight adjusted molecular weight
CF	caudofemoralis muscle	MWCO	molecular weight cutoff
Cit	citraconic anhydrate	MWD	maximum walking distance
Cyt	cytchrome C	NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidone
DAP	1,5-diamino pentan	PAD	peripheral artery disease
DDS	drug delivery system	PBLA	poly(β-benzyl-L-aspartate)
Del	developmental endothelial locus	PBMNC	peripheral blood derived mononuclear cell
DP	degree of polymeration	PBS	phosphate buffered saline
ECM	extracellular matrix	PDI	polydispersity index
ELISA	enzyme-linked immuno sorbet assay	PEG	poly(ethylene glycol)
EMEM	Eagle's minimal essential medium	PIC	polyion complex
EPC	endothelial progenitor cell	RFU	relative fluorescent unit
EPR	enhanced permeability and retention	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
FGF	fibroblast growth factor	SM	semimembranous muscle
FP	2,5-dihydro-4-methyl-2,5-dioxo-3- furanpropanoic acid	ST	semitendonous muscle
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor	TcPO <sub>2</sub>	transcutaneous oxygen pressure
GPC	gel permeation chromatography	TTF	time to first occurrence of treatment failure
HGF	hepatocyte growth factor	VEGF	vascular endothelial growth factor

# 急性下肢虚血に対するナノ粒子を用いた 新たな治療戦略の探求

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 野澤 宏彰 准教授

須原 正光

## 要旨

手術不能の重症末梢動脈疾患に対する血管新生療法には未解決の問題が多い。今回、新たな血管新生療法としてポリイオン複合体型ナノ粒子による側副血行路形成部位へのドラッグデリバリーシステムの開発を試みた。本研究に於いては、その粒子サイズを精密に変化させることによって、全身投与での標的部位への集積効率を制御できることが明らかにされた。更に、側副血行路形成の促進が期待できる IL-1 $\beta$ を薬物として内包した粒子の調製に成功した。しかし、この粒子の標的部位への集積は微弱であり、その要因が粒子の血中安定性の違いに帰することが推察された。今後、薬物内包ナノ粒子の分子設計の再検討ならびに粒子調製条件の最適化が望まれる。

## 序文

### 末梢動脈疾患治療の現状と問題点

末梢動脈疾患 (peripheral artery disease; PAD) は「冠動脈以外の末梢動脈である大動脈・四肢動脈・頸動脈・腹部内臓動脈・腎動脈の閉塞性疾患」と定義される [1]。現在、PAD の多くは動脈硬化を原因とする閉塞性動脈硬化症 (arteriosclerosis obliterans; ASO) が占めており、全世界的に患者数が増加している [2]。下肢における PAD には Fontaine 分類 [3]・Rutherford 分類 [4] といった病期分類があるが、いずれにおいても最重症は虚血による組織壊死である。壊死の進行とともに多臓器不全に陥ることや、感染を併発して敗血症に至ることもあり、肢予後・生命予後ともに非常に不良である [5]。このような状態に対しては、可及的速やかな血行再建が求められる [1,5] が、特に末梢の血管床が荒廃している症例においては治療が施行できない、もしくは奏功しないことが多く、救命のために下肢切断を余儀なくされる。このような状況の中、以前より血管新生療法が注目されてきた。ヒトに対して行われた主な比較試験の結果を表 1 にまとめた。Basic fibroblast growth factor (bFGF) の投与 [6–8]、vascular endothelial growth factor (VEGF) [9–11]・hepatocyte growth factor (HGF) [12]、developmental endothelial locus-1 (Del-1) [13] などの各種血管新生因子の遺伝子療法、骨髄由来



単核球 (BMMNC) ・末梢血由来単核球 (PBMNC) 、各種幹細胞を用いた細胞治療も試みられ、臨床試験が行われてきた [14–25]。血管新生因子そのものの投与は、bFGF の経静脈投与において腎障害が顕著に現れたことで頓挫した [7]。選択的動脈内投与でも腎障害の発現が認められている [8]。一方で gelatin hydrogel に包埋して筋肉内投与する方法では、腎障害の発現は見られず血流改善効果も上げており、導入法の改善によって臨床応用の可能性は残る [26]。遺伝子導入療法も自覚症状の改善や生理・画像検査所見の改善は得られたものの、その多くで救肢率などの臨床的アウトカムは達成できていない [11,27]。細胞移植療法はヒトでも救肢率の向上など一定の臨床効果が得られているが、特に骨髄由来細胞採取の侵襲性・採取した細胞の維持管理に要する技術と費用・緊急対応が困難など解決すべき問題は多い。タンパク・遺伝子治療と細胞移植療法との大きな違いは、前者では単一の物質のみの導入であるが、後者では導入された細胞が必要に応じて様々なサイトカインを分泌しうることがあげられる。また、細胞は自らが機能するに最適の部位に遊走しうるが、前二者では導入された物質は拡散・血流という受動的な動態しかとりえないため、本来機能を発揮すべき部位に十分に届いていない点も重要と考えられる。

Agent		Author	Year	Route	n (treated/control)		Endpoint	Improve.
Protein	bFGF	Lazarous [6]	2000	IA	19	(13/6)	calf blood flow	Y
	bFGF	Cooper [7]	2001	IV	24	(16/8)	peak walking time	stopped
	bFGF	Lederman [8]	2002	IA	190	(127/63)	peak walking time	Y
	G-CSF	Arai [28]	2006	SC	26	(14/12)	ABI, TcPO2	Y
Gene	<i>VEGF165</i>	Makinen [9]	2002	IA	54	(19/35)	angiography	Y
	<i>VEGF121</i>	Rajagopalan [10]	2003	IM	105	(72/33)	peak walking time	N
	<i>VEGF165</i>	Kusumanto [11]	2006	IM	54	(27/27)	amputation	N
	<i>Del-1</i>	Grossman [13]	2007	IM	105	(52/53)	peak walking time	N
	<i>FGF-1</i>	Nikol [29]	2008	IM	125	(59/66)	ulcer healing	N
	<i>HGF</i>	Shigematsu [12]	2010	IM	40	(27/13)	rest pain/ulcer size	Y
	<i>FGF-1</i>	Belch [27]	2011	IM	525	(259/266)	AFS	N
Cell	BMNMC vs PBMNC	Tateishi -Yuyama [14]	2002	IM	40	(20/20)	ABI, TcPO2	Y
	M-PBMNC	Huang [16]	2005	IM	28	(14/14)	rest pain/ulcer size	Y
	M-PBMNC vs BMNMC	Huang [15]	2007	IM	150	(76/74)	ABI	Y
	BMNMC	Bartsch [17]	2007	IA+IM	25	(13/12)	MWD, ABI	Y
	BMNMC	Cobellis [18]	2008	IA	19	(10/9)	ABI	Y
	BMC	Prochazka [19]	2010	**	96	(42/54)	amputation	Y
	BMMSC or BMMNC	Lu [20]	2011	IM	82	(20/21/41)	ulcer healing	Y
	BMMNC	Walter [21]	2011	IA	40	(19/21)	ABI	N
	BMC	Iafrati [22]	2011	IM	48	(34/14)	amputation	N
	BMMNC	Idei [23]	2011	IM	97	(51/46)	AFS	Y
	Ixymelocel-T	Powell [24]	2012	IM	72	(48/24)	TTF	Y
	EPC	Losordo [25]	2012	IM	28	(16/12)	AFS	Y

表 1. 既報の血管新生療法の臨床試験結果（略語は略語一覧を参照）

\*\*：injection along posterior / anterior tibial artery

## ナノ製剤を用いたドラッグデリバリーシステム

ナノ製剤を用いた全身投与系のドラッグデリバリーシステム (DDS) では、低分子量の薬剤とは異なり、生体内分布・血中半減期・内包薬剤の代謝を制御できる。このようなナノ製剤による薬物の体内動態制御は、ここ十数年の間、**enhanced permeability and retention effect (EPR 効果)** によって説明されてきた [30]。すなわち、腫瘍組織においては、無秩序で幼若な新生血管や各種のサイトカインの発現・増加があり、その結果として、内皮細胞間に 300 ~ 4700 nm の **fenestration** が生じる [31]。そのため、腫瘍とその周辺組織では血管の透過性が亢進する。また、腫瘍組織では様々な物質が血管外漏出する (**enhanced permeability**) と同時にリンパ系の障害が加わることで漏出物質の排泄が遅延する (**retention**)。このような疾患組織の特性を利用して、全身投与したナノ製剤が疾患部位（特に腫瘍組織）に対して集積することを **EPR 効果** と呼んでいる。近年では、適切なサイジングによってナノ製剤を病的組織に選択的に送達させることも可能になりつつある。更に、炎症組織における血管透過性の亢進が明らかになったことから、腫瘍組織以外の疾患に於いても **EPR 効果** 同様の原理にてナノ製剤による治療が達成できる可能性が報告されている [32]。

一方 PAD において、**native** の動脈に狭窄・閉塞が起きると、代償反応として側副血行路が発達する。この側副血行路が発達する過程には、炎症反応が深く

関与している [33–36]。たとえば CD4 をノックアウトしたマウスでは、動脈を結紮しても側副血行路の発達が生じないことが報告されている [37]。逆に、炎症反応を抑制する働きのある inhibitory nuclear factor kappa B (iNF- $\kappa$ B) をノックアウトしたマウスでは側副血行路の形成が促進されることも示されている [38]。今回、この側副血行路形成に伴う炎症反応をターゲットとして、ナノ粒子を用いた DDS が達成できるのではないかとの仮説を立案した。

## 本研究の概要

側副血行路形成反応は慢性虚血より急性虚血において強く発現していることが知られており [39]、急性下肢虚血モデルにおいてその仮説を検証することとした。これまでラットの下肢虚血モデルは、大腿部の縦切開で大腿動脈全長の切除もしくは結紮モデルが使用されることが多かった [40–42]。しかし、このモデルでは膝窩動脈と伏在動脈の分岐部を処理するために大腿深部まで操作が及ぶ。同部はまさに側副血行路の発達が予想される部位であり、ここに手術関連の侵襲・炎症が及んでしまうと、側副血行路形成に伴う炎症反応による影響を正確に評価できなくなると考えられた。そのため、本研究に特化した急性下肢虚血モデルを新たに構築することとした。一方、関連研究に於いては、より低侵襲に虚血を誘導する大腿動脈結紮モデルが使用される。しかしながらこのモデル

は、術後7日目には健常側との血流に有意差がなくなると指摘されている [43]。慢性期にも一定の虚血が残存していない場合には、治療効果判定が困難になると考えられるため、本研究に於いては同モデルを採用していない。〈実験1〉では、①可及的に強い虚血を惹起すること②側副血行路ができる筋肉に手術侵襲が及ばないことの両面を達成しうる動物モデルの構築を試み、そのモデルにおいて側副血行路がどの筋肉に形成されるのかを評価した。

続いて〈実験2〉では、側副血行路ができる部位に実際にナノ粒子が選択的に到達・滞留するかどうかを評価した。実験に用いるナノ粒子として、ポリイオン複合体 (polyion complex; PIC) 高分子ミセル (PIC micelle) もしくは中空粒子 (PICsome) を選択した。これらを総称して以下 PIC-nanocarrier と記載する。

これは poly(ethylene glycol) (PEG) と anioner もしくは cationer が結合した block-copolymer の自己組織化によって形成される。図1に示すように、ポリマー全体に対する PEG の重量分画 ( $f_{\text{PEG}}$ ) が 10% より高ければ micelle に、低ければ vesicle を形成する [44]。

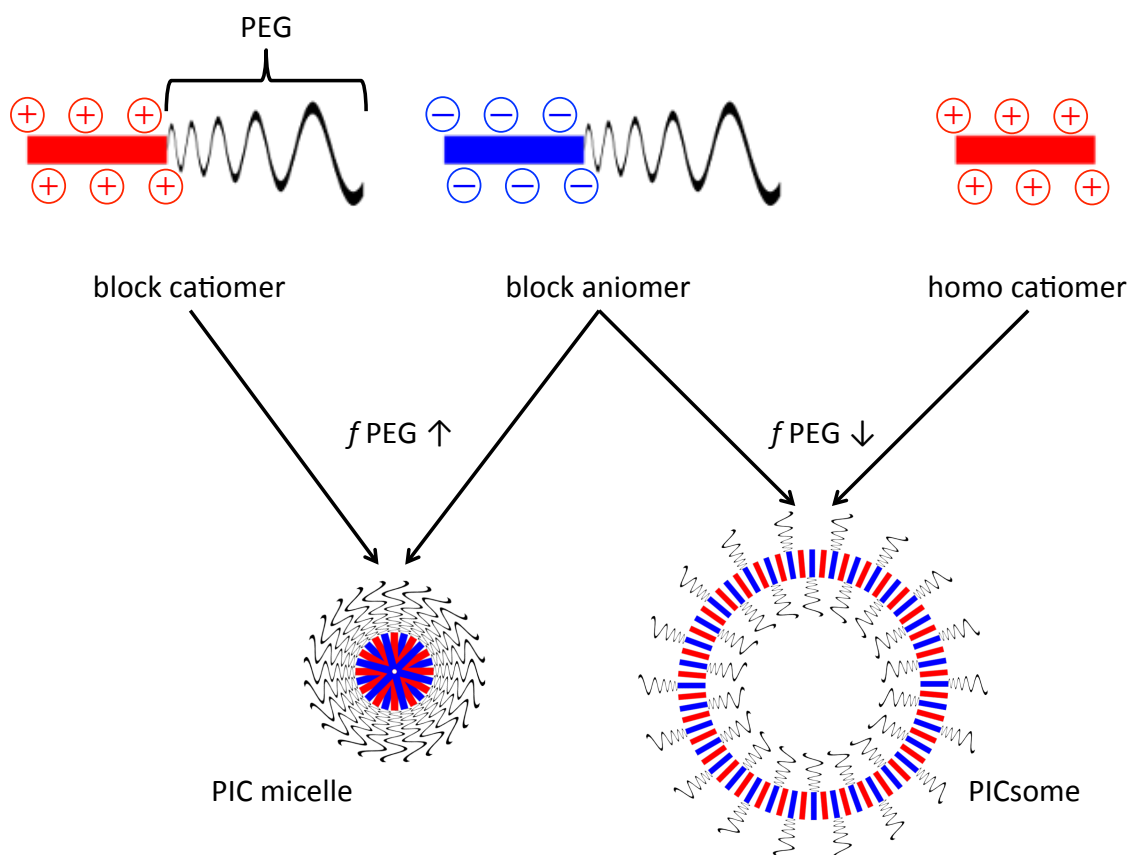


図 1. PIC-nanocarrier 構造のシエーマ

$f_{\text{PEG}} > 10\%$  で PIC micelle (左)、 $f_{\text{PEG}} < 10\%$  で PICsome (右) を形成する。

この PIC-nanocarrier の特徴は、

- ① 原料のポリマーが水溶性で、粒子の形成に有機溶媒を必要としない
- ② ポリマーとともに混合・攪拌するだけで、ミセルの内部もしくは中空粒子の内部にさまざまな物質を内包させることができる
- ③ PEG の外層をもつことで生体適合性とステルス性に優れ、マクロファージなどの貪食細胞への取込を制御可能
- ④ 混合するポリマーの総濃度を変えるだけで厳密なサイズ調節が可能
- ⑤ イオン複合体に化学架橋を加えることで、生体内での安定性が高まる

というさまざまな利点をもつ [45–48]。過去にはこの PIC-nanocarrier を用いた DDS により、エラストラーゼ注入大動脈瘤モデルの瘤径を縮小させ [49]、バルーン擦過による内膜肥厚モデルの進展を抑制する [50]など、動物実験では血管疾患分野でも成果を上げている。前者では 100 nm 径の粒子が、後者では 40 nm 径の粒子が最も病変への集積性が高かったことが示されている。今回はこの 2 種類に加えて 200 nm の粒径を使用し、集積効率を比較検討することとした。また、組織学的に側副血行路周囲のどこに集積するかを検討するため、 $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) 染色を用いて側副血行路との位置関係を検討した。さらに、PIC-nanocarrier の特性であるステルス性の評価のため、主な貪食細胞としてマクロファージへの取り込みを CD68 染色を用いて検討した。

最後に<実験3>として、薬剤内包 PIC-nanocarrier の有効性について検証を行った。血管新生とは、de novo の反応である vasculogenesis・angiogenesis と、すでに存在する微小血管の発達である arteriogenesis・collateral growth に大別される [51]。後者の促進物質として各種の成長因子や、炎症性サイトカインによる炎症反応の促進も有望と考えられる [38]。しかし、これらを含むペプチドは表面に電荷を帯びているため、単純な混合による PICsome 内腔への封入は困難であり、PIC micelle を選択する必要がある。PIC micelle の安定性を推測する指標として charge density があり、これは分子量を表面電荷で除した数値である。この絶対値が小さいほど、つまり分子量が小さく、電荷の絶対値が大きいほど安定した PIC micelle を形成できる [52]。一方で、一般にペプチドは露出しているアミノ酸の違いから、部位によって表層の電荷が異なる。安定した PIC micelle の生成には、表層電荷ができる限り均一である方が望ましい。これらを同時に解決する手法として、charge conversion 法が報告されている [53]。これは無水マレイン酸の誘導体をペプチド表面に露出する正電荷アミノ酸（主に lysine）のアミノ基に結合させることで、同部の電荷を負に変換するという手法である（図 2）。

構造シミュレーション [54]をもとに、安定した PIC micelle を形成しうる物質をまず机上でスクリーニングすることとした。スクリーニングデータをもとに目標の物質を選定し、PIC micelle の形成を試みた。続いてそれを前述の急性下



