

博士論文

ラパマイシン内包ナノ粒子による大動脈瘤形成抑制効果の検討

白須拓郎

## 目次

要旨	P. 7
序文	
大動脈瘤治療の現状と問題点	P. 8
ヒト大動脈瘤の病態生理とエラスターゼ誘導	
腹部大動脈瘤モデル	P. 10
ナノ粒子による大動脈瘤治療の可能性	P. 14
ラパマイシンおよびナノ粒子の特徴	P. 15
大動脈瘤に対する薬物療法の意義	P. 16
本研究の概要	P. 17
実験 1. ラパマイシン内包ナノ粒子の大動脈瘤への集積に関する検討	
＜方法＞	
実験動物	P. 18
Poly(ethylene glycol)- <i>b</i> -poly( $\gamma$ -benzyl L-glutamate)の合成	P. 18
ラパマイシン内包ナノ粒子の合成と評価	P. 19
Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子の合成	P. 20
ラットエラスターゼ誘導腹部大動脈瘤モデルの作成	P. 21
薬剤投与および検体採取	P. 23

<i>In vivo</i> イメージングシステムでの大動脈検体の評価	P. 23
-------------------------------------	-------

大動脈検体ホモジネートの蛍光強度測定	P. 24
--------------------	-------

共焦点レーザースキャン顕微鏡での大動脈検体の評価	P. 25
--------------------------	-------

CD31 に対する免疫染色	P. 26
---------------	-------

統計学的評価	P. 27
--------	-------

## <結果>

ラパマイシン内包ナノ粒子の合成	P. 27
-----------------	-------

Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子の合成	P. 29
--------------------------------	-------

大動脈瘤へのナノ粒子の集積 ( <i>In vivo</i> イメージングシステム)	P. 29
--	-------

大動脈検体ホモジネートの蛍光強度	P. 31
------------------	-------

大動脈瘤組織中のナノ粒子の分布 (共焦点レーザースキャン顕微鏡)	P. 33
-------------------------------------	-------

大動脈瘤壁内の新生血管	P. 38
-------------	-------

<小括>	P. 39
------	-------

## 実験 2. ラパマイシン内包ナノ粒子による大動脈瘤形成抑制効果に関する検討

### <方法>

実験プロトコール	P. 40
----------	-------

薬剤投与および検体採取	P. 41
-------------	-------

大動脈瘤検体の組織学的評価	P. 42
大動脈瘤検体のホモジネートを用いた zymography	
およびサイトカイン産生の評価	P. 43
統計学的評価	P. 45
<結果>	
ナノ粒子による大動脈瘤径拡大抑制効果	P. 46
薬物投与による有害事象	P. 48
大動脈瘤検体の組織学的評価	P. 49
Zymography およびサイトカイン量の分析	P. 57
<小括>	P. 60
考察	
本研究で得られた新たな知見	P. 61
ラットエラストラーゼ誘導大動脈瘤モデル使用の妥当性	P. 61
ラパマイシンのナノ粒子化による生物学的利用能の向上	P. 62
ラパマイシン内包ナノ粒子の優れた血中滞留性	P. 64
ラパマイシン内包ナノ粒子の大動脈瘤への集積メカニズム	P. 66
大動脈瘤組織中でのラパマイシン内包ナノ粒子の作用	P. 69
ラパマイシン内包ナノ粒子による治療効果の増強	P. 72

研究の限界	P. 75
今後の展望	P. 75
結論	P. 77
謝辞	P. 78
参考文献	P. 79

## 略語表

略語	内容
ALT	alanine aminotransferase
AST	aspartate aminotransferase
BLG-NCA	<i>N</i> -carboxy anhydride of $\gamma$ -benzyl L-glutamate
BUN	blood urea nitrogen
CINC	cytokine-induced neutrophil chemoattractant
Cre	creatinine
DDS	drug delivery system
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
EPR	enhanced permeability and retention
EVG	elastica van Gieson
HE	hematoxylin-eosin
$^1\text{H-NMR}$	$^1\text{H}$ -nuclear magnetic resonance
IP	interferon $\gamma$ -induced protein
IL	interleukin
MIP	macrophage inflammatory protein
MMP	matrix metalloproteinase
mTOR	mammalian target of rapamycin
PBS	phosphate buffered saline
PDI	polydispersity index
PEG	poly(ethylene glycol)
PEG- <i>b</i> -PBLG	poly(ethylene glycol)- <i>b</i> -poly( $\gamma$ -benzyl L-glutamate)
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
SPF	specific pathogen free
$\alpha\text{SMA}$	$\alpha$ -smooth muscle actin

# ラパマイシン内包ナノ粒子による大動脈瘤形成抑制効果の検討

東京大学医学系研究科外科学専攻 血管外科

指導教員 渡邊聡明教授

白須拓郎

## 要旨

非侵襲的治療による大動脈瘤径拡大の抑制は未解決の課題である。我々はラパマイシンを内包するナノ粒子を作成し、ラット腹部大動脈瘤モデルに経静脈的に全身投与したところ、大動脈瘤に選択的に集積することが確認できた。この集積には大動脈瘤の特徴的な変化が関係していると考えられた。コントロールおよび同量のラパマイシンを単独投与した実験群と比較して、ラパマイシン内包ナノ粒子投与群は有意に大動脈径拡大を抑制し、その機序には炎症細胞浸潤抑制、**matrix metalloproteinase** 活性の抑制が関与していた。以上の知見から、ラパマイシン内包ナノ粒子を用いた薬物送達は、大動脈瘤形成を抑制する有効な治療法となりうると考えられた。

## 序文

### 大動脈瘤治療の現状と問題点

大動脈瘤は破裂すると致死的な疾患であるが、自然経過とともに瘤径は拡大し、大動脈瘤径の増加とともに破裂のリスクが増大することが知られている[1, 2]。現在の大動脈瘤治療は、紡錘形の腹部大動脈瘤では瘤径 50–55mm 以上の破裂のリスクが高くなる症例には開腹もしくは後腹膜アプローチによる人工血管埋め込み術（人工血管置換術）あるいはステントグラフト内挿術の侵襲的治療が考慮される[3]。一方それに満たない小瘤径の腹部大動脈瘤に対しては多くの場合において慎重に経過観察が行われ、内科的な併存疾患のコントロールおよび禁煙以外に積極的に瘤径拡大を抑制する有効な治療法は未だに示されていない[4]。大動脈瘤の有病率は年齢とともに増加するとされ、日常臨床でしばしば遭遇する一般的な疾患であるとともに、今後の先進国を中心とした社会高齢化を見据えても重要な疾患の 1 つであるといえる[1]。一方で、全症例の 90% は喫緊の外科的治療が必要ない小瘤径の腹部大動脈瘤であるとも報告されている[4]。これらのことから、小瘤径の大動脈瘤に対する瘤径拡大抑制は、多くの患者を対象とし、かつ未解決の問題であることが分かる。これまでに動物実験やヒトにおける観察研究などで種々の薬剤による大動脈瘤径拡大の抑制に関する検討



が進められてきた[4, 5]。代表的な薬剤として、propranolol [6]、doxycycline [7]、statins [8, 9]、angiotensin-converting enzyme inhibitors [10, 11]、angiotensin-receptor blockers [12]などが挙げられる。しかし、前述のとおりいずれも臨床的に有用であるとは示されなかった。Propranolol は前向きランダム化 2 重盲検比較試験で瘤径拡大抑制効果が示されず、副作用による quality of life 低下が明らかになったため、現在のガイドラインでは推奨されていない[6]。もっとも代表的な doxycycline は数々の動物実験で matrix metalloproteinase (MMP) 活性抑制を介する大動脈瘤拡大の抑制効果が示され[7]、ヒトにおいても 6 か月の投与で血漿中 MMP-9 値[13]や大動脈瘤壁中の好中球、細胞障害性 T 細胞[14]が低下することが報告された。しかし、ヒトを対象とした 2 重盲検比較試験では有意な大動脈瘤径拡大抑制効果は示されなかった[15]。我々は、この原因の一つとして動物実験での投与量 (50–100 mg/kg) と、ヒトへの投与量 (約 2 mg/kg) の違いがあると考えた。Atorvastatin においてもラット (350–400 g) に対して 20 mg/kg で投与されており、ヒトでの一日投与量 20mg をはるかに超える量である[8]。Simvastatin の報告でもマウスに対して 50 mg/kg の投与量で、ヒトに対する投与量 5–20 mg の 100 倍以上の投与量の較差がある[9]。同様のことが angiotensin-converting enzyme inhibitor の enalapril (マウスに 10–15 mg/kg に対してヒトでは一日投与量 5–10 mg) や angiotensin-receptor blocker の losartan にも当てはまる (マウスに 40–

60 mg/kg に対してヒトでは一日投与量 25–100 mg) [12]。すなわち薬理学的に大動脈瘤拡大抑制に働くと考えられる薬物であっても、大動脈瘤組織局所での濃度が治療域に達していなければ治療効果は発揮できないと考えられる。したがって、本研究では大動脈瘤に対する薬物送達効率の向上とそれによる治療効果の可能性を検討することとした。

#### ヒト大動脈瘤の病態生理とエラスターゼ誘導腹部大動脈瘤モデル

大動脈瘤は、肉眼的には正常大動脈の 1.5 倍の大動脈径となった部位（腹部大動脈では一般的に径 30mm 以上）と定義される[16]。組織学的には、正常の大動脈組織と比較して、大動脈瘤では中膜弾性板を構成する elastin の分解や細胞外マトリックスの破壊が起こり、マクロファージなどの炎症細胞が関与した慢性炎症性変化が特徴的である。これらは結果として見られる変化であるが、大動脈瘤形成に関連するメカニズムとして、

- ・ 炎症性変化・免疫応答
- ・ 大動脈瘤壁のタンパク分解
- ・ Wall shear stress の増大

が挙げられる（図 1）。

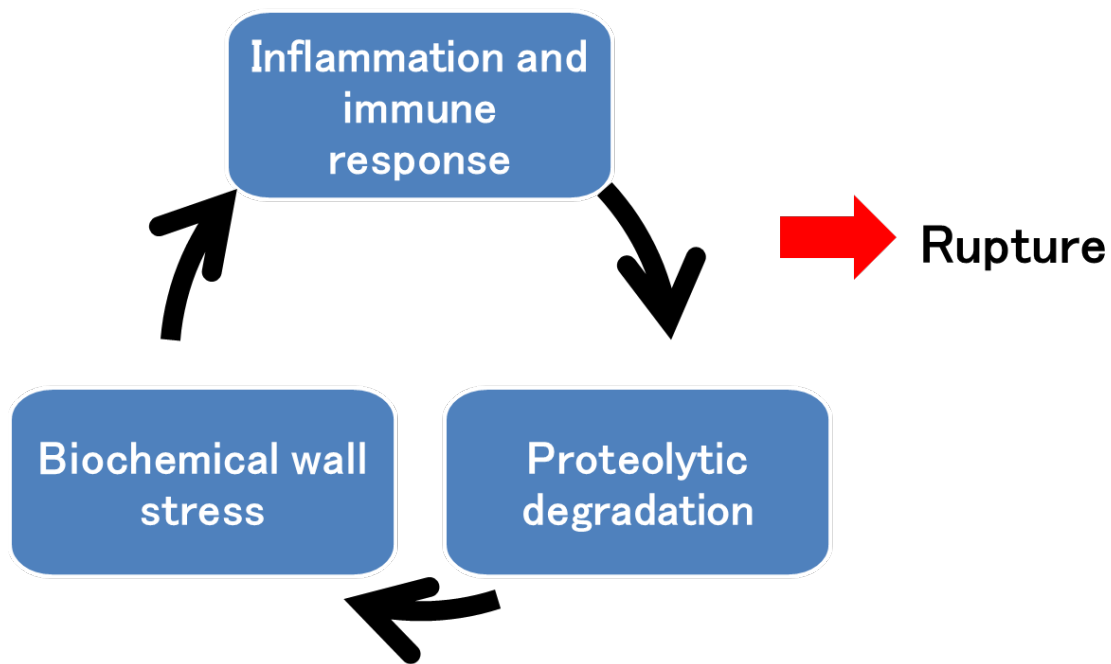


図1 大動脈瘤形成・増大のメカニズム

大動脈壁へのストレス、大動脈瘤壁局所での炎症反応、*elastin* や *collagen* などのタンパク分解の機序が循環して徐々に大動脈瘤径は拡大し、やがて破裂に至る。

すなわち何らかの機序により正常径に比較して増大した大動脈瘤壁には、慢性炎症に伴う *MMPs* や炎症性メディエーターの過剰産生が認められる[17]。また、炎症性メディエーターは平滑筋細胞、マクロファージなどに働きかけ、炎症細胞の遊走や *MMP-2* や *MMP-9* などのプロテアーゼ活性増大につながり、その結果大動脈瘤壁中の中膜に存在する *elastin* などを分解する[18–24]。*Elastin* の減少は大動脈瘤の径拡大に関連する[17]。そして、大動脈瘤径の増大に比例してストレスが増大し（ラプラスの法則 *LaPlace's law*）[25]、大動脈瘤壁へのストレスは平滑筋細胞を刺激して、*platelet-derived growth factor* 受容体を活性化させ[26, 27]、

さらなる炎症を惹起する。これらのサイクルが循環することで徐々に大動脈瘤径は拡大していく[28]。小瘤径の大動脈瘤では **elastin** の減少が見られるのみだが、瘤径の増大とともに中膜平滑筋細胞や外膜の **collagen** なども減少するようになり、大動脈壁の強度を保つ **collagen** の減少は、ついには破裂につながる[17] (図 2A、B)。

エラスターゼ誘導腹部大動脈瘤モデルは、孤立させた大動脈内にエラスターゼを持続注入して大動脈瘤を形成させるモデルである。エラスターゼ注入直後から 3 日後までは、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞などに影響を与え、**initial dilatation** が起きると考えられている[17]。その後はマクロファージなど中心的な役割を果たす持続的な炎症が起き、**IL-1 $\beta$** 、**IL-6** などの炎症性サイトカイン、**MMP-2** や **MMP-9** などのプロテアーゼが関連して弾性板や外膜の膠原繊維の破壊が徐々に進行し、7-14 日目までに大動脈瘤を形成する[29]。大動脈瘤壁内の炎症性変化、組織学的変化などヒトの大動脈瘤と多くの類似点を持つとされ、広く動物実験に用いられている。

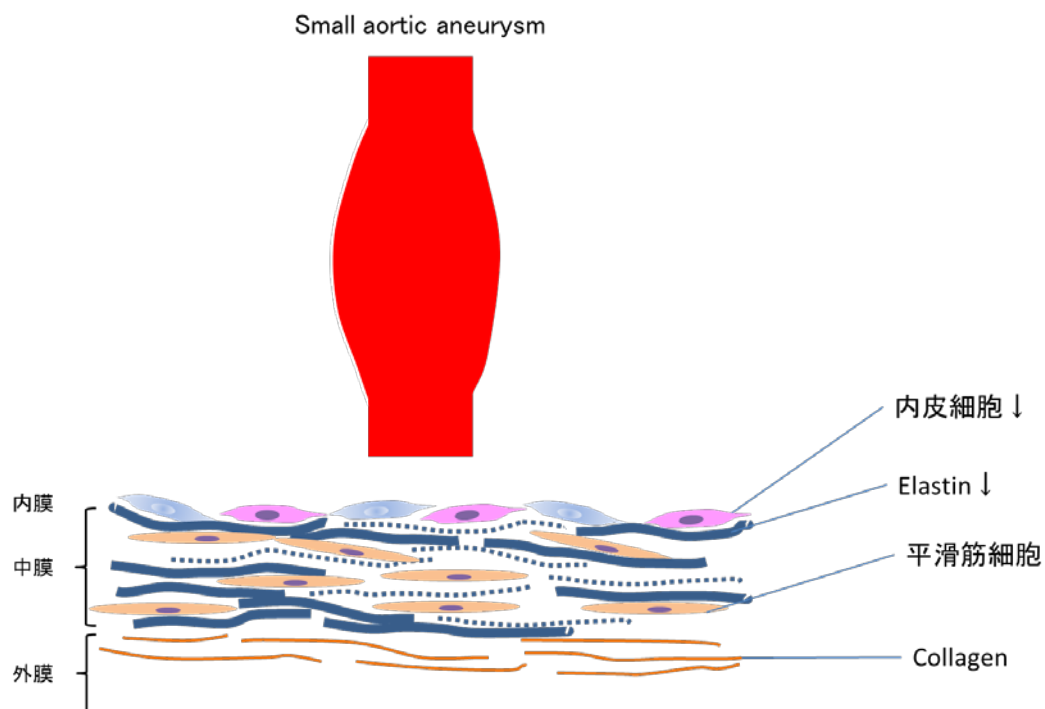


図 2A 小瘤径の大動脈瘤

Elastin の減少が見られるが、平滑筋細胞や collagen は比較的保たれる。

Curr Probl Surg 39(2):110-230:2002 より改変して作成。

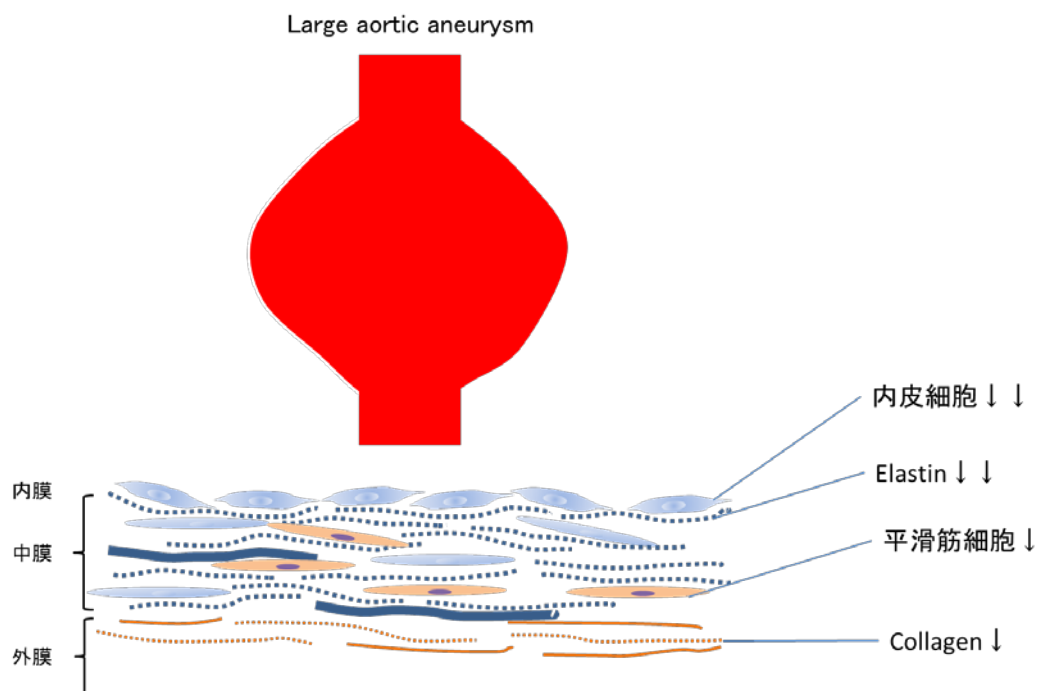


図 2B 瘤径の大きな大動脈瘤

Elastin はほぼ消失し、平滑筋細胞や collagen も減少している。

Curr Probl Surg 39(2):110-230:2002 より改変して作成。

## ナノ粒子による大動脈瘤治療の可能性

ナノ粒子は、主に腫瘍を標的としたドラッグデリバリーシステム (drug delivery system, DDS) の手法として近年盛んに報告されており、既存の薬物をより効率的に標的臓器に届けることによって、治療効果を増大させ、副作用を低減することが期待されている手法である[30]。一般に大動脈壁への血流は、内膜から中膜内層までは大動脈内腔からの血流によって支配され、中膜外層から外膜にかけては血管の栄養血管 (vasa vasorum) によって支配される[17]。大動脈瘤壁への血流支配に関しては、組織学的な変化としての内膜の脱落、弾性板の破壊、細胞外マトリックスの破壊や大動脈瘤に特徴的な medial neovascularization の増生などが関連すると考えられる[17, 28]。このような大動脈瘤組織における特徴的な構造破壊はナノ粒子の集積向上に寄与すると我々は考えた。また、大動脈瘤壁には腫瘍に対するナノ粒子による選択的な薬物送達の機序として考えられている enhanced permeability and retention (EPR) 効果と類似した環境も形成されていると想定された。EPR 効果は、腫瘍局所での血管透過性亢進と、未発達なリンパ管のためにナノ粒子が腫瘍局所に集積しやすくなる現象を説明したものであるが[30]、大動脈瘤の慢性炎症に伴う大動脈瘤壁内の血管透過性亢進は、この機序の一端を再現している可能性があると考えられる。このような大動脈瘤における構造破壊および慢性炎症に伴う血管透過性亢進は大動脈瘤におけるナ

