

博士論文

スタチン内包高分子ミセルによる
大動脈瘤拡大抑制効果の検討

福原 菜摘

目次

略語集	P6
要旨	P10
序文	
腹部大動脈瘤について	P11
腹部大動脈瘤治療の現状	P13
腹部大動脈瘤の薬物療法	P14
スタチン製剤の効果	P15
Drug Delivery System の構築	P18
高分子ミセル型ドラッグキャリア	P19
スタチン内包高分子ミセルの腹部大動脈瘤治療における可能性	P23
研究の目的	P23
実験 1. ピタバスタチン内包高分子ミセルの合成	
【方法】	
PEG-Poly(L-lysine) Block Copolymer の合成	P24
フェニルボロン酸付加ポリマー(PEG-PLys (FPBA) の合成	P26
Alexa647 蛍光ラベル化スタチン内包高分子ミセルの合成	P28

ピタバスタチン内包高分子ミセルの合成	P28
ピタバスタチン内包高分子ミセルの pH 応答性と薬物内包率	P29
細胞培養	P30
共焦点顕微鏡での SMC への薬剤取り込みの評価	P30
細胞増殖抑制試験	P31
【結果】	
ピタバスタチン内包高分子ミセルの合成	P32
ピタバスタチン内包高分子ミセルの pH 応答性と薬物内包率	P36
蛍光ラベル化ピタバスタチン内包ミセルの細胞内への取り込み	P38
ピタバスタチン内包高分子ミセルの細胞増殖抑制試験	P39
小括	P40
実験 2. 腹部大動脈瘤に対するスタチン内包高分子ミセルの治療効果	
【方法】	
実験動物	P41
エラスターゼ腹部大動脈瘤モデルラットの作成	P41
大動脈瘤拡大抑制効果についての実験プロトコール	P43
腹部大動脈瘤の組織学的評価	P44
Gelatinase 活性	P45

統計学的評価	P46
【結果】	
エラスターゼ腹部大動脈瘤モデルに対するピタバスタチン内包高分子ミセルの治療効果	P47
腹部大動脈瘤の組織学的評価	P50
Gelatinase 活性	P55
小括	P58
実験 3. 腹部大動脈瘤モデルラットにおけるスタチン内包ミセルの体内動態	
【方法】	
放射性同位元素 (^{125}I) 標識ピタバスタチン内包高分子ミセルの作成	P59
^{125}I 標識ピタバスタチン内包高分子ミセルによる体内動態の評価	P59
【結果】	P61
小括	P62
考察	
本研究で得られた知見	P63
ピタバスタチン内包高分子ミセルの動態と効果発現のメカニズム	P63
研究の限界	P67
今後の展望	P70

結論	P71
謝辭	P72
引用文献	P73

略語表

略語	内容
AAA	abdominal aortic aneurysm
ALT	alanine aminotransferase
AST	aspartate aminotransferase
bFGF	basic fibroblast growth factor
BUN	blood urea nitrogen
CK	creatine kinase
Cre	creatinine
CRP	C-reactive protein
DDS	drug delivery system
DMT-MM	4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride n-hydrate
DMSO	dimethyl sulfoxide
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
EPR	enhanced permeation and retention
ET-1	endothelin-1
EVG	elastica van Gieson

FPBA	fluorophenylboronic acid
GPC	gel permeation chromatography
HE	hematoxylin-eosin
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
HPLC	high performance liquid chromatography
IC ₅₀	half maximal (50%) inhibitory concentration
IL-6	interleukin 6
LDL	low-density lipoprotein
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MMP	matrix metalloproteinase
NO	nitric oxide
PBS	phosphate-buffered saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PEG	polyethylene glycol
PS/m	pitavastatin-loaded polymeric micelle
SMC	smooth muscle cell
TFA	trifluoroacetic acid
TG	triglyceride

TNF- α	tumor necrotic factor α
TXA2	thromboxane A2
α SMA	α -smooth muscle actin

スタチン内包高分子ミセルによる大動脈瘤拡大抑制効果の検討

東京大学医学系研究科外科学専攻

指導教員 石原聡一郎教授

福原菜摘

要旨

これまでに腹部大動脈瘤に対しての薬物療法について多くの報告がなされてきたが、いまだ臨床的に有効と言える非侵襲的治療はない。それは大動脈病変で有効な薬物濃度が保たれないためと考えられる。そこで、標的部位への効率的な drug delivery が可能な薬剤内包高分子ミセルを用いて薬剤の治療効果を検討した。抗炎症効果のあるスタチンを内包する高分子ミセルを作成し、ラットの腹部大動脈瘤モデルに投与した。コントロール群と比較してミセル投与群では用量依存的に大動脈瘤拡大抑制効果が認められた。その機序として、大動脈瘤壁への薬剤の集積による炎症の抑制と matrix metalloproteinase 活性の抑制が関与しているものと考えられた。スタチン内包高分子ミセルは腹部大動脈瘤に対して有効な治療法となり得る。

序文

腹部大動脈瘤について

腹部大動脈瘤 (abdominal aortic aneurysm: 以下 AAA) は自覚症状を呈することが少なく、偶発的に診断されることが多い疾患である。有病率は 1.6~7.2 % 程度で年齢の上昇と共に増加する [1, 2]。通常ヒトの腹部大動脈径は 2 cm 程度であるが、1.5 倍である 3 cm を超えて拡大したものを AAA とガイドラインでは定義している [3]。AAA の原因としては、動脈硬化性、遺伝性、炎症性、感染性などがあるが、大部分が動脈硬化性によるものである [4]。動脈硬化により、大動脈壁内腔の粥状硬化に伴う慢性炎症から動脈壁の構造変化が起こり、瘤が形成される [5]。通常 AAA は無症状であるためにその存在は健診または他の疾患の検査の際に偶発的に発見されることが多い。発見に至らぬまま瘤が拡大し続けると、最終的には瘤破裂をきたす。ひとたび破裂をきたせばその致死率は 85 % を超えるため [6]、破裂を起こす前に AAA を発見し治療することが肝要である。

大動脈は、内膜・中膜・外膜の三層構造をとっており、内膜は主に内皮細胞、中膜はエラスチンから構成される弾性板と平滑筋、外膜はコラーゲンなどの結合組織から成る。AAA の組織を見ると、内皮細胞の脱落と中膜弾性板の破壊、細胞外マトリックスの破壊などの構造変化が起きている [7]。動脈硬化がベースにあると考えると、まずは内皮細胞の障害を起点とし、炎症性メディエーターの過

剰産生が起こり、これがマクロファージなどの炎症細胞の遊走や matrix metalloproteinase (MMP) の活性増大を引き起こす[8]。これにより、中膜のエラスチン分解が起こり、動脈壁が脆弱化する。そこに血流や壁応力の変化が加わり、AAA はその瘤径を増大させていくと考えられている (図 1) [9, 10]。

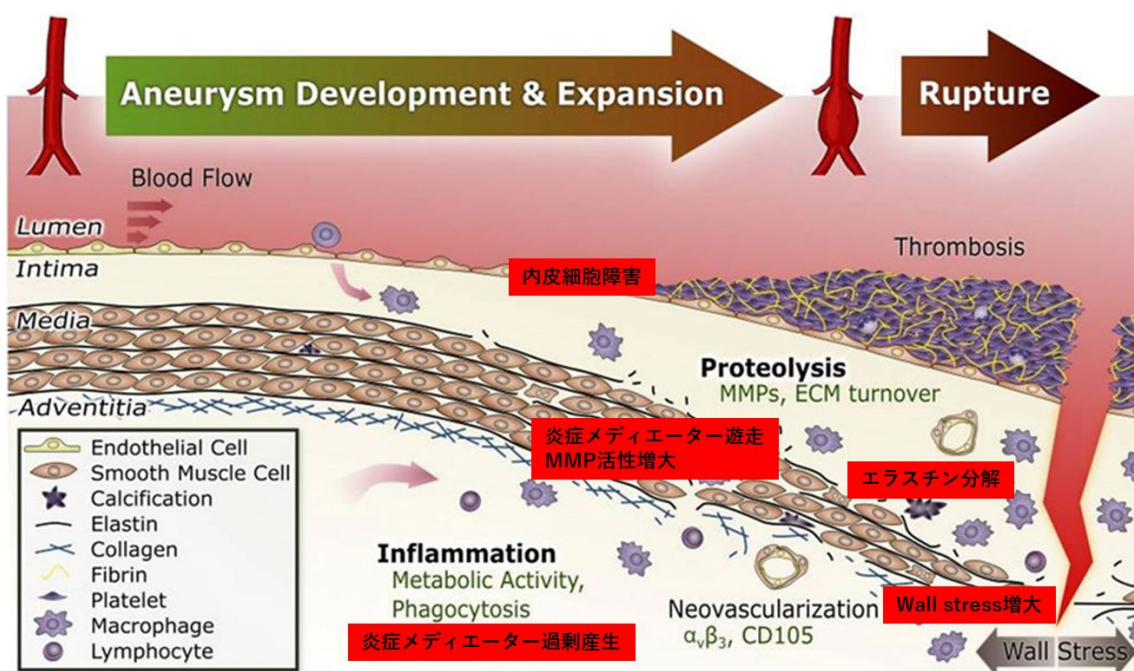


図 1 : AAA 発生と拡張、破裂に至るまでに関わる因子
 内皮細胞障害を起点とした動脈硬化性変化から、AAA 拡張に至るシエーマ。
 (Parmanand S, et al. JACC, 2018 を改変)

瘤径の増大に伴い動脈壁へのストレスが増大し、血行動態や壁応力の変化に伴い、平滑筋細胞の platelet-derived growth factor (PDGF) 受容体活性増大やマクロファージの遊走などを引き起こし、さらなる炎症の増悪をきたす[11, 12]。

中膜平滑筋細胞の減少と外膜のコラーゲン減少から、大動脈壁の強度が失われ、最終的には破裂に至るとされている[13]。

腹部大動脈瘤治療の現状

現在、本邦のガイドラインでは、AAAは破裂リスクの高くなる5.0-5.5 cmの瘤径まで拡大した場合に手術加療が推奨されている[3]。手術は開腹による瘤の人工血管置換術、または血管内治療によるステントグラフト内挿術が行われる。開腹による人工血管置換術は古くからAAAの治療法として確立された手技であり、high volume centerにおいて手術死亡率は約1%と低く、長期的にも合併症の少ない治療である[14]。しかし手術侵襲が高いため、高齢者や並存疾患の多い患者では耐術不能な場合がある。そのような開腹術の欠点をカバーする治療がステントグラフト内挿術であり、近年では数多く行われている。血管内治療は侵襲が少なく、開腹手術がためられる患者に対しても施行可能な場合がある。しかし瘤や正常部分の血管の形状、大動脈壁性状から施行できないこともあり、また術後の瘤再拡大による再手術の率が開腹手術よりも高く、長期成績における瘤関連死も多いというデメリットがある[4]。

これらの治療の欠点を鑑みると理想的な治療は、瘤が小さい時点で発見し、それを薬物で拡大しないようにコントロールすることである。手術加療が考慮さ

れる瘤径となる前の小径瘤に対しては、現段階では有用な瘤拡大抑制が認められた治療法はなく、瘤拡大のリスクファクターである喫煙をやめ、高血圧や糖尿病、脂質異常症など並存疾患のコントロールを行いつつ、慎重な経過観察を続けるにとどまる[15, 16]。また運動リハビリによる抑制効果も示唆されている[17]。薬物による、小径瘤に対する瘤拡大抑制についてはこれまで数々の検討がなされてきた。

腹部大動脈瘤の薬物療法

これまでに AAA に対して瘤拡大抑制効果のある薬剤について、数々の研究が行われてきた。特に β 遮断薬[18]、アンジオテンシン受容体拮抗薬[19]、アンジオテンシン変換酵素阻害薬[20]、抗生剤[21]、スタチン[22]、メトホルミン[23]などは動物実験で瘤拡大抑制効果が示され、臨床応用が期待されたが、現時点では明確な臨床的有用性が示された薬剤はない。 β 遮断薬であるプロプラノロールを用いた前向きランダム化二重盲検試験では、有意な瘤径拡大抑制効果が認められず、プロプラノロール内服群での副作用による脱落例が多かった[24]。アンジオテンシン変換酵素阻害薬は、カプトプリルでの動物実験においてエラスターゼによる AAA の発生を抑制するとの結果が出ている一方で[25]、ヒトに対する投与では AAA の拡大率との有意な関連性は認められなかった[26]。同じく

アンジオテンシン受容体拮抗薬であるロサルタンも、動物モデルでは AAA 形成抑制効果が認められたがヒトに対する臨床試験では有意な効果は認められなかった[27]。ドキシサイクリンは抗生剤であるが、その抗炎症作用を期待されて投与候補となった。しかし動物実験では効果を認めたものの、臨床応用は実現しなかった[28, 29]。

スタチン製剤の効果

最も注目した薬剤として、3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA)還元酵素阻害薬(スタチン)がある。スタチンは、low-density lipoprotein (LDL)-コレステロール低下作用を持つ薬剤として脂質異常症に対して広く使用されている。内因性コレステロール生合成経路において、スタチンは HMG-CoA からメバロン酸に変換する HMG-CoA 変換酵素に拮抗し、コレステロール産生を抑制する。肝細胞内コレステロールの減少により、LDL 受容体活性が促進され、血中から肝細胞内への LDL の取り込みが増加することにより血中 LDL コレステロール値が低下する。

スタチンはコレステロール低下作用以外に抗炎症作用、血管内皮機能改善作用、心保護作用、骨形成促進作用、免疫抑制作用など、多面的な作用を持つことがわかっており[30]、大規模臨床試験でも心血管イベントの発症・進展の予防効

果が示された[31]。多面的効果の発現は、メバロン酸代謝経路における中間代謝産物であるイソプレノイド(ファルネシルピロリン酸、ゲラニルゲラニルピロリン酸)の産生も抑制することが関連していると推測される。イソプレノイドは細胞内シグナル伝達系において重要な役割を果たす低分子量 GTP 結合タンパクである Rho や Rac、Ras の活性化に関与している。動脈硬化と炎症においては Rho や Rac、Ras は悪影響を及ぼすが、これらの活性化を抑制することにより循環器系への作用が発現する。特に心血管イベントの抑制に関連していると思われるものとして、主に以下の作用が報告されている (図 2) [32]。

- 血管の抗炎症作用：動脈硬化をきたした血管壁の障害された血管内皮細胞への炎症細胞(単球、マクロファージ等)の接着・浸潤を抑制する。
- 抗血栓作用：アラキドン酸カスケードに作用し TXA2 (thromboxane A2) を抑制し、prostacyclin 産生を促進する。また線溶系を活性化する。
- プラークの安定化：プラークの不安定化を促進するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) などのプロテアーゼ活性を低下させ、プラーク内のコラーゲン集積を増加させてプラークを安定化させる。
- 抗酸化作用：酸化 LDL を減少させ、またフリーラジカルを抑制する。

- ・平滑筋細胞増殖抑制：PDGF および bFGF (basic fibroblast growth factor) に抑制的に働き、一酸化窒素合成酵素を誘導し血管拡張作用をもたらす。
- ・血管内皮細胞の機能改善：血管内皮細胞の一酸化窒素合成酵素の発現が増加し、一酸化窒素 (NO) の産生増加により血管を弛緩させる。また内皮由来の血管収縮因子であり血管障害や動脈硬化促進に働く endothelin-1 (ET-1) や monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) の産生を抑制する。

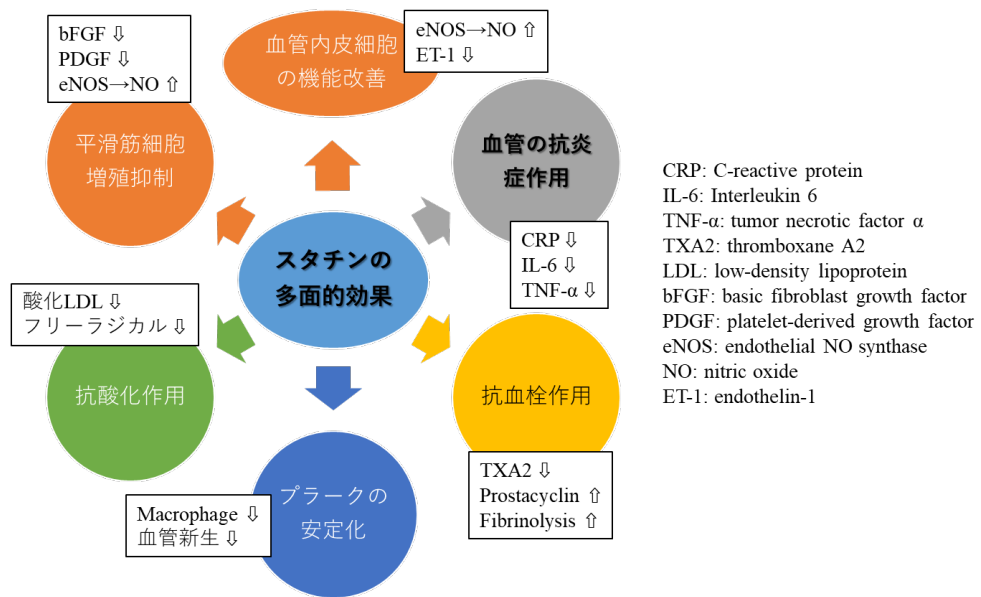


図 2：スタチンの多面的効果

炎症性メディエーターやサイトカインを介して血管に対して多面的な効果をもたらす。

以上のような多面的効果からスタチンに関しても AAA 拡大抑制効果を期待されたが、前述のような動物実験における AAA 抑制効果は示されているものの [22, 33]、臨床において明確に効果があったとする報告はない[34]。