肢虚血モデルに投与し、集積性を検討した。また健常ラットに投与して血中滞留性も評価した。

これらの所見を総合し、側副血行路形成にともなう炎症反応という新たなターゲットに対し、DDS の可能性につき検討を行った。

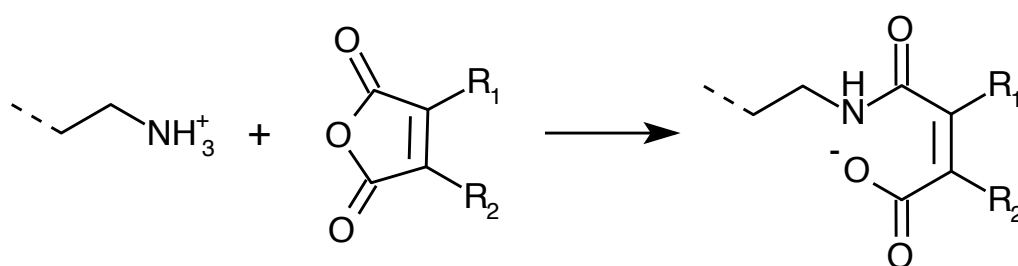


図 2. Charge conversion の概念

$-\text{NH}_3^+$  の正電荷が charge conversion によって  $-\text{COO}^-$  の負電荷に置換される。側鎖 (R1, R2) にも負電荷をもつ分子を使えば、1 箇所の  $-\text{NH}_3^+$  を 2 価以上の負電荷に置き換えることも可能。

## 実験 1 . 側副血行路の形成部位に関する検討

### <方法>

#### 実験動物

ラットは生後 11-12 週で体重 400-500g のオス Splague-Dawley ラット (specific pathogen free / virus antibody free) を日本クレア株式会社から購入した。恒温環境 (22 ± 1 °C)、12 時間昼・12 時間夜の照明サイクルのもと アイソレーションラック内で飼育した。飲水は自由とし、通常の餌を与えた。

すべての動物実験は東京大学動物実験委員会の承認のもと、東京大学動物実験実施規則および東京大学動物実験実施マニュアルに基づいて実施した (承認番号 医-P13-126, 医- P15-034) 。

#### ラット急性下肢虚血モデルの作成

2.0-2.5 % イソフルラン吸入下に左鼠径部に 20 mm の斜切開をおき、左大腿動脈を露出・剥離した。末梢側は superficial caudal epigastric artery の分岐を確認し、そのすぐ末梢で大腿動脈本幹を 6-0 polypropylene (Prolene<sup>®</sup>, Johnson & Johnson K.K., Tokyo, Japan) で結紮した。中枢側は、①鼠径靭帯を把持して頭側に展開し、caudal epigastric artery の分岐のすぐ中枢で外腸骨動脈を結紮する群・②鼠径靭帯を切離し、内腸骨動脈のすぐ中枢で総腸骨動脈を結紮する群の 2 群で検討した。

それぞれにおいて分枝を 6-0 Prolene®で結紮したのち、大腿動脈を切除した。皮膚を 6-0 Prolene®連続縫合で閉創した (図 3)。また、③動脈の露出と目視のみで閉創した sham-ope 群も作成した。

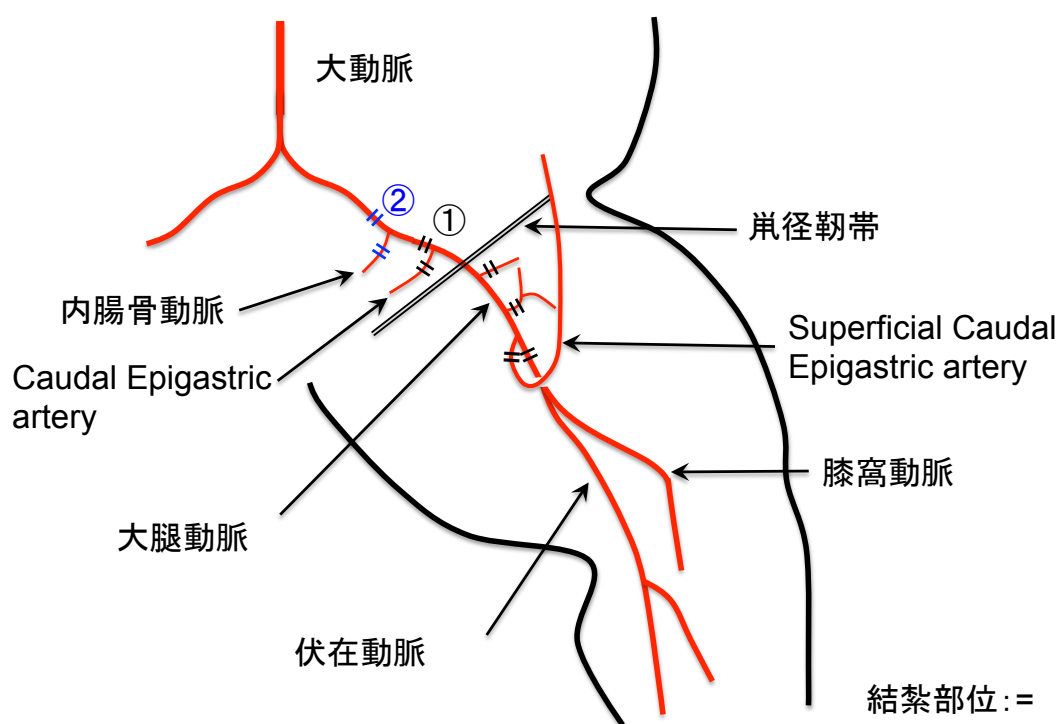


図 3. 急性虚血群における大腿動脈の切除位置

末梢側は superficial caudal epigastric artery を分岐したすぐ末梢で大腿動脈を結紮切離した。中枢側は①caudal epigastric artery の分岐のすぐ中枢の外腸骨動脈、②内腸骨動脈分岐のすぐ中枢の総腸骨動脈で結紮切離する 2 種類を作成した。

## 下肢動脈造影

造影剤は Nishiyama らの報告にある四酸化三鉛溶液を用いた [55]。四酸化三鉛は鉛丹という顔料としても使用される物質で、X 線不透過であると同時に鮮やかなオレンジ色の色彩を呈する。そのため造影後に微細な動脈まではっきりと視認することができ、解剖を確認する上で有用である。滅菌水 10 mL に四酸化三鉛 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 20 g、ゼラチン (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 0.3 g の割合で加えて加熱しながら攪拌・溶解し、造影剤を作成した。

ラットの大腿動脈結紮モデルでは、側副血行路形成に伴う末梢の血流改善は術後 14 日でプラトーに達すると報告されている [56]。実験 1 では側副血行路の完成状態を評価するため、下肢虚血モデル作成後 14 日目に腹部大動脈から下肢動脈造影を施行した。2.0-2.5 % イソフルラン吸入下に開腹し、後腹膜を鈍的に剥離して腹部大動脈・下大静脈を露出。大動脈を下大静脈より剥離し、2-0 絹糸で taping。腎動脈直下より 20 G サーフロー針 (Terumo Co., Tokyo, Japan) を末梢に向けて刺入し、外筒を留置した。下大静脈より pentobarbital (Somnopentyl, Kyoritsuuseiyaku Co, Tokyo, Japan) を過量投与して安楽死させ、あらかじめ加温しておいた酸化鉛造影剤をサーフローから注入して動脈造影を施行した。X 線透視下に側副血行路が十分に描出されていることを確認し、静止画を撮影した。

引き続き X 線透視を併用しながら下肢を解剖し、側副血行路が走行している筋肉を確認した。再現性の確認のため、①を 5 例、②を 2 例、③を 3 例作成した。

### 下肢血流の評価

①のモデルを前述の通り別途に 5 例作成した。術後 14 日目に、全身麻酔下に Laser Doppler 血流イメージ装置 (moorLDI2-IR<sup>®</sup>, Moor Instrument Ltd, Devon, UK) を用いて下肢血流の評価を行った。

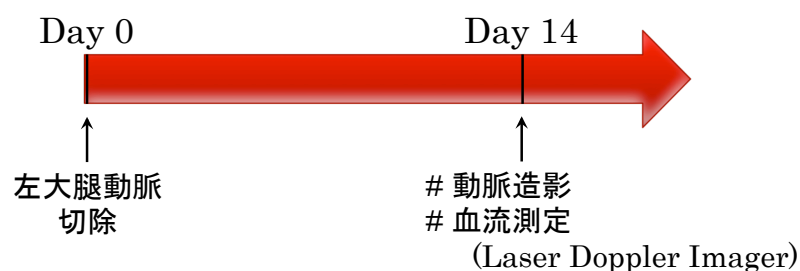


図 4. 実験 1 のプロトコール

### 統計解析

実験 1～3 を通して、全ての統計学的検定は JMP Pro 13.0 (SAS Institute, NC, USA) を用いて行った。連続変数は平均 ± 標準誤差で記載した。2 群間比較には paired t-test を用いた。有意水準は  $p < 0.05$  とした。

<結果>

### 下肢動脈造影

①・②・③の代表的な解剖所見と動脈造影を図 5 に示す。①において、側副血行路は内腸骨動脈から起始し、主に尾骨大腿筋 (caudofemoralis muscle; CF) と半膜様筋 (semimembranous muscle; SM) を通って膝窩動脈に流入していた。SM のすぐ背尾側にある半腱様筋 (semitendonous muscle; ST) にもわずかな側副血行路が描出された。②において、側副血行路は SM にわずかしか形成されず、SM 末梢側および下腿筋の変性が肉眼にも明らかであった。③においては CF・SM・ST に微小な動脈が確認され、この微小動脈が①で認められた側副血行路へと発達していくものと考えられた。

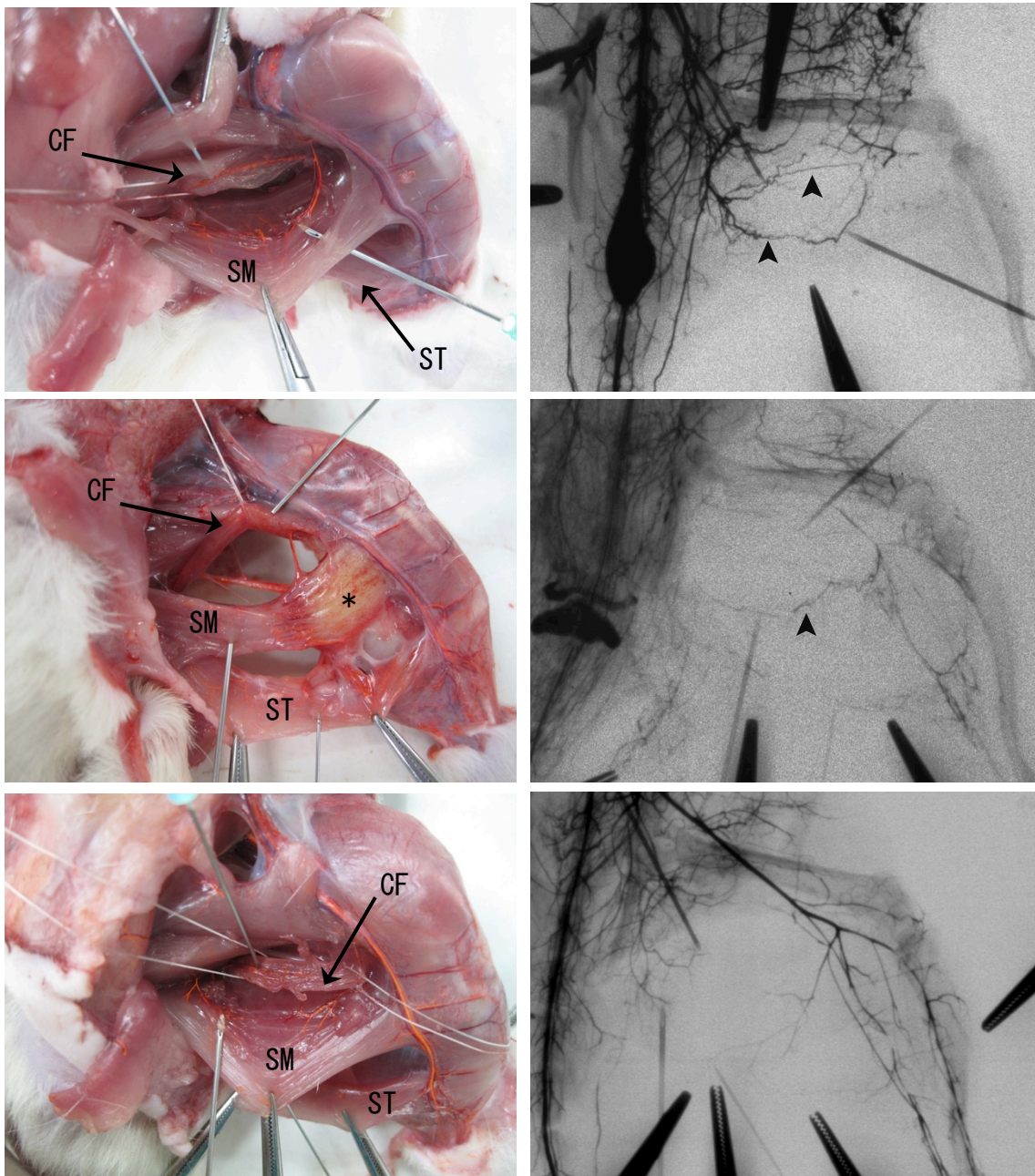


図 5. 側副血行路の肉眼写真と X 線画像 (いずれも術後 14 日目)

上段：モデル① SM・CF 中に側副血行路の発達を認める (右図中矢頭)。

中段：モデル② SM に側副血行路を認める (右図中矢頭) が、筋肉の変性も認められる (左図中\*)。

下段：モデル③ (sham ope)

CF, SM, ST のいずれにも、側副血行路のベースとなる筋肉枝を認める (両図中針先)。

CF: 尾骨大腿筋, SM: 半膜様筋, ST: 半腱様筋

筋肉の位置関係を表したシェーマを図 6 に示す。大腿動脈末梢～伏在動脈直下には薄筋・縫工筋が存在する（図中青字「浅層」）。それらを切離すると、尾骨大腿筋（CF）・半膜様筋（SM）・半腱様筋（ST）が現れる（図中橙字「深層」）。モデル①で側副血行路が形成された CF・SM は動脈切除手技において露出されない筋肉であることから、外科的侵襲の影響が比較的少ないと考えられる。そのため、側副血行路形成に伴う炎症反応をより正確に評価できると考えられ、本研究で用いるのに適していると考えられた。

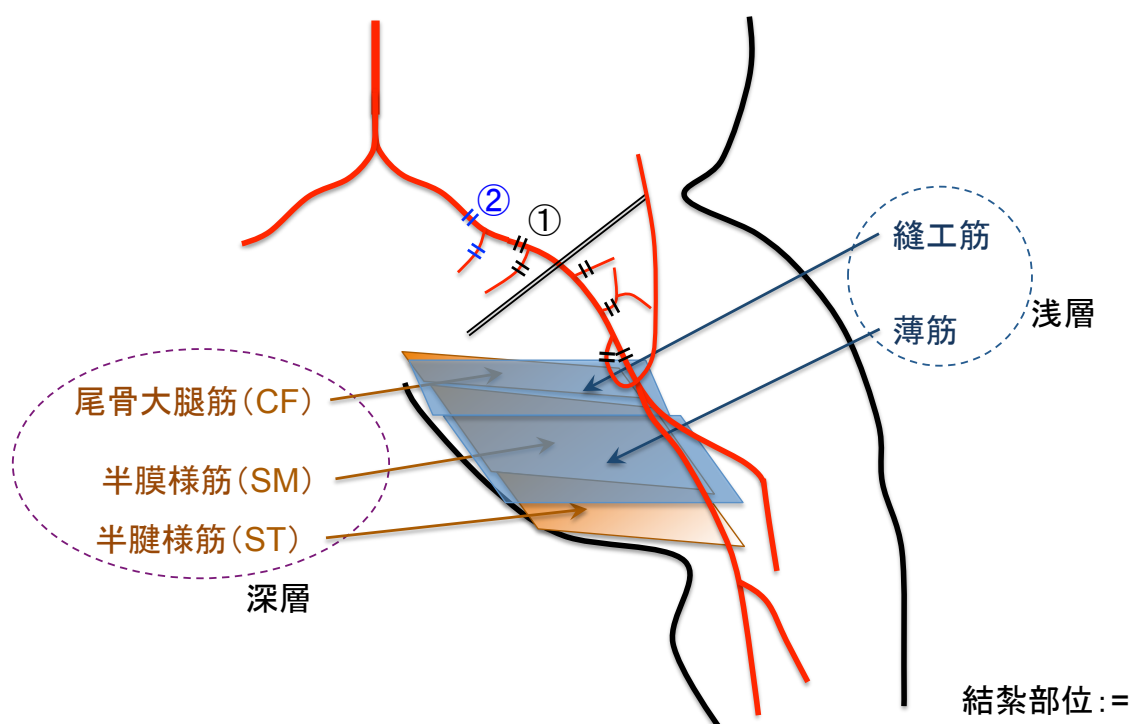


図 6. 大腿内側の筋肉群のシェーマ

大腿動脈・伏在動脈直下には縫工筋・薄筋が存在する。それらを切離して展開すると、深層に尾骨大腿筋（CF）・半膜様筋（SM）・半腱様筋（ST）が現われる。CF、SM、ST の3つの筋肉は、動脈露出・結紮部位とは水平方向に離れており、垂直方向にも1層の筋肉で隔てられている。



## 下肢血流の評価

①のモデルにおける代表的な下肢の肉眼写真と血流イメージング画像を図 7 に示す。①～③いずれのモデルにおいても足部に壊死や潰瘍形成は認められなかった。相対血流値は健常肢である右肢（画面左）で  $695.7 \pm 19.0$ 、虚血肢である左肢（画面右）で  $430.2 \pm 37.4$  であり、虚血肢は健常肢に比べて  $61.9 \pm 6.2\%$  まで血流が低下していた。