ノ粒子の集積性向上に寄与しうるとの仮説の上、ナノ粒子による大動脈瘤に選択的な DDS の可能性およびそれによる薬剤単独投与と比較した治療効果の増強に関して検討することとした。

### ラパマイシンおよびナノ粒子の特徴

今回我々が用いた薬物であるラパマイシン(rapamycin もしくは sirolimus)は、Suren Sehgal らによってイースター島（ポリネシア語で Rapa Nui）の土壌中にいた *Streptomyces hygroscopicus* という放線菌から産生される化合物として発見された[31]。抗真菌薬としての活性[32]や免疫抑制作用[33, 34]が発見され、現在ではラパマイシンは mammalian target of rapamycin (mTOR)に作用し、細胞の成長や増殖、細胞の代謝、autophagy や angiogenesis に関わる細胞内シグナル伝達の中心的な経路を阻害することが分かっている[35]。臨床応用としては腎移植後の免疫抑制剤や冠動脈ステントへの塗布が有名であるが、ラパマイシンは疎水性が強く、これまでは主に経口的に投与されていた。大動脈瘤との関連では、ラットの動物実験において、mTOR 阻害作用から NF- $\kappa$ B、MMP-9 発現抑制を介して大動脈瘤形成を抑制することが報告されている[36]。

我々の用いるナノ粒子は、両親媒性のブロック共重合体を主に疎水性相互作用により自己組織化させるもので、内側に疎水性セグメントを、外側に親水性

セグメントを有する[30]。これまでに動物実験での大動脈瘤径拡大抑制効果の報告がある薬物の内、疎水性の高いラパマイシンをナノ粒子に内包させることで安定したナノ粒子が形成できると考えた(図3)。また、以前の検討で40nm、100nm、200nmの粒子径を持つナノ粒子の比較で、100nmの粒子が最も腹部大動脈瘤に有効に集積するという結果があり(unpublished data)、本研究では100nmに近い粒子径のナノ粒子を作成することとした。

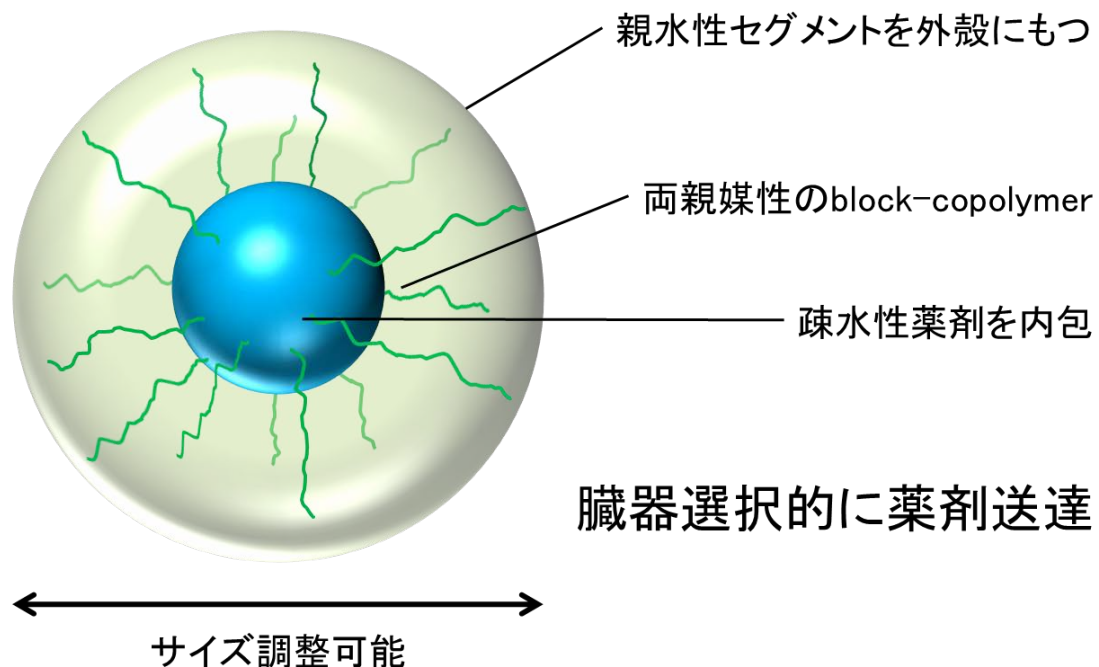


図3 ナノ粒子の模式図

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構造となる。疎水性薬剤は内部に物理封入される。

#### 大動脈瘤に対する薬物療法の意義

大動脈瘤増大の過程で elastin や中膜平滑筋細胞、collagen の量は減少する。一



般に collagen の量が減少し、破裂リスクが急速に増大する閾値は腹部大動脈瘤の手術適応と考えられている瘤径 50–55mm に一致する[17]。一方で 30–50mm の小瘤径の大動脈瘤では拡張速度は比較的緩徐であり、この時期に拡大抑制の治療効果が発揮されることは臨床的意義が大きい。すなわち、腹部大動脈瘤に対する侵襲的治療が 70 歳代で多く行われている事を考慮すると、破裂のリスクが少ない瘤径で安全に保存的治療を行うことができることによる患者負担、医療経済的な側面でのメリットが挙げられる。また、治療手段の限られた現状ではスクリーニング検査による小瘤径腹部大動脈瘤の発見の有用性には疑問が残るが[37, 38]、薬物療法の実現によりその意義を変える可能性がある。

## 本研究の概要

腹部大動脈瘤に対する薬物治療はこれまで様々なものが試されてきたが、薬剤単独による治療では限界があった。DDS の工夫によって効率的な治療実現の可能性があると考え、我々はラパマイシンを内包したナノ粒子を作成した。ラパマイシン内包ナノ粒子の安定性を確認した上で、①ナノ粒子が大動脈瘤組織に選択的に集積するか、②ナノ粒子によって大動脈瘤径拡大が抑制されるか、に関して検討した。また、そのメカニズムに関して組織学的検討を中心に詳細に考察した。

## 実験 1. ラパマイシン内包ナノ粒子の大動脈瘤への集積に関する検討

### <方法>

#### 実験動物

ラットは生後 7-8 週で体重 300-350g のオス SD ラット (specific pathogen free [SPF]/ virus antibody free) を日本チャールズ・リバー株式会社から購入した。恒温環境 ( $22 \pm 1$  °C)、SPF 条件下で、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き実施した。

#### Poly(ethylene glycol)-*b*-poly( $\gamma$ -benzyl L-glutamate)の合成

Poly(ethylene glycol)-*b*-poly( $\gamma$ -benzyl L-glutamate) (PEG-*b*-PBLG) は既報の方法で合成した (number-average molecular weight = 21000, polydispersity index = 1.04, degree of polymerization in PBLG segment = 41) [39-42]。

ベンゼン凍結乾燥にて水分を除去した PEG-NH<sub>2</sub> ( $M_w$ :12K、 200 mg 、  $0.67 \times 10^{-2}$  mmol)へ 2 mL の *N,N*-dimethylformamide (DMF) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)を加え、末端まで完全に溶解させるため、35°C 下で 2 時間ほど

攪拌した。N-carboxy anhydride of  $\gamma$ -benzyl L-glutamate (BLG-NCA) (Chuo Kaseihin Co. Inc., Tokyo, Japan) を 220 mg (0.84 mmol, 50 equiv) 計量し、DMF 2 mL を加えて溶解させた後、シリンジ操作にて素早く PEG 溶液を入れたナスフラスコに加えた。重合反応は 35°C で 24 時間行った。NCA の計量を含め、全ての操作はアルゴン下で行った。重合溶液を大過剰量のエーテル中に再沈殿（室温）させて重合を停止した後、沈殿したポリマーを吸引濾過した。次に減圧乾燥を行い PEG-*b*-PBLG を回収した。PEG-*b*-PBLG の物性と化学構造は、DMF 系ゲル浸透クロマトグラフィーおよび  $^1\text{H}$ -nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$ -NMR) 測定により確認した。 $^1\text{H}$ -NMR の測定は、JNM-ECS 400 (400 MHz) (Jeol Resonance Inc., Tokyo, Japan) を用いて実施した。測定には標準試薬としてのテトラメチルシラン (0.05wt%) を含む dimethyl sulfoxide (DMSO)- $d_6$  を使用し、測定温度 22°C、積算回数 64 回の条件を用いた。

#### ラパマイシン内包ナノ粒子の合成と評価

PEG-*b*-PBLG (25mg) とラパマイシン (25mg) (LC Laboratories, MA, USA) を DMF (1mL) 中に溶解させ 24 時間攪拌した。その後、上記の混合溶液を激しく攪拌させた純水 (49mL) に滴下させ、ラパマイシンを内包させたナノ粒子を形成させた。得られたナノ粒子は透析膜 (Spectra/Por® 6 membrane; MWCO, 3500)

(Spectrum Laboratories Inc., CA, USA)を用いた粗精製した後、さらに遠心限外濾過 (Vivaspin 6) (Sartorius AG, Göttingen, Germany)を用いて精製した。ナノ粒子に内包されたラパマイシンの濃度に関しては、ストック溶液から 1.0mL を採取し、凍結乾燥の後に  $^1\text{H-NMR}$  測定を行うことで定量した。 $^1\text{H-NMR}$  を用いてポリマーの合成ならびに PEG のピークの面積値とラパマシンのピークの面積値を比較し、ラパマシンの濃度を決定した。粒子径分析は Zetasizer® (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK)を用いて動的光散乱法にて行った。

#### Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子の合成

PEG-*b*-PBLG の  $\omega$  末端のアミノ基残基に対して Alexa647 succinimidyl esters (Invitrogen Corp., CA, USA)を反応させることにより、蛍光ラベル化ポリマー (Alexa647-PEG-*b*-PBLG) を調製した。前項と同様に Alexa647-PEG-*b*-PBLG とラパマイシンから構成される Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子を作成した。透析による粗精製、限外濾過も同様に行った。

## ラットエラスターゼ誘導腹部大動脈瘤モデルの作成

Anidjar と Dobrin により報告されたエラスターゼ誘導腹部大動脈瘤モデルを用いた[43, 44]。2% イソフルラン吸入下に腹部正中切開で開腹し、下行結腸を外側から授動、後腹膜を切開して腎動脈下腹部大動脈に到達した。大動脈終末部までを周囲から剥離し、腰動脈などの分枝はすべて結紮した。続いて右鼠径部の皮膚切開から右伏在動脈をテーピングし、ここから PE-10 チューブを挿入して先端を大動脈内に誘導した。チューブ先端の上下を絹糸で結紮し、10mm の腎動脈下腹部大動脈を完全に孤立させた。ブタ膵臓由来エラスターゼ (E-1250, Type I; Sigma-Aldrich) 2.7 単位を 0.27mL の PBS (phosphate buffered saline) に溶解し、0.9 時間かけてマイクロシリンジポンプを用いて持続注入した。持続注入後、大動脈の結紮糸を外し、PE-10 チューブを抜去、止血・閉創してモデル作成とした (図 4)。

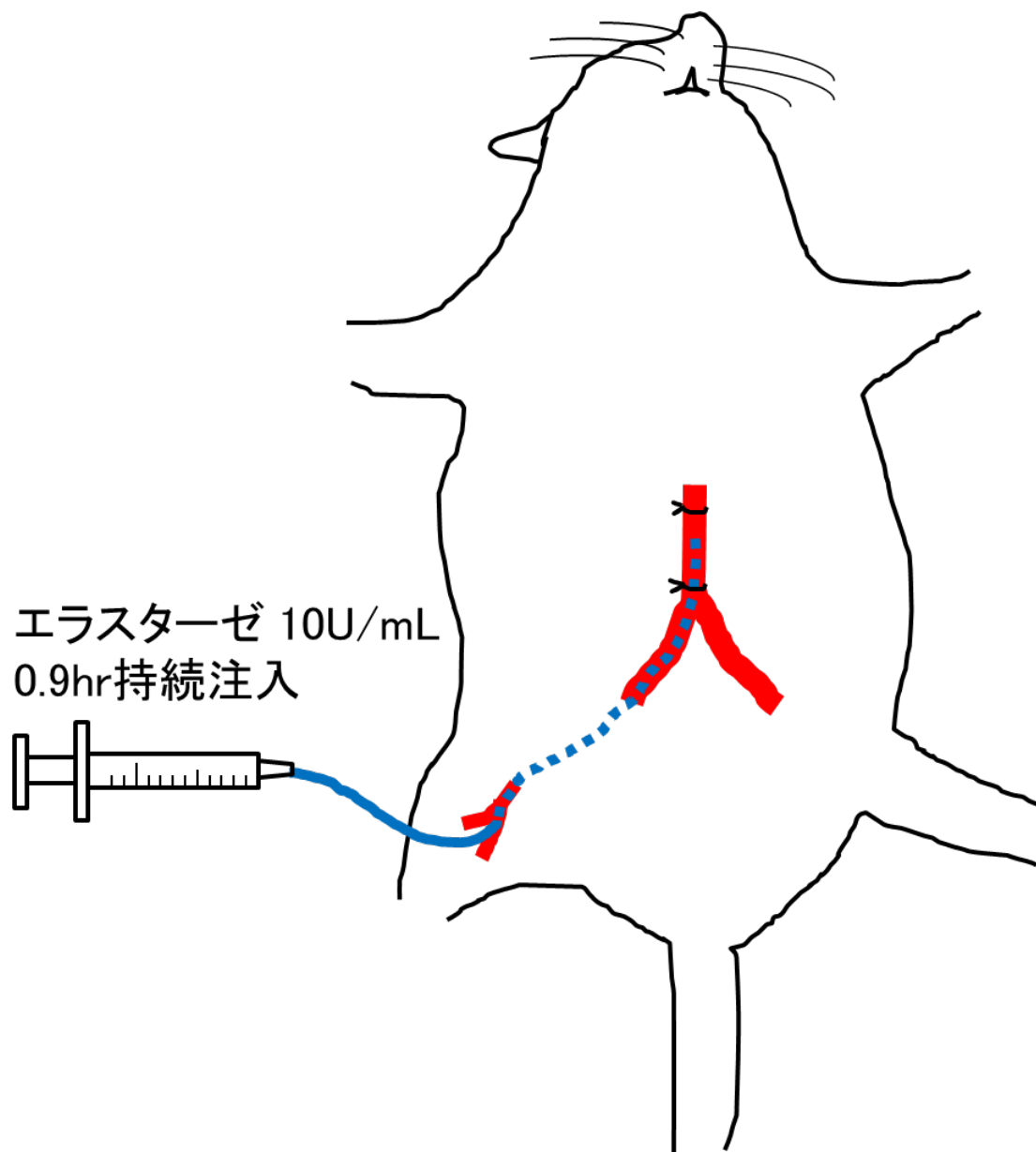


図4 ラットエラスターゼ誘導腹部大動脈瘤モデル

右伏在動脈から PE-10 チューブを挿入し、先端を周囲から孤立した腎動脈下腹部大動脈内に留置し、ブタ膵臓由来エラスターゼ 10 単位/mL、0.27mL を 0.9 時間かけて注入する。

### 薬剤投与および検体採取

Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子を用いた大動脈瘤への集積性の評価では、エラスターゼ注入後 7 日経過し、大動脈瘤が形成されたモデルを実験対象とした。

Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子は、その蛍光強度(relative fluorescence units)が一定になるように PBS で希釈し、モデル作成後 7 日目のモデルの外側尾静脈から経静脈投与した(投与量=500 $\mu$ L、n = 19)。投与後 1 (n=4)、4 (n=4)、8 (n=4)、16 (n=3)、24 時間 (n=4) のタイムポイントにおいて過量麻酔にてラットを犠牲死させ、続けてヘパリン処理を施したシリンジを用いて右心房より 5mL の血液を採取した。次に、上行大動脈から両側総腸骨動脈までを一塊に切除し、血管内に血液が残らないように PBS で愛護的に洗浄した。コントロールの検体は、モデル作成後 7 日目に薬剤を投与しない点以外は同様に取り扱った。

### In vivo イメージングシステムでの大動脈検体の評価

大動脈瘤に対するナノ粒子の集積性の評価には、IVIS® imaging system (Xenogen, CA, USA)を使用した。前述の手法によって採取した各大動脈の検体は

腹側が上方になるようにして装置内へ並べた。測定には Excitation を 640nm、Emission を 680nm、撮影時間として 5 秒の撮像条件を用いた。

#### 大動脈検体ホモジネートの蛍光強度測定

測定には Infinite® M 1000 Pro (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) を用いた。検体採取および準備は次のように実施した。ヘパリン加シリンジで採取した血液は、遠心分離（4°C、2100G、5 分を 2 回）によって速やかに血漿成分を分離させた。血漿消失率（plasma clearance, % dose / mL plasma）は、 $\alpha$  相（分布相）および  $\beta$  相（消失相）に分けて推定した（分割法）[45]。大動脈切除検体は、胸部下行大動脈および大動脈瘤を切り出してそれぞれの重量（ $W_{\text{sample}}$  [g]）を測定した後、1000 $\mu$ L の passive lysis buffer (E194A, Promega Corp., WI, USA) と混合し、マルチビーズショッカー® (Yasui Kikai Co., Osaka, Japan) を用いてホモジネート（2000rpm、30 秒、3 回）させた。その後、遠心分離（4°C、2000rpm、5 分間）を用いて浮遊成分を分離し、上清を回収した。血漿およびホモジネートされた液体を 96 ウェルマイクロプレートに 100 $\mu$ L ずつ分収し、Infinite® M 1000 Pro を用いて測定した（Excitation, 652nm; Emission, 668; Gain, 血漿は 145、大動脈検体ホモジネートは 210）。測定した値を  $A_{\text{sample}}$  とし、コントロールの検体の測定



値および重量 (g) をそれぞれ  $A_{\text{control}}$  および  $W_{\text{control}}$  として、下記計算式で組織重量 1g 当たりの adjusted absorbance value を計算した。

式

$$\text{Adjusted absorbance value} = (A_{\text{sample}} / W_{\text{sample}}) - (A_{\text{control}} / W_{\text{control}})$$

#### 共焦点レーザースキャン顕微鏡での大動脈検体の評価

「ラットエラスターゼ誘導腹部大動脈瘤モデルの作成」に従って別途作成したラットモデル 3 匹に対して、モデル作成後 7 日目に Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子を投与し、24 時間後に大動脈瘤の検体を切除した。検体は O.C.T Compound (Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan) に包埋し、液体窒素で凍結させ、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。厚さ  $10\text{ }\mu\text{m}$  に薄切し、Hoechst 33342 (H1399, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) を用いて、室温で 1 分間核染色をし、脱水、封入して共焦点レーザースキャン顕微鏡 (LSM 780<sup>®</sup>, Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いて観察した。

また、CD68 および  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) に対する免疫染色を行った。凍結ミクロトーム (CM1950, Leica, Nussloch, Germany) で厚さ  $10\mu\text{m}$  に薄切し、Blocking one (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan)を用いて非特異的反応のプロ

ック（室温、20 分間）を行った後、一次抗体に室温で 30 分間反応させた。一次抗体として抗 CD68 モノクローナル抗体 (1:100; T-3003, BMA Biomedicals, Augst, Switzerland)、抗  $\alpha$ SMA モノクローナル抗体 (1:100 ; M0851, Dako, Glostrup, Denmark)を用いた。二次抗体には Alexa Fluor® 555 標識抗マウス IgG 抗体 (1:300; ab150118, Abcam, Cambridge, UK) を用い、室温で 30 分間反応させた。Hoechst 33342 (H1399, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) を用いて、室温で 1 分間核染色をし、脱水、封入して共焦点レーザースキャン顕微鏡 (LSM 780®, Carl Zeiss, Jena, Germany) で観察した。