Drug Delivery System の構築

過去の研究において臨床応用が現実化しなかった原因として、薬剤用量の問題がある。動物実験で使用する量を人間の体重に換算すると、過剰量となってしまう。そのため、実際の臨床で使用されている人に対する安全域を考慮した用量を使用するとその効果に限界があるのであろう [29]。それ故に、投与する薬物を物理的、化学的あるいは生物学的手法を用い、本来の薬効を損なうことのないよう適度に修飾し、薬物が標的の疾患部位において十分に効果を発現し、有効性および安全性を両立させる新しい治療戦略の構築が求められている [35]。

このような観点から考え出された概念が、薬物を「必要なときに、必要な場所で、必要な量だけ効率よく作用させる」Drug Delivery System (DDS) である。DDS では、薬物の体内での行き先（体内動態）をコントロールし、薬物本来の効能を最大限高めることで薬物投与の最適化を目指している。特に高薬理活性物質の場合では、非標的組織へ運ばれた薬物が副作用を誘発させ多大な障害を与えてしまう可能性がある。そのため、目的とする疾患組織のみへ薬物を送達する

ことが必須である。このようなアプローチを達成するためには、疾患部位への薬物の運び手（キャリア）が必要となる。薬物キャリアとして、近年では高分子化合物やそれらの会合体を利用するという手法が用いられている[36]。

高分子ミセル型ドラッグキャリア

全身投与による薬物治療では、標的とする疾患部位に薬物キャリアが到達するまでに様々な障壁がある。主として、血液中の血漿タンパク質との相互作用による失活があるほか、サイズが約 100 nm 以上のものは肝臓や脾臓に存在する細網内皮系に取り込まれ易く、逆に 4 nm 以下では腎糸球体により尿中へ濾過される[36]。これらの障壁を乗り越えるためには、生体適合性高分子で構成された数十 nm サイズの DDS キャリアが必要となる。このような概念のもとに、高分子ミセル型ドラッグキャリアの医療への応用が盛んに研究されてきた。

親水性セグメントと薬物を担持する役割を持つ機能性セグメントから成るブロック共重合体は、水溶液中において疎水性相互作用、静電相互作用、或いは金属錯体形成反応に基づき機能性セグメントが凝集することで内核（コア）を構成し、同時に親水性セグメントが互いの排除体積効果により立体反発することで外殻を構成するコア - シェル構造の高分子ミセル（図 3）を形成する[37]。高分子ミセル内核には、静電相互作用や疎水性相互作用により薬物を物理的に封入

することが可能であり、また内核を構成する機能性セグメントには薬物を直接化学結合によって導入することも可能である。従って、単体では薬物として投与できないような疎水性の医薬品をはじめ、蛋白質や DNA をも高分子ミセル内核に封入することが可能となる。一方、高分子ミセル外殻を構成する親水性セグメントとしてはポリエチレングリコール (PEG) が一般的に使われる。PEG は両親媒性、無電荷、非抗原性、低蓄積性および低毒性など優れた生体適合性を持つポリマーであり、既に PEG に薬物を化学的に導入した様々な医薬品が開発され、臨床において優れた効果を示している [38]。高分子ミセルに内包された薬物は、この PEG 鎖に覆われているために、生体成分との相互作用による失活や代謝反応を回避することが可能であり (ステルス性)、生体内において長期間安定に存在することが見込まれる。これにより、疾患をターゲティングする場合には、長期間血中を循環しながら、疾患部位へ集積していくことで、高い薬効を発揮することができるものと期待される (図 4)。

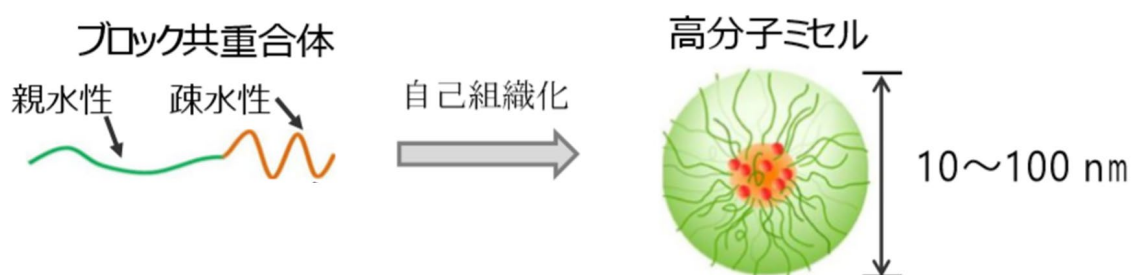


図 3 : 高分子ミセルの組成

両親媒性のブロック共重合体を自己組織化させ、内側に疎水性セグメント、外側に親水性セグメントを有する。疎水性薬剤は内部に物理封入される。

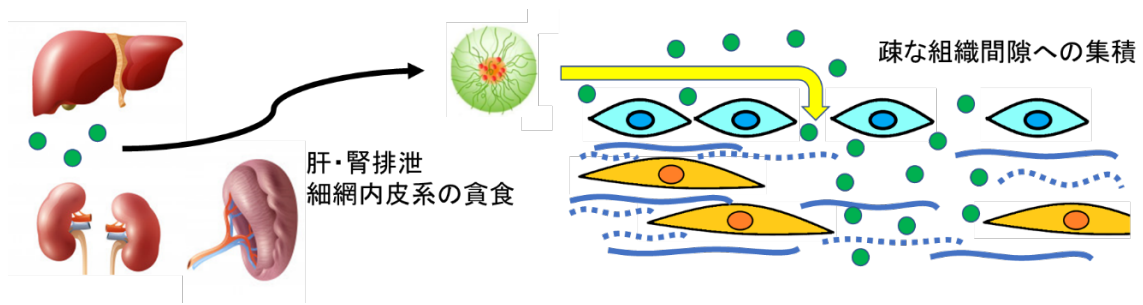


図4：標的組織へのミセル粒子の集積

数十 nm の粒子径 PEG シェルを持つミセルは肝臓・腎臓での排泄や細網内皮系のトラップを潜り抜けて血中に滞留し、血管内から標的組織へと拡散する。

これまでにシスプラチンやダッハプラチン、ドキシソルビシンといった薬剤を内包するナノ粒子により、副作用を低減し治療効果が増大したという報告がなされている [39, 40]。しかし、DDS の先行研究では主に悪性腫瘍に対する治療としてのナノ粒子の応用についての報告が多く [41, 42]、AAA といった血管疾患への応用についての検討は少ない。しかし、AAA では血管壁の構造変化と、悪性腫瘍と類似した血行動態の特徴を持つことから、高分子ミセルによってより効率的な Drug Delivery が可能となると考えた。

AAA に対する DDS の先行研究として、白須らはラパマイシン内包ナノミセルの大動脈瘤壁への集積と、それによる AAA 拡大抑制効果の増大を報告している [43]。その中で、ミセルの瘤への選択的な集積と瘤組織中のミセルの長期滞留性を認めた。特に、瘤壁の中膜、外膜へのミセルの局在が報告されている。大動脈瘤壁では先述のとおり内膜の脱落に中膜弾性板の破壊と消失、外膜におけるコラー

ゲンの変性と密度の低下が起こっており、そのような疎な組織間隙にミセル粒子が大動脈瘤内の血流から壁内に直接侵入する。また、ミセルの瘤壁への滞留については enhanced permeation and retention effect (EPR 効果) に類似する受動的な集積と炎症性細胞への直接的な集積が認められる。EPR 効果は腫瘍組織に選択的に高分子が集積するメカニズムと考えられているものであり、正常組織に比べて血管透過性が亢進している腫瘍組織において、高分子が血管外に流出しやすく、またリンパ系が発達していないために腫瘍組織に到達した物質が蓄積されやすい、といった特性である。動脈瘤壁においても、血管新生とリンパ管新生が起こっており、慢性炎症による血管透過性の亢進とリンパうっ滞が生じていることが報告されている [44]。そこから、腫瘍組織内と同じく動脈瘤壁においても EPR 効果と類似した機序でミセル粒子が壁組織内に滞留しているものと考えた。瘤壁のマクロファージへのミセルの直接的な取り込みも確認されており、組織間隙に侵入したミセルがそのまま周囲の炎症細胞へと取り込まれて薬効が発揮されている [43]。この先行研究の時点ではスタチンの内包は成功しておらず、ラパマイシンのみが内包薬物として選択肢にあがっていた。その後、フェニルボロン酸とジオール基などを有する化合物が pH 変化によって解離する可逆的な結合を形成する性質を利用することによって、本研究にて初めてストロングスタチンであるピタバスタチンをミセルに内包することに成功し、白須

らの研究から発展してスタチン内包ミセルの AAA に対する治療効果について検討することとした。

スタチン内包高分子ミセルの腹部大動脈瘤治療における可能性

スタチンは前述のように抗炎症効果やプラーク安定化作用があるが、大動脈への効果についての報告は少ない。根本らは、多量アテローム血栓を有する大動脈に対してスタチンを使用した群の血栓量を測定した[45]。その結果、高力価のストロングスタチン群において、有意に血栓量が減少しプラーク抑制が示唆されていた。この結果はスタチンの DDS への使用を考慮した一つの理由であった。

研究の目的

心血管保護作用を持つピタバスタチンを導入した新たな高分子ならびにナノメディシンを創製し、全身投与系による AAA に対する非侵襲的治療法を開発する。

実験 1. スタチン内包高分子ミセルの合成

【方法】

PEG-Poly(L-lysine) Block Copolymer の合成

PEG-b-poly(L-lysine) (PEG-PLys)は既報の方法で合成した[46]。Lys(TFA)-NCA (Chuo Kaseihin Co. Inc., Tokyo, Japan)は、重合開始剤としてジメチルスルフォキシド(DMSO) (Nacalai Tesque Inc., Tokyo, Japan)に溶解した MeO-PEG-NH₂ (NOF corporation, Tokyo, Japan)と混和し、25 °Cアルゴン下で3日間攪拌した。重合溶液を大過剰量のジエチルエーテル(Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan)に滴下し、PEG-poly(ε-trifluoro acetyl-L-lysine) PEG-PLys(TFA)を白色粉末として得た。¹H NMR スペクトルは AVANCEIII 400 instrument (Bruker, Billerica, MA, USA)にて *d*-DMSO を用いて計測した。ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)は、TSKgel super AW3000 と AW4000 (Tosoh Corporation, Tokyo, Japan)を用い、LiBr/NMB(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) (50 mM)を移動相として HPLC システム(JASCO, Tokyo, Japan)にて流速 0.3 mL/min、40 °Cの条件で行った。生成ポリマーの M_w/M_n は 1.12 であった。PEG-PLys(TFA)の TFA 基はメタノール(Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan)/5M 水酸化ナトリウム (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka,

Japan) 水溶液[4:1(v/v)]内にて室温で脱保護した。一晩の反応後、混合液を 5 mM 塩酸(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)溶液と脱イオン化水にて透析精製し、その後、凍結乾燥によって白色粉末として PEG-PLys を得た。¹H NMR スペクトルは D₂O を用いて AVANCEIII 400 にて計測した。Lys ユニットの重合度は、ブチレンプロトン(PLys の側鎖)とオキシエチレンプロトン(PEG 主鎖)のピーク比から 45 と算出された(図 5)。PEG-PLys の M_w/M_n は GPC にて計測した。Superdex Increase 200 10/300GL, eluent: 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) with 500 mM NaCl, flow rate: 0.5 mL/min, detector: UV-vis (absorbance = 220 nm)

PEG-PLys (TFA)

¹H NMR (*d*₆-DMSO at 25 °C): δ 3.4-3.7 (1090H, -CH2CH2O-), δ 1.2-2.0 (252H, -CH2CH2CH2CH₂NHCOCF₃), δ 3.0-3.2 (84H, -CH2NHCOCF₃), δ 3.8-4.0 (42H, -COCHNH-).

PEG-PLys

¹H NMR (D₂O at 25 °C): δ 3.5-3.9 (1090H, -CH2CH2O-), δ 1.3-2.0 (252H, -CH2CH2CH2CH₂NH₃), δ 2.8-3.0 (84H, -CH₂CH2NH₃), δ 4.2-4.4 (42H, -COCHNH-).

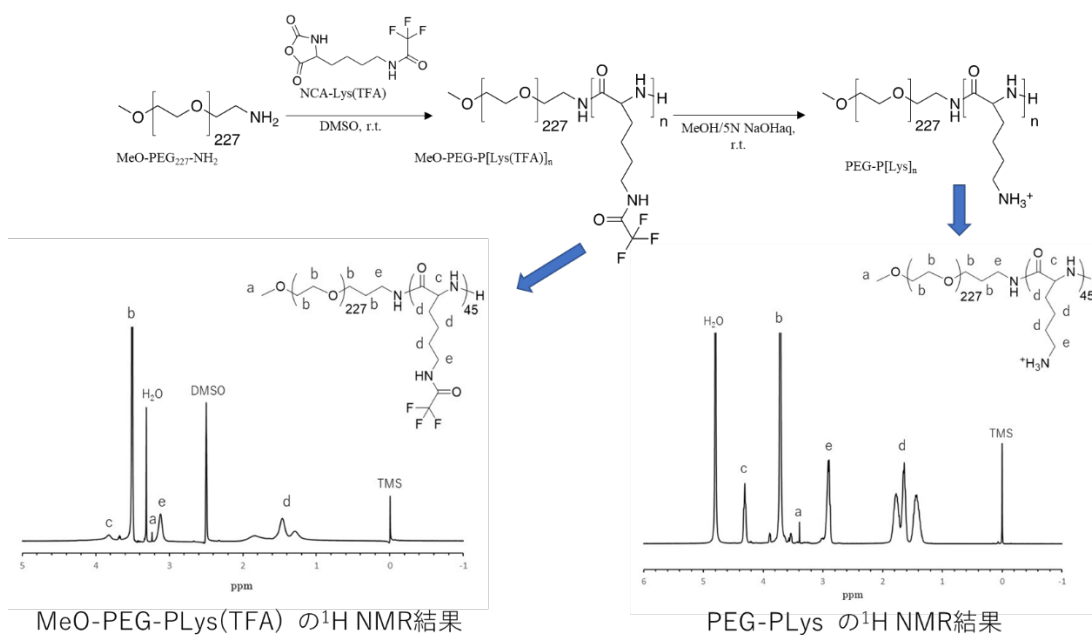


図5：PEG-Poly(L-lysine) Block Copolymer の合成
 アミノ酸部位の重合度は45であり、脱保護は定量的に行われた。

フェニルボロン酸付加ポリマー(PEG-PLys(FPBA))の合成

フェニルボロン酸(FPBA)のPEG-PLys側鎖への結合は、DMT-MM(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)を濃縮試薬として50 mM重炭酸ナトリウム(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan)と25 mg/mL D-ソルビトール(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan)溶液を含むメタノール(Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan)内で行った。一晩の反応後、混合物は5 mMの水酸化ナトリウムと純水にて透析による精製を行い、凍結乾燥してPEG-PLys(FPBA)を得た(図6)。ポリマー内のFPBA導入率は、D₂O含有D-sorbitol内¹H NMRにより測定したPLys側鎖内のプロピレンプロトンとFPBA

プロトンの比率から 40 %と算出した。得られたポリマーの GPC 分析は、以下の条件で実施した。Superdex Increase 200 10/300GL, eluent: 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) with NaCl (500 mM) and d-sorbitol (500 mM), flow rate: 0.75 mL/min, detector: UV-vis (absorbance = 220 nm)

^1H NMR (D_2O with 5 mg/mL of D-sorbitol at 25°C): δ 1.2–2.0 (252H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCF}_3$), δ 2.8–3.0 (84H, $-\text{CH}_2\text{NHCOCF}_3$), δ 7.2–7.7 (72H, $-\text{C}_6\text{H}_3\text{FB}(\text{OH})_2$).