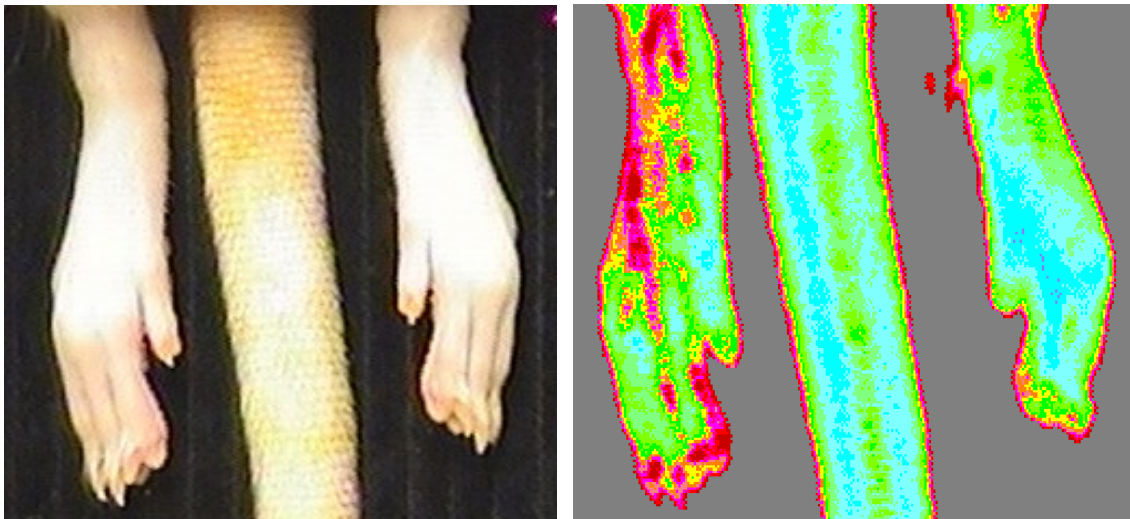


図 7. 急性下肢虚血モデル①の下肢肉眼所見と Laser Doppler imager 画像  
肉眼的に潰瘍形成や組織壊死を認めない（左図）。また、画面右の虚血肢  
において血流信号の低下を認める（右図）。

<小括>

Caudal epigastric artery ~ superficial caudal epigastric artery の間で大腿動脈を切除した急性下肢虚血モデルにおいて、側副血行路は内腸骨動脈から膝窩動脈の間に形成された。それらは主に尾骨大腿筋 (caudofemoralis muscle; CF) と半膜様筋 (semimembranous muscle; SM) 内を走行していた。上述のモデルにおいて、虚血側の足部表層血流は健常側に比べて約 62 %まで低下していた。

## 実験 2. 側副血行路形成部位へのナノ粒子の集積性に関する検討

### <方法>

#### Cy-5 labeled PIC-nanocarrier の調製

実験 1 で確認された側副血行路形成部位へのナノ粒子集積性を検証するために、粒子直径が 30 nm、100 nm、200 nm の Cy-5 labeled PIC-nanocarrier（以後、順に PICs-30, PICs-100, PICs-200 と記載する）を既報に従い調製した [44]。まず block anioner: MeO-PEG-*b*-poly(aspartic acid) [PEG-P(Asp); *Mn* of PEG = 2000, DP of P(Asp) = 75]、block cationer: MeO-PEG-*b*-poly([5-aminopentyl]- $\alpha,\beta$ -aspartamide) [PEG-P(Asp-AP); *Mn* of PEG = 2000, DP of P(Asp-AP) = 82]、homo cationer *n*-butyl-poly([5-aminopentyl]- $\alpha,\beta$ -aspartamide) [Bu-P(Asp-AP); DP of P(Asp-AP) = 82]を合成した。以下に概略を記す (図 8)。

Block anioner と block cationer はまず  $\beta$ -benzyl-L-aspartate-*N*-carboxyanhydrides (BLA-NCA) と MeO-poly(ethylene glycol)-NH<sub>2</sub> [MeO-PEG-NH<sub>2</sub>] から MeO-PEG-poly( $\beta$ -benzyl-L-aspartate) [PEG-PBLA]を合成し、これを共通のプラットフォームとして合成した。PEG-PBLA に NaOH を加え、室温で 10 時間アルカリ加水分解して PEG-P(Asp)を合成した。続いて Cy5 mono-reactive dye pack (GE Healthcare, Tokyo, Japan) を用いて、PEG-P(Asp)に Cy5 を標識化した [PEG-P(Asp)-Cy5]。一方、PEG-PBLA に 1,5-diamino pentan (DAP) を 4 °C の

*N*-methylpyrrolidone (NMP) 中で 1 時間反応させ、PEG-P(Asp-AP)を合成した。

Homo-cationer は、まず *n*-butyl amine と BLA-NCA を 35°C で 40 時間反応させ、

Bu-PBLA を合成した。これに block cationer と同様に DAP を反応させ、

Bu-P(Asp-AP)を得た。

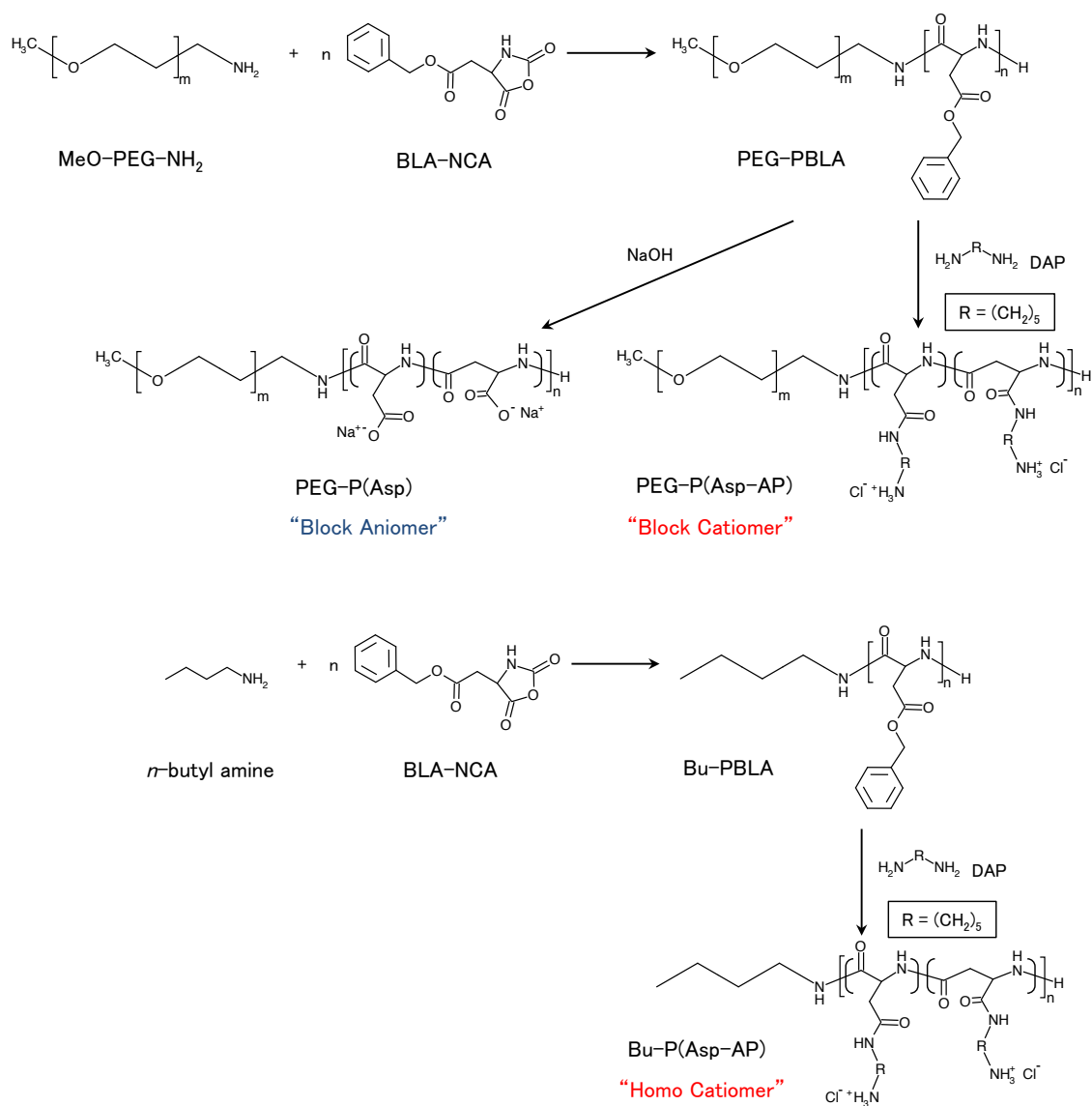


図 8. Block anioner / cationer と homo cationer 合成の概略

PEG-P(Asp)-Cy5、PEG-P(Asp-AP)、Bu-P(Asp-AP)をそれぞれ 10mM のリン酸緩衝液 (PBS) に溶解した。PICs-30 は PEG-P(Asp)-Cy5 と PEG-P(Asp-AP)を-COO<sup>-</sup>基と-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>基が 1:1 となり、総ポリマー濃度が 1 mg/mL となるように混合し、ボルトックスミキサーで激しく攪拌 (2000 rpm, 2 min) して調製した。PICs-100 および PICs-200 は PEG-P(Asp)-Cy5 と Bu-P(Asp-AP)を、同様に-COO<sup>-</sup>基と-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>基が 1:1 となるよう混合・攪拌して調製した。総ポリマー濃度はそれぞれ 1 mg/mL、3 mg/mL とした。これらの PIC-nanocarrier に架橋を加えて構造を強化するため、10 mg/mL の 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) 溶液を、PEG-P(Asp)に含まれる-COOH 基の 10 倍当量加えて 4°C で 12 時間反応させた。得られた PIC-nanocarrier 溶液は Vivaspin<sup>®</sup> 6 (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany) を用いて、PICs-30 は molecular weight cutoff [MWCO] 100,000 で、PICs-100 および PICs-200 は 300,000 で濾過し、精製した。

精製された PIC-nanocarrier は動的光散乱法 (Zetasizer<sup>®</sup> Nano, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK) によりそのサイズ分布を確認した。溶液中の PIC-nanocarrier 濃度は Cy-5 の蛍光強度と線形に対応することが知られている。PBS で適宜希釈し、Nanodrop<sup>®</sup> 3300 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) による測定で 30,000 relative fluorescent unit (RFU) となるよう調製した。

## 実験動物

生後 8–9 週で体重 300–350g のオス Splague-Dawley ラット (specific pathogen free / virus antibody free) を日本チャールズ・リバー株式会社から購入した。自家蛍光の影響を低減するため、蛍光評価の 7 日前からはアルファルファフリーの iVid®#2 もしくは#3 (Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) を与えた他は、実験 1 と同様の飼育条件で飼育した。

## ラット急性下肢虚血群・sham-ope 群の作成と PIC-nanocarrier の投与

実験 1 で述べた方法のうち、① (caudal epigastric artery~superficial caudal epigastric artery) の範囲で大腿動脈を切除したモデルを作成し、急性虚血群とした。同じ範囲で大腿動脈の露出・視認にとどめて閉創した個体も作成し、sham-ope 群とした。既報によると、大腿動脈切除モデルにおいて内転筋の各種サイトカイン遺伝子の転写活性が 6~24 時間でピークを迎えると報告されている [57]ことから、手術 24 時間後に尾静脈から体重 100 g あたり蛍光強度 30,000 RFU の PIC-nanocarrier 溶液 100  $\mu$ L を静注した (sham-ope 群は PICs-100 のみ)。

## 蛍光イメージング

PIC-nanocarrier 溶液投与後 24 時間および 72 時間後に、2.0-2.5 % イソフルラン吸入下に尾静脈から pentobarbital を過量投与して安楽死させた。両側の CF・SM・ST を全長にわたって摘出した。In vivo imaging system (IVIS<sup>®</sup>, Xenogen, CA, USA) にて各組織の最大蛍光強度を評価した。いずれの測定でも Excitation を 640 nm、Emission を 680 nm とし、撮影時間 7 秒とした。

## 組織学的評価

集積した PIC-nanocarrier が筋肉内の分布・局在、および炎症細胞との共局在を検討するため組織学的評価を行った。集積した PIC-nanocarrier と小動脈との位置関係を検討するため  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) を染色した。また炎症細胞としてマクロファージとの共局在を評価するべく CD68 染色を行った。

IVIS<sup>®</sup>で蛍光集積を認めた部分を切り出し、O.C.T Compound (Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan) に包埋して液体窒素で凍結させ、-80 °C で保存した。染色に際して厚さ 10  $\mu$ m に薄切した。30 分風乾の後、氷冷アセトンで 10 分間固定して再度 10 分間風乾した。PBS で洗浄後、Target Retrieval Solution (1x; S1699, Dako Inc., CA, USA) にて 70 °C で 20 分間抗原賦活を行った。PBS で洗浄後、Carbo-free Blocking Solution (1x; SP-5040, Vector Laboratories, Inc., CA, USA) を 1

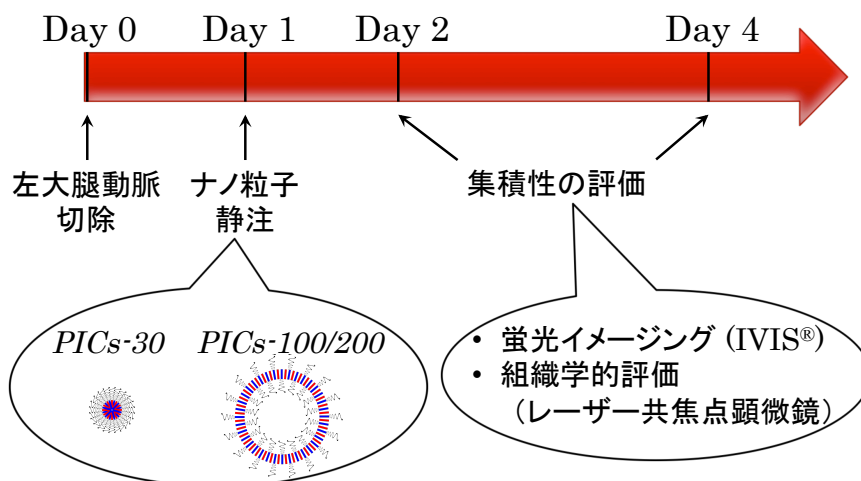
時間反応させて非特異反応をブロックした。PBS で洗浄後、1 次抗体 (anti-CD68 antibody (1:50; Anti Rat Macrophages (CD68) Mouse monoclonal IgG1, clone ED1, T-3003, BMA Biomedicals, Augst, Switzerland) もしくは anti- $\alpha$ -SMA antibody (1:100; Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin, Clone 1A4, M0851, Dako Inc., CA, USA) ) を室温で 1 時間反応させた。以降の操作は遮光環境下で行った。PBS で洗浄後、Alexa Fluor<sup>®</sup> 555 で標識した 2 次抗体 (1:200; ab150118, Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor<sup>®</sup> 555) preadsorbed, Abcam, Cambridge, UK) を室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、Hoechst 33342 (1:1000; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) を 15 分間反応させて核染色をおこない、Fluorescent Mounting Medium (S3023, Dako Inc., CA, USA) で封入した。検鏡は共焦点レーザー顕微鏡 LSM<sup>®</sup> 780 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) で行った。

PIC-nanocarrier により炎症反応が惹起されている可能性を評価するため、PIC-nanocarrier を投与していない個体での CD68 染色を行った。急性下肢虚血モデルを前述の通り別途に 3 例作成した。術後 48 時間後 (PIC-nanocarrier 投与 24 時間後に相当する) に安楽死させ、両側の CF・SM・ST を採取した。1 次抗体反応までは上述と同様に行った。続いて LSAB<sup>®</sup>2 System-HRP kit (K0609, Dako Inc., CA, USA)を用いて二次複合体形成を行った。DAB Peroxidase Substrate kit (SK4100, Vector Lab. Inc., CA, USA) で発色を行い、Mayer's hematoxylin 溶液で核



染色を行った。標本は光学顕微鏡で 400 倍視野で観察し、DAB で発色した領域の面積を ImageJ<sup>®</sup> で計測した。

(A) PIC-nanocarrier 投与



(B) PIC-nanocarrier 非投与 (コントロール)

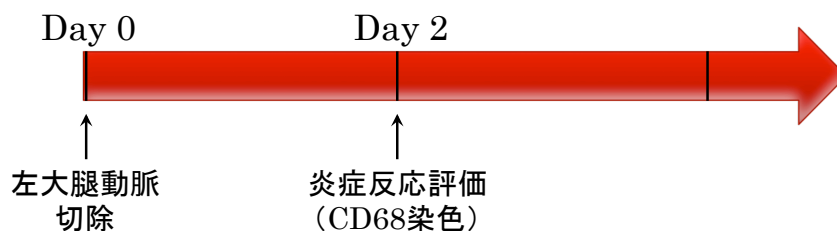


図 9. 実験 2 のプロトコール

<結果>

### Cy-5 labeled PIC-nanocarrier の調製

動的光散乱法による PIC-nanocarrier の粒径分布を図 10 に示す。いずれの PIC-nanocarrier も単峰性でばらつきの少ない分布曲線を描いた。径 30 nm の PIC micelle (PICs-30) は平均 31 nm、径 100 nm・200 nm の PICsome (PICs-100・PICs-200) はそれぞれ平均 99 nm・205 nm の粒径であった。