### CD31 に対する免疫染色

モデル作成後 7 日目に切除した大動脈瘤検体をパラフィンに包埋し、厚さ 4 $\mu$ m で切り出し、CD31 に対して免疫染色を行った。脱パラフィン処理後、Target Retrieval Solution® (S1699, Dako, Glostrup, Denmark) に浸漬し、オートクレーブ法 (120°C、10 分間) で抗原性の賦活化処理を行った。Peroxidase-Blocking Solution® (S2023, Dako, Glostrup, Denmark) で内因性ペルオキシダーゼ除去 (室温、30 分間) を、Carbo-Free Blocking Solution (SP-5040, Vector Laboratories, CA, USA) で非特異的反応のブロックを (室温、30 分間) 行い、一次抗体として抗 CD31 モノクローナル抗体 (1:100; RDI-RTcd31-3A, Fitzgerald Industries International Inc., MA,

USA) を用いて 4°C で一晩反応させた。二次抗体はビオチン標識抗マウス IgG 抗体 (1:100; B-2001, Vector Laboratories, CA, USA) を用いて室温で 60 分間反応させた。VECTASTAIN ABC kit (Vector Laboratories, CA, USA) で複合体形成を行い (室温、30 分間)、DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit (SK-4100, Vector Laboratories, CA, USA) で発色させ、hematoxylin で 45 秒間核染色し、脱水、透徹、封入した。

#### 統計学的評価

全ての統計学的検定は JMP Pro 11 (SAS Institute, NC, USA)を用いて行った。異なる 2 つの群間比較には unpaired Student's *t*-test を用いた。P 値 0.05 未満を有意とした。

#### <結果>

#### ラパマイシン内包ナノ粒子の合成

図 5 に示す Zetasizer®測定の結果ように、得られたナノ粒子は 106nm の粒径と 0.17 の粒径分散度 (polydispersity index、PDI) を有する単分散粒子であることが確認された。<sup>1</sup>H-NMR での計測から内包に利用されたラパマイシンは 82%であ

った。ラパマイシンを内包しないナノ粒子 (Ctrl、粒子径 42nm) と比較して、ラパマイシンが内包された体積に対する粒子径の増大が確認された。また、pH = 7.4、37°C、10mM NaCl の条件下でのラパマイシン内包ナノ粒子の散乱光強度 (scattered light intensity) 計測では、48 時間の安定性が確認された (図 6)。さらに、6 日目までの経過で、ナノ粒子の分解は 20% 程度であった (図 6)。本研究で調製されたラパマイシン内包ナノ粒子は生体内でも十分な安定性を発揮すると推察された。

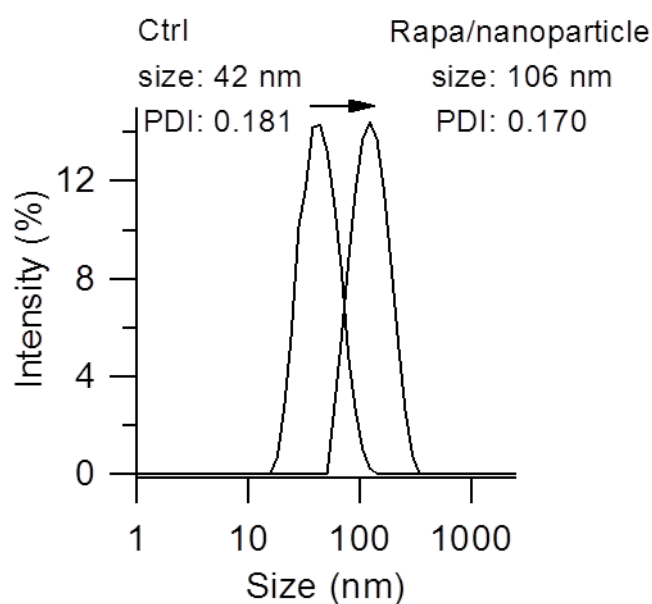


図 5 Zetasizer®による粒子径の分析

ラパマイシン内包ナノ粒子は粒子径 106nm の比較的均一な粒子であることが確認された。ラパマイシンを内包しないナノ粒子 (Ctrl) の粒子径 (42nm) と比較して、ラパマイシンが内包された体積に対する粒子径の増大が確認された。

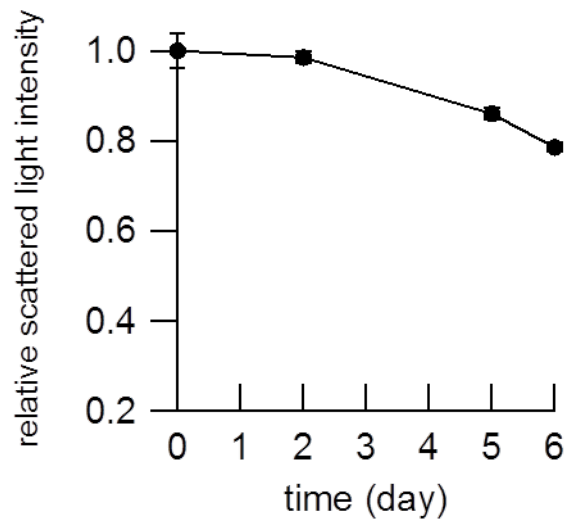


図 6 散乱光強度の経時的変化

ラパマイシン内包ナノ粒子の散乱光強度は、48 時間の安定であり、6 日目までの経過での分解は 20%程度であった。

#### Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子の合成

ナノ粒子の形成は、Alexa647-PEG-b-PBLG とラパマイシンの混合液（DMF）を純水中に滴下することで進行し、同サイズのナノ粒子が得られた。

#### 大動脈瘤へのナノ粒子の集積（*In vivo* イメージングシステム）

大動脈瘤モデルに対して経静脈的に Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子を全身投与して 1、4、8、16、24 時間後に切除した胸部大動脈から両側腸骨動脈までの一塊の検体を、IVIS® imaging system を用いて撮影した。図 7 に示すように、投与後 1 時間後では、大動脈弓部を含め大動脈切除検体全体に蛍光シグナルが観察された。投与後 4 時間では大動脈弓部および腹部大動脈瘤

に局限した集積となり、8 時間では、蛍光シグナルは腹部大動脈瘤に局限し、胸部下行大動脈には蛍光シグナルは観察されなかった。16 時間後、24 時間後においても徐々にシグナル強度は減衰してはいるものの、腹部大動脈瘤に一致して蛍光シグナルが観察された。

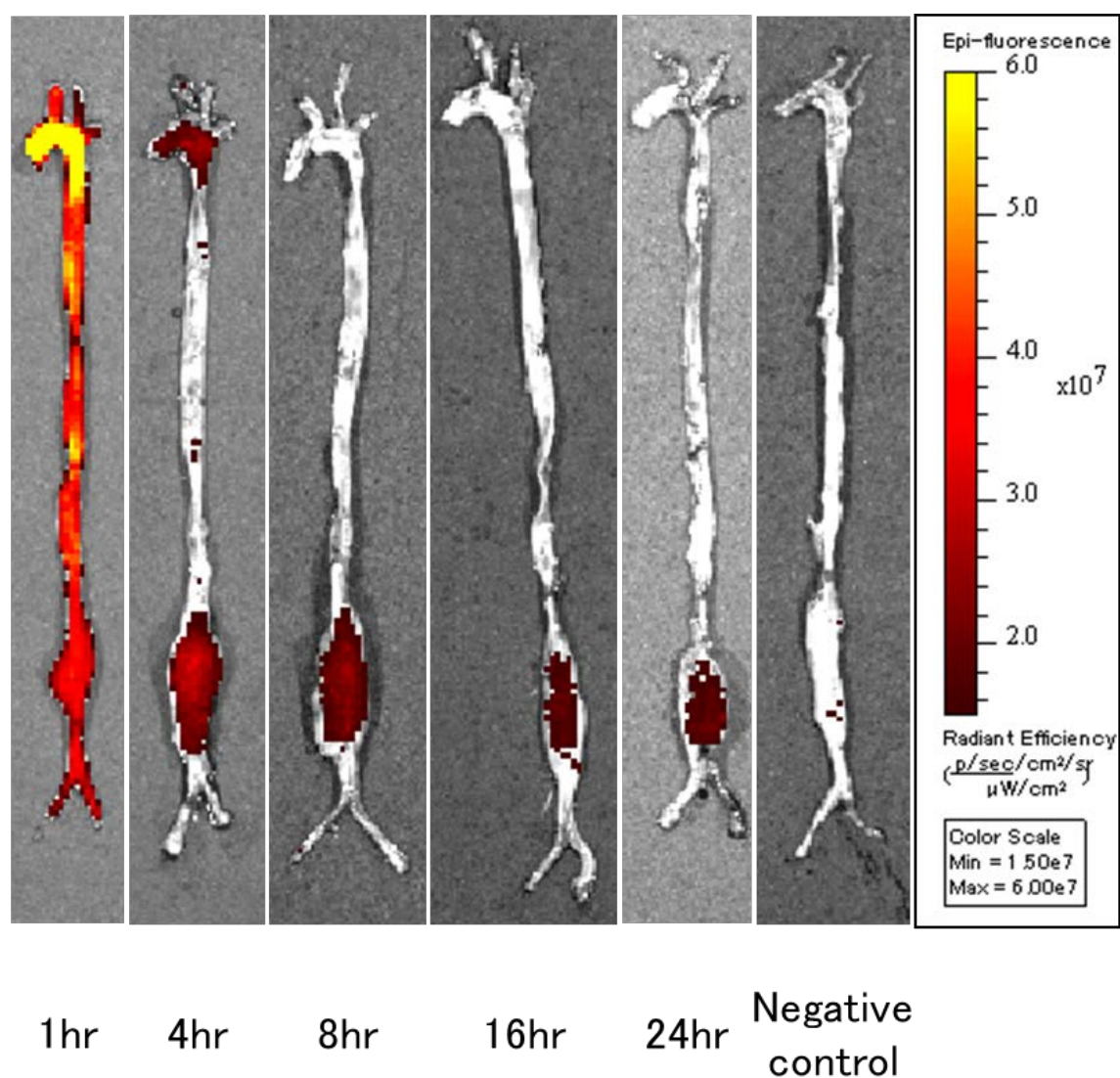


図7 Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子の大動脈への集積

投与後 1 時間では大動脈全体に蛍光シグナルが認められたが、4 時間から 24 時間までは腹部大動脈瘤に局限した蛍光シグナルが観察された。

## 大動脈検体ホモジネートの蛍光強度

Plasma clearance は図 8 のようであった。分布相の半減期 ( $t_{1/2}(\alpha)$ ) は 2.1 時間、消失相の半減期 ( $t_{1/2}(\beta)$ ) は 15.8 時間と推定された。また、10 時間時点でも投与量の 9.0% が残存し、血中滞留性は比較的良好であると考えられた。一方で血中濃度が非常に高い投与後 1 時間では蛍光物質が大動脈組織以外の vasa vasorum 中など多く存在すると考えられた。図 7 の投与後 1 時間の像で大動脈弓部や胸部大動脈などにも強い蛍光シグナルが観察されたのはこのためで、大動脈組織中濃度の分析では投与後 1 時間は除外した。

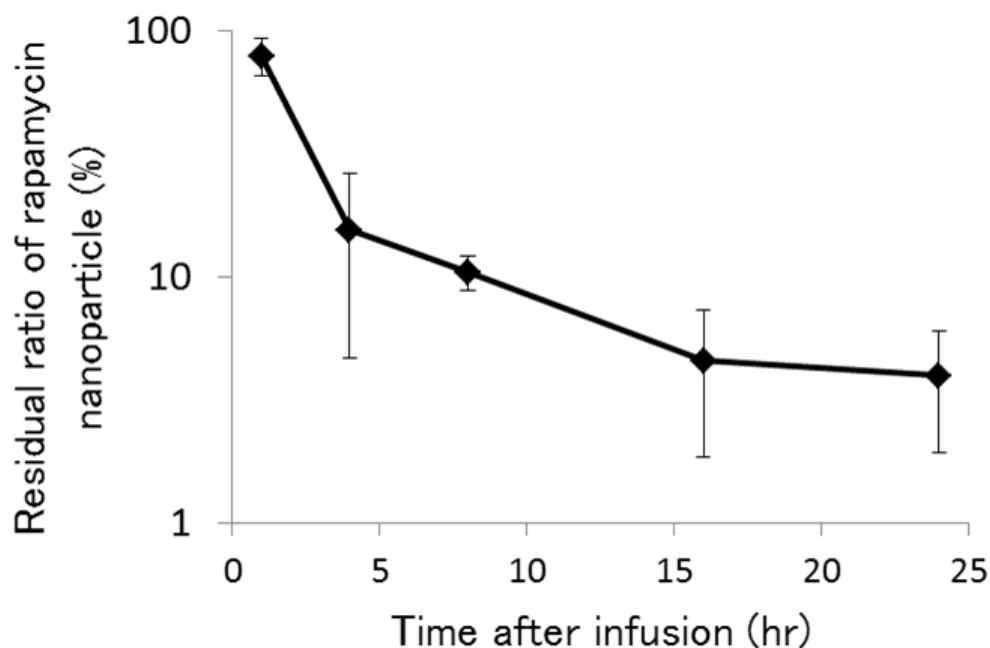


図 8 Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子投与後の plasma clearance

分布相の半減期は 2.1 時間、消失相の半減期は 15.8 時間と推定され、10 時間時点でも投与量の 9.0% が残存していた。

腹部大動脈瘤組織および正常な大動脈である胸部大動脈組織のホモジネートの蛍光強度を測定すると図 9 のようであった。投与後 4 時間では腹部大動脈瘤および胸部大動脈の間で adjusted absorbance value に差は認められなかった。胸部大動脈では血中薬物濃度の低下に呼応するように投与後 8 時間以降では蛍光シグナルが観察されなかったのに対して、腹部大動脈瘤では投与後 8 時間で遅延性のピークを示し、投与後 24 時間でも高い蛍光強度を検出した。

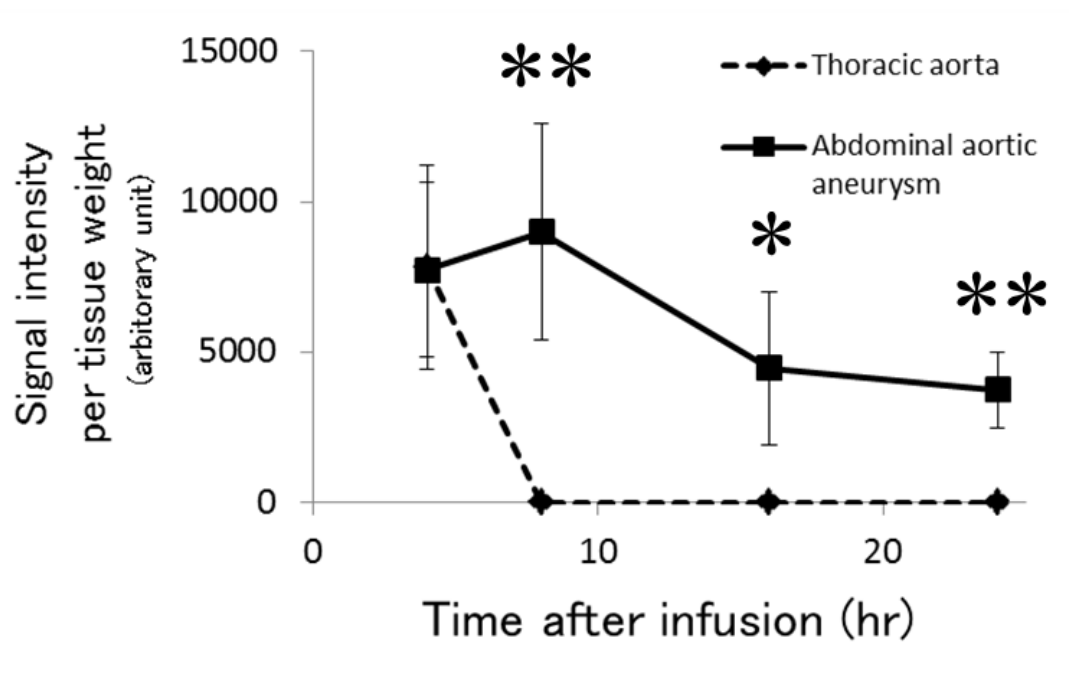


図 9 腹部大動脈瘤および胸部大動脈への Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子の集積

腹部大動脈瘤への集積は投与後 8 時間で遅延性のピークを迎え、24 時間後まで高い蛍光シグナルが検出された。同じ時間での thoracic aorta と abdominal aortic aneurysm の蛍光シグナル値の比較で、\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 。



### 大動脈瘤組織中のナノ粒子の分布（共焦点レーザースキャン顕微鏡）

モデル作成後 7 日目に Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子を投与し、24 時間後に採取した大動脈検体の薄切標本を各染色のみ行って共焦点レーザースキャン顕微鏡（LSM 780®）を用いて観察した。弾性板の破壊された領域の中膜、外膜を中心に、Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子は豊富に大動脈瘤組織内に分布していた。また、一部で弾性板の破壊が顕著ではない中膜、外膜にも Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子が観察される領域が認められた（図 10、矢印）。

次に、CD68 もしくは  $\alpha$  SMA に対する免疫染色とともに Hoechst による核染色を行い、Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子の大動脈瘤組織中での局在を詳細に検討した。図 11 に示すように大動脈瘤組織中に分布した Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子の中には CD68 陽性細胞と共局在するものが認められた。強拡大での観察で、Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子が CD68 陽性細胞内に取り込まれている様子が分かる（図 12）。一方で、Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子は  $\alpha$  SMA 陽性細胞とは共局在せず、その間隙に分布していると考えられた（図 13）。

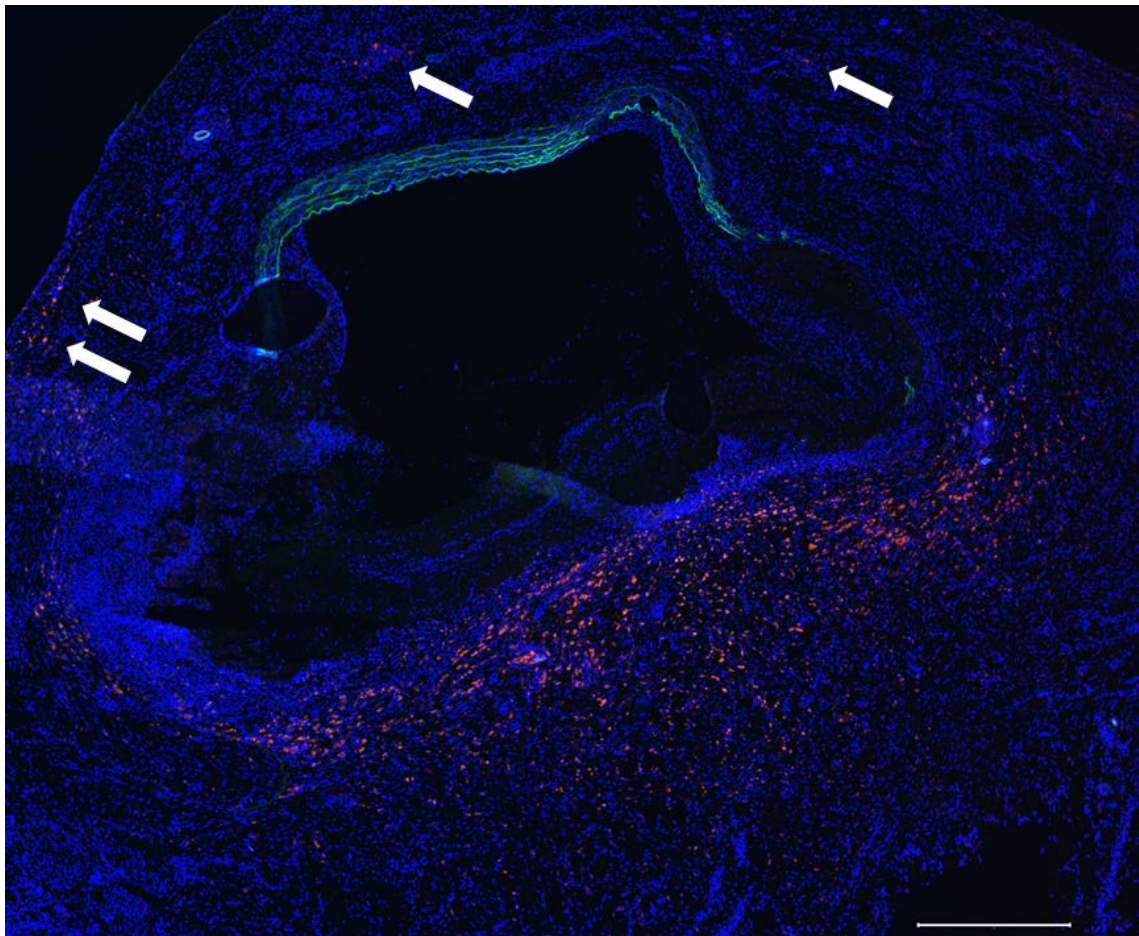


図 10 大動脈瘤組織内での Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子の局在

弾性板が破壊された中膜、外膜を中心に蛍光物質が豊富に観察された。一部、それらとは無関係な中膜、外膜にも分布していた（矢印）。

青，核；緑，弾性板；赤，Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子；スケールバー，500 $\mu$ m