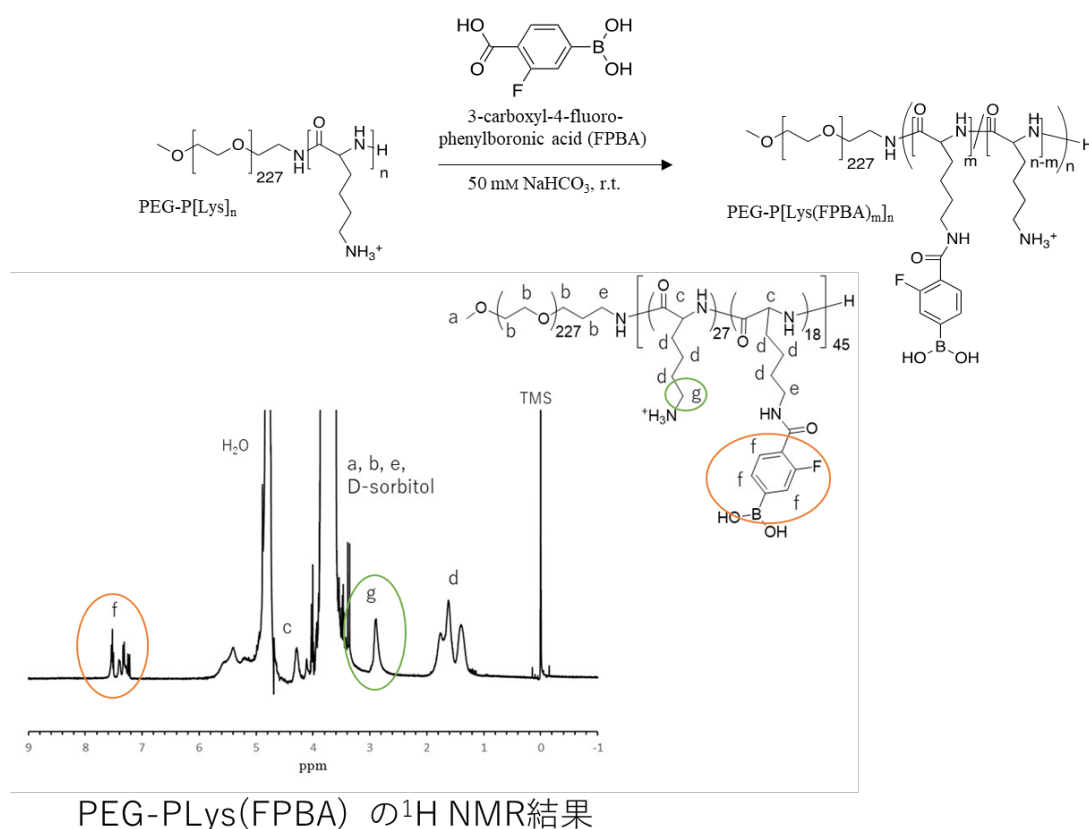


図6：フェニルボロン酸付加ポリマーの合成
f と g のピークの比によりフェニルボロン酸の側鎖への導入数は 18 と考えられた。

Alexa647 蛍光ラベル化スタチン内包高分子ミセルの合成

Alexa647 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) と PEG-PLys (FPBA) を 50 mM の重炭酸ナトリウム (pH 8.5) と混合し、一晩ラベル化した。混合物を純水にて透析膜 (MWC0: 6-8000) による粗精製を行った。凍結乾燥後、得られた溶液を 1 M の塩化ナトリウム (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) と 500 mM の D-ソルビトール水溶液に溶解し、PD-10 column (MWC0: 6-8000) を用いてさらに精製、凍結乾燥した。

ピタバスタチン内包高分子ミセルの合成

ピタバスタチン (FUJIFILM Wako Chemicals corporation, Tokyo, Japan) / テトラヒドロフラン溶液 (130 mM, 3.0 mL) を FPBA/PBS (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 溶液 (0.60 mM, 30 mL) に滴下し、10 分間攪拌した。混合液は限外濾過 (MWC0: 10 kDa, Millipore, Burlington, MA, USA) にて精製した。均一なミセルを得るため、スタチンミセルの溶液を microfluidic mixer (NanoAssemblr, Precision Nanosystems Inc, Vancouver, BC, Canada) に通した。ピタバスタチン溶液 (13 mM, 100 μ L) を Alexa647 ラベル化 PEG-PLys (FPBA) の PBS 溶液 (0.06 mM, 900 μ L) と 10 分間混和して Alexa647 ラベル化ピタバスタチンミセルを合成し、前述の方法で Alexa647 ラベル化ピタバスタ

チンミセルを精製した。ミセルの径は zetasizer を用いた動的光散乱法にて測定した。

ピタバスタチン内包高分子ミセルの pH 応答性と薬物内包率

ピタバスタチン内包高分子ミセル(PS/m)の薬剤リリースに関しては、次の方法にて確認した。

作製した PS/m (1.0 mg/ml) を MWC0 3.5k の透析膜内へ封入し、37 °C、pH 7.4, 6.0, 5.0 のバッファーおよび 1 % Tween20 を用いて 48 時間透析した。その後、TSKgel ODS-100Z カラムを用いた分析を HPLC にて実施した。薬剤内包率は、ピタバスタチンのピーク面積から算出した。

HPLC 条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長 245 nm）

カラム温度：40 °C

移動相：グラジエント法

0.01 mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液/アセトニトリル (60:40) - 20 min

0.01 mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液/アセトニトリル (60:40) → (10:90)

- 20 min

0.01 mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液/アセトニトリル (10:90) - 20 min

流速 : 1.0 ml/min

細胞培養

Smooth muscle cell (SMC) は 1 % ピタバスタチン添加 Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 (Promo Cell, Heidelberg, Germany) 内で 37 °C、5 %CO₂ 加湿気内で培養した。

共焦点顕微鏡での SMC への薬剤取り込みの評価

SMC (5.0x10⁴ cells/dish) をコラーゲン I コーティングの 35 mm ガラスディッシュにて 48 時間培養した。細胞を PBS にて洗浄し、1 mL の Alexa647 ラベル化ピタバスタチン内包ミセル (ピタバスタチン : 0.125 mg/mL) 内にて 24 時間培養した。細胞を PBS にて洗浄した後、Lyso Tracker Green にて後期エンドソーム/リソソームを染色した。さらに 30 分常温放置した後、PBS で洗浄し、16.2 μM の Hoechst 33342 溶液で 3 分間、核を染色した。PBS で洗浄した後、新たな PBS 内で LSM710 を用いて観察した。Alexa647、LysoTracker Green、Hoechst 33342 はそれぞれレーザー光 633、561、405 nm を使用した。

細胞増殖抑制試験

細胞増殖抑制試験は SMC に対して Cell Counting Kit 8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて行った。SMC をコラーゲン I コーティングした 96 ウェルプレートで 2×10^3 cell/well の濃度で 48 時間培養した。スタチン(ピタバスタチン:10 mM) を DMSO に溶解した溶液をコントロールとした。コントロールと PS/m 溶液を、それぞれ様々な濃度で細胞培地に添加し、48 時間の培養の後にウェルを PBS で洗浄し、新しい培地 (100 μ L) に Cell Counting Kit 8 (10 μ L) を加え、1 時間インキュベーションした。マイクロプレートリーダー (iMark, BIO-RAD, Hercules, CA, USA) にて 450 nm の吸光度を測定し、細胞の生存率を算出した。なお、DMSO の濃度は全試験溶液の 1% 以下となるように調整しており、この濃度で DMSO は細胞増殖に影響を及ぼさないことを確認している。

【結果】

ピタバスタチン内包高分子ミセルの合成

PS/m は水中での自己会合によって形成した。この工程で、ポリマーの側鎖のフェニルボロン酸とスタチンの水酸基との間に共有結合が形成され、これらのポリマーの自己組織化によりミセルが形成された(図7)。

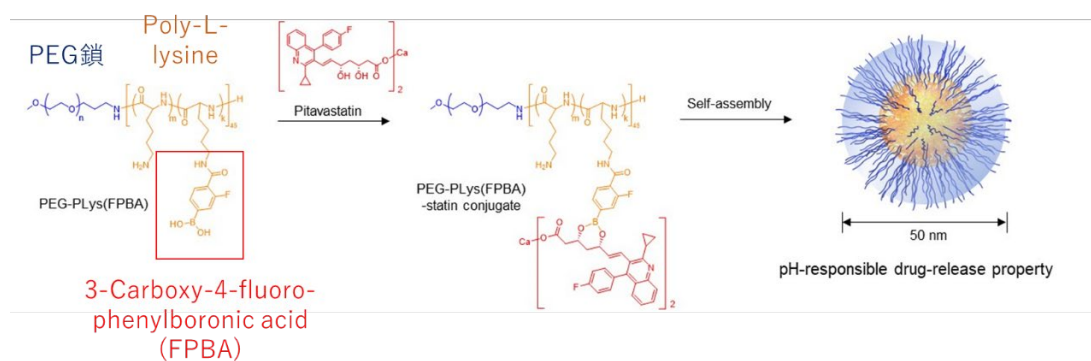


図7：ミセルの形成過程

PEG-PLys (FPBA) の側鎖にピタバスタチンが結合し、自己組織化して形成された PS/m は約 50 nm の大きさであった。

ピタバスタチンとフェニルボロン酸との化学結合形成については、ホウ素 NMR によって新たなピークを形成していることから確認した (図 8) [47]。すなわち、ピタバスタチンとフェニルボロン酸との化学結合形成は pH 7.4 では安定であることが確認された。

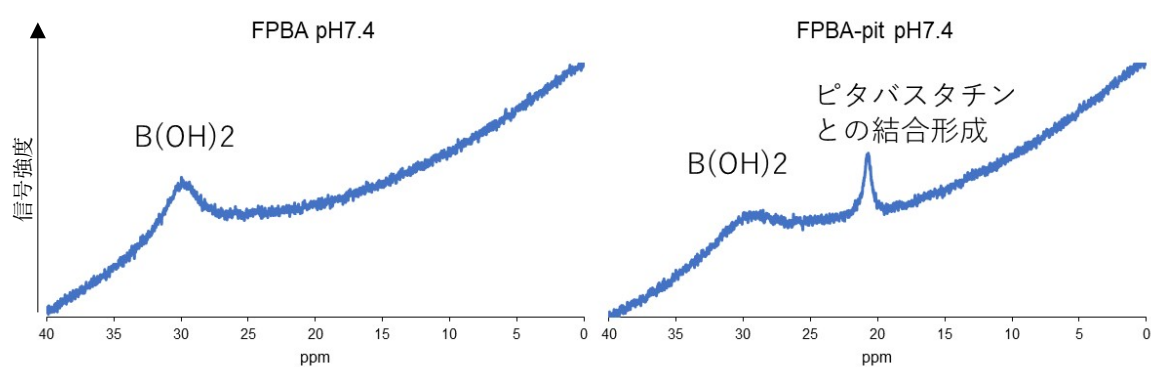


図 8 : ホウ素 NMR による分析

pH 7.4 の同条件下で認められた新しいピークにより、ピタバスタチンとの結合形成が確認された。

動的光散乱法にて測定したミセル径は約 50 nm であり、多分散指数は 0.12 であった(図 9)。

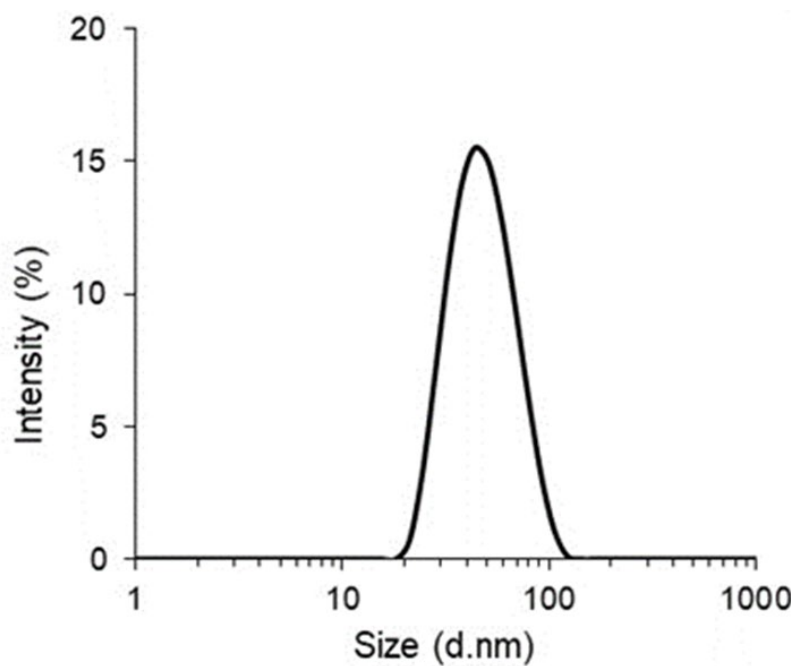


図 9 : PS/m の動的光散乱測定結果

10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中、ピタバスタチン濃度: 0.5 mg/mL、25 °Cにて測定。

PS/m は生理学的環境下(150 mM NaCl を含む pH 7.4 のリン酸緩衝溶液中、37 °C)での 24 時間の安定性が確認され(図 10)、血中でミセル構造が保持されていることが示唆された。

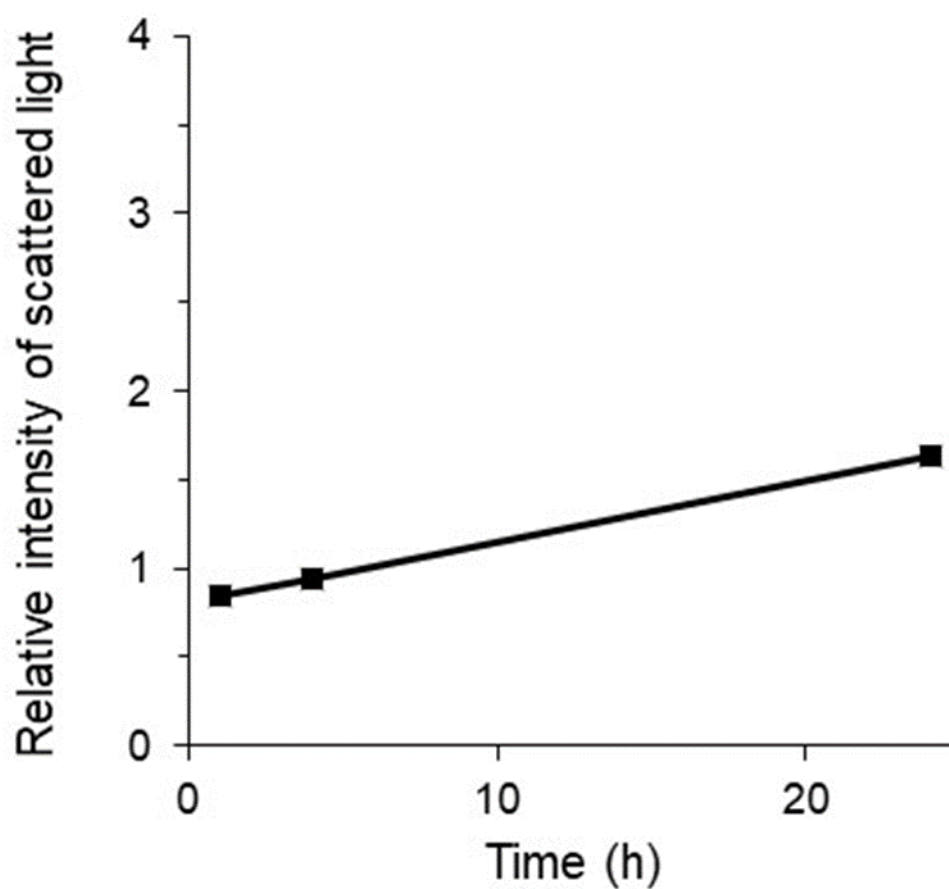


図 10 : PS/m の経時安定性測定結果
生理学的環境下で PS/m の散乱光強度は 24 時間後でも安定している。

ピタバスタチン内包高分子ミセルの pH 応答性と薬物内包率

得られたデータの代表例を図 1 1 に示す。ここでは 16.4 min のピタバスタチン由来のピークに加え、13.5 min, 14.7 min, 17.8 min にある原薬由来のエピ[°]体、5-ケト体、ラクトン体などの類縁体のピークが確認されたが、本実験では全てピタバスタチンのピークとして計算し、薬剤内包率を算出した(表 1)。pH の低下に伴い薬剤残存率が低下していることから、薬剤放出が増加していると考えられた。