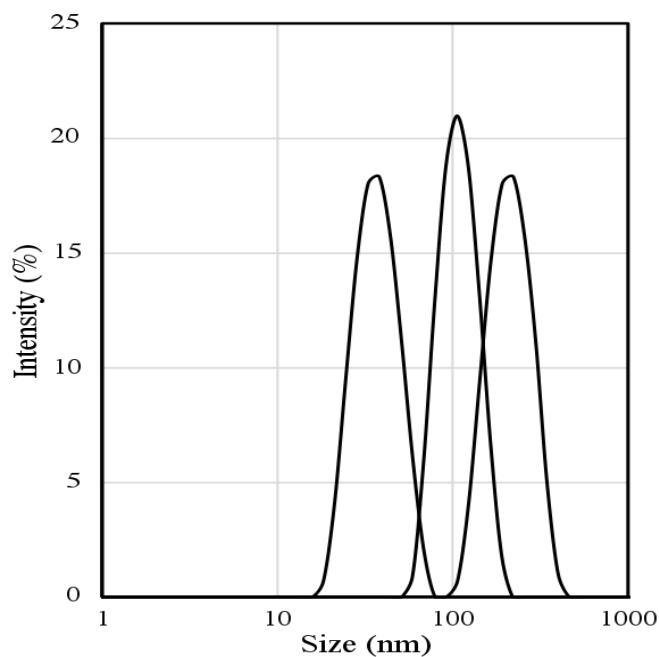


図 10. 動的光散乱法による PIC-nanocarrier の粒径評価

左から PICs-30、PICs-100、PICs-200 の粒径分布を示す。いずれも単峰性で幅が狭く、均一な性質であることを示している。

## 蛍光イメージング

図 11 に、代表的な IVIS<sup>®</sup>画像を示す。蛍光を認める部位が赤～黄色で表されている。PICs-100 および PICs-200 が虚血肢の筋肉に集積し、蛍光を発していることがわかる。一方で、PICs-30 に集積は認められなかった。

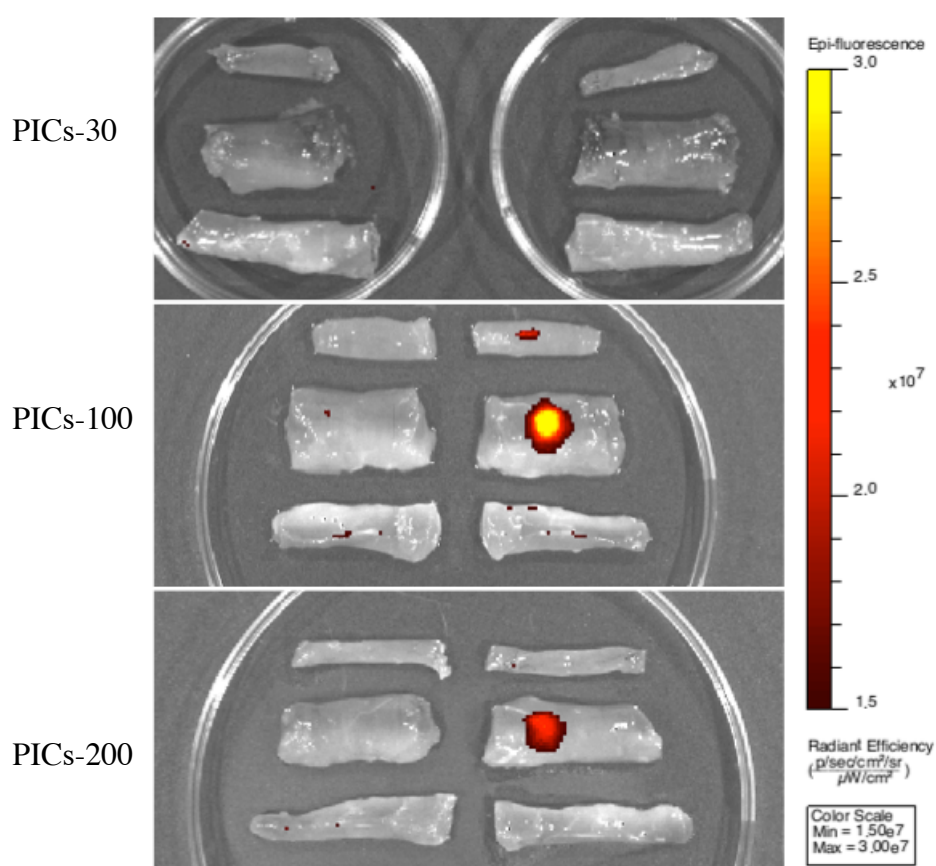


図 11. 摘出した筋肉の IVIS<sup>®</sup>画像

PICs-30（上図）、PICs-100（中図）および PICs-200（下図）の投与 24 時間後の IVIS<sup>®</sup>画像。いずれの写真も向かって左が健常肢（右肢）、右が虚血肢（左肢）である。シャーレの中はいずれもそれぞれ上から尾骨大腿筋（CF）、半膜様筋（SM）、半腱様筋（ST）である。

最大蛍光強度 (maximum radiant efficiency) を定量し、グラフ化したものが図 12 である。急性下肢虚血群において、PICs-100 は投与後 24 時間後・72 時間後とも、CF および SM で有意な集積を示した (図 12-1 CF:  $p = 0.002$  and  $0.008$ , SM:  $p = 0.006$  and  $0.003$ , それぞれ 24 時間後, 72 時間後の順)。ST にはどちらの時点でも集積に有意な左右差は認められなかった ( $p = 0.29$  and  $0.23$ , respectively)。

PICs-200 は投与後 24 時間後で CF および SM で有意な集積を示した (図 12-1 CF:  $p = 0.002$ , SM:  $p = 0.002$ )。ST にはどちらの時点でも集積に有意な左右差は認められなかった ( $p = 0.65$  and  $0.22$ , respectively)。PICs-30 はいずれの筋肉・いずれの時点でも集積に有意差は認められなかった。Sham-ope 群についても、いずれの筋肉・いずれの時点でも PICs-100 の集積に有意差は認められなかった (図 11-2 CF:  $p = 0.61, 0.27$ , SM:  $p = 0.99, 0.14$ , ST:  $p = 0.31, 0.48$ , それぞれ 24 時間後, 72 時間後の順)。

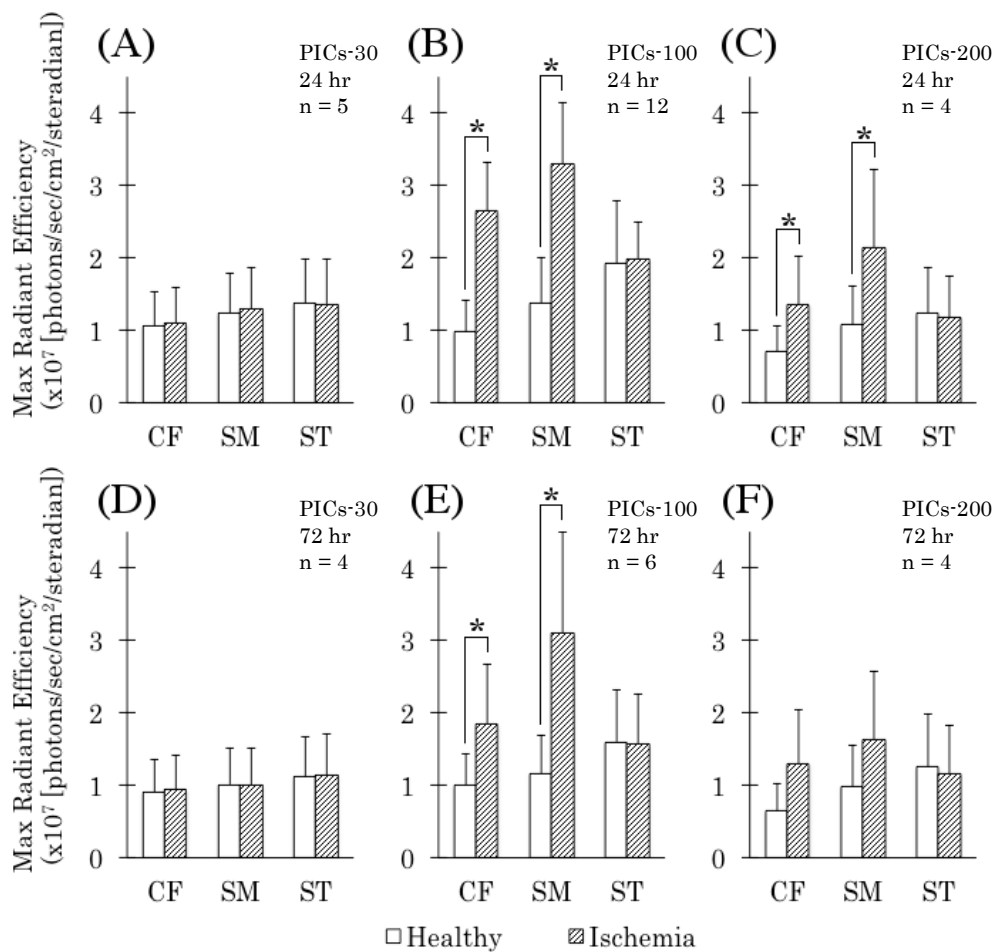


図 12-1. 筋肉の最大蛍光強度の定量化（急性下肢虚血群）

PICs-100 は、投与後 24 時間後・72 時間後とも虚血側の CF および SM で有意な集積を示した。PICs-200 は、投与後 24 時間後において虚血側の CF および SM で有意な集積を示した。PICs-30 投与群では集積の左右差は認められなかった。

(A): PICs-30, 24hr 後 (B): PICs-100, 24hr 後 (C) PICs-200, 24hr 後

(D): PICs-30, 72hr 後 (E): PICs-100, 72hr 後 (F) PICs-200, 72hr 後

CF: 尾骨大腿筋, SM: 半膜様筋, ST: 半腱様筋

(\*:  $p < 0.05$ )

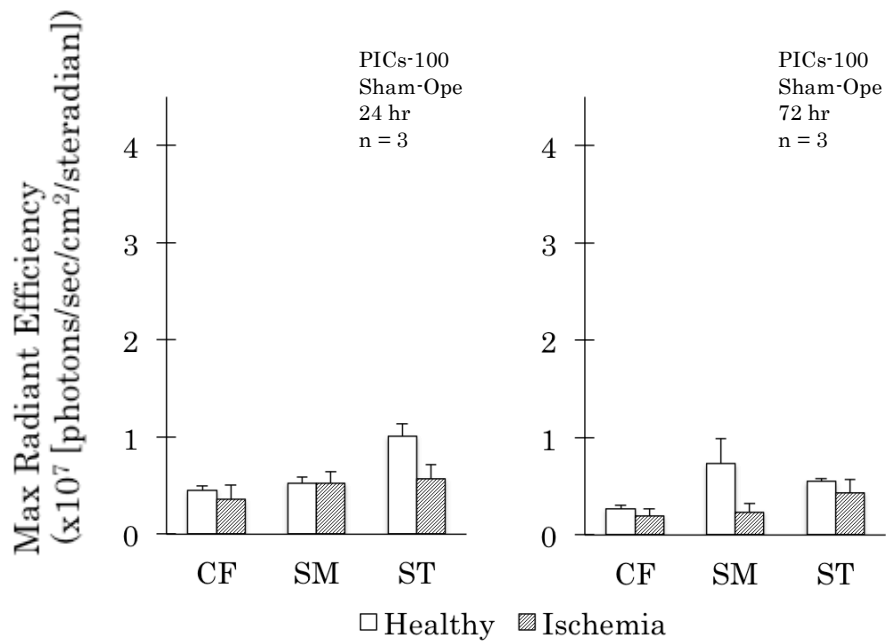


図 12-2. 筋肉の最大蛍光強度の定量化 (sham-ope 群)

Sham-ope 群では、投与後 24 時間後・72 時間後とも、PICs-100 の集積に左右差は認められなかった。

CF: 尾骨大腿筋, SM: 半膜様筋, ST: 半腱様筋

## 組織学的評価

$\alpha$ -SMA 染色を図 13 に示す。赤で示される PICs-100 の信号が、 $\alpha$ -SMA 陽性の小動脈周囲に局在していることがわかる。

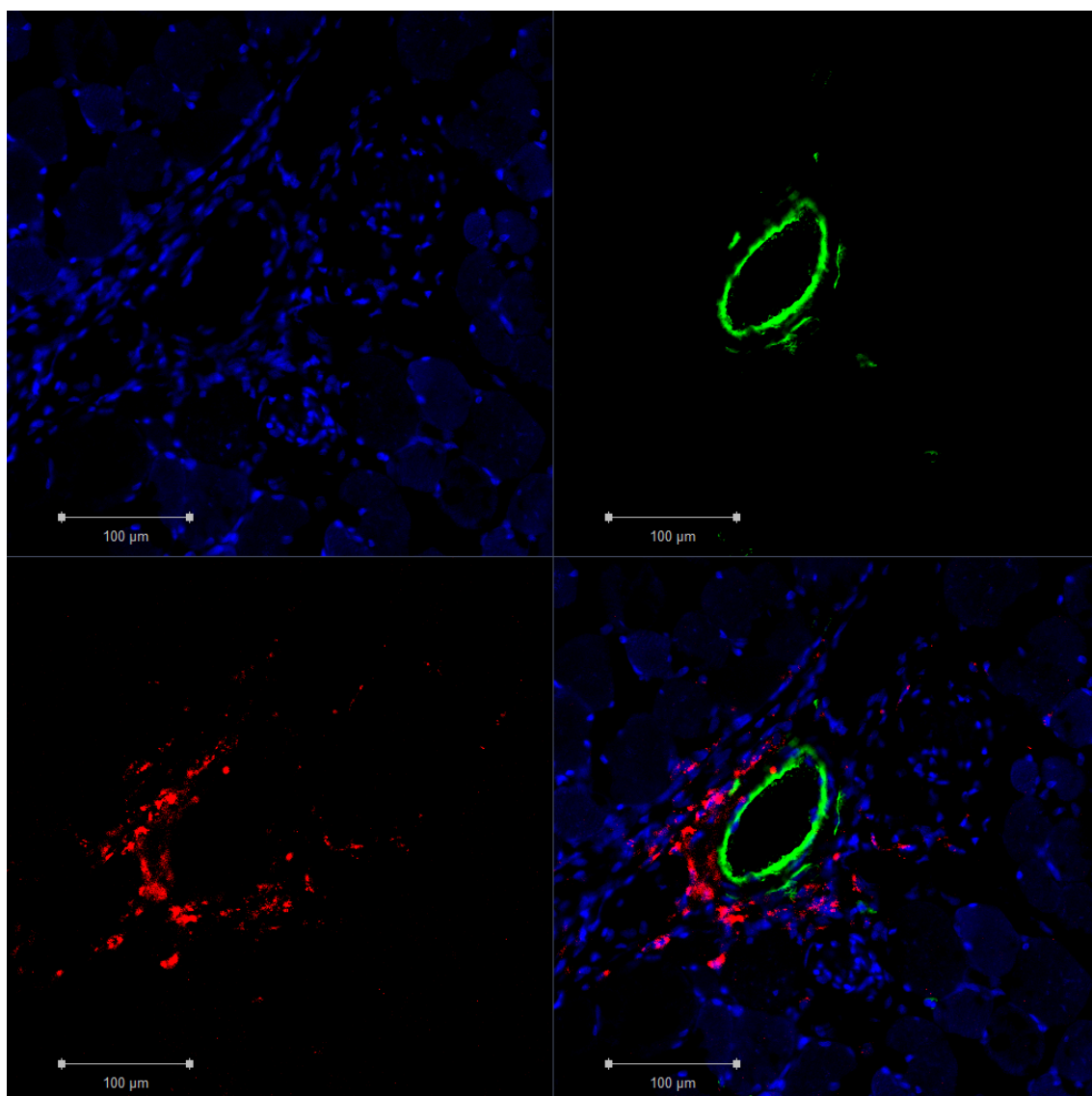


図 13. 蛍光集積を示した切片の $\alpha$ -SMA 染色

左上：核染色（青）      右上： $\alpha$ -SMA 染色（緑）、

左下：PICs-100（赤）      右下：merged

赤で示される PICs-100 が小動脈周囲に局在している。

続いて CD68 蛍光染色を示す (図 14-1)。CD68 はラットマクロファージのマーカーである。黄色は CD68 と PICs-100 が共に陽性である (共局在している) ことを示しており、マクロファージに取り込まれた PICs-100 を表すと考えられる。図 14-2 は共局在分析のスクリーンキャプチャ画像である。核染色の青と、CD68 陽性かつ PICs-100 陰性の緑を消去している。信号の強弱に関わらず、色彩を一定としているため、上段より赤・黄とも強調された表示となっている。全 PICs-100 (赤 + 黄) に対する、マクロファージに取り込まれた PICs-100 (黄) の割合は  $16.4 \pm 1.4\%$  ( $n=7$ ) であった。逆に、全マクロファージに対する、PICs を取り込んだマクロファージの割合は  $9.5 \pm 2.0\%$  ( $n=7$ ) であった。