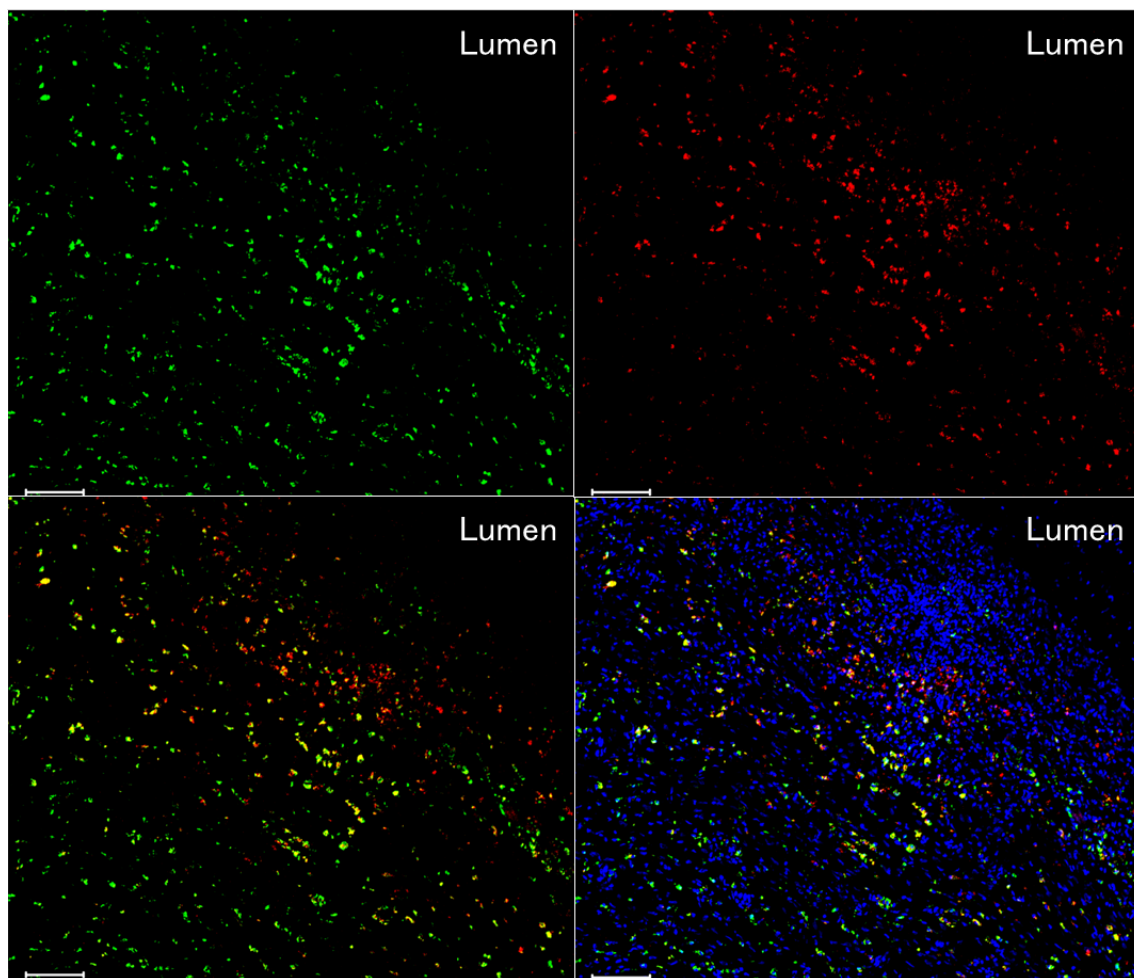


図 11 CD68 陽性細胞と Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子の共局在（弱拡大）

スケールバーは  $100\ \mu\text{m}$ 。緑は CD68 によるマクロファージの表面抗原の染色、赤は Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子、青は Hoechst による核染色を示す。左下図において、黄から橙の色調はマクロファージとラパマイシン内包ナノ粒子の共局在を示すと考えられる。

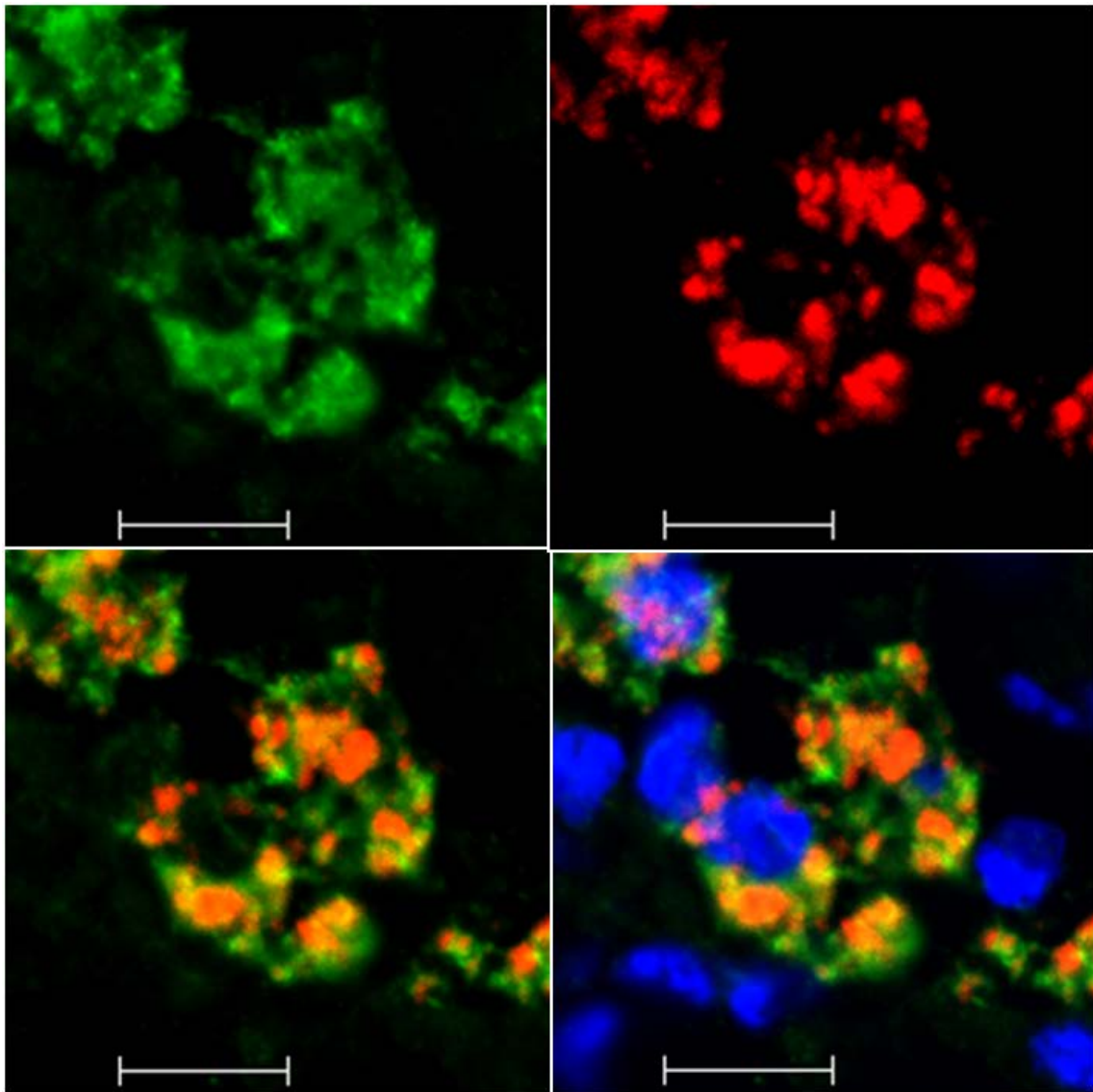


図 12 CD68 陽性細胞と Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子の共局在（強拡大）

スケールバーは 10 $\mu$ m。緑は CD68 によるマクロファージの表面抗原の染色、赤は Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子、青は Hoechst による核染色を示す。左下図において、黄から橙の色調はマクロファージとラパマイシン内包ナノ粒子の共局在を示すと考えられる。



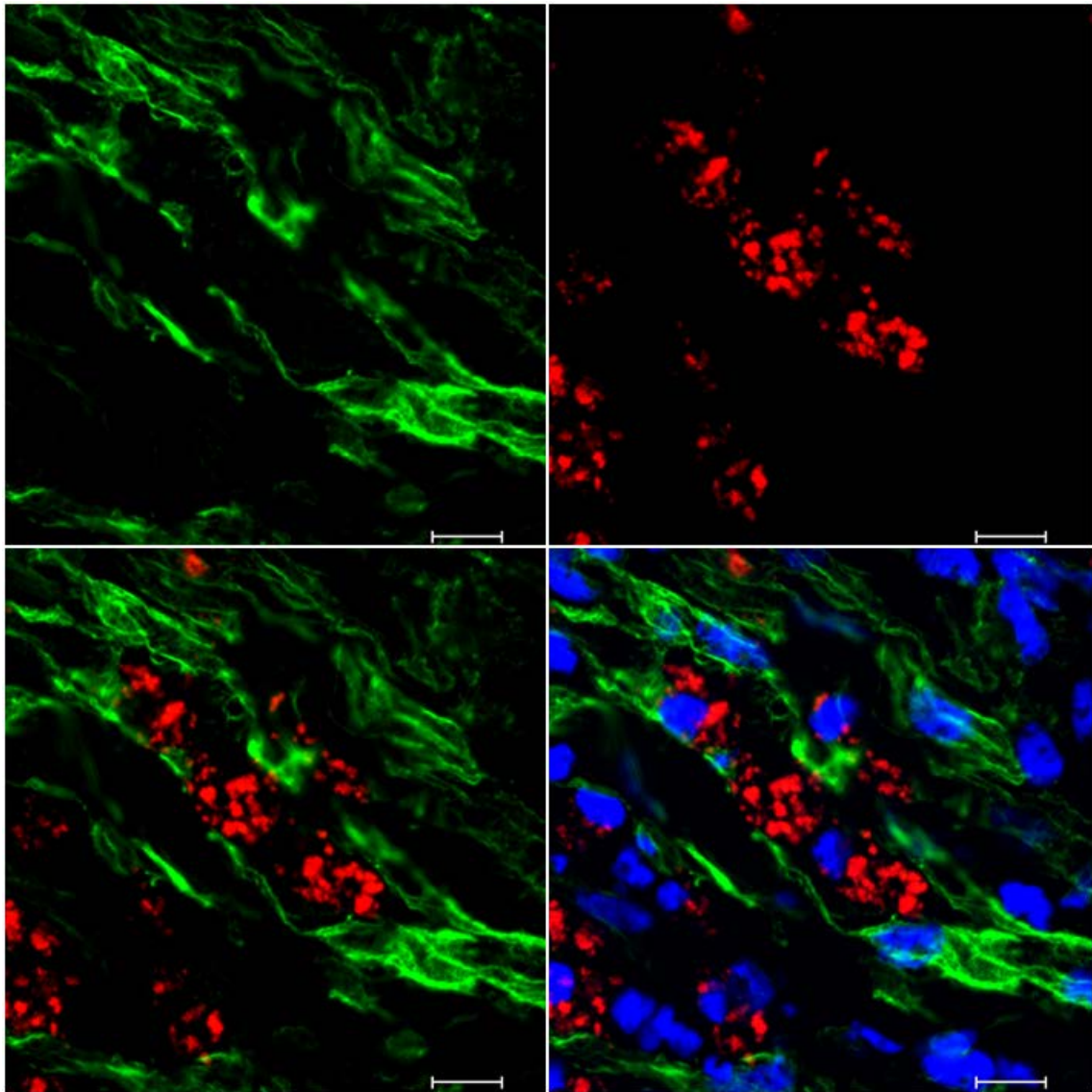


図 13  $\alpha$ SMA 陽性細胞と Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子の局在（強拡大）

スケールバーは 10 $\mu$ m。緑は  $\alpha$ SMA による平滑筋細胞の染色、赤は Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子、青は Hoechst による核染色を示す。ラパマイシン内包ナノ粒子は平滑筋細胞とは共局在せず、その間隙に局在している。

## 大動脈瘤壁内の新生血管

モデル作成後 7 日目に切除した大動脈瘤検体を、CD31 に対して免疫染色を行って観察した。図 14 に示すように CD31 で染色される微小な血管が大動脈瘤壁の中膜・外膜レベルに散見された。

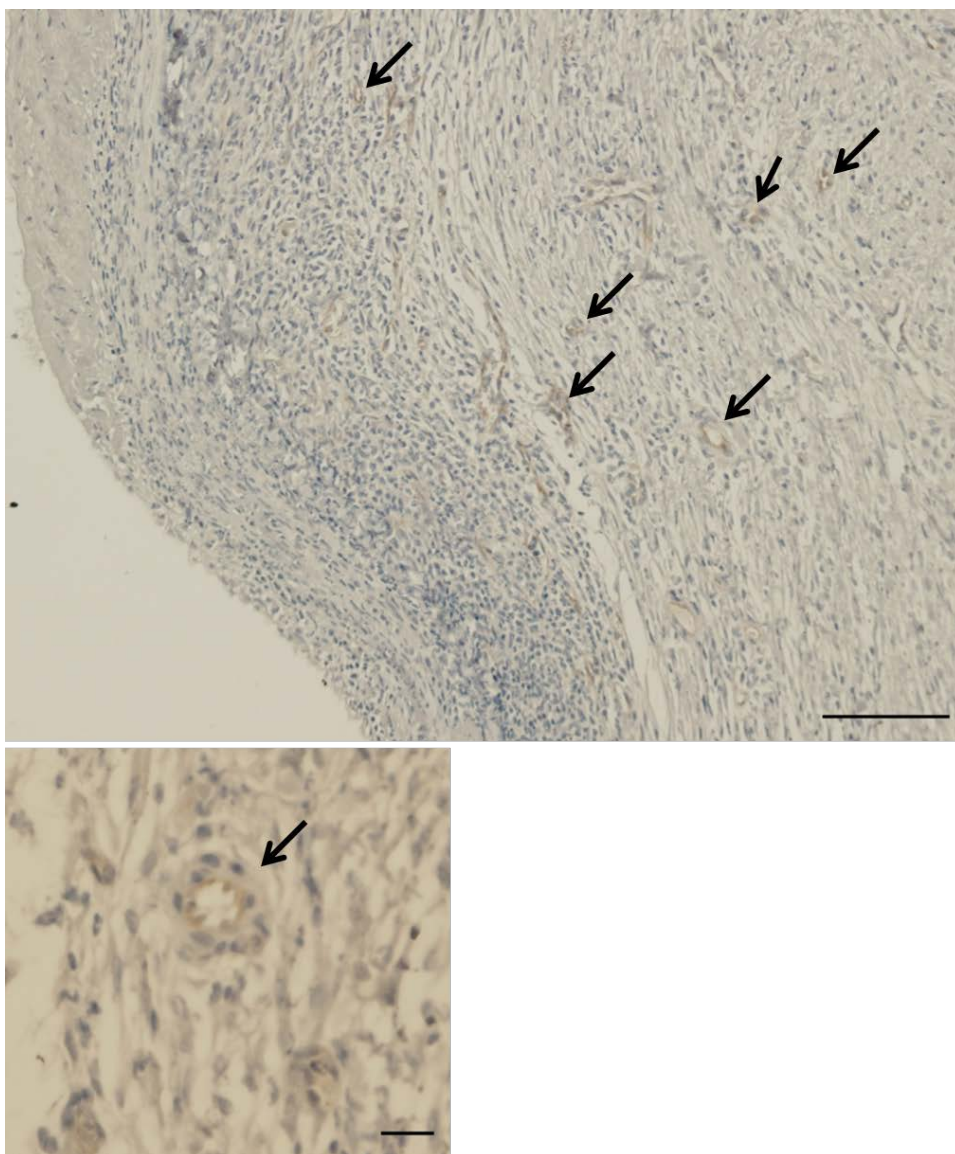


図 14 CD31 に対する免疫染色

上図；スケールバーは 100  $\mu$  m：下図；スケールバーは 20  $\mu$  m。上図で画像左下が内腔側。中膜・外膜レベルに CD31 で染色される微小な血管が散見される。

## <小括>

我々が作成したラパマイシン内包ナノ粒子は長時間安定であった。エラストマーゼ注入後7日経過して大動脈瘤が形成されたモデルに対して、Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子を用いて集積性を評価したところ、ラパマイシン内包ナノ粒子は大動脈瘤に選択的に集積し、長時間にわたって高い組織中濃度を保つと考えられた。また、ラパマイシン内包ナノ粒子は弾性板破壊が進んだ中膜、外膜などに多く分布していた。

実験 2. ラパマイシン内包ナノ粒子による大動脈瘤形成抑制効果に関する検討

<方法>

実験プロトコール

ラパマイシン内包ナノ粒子による大動脈瘤径拡大抑制効果の検討に関しては、図 15 に示すスタディーデザインとした。エラスターゼ注入前、直後およびモデル作成後 7 日目に大動脈径を測定した。薬剤投与は、day0（エラスターゼ注入後）、day2、day4、day6 の 4 回にわたって、29G 針付シリンジを用いて外側尾静脈から行った。すべての検体採取はモデル作成後 7 日目の上記手技終了後に行った。

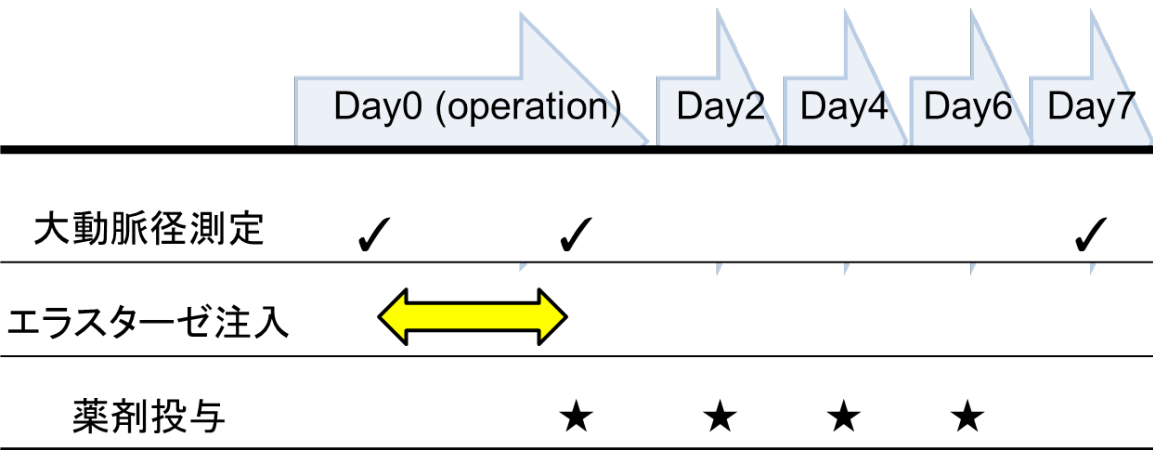


図 15 実験プロトコール

大動脈径測定はエラスターゼ注入前、直後およびモデル作成後 7 日目に行った。薬剤投与はエラスターゼ注入後（day0）、day2、day4、day6 に行った。



## 薬剤投与および検体採取

薬剤投与群は以下のような PBS、ラパマイシン単独およびラパマイシン内包ナノ粒子投与群の 5 群とし、ランダムに割り付けした。

1. PBS 1ml/kg 投与群 (PBS 群、n=5)
2. ラパマイシン単独 0.1mg/kg 投与群 (free/RAP-0.1 群、n=5)
3. ラパマイシン単独 1mg/kg 投与群 (free/RAP-1 群、n=5)
4. ラパマイシン内包ナノ粒子 0.1mg/kg 投与群 (RAP/nano-0.1 群、n=5)
5. ラパマイシン内包ナノ粒子 1mg/kg 投与群 (RAP/nano-1 群、n=5)