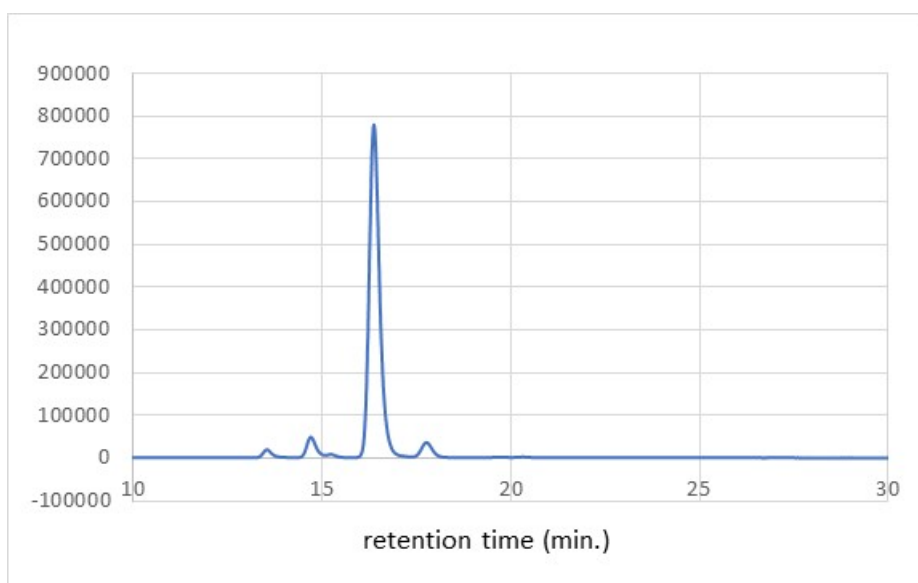


図 1 1 : PS/m からのピタバスタチンリリースに関する代表的な HPLC 結果
16.4 min にピタバスタチン由来のピークを認める。

pH	薬剤残存率
pH 7.4	83 %
pH 6.0	33 %
pH 5.0	20 %

表 1 : pH 応答リリース後の薬剤残存率

pH の低下と共に薬剤残存率が低下しており、薬剤放出が増加していると判断される。

蛍光ラベル化ピタバスタチン内包ミセルの細胞内への取り込み

蛍光ラベル化ピタバスタチン内包ミセルを用いた共焦点顕微鏡による分析では、24時間の培養後、ピタバスタチンミセル(赤)がSMCの細胞質内に取り込まれ、一部でリソソーム(緑)との共局在(黄)が確認された(図12)。

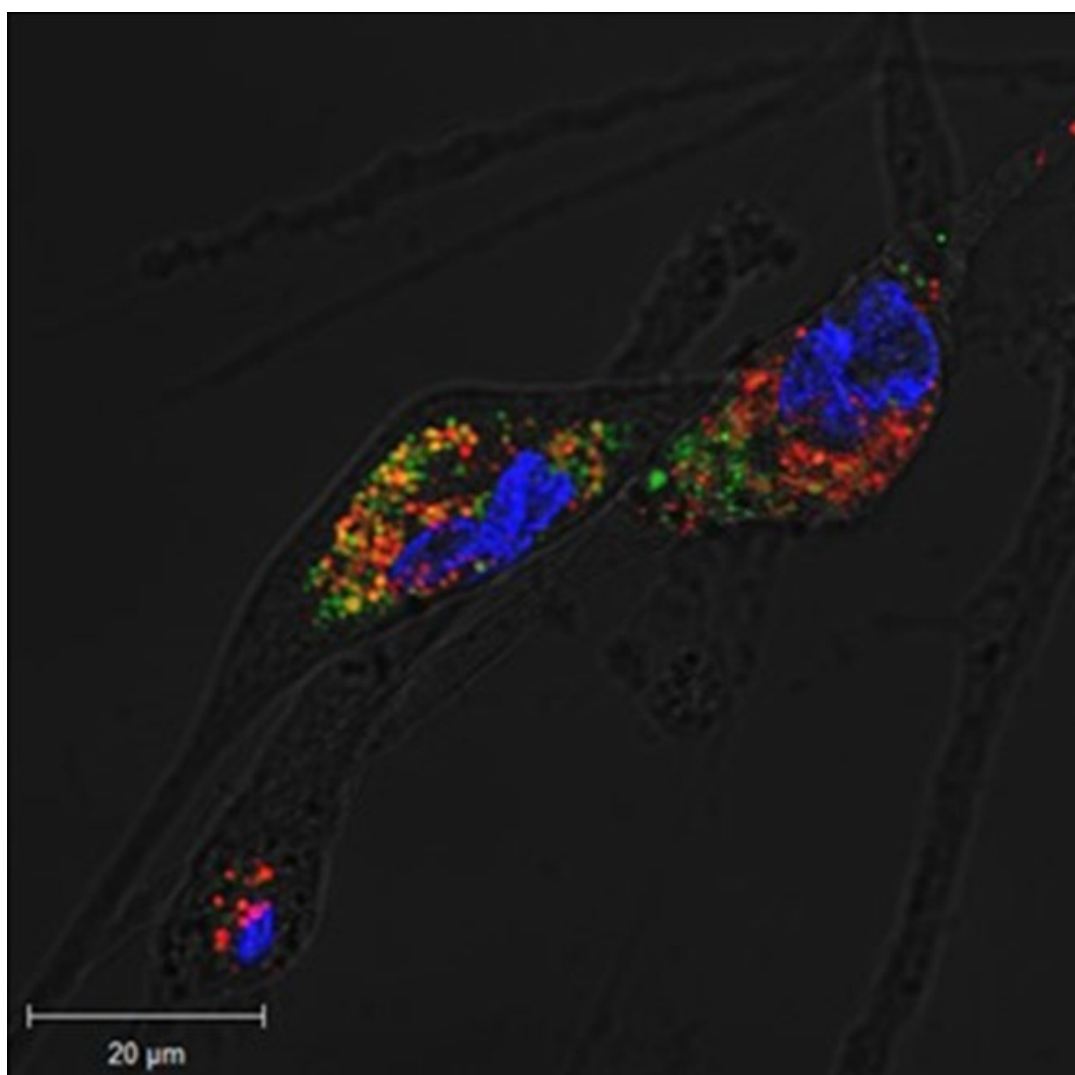


図12 : SMC細胞質内への蛍光ラベル化ピタバスタチン内包ミセルの取り込み
緑はリソソーム、青は核、赤は蛍光ラベル化ピタバスタチン内包ミセル。ミセルとリソソームとの共在箇所は黄。

ピタバスタチン内包高分子ミセルの細胞増殖抑制試験

PS/m と free ピタバスタチンの half maximal (50%) inhibitory concentration (IC_{50}) を比較すると、PS/m の IC_{50} 値は free ピタバスタチンの約 30 倍低く、薬理活性の向上によるものと考えられた(表 2)。

	Free pitavastatin	PS/m
IC_{50} (μM)	8.71	0.26

表 2 : SMC における free ピタバスタチンと PS/m の IC_{50} 値

小括

- ・酸性度によってピタバスタチンを放出することが可能な、フェニルボロン酸を導入した高分子ミセルの合成を行った。

- ・PS/m の径は 50nm で、生理学的条件下では 24 時間安定である。

- ・PS/m は pH の低下と共に薬剤放出が増加する。

- ・蛍光ラベル化ピタバスタチン内包ミセルを用いた共焦点顕微鏡による分析では、PS/m が平滑筋細胞の細胞質内に取り込まれ、一部でリソソームとの共局在が確認された。

- ・細胞増殖抑制試験の結果より、ミセル化によってピタバスタチンの活性が約 30 倍高くなることが示された。

実験 2. 腹部大動脈瘤に対するスタチン内包ミセルの治療効果

【方法】

実験動物

全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及び東京大学動物実験実施マニュアルに基づき実施した。(承認番号：M-P18-115)

ラットは 250-400 g の Sprague-Dawley ラット (specific pathogen free/virus antibody free) を使用した。東京実験動物株式会社から購入し、1 週間以上飼育した後に実験した。飼育は恒温環境 (22±1 °C) で 12 時間の明暗周期で管理した。通常の餌と水を与え、自由摂取とした。

エラスターゼ腹部大動脈瘤モデルラットの作成

エラスターゼ腹部大動脈瘤モデルラットの作成は、Anidjar と Dobrin の示す通りに行った [48, 49]。手術はイソフルランによる全身麻酔下に行った。腹部正中切開をし、腸管を右側腹部に圧排して後腹膜を露出・切開して腎動脈下腹部大動脈に到達した。大動脈を分岐部まで周囲組織から剥離し、腰動脈など分枝動脈はすべて結紮した。次に鼠径部を切開し、大腿動脈を露出した。大腿動脈から PE-10 チューブを挿入し、腎動脈下大動脈まで先端を進めた。大動脈分岐部とチュ

ーブ先端より中枢の大動脈を絹糸にて一時的に結紮して血流を遮断し、PE-10 チューブから大動脈内に 10 単位/mL のブタ腭エラスターゼ (SLBV9311, Type I ;Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) をマイクロシリンジポンプにて 0.9 時間持続注入した。エラスターゼ注入後、大動脈の結紮を解き、PE-10 チューブを除去して閉創し、モデル作成した (図 1 3)。

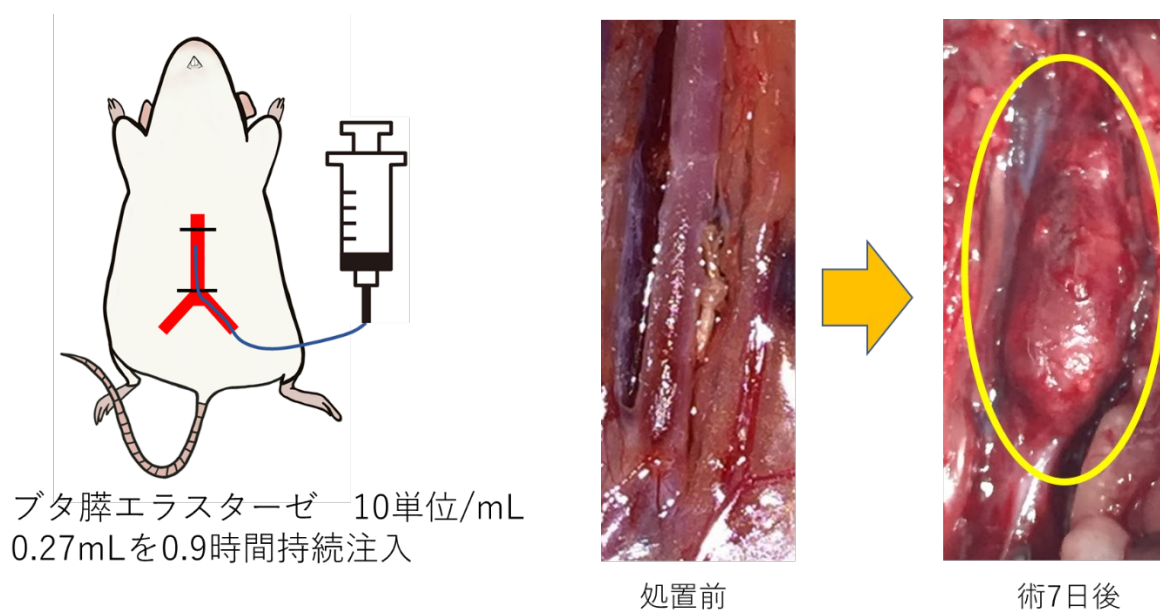


図 1 3 : エラスターゼ腹部大動脈瘤モデルの作成

大腿動脈より大動脈まで誘導したチューブから中枢と末梢を結紮した大動脈内にブタ腭エラスターゼを注入する。写真はラットの腹部大動脈。エラスターゼを注入した部分が術 7 日後には瘤化する (黄丸)。

大動脈瘤拡大抑制効果についての実験プロトコール

マイクロキャリパーにてエラストラーゼ注入前後の腹部大動脈径を測定した。ラットは無作為に以下の4群に割り付けた。i) 1 mL/kg PBS 投与(コントロール)群(n=7)、ii) 2 mg/kg PS/m 投与群(n=7)、iii) 5 mg/kg PS/m 投与群(n=7)、iv) 10 mg/kg PS/m 投与群(n=8)。それぞれPS/mの濃度は5 mg/mLとした。手術終了直後と術2日後、4日後、6日後にそれぞれの薬剤を尾静脈より投与した。術7日後に全身麻酔下に腹部大動脈を露出し、径を測定した後に心臓より採血を行い、生化学検査としてAST (aspartate aminotransferase)、ALT (alanine aminotransferase)、BUN (blood urea nitrogen)、Cre (creatinine)、CK (creatine kinase)、TG (triglyceride)、LDL-C (low-density lipoprotein cholesterol)を測定した(図14)。胸腔内で下大静脈を切離し、左心室より生理食塩水を流して放血した後、4%リン酸パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液にて120 mmHgで灌流固定した。腹部大動脈を摘出し、同液にて24時間固定した後、検体をパラフィンに包埋した。



図14：実験スケジュール

Day0でモデル作成し、day0モデル作成直後、day2, day4, day6でそれぞれ割り付けた薬剤を投与、day7でsacrificeし検体を採取した。

腹部大動脈瘤の組織学的評価

前項にてパラフィンに包埋した大動脈検体の瘤形成部分を短軸方向に $4 \mu\text{m}$ の厚さで切り出し、hematoxylin-eosin(HE)染色と elastica van Gieson(EVG)染色を行った。免疫染色は、 α SMA と CD68 に対してヒストファイン SAB-P0 キット (Nichirei, Tokyo, Japan) を用いて streptavidin-biotin complex peroxidase method にて行った。脱パラフィン処理の後、オートクレーブ法にて抗原賦活化し、内因性ペルオキシダーゼブロックと非特異的染色ブロックを行った。一次抗体として抗 α SMA モノクローナル抗体(1:1000; ab5694, Abcam, Cambridge, MA, USA)と抗CD68モノクローナル抗体(1:1000; ab31630, Abcam, Cambridge, MA, USA)を添加して 4°C で一晩反応させた。ビオチン標識化した二

次抗体により視覚化した後に hematoxylin にて核染色を行い、脱水、透徹、封入した。

それぞれの切片は 400 倍で撮像し、HE 染色においては細胞数/撮像範囲内検体面積、 α SMA においては α SMA 陽性領域面積/中膜領域面積、CD68 においては CD68 陽性細胞数/撮像範囲内検体面積を計測した。各群でランダムに選択した 25 画像について計測し平均値を求めた。データは one-way analysis of variance にて分析し、 $P < 0.05$ を有意とした。

Gelatinase 活性

ラットは無作為に PBS 投与群 (n=5) と 5 mg/kg PS/m 投与群 (n=5) の 2 群に分け、すべてのラットでエラストラーゼ腹部大動脈瘤モデルを作成した。前述の実験プロトコールに従い、術直後、術 2, 4, 6 日後の計 4 回、PBS または PS/m を尾静脈から投与した。術 7 日後に形成された AAA を摘出し、200 μ L の passive lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA) を加えてマルチビーズショッカー (Yasui Kikai Co., Osaka, Japan) にてホモジナイズした (2500 rpm、30 秒、2 回)。遠心分離 (4 $^{\circ}$ C、3000 rpm、5 分間) を行い、上清を回収した。Gelatinase の活性を見るため、gelatin zymography kit (AK47, Primary Cell Co, Sapporo, Japan) を用いてザイモグラフィーを行った。5 μ g のタンパクを含むライセートを SDS-

PAGEにより電気泳動した。SDS-PAGE gelはincubation bufferにて37℃、40時間インキュベートした。マーカーはMMP-2, pro MMP-2, pro MMP-9を含むMMPマーカーを用いた。ゲルはWSE-6100LuminoGraph I (ATTO, Tokyo, Japan)にてスキャンを行い、ImageJにて定量した。

統計学的評価

統計分析はJMP pro 15(SAS Institute, NC, USA)を用いて行った。数値は平均±標準偏差で示した。コントロール群と治療各群の比較はDunnett's testで行った。2群間の比較はStudent's t-testを用い、4群間の比較はone-way ANOVAを用いた。 $p < 0.05$ を有意とした。

【結果】

エラスターゼ腹部大動脈瘤モデルに対するピタバスタチン内包高分子ミセルの

治療効果

エラスターゼ注入後に投与する薬剤によって、コントロール群、PS/m 2 mg/kg 投与群、PS/m 5 mg/kg 投与群、PS/m 10 mg/kg 投与群の4群の大動脈検体を比較した (図15)。

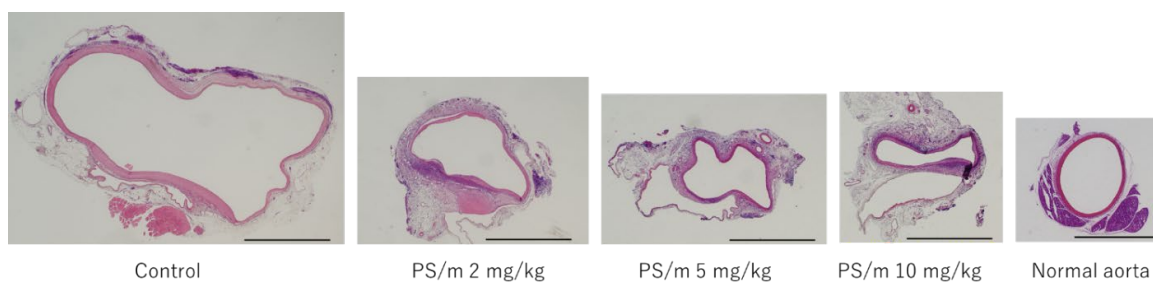


図15：各群におけるAAAと正常大動脈標本 (HE染色)

