

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 須原 正光

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) は全世界的に患者数が増加している。PAD の最重症段階は虚血性の組織壊死であり、壊死の進行により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、組織予後・生命予後ともに非常に不良である。このような最重症例に対しては可及的速やかな血行再建が求められるが、治療が施行できないもしくは奏功しない場合、四肢では大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。しかし、タンパクの直接投与は有害事象が顕著に現れ、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なかった。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・緊急対応が困難であることなど解決すべき問題は多い。

ナノ製剤を用いたドラッグデリバリーシステム

そこで今回我々は、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) により、新たな血管新生治療戦略の構築を試みた。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。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、その結果として腫瘍とその周辺組織では血管の透過性が亢進し様々な物質が血管外漏出する (**enhanced permeability**)。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に対して集積することを **EPR 効果** と呼んでいる。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。

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してくる。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ことが知られている。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仮説を立てた。

本研究の概要

< 実験 1 >

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いるため、急性下肢虚血モデルにおいて本仮説を検証することとした。ラットの大腿動脈切除モデルを念頭に置いたが、過去の報告からこのモデルでは大腿内側の筋群に側副血行路が形成されることが予想された。大腿動脈のうち、上記筋群より表層にある部分のみを切除し、標的部位の外科侵襲による炎症を可及的に抑制しうる新たな急性下肢虚血モデルを構築した。このモデルにおいて、側副血行路が内腸骨動脈から膝窩動脈の間に形成され、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。すぐ近傍の半腱様筋 (semitendinous muscle; ST) には側副血行路は乏しかった。このモデルにおいて、術後 2 週間の虚血側の足部表層血流は健常側に比べて約 62 %まで低下しており、慢性期においても一定の虚血状態を維持していることが確認できた。

<実験 2 >

実際にナノ製剤が上記の CF, SM に選択的に送達され、集積しうるか否かを評価した。実験に用いるナノ製剤として、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 aniomer もしくは cationomer が結合した block-copolymer を材料として調製される。PIC-nanocarrier は、原料のポリマーが水溶性であること・ポリマーを混合するだけで粒子を自己組織化すること・総ポリマー濃度を変えることで厳密なサイズ調節が可能なこと・PEG 外殻により生体適合性とステルス性に優れること・化学架橋を加えることで生体内安定性を高められることなどさまざまな利点をもつ。過去の研究から、30 nm 径の PIC micelle (PICs-30) と、100 および 200 nm 径の PICsome (PICs-100/-200) を使用して比較することとした。

<実験 1 >で構築した片側急性下肢虚血モデルに、上記 3 種の蛍光標識 PIC-nanocarrier 溶液をそれぞれ尾静脈から全身投与し、投与 24 時間後と 72 時間後において両側の CF・SM・ST を摘出した。摘出した筋肉は In Vivo Imaging System (IVIS®) でその蛍光強度を測定した。PICs-30 はいずれの筋肉・いずれの時点でも蛍光強度に有意な左右差を示さなかった。PICs-100 は投与 24 時間後・72 時間後とも、虚血側の CF および SM で有意な蛍光集積を示した。ST にはどちらの時点でも蛍光強度に有意な左右差を示さなかった。PICs-200 は投与 24 時間後のみ、虚血側の CF および SM で有意な蛍光集積を示した。PICs-100 投与モデルの CF・SM の凍結切片を作成し、 α -SMA で血管平滑筋を蛍光染色した。これにより PIC-nanocarrier の局在と血管との位置関係を、レーザー共焦点顕微鏡を用いて評価した。投与された PIC-nanocarrier は α -SMA 陽性の小動脈周囲の間質に局在していた。同様に CD68 でマクロファージを染色し、貪食細胞との局在関係について評価した。PICs-100 の 16.4 % およびマクロファージの 9.5% のみが共局在を示した。

皮膚切開と動脈の露出のみを行った sham-ope 群も作成し、PICs-100 を投与して同様の

計測を行ったが、いずれの筋肉・いずれの時点でも蛍光強度に有意な左右差はなかった。また一方で、PIC-nanocarrier 非投与の急性下肢虚血モデルを作成して上記の3筋肉を摘出し、凍結切片を作成した。CD68でマクロファージを染色し、各筋肉内の炎症の評価を行った。SM内のCD68染色領域が健常側に比して虚血側で有意に広く、より強い炎症が惹起されていることが確認できた。CFにもその傾向がうかがわれた。その炎症はPIC-nanocarrier投与ではなく側副血行路形成により惹起されたものであることが示唆された。以上から、PIC-nanocarrierの集積は手術侵襲によるものではなく、側副血行路形成に伴う炎症に関連するものと考えられた。

PICs-30が集積しなかった原因としては、粒径が小さいことからretentionにおいてPICs-100/200より不利であり、漏出はしたもののwash outされて拡散してしまった可能性が考えられた。逆にPICs-200はretentionにおいてPICs-100より有利であるはずが、72時間後の有意差が消失してしまっていた。これについては、経時的に炎症が沈静化してenhanced permeabilityの程度が减弱したという仮説が考えられた。PICs-100より粒径の大きなPICs-200はその影響を受けやすく、漏出量が減少しやすいと考えられる。漏出量の減少がretentionにおいての優位性を上回ったため、経時的に集積が弱まった可能性が考えられた。また、マウスでは径150 nm以上のPIC-nanocarrierは脾臓への集積が増加することが知られている。動物種は異なるが、脾臓への集積増加が標的部位への漏出量減少に影響した可能性も考えられた。

<実験3>

薬剤内包PIC-nanocarrierの有効性について検証を行った。血管新生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を候補に挙げた。しかし、これらペプチドは表面に露出しているアミノ酸の違いから部位によって表層電荷が異なるため、安定したPIC micelleを形成しにくいと考えられた。これを解決する手法として、無水マレイン酸の誘導体によるcharge conversion法を用いた。これはペプチド表面に露出する正電荷アミノ酸（主にlysine）のアミノ基に無水マレイン酸の誘導体を結合させることで、同部の電荷を負に変換する手法である。これによりペプチド表面の電荷が全体に負となり、PEGを結合させたblock cationerと混合することでPIC micelleが調製できる。

構造シミュレーションをもとに、安定したPIC micelleを形成しうる物質としてIL-18を選択した。IL-18をcharge conversionすることにより、平均粒径93 nmのPIC micelle（PICs-IL）を調製できた。charge conversionしたIL-18の生理活性を計測したところconversion前の約35%であり、减弱したものの残存していた。このPICs-ILを<実験2>と同様に急性下肢虚血モデルに投与して蛍光強度を評価したが、IVIS®による測定では側副血行路形成部位への蛍光集積は検出できなかった。

PICs-ILが標的部位に送達されなかった可能性、もしくは送達後に崩壊して蛍光が検出できなかった可能性が考えられた。崩壊したPICs-ILのsurrogateとして、内包したIL-18

自体を検出することが考えられる。しかし、IL-18 自体の半減期や charge conversion による表面修飾の影響を考慮すると困難が予想される。IL-18 によって誘導されるサイトカインの定量や、側副血行路形成促進による虚血改善などの間接的な指標を評価する必要があると考えられる。一方で、PICs-IL の血中半減期を測定したところ 11.2 分であり、既報における同等径の PICsome に比べて非常に短かった。PICs-IL と PICsome の化学架橋の違いが両者の血中安定性を左右したものと考えられ、血中安定性の低さが送達不足の一因と考えられる。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-18 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。送達後の粒子の崩壊は、内包薬剤が活性を発揮するために必須のプロセスであり、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。

結語

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-18 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。