ここで、ラパマイシンの投与量は以前の動物実験で治療効果を示した際に用いられた用量 (1mg/kg) とヒトへの投与に相応する用量 (0.1mg/kg) に設定した[36]。

ラパマイシン単独投与は Tween 80 5%、polyethylene glycol 400 5%、ethanol 5%および deionized distilled water 85%からなる専用液で溶解し[46]、ラパマイシン内包ナノ粒子は PBS で濃度調整して 1mg/mL とし、いずれの個体に対しても容量負荷は同様となるようにした。動脈径測定は 15 倍拡大視野でキャリパー型内側マイクロメーターを用いて行った。モデル作成後 7 日目の動脈径測定後、右心房から血液を 5mL 採取し、血球計数検査および生化学検査 (aspartate aminotransferase [AST]、alanine aminotransferase [ALT]、blood urea nitrogen [BUN]、creatinine [Cre]) を測定した (DRI-CHEM®, FUJIFILM Corp., Tokyo, Japan)。胸腔

内で下大静脈を切離し、左心室を穿刺して 4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)により 120mmHg で還流固定し、動脈瘤を周囲の組織も含めて全摘出し、さらに同液で一晩固定した。動脈瘤検体の中央部を切り出しパラフィンに包埋した。

#### 大動脈瘤検体の組織学的評価

パラフィンに包埋したサンプルから厚さ 4 $\mu$ m で切り出し、hematoxylin-eosin (HE) 染色および elastica van Gieson (EVG) 染色を行った。また、パラフィン包埋検体の免疫染色は CD68 および  $\alpha$ SMA に対して行った。脱パラフィン処理後、CD68 に対する免疫染色では Target Retrieval Solution® (S1699, Dako, Glostrup, Denmark) に浸漬し、オートクレーブ法 (120°C、10 分間) で抗原性の賦活化処理を行った。 $\alpha$ SMA に対する免疫染色では 0.5%トリプシンに浸漬し、タンパク質分解酵素処理 (37°C、30 分間) で抗原性賦活化処理を行った。

Peroxidase-Blocking Solution® (S2023, Dako, Glostrup, Denmark) を用いて内因性ペルオキシダーゼ除去 (室温、30 分間) を、Carbo-Free Blocking Solution (SP-5040, Vector Laboratories, CA, USA) で非特異的反応のブロック (室温、30 分間) を行い、一次抗体として抗 CD68 モノクローナル抗体 (1:100; T-3003, BMA Biomedicals, Augst, Switzerland)、抗  $\alpha$ SMA モノクローナル抗体 (1:100 ; M0851,

Dako, Glostrup, Denmark) をそれぞれ用いて 4°C で一晩反応させた。二次抗体は  
ビオチン標識抗マウス IgG 抗体(CD68 では 1:100、 $\alpha$ SMA では 1:200; B-2001, Vector  
Laboratories, CA, USA) を用いて室温で 30–60 分間反応させた。VECTASTAIN  
ABC kit (Vector Laboratories, CA, USA) を用いて複合体形成を行い (室温、30 分  
間)、DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit (SK-4100, Vector Laboratories, CA, USA)  
で発色させ、hematoxylin で 45 秒間核染色し、脱水、透徹、封入した。

CD68 に対する免疫染色を行った検体に関して、CD68 陽性細胞密度を計算し  
た。200 倍視野で、1 スライス当たりの CD68 陽性細胞数をカウントし、検体の  
面積を Image J® (National Institutes of Health, MD, USA)を用いて計測し、以下の  
式に当てはめた。

式

$$\text{CD68 陽性細胞密度} = \text{number of CD68-positive cells} / \text{specimen area}$$

大動脈瘤検体のホモジネートを用いた zymography およびサイトカイン産生の評  
価

組織評価に用いた検体とは別に作成した大動脈瘤モデルに対して、前述と同  
様に 4 回の薬剤投与を行う群にランダム割り付けし (RAP/nano-1 群、free/RAP-1  
群、PBS 群、それぞれ n=3)、エラスターゼを注入して作成した腹部大動脈瘤を

モデル作成後 7 日目に全摘出した。大動脈瘤検体重量の 4 倍量の passive lysis buffer (E194A, Promega Corp., WI, USA)を加えてマルチビーズショッカー® (Yasui Kikai Co., Osaka, Japan)を用いてホモジネートし (2500rpm、30 秒、2 回)、遠心分離 (4 °C、3000rpm、5 分間) を行って浮遊成分を分離し、上清を回収した。タンパク定量は bicinchoninic acid (BCA)法で行った。

Zymography には Gelatin-zymography Kit (AK47、コスモ・バイオ株式会社、東京) を使用した。各ホモジネートと同量のサンプル調整バッファを混合し、15 分間室温で静置したのちに、アクリルアミド濃度 10%で、ゼラチンが 0.1%含まれるゲルの各ウェルに同重量のタンパク質を注入し、定電流で電気泳動を行った (電流 20 mA、泳動時間 100 分間)。ゲル洗浄液で 1 時間ゲルを洗浄し、酵素反应用バッファ中で 37°C で反応させた。Coomassie brilliant blue 内、室温で 30–40 分間振盪して染色し、続いて脱色液 (酢酸 : メタノール : 純水 = 10 ml : 60 ml : 130 ml) 内、室温で 30 分間の脱色を 2–3 回行った。最適なサンプル重量および酵素反応時間を見出すため、サンプル重量 (3–20 $\mu$ g) および酵素反応時間 (4–20 時間) を変更しながら予備実験を行い、最終的には 3 $\mu$ g で 20 時間反応させるプロトコールに決定した。得られたゲルを ESPER-SCANNER® (Seiko Epson Corp., Nagano, Japan)でスキャンし、Image J®を用いて定量的に評価した [46]。

サイトカインの評価では Proteome profiler<sup>TM</sup> array kit (rat cytokine array panel A, R&D Systems Inc., MN, USA)を使用した。このキットでは、免疫測定法を応用しており、各ホモジネートをビオチン化した抗体のカクテルと混合し、特定の標的に対する抗体をスポット状に付けたメンブレンとインキュベートし、化学発光させることで、対象となるサイトカイン量の相対的な大きさが分かる。総タンパク質量 250 $\mu$ g の各臓器のホモジネートを用い、抗体反応および化学発光の過程を経て得られたメンブレンを X 線フィルムに感光させ、その X 線フィルムを ESPER-SCANNER<sup>®</sup>でスキャンし、Image J<sup>®</sup>を用いて定量的に評価した[47]。

cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1, CINC-2 $\alpha/\beta$ , CINC-3, interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, interferon  $\gamma$ -induced protein 10 (IP-10), macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$ , MIP-3 $\alpha$ , regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES)を定量評価した。

### 統計学的評価

全ての統計学的検定は JMP Pro 11 (SAS Institute, NC, USA)を用いて行った。連続変数は平均値および標準偏差で表記し、コントロール群との比較は Dunnett 検定を用い、異なる 2 つの群間比較には unpaired Student's *t*-test を用いた。P 値 0.05 未満を有意とした。

## <結果>

### ナノ粒子による大動脈瘤径抑制効果

エラスターゼ注入前の大動脈径を 1 とする比 (diameter ratio) で、エラスターゼ注入直後およびモデル作成後 7 日目の大動脈径を表した (図 16)。エラスターゼ注入直後では 35–51% の大動脈径拡張 (initial dilatation) が認められ、投与薬剤別の群間に有意差は認められなかった。一方、7 日目の大動脈径において、PBS 群の拡張 (diameter ratio,  $3.0 \pm 0.4$ ) に比較して、free/RAP-1 群、RAP/nano-0.1 群および RAP/nano-1 群のいずれも有意に動脈径拡大が抑制されていた (diameter ratio: free/RAP-1 群,  $1.9 \pm 0.2$ ; RAP/nano-0.1 群,  $1.9 \pm 0.2$ ; RAP/nano-1 群,  $1.6 \pm 0.2$ ; いずれも  $p < 0.001$ )。また、同量のラパマイシンを単独のまま投与した群とナノ粒子化して投与した群、すなわち free/RAP-0.1 群に対する RAP/nano-0.1 群、free/RAP-1 群に対する RAP/nano-1 群で比較すると、どちらの比較でもナノ粒子化したラパマイシンを投与した群で有意な大動脈径拡大抑制効果が確認された (いずれも  $p < 0.01$ )。

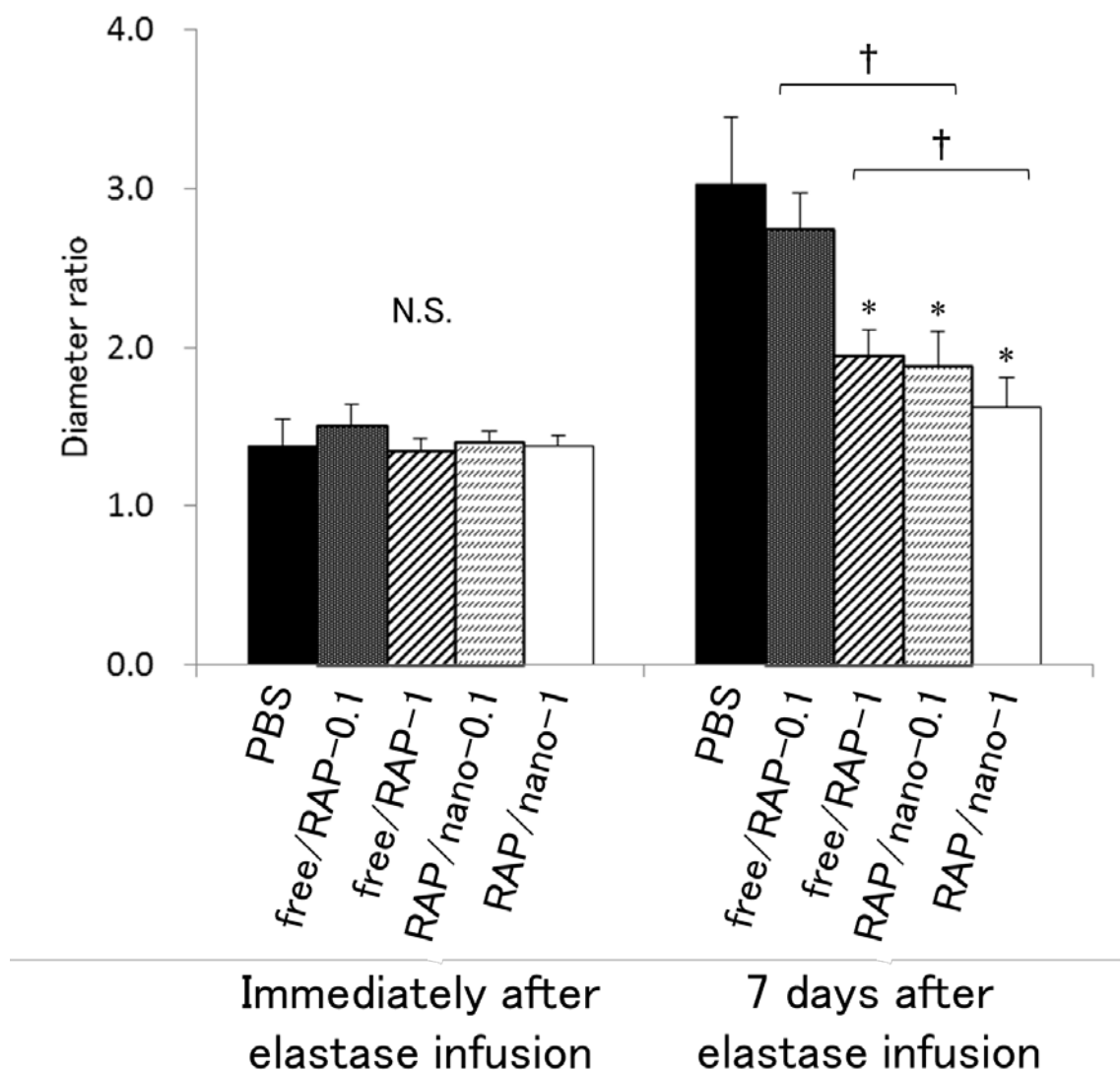


図 16 腎動脈下腹部大動脈径 (n = 6)

モデル作成後 7 日目で、free/RAP-1 群、RAP/nano-0.1 群、RAP/nano-1 群は PBS 群と比較して有意に大動脈径拡大が抑制されていた (\*). ラパマイシン内包ナノ粒子投与群では同量のラパマイシン単独投与群と比較して有意な大動脈径拡大抑制効果が示された (†).

\* PBS 群との比較で  $p < 0.001$ 、† 同量のラパマイシン内包ナノ粒子投与群とラパマイシン単独投与群の比較で  $p < 0.01$ 。

## 薬物投与による有害事象

血球計数検査および生化学検査では PBS 群に比較して free/RAP-1 群で BUN が有意に高値 ( $29.0 \pm 2.3$  mg/dL versus  $20.8 \pm 2.4$  mg/dL) を示したのみで、ラパマイシン内包ナノ粒子投与群では有意な異常値は認められなかった (表 1)。

	PBS	free/RAP-0.1	free/RAP-1	RAP/nano-0.1	RAP/nano-1
Complete blood count					
WBC, per ml	$10100 \pm 2800$	$15300 \pm 3100$	$11600 \pm 3000$	$12700 \pm 1700$	$10900 \pm 1900$
RBC, x104 per ml	$750 \pm 40$	$791 \pm 89$	$833 \pm 106$	$747 \pm 56$	$751 \pm 26$
Hb, g/dL	$14.1 \pm 0.7$	$14.5 \pm 0.8$	$15.2 \pm 1.0$	$14.5 \pm 0.9$	$14.1 \pm 0.7$
Ht, %	$41.7 \pm 2.1$	$44.1 \pm 3.5$	$45.3 \pm 3.5$	$42.4 \pm 2.8$	$42.2 \pm 1.4$
Plt, x104 per ml	$144 \pm 19$	$136 \pm 27$	$106 \pm 34$	$119 \pm 22$	$119 \pm 26$
Biochemical analysis					
AST, IU/L	$61 \pm 8$	$71 \pm 15$	$63 \pm 16$	$72 \pm 5$	$61 \pm 10$
ALT, IU/L	$23 \pm 5$	$26 \pm 4$	$24 \pm 4$	$25 \pm 4$	$25 \pm 4$
BUN, mg/dL	$20.8 \pm 2.4$	$21.7 \pm 4.2$	$29.0 \pm 2.3$ *	$22.3 \pm 3.7$	$22.6 \pm 5.6$
Cre, mg/dL	$0.4 \pm 0.2$	$0.3 \pm 0.1$	$0.2 \pm 0.2$	$0.2 \pm 0.1$	$0.2 \pm 0.1$

表 1 モデル作成後 7 日目の血球計数検査および生化学検査

WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; and Plt, platelet; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen; Cre, creatinine; \* PBS 群との比較で  $p < 0.05$



## 大動脈瘤検体の組織学的評価

HE 染色および EVG 染色の弱拡大 (20 倍) での観察においても、RAP/nano-0.1 群および RAP/nano-1 群において瘤径拡大が抑制されていることが確認され、続いて free/RAP-1 群、free/RAP-0.1 群、PBS 群の順に径が拡張していた (図 17)。また、RAP/nano-0.1 群および RAP/nano-1 群の中膜弾性板は全周において比較的良好に保たれているのに対して、free/RAP-1 群では弾性板は減少し、free/RAP-0.1 群や PBS 群では概ね消失していた。

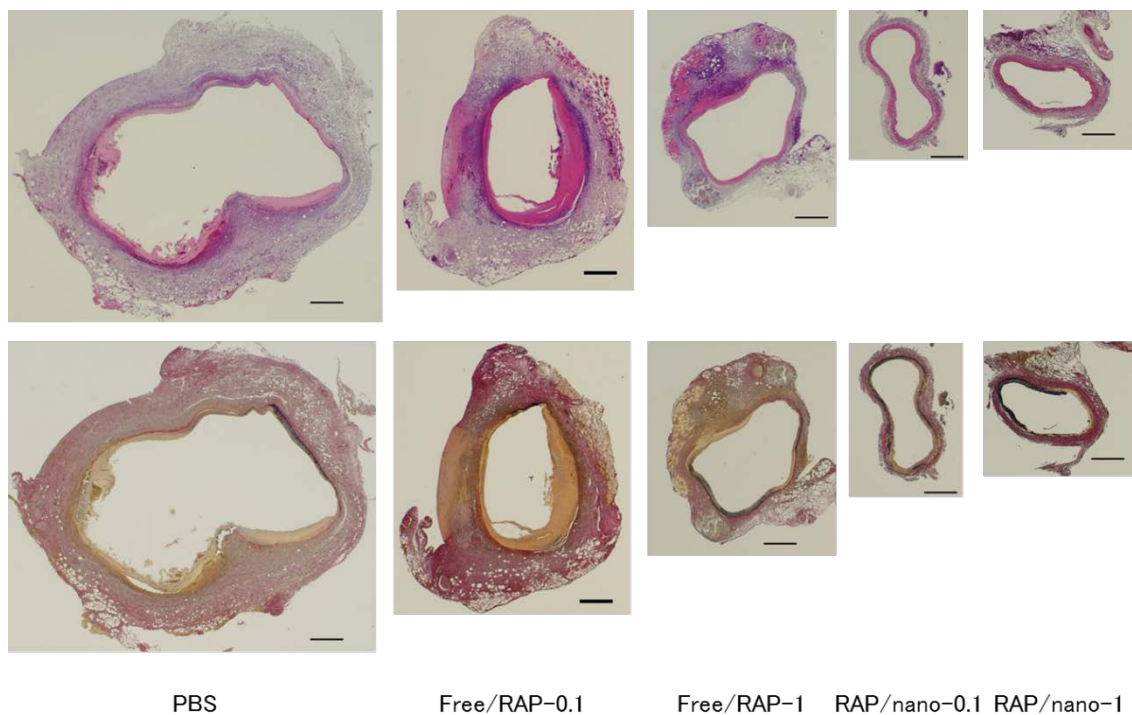
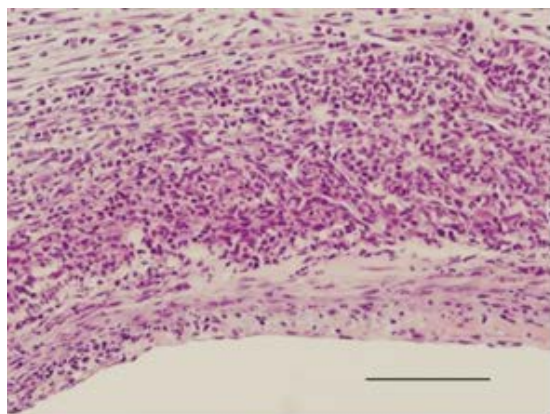


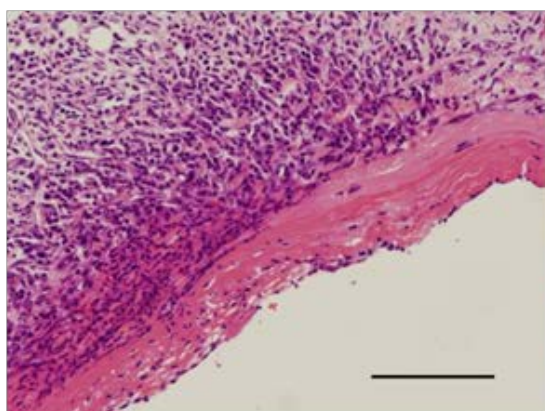
図 17 HE および EVG 染色 (弱拡大)

20 倍。スケールバーは 500 $\mu$ m。RAP/nano-0.1 群および RAP/nano-1 群では瘤径拡大が抑制され、弾性板がよく保たれている。

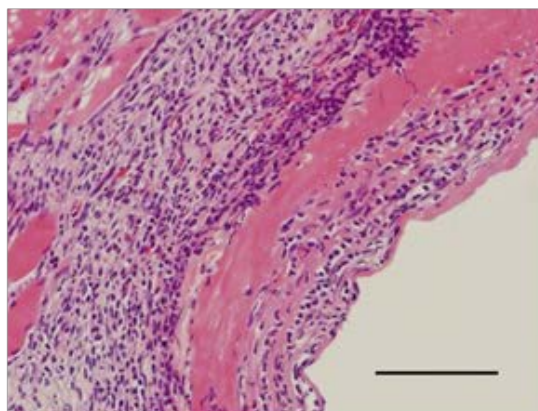
強拡大（400 倍）の所見では、RAP/nano-0.1 群および RAP/nano-1 群の中膜弾性板の層構造はよく保たれており、同部位への炎症細胞浸潤はほとんど認められなかったのに対して、free/RAP-0.1 群や free/RAP-1 群の弾性板は層構造が乱れたり、もしくは消失したりしており、それと一致するように中膜への炎症細胞浸潤が目立った。PBS 群では中膜弾性板の減少および炎症細胞浸潤が顕著であった（図 18、19）。