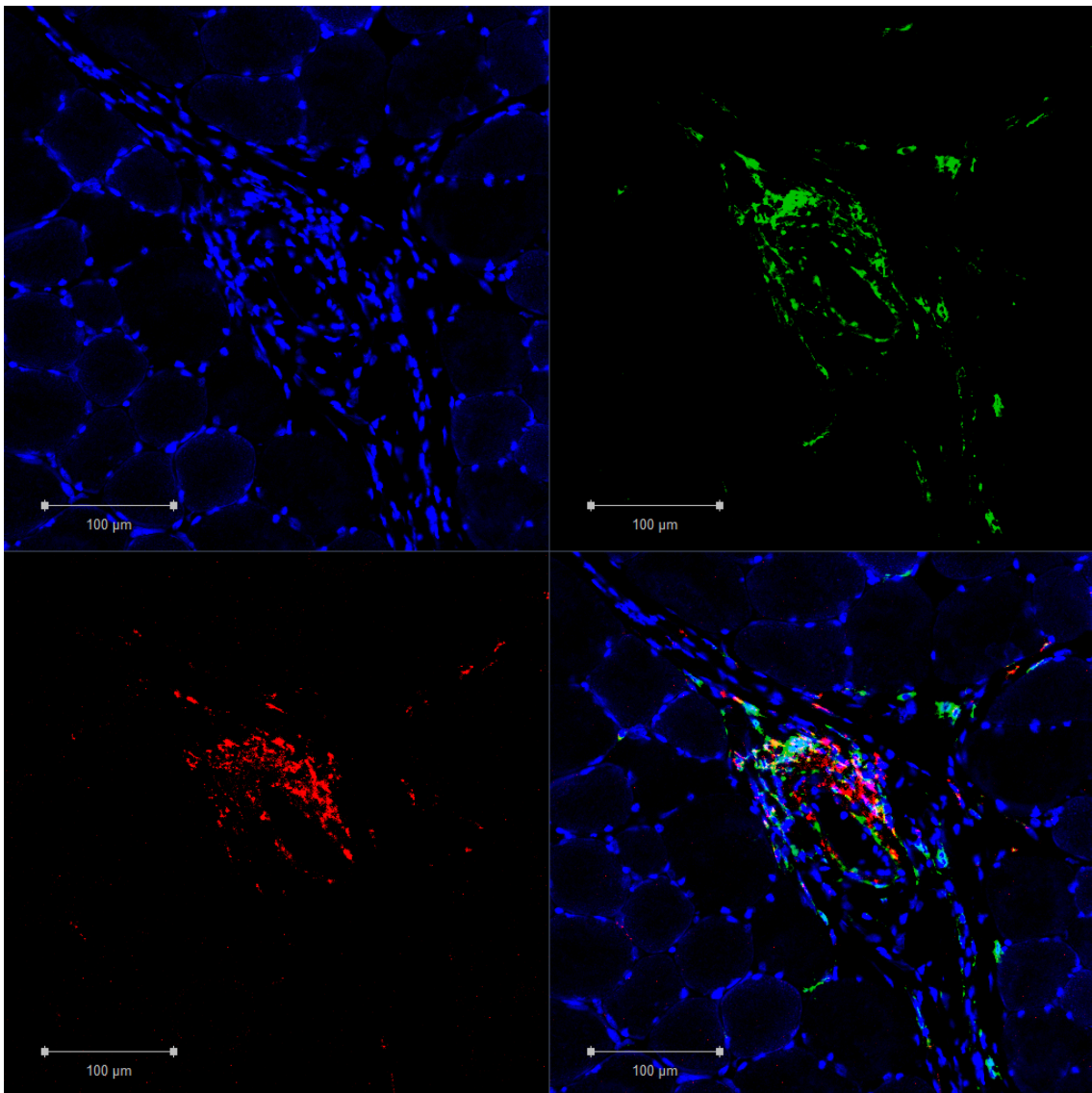


図 14-1. 蛍光集積を示した切片の CD68 染色

左上：核染色（青）      右上：CD68染色（緑）

左下：PICs-100（赤）      右下：merged

赤で示される PICs-100 の一部が、緑で示される CD68 陽性細胞（マクロファージ）と共局在して黄色に表示されている。

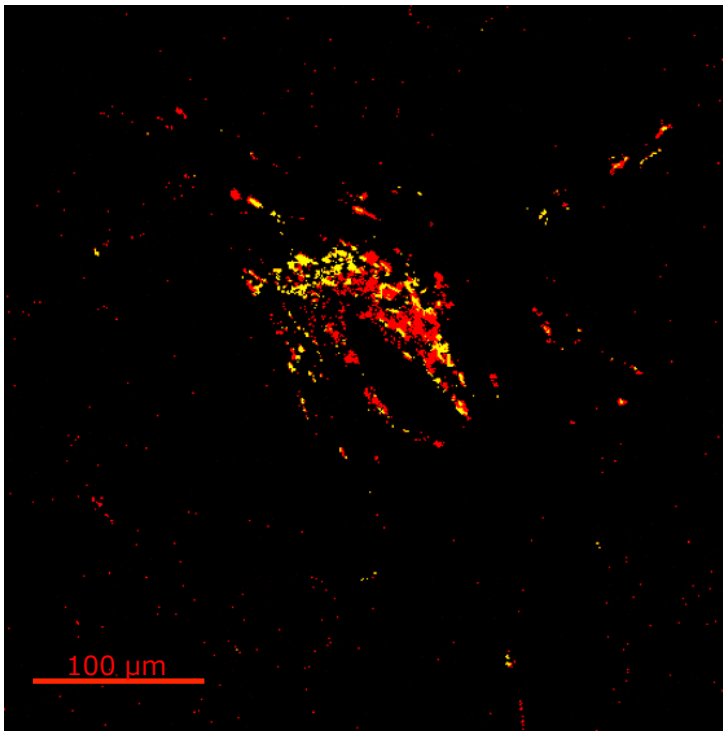


図 14-2. 蛍光集積を示した切片の共局在分析画像  
赤 : PICs-100  
黄 : CD68 と PICs-100 の共局在 をそれぞれ示す

続いて、コントロールとなる PIC-nanocarrier 非投与の動物から採取した各筋肉の各筋肉の CD68 染色を示す (図 15)。ImageJ®による計測で、DAB 発色領域の面積は CF: 健常側  $244.1 \pm 117.9 \mu\text{m}^2$ , 虚血側  $532.2 \pm 185.6 \mu\text{m}^2$ 、SM: 健常側  $265.9 \pm 6.3 \mu\text{m}^2$ , 虚血側  $1509.2 \pm 114.3 \mu\text{m}^2$ 、ST: 健常側  $371.6 \pm 179.6 \mu\text{m}^2$ , 虚血側  $392.0 \pm 138.1 \mu\text{m}^2$ であった。SMにおいて虚血側の CD68 陽性領域が健常側に比べて有意に広く、PIC-nanocarrier 投与の有無にかかわらず虚血側では標的筋肉内に炎症が惹起されていることが確認された。統計学的な有意差はなかったが、CFでもその傾向が示唆された ( $p = 0.053, 0.009, 0.82$ , respectively)。

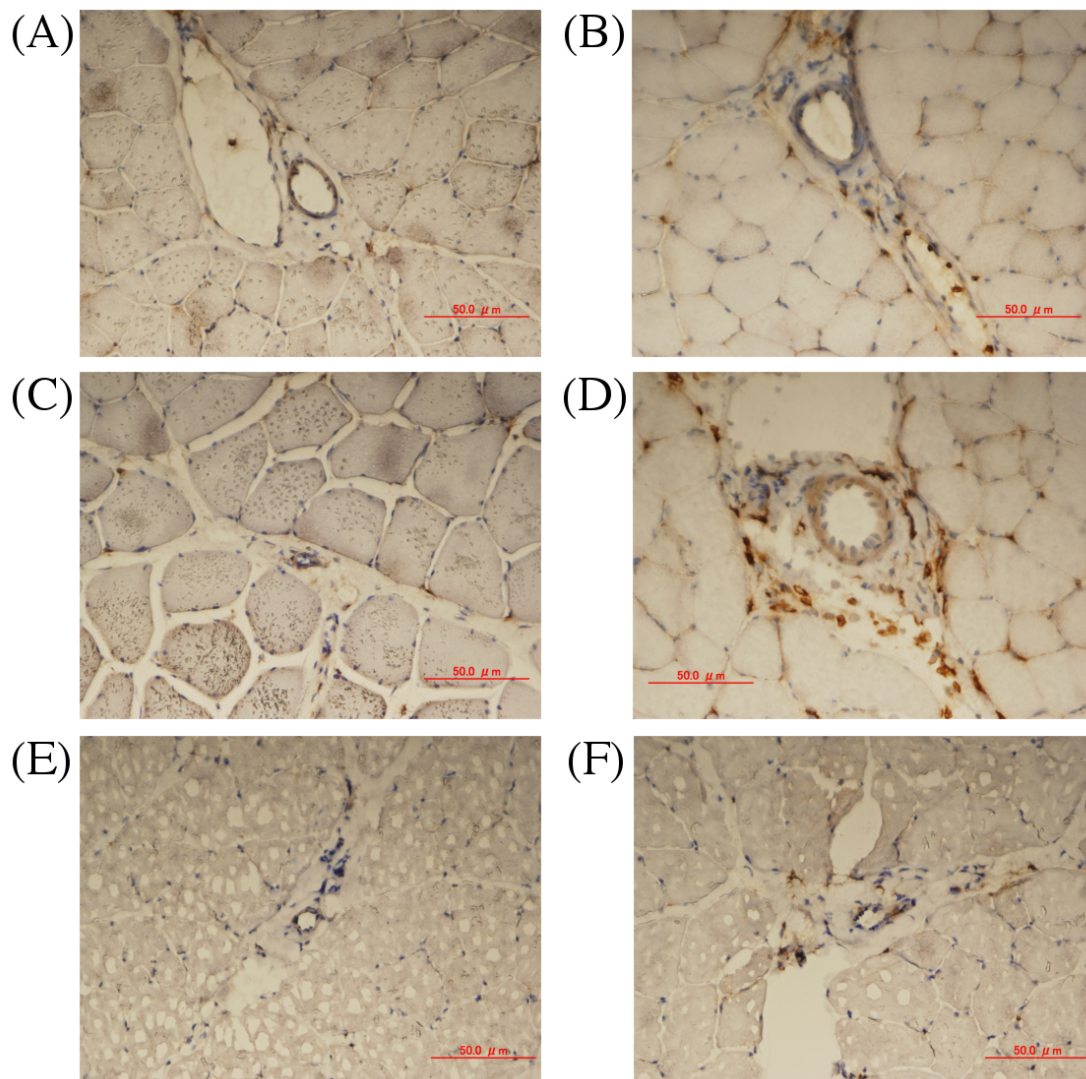


図 15. PIC-nanocarrier 非投与群から採取した標的筋肉の CD68 染色画像  
 (A): 健常側 CF, (B): 虚血側 CF,  
 (C): 健常側 SM, (D): 虚血側 SM,  
 (E): 健常側 ST, (F): 虚血側 ST  
 SM において虚血側で健常側より多くの CD68 陽性領域が認められ、炎症  
 が惹起されていることが示唆された。  
 CF: 尾骨大腿筋, SM: 半膜様筋, ST: 半腱様筋

<小括>

急性虚血群において、PICs-100 が投与後 24 時間後・72 時間後ともに CF・SM に有意な集積を示した。PICs- 200 は投与後 24 時間後のみ CF・SM に有意な集積を示した。PICs-30 は有意な集積を認めなかった。Sham-ope 群においては、PICs-100 は有意な集積を示さず、側副血行路形成に伴う炎症によって PICs-100 が集積したと考えられた。

また、PICs-100 は筋肉内の小動脈周囲の筋線維間質に局在していた。80 %以上の PICs-100 はマクロファージに取り込まれずに存在していた。

### 実験 3 . IL-1 $\beta$ 内包 PIC micelle の調製と生理活性・集積性の検討

#### <内包薬剤の選定>

PIC micelle に内包させる物質として、血管新生因子から fibroblast growth factor (FGF) -1/2 を、炎症性サイトカインから monocyte chemotactic protein (MCP) -1、interleukin (IL) -1 $\alpha/\beta$  を候補に挙げた。これらのアミノ酸配列を <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetSurfP/> に入力して構造をシミュレートし、表面に露出していると考えられる lysine の数をカウントした。その表面 lysine の 50 % および 100 % を citraconic anhydride (Cit, 図 17 左) で charge conversion したと仮定したときの charge density を計算した。種々のサイトカインにおける charge density の計算結果を図 16 に示す。100 % charge conversion した IL-1 $\beta$  の charge density が -560 と絶対値が最も小さく有望と考えられたため、IL-1 $\beta$  で PIC micelle の構築を試みることにした。

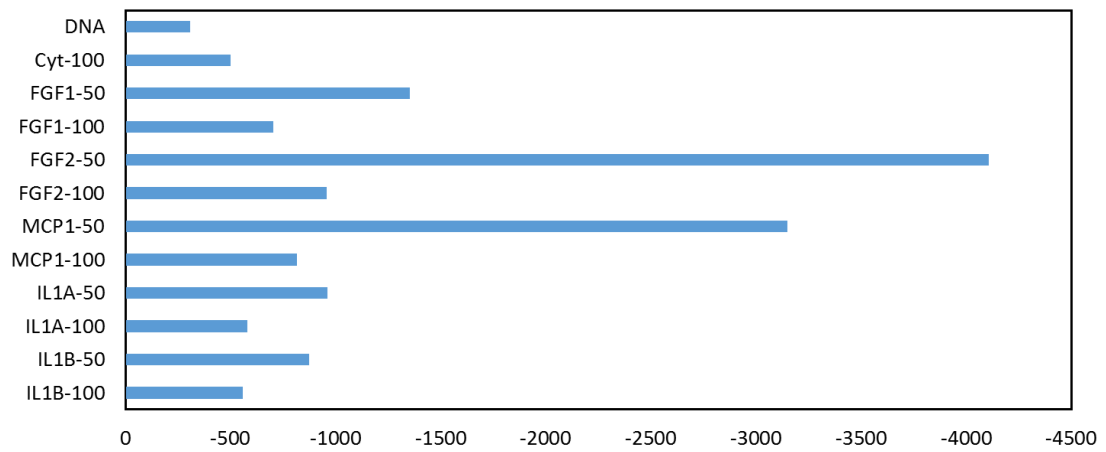


図 16. 内包物質の charge density シミュレーション

各ペプチド名の末尾の“-50”は表面 lysine の 50%を、“-100”は 100%を charge conversion したことを示している。

Cyt: cytochrome C, FGF: fibroblast growth factor,

MCP: monocyte chemotactic protein, IL: interleukin

<方法>

### IL-1 $\beta$ の charge conversion

IL-1 $\beta$ を PIC micelle に内包するため、表面電荷の変換を行った。電荷の変換は既報に準じ [58]、Cit と、1分子で2価の負電荷を付与できる 2,5-dihydro-4-methyl-2,5-dioxo-3-furanpropanoic acid (FP) の2種類の低分子を用いて行った (図 17)。

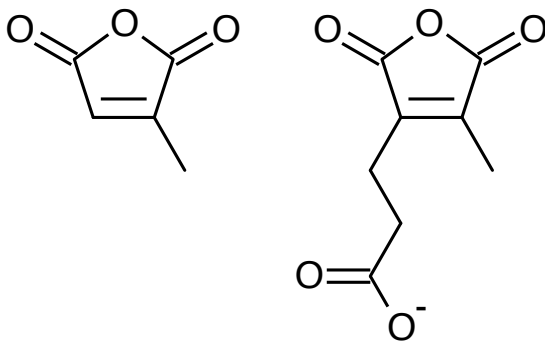


図 17. Citraconic anhydride (Cit, 左) と 2,5-dihydro-4-methyl-2,5-dioxo-3-furanpropanoic acid (FP, 右) の構造式

IL-1 $\beta$  (250  $\mu$ L, 1mg/mL) を 100 mM NaHCO<sub>3</sub> buffer (pH 9.0) に溶解させ、限外濾過 (MWCO: 3,000) を行った。Cit および FP 0.125 mg をそれぞれ 100 mM NaHCO<sub>3</sub> buffer (pH 9.0, 500  $\mu$ L) に溶解させ、溶液に加えた。4°C で3時間の反応後、溶液を 10 mM NaHCO<sub>3</sub> buffer (pH 7.4) を用いた限外濾過により洗浄した。IL-1 $\beta$  中の1級アミンの量はフルオレスカミンを用いて定量した。



Charge conversion 前の IL-1 $\beta$ を Orig-IL、Cit で charge conversion した IL-1 $\beta$ を Cit-IL、FP で charge conversion した IL-1 $\beta$ を FP-IL と以下記載する。

### **Charge converted IL-1 $\beta$ の生理活性の検証**

表面電荷の修飾のため、IL-1 $\beta$ はその表面構造が変化した。表面構造の変化により、修飾前の IL-1 $\beta$ と比べてその生理活性がどう変化するかを検証した。IL-1 $\beta$ の生理活性測定には、既報にある線維芽細胞の IL-8 産生を定量する手法を用いた [59]。

ヒト線維芽細胞株 MRC-5 を American Type Culture Collection (ATCC<sup>®</sup>, Manassas, VA, USA) より購入した。添付のプロトコールに従い、ATCC formulated EMEM 培地 (ATCC<sup>®</sup>, Manassas, VA, USA) に Fetal Bovine Serum を 10 % (v/v) となるように加えて EMEM-10 培地とした。MRC5 を EMEM-10 で前培養した。

IL-8 assay のプロトコールに従い、RPMI 1640 培地に Fetal Bovine Serum を 5 % (v/v) となるように加えて RPMI-5 培地とした。前培養しておいた MRC5 を回収し、RPMI-5 で  $3\sim 4.0\times 10^4$  個/mL となるよう懸濁した。24-well 平底プレートに 1.0 mL/well の MRC5 懸濁液を分注し、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 環境下にて培養した。以下、特記がない限り細胞培養条件は同一である。細胞が confluent に達したことを確認し、assay に供した。

Orig-IL、Cit-IL、FP-IL をそれぞれ RPMI-5 培地で 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3 pg/mL に希釈した。各 well より 100  $\mu$ L の上清を捨て、各濃度の 3 種の IL-1 $\beta$ 溶液を 100  $\mu$ L ずつ、それぞれ 2 well に分注した。Negative control として、別途 2 well に RPMI-5 を 100  $\mu$ L ずつ加えた。24 時間培養したのち、各 well から 400  $\mu$ L の上清を採取した。

IL-8 の定量には Human IL-8/CXCL8 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) を用いた。採取した上清を付属の Calibration Diluent でそれぞれ 1000 倍に希釈し、ELISA 法にて IL-8 の濃度を測定した。解析する IL-8 の濃度は、同一条件の 2 つの well の平均を採用した。

### **IL-1 $\beta$ 内包 PIC micelle (PICs-IL) の調製**

原料となる polymer の合成の概略を図 18 に示す。まず MeO-PEG-*b*-poly( $\epsilon$ -trifluoroacetyl-L-lysine) (PEG-PLys(TFA)) の合成を、NCA 重合法により行った。MeO-PEG-NH<sub>2</sub> (Mw of PEG = 12,000) を真空下で 15 分間乾燥させ、蒸留した *N,N*-dimethylformamide (DMF) に溶解させた。Lys(TFA)-NCA を蒸留した DMF に溶解させ、前述の PEG 溶液に加えた。35  $^{\circ}$ C で 3 日間の反応後、反応溶液を過剰量の diethyl ether に加えることにより沈殿を生成させた。沈殿物を吸引濾過法により回収し、真空下で 1 晩乾燥させて PEG-PLys(TFA)を得た。