術7日目のAAAと正常大動脈標本。組織像は20倍、スケールバーは1mm。

エラスターゼ注入直前と直後の腹部大動脈径は4群間で差はなかったが、術7日後ではコントロール群 6.41 ± 0.43 mm、PS/m 2 mg/kg 群 4.78 ± 0.43 mm、PS/m 5 mg/kg 投与群 3.88 ± 0.66 mm、PS/m 10 mg/kg 投与群 3.63 ± 0.66 mm であり、PS/m 治療群はいずれもコントロール群と比較して有意に瘤径が小さかった (それぞれ $p=0.042, 0.002, 0.006$) (図16)。

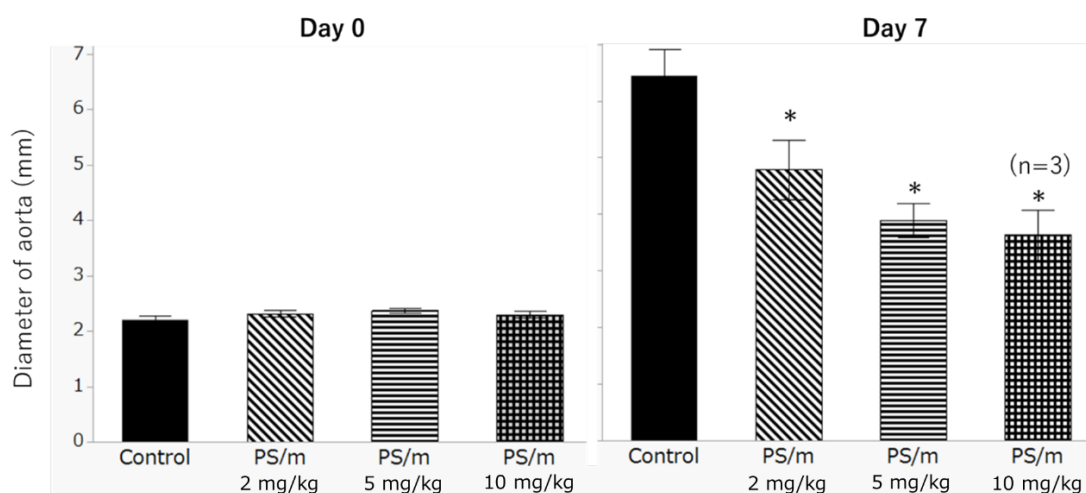


図 1 6 : 各群の大動脈径 (Day 0 および Day 7)

7 日目においては PS/m の用量依存性に瘤径拡大の抑制が認められた。*: コントロールとの比較で $p < 0.05$

用量依存的に瘤径拡大抑制効果が強かった。ただ、PS/m 2 mg/kg 投与群と PS/m 5 mg/kg 投与群のラットには治療期間中の死亡は見られなかったが、PS/m 10 mg/kg 投与群のラットは 8 匹中 5 匹 (62.5%) が治療期間中に死亡した。死亡した 5 匹のラットはそれぞれ day1, 2, 4, 5, 6 で死亡した。day4 に死亡したラットは皮下血腫が見られ、尾の先端が壊死していた。また、day4、day5 に死亡したラットは自発運動の低下を認めた。尿、便には肉眼的に明らかな異常は認めなかった。生存していたラットにおける血液生化学的検査では、TG のみ PS/m 投与群においてコントロール群と比して低値であったが、他は差異を認めなかった (表 3)。

	Control	PS/m 2mg/kg	PS/m 5mg/kg	PS/m 10mg/kg
AST (IU/L)	62±5.0	55±4.2	61±3.6	51±7.9
ALT (IU/L)	21±1.5	21±1.3	21±1.1	20±2.4
BUN (mg/dL)	16.1±0.9	17.0±0.7	17.0±0.6	18.3±1.4
CRE (mg/dL)	0.25±0.01	0.26±0.01	0.26±0.01	0.25±0.02
CK (IU/L)	183±31	210±26	190±22	154±50
TG (mg/dL)	137±11	72±9 *	105±8 *	56±18 *
LDL-C (mg/dL)	9±1.2	12±1.0	12±0.8	14±1.8

表 3 : 血液生化学検査

生存していたラットにおいて TG 以外は各群に大きな差異はなかった。

生存していた PS/m 10 mg/kg 投与群のラットでは心臓、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉の組織像でも大きな異常は認めなかった (図 1 7)。

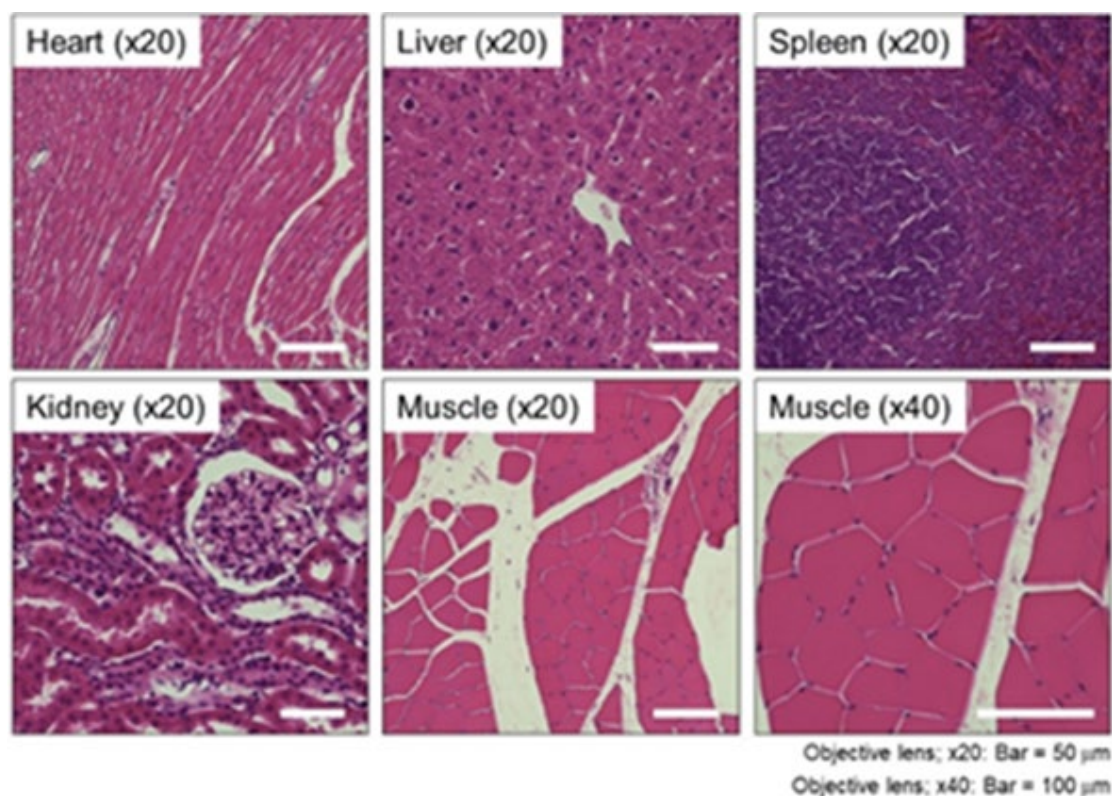


図 1 7 : PS/m 10 mg/kg 投与ラットの心臓、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉の組織像各臓器において明らかな異常を認めなかった。

腹部大動脈瘤の組織学的評価

大動脈壁の組織学的観察を行った。HE 染色では、大動脈壁への炎症細胞の集積がコントロール群と比較して PS/m 投与群で有意に低かった (図 1 8)。また、EVG 染色ではコントロール群において弾性板の破壊が著明であったのに対し、PS/m 投与群では弾性板が保持されていた (図 1 9)。 α SMA の免疫染色では、大動脈中膜内の α SMA 陽性細胞がコントロール群と比較して PS/m 投与群では有意に多く存在していた (図 2 0)。また、CD68 の免疫染色では CD68 陽性マクロファージの大動脈壁への集積がすべての群で認められたが、PS/m 投与群ではコントロール群と比較して有意に CD68 陽性細胞の集積が少なかった (図 2 1)。

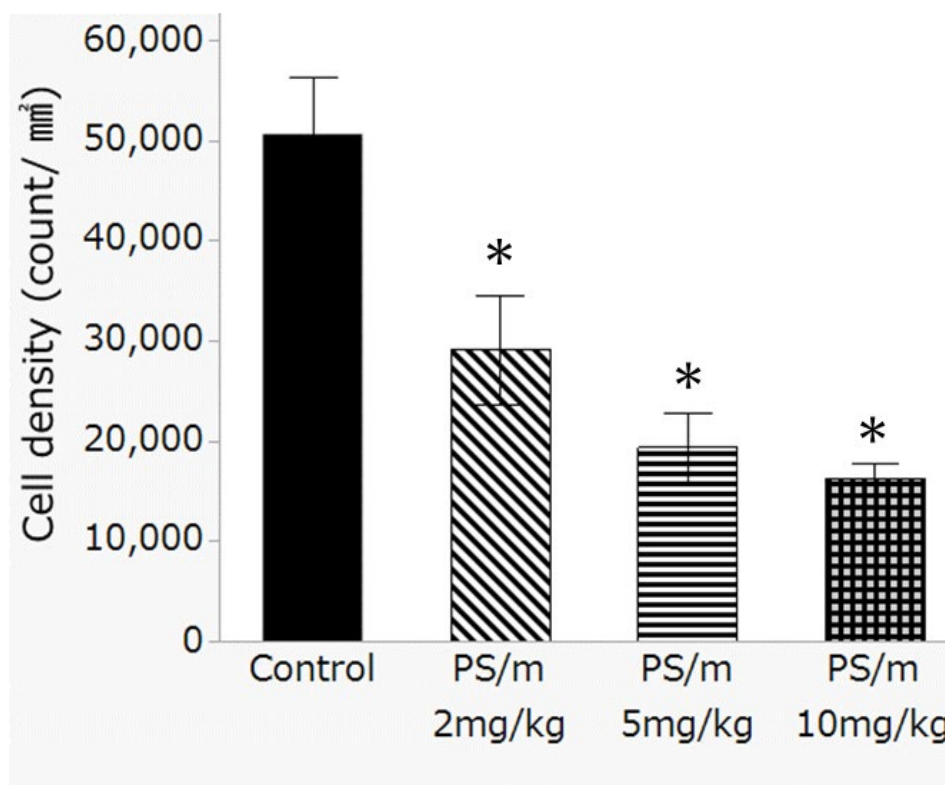
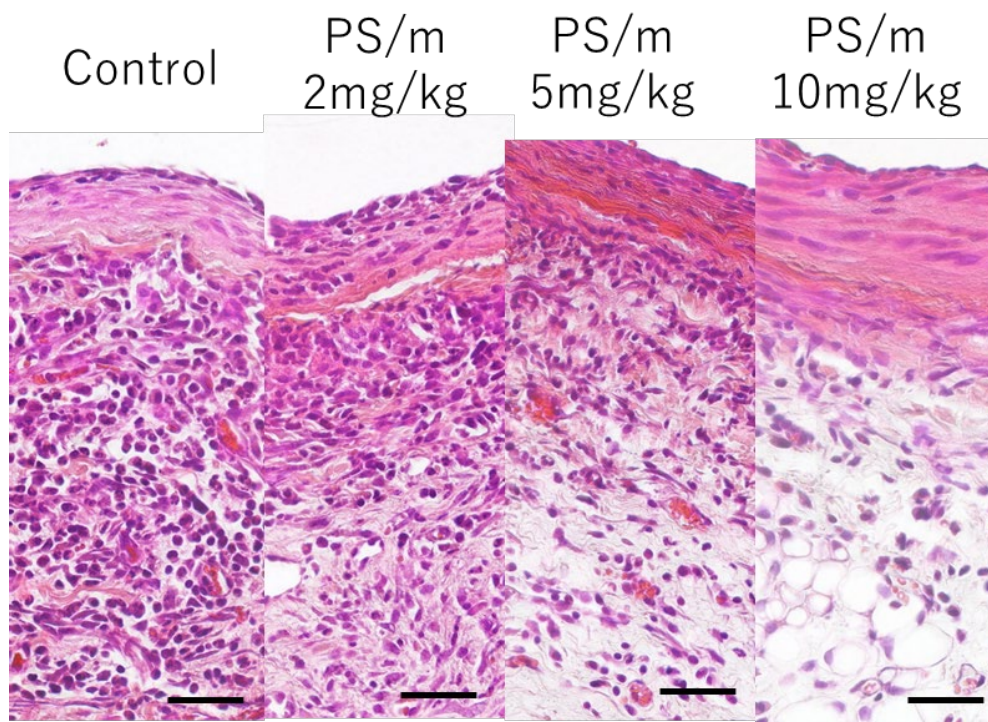


図18 : HE染色の組織像と炎症細胞の細胞密度

組織像は400倍、スケールバーは100 μ m。画像上が内腔側、下が外膜側。コントロール群では炎症細胞の著明な浸潤が見られるが、PS/m投与群では用量依存的に細胞浸潤が少なくなっている。*:コントロールとの比較で $p < 0.05$

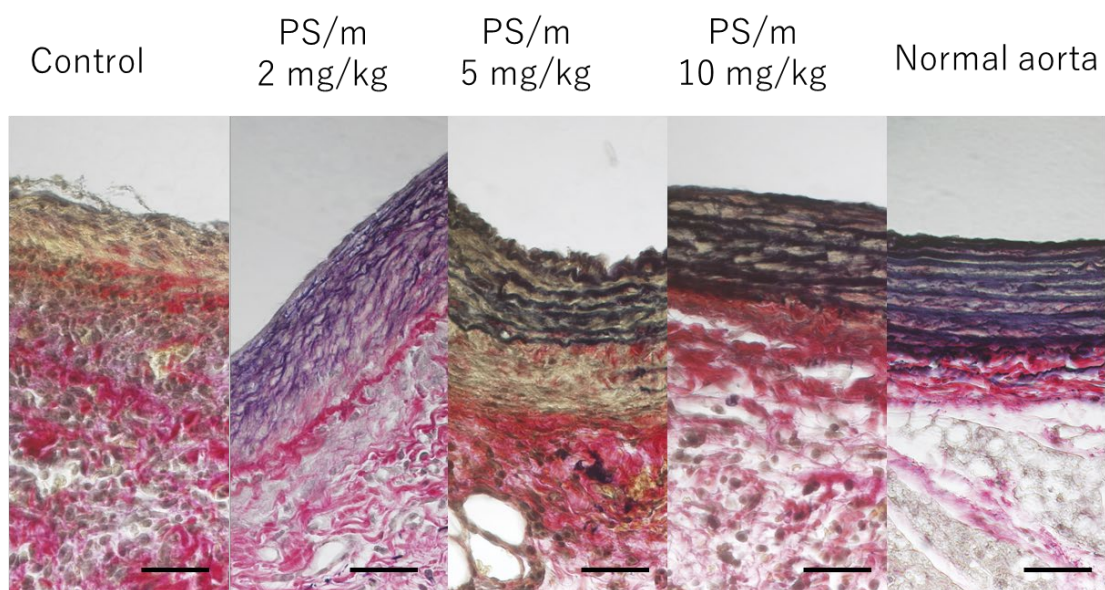


図 1 9 : EVG 染色の組織像

組織像は 400 倍、スケールバーは 100 μ m。画像上が内腔側、下が外膜側。

コントロール群では弾性板がほとんど見られず、PS/m 2 mg/kg 投与群でも少ないが、PS/m 5 mg/kg 投与群、PS/m 10 mg/kg 投与群では弾性板の乱れも少なく、よく保持されている。