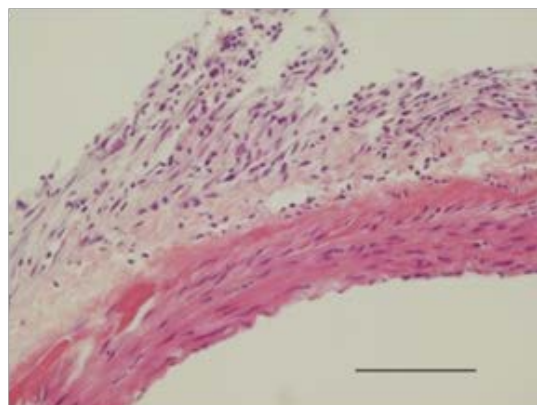
PBS



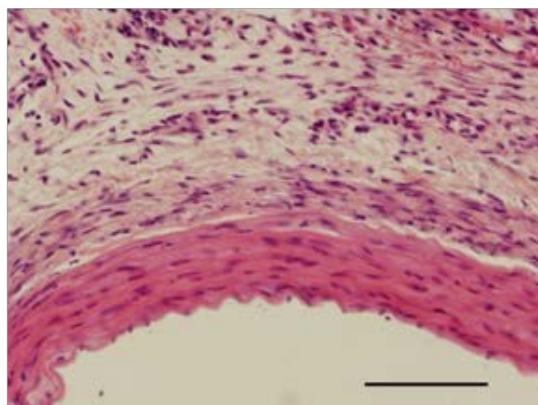
Free/RAP-0.1



Free/RAP-1



RAP/nano-0.1

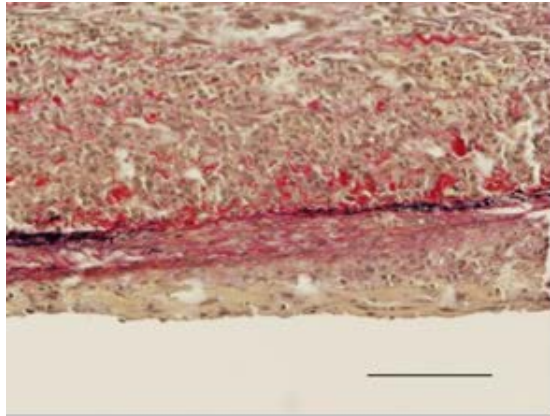


RAP/nano-1

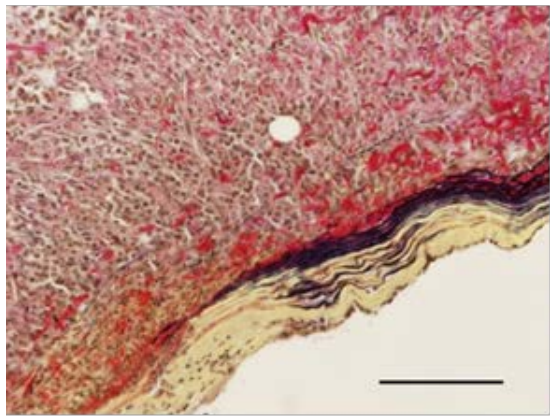
図 18 HE 染色（強拡大）

400 倍。スケールバーは 100 $\mu$ m。画像下側が内腔側、上側が外膜側。

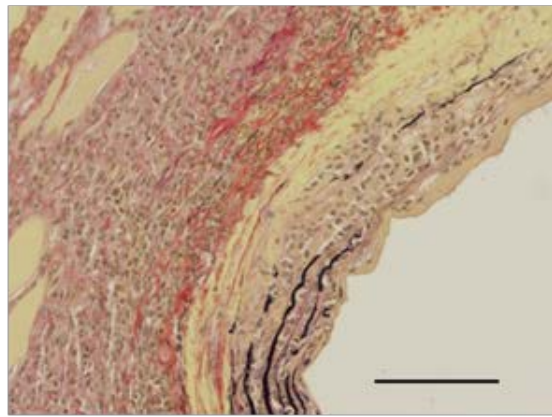
RAP/nano-0.1 群および RAP/nano-1 群では中膜への炎症細胞浸潤がほとんど認められない。



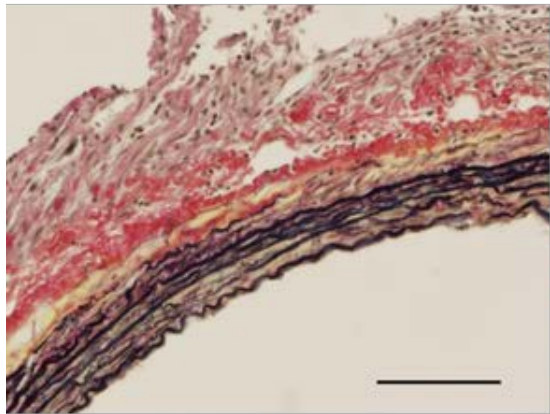
PBS



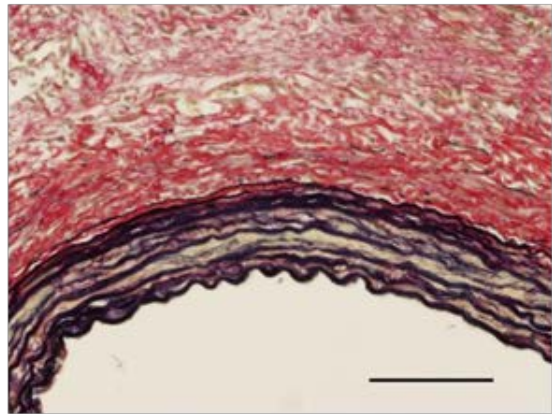
Free/RAP-0.1



Free/RAP-1



RAP/nano-0.1



RAP/nano-1

図 19 EVG 染色（強拡大）

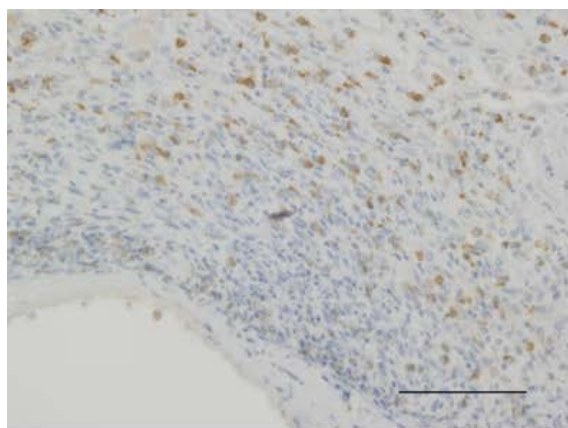
400 倍。スケールバーは 100 $\mu$ m。画像下側が内腔側、上側が外膜側。

RAP/nano-0.1 群および RAP/nano-1 群では中膜の弾性板の乱れも少なく、良く保たれている。

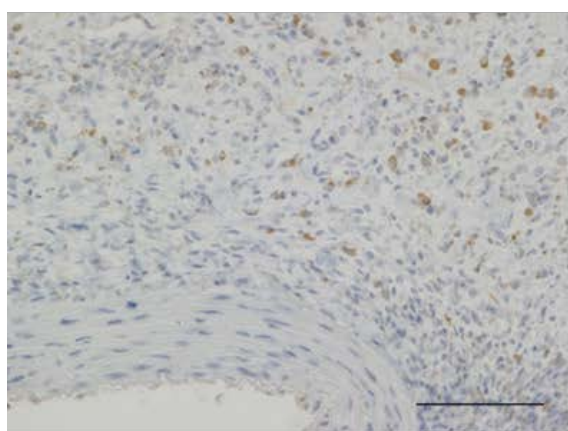


続いて、CD68 に対する免疫染色で大動脈組織中へのマクロファージの浸潤を評価した（各群 n = 4）。RAP/nano-0.1 群および RAP/nano-1 群では CD68 陽性細胞は中膜に散見されるのみであったが、PBS 群、free/RAP-0.1 群、free/RAP-1 群では中膜、外膜を中心に多くの CD68 陽性細胞が観察された（図 20）。CD68 陽性細胞密度は図 21 のように表され、RAP/nano-0.1 群および RAP/nano-1 群では PBS 群に比較して有意に CD68 陽性細胞の浸潤が少なかった（ $p < 0.05$ ）。

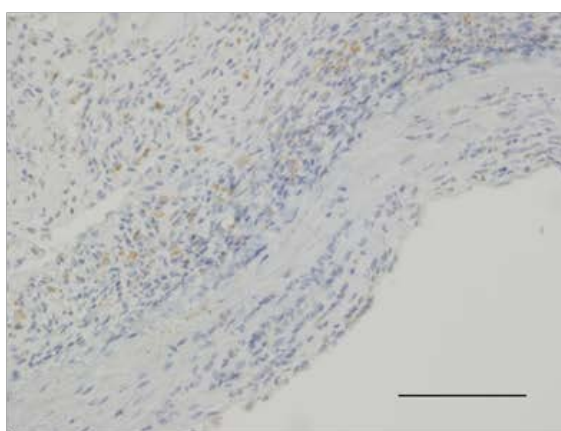
中膜平滑筋細胞の観察のために  $\alpha$ SMA に対する免疫染色を行った（各群 n = 4）。RAP/nano-0.1 群および RAP/nano-1 群では  $\alpha$ SMA 陽性細胞が保たれている様子が観察されたが、PBS 群、free/RAP-0.1 群、free/RAP-1 群では  $\alpha$ SMA 陽性細胞はほとんど観察されなかった（図 22）。



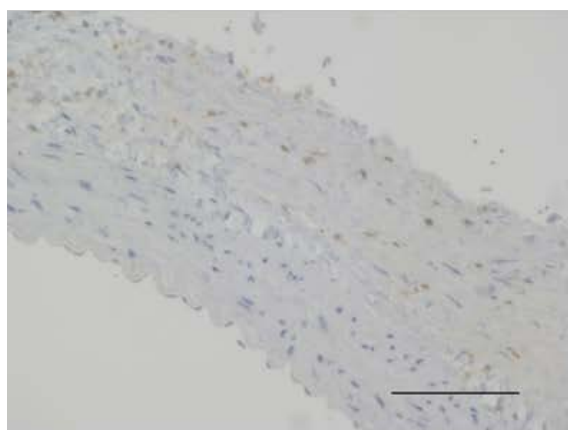
PBS



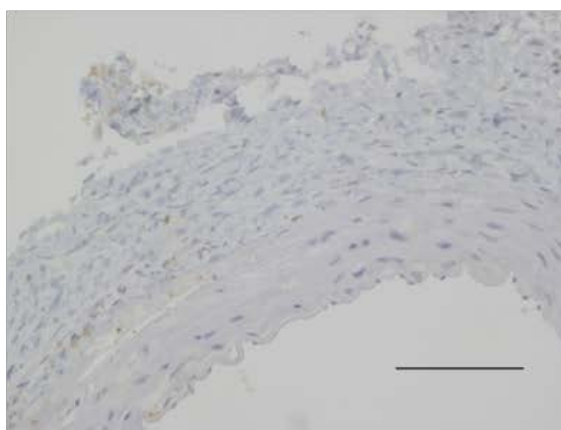
Free/RAP-0.1



Free/RAP-1



RAP/nano-0.1



RAP/nano-1

図 20 CD68 に対する免疫染色（強拡大）

400 倍。スケールバーは 100 $\mu$ m。画像下側が内腔側、上側が外膜側。CD68 陽性細胞は茶色に染色される。RAP/nano-0.1 群および RAP/nano-1 群では CD68 陽性細胞が目立たない。

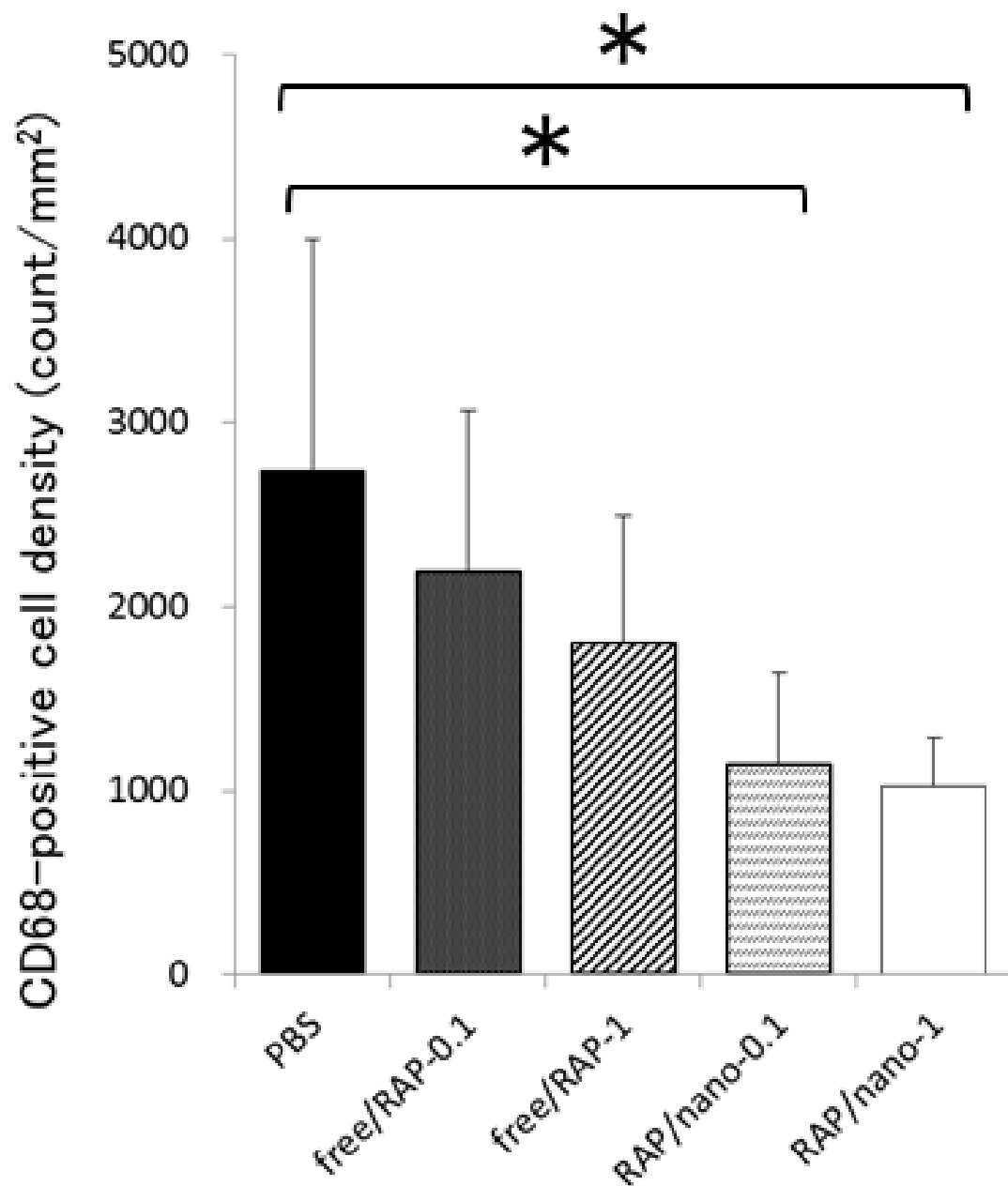
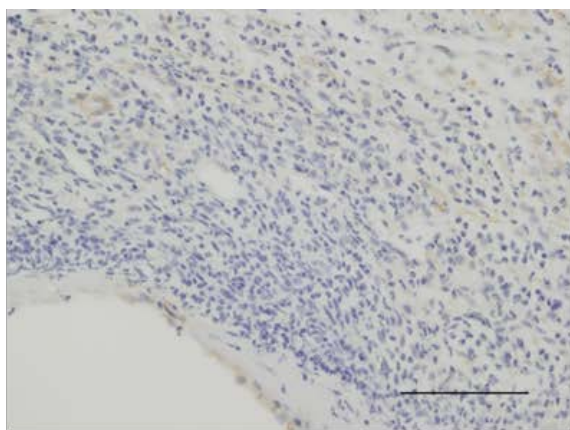
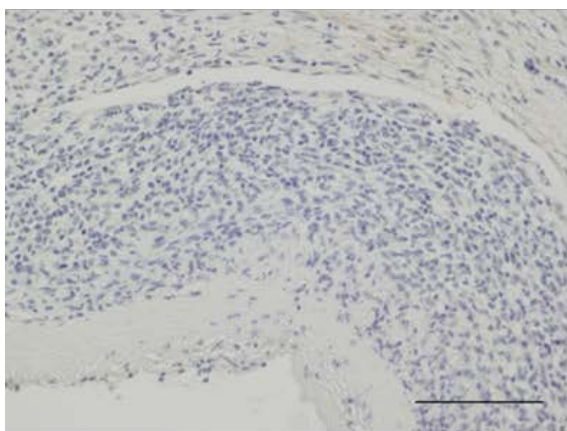


図 21 単位面積当たりの CD68 陽性細胞数

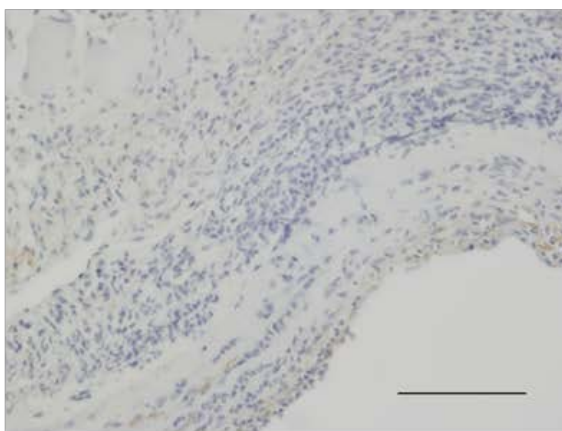
PBS 群に比較して RAP/nano-0.1 群および RAP/nano-1 群では有意に CD68 陽性細胞の浸潤が少なかった。\* PBS 群との比較で  $p < 0.05$



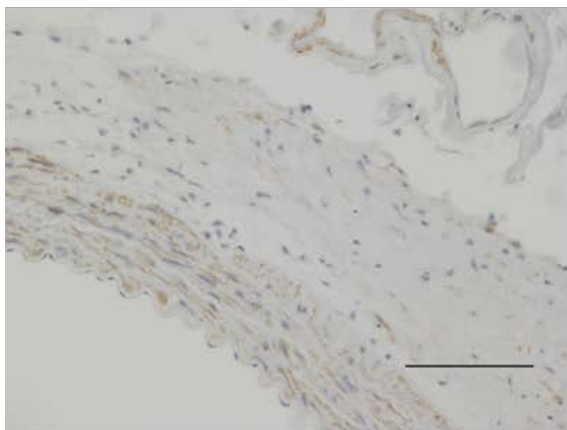
PBS



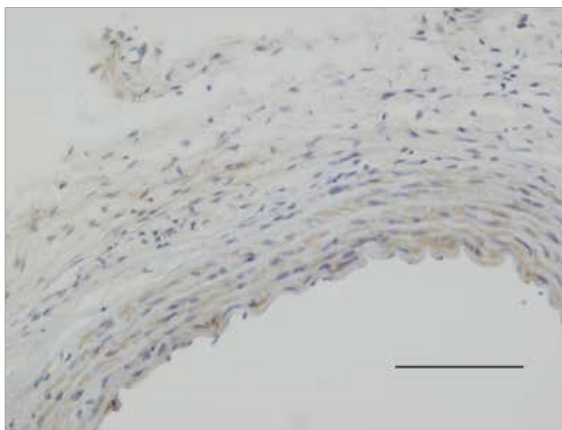
Free/RAP-0.1



Free/RAP-1



RAP/nano-0.1



RAP/nano-1

図 22  $\alpha$ SMA に対する免疫染色（強拡大）

400 倍。スケールバーは 100 $\mu$ m。画像下側が内腔側、上側が外膜側。 $\alpha$ SMA は茶色に染色される。RAP/nano-0.1 および RAP/nano-1 群では  $\alpha$ SMA 陽性細胞が中膜に保たれている。