PEG-PLys(TFA)の構造解析はゲル浸透クロマトグラフィー (GPC, 移動相: DMF + 10 mM LiCl, 流速: 0.80 mL/min, 検出器: 屈折率, 温度: 25°C) および  $^1\text{H}$ -nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$ -NMR, 400 MHz, 溶媒: dimethyl sulfoxide (DMSO) - $d_6$ ) により行った。構造解析の条件は以下同一である。

続いて PEG-PLys の合成を、PEG-PLys(TFA)の側鎖の TFA 基を強塩基により脱保護することにより合成した。PEG-PLys(TFA)を methanol に溶解させ、1 mol/L の NaOH 水溶液を加えて 25 °C で 1 晩反応させた。反応溶液を透析膜 (MWCO: 6,000-8,000) に入れ、純水に対して 1 晩透析した後、凍結乾燥法により PEG-PLys が得られた。PEG-PLys の構造解析を GPC および  $^1\text{H}$ -NMR により行った。

この PEG-PLys を 5 % LiCl を含む NMP に溶解させた。2-iminothiolane を NMP に溶解させ、PEG-PLys 溶液に加えた。溶液に 10 % triethylamine を含む NMP を加えた後、25 °C で 1 晩反応させた。反応溶液を過剰量の diethyl ether に加えることにより沈殿を生成させた。沈殿物をさらに少量の NMP に溶解させて過剰量の diethyl ether に加えることにより再沈殿を行った。2 回の再沈殿後に溶液を透析膜 (MWCO: 6,000-8,000) に入れ、純水に対して 1 晩透析した。凍結乾燥法により PEG-P(Lys-SH) が得られた。PEG-P(Lys-SH)の構造解析を GPC および  $^1\text{H}$ -NMR により行った。

実験 2 と同様に Cy5 で蛍光標識を行った PEG-P(Lys-SH) [PEG-P(Lys-SH)-Cy5] を 10 mM phosphate buffer (pH 7.4, 1 mg/mL) に溶解させた。ポリマーの 1 級アミンと IL-1 $\beta$  (Orig-IL, FP-IL) のカルボキシル基の物質質量比が 1 になるように混合した。ポリマーのチオール基を酸化してジスルフィド結合を形成させるため、室温で 1 晩おき、0.5% DMSO を含む 10 mM Tris-HCL buffer (pH 7.4) に対して 37 $^{\circ}$ C で 24 時間、さらに DMSO を含まない同 buffer に対して 2 日間透析し、IL-1 $\beta$  内包 Cy5 labeled PIC micelle を調製した。

以下、IL-1 $\beta$  内包 Cy5 labeled PIC micelle を PICs-IL と記載する。調製した PICs-IL の粒子径分析は Zetasizer<sup>®</sup> Nano (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK) を用いた動的光散乱法により行った。

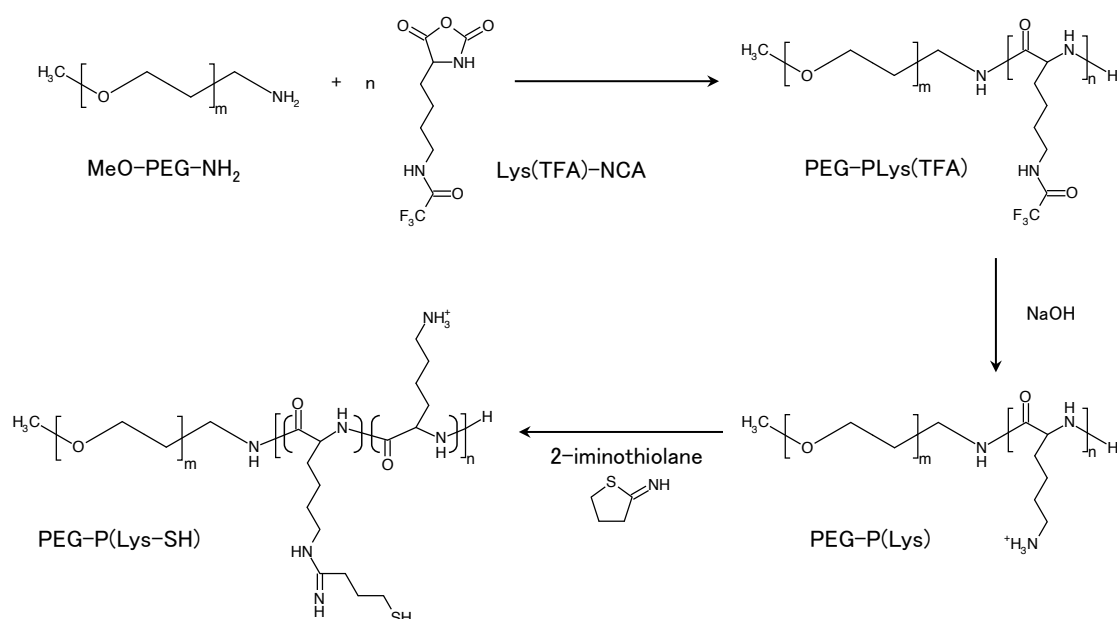


図 18. PICs-IL 調製のための block cationer (PEG-P(Lys-SH)) の合成手順

## PICs-IL の集積性の検討

実験 2 と同様にラット急性下肢虚血モデルを作成し、術後 24 時間後に尾静脈から PICs-IL 溶液を体重 100 g あたり 100  $\mu$ L 静注した (n = 3)。投与 24 時間後に、やはり実験 2 と同様に両側の CF・SM・ST を摘出して IVIS<sup>®</sup>にて蛍光強度を評価した。

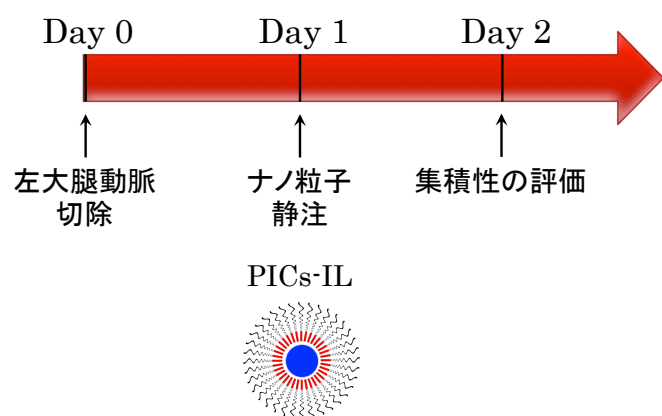


図 19. 実験 3 PICs-IL の集積性の検討 プロトコール

## PICs-IL の血中滞留性の検討

7 日前からアルファルファフリー飼料 (iVid<sup>®</sup> #3, Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) を与えて自家蛍光を低減させておいたオスの Sprague-Dawley ラット (体重 300-350 g) の尾静脈から、PICs-IL 溶液を体重 100 g あたり 300  $\mu$ L 静注した。投与直後・20 分後・40 分後・1 時間後・2 時間後・4 時間後に外頸静脈から 100-150  $\mu$ L の血液を採取した。血液はすぐに氷上に静置した後、4  $^{\circ}$ C・3000 rpm で 15 分間遠心分離して血清を採取した。採取した血清の蛍光強度を NanoDrop<sup>®</sup> 3300 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) で測定した。

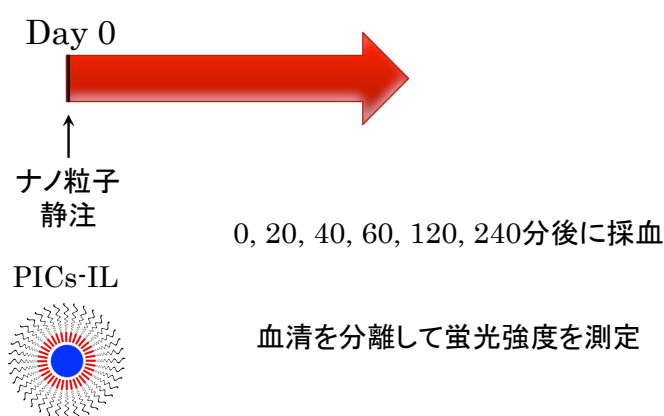


図 20. 実験 3 PICs-IL の血中滞留性の検討 プロトコール

<結果>

### **IL-1 $\beta$ の charge conversion**

フルオレスカミンを用いた 1 級アミンの定量により IL-1 $\beta$  中の 1 級アミンが 5.9 %であることが確認され、ほぼすべての 1 級アミンが Cit、FP と反応したことが示唆された。

### **Charge converted IL-1 $\beta$ の生理活性の検証**

図 21 に 3 種類の IL-1 $\beta$ の生理活性を示す。100 pg/mL の IL-1 $\beta$ を投与したとき (グラフ右端) の IL-8 濃度は、Orig-IL: 20.3 ng/mL, Cit-IL: 0.50 ng/mL, FP-IL: 7.15 ng/mL であった。

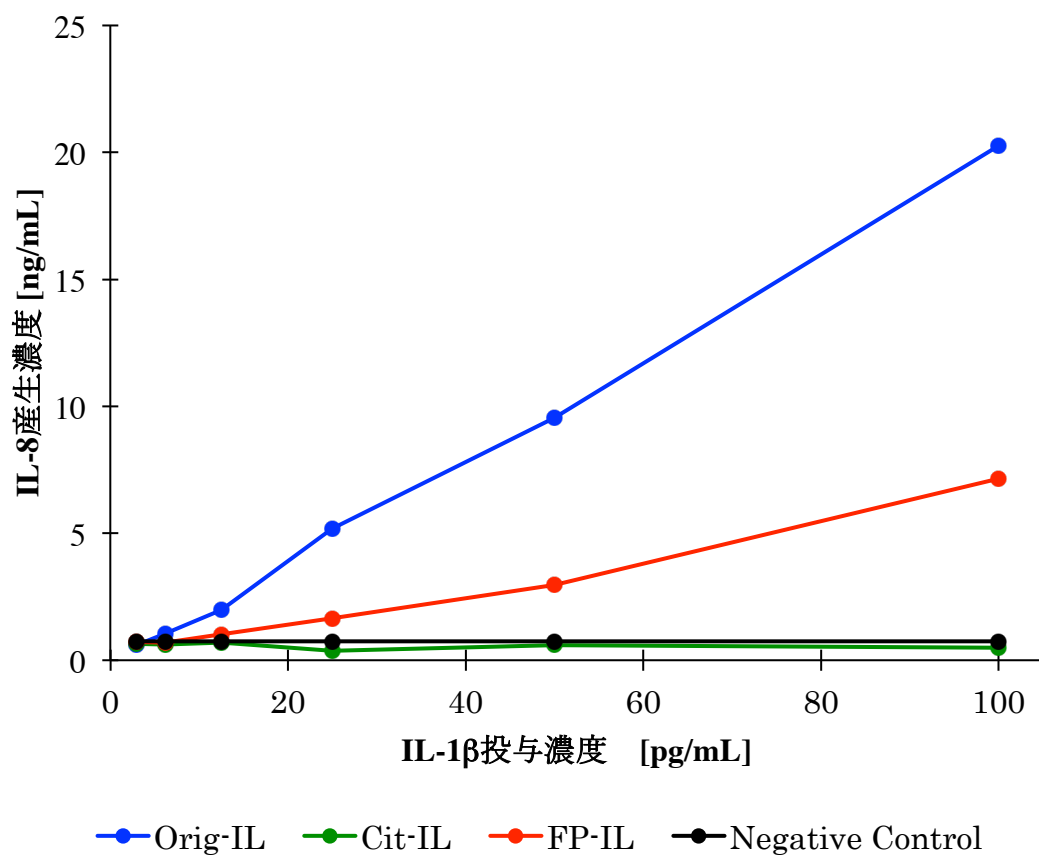


図 21. Charge conversion による IL-1 $\beta$ 生理活性の変化  
 Cit-IL はほとんど生理活性が失われているが、FP-IL は Orig-IL に比べて低下しているものの活性を残していることが示された。



## IL-1 $\beta$ 内包 PIC micelle (PICs-IL) の調製

PIC micelle の原料となるポリマーの性質は下記の通りであった。

### PEG-PLys(TFA)

<sup>1</sup>H-NMR から PLys(TFA)の重合度 85 の PEG-PLys(TFA)が得られたことが確認された。また、GPC から単分散のピークが確認され、NCA 重合法によるホモポリマーの形成は確認されなかった。

### PEG-PLys

<sup>1</sup>H-NMR から PLys の重合度 85 の PEG-PLys が得られたことが確認された。また、GPC から単分散のピークが確認され、強塩基によるポリペプチド鎖の加水分解は確認されなかった。

### PEG-P(Lys-SH)

<sup>1</sup>H-NMR から SH 基の導入率 20%の PEG-P(Lys-SH)が得られたことが確認された。また、GPC から単分散のピークが確認され、酸性条件下におけるポリマー間の架橋は確認されなかった。

図 22 に示すように、この PEG-P(Lys)と FP-IL から調製された PICs-IL は動的  
光散乱法により平均粒径 93 nm・多分散度 (PDI) 0.08 であることが確認された。  
PEG-P(Lys)単独の溶液、PEG-P(Lys)と Orig-IL で調製した溶液を同様に計測した  
が、PIC micelle 形成を示唆する 30nm 以上の粒子は検出されなかった。

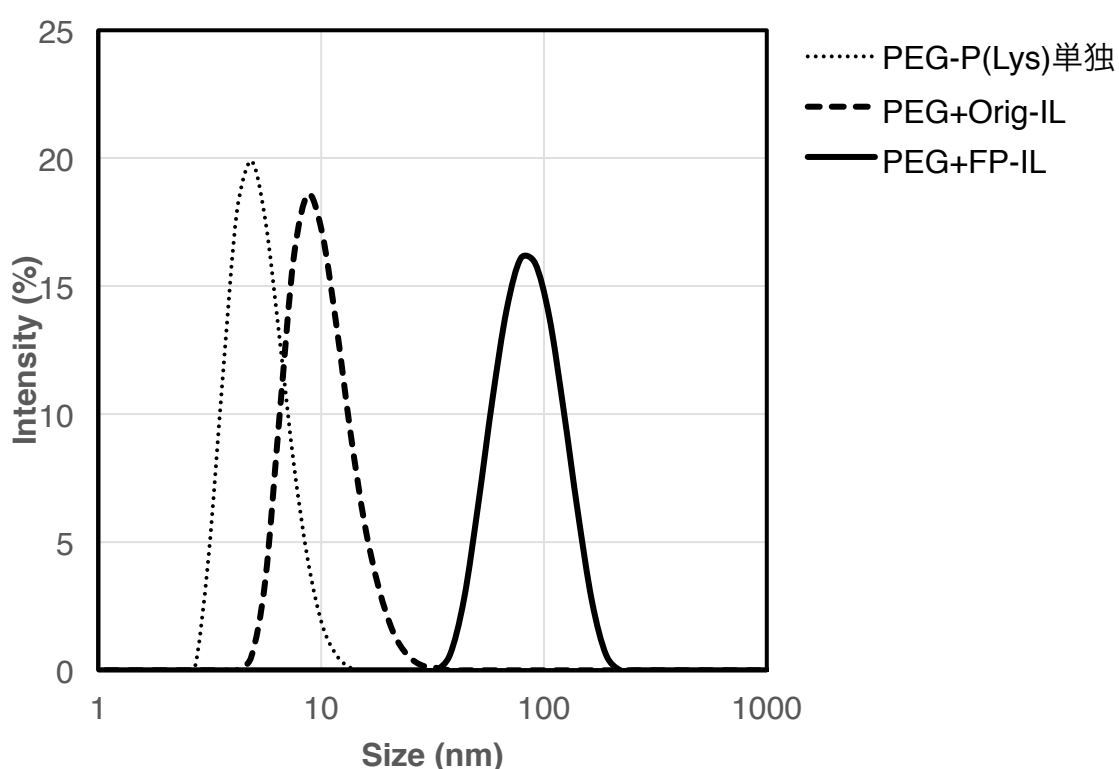


図 22. PICs-IL および PEG-P(Lys)の動的光散乱法による粒径評価

PEG 単独・PEG と Orig-IL で調製した場合、30nm 以上の粒径は得られず、  
ポリマーそのものの大きさを検出している (micelle を形成していない) も  
のと考えられた。PEG と FP-IL で調製した場合は平均粒径 93 nm が得られ、  
micelle を形成していると考えられた。

## PICs-IL の集積性の検討

図 23 に、IVIS<sup>®</sup>による max radiant efficiency のグラフを示す。CF, SM, ST のいずれにおいても max radiant efficiency に左右差は認められなかった ( $p = 0.94, 0.36$  and  $0.73$ , respectively)。

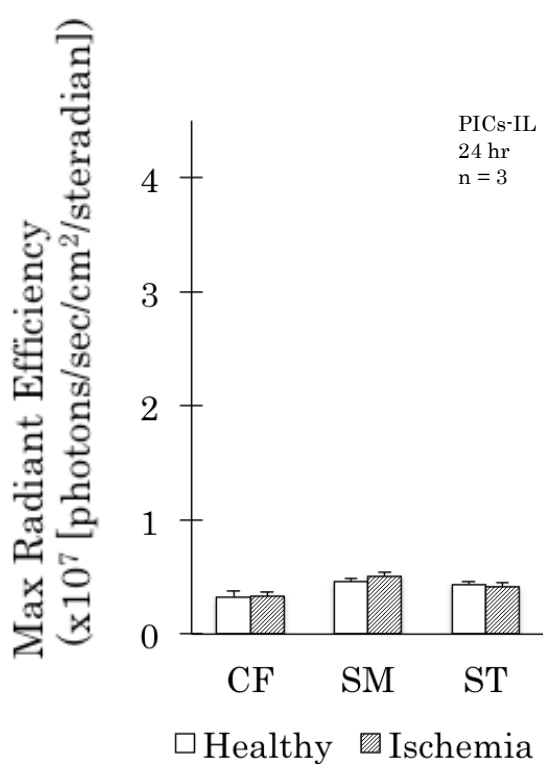


図 23. PICs-IL 静注後 24 時間後の各筋肉の max radiant efficiency  
いずれの筋肉でも蛍光強度に左右差を認めなかった。  
CF: 尾骨大腿筋, SM: 半膜様筋, ST: 半腱様筋