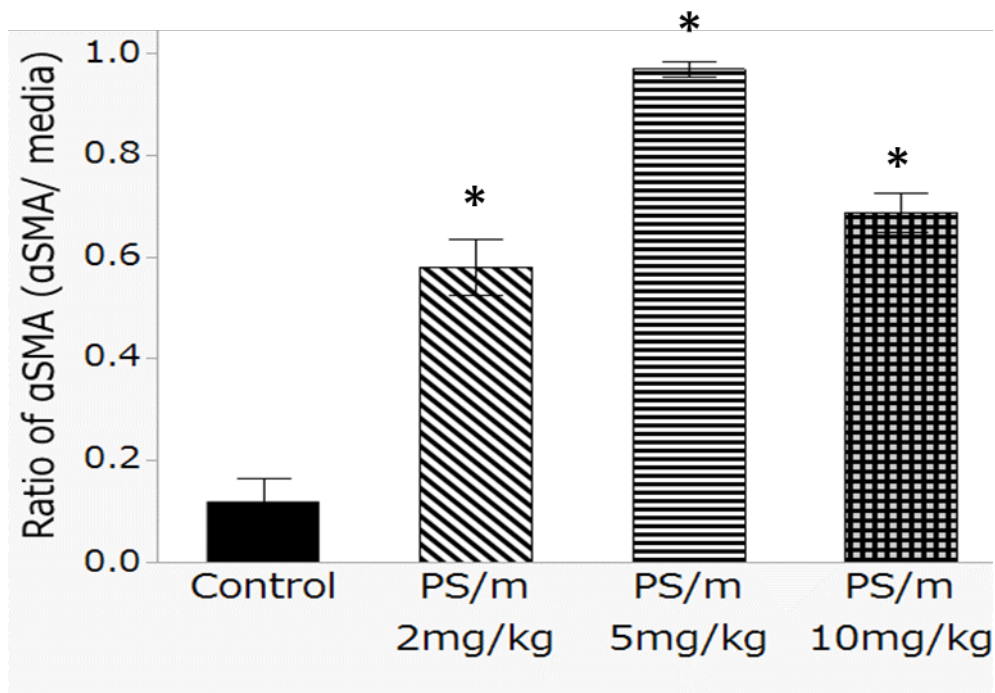
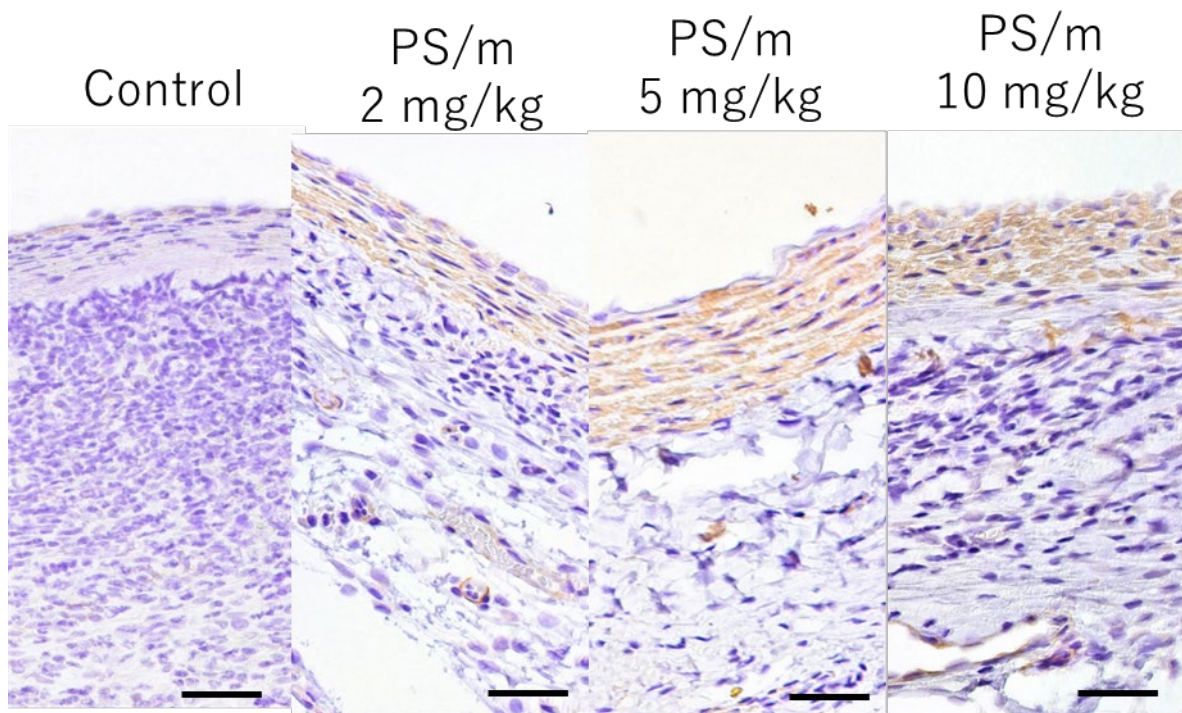


図 20 : α SMA に対する免疫染色の組織像と α SMA 陽性面積/中膜面積
 組織像は 400 倍、スケールバーは 100 μ m。画像上が内腔側、下が外膜側。 α SMA 陽性細胞は茶色。コントロール群では中膜にほとんど α SMA 陽性細胞は認められないが、PS/m 投与群では中膜に α SMA 陽性細胞が認められる。*: コントロールとの比較で $p < 0.05$

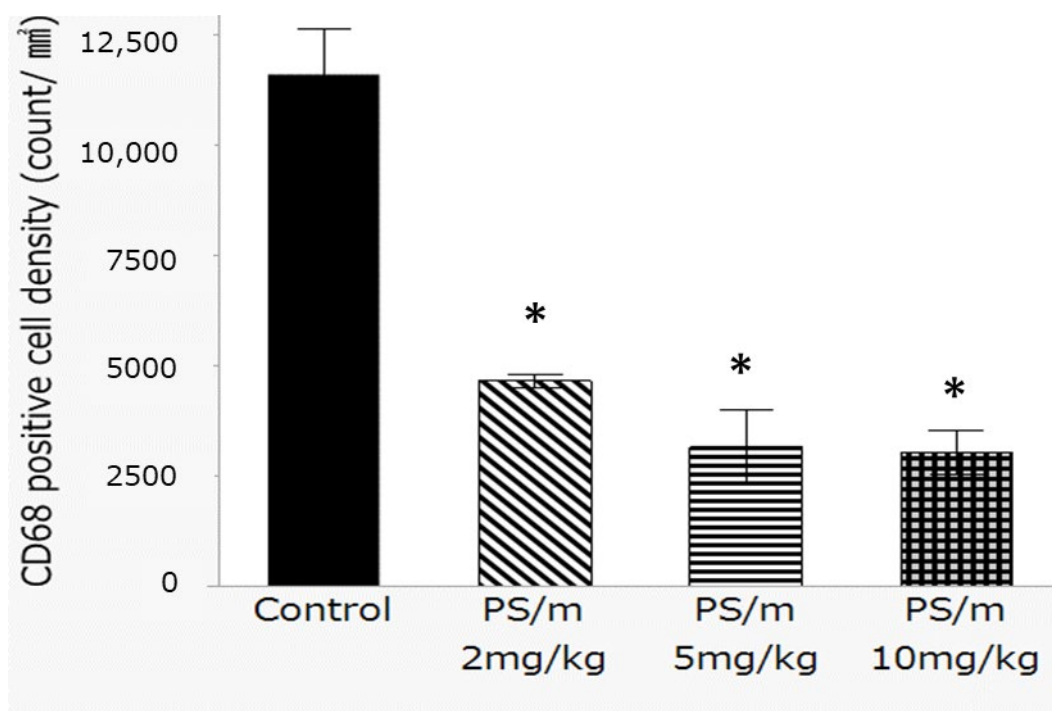
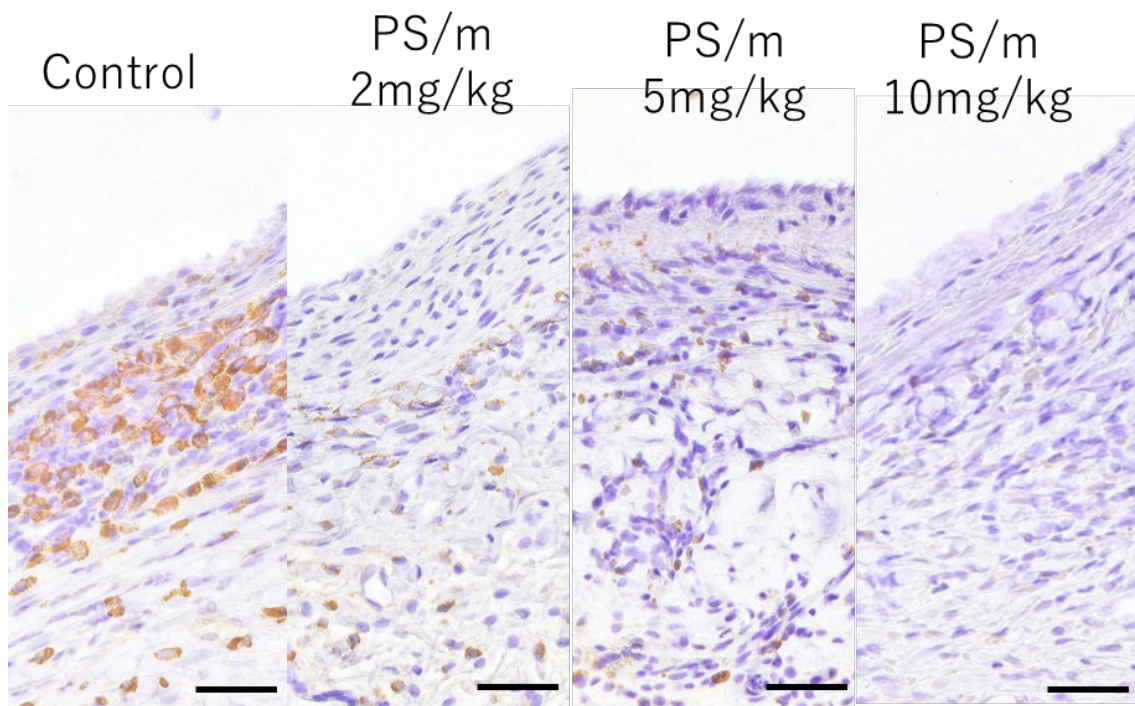


図 2 1 : CD68 に対する免疫染色の組織像と CD68 陽性細胞密度
 組織像は 400 倍、スケールバーは 100 μ m。画像上が内腔側、下が外膜側。CD68 陽性細胞は茶色。コントロール群では CD68 陽性細胞の集積が認められるが、PS/m 投与群ではいずれも CD68 陽性細胞は目立たない。*:コントロールとの比較で $p < 0.05$

Gelatinase 活性

ザイモグラフィーにてそれぞれの AAA 検体中の gelatinase 活性を調べた。

64 kDa に MMP-2、92 kDa に pro MMP-9 の活性が示される (図 2 2)。

Pro MMP-9 活性は PBS 群と比較して 5 mg/kg PS/m 投与群の方が有意に抑制されていた (図 2 3)。

MMP-2 活性は、PBS 群と 5 mg/kg PS/m 投与群で有意差は見られなかった (図 2 4)

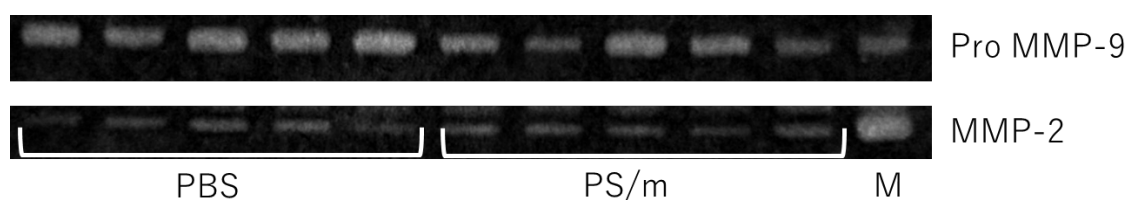


図 2 2 : ザイモグラフィーによる gelatinase 活性の評価

各ウェルに蛋白量として 5 μ g ずつホモジネートを注入し、37 $^{\circ}$ C、40 時間反応させた。M: マーカー

Pro MMP-9

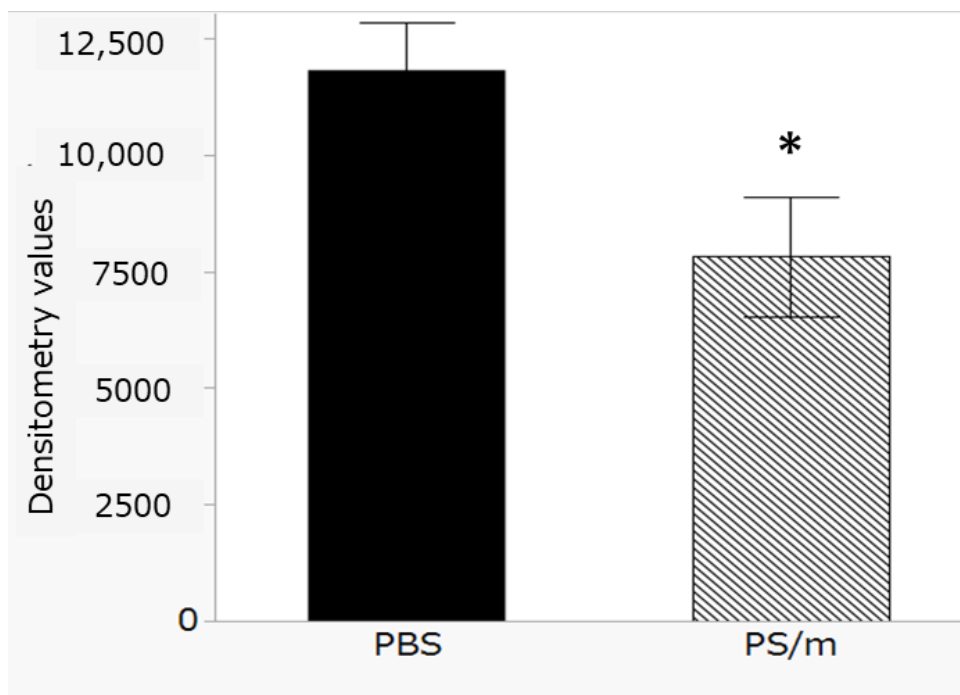


図 2 3 : Pro MMP-9 活性

PBS 投与群と PS/m 投与群では、有意に PS/m 投与群の活性が抑制されていた。

*: $p < 0.05$ 。

MMP-2

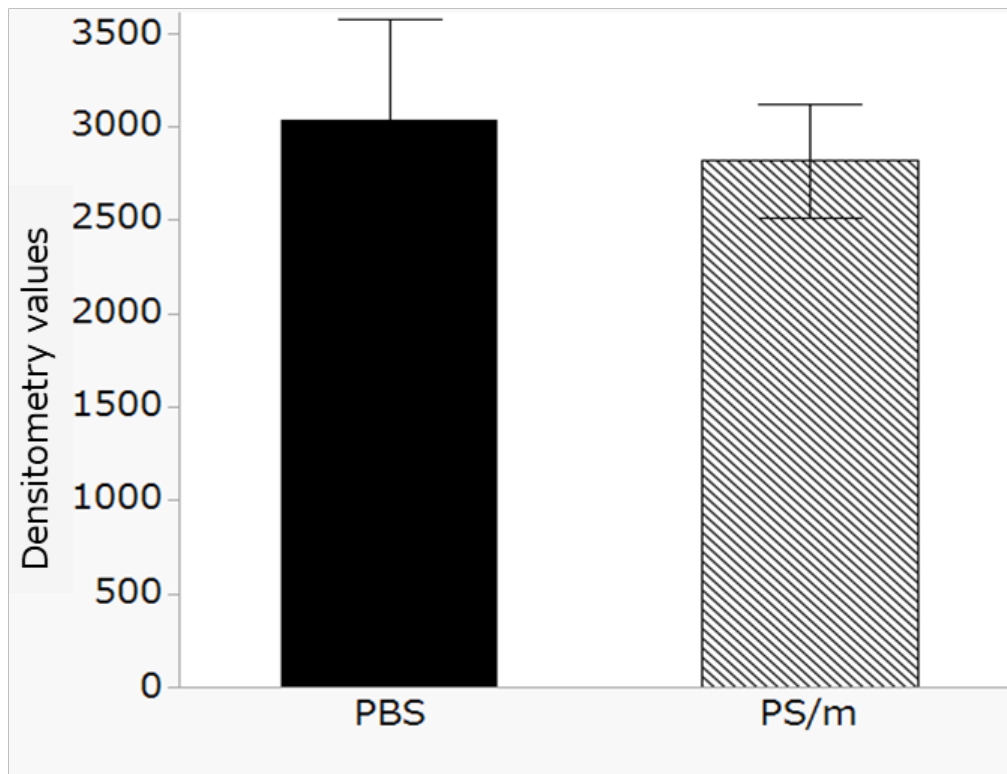


図 2 4 : MMP-2 活性

PBS 投与群と PS/m 投与群で有意差はなかった。

小括

- ・ エラスターゼ注入大動脈モデルにおいて、PS/m 投与は用量依存的に瘤径拡大抑制効果を認めた。

- ・ 10 mg/kg PS/m 投与群でのラットの死亡率が高かったことから、最大耐量を超えていた可能性がある。

- ・ TG 値は PS/m 投与群で低かったが、その他の血液生化学的検査の値に差異はなく、生存していた 10 mg/kg PS/m 投与群のラットでは心臓、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉の組織像において明らかな異常は認めなかった。