## Zymography およびサイトカイン量の分析

PBS 群、free/RAP-1 群および RAP/nano-1 群を対象にプロテアーゼ活性を調べるために gelatin zymography を行った（各群  $n = 3$ 、図 23）。Pro MMP-9 活性では群間に有意差は認められなかったが、pro MMP-2、MMP-2 活性において RAP/nano-1 群では PBS 群および free/RAP-1 群と比較して有意に抑制されていた（いずれも  $p < 0.01$  もしくは  $p < 0.05$ 、図 24）。一方 free/RAP-1 群では PBS 群と比較してこれらのプロテアーゼ活性が抑制されていた（いずれも  $p < 0.05$ 、図 24）。

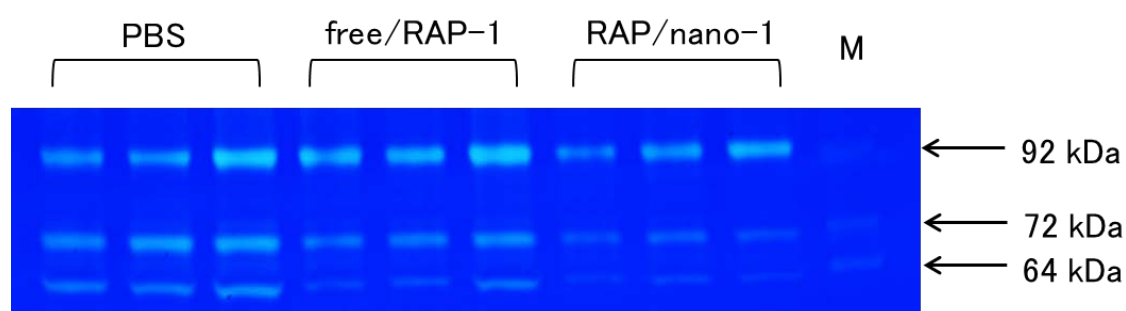
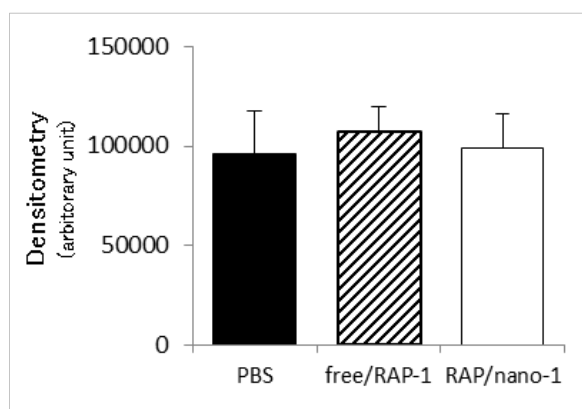


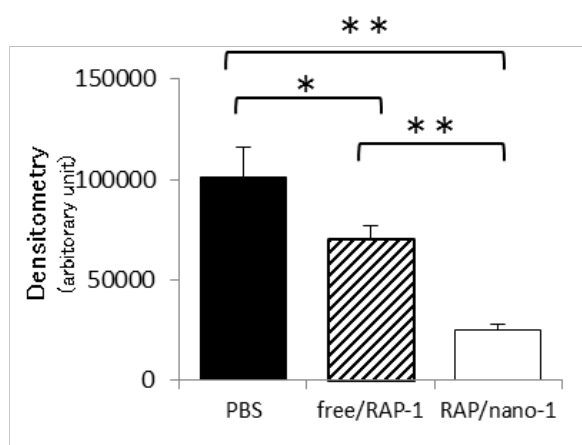
図 23 Zymography によるプロテアーゼ活性の評価

各ウェルにホモジネートを  $3\mu\text{g}$  ずつ注入し、 $37^\circ\text{C}$  で 15 時間反応させた。  
M はマーカーで上から順に Pro MMP-9、Pro MMP-2、MMP-2 のバンドを示す。

## Pro MMP-9



## Pro MMP-2



## MMP-2

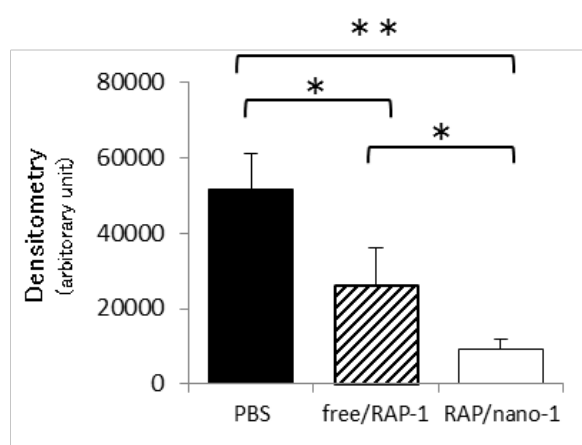


図 24 定量的なプロテアーゼ活性の評価

PBS 群および free/RAP-1 群と比較して RAP/nano-1 群では pro MMP-2 および MMP-2 活性が有意に抑制されていた。\*  $p < 0.05$ 。\*\*  $p < 0.01$ 。

炎症性サイトカイン量の分析に関しても、PBS 群、free/RAP-1 群および RAP/nano-1 群を対象に行った（各群 n = 3）。free/RAP-1 群と比較して RAP/nano-1 群では IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、CINC-1 の相対量が有意に小さな値を示していた（ $p < 0.05$ 、図 25）。また、IL-1 $\beta$ 、CINC-1 においては PBS 群と比較しても RAP/nano-1 群で有意に発現量を抑制していた（ $p < 0.05$ ）。一方で CINC-2 $\alpha/\beta$ 、CINC-3、IL-6、IL-10、IP-10、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-3 $\alpha$ 、RANTES の発現量は群間に有意差は無かった。

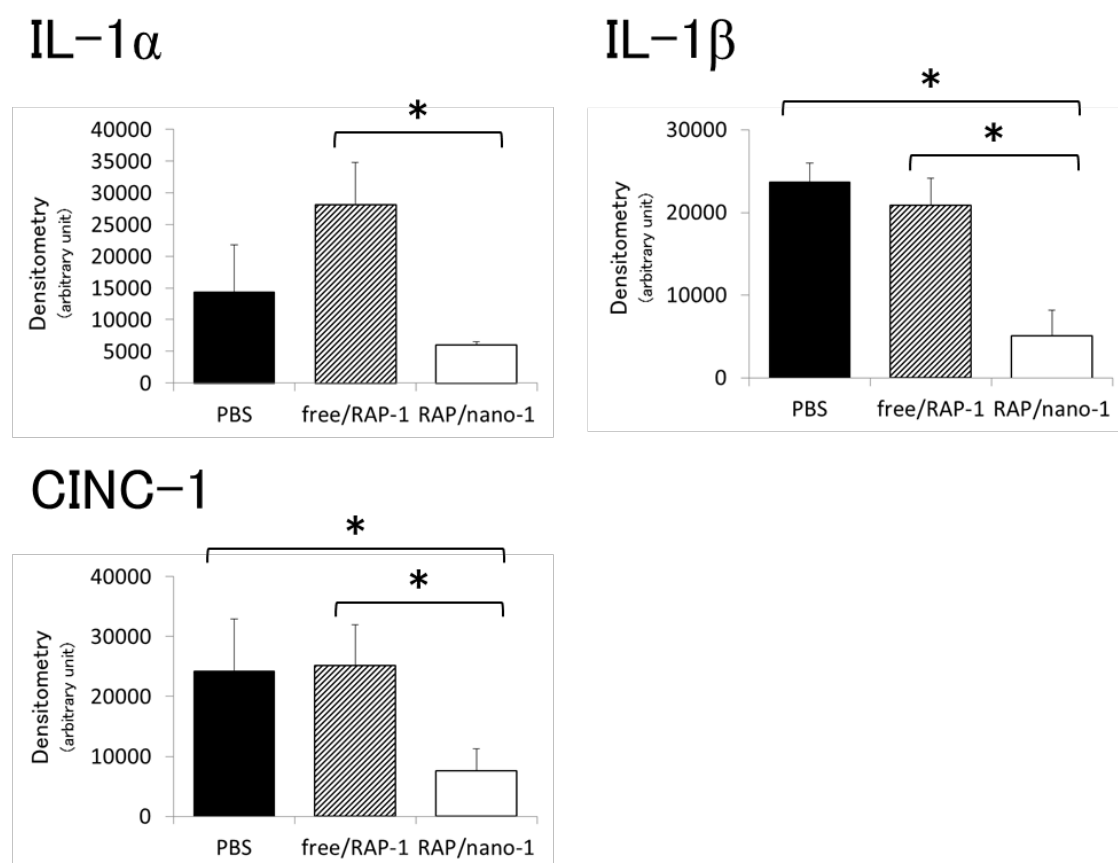


図 25 炎症性サイトカインの評価

RAP/nano-1 群では free/RAP-1 群に対して IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、CINC-1 の相対量が有意に小さかった。\*  $p < 0.05$ 。

### <小括>

ラパマイシン内包ナノ粒子投与は同量のラパマイシン単独投与および PBS 投与と比較して大動脈径拡大を有意に抑制した。ラパマイシン内包ナノ粒子投与群では弾性板の破壊および CD68 陽性細胞の浸潤が抑制され、中膜の  $\alpha$ SMA 陽性細胞が保たれていた。また、MMP-2 の活性が抑制され、IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカイン発現も抑えられていた。

## 考察

### 本研究で得られた新たな知見

ラパマイシン内包ナノ粒子は正常の大動脈にはほとんど集積せず、大動脈瘤に選択的に集積し、24 時間以上にわたり高い組織中濃度を保っていた。大動脈瘤の組織内では、弾性板が破壊された部位の中膜や外膜を中心に分布し、CD68 陽性細胞に取り込まれているものも認められた。その結果、ラパマイシンの薬理作用である抗炎症効果を、ラパマイシン単独投与よりも有効に局所で発揮し、大動脈瘤径拡大を抑制した。

### ラットエラスターゼ誘導大動脈瘤モデル使用の妥当性

ヒトにおいて、動脈瘤が形成されると wall shear stress の増大、炎症性変化・免疫応答、大動脈瘤壁のタンパク分解などのメカニズムが循環し、徐々に瘤径が拡大していくが、その過程でマクロファージやリンパ球などが中膜や外膜を主体に慢性炎症を引き起こすと考えられている。慢性炎症は血管新生を伴うが、大動脈瘤においては中膜・外膜に medial neovascularization と呼ばれる特徴的な新生血管が形成され、炎症細胞浸潤などに大きな役割を果たしていると考えられている[48]。

エラスターゼ誘導腹部大動脈瘤モデルでは、孤立させた大動脈内にエラスターゼを持続注入した直後から3日後までは、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞が関連して、initial dilatation が起きる[17]。その後は慢性の炎症性変化に移行していき、マクロファージやT細胞などの炎症細胞、IL-1 $\beta$ 、IL-6などの炎症性サイトカイン、MMP-2やMMP-9などのプロテアーゼが関連して弾性板や外膜の膠原繊維の破壊が徐々に進行し、7-14日目までに大動脈瘤を形成する[29]。すなわちエラスターゼ注入を契機として、慢性炎症が起きる点、各種プロテアーゼの過剰産生と大動脈壁のタンパク分解が起きる点はヒトの大動脈瘤と共通の病態を呈している。組織学的にも、エラスターゼ誘導大動脈瘤モデルで認められる内皮の脱落、平滑筋細胞の減少、中膜弾性板の破壊、中膜・外膜を中心としたマクロファージ、T細胞の浸潤といった所見はヒトの大動脈瘤と類似しているとされる[17, 29, 49]。以上より、我々の用いたエラスターゼ誘導大動脈瘤モデルは、ナノ粒子による選択的な薬物送達および大動脈瘤径拡大抑制効果を検討するにあたり、妥当な動物モデルであると考えられる。

#### ラパマイシンのナノ粒子化による生物学的利用能の向上

ラパマイシンはFK506-binding protein12 (FK506BP12)と結合してmTORを阻害することにより様々な薬理作用を示すことが知られている[35]。mTORはセリ

ン・スレオニンキナーゼの一種で、細胞内タンパク質と複合体を形成し(mTORC1、mTORC2)、細胞内シグナル伝達を行うが、ラパマイシンによる阻害の結果、免疫抑制作用、抗炎症作用、細胞増殖抑制作用（平滑筋細胞増殖抑制・がん細胞増殖抑制）などの多面的な作用が報告されている[35]。特に抗炎症作用に関しては、CD28 や IL-2 受容体依存性のシグナル伝達が PI3K-Akt 経路を介して mTOR に至るが、これを阻害することにより T 細胞や B 細胞の活性化を抑制する[50]。また、Lawrence DM らは、ラットエラスターゼ誘導腹部大動脈瘤モデルにおいて FK506BP12 の遺伝子発現がアップレギュレーションしており、ラパマイシンが前述の mTOR 阻害作用から NF- $\kappa$ B、MMP-9 発現抑制を介して大動脈瘤形成を抑制することを報告した[36]。

彼らの方法ではモデル作成日術前より犠牲死させる 7 日目までの毎日、1mg/kg のラパマイシンを経口投与している。ラパマイシンは高い疎水性のために経口投与に限られていたが、その生物学的利用能 (bioavailability) は 10–17% と報告され[51, 52]、これまでラパマイシンの治療効果を過小評価していた可能性がある。本研究でラパマイシンをナノ粒子化する際に用いた PEG-*b*-PBLG は両親媒性のブロック共重合体で、疎水性相互作用によりナノ粒子を形成させたうえで、内側の疎水性部分にラパマイシンを物理封入した。一方で、外側には親水性部分を持ち、高い水溶性を発揮した。このことはラパマイシンの経静脈投与を可

能にし、生物学的利用能の向上に寄与したと考えられる。一方で、ラパマイシン単独投与にあたり、生物学的利用能の差をバイアスとしないために、本研究ではラパマイシンの専用溶解液を用いて経静脈投与を行った[46]。

#### ラパマイシン内包ナノ粒子の優れた血中滞留性

本研究ではラパマイシンと両親媒性のブロック共重合体である PEG-*b*-PBLG の自己組織化により均一で安定性の高い、粒子径 106nm のナノ粒子を形成させた。PEG-*b*-PBLG のみの攪拌から得られたナノ粒子 (42nm) と比較して 64nm 大きな粒子となっていた事は、ラパマイシンが内包されていることを強く示唆する所見である。*In vitro* でラパマイシン内包ナノ粒子は 48 時間にわたりほぼ不変で、6 日目までに 20% が分解されるのみであり、堅強な安定性が確認された。また、ラット血漿中でも投与量の 9.0% が 10 時間後にも残存していた。血漿タンパク質との相互作用、肝臓や腎臓からの排泄を考慮すると、血中滞留性は良好であったと考えられる。本研究のラパマイシン内包ナノ粒子の表面を装飾する PEG は、高い水溶性、生体適合性を有し、血漿タンパク質との相互作用やマクロファージからの認識を避けて優れた血中滞留性を示すことが知られている [53–56]。



全身循環中の血中タンパク質及び細網内皮系との相互作用を避け、血中滞留性を向上させるためには、サイズ、形状、表面電荷、表面の修飾など様々な要素が影響すると考えられている[53, 57]。特にナノ粒子径に関して、6nm 未満のナノ粒子は腎臓からの排泄を受けやすく、300nm より大きなナノ粒子は肝臓や細網内皮系から認識されやすくなると報告されているが[58–61]、本実験で用いたラパマイシン内包ナノ粒子はこの点からも 106nm という適切な範囲の粒子径であったと考えられた (図 26)。

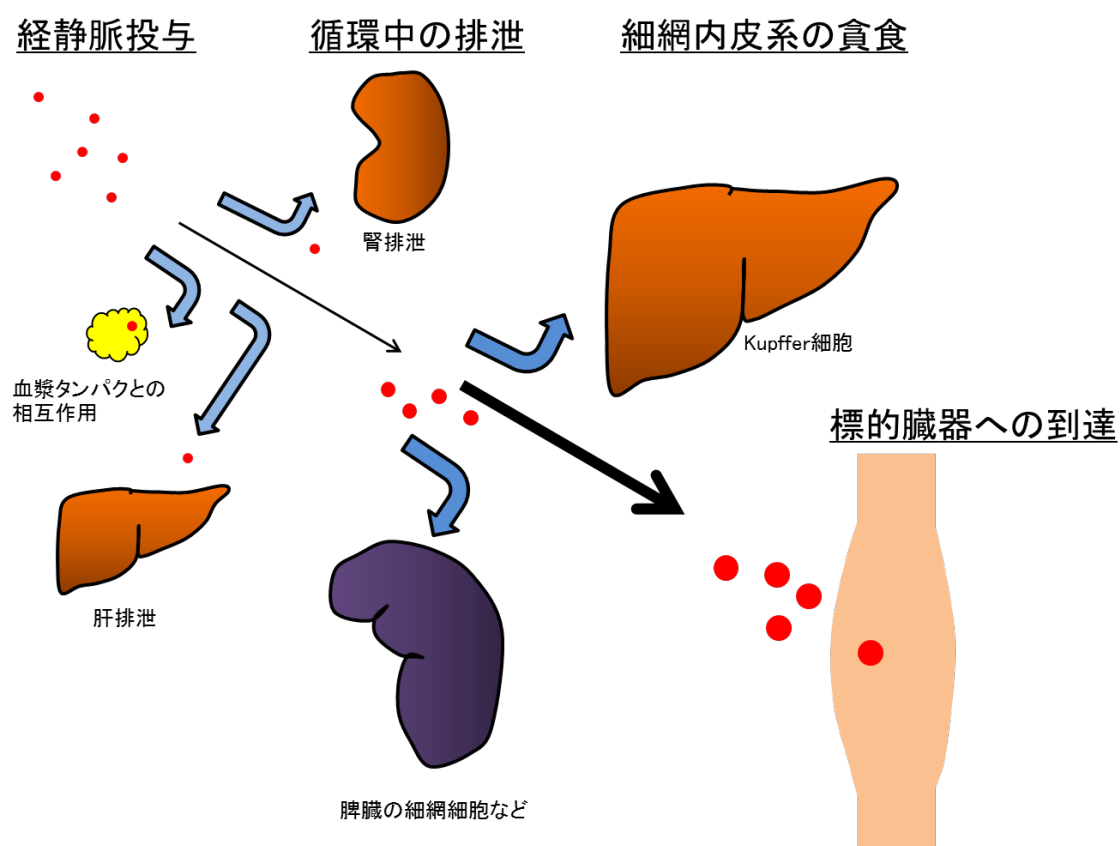


図 26 ナノ粒子の targeted delivery の模式図

ナノ粒子は循環血液中に投与されたのち、血漿中のタンパク質との相互作用、肝臓および腎臓からの排泄を避け、細網内皮系からの貪食を回避した上で標的臓器に到達できると考えられる。

## ラパマイシン内包ナノ粒子の大動脈瘤への集積メカニズム

*In vivo* imaging system での観察において、ラパマイシン内包ナノ粒子は、正常大動脈と比較して大動脈瘤に選択的に集積した（図 7）。血中濃度が十分高い投与後 1 時間では大動脈弓部＞胸部下行大動脈＞腹部大動脈の順で蛍光強度が観察されたが、これは *vasa vasorum* の密度に呼応したものと考えられた[62]。組織ホモジネートを用いた定量的な蛍光強度測定において、組織中の濃度も正常大動脈では投与後 8 時間以降ではゼロとなるのに対して、大動脈瘤では投与後 8 時間を遅延性のピークとし、投与後 24 時間まで高い組織中濃度を保っていた（図 9）。正常大動脈ではナノ粒子の血中濃度が低下するのとともに組織中濃度も単調に減少するのに対し、大動脈瘤形成部位では血中濃度が漸減している投与後 8 時間において遅延性のピークを形成した事は、大動脈瘤へのナノ粒子の到達に関して単純拡散ではない特殊なメカニズムが働いていることを示唆している。

大動脈瘤への選択的な集積メカニズムとして、我々は大きく 2 つの可能性を考えている。1 つ目は大動脈壁における組織構造の破壊である。大動脈瘤の病態生理には十分に解明されていない点もあるが、マクロファージやリンパ球などの炎症細胞は中心的な役割を果たすと考えられている[18–24]。大動脈瘤組織では、炎症細胞により炎症性サイトカインや MMPs などの産生が亢進し、内膜の脱落、弾性板や細胞外マトリックスの破壊が進行している。その結果、大動脈