## PICs-IL の血中滞留性の検討

図 24 に PICs-IL の血中蛍光強度のグラフを示す。最小二乗法による近似曲線の傾きは-0.0269 であり、相関係数は  $R^2 = 0.99368$  であった。近似曲線から計算された半減期は 11.2 分であった。

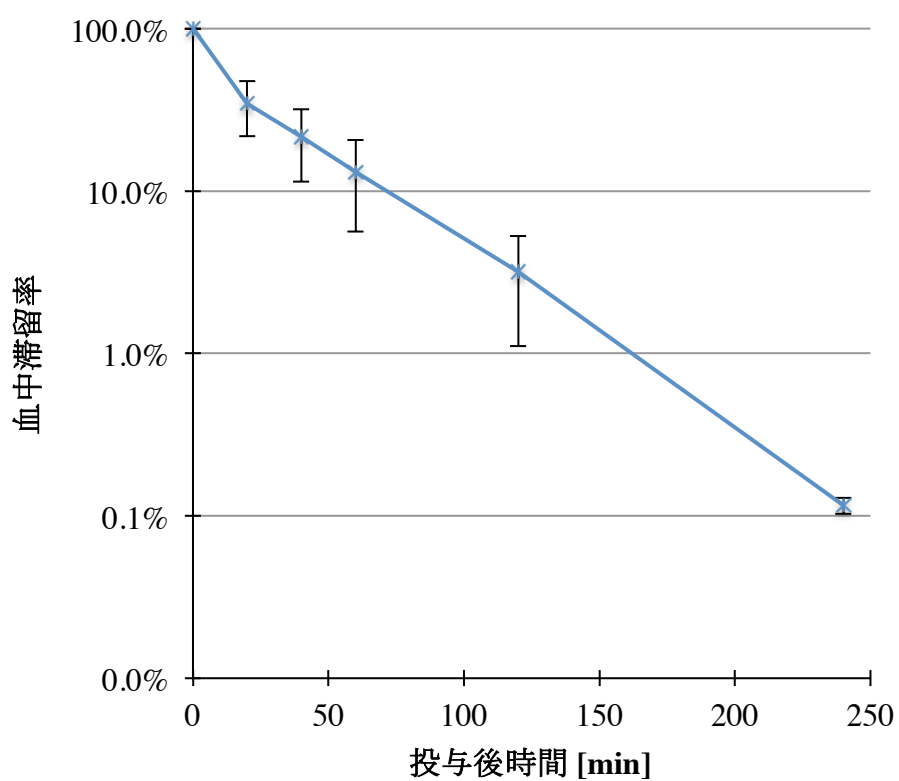


図 24. PICs-IL の血中滞留性  
半減期は 11.2 分であった。

<小括>

IL-1 $\beta$ をFPでcharge conversionすることにより、平均粒径93 nmのPICs-ILを調製することができた。FP-ILの活性はOrig-ILの約35%となっていた。このPICs-ILを急性下肢虚血モデルに投与したが、側副血行路形成部位への集積は認められなかった。このPICs-ILの血中半減期は11.2分であった。

## 考察

本研究では、まず新たにラットの急性下肢虚血モデルを構築するところから開始した。今回構築したモデルは鼠径部の斜切開を用い、大腿部への侵襲が少ない。当初は IVIS®にて体外からの蛍光検出を期待していたため、このような設計となった。一般に、虚血によって誘導される側副血行路が走行すると予想されるのは主に筋肉内である [60]。今回は皮下組織直下に存在する大腿動脈のみを処置対象としたことで、筋肉への手術侵襲を低減しつつも大腿動脈結紮モデル [43]より高度の虚血を誘導しえた。特に、今回ターゲットとした尾骨大腿筋 *caudofemoralis muscle* や半膜様筋 *semimembranous muscle* は、腹側に薄筋・縫工筋が、背側に大腿二頭筋・臀筋群があり、もっとも深部に存在する。このような、手術侵襲などの外的要因から最も守られた筋肉内に側副血行路を形成できるモデルを構築できたことで、今回の知見に到達できたと考えられる。実際に、*sham-ope* 群では PIC-nanocarrier の集積を認めず、側副血行路による炎症を効率的に抽出できるモデルになったと考えている。

このようなモデルに対し、100 nm の径を持つ PICs-100 が 24 時間後・72 時間後ともに集積を示し、200 nm の径を持つ PICs-200 が 24 時間後に集積を示した。径 30 nm の PICs-30 は 24 時間後も集積を示さなかった。Enhanced permeability

の観点からは、小さな粒子の方がより小さな間隙も通過することができるはずであり、PICs-30 > PICs-100 > PICs-200 の順に集積が低下することが予想される。実際に過去の研究を見ると、Taniguchi らは頸動脈擦過による内膜肥厚モデル作成後 7-14 日後に PIC-nanocarrier を投与すると、径 40 nm の PIC-nanocarrier (PICs-40) が集積したが 100 nm・200 nm は集積しなかったことを示している [50]。頸動脈擦過後 7-14 日目においては、血管内皮細胞はまだ再生されておらず [61]、露出した細胞外マトリクス (ECM) の間隙から PIC-nanocarrier が血管壁内に侵入したと考察されている。肥厚内膜には侵入しえなかった PICs-100 が、本研究においては小動脈周囲に侵入・滞留しており、肥厚内膜における ECM より側副血行路周囲の ECM の方がより広い間隙を持つことが示唆される。これはより小径の PICs-30 / 40 にとっては、より通過しやすいことを意味する。一方、急性炎症期にある組織においてはリンパ系によるドレナージ能が亢進していることが知られている [32]。Retention に関しては粒径が大きい方が有利であり、側副血行路形成部位において血管外に漏出した PICs-30 が ECM の間隙をすり抜けて wash out されてしまったために集積しなかったという機序は十分に考えられる (図 25)。上記の仮説が正しければ、PICs-200 は漏出部により長くとどまることが予想される。しかし実際には、PICs-100 においては投与 72 時間後も虚血側で有意な集積を認めていたのに対し、PICs-200 では 72 時間後に有意差が消失

していた。ひとつの可能性として、PIC-nanocarrier の漏出量と wash out 量が経時的に変化し、その結果両者のバランスが時間とともに変化しているという仮説が考えられる。投与 24~72 時間後においては炎症反応が沈静化していき、それに伴い側副血行路の enhanced permeability が徐々に減弱していくと仮定する。すると PICs-200 は投与 24~72 時間後において、投与直後~24 時間後に比べて更に漏出しにくくなると考えられる。一方で PICs-200 に比べて粒径の小さい PICs-100 は enhanced permeability 減弱の影響は受けにくいと考えられ、すなわち炎症の沈静化過程においても漏出量が減少しにくいと考えられる。Retention の点で PICs-200 は PICs-100 より有利であるものの、持続的な漏出が得られなかった結果 72 時間後には wash out 量が相対的に漏出量を上回ってしまい、集積の有意性が失われたと解釈しうる。また、径 200 nm 以上の PICsome は脾臓への取り込みが増加することが知られている [47]。したがって PICs-200 は血中濃度が PICs-100 より低下しやすい可能性がある。Enhanced permeability の減弱に加えて、血中濃度の低下が漏出量低下に影響した可能性も考えられる。



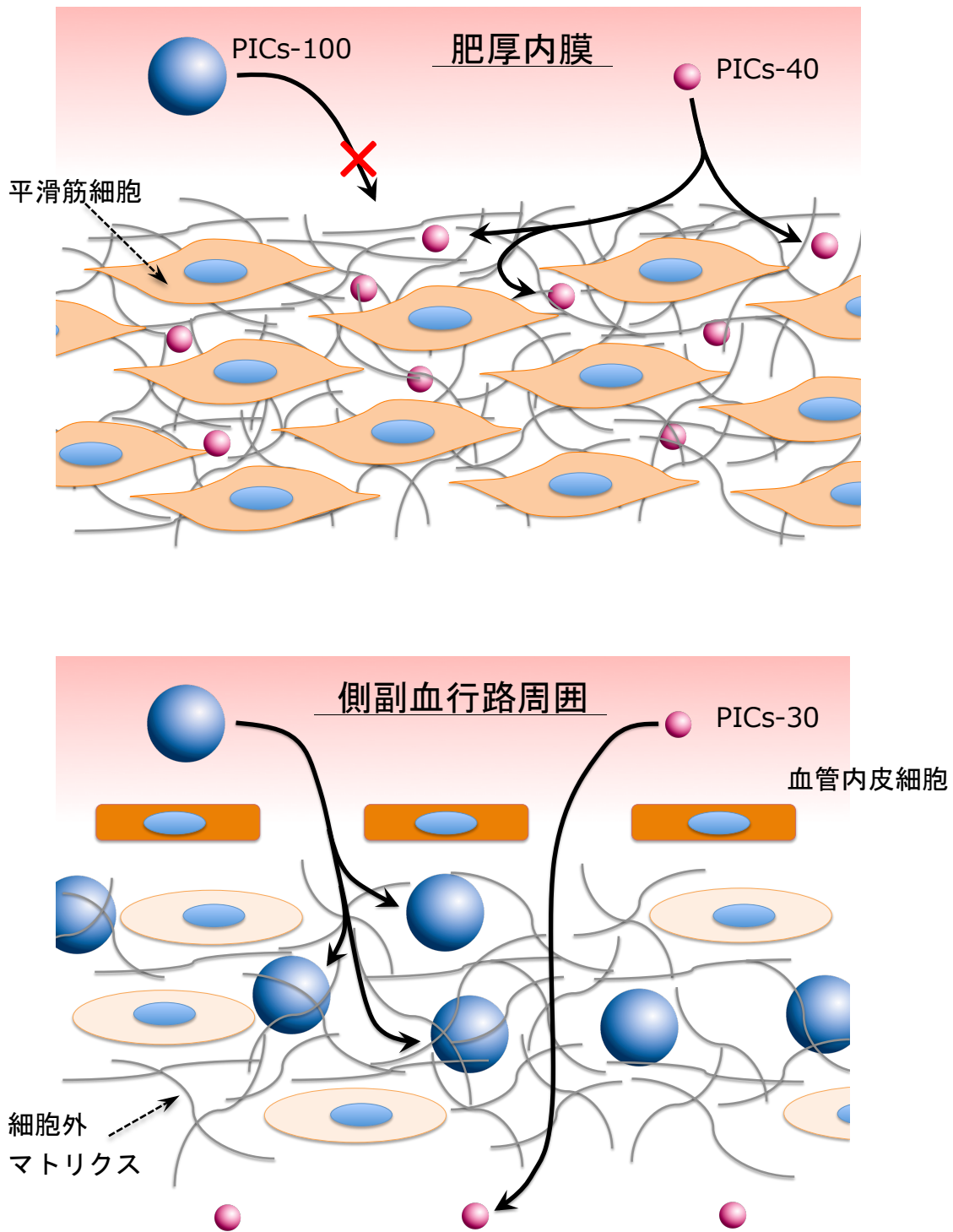


図 25. 集積機序に関する考察シエーマ (上：肥厚内膜、下：側副血行路周囲)  
 肥厚内膜には 100 nm 径の粒子は侵入できないが、40 nm の粒子は侵入できた。側副血行路周囲にはいずれの径の粒子も侵入できたが、30nm 径の粒子は wash out されてしまったと考えられる。組織によって異なる細胞・細胞外マトリクス密度が、デリバリーに適切な nanocarrier の粒径を左右していると考えられる。

組織学的検討においては、PICs-100 は筋線維の中には認められず主に小動脈周囲の間質に局在していた。一般に EPR 効果は毛細血管の内皮細胞間隙や fenestration において起きる現象であり、中膜を持つ小動静脈より太い血管で見られるものではないと考えられている。実際に前述の頸動脈擦過モデル [50] および Shirasu らの elastase による大動脈瘤モデル [49] においては、PIC-nanocarrier はいずれも動脈壁内に集積していた。新たに成長してきた側副血行路は、頸動脈・大動脈のような中～大口径の動脈と中膜や外膜の構造が異なっている・側副血行路の周囲には EPR 効果をもたらす毛細血管が増生しているといった可能性が考えられる。また、標本採取の際に失われただけで、実際には大動脈・頸動脈周囲にも PIC-nanocarrier は漏出しているという可能性も考えられる。これらはいずれも今回検討できておらず、今後の検討課題である。

また、マクロファージとの共局在に関しては既報と異なる結果が得られた。前述の大動脈瘤モデルでは、大部分の PIC-nanocarrier がマクロファージと共局在していた [49] が、本研究ではマクロファージに取り込まれていない PIC-nanocarrier の方が共局在しているものより多かった。PIC-nanocarrier のうちの程度がマクロファージに貪食をうけるかは、PIC-nanocarrier の量とマクロファージ数の相対的な存在割合によって大きく異なってくると考えられる。大動脈瘤モデルではマクロファージの数が相対的に多く、本研究では漏出した

PICs-100の方が相対的に多かった可能性が考えられる。一方でマクロファージ側から見ると、全マクロファージ中PICs-100と共局在しているものは約10%であったことから、PICs-100が相対的に過剰になっているにもかかわらず異物として認識していないマクロファージが90%程度あることになり、これはPEG外殻を持つPIC-nanocarrierの高いステルス性[47]を反映したものと考えられる。ただし、CD68染色では遊離状態に見えるPICs-100も、一部はマクロファージ以外の単核球などに取り込まれていると考えられるため、ステルス性の評価としては過大になっていると思われる。しかし、薬剤を搭載した際には、デリバリーされた粒子の一定部分が異物として免疫系に除去されることなく、搭載された薬剤がECMで長時間作用しうる可能性は十分に考えられる。

これまでの循環器疾患モデルに対するPIC-nanocarrierを用いた研究では、いずれも「病態を模して」作成したモデル領域への粒子集積を見ているものであった[49,50]。病態モデルは必ずしも現実の疾患で起きている変化と同等ではなく、動物実験の結果をヒトに外挿するにあたって障壁となることがある。今回の我々のモデルは、急性虚血の惹起自体は現実の疾患とは異なるものの、側副血行路形成という極めて生理的な反応を標的としたデリバリーを達成できた。これはヒトへの応用を考えるにあたり、本研究の大きな意義のひとつと考えられる。

実験3では、IL-1 $\beta$ のミセル化に成功した。これまでの実験ではエピルビシン [62]、ラパマイシン [49]など低分子量の化合物は安定してミセル化が可能であり、これらを応用した動物実験で治療効果をあげてきた。ペプチドのミセル化においては、Kim らの報告で免疫グロブリンを charge conversion してミセル化する手法が報告されている [58]。今回、この方法を応用して IL-1 $\beta$ のミセル化を行った。しかし、ペプチドとポリマーの比率、PEG と ionic polymer の weight fraction や S-S 架橋の割合といった条件は、本来は内包薬剤によって最適化を行う必要がある。十分な最適化には長期間を要するため、今回は Kim らが免疫グロブリンで使用した条件をそのまま使用した。また Anraku らは、マウスに PIC-nanocarrier を静注したときの血中滞留性につき報告している [47]。それによると、径 38 nm の PIC micelle の半減期は 4.6 時間、径 107 nm の PICsome の半減期は 19.6 時間であった。ラットでは径 40 nm で 3.0 時間、径 100 nm で 0.9 時間というデータもあり (unpublished data)、動物種によって生体内動態は大きく異なることが示唆されるが、いずれにしても今回使用した PICs-IL の血中半減期は 0.2 時間と上記に比べて極めて短かった。これにより、同等の粒子径であっても標的とする組織への集積が乏しかった可能性が考えられる。薬剤を内包していない PIC-nanocarrier と PICs-IL の血中滞留性に差がある原因として、EDC による化学架橋の有無が考えられる。外殻の架橋を強化すれば粒子の安定性自

体は向上するが、逆に粒子が崩壊しないことで IL-1 $\beta$  が放出されにくくなり治療効果を発揮できなくなる可能性も考えられる。今後は、デリバリー効率向上のための粒子安定性と、標的部位での崩壊とのバランスをとった調製条件最適化を図る必要がある。今回用いた charge conversion 法による PIC micelle は、citraconic amide が pH 5 で分解されることを利用し、endosome により細胞内に取り込まれた際の低 pH で崩壊するように設計されている [52,58]。一方、ウサギの心筋梗塞モデルにおいて、虚血心筋の細胞外 pH は約 6.5 と報告されており [63]、endosome 内に比して pH が高い。Charge conversion に用いる新たな低分子を探索することでより高い pH で崩壊し得る PIC-nanocarrier を設計し、外殻の架橋を強化することにより血中安定性と標的組織での崩壊を両立させられる可能性がある。

また今回は PICs-IL の信号を標的部位で検出することができなかった。これは①PICs-IL 自体がデリバリーできていなかった可能性②デリバリーはできたが、すでに崩壊していたために検出できなかった可能性が考えられる。内包されている IL-1 $\beta$  を検出できれば鑑別できる可能性があるが、IL-1 $\beta$  自体の半減期が非常に短いため困難が予想される。In vivo レーザー共焦点顕微鏡の観察も、標的部位が組織の深部に位置することから同様に難しいと考えられる。評価の手法