- ・ 組織的検索では、HE 染色で大動脈壁への炎症細胞の集積が PS/m 投与群で少ないことが確認された。EVG 染色で PS/m 投与群では弾性板が保持されている傾向があった。αSMA 免疫染色で大動脈中膜内の αSMA 陽性細胞が PS/m 投与群で多く存在していることが確認された。CD68 免疫染色で CD68 陽性細胞、すなわちマクロファージの集積が PS/m 投与群で少ないことが確認された。

- ・ ザイモグラフィーで、Pro MMP-9 活性は 5mg/kg の PS/m 投与群で有意に抑制されており、MMP-2 活性は PBS 投与群との差異は認めなかった。

実験3. 腹部大動脈瘤モデルラットにおけるスタチン内包ミセルの体内動態

【方法】

放射性同位元素 (^{125}I) 標識ピタバスタチン内包高分子ミセルの作成

^{125}I 標識ピタバスタチン内包高分子ミセルの合成は前述の実験1と同様の手法で行った。 ^{125}I の導入にはボルトン・ハンター法を用い(図25)、ラベル化後のミセルは限外濾過 (MWC0: 10 kDa, Millipore, Burlington, MA, USA) で精製した。

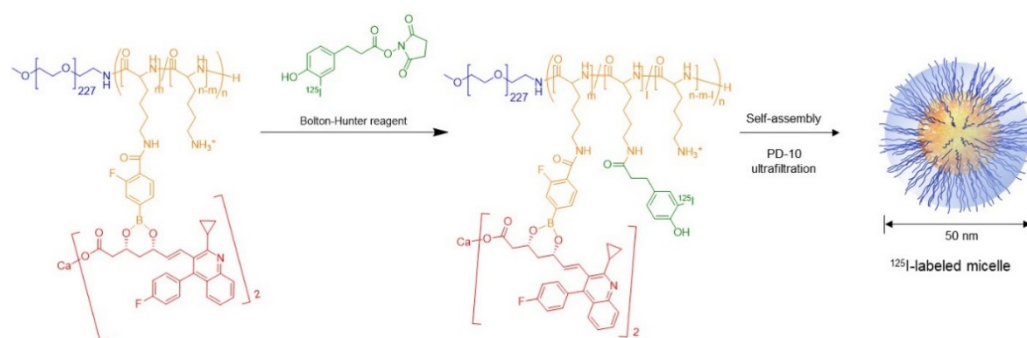


図25 : ^{125}I 標識ピタバスタチン内包高分子ミセルの合成

ラットへの ^{125}I 標識ピタバスタチン内包高分子ミセルによる体内動態の評価

エラストーゼ腹部大動脈瘤モデルラットを前述の方法で作成した。術6日目から1%ヨウ化カリウムを飲料水としてラットに内服させた。術7日目にピタバスタチン換算で5 mg/kgの投与量になる ^{125}I 標識ピタバスタチン内包高分子ミセルをラットの尾静脈から投与した。薬剤投与終了1時間後、4.5時間後

でラットを炭酸ガスにて安楽死させ全身臓器を摘出した。ラットはそれぞれ
n=4 で薬剤投与を行った。ガンマカウンターを用いて、 ^{125}I の放射活性を測定
し、各臓器の薬物の集積量を評価した。薬剤投与と放射活性の測定は東京工業
大学にて行った。

【結果】

各臓器の放射線活性は以下に示すグラフの通りであった(図26)。正常血管と比較すると、4.5時間後にはAAAへの集積が強くなっており、また経時的に集積量が増加していた。ただし、全体としては肝臓、脾臓、腎臓に多く拡散しており、血中滞留はわずかであった。1時間後に肝臓に多く集積している一方で、4.5時間後は小腸、大腸への集積が多く、腸管に移行している可能性が考えられた。薬剤は胆汁排泄である可能性が示唆された。

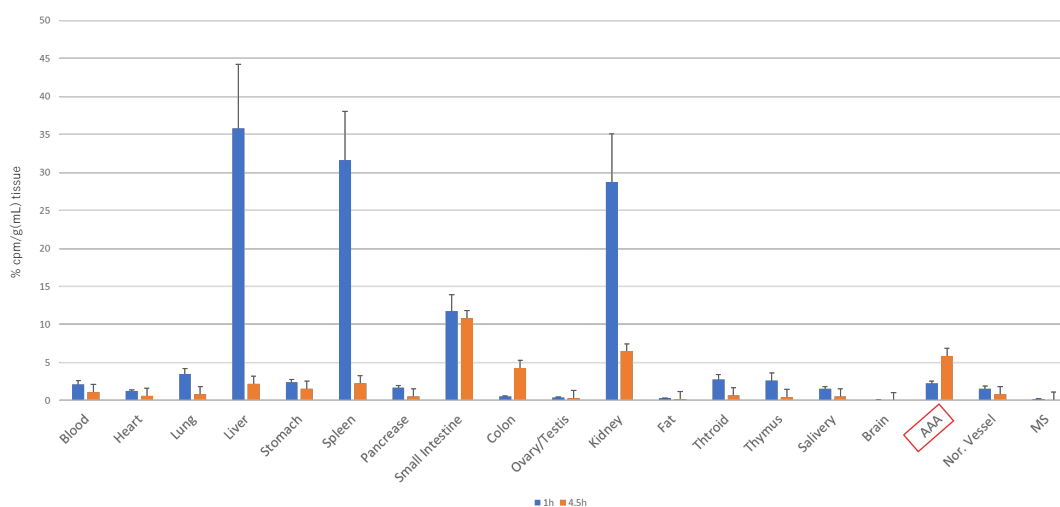


図26： ^{125}I 標識ピタバスタチン内包高分子ミセル投与1時間後と4.5時間後の各臓器の放射線活性
肝臓、脾臓、腎臓、小腸への集積が比較的多く、血中濃度は低い。4.5時間後では正常血管と比較するとAAAへの集積が強く、また経時的な集積増加が見られる。

小括

- ・ PS/m を放射性同位元素で標識化し、体内動態を評価した。
- ・ 全体的には肝臓、腎臓、脾臓への集積が多く認められた。後期に腸管への集積が見られ胆汁排泄型の代謝であることが示唆された。血中への滞留はごくわずかであった。経時的に AAA への集積の増加がみられた。

考察

本研究で得られた知見

脂溶性薬剤であるピタバスタチンを高分子ナノミセルに内包することで経静脈的に投与することが可能であった。PS/m は AAA に集積を認めた。それによって MMP-9 の活性を抑制し、マクロファージを始めとする炎症細胞の集簇抑制及び中膜弾性板と平滑筋細胞の保持により、瘤拡大を抑制したものと考えられた。

ピタバスタチン内包高分子ミセルの動態と効果発現のメカニズム

ピタバスタチンは有機アニオントランスポーターにより肝臓に取り込まれ、肝臓での LDL 受容体を介してコレステロール取り込みを促進することにより血中 LDL-コレステロールを下げる [50]。また、心血管保護作用においては SMC やマクロファージに取り込まれ、抗炎症作用を発揮する [32]。血液中には主に未変化体あるいは主な代謝物であるラクトン体で認められる [51]。経口投与時の bioavailability は約 60% である [51]。市販のピタバスタチンは経口のものしかなく、静脈注射剤は不溶性のため市販されていない。しかし本実験のように水溶性のミセル内包スタチンを使用することで、より高い bioavailability が期待

される。また、細胞増殖抑制試験の結果からミセル化することにより薬理活性の向上が示された。本研究でミセル化のために使用したポリマーは生体適合性が高く、実験で使用した濃度範囲では細胞増殖に影響を及ぼさないため[52, 53]、細胞増殖抑制試験の結果はピタバスタチンをミセル化させたことによる効果であると判断している。

共焦点顕微鏡の結果から、PS/m はエンドサイトーシスにて細胞内に取り込まれ、後期エンドソーム、リソソームに至ると考えられる。細胞外からリソソームに至るまでに pH 7.4 から pH 5 へと変化し[54, 55]、pH の低下による薬剤放出が起これと考えられる。ピタバスタチンは脂溶性であることから膜の透過性が高いと考えられ、放出されたピタバスタチンがエンドソーム膜を透過してサイトゾルに至り、薬効を発揮するものと推察される。あるいは、エンドソーム内での pH 変化によりピタバスタチンが放出され、ポリマー側の Lys 残鎖がカチオン性ポリマーに変化することから膜障害によるエンドソームエスケープを起これことで、エンドソーム内に放出されたピタバスタチンがサイトゾル内に移行して薬効を発揮するという経路も考えられる。ただし、本研究においては蛍光ラベル化ピタバスタチン内包ミセルとリソソームとの共局在は部分的であり、今後小胞体やゴルジ体との共局在についても検討する必要がある。本実験の前にシンバスタチンを内包した高分子ミセルを使用して同様のシナリオで実験を行って

いるが、瘤へのミセルの集積と瘤抑制効果は認められたものの軽度であった。これはフェニルボロン酸を使用していないミセルであり、その薬剤徐放性が劣っていたため *in vivo* での結果に結びつかなかったものと考えている。

実験 2 の結果から、生体内で PS/m が作用し大動脈瘤拡大抑制効果を発揮することがわかった。PS/m 投与群では、AAA の形成に大きく関与するマクロファージを始めとする炎症細胞の動脈壁への集積が有意に少なく、一方で中膜弾性板と SMC は保持されていた。また、ザイモグラフィーの結果から PS/m 投与群で MMP9 活性が有意に抑制されていた。MMP ファミリーの中でも、MMP-2 と MMP-9 は大動脈瘤の形成に強くかかわっていることが知られている [56, 57]。特に MMP-9 は、正常大動脈ではほとんど見られないが、AAA では瘤の中膜と外膜に集簇するマクロファージにより活性が亢進している [58]。MMP-9 が活性化されることにより、細胞外マトリクスの合成不全や炎症性サイトカインの遊離・活性化が引き起こされ、瘤拡大につながる。ミセルから放出されたピタバスタチンは、大動脈瘤組織内のマクロファージや SMC 内で HMG-CoA 還元酵素阻害作用によりコレステロール生合成の中間体であるイソプレノイドの産生を抑制し、Ras や Rho などの低分子 G 蛋白の活性を抑制することで mitogen activated protein kinases の活性を抑制し、MMP 活性の抑制につながるものと考えられる [59, 60, 61]。本研究

では瘤壁組織内の SMC やマクロファージなどへの PS/m の取り込みは確認していないため、今後集積の確認をする必要がある。

実験 3 では、薬剤の多くが臓器にトラップされており血中滞留性は低く、期待されるほどの AAA への薬剤集積は認められなかった。高分子ミセルの最大のメリットは、血中を安定して循環し、標的臓器特異的に集積して内包薬物を放出することである。今回作成したミセルは *in vitro* では 24 時間の安定性を示していたものの、ステルス性が低く生体内ではその多くが肝臓や脾臓、腎臓でトラップされてしまったため、血中濃度が保たれなかったものと考えられる。ミセルの薬物動態は、粒子径や形状、表面電荷、表面修飾等により影響される[62]。今回作成したピタバスタチン内包ミセルは、粒子径は 50 nm と臓器へのトラップをクリアできる径であった。しかし、先行研究における白須らの報告では、106 nm の粒子径であるラパマイシン内包ミセルを用い、ラット血漿中に投与量の 9.0 %が 10 時間後にも残存していた[43]。今回のミセル径が適していなかった可能性はある。しかし、正常血管では血中濃度の低下と共に血管壁へのわずかな集積も低下していたが、大動脈瘤壁においては経時的な瘤壁への集積増大を認めており、EPR 効果による瘤壁へのミセルの集積と滞留が起こっていることが示唆された。今後はさらに長時間での体内動態の評価と、ミセル性能の改善を行う予定である。

研究の限界

エラスターゼモデルは、比較的急性に瘤を作成するものである。よって、動脈硬化により時間をかけて慢性の構造変化が起こっている臨床上の AAA の像とは正確には比較できない。しかし内皮細胞の消失、中膜の菲薄化は AAA と酷似しており、ある程度 mimic できると考えられる。他の大動脈瘤モデルでは、塩化カルシウム散布モデルでは瘤形成に時間がかかり、瘤径の予測ができるものではないため採用しなかった[63]。また apolipoprotein E ノックアウトマウスでの大動脈瘤モデルもあるが、これは瘤の形成機序には大動脈壁の解離が最も寄与していると考えられ、炎症の主座としての AAA というモデルにはなりえなかった[64]。よって、最も本エラスターゼモデルが適当なものであったと考えている。

実験 2 において PS/m 10 mg/kg 投与ラットの死亡率が高かった原因については、死亡したラットの剖検や生存中の血液検査などを行っていなかったため、死因を特定することは難しい。その上で推定される死因は、投与したピタバスタチンの絶対量が多いことからピタバスタチンの過剰投与による肝障害や筋組織障害が考えられる。今後、毒性試験を行い生存中のラットにおける血液・尿検査、すべてのラットでの剖検を行う必要がある。

血液生化学検査では、PS/m 投与群で TG 値の減少が認められたが、本実験においては採血前の絶食を行っておらず、食餌摂取量の計測も行っていないことか

ら、TG 値については参考値である。副作用の評価のためにも、食餌条件を揃えた上での血液生化学検査による評価は今後必要である。

本研究ではピタバスタチンが脂溶性薬剤であるために、PS/m と同量のピタバスタチンを同条件で経静脈的に投与することが困難であり、ピタバスタチンの単体投与との比較は行っていない。したがって、薬剤をミセル化させたことによる効果の増大があったのかについては断定することができない。しかし、PS/m の体内動態では肝臓への分布が多いものの経時的に AAA への集積が増加しているのに対し、ピタバスタチン単体では血漿中の濃度の約 54 倍が肝臓に分布し、他の臓器への分布は血漿中と同等かそれ以下となり、投与 0.5~1 時間後に最高血中濃度に達した後は経時的に減少していく [65]。ピタバスタチン単体では AAA への分布も同様に経時的に減少していくものと考えられる。このことから、薬剤が組織内に滞留している PS/m においては、ピタバスタチンの単体投与よりも大動脈瘤壁内への集積と薬物曝露量が多くなり、結果として薬理効果が高くなると推察される。

ピタバスタチンのミセル化による薬理活性の向上については、取り込み効率の上昇や細胞内動態の変化等が関与していると推察される [66]。しかし、本研究においては上記に関する詳細が未解明の課題として残されている。今後さらにミセルの安定化や瘤径コントロールを図りながらも *in vitro* における薬理活性

向上の機序を調べる必要がある。本研究において、PS/m の細胞への取り込みの評価は SMC のみで行っているが、白須らの報告ではラパマイシン内包ミセルの大動脈瘤壁でのマクロファージへの取り込みが確認されており[43]、ピタバスタチンの作用はマクロファージなど SMC 以外の細胞でも発現している可能性がある。したがって、細胞培養実験及び動物実験においてマクロファージや間質細胞などでのミセルの取り込みの確認が本研究の課題として残されている。

ミセルの取り込みは、実験 3 で示されたように肝臓・脾臓での取り込みが多く、ステルス性は期待するほど高くなかったと解釈される。臨床応用された場合に、ミセルがターゲットにほとんど集積するのが理想であるが、ラットでの実験結果を見る限りはそうではない。DDS として肝臓・脾臓に薬剤用量をステイールされてしまうのであれば、肝臓・脾臓での毒性に関してはさらに検討する必要がある、別の動物種での実験も必要であろう。特に肝臓へのトラップが多かったことから、肝臓においてピタバスタチンが作用し、その副産物により瘤拡張抑制効果が得られた可能性も否定できない。また、本研究においては 1 時間後、4.5 時間後での測定しか行っていないが、8 時間後、24 時間後など、さらに長時間での検討が今後必要であり、薬剤排泄についての検討として糞便・尿中の排出についても計測が必要である。

今後の展望

本研究ではスタチンのミセル化により AAA への薬剤の集積性を高め、瘤縮小効果を得ることができた。しかし、ミセルの AAA への集積は想定よりも少なく、ミセル設計のさらなる最適化が必要である。前述の通り 100 nm 程度の粒子径への変更や、安息香酸などの疎水基やリガンドの導入も検討される。

DDS として今回高分子ミセルを使用した。本研究のスキームをそのまま他のナノメディシンを使用することも考えている。すなわち、他のより小さい分子のポリマーを使用することで、本研究で使用していた炎症という広義の概念をより詳細に分類し、接着因子や遊走因子に specific に作用するものを作成すれば、より組織移行率が上がると考えられる。その中で、最大耐量や生体における毒性評価も併せて実施する必要があると考えている。最近では AAA 関連の SNP 解析も行われてきており、それらとのリンクも臨床応用へ寄与すると思われる。

具体的に臨床応用された場合、現在スタチンは経口投与であるが、ミセルは注射剤となる。皮下注射剤や経口剤の開発が可能であれば、よりアドヒアランスの向上が期待される。ミセル性能を改善することができれば、副作用の少ない薬剤として高齢者にも使用しやすくなる。最終的には小径瘤の拡張抑制だけでなく、すでに手術適応となる大きさまで拡張した瘤があるものの耐術不能である患者に対して投与することもできる薬剤の開発を目指している。

結論

ピタバスタチンを内包した高分子ミセルを作成した。フェニルボロン酸を導入することにより細胞内での薬剤放出が可能となった。PS/m は SMC の細胞質内に取り込まれ、一部でリソソームとの共局在が確認された。薬理活性は通常のピタバスタチンに比べて約 30 倍高いことが示された。

エラスターゼ注入腹部大動脈瘤モデルにおいて、PS/m 投与は用量依存的に瘤径拡大抑制効果を認めた。PS/m の最大耐量は 10 mg/kg 以下と考えられた。

組織的検索では、HE 染色で大動脈壁への炎症細胞の集積が PS/m 群では有意に低かった。また EVG 染色で PS/m 群では弾性板が保持されていた傾向があった。

α SMA 免疫染色で、大動脈中膜内の α SMA 陽性細胞が PS/m 群で有意に多く存在していた。CD68 免疫染色では PS/m 群で CD68 陽性細胞の集積が少なかった。

ザイモグラフィーで、Pro MMP-9 活性は 5 mg/kg の PS/m 群で有意に抑制されており、MMP-2 活性はコントロール群との差異は認めなかった。

PS/m の AAA への経時的な集積の増大が認められた。PS/m の多くは肝臓、脾臓および腎臓へトラップされており、ステルス性は低い。

謝辞

本研究を進めるにあたって、東京大学大学院 医学系研究科 外科学専攻 臓器病態外科学講座 腫瘍外科学・血管外科学 石原聡一郎教授、ならびに血管外科学 保科克行准教授には研究全般にわたりご指導ご鞭撻を賜り、深謝いたします。また東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所 三浦裕准教授には、高分子ミセル作成の手ほどきから具体的な実験方法まで多岐にわたるご指導をいただき、深く感謝いたします。

東京工業大学 大学院 大学院生 本田雄志さん、学部生 浮田菜央さんにはミセル合成の具体的なお手伝いをいただき、感謝申し上げます。

また実際の研究および論文作成においては、多くの先生方に多大なるご協力を頂きました。ここに深甚なる謝意を表します。

引用文献

1. Benson R. A, Poole R, Murray S, Moxey P, Loftus M I. Screening results from a large United Kingdom abdominal aortic aneurysm screening center in the context of optimizing United Kingdom National Abdominal Aortic Aneurysm Screening Programme protocols. *J Vasc Surg.* 63(2), 301-304, 2016.
2. Von Allmen, R.S. Powell, J.T. The management of ruptured abdominal aortic aneurysms: Screening for abdominal aortic aneurysm and incidence of rupture. *J Cardiovasc Surg.* 53, 69–76, 2012.
3. 日本循環器学会、日本心臓血管外科学会、日本胸部外科学会、日本血管外科学会合同ガイドライン 2020年改訂版 大動脈瘤・大動脈解離診療ガイドライン https://www.j-circ.or.jp/cms/wp-content/uploads/2020/07/JCS_2020_Ogino.pdf
4. Toghil BJ, Saratzis A, Bown MJ. Abdominal aortic aneurysm an independent disease to arteriosclerosis? *Cardiovasc Pathol.* 27, 71-75, 2017.
5. Thompson RW, Geraghty PJ, Lee JK. Abdominal aortic aneurysms: basic mechanisms and clinical implications. *Curr Probl Surg.* 39(2), 110–230, 2002.

6. Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet*, 365, 1577–1589, 2005.
7. Zankl A.R, Schumacher H, Krumsdorf U, Katus H.A, Jahn L, Tiefenbacher C.P, Pathology, natural history and treatment of abdominal aortic aneurysms, *Clin Res Cardiol*, 96, 140-151, 2007.
8. Dollery M. C, Libby P. Artherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res*, 69, 625-635, 2006.
9. Parmanand S, Jagat N. Molecular characterization of high-risk aortic aneurysms: imaging beyond anatomy. *J Am Coll Cardiol*. 71(5), 524-528, 2018.
10. Hoshina K, Sho E, Sho M, Nakanishi TK, Dalman RL. Wall shear stress and strain modulate experimental aneurysm cellularity. *J Vasc Surg*, 37, 1067-74, 2003.
11. Nakanishi T, Hoshina K, Tsao PS, Sho E, Sho M, Kawowski JK, Yeh C, Yang R-B, Topper JN, Dalman RL. Flow loading induces macrophage antioxidative gene expression in experimental aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 2017-2022, 2002.
12. Sho E, Sho M, Hoshina K, Kimura H, Nakanishi TK, Dalman RL. Hemodynamic forces regulate mural macrophage infiltration in experimental aortic aneurysms. *Exp Mol Pathol*, 76, 108-116, 2004.

13. Hu Y, Böck G, Wick G, Xu Q. Activation of PDGF receptor alpha in vascular smooth muscle cells by mechanical stress. *FASEB J*, 12(12), 1135-42, 1998.
14. 日本血管外科学会データベース管理運営委員会, NCD 血管外科 データ分析チーム 血管外科手術アニュアルレポート 2013 年 日本血管外科学会雑誌, 28, 273-292, 2019.
15. Nakayama A, Morita H, Hayashi N, Nomura Y, Hoshina K, Shigematsu K, Ohtsu H, Miyata T, Komuro I. Inverse correlation between calcium accumulation and the expansion rate of abdominal aortic aneurysms. *Circ J*, 80(2), 332-9, 2016.
16. Kent KC. Clinical practice: Abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med*, 371, 2101-2108, 2014.
17. Nakayama A, Amiya E, Morita H, Hyodo K, Takayama N, Konishi Y, Taya M, Fujiwara T, Hosoya Y, Hoshina K, Komuro I. The potential of cardiac rehabilitation as a method of suppressing abdominal aortic aneurysm expansion: a pilot study. *Heart Vessels*, 34, 2031-2039, 2019.
18. Sliby JM, Ricci MA, Gadowski GR, Hendley ED, Pilcher DB. Expansion of aortic aneurysms is reduced by propranolol in a hypertensive rat model. *J Vasc Surg*, 20(2), 178-83, 1994.

19. Fujiwara Y, Shiraya S, Miyake T, Yamakawa S, Aoki M, Makino H, Nishimura M, Morishita R. Inhibition of experimental abdominal aortic aneurysm in a rat model by the angiotensin receptor blocker valsartan. *Int J Mol*, 22, 703-708, 2008.
20. Liao S, Miralles M, Kelley JB, Curci AJ, Borhani M, Thompson RW. Suppression of experimental abdominal aortic aneurysms in the rat by treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Vasc Surg*, 33(5), 1057-1064, 2001.
21. Petrincic D, Liao S, Holmes DR, Reilly JM, Parks WC, Thompson RW. Doxycycline inhibition of aneurysmal degeneration in an elastase-induced rat model of abdominal aortic aneurysm: preservation of aortic elastin associated with suppressed production of 92 kD gelatinase. *J Vasc Surg*, 23(2), 336-46, 1996.
22. Golledge J, Cullen B, Moran C, Rush C. Efficacy of simvastatin in reducing aortic dilatation in mouse models of abdominal aneurysm. *Cardiovasc Drugs Ther*, 24(5-6), 373-8, 2010.
23. Fujimura N, Xiong J, Kettler EB, Xuan H, Glover KJ, Mekk MW, Xu B, Dalman RL. Metformin treatment status and abdominal aortic aneurysm disease progression. *J Vasc Surg*. 64(1), 46-54e8, 2016.
24. Propranolol Aneurysm Trial Investigators. Propranolol for small abdominal aortic aneurysms: results of a randomized trial. *J Vasc Surg*, 35(1), 72-9, 2002.

25. Liao S, Miralles M, Kelley BJ, Curci JA, Borhani M, Thompson RW.
Suppression of experimental abdominal aortic aneurysms in the rat by treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Vasc Surg*, 33, 1057-1064, 2001.
26. Hackmam DG, Thiruchelvam D, Redelmeier DA. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and aortic rupture: a population-based case-control study. *Lancet*, 19;368(9536), 659-65, 2006.
27. Salata K, Syed M, Hussain MA, Eikelboom R, Mestral C, Verma S, Al-Omran M.
Renin-angiotensin system blockade does not attenuate abdominal aortic aneurysm growth, rupture rate, or perioperative mortality after elective repair. *J Vasc Surg*, 67(2), 629-636.e2, 2018.
28. Mosorin M, Juvonen J, Biancari F, Satta J, Surcel HM, Leinonen M, Saikku P, Juvonen T. . Use of doxycycline to decrease the growth rate of abdominal aortic aneurysms: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *J Vasc Surg*, 34(4), 606-10, 2001.
29. Baxter TB, Matsumura J, Curci JA, McBride R, Larson L, Blackwelder W, Lam D, Wijesinha M, Terrin M. Effect of doxycycline on aneurysm growth among patients with small infrarenal abdominal aortic aneurysms a randomized clinical trial. *JAMA*, 323(20), 2029-38, 2020.

30. Barakat AF, Saad M, Abuzaid A, Mentias A, Mahmoud A, Elgendy IY. Perioperative statin therapy for patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg*, 101, 818-25, 2016.
31. Ridker P, Danielson E, Fonseca FAH, Genest J, Gotto, Jr. AM, John J.P. Kastelein JJP, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*, 359, 2196-207, 2008.
32. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45, 89-118, 2005.
33. Shiraya S, Miyake T, Aoki M, Fujiwara Y, Ohgi S, Nishimura M, Ogihara T, Morishita R. Inhibition of development of experimental aortic abdominal aneurysm in rat model by atorvastatin through inhibition of macrophage migration. *Artherosclero*, 202, 34-40, 2002.
34. Ferguson CD, Clancy P, Bourke B, Walker PJ, Dear A, Buckenham T, Norman P, Golledge J. Association of statin prescription with small abdominal aortic aneurysm progression. *Am Heart J*, 159(2), 307-313, 2010.
35. 橋田充, 高倉喜信 生体内薬物送達学(基礎生体工学講座) 第4章 薬物の分布とその制御: ターゲティング 産業図書, 1994.

36. 片岡一則, 張祐銅 ドラッグデリバリーシステムの新展開-究極の薬物治療
を目指して 第4章 標的指向型 DDS(ターゲティング) シーエムシー出版,
2004.
37. Nishiyama N, Kataoka K. Medical applications of nanotechnology: polymeric
micelles for drug delivery. *J Jpn Surg Soc*, 106, 700-705 2005.
38. 裴潤秀, 片岡一則 超機能化高分子ナノミセル 炎症と免疫 13(2), 131-
142, 2005.
39. Matsumura Y. Preclinical and clinical studies of NK012, an SN-38-incorporating
polymeric micelles, which is designed based on EPR effect. *Adv. Drug Deliv. Rev*,
63, 184-192, 2011.
40. Plummer R, Wilson RH, Calvert H, Boddy AV, Griffin M, Sludden J, Tilby MJ,
Eatock M, Pearson DG, Ottley CJ, Matsumura Y, Kataoka K, Nishiya T. A phase I
clinical study of cisplatin-incorporated polymeric micelles (NC-6004) in patients
with solid tumours. *Br. J. Cancer*, 104, 593-598, 2011.
41. Matsumura Y, Kataoka K. Preclinical and clinical studies of anticancer agent-
incorporating polymer micelles. *Cancer Sci*, 100, 572-579, 2009.

42. Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K. Optimization of (1,2-diamino-cyclohexane) platinum(II)-loaded polymeric micelles directed to improved tumor targeting and enhanced antitumor activity. *J Control Release*, 121(3), 146-55, 2007.
43. Shirasu T, Koyama H, Miura Y, Hoshina K, Kataoka K, Watanabe T. Nanoparticles effectively target rapamycin delivery to sites of experimental aortic aneurysm in rats. *PLoS One*, 11(6), e0157813, 2016.
44. Sano M, Sasaki T, Hirakawa S, Sakabe J, Ogawa M, Baba S, Zaima N, Tanaka H, Inuzuka K, Yamamoto N, Setou M, Sato K, Konno H, Unno N. Lymphangiogenesis and angiogenesis in abdominal aortic aneurysm. *PloS One* 9(3), e89830, 2014.
45. Nemoto M, Hoshina K, Statins reduce extensive aortic atheromas in patients with abdominal aortic aneurysms, *Ann Vasc Dis*, 6(4), 711-717, 2013.
46. Honda Y, Nomoto T, Matsui M, Takemoto H, Kaihara Y, Miura Y, Nishiyama N. Sequential Self-Assembly Using Tannic Acid and Phenylboronic Acid-Modified Copolymers for Potential Protein Delivery. *Biomacromolecules*, 21, 3826–3835, 2020.
47. Naito M, Ishii T, Matsumoto A, Miyata K, Miyahara Y, Kataoka K. A phenylboronate-functionalized polyion complex micelle for ATP-triggered release of siRNA. *Angew Chem Int Ed*, 51, 10751-10755, 2012.

48. Anidjar S, Salzmann J-L, Gentric D, Lagneau P, Camilleri J-P, Michel J-B. Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation*, 82, 973-981, 1990.
49. Anidjar S, Dobrin PB, Eichorst M, Graham GP, Chejfec G. Correlation of inflammatory infiltrate with the enlargement of experimental aortic aneurysms. *J Vasc Surg*, 16(2), 139-147, 1992.
50. Cabral H, Kataoka K. Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies. *J Controlled Release*, 190, 465-76, 2014.
51. Aoki T, Nishimura H, Nakagawa S, Kojima J, Suzuki H, Tamaki T, Wada Y, Yokoo N, Sato F, Kimata H, Kitahara M, Toyoda K, Sakashita M, Saito Y. Pharmacological profile of a novel synthetic inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Arzneimittelforschung*, 47(8), 904-909, 1997.
52. Fujino H, Kojima J, Yamada Y, Hiroyasu, Kanda H, Kimata H. Studies on the Metabolic Fate of NK-104, a New Inhibitor of HMG-CoA Reductase (4) : Interspecies Variation in Laboratory Animals and Humans. *薬物動態*, 14(2), 79-91, 1999.
53. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in Cancer Therapy: Challenges, Opportunities, and Clinical Applications. *J Controlled Release*, 200, 138-57, 2015.

54. Sonawane ND, Thiagarajah JR, Verkman AS. Chloride Concentration in endosomes measured using a ratioable fluorescent Cl⁻ indicator. *J. Biol. Chem*, 277(7), 5506-5513, 2002.
55. DiCiccio JE, Steinberg BE. Lysosomal pH and analysis of the counter ion pathways that support acidification. *J Gen Physiol*, 137(4), 385-390, 2011.
56. Maguire EM, Pearce SWA, Xiao R, Oo AY, Xiao Q. Matrix Metalloproteinase in Abdominal Aortic Aneurysm and Aortic Dissection, *Pharmaceuticals*, 12, 118, 2019.
57. Longo GM, Fiotti N, Baxter BT, Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms, *J Clin Invest*, 110(5), 625-632, 2002.
58. Thompson RW, Welgus HG, Parks WC. Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms. An elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *J Clin Invest*, 96(1), 318-326, 1995.
59. Yoshimura K, Nagasawa A, Kudo J, Onoda M, Morikage N, Furutani A, Aoki H, Hamano K. Inhibitory Effect of Statins on Inflammation-Related Pathways in Human Abdominal Aortic Aneurysm Tissue. *Int J Mol Sci*, 10, 3390, 2015.

60. Bellosta S, Via D, Canavesi M, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. HMG-CoA Reductase Inhibitors Reduce MMP-9 Secretion by Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18, 1671-1678, 1998.
61. Yang CQ, Li W, Li SQ, Li J, Li YW, Kong SX, Liu RM, Wang SM, Lv WM. MCP-1 stimulates MMP-9 expression via ERK 1/2 and p38 MAPK signaling pathways in human aortic smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem*, 34, 266-276, 2014.
62. Ernsting MJ, Murakami M, Roy A, Li S-D. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *J Control Release*, 172(3), 782-794, 2013.
63. Chiou AC, Chiu B, Pearce WH. Murine aortic aneurysm produced by periarterial application of calcium chloride. *J Surg Res*, 99(2), 371e6, 2001.
64. Daugherty A, Cassis LA. Chronic angiotensin II infusion promotes atherogenesis in low density lipoprotein receptor *-/-* mice. *Ann N Y Acad Sci*, 892, 108–118, 1999.
65. Kimata H, et al. Studies on the metabolic fate of NK-104, a New Inhibitor of HMG-CoA Reductase (1) : Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion in Rats. *薬物動態*, 13(5), 484-498, 1998.
66. Cabral H, Miyata K, Osada K, Kataoka K. Block copolymer micelles in nanomedicine applications. *Chem. Rev.* 118, 6844-6892, 2018.