として、IL-1 $\beta$ によって誘導される炎症反応の検出や治療効果によって間接的な評価を行うなどが考えられ、今後の検討課題である。

このように今回の研究では、ドラッグデリバリーを用いた新たな血管新生療法を見出すことまでは叶わなかった。一方で、別の臨床応用手段としてイメージングデバイスとしての応用が考えられる。Nishiyama らや Nemoto らはウサギを使った実験で、筋肉内投与による血管新生療法において注射部位によって効果が異なることを報告している [55,64]。これらは、側副血行路が生じる部位に薬剤を注射しなければ血管新生療法は十分な効果が得られないことを示唆している。実臨床においては動脈の閉塞部位や程度は患者によって様々であり、それに伴って側副血行路が形成される部位も異なっている。したがって、局所投与による血管新生療法の効果を向上させるには、患者ごとに最適の注射部位を同定してそこに投与する必要がある。今回の検討では体外から側副血行路形成部位に集積した蛍光を検出することはできなかった。しかし一方で、Shiraishi らはガドリニウムを内包した PIC micelle を調製し、MRI の T1 強調画像で高信号として捉えられることを報告している [65]。この粒子を径 100 nm で作成し、同様に側副血行路形成部位に集積させることができれば、MRI で側副血行路形成部位を同定できる可能性がある。これにより、局所投与による血管新生療法

において治療すべきターゲットを明確にすることができ、より効果的で効率的な治療が可能になると考えられる。

## 結論

ラット急性下肢虚血モデルに於いて、側副血行路が形成されようとしている筋肉に径 100 nm の PICsome が最も集積を示した。Charge conversion 法を用いることで IL-1 $\beta$  を内包した径 93 nm の PIC micelle を調製することに成功したが、側副血行路形成部位への集積は微弱であった。そしてこの要因が PICsome と薬剤内包 PIC micelle の血中安定性の違いに帰することが推測された。一方で、側副血行路形成という生理的反応をターゲットにドラッグデリバリーが達成しうるという本研究の成果は、ヒトにおける現実の疾患にも外挿しうる重要な知見であると考えられた。今後、具体的な薬剤送達や治療補助ツールとしてのブラッシュアップが望まれる。



## 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 野澤宏彰 准教授、国際医療福祉大学 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）、国際医療福祉大学血管外科 重松邦広 教授（前東京大学医学部附属病院血管外科講師）、公益財団法人川崎市産業振興財団ナノ医療イノベーションセンター 片岡一則 センター長（前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教授）、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻血管外科 保科克行 講師、同 赤木大輔 特任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ご尽力を賜りました東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻 安楽泰孝 特任助教および同博士課程 宮崎拓也 様に御礼を申し上げます。最後に、実験環境の整備から実験計画、結果の解釈、考察に至るまで全面的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、東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻 Horacio Cabral 准教授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 前特任准教授に格別の御礼を申し上げます。

## 引用文献

- [1] 末梢閉塞性動脈疾患の治療ガイドライン（2015年度版） .
- [2] F. G. R. Fowkes, D. Rudan, I. Rudan, et al., Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: A systematic review and analysis. *Lancet*; **382** (9901): 1329–1340, 2013.
- [3] Fontaine R, M. Kim, and R. Kieny, Surgical treatment of peripheral circulation disorders. *Helv Chir Acta.*; **21** (5–6): 499–533, 1954.
- [4] R. B. Rutherford, J. D. Baker, C. Ernst, et al., Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: Revised version. *J. Vasc. Surg.*; **26** (3): 517–538, 1997.
- [5] L. Norgren, W. R. Hiatt, J. A. Dormandy, et al., Inter-Society Consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *J. Vasc. Surg.*; **45** (Supplement S): S5A–S67A, 2007.
- [6] D. F. Lazarous, E. F. Unger, S. E. Epstein, et al., Basic fibroblast growth factor in patients with intermittent claudication: Results of a phase I trial. *J. Am. Coll. Cardiol.*; **36** (4): 1239–1244, 2000.

- [7] L. T. Cooper Jr., W. R. Hiatt, M. A. Creager, et al., Proteinuria in a placebo-controlled study of basic fibroblast growth factor for intermittent claudication. *Vasc.Med.*; **6** (4): 235–239, 2001.
- [8] R. J. Lederman, F. O. Mendelsohn, R. D. Anderson, et al., Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet*; **359** (9323): 2053–2058, 2002.
- [9] K. Mäkinen, H. Manninen, M. Hedman, et al., Increased Vascularity Detected by Digital Subtraction Angiography after VEGF Gene Transfer to Human Lower Limb Artery: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blinded Phase II Study. *Mol. Ther.*; **6** (1): 127–133, 2002.
- [10] S. Rajagopalan, E. R. M. III, R. J. Lederman, et al., Regional Angiogenesis With Vascular Endothelial Growth Factor in Peripheral Arterial Disease: A Phase II Randomized, Double-Blind, Controlled Study of Adenoviral Delivery of Vascular Endothelial Growth Factor 121 in Patients With Disabling Intermittent Cl. *Circulation*; **108** (16): 1933–1938, 2003.

- [11] Y. H. Kusumanto, V. van Weel, N. H. Mulder, et al., Treatment with Intramuscular Vascular Endothelial Growth Factor Gene Compared with Placebo for Patients with Diabetes Mellitus and Critical Limb Ischemia: A Double-Blind Randomized Trial. *Hum. Gene Ther.*; **17** (6): 683–691, 2006.
- [12] H. Shigematsu, K. Yasuda, T. Iwai, et al., Randomized, double-blind, placebo-Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of hepatocyte growth factor plasmid for critical limb ischemia. *Gene Ther.*; **17** (9): 1152–1161, 2010.
- [13] P. M. Grossman, F. Mendelsohn, T. D. Henry, et al., Results from a phase II multicenter, double-blind placebo-controlled study of Del-1 (VLTS-589) for intermittent claudication in subjects with peripheral arterial disease. *Am. Heart J.*; **153** (5): 874–880, 2007.
- [14] E. Tateishi-Yuyama, H. Matsubara, T. Murohara, et al., Therapeutic angiogenesis for patients with Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: A pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*; **360** (9331): 427–435, 2002.

- [15] P. P. Huang, X. FengYang, S. Z. Li, et al., Randomised comparison of G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells versus bone marrow-mononuclear cells for the treatment of patients with lower limb arteriosclerosis obliterans. *Thromb. Haemost.*; **98** (2): 1335–1342, 2007.
- [16] P. HUANG, S. LI, M. HAN, et al., Autologous Transplantation of Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Mobilized Peripheral Blood Mononuclear Cells Improves Critical Limb Ischemia in Diabetes. *Diabetes Care*; **28** (9): 2155–2160, 2005.
- [17] T. Bartsch, M. Brehm, T. Zeus, et al., Transplantation of autologous mononuclear bone marrow stem cells in patients with peripheral arterial disease (The TAM-PAD study). *Clin. Res. Cardiol.*; **96** (12): 891–899, 2007.
- [18] G. Cobellis, A. Silvestroni, S. Lillo, et al., Long-term effects of repeated autologous transplantation of bone marrow cells in patients affected by peripheral arterial disease. *Bone Marrow Transplant.*; **42** (10): 667–672, 2008.
- [19] V. Procházka, J. Gumulec, F. Jalůvka, et al., Cell Therapy, a New

Standard in Management of Chronic Critical Limb Ischemia and Foot Ulcer. *Cell Transplant.*; **19** (11): 1413–1424, 2010.

- [20] D. Lu, B. Chen, Z. Liang, et al., Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: A double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res. Clin. Pract.*; **92** (1): 26–36, 2011.
- [21] D. H. Walter, H. Krankenberg, J. O. Balzer, et al., Intraarterial administration of bone marrow mononuclear cells in patients with critical limb ischemia a randomized-start, placebo-controlled pilot trial (PROVASA). *Circ. Cardiovasc. Interv.*; **4** (1): 26–37, 2011.
- [22] M. D. Iafrati, J. W. Hallett, G. Geils, et al., Early results and lessons learned from a multicenter, randomized, double-blind trial of bone marrow aspirate concentrate in critical limb ischemia. *J. Vasc. Surg.*; **54** (6): 1650–1658, 2011.
- [23] N. Idei, J. Soga, T. Hata, et al., Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation reduces long-term major amputation risk in patients with critical limb ischemia : A comparison of atherosclerotic peripheral

- arterial disease and buerger disease. *Circ. Cardiovasc. Interv.*; **4** (1): 15–25, 2011.
- [24] R. J. Powell, W. A. Marston, S. A. Berceli, et al., Cellular Therapy With Ixmyelocel-T to Treat Critical Limb Ischemia: The Randomized, Double-blind, Placebo-controlled RESTORE-CLI Trial. *Mol. Ther.*; **20** (6): 1280–1286, 2012.
- [25] D. W. Losordo, M. R. Kibbe, F. Mendelsohn, et al., A Randomized, Controlled Pilot Study of Autologous CD34+ Cell Therapy for Critical Limb Ischemia. *Circ Cardiovasc Interv.*; **5** (6): 821–830, 2012.
- [26] M. Kumagai, A. Marui, Y. Tabata, et al., Safety and efficacy of sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel in patients with critical limb ischemia. *Heart Vessels*; **31** (5): 713–721, 2016.
- [27] J. Belch, W. R. Hiatt, I. Baumgartner, et al., Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: A randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia. *Lancet*; **377** (9781): 1929–1937, 2011.
- [28] M. Arai, Y. Misao, H. Nagai, et al., Granulocyte colony-stimulating

- factor: a noninvasive regeneration therapy for treating atherosclerotic peripheral artery disease. *Circ. J.*; **70** (9): 1093–1098, 2006.
- [29] S. Nikol, I. Baumgartner, E. Van Belle, et al., Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Mol. Ther.*; **16** (5): 972–978, 2008.
- [30] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, et al., Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *J. Control. Release*; **65** (1–2): 271–284, 2000.
- [31] H. Hashizume, P. Baluk, S. Morikawa, et al., Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am. J. Pathol.*; **156** (4): 1363–1380, 2000.
- [32] H. Nehoff, N. N. Parayath, L. Domanovitch, et al., Nanomedicine for drug targeting: Strategies beyond the enhanced permeability and retention effect. *Int. J. Nanomedicine*; **9** (1): 2539–2555, 2014.
- [33] I. Buschmann, M. Heil, M. Jost, et al., Influence of Inflammatory Cytokines on Arteriogenesis. *Microcirculation*; **10** (3–4): 371–379, 2003.



- [34] M. Heil and W. Schaper, Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (Arteriogenesis). *Circ. Res.*; **95** (5): 449–458, 2004.
- [35] A. La Sala, L. Pontecorvo, A. Agresta, et al., Regulation of collateral blood vessel development by the innate and adaptive immune system. *Trends Mol. Med.*; **18** (8): 494–501, 2012.
- [36] D. T. Sweet, Z. Chen, C. S. Givens, et al., Endothelial shc regulates arteriogenesis through dual control of arterial specification and inflammation via the notch and nuclear factor- $\kappa$ B-light-chain-1 enhancer of activated b-cell pathways. *Circ. Res.*; **113** (1): 32–39, 2013.
- [37] E. Stabile, M. Susan Burnett, C. Watkins, et al., Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation*; **108** (2): 205–210, 2003.
- [38] D. De Groot, R. T. Haverslag, G. Pasterkamp, et al., Targeted deletion of the inhibitory NF- $\kappa$ B p50 subunit in bone marrow-derived cells improves collateral growth after arterial occlusion. *Cardiovasc. Res.*; **88** (1): 179–185, 2010.
- [39] G. L. Tang, D. S. Chang, R. Sarkar, et al., The effect of gradual or

acute arterial occlusion on skeletal muscle blood flow, arteriogenesis, and inflammation in rat hindlimb ischemia. *J. Vasc. Surg.*; **41** (2): 312–320, 2005.

- [40] Z. W. Zhuang, L. Gao, M. Murakami, et al., Arteriogenesis : Noninvasive Quantification with Multi – Detector Purpose : Methods : Results : Conclusion : *Radiology*; **240** (3): 698–707, 2006.
- [41] Q. Li, D. Yao, J. Ma, et al., Transplantation of MSCs in Combination with Netrin-1 Improves Neoangiogenesis in a Rat Model of Hind Limb Ischemia. *J. Surg. Res.*; **166** (1): 162–169, 2011.
- [42] A. Nagano, T. Komatsuno, H. Kasahara, et al., Evaluation of hepatocyte growth factor plasmid therapeutic effect by <sup>99m</sup>Tc-hexakis-2-methoxy-isobutylisocyanide blood flow scintigraphy in a rat model of hind limb ischemia. *Nucl. Med. Commun.*; **32** (9): 818–823, 2011.
- [43] H. A. Corcoran, B. E. Smith, P. Mathers, et al., Laser Doppler Imaging of Reactive Hyperemia Exposes Blood Flow Deficits in a Rat Model of Experimental Limb Ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol.*; **53** (6): 446–451, 2009.

- [44] Y. Anraku, A. Kishimura, M. Oba, et al., Spontaneous Formation of Nanosized Unilamellar Polyion Complex Vesicles with Tunable Size and Properties. *J. Am. Chem. Soc.*; **132** (5): 1631–1636, 2010.
- [45] A. Koide, A. Kishimura, K. Osada, et al., Semipermeable Polymer Vesicle (PICsome) Self-Assembled in Aqueous Medium from a Pair of Oppositely Charged Block Copolymers: Physiologically Stable Micro-/Nanocontainers of Water-Soluble Macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.*; **128** (18): 5988–5989, 2006.
- [46] A. Kishimura, A. Koide, K. Osada, et al., Encapsulation of myoglobin in PEGylated polyion complex vesicles made from a pair of oppositely charged block ionomers: A physiologically available oxygen carrier. *Angew. Chemie - Int. Ed.*; **46** (32): 6085–6088, 2007.
- [47] Y. Anraku, A. Kishimura, A. Kobayashi, et al., Size-controlled long-circulating PICsome as a ruler to measure critical cut-off disposition size into normal and tumor tissues. *Chem. Commun.*; **47** (21): 6054–6056, 2011.
- [48] A. Kishimura, Development of polyion complex vesicles (PICsomes) from block copolymers for biomedical applications. *Polym. J.*; **45** (9):

892–897, 2013.

- [49] T. Shirasu, H. Koyama, Y. Miura, et al., Nanoparticles Effectively Target Rapamycin Delivery to Sites of Experimental Aortic Aneurysm in Rats. *PLoS One*; **11** (6): e0157813, 2016.
- [50] R. Taniguchi, Y. Miura, H. Koyama, et al., Adequately-Sized Nanocarriers Allow Sustained Targeted Drug Delivery to Neointimal Lesions in Rat Arteries. *Mol. Pharm.*; **13** (6): 2108–2116, 2016.
- [51] M. Heil, I. Eitenmüller, T. Schmitz-Rixen, et al., Arteriogenesis versus angiogenesis: Similarities and differences. *J. Cell. Mol. Med.*; **10** (1): 45–55, 2006.
- [52] Y. Lee, T. Ishii, H. Cabral, et al., Charge-conversional polyionic complex micelles-efficient nanocarriers for protein delivery into cytoplasm. *Angew. Chemie - Int. Ed.*; **48** (29): 5309–5312, 2009.
- [53] Y. Lee, S. Fukushima, Y. Bae, et al., A Protein Nanocarrier from Charge-Conversion Polymer in Response to Endosomal pH. *J. Am. Chem. Soc.*; **129** (17): 5362–5363, 2007.
- [54] UniProt BLAST. <https://www.uniprot.org/blast/>; n.d.
- [55] A. Nishiyama, H. Koyama, T. Miyata, et al., Therapeutic site selection

- is important for the successful development of collateral vessels. *J. Vasc. Surg.*; **62** (1): 190–199, 2015.
- [56] B. M. Prior, P. G. Lloyd, J. Ren, et al., Time course of changes in collateral blood flow and isolated vessel size and gene expression after femoral artery occlusion in rats. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol*; **287** (6): 2434–2447, 2004.
- [57] C. W. Lee, E. Stabile, T. Kinnaird, et al., Temporal Patterns of Gene Expression After Acute Hindlimb Ischemia in Mice Insights Into the Genomic Program for Collateral Vessel Development. *J. Am. Coll. Cardiol.*; **43** (3): 474–482, 2004.
- [58] A. Kim, Y. Miura, T. Ishii, et al., Intracellular Delivery of Charge-Converted Monoclonal Antibodies by Combinatorial Design of Block/Homo Polyion Complex Micelles. *Biomacromolecules*; **17** (2): 446–453, 2016.
- [59] C. A. Dinarello, K. Muegge, and S. K. Durum, Measurement of soluble and membrane-bound interleukin 1 using a fibroblast bioassay. *Curr. Protoc. Immunol.*; **Supplement** Unit 6.2.1-7, 2000.
- [60] S. Herzog, H. Sager, E. Khmelevski, et al., Collateral arteries grow

from preexisting anastomoses in the rat hindlimb. *Am. J. Physiol.*

*Heart Circ. Physiol.*; **283** (5): H2012-20, 2002.

- [61] A. W. Clowes, M. M. Clowes, J. Fingerle, et al., Regulation of smooth muscle cell growth in injured artery. *J Cardiovasc Pharmacol.*; **14** (Suppl 6): S12-15, 1989.
- [62] A. Takahashi, Y. Yamamoto, M. Yasunaga, et al., NC-6300, an epirubicin-incorporating micelle, extends the antitumor effect and reduces the cardiotoxicity of epirubicin. *Cancer Sci.*; **104** (7): 920–925, 2013.
- [63] G. Yan and A. G. Kleber, Changes in Extracellular and Intracellular pH in Ischemic Rabbit Papillary Muscle. *Circ. Res.*; **71** (2): 460–471, 1992.
- [64] M. Nemoto, H. Koyama, A. Nishiyama, et al., Adequate Selection of a Therapeutic Site Enables Efficient Development of Collateral Vessels in Angiogenic Treatment With Bone Marrow Mononuclear Cells. *J. Am. Heart Assoc.*; **4** (9): e002287, 2015.
- [65] K. Shiraishi, K. Kawano, Y. Maitani, et al., Polyion complex micelle MRI contrast agents from poly(ethylene glycol)-b-poly(l-lysine) block

copolymers having Gd-DOTA; preparations and their control of  
T1-relaxivities and blood circulation characteristics. *J. Control.  
Release*; **148** (2): 160–167, 2010.