壁の抗張力は失われ、大動脈瘤壁には微細な欠陥（micro-defect）が生じ、大動脈瘤内を流れるナノ粒子が大動脈壁内に侵入しやすい環境が形成される。本研究の「実験 1．ラパマイシン内包ナノ粒子の大動脈瘤への集積に関する検討」の図 10 で示したように、Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子の多くは弾性板が破壊され、細胞外マトリックスの破壊が顕著な領域の中膜・外膜レベルに豊富に局在していたことは、このメカニズムを支持する所見であると考えられる。一方で、血中濃度が低下するラパマイシン内包ナノ粒子投与後 16 時間や 24 時間時点でも大動脈瘤組織中濃度は高値を示した。これは、大動脈瘤には単に集積しやすいのみならず、組織中から流出や拡散しにくい事を示唆する。このように標的組織に集積し、滞留するためにナノ粒子に求められる重要な要件として、粒子径が挙げられる[53]。すなわち、ナノ粒子が大動脈瘤壁に生じた微細な欠陥よりも大きな粒子径であったならば大動脈瘤に選択的に集積しえず、また、小さすぎるナノ粒子であっても様々な組織間隙からの拡散が起こりやすく、大動脈瘤内に長時間停滞することはできなかったと思われる。本研究ではサイズの違いによる集積性の差異に関しては検討していないが、我々の用意した粒子径 106nm のナノ粒子は、大動脈瘤壁への分布の観点からも適切なナノ粒子径の範囲内であったと考えられる。このように、大動脈瘤に特異的な

組織構造の破壊は、ナノ粒子集積の主要なメカニズムであったと我々は考えている。

2 つ目のメカニズムとして EPR 効果に類似した機序が考えられる。EPR 効果は腫瘍組織へのナノ粒子の集積メカニズムとして考えられているもので、腫瘍による血管新生因子の産生増加のために腫瘍周囲の血管透過性が亢進すること、および腫瘍周囲ではリンパ管が未発達なことにより、高分子などが腫瘍局所に蓄積するメカニズムのことを指す。これまでラットエラストーゼ誘導腹部大動脈瘤モデルで **medial neovascularization** に関して検証した研究はないが、我々は CD31 に対する免疫染色を行い、中膜・外膜を中心に CD31 で内皮が染色される微小血管の増生を確認した (図 14)。これらの血管は、ヒトの大動脈瘤に特徴的にみられる **medial neovascularization** に相当するものであると考えられた。**Medial neovascularization** は未成熟で平滑筋細胞などを欠くとされ[63, 64]、ナノ粒子の大動脈瘤への選択的な集積にも関連する可能性があると我々は考えた。また、大動脈瘤には中膜、外膜を走行する血管の栄養血管 (**vasa vasorum**) から血液が供給される。**IL-1 $\beta$**  などの炎症性サイトカイン、**MMPs** は血管透過性を亢進させ[65]、血管新生因子の不均衡などにより内皮細胞間の間隙は拡大する[66]。一方で、低酸素環境下に誘導され内膜や中膜に新生する大動脈壁内のリンパ管の機能は不十分であり、リンパ鬱滞を来しているとの報告がある[67]。このように大

動脈瘤組織でも新生血管の増生・透過性亢進およびリンパ鬱滞、すなわち EPR 効果に類似した機序が関与すると考えられた。図 10 の矢印で示したナノ粒子は、弾性板の破壊が著しい領域とは無関係な中膜、外膜に分布しており、この第 2 のメカニズムを支持する所見である。以上の 2 つのメカニズムによって、大動脈瘤へのナノ粒子の集積は説明されると我々は考えた。

#### 大動脈瘤組織中でのラパマイシン内包ナノ粒子の作用

適切に標的臓器まで送達されたナノ粒子は、標的細胞との相互作用によって治療効果を発揮する（図 27）。大動脈瘤形成・増大に関わる様々な細胞の内、マクロファージは重要な役割を果たす細胞の 1 つである [18–24, 29, 68]。ラパマイシンは細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質キナーゼである mTOR に作用するため、ナノ粒子が分解してラパマイシンが解放され、標的細胞の細胞内に取り込まれた上で作用すると想定される。その分解には「細胞内分解」と「細胞外分解」があると考えられる。「実験 1. ラパマイシン内包ナノ粒子の大動脈瘤への集積に関する検討」の図 11 で示したように、大動脈瘤に集積したナノ粒子には、投与後 24 時間後の像でマクロファージと共局在するものが多く認められた。マクロファージからの endocytosis を受け、「細胞内分解」によって直接的にマクロファージ内で作用したと考えられた。マクロファージは瘤径拡大にお

いて重要な役割を果たしているので、合理的な薬物送達であったと考えられる [29]。また、「細胞外分解」を起こしたナノ粒子はより小さなラパマイシンの粒子となり、平滑筋細胞、T 細胞など大動脈瘤形成・増大に関連する様々な細胞に作用すると推測される。

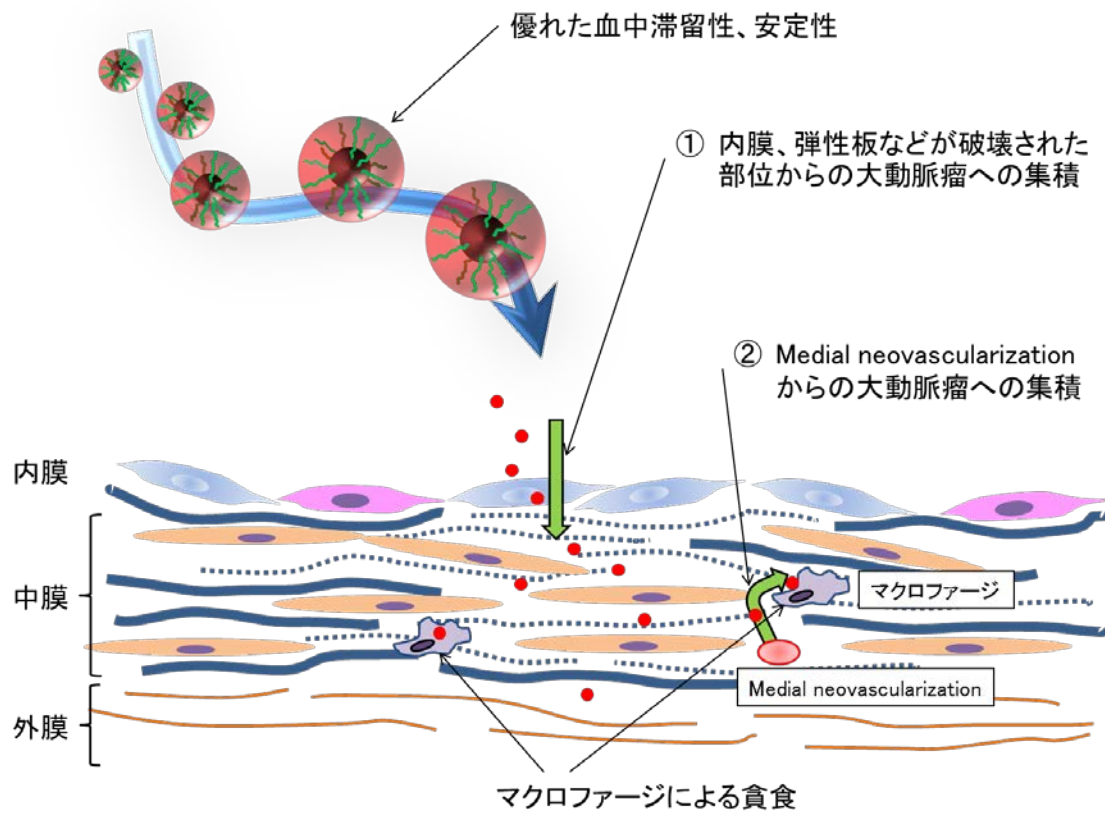


図 27 ラパマイシン内包ナノ粒子の大動脈瘤への集積およびマクロファージとの相互作用

ラパマイシン内包ナノ粒子は経静脈投与後も安定した状態で良好な血中滞留性を示す。①内膜や弾性板の破壊が進行している部位からの経路、②medial neovascularization を介する経路、からラパマイシン内包ナノ粒子は大動脈瘤組織に集積する。ラパマイシン内包ナノ粒子は、大動脈瘤組織で炎症、タンパク分解の主役となるマクロファージからの endocytosis を受け、抗炎症作用を発揮する。

## ラパマイシン内包ナノ粒子による治療効果の増強

実験 2. で検証したラパマイシン内包ナノ粒子による大動脈瘤形成抑制効果の結果では、ラパマイシンをナノ粒子化することによって、同量のラパマイシンを単独投与した場合と比較して有意な瘤径拡大抑制効果の増強が確認された。ラパマイシン内包ナノ粒子投与群ではラパマイシン単独投与群と比較して **IL-1 $\alpha$** 、**IL-1 $\beta$** 、**CINC-1** などの炎症性サイトカイン発現量および **MMP-2** 活性の有意な抑制効果が確認された。マクロファージの浸潤も、有意差は無いが抑制する傾向にあり、弾性板や中膜平滑筋細胞が保たれていることが示された。代表的な炎症性サイトカイン発現、各種炎症細胞、プロテアーゼ活性は図 28 に示すように関連する。すなわち、本実験結果で示された **IL-1 $\beta$** 、**CINC-1** などのサイトカインはマクロファージなどの炎症細胞に働きかけて **MMPs** 産生を亢進させ、**elastin** 分解を促進し、大動脈径は拡大する。これがラパマイシン内包ナノ粒子投与により大動脈径拡大が抑制された機序の一端であると考えられる。一方で、ラパマイシン単独投与群では **IL-1 $\alpha$** 、**IL-1 $\beta$** 、**CINC-1** の発現に有意差はなかったものの **pro MMP-2** および **MMP-2** の活性は抑制し、瘤径拡大も抑制していた。ラパマイシン単独投与群では、大動脈瘤組織に送達される薬物量が少ないことに加えて、マクロファージからの **endocytosis** を受けて直接的に働きかけるラパマイシン内包ナノ粒子投与群と比べて相対的にその他の炎症細胞に働きかける割合



が大きかったために、関連する炎症性サイトカインが異なっていたのではないかと考えられる。その結果、ラパマイシン単独投与群およびラパマイシン内包ナノ粒子投与群ともに治療効果を示したものの、ラパマイシン内包ナノ粒子投与群でより大きな治療効果が表れたと考察している。

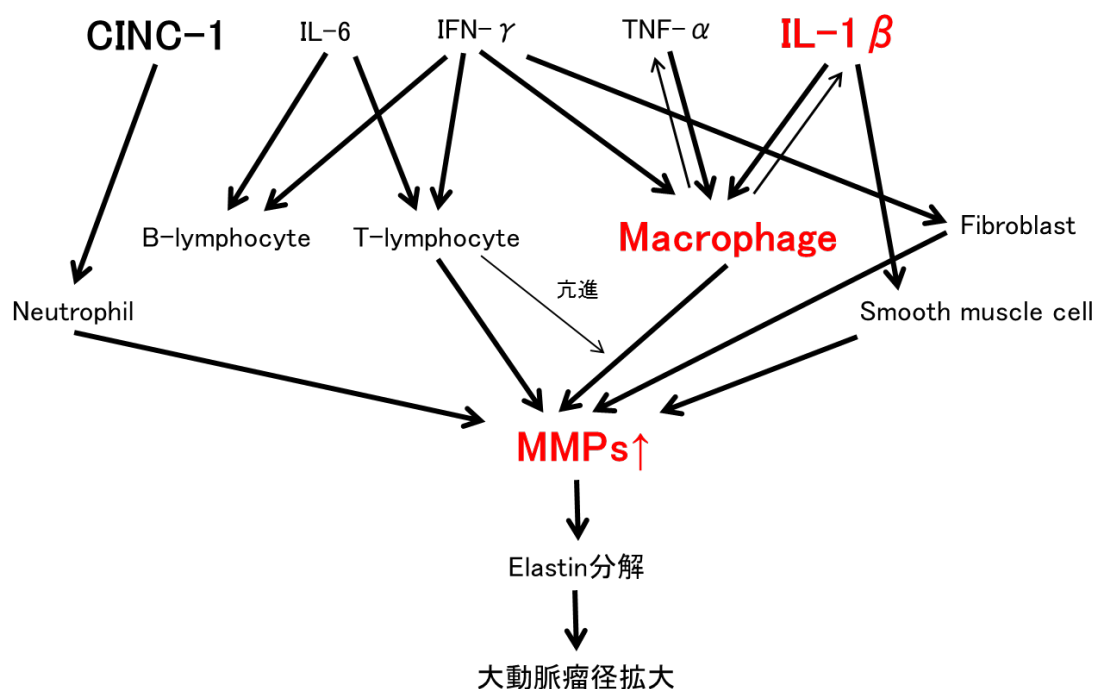


図 28 大動脈瘤径拡大に関連するサイトカイン、炎症細胞

マクロファージは中心的な役割を果たし、IL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインと関連してプロテアーゼを産生し、大動脈瘤径は拡大する。

すなわち、ラパマイシンをナノ粒子化することによって、以下のような過程を経て治療効果を増強したと考えられる（図 27、28）。

- ・良好な血中滞留性を示し、
- ・選択的に大動脈瘤組織に集積し、
- ・マクロファージを中心とした大動脈瘤形成・増大に関連する細胞に有効に作用した

一方で、本研究で示された **MMPs** や炎症性サイトカインの挙動、特に **MMP-9** の挙動は以前の報告と異なる面がある。これまでの報告では **MMP-9** 発現量もしくは活性の抑制に伴う瘤径抑制効果を論じるものが多かったが、本研究では **MMP-9** の活性抑制は示されなかった[4, 5, 7, 17, 20, 28, 29]。これは本研究で用いた **SD** ラットと以前の研究での使用動物との種もしくは系統の違いによる点、エラストラーゼ誘導大動脈瘤モデル作成後 7 日目というタイムポイントの違いによる点によって説明されると考えられる。一方で、本研究で瘤径抑制効果に関連したと考えられた **MMP-2** の活性抑制も重要な機序であると考えられている[5, 17, 28, 29, 69, 70]。異なる動物種、異なるタイムポイントでの検討を行えば今回の結果とは違った **MMPs** や炎症性サイトカインの挙動が示された可能性がある[17]。本研究で本質的に重要であったと考えられる点は、抗炎症効果とそれともなう大動脈瘤壁構造の保存が協調的に作用して大動脈瘤径拡大を抑制した点にあると考えている。

## 研究の限界

エラスターゼモデルはヒトの大動脈瘤に見られる動脈硬化性変化を再現していない。この点に関しては、アポリポプロテイン E 欠損マウスを用いたアンジオテンシン II 誘導大動脈瘤モデルなどでの検証が必要である。また、ヒトの大動脈瘤ではより慢性的な経過を辿るため動物モデルと特徴を異にすると考えられる。

## 今後の展望

本研究ではナノ粒子の応用による大動脈瘤の薬物治療の可能性が示された。今後、ナノ粒子の最適化（表面へのリガンドの負荷、サイズ効果など）や、内包する薬剤を工夫すること（doxycycline や statins など）によって、実用に耐えるような治療を実現できる可能性がある。全大動脈瘤患者の大半を占める小瘤径の大動脈瘤患者に対する瘤径拡大を抑制効果が実現されれば、現状では疑問が残る小瘤径の大動脈瘤スクリーニング検査の有用性が見直されるかもしれない。全世界的な人口の高齢化を背景に小瘤径の大動脈瘤はますます増加すると考えられ[71]、2 次予防から 1 次予防へ変換していくことは、医療経済的な面からもメリットが享受できる可能性がある。また、炎症性大動脈瘤、高安動脈炎に伴う動脈瘤、IgG4 関連疾患の動脈瘤や感染性動脈瘤など特殊な動脈瘤で

は臨床的にも週単位の短期間で急速に増大することがある。これらの炎症の影響が強く出ている動脈瘤はエラスターゼ誘導腹部大動脈瘤モデルにより近い病態であるため本研究の知見がより再現されやすい可能性があり、なおかつ炎症の急性期に手術を避ける点、比較的短期間の投薬でも臨床的意義がある点などから臨床応用への期待を持つことができる。これ以外にも、全身状態不良やその他の理由で、破裂の危険性があるが非手術のまま経過観察されている症例においても、大動脈瘤破裂の危険因子と考えられている MMPs や大動脈壁内のマクロファージ数を薬物的にコントロールすることは有効な可能性がある[72–74]。

現在飛躍的に増え続けているステントグラフト治療後には一定の割合で endoleak 症例が発生することが知られているが[75]、とりわけ瘤径拡大を伴う type2 endoleak 症例に関して、補完的な治療法としての有用性も期待できる。

## 結論

ラパマイシン内包ナノ粒子は大動脈瘤に選択的に集積し、長時間にわたって高い組織中濃度を保つと考えられた。大動脈組織中で、ラパマイシン内包ナノ粒子はマクロファージに貪食され、炎症性サイトカイン産生を抑制し、それに引き続く炎症細胞の浸潤を抑制していると考えられた。また、MMP-2 活性の抑制により中膜弾性板の層構造が保たれていることが大動脈径拡大抑制に関与していると考えられた。

## 謝辞

本研究を遂行する機会及び御指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科外科学専攻腫瘍外科・血管外科 渡邊聡明教授、国際医療福祉大学 宮田哲郎教授（前東京大学医学部附属病院血管外科病院教授）、東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻兼医学系研究科疾患生命工学センター臨床医工学部門片岡一則教授に深謝致します。本研究の計画及び遂行にあたり御指導を賜りました国際医療福祉大学血管外科 重松邦広教授（前東京大学医学部血管外科講師）、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻血管外科 保科克行講師に御礼を申し上げます。

また、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 三浦裕助教ならびに東京大学医学部附属病院トランスレーショナル・リサーチセンター 小山博之特任准教授に格別の御礼を申し上げます

## 参考文献

1. Singh K, Bønaa KH, Jacobsen BK, Bjørk L, Solberg S. Prevalence of and risk factors for abdominal aortic aneurysms in a population-based study : The Tromsø Study. *Am J Epidemiol* 154(3):236-44:2001.
2. Brewster DC, Cronenwett JL, Hallett JW Jr, Johnston KW, Krupski WC, Matsumura JS; Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms. Report of a subcommittee of the Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg* 37(5):1106-17:2003.
3. 2011 WRITING GROUP MEMBERS; 2005 WRITING COMMITTEE MEMBERS; ACCF/AHA TASK FORCE MEMBERS. 2011 ACCF/AHA Focused Update of the Guideline for the Management of patients with peripheral artery disease (Updating the 2005 Guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation* 124(18):2020-45:2011.
4. Baxter BT, Terrin MC, Dalman RL. Medical management of small abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 117(14):1883-9:2008.
5. Samson R. Can pharmacologic agents slow abdominal aortic aneurysm growth? *Semin Vasc Surg* 25(1):25-8:2012.
6. Propranolol Aneurysm Trial Investigators. Propranolol for small abdominal aortic aneurysms: results of a randomized trial. *J Vasc Surg*

35(1):72-9:2002.

7. Petrinec 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.

8. Shiraya S, Miyake T, Aoki M, Yoshikazu F, Ohgi S, Nishimura M, et al. Inhibition of development of experimental aortic abdominal aneurysm in rat model by atorvastatin through inhibition of macrophage migration. *Atherosclerosis* 202(1):34-40:2009.

9. Golledge J, Cullen B, Moran C, Rush C. Efficacy of simvastatin in reducing aortic dilatation in mouse models of abdominal aortic aneurysm. *Cardiovasc Drugs Ther* 24(5-6):373-8:2010.

10. Hackam 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.

11. Sweeting MJ, Thompson SG, Brown LC, Greenhalgh RM, Powell JT. Use of angiotensin converting enzyme inhibitors is associated with increased growth rate of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 52(1):1-4:2010.

12. Habashi JP, Doyle JJ, Holm TM, Aziz H, Schoenhoff F, Bedja D, et al. Angiotensin II type 2 receptor signaling attenuates aortic aneurysm in mice through ERK antagonism. *Science* 332(6027):361-5:2011.

13. Baxter BT, Pearce WH, Waltke EA, Littooy FN, Hallett JW Jr, Kent



KC, et al. Prolonged administration of doxycycline in patients with small asymptomatic abdominal aortic aneurysms: report of a prospective (Phase II) multicenter study. *J Vasc Surg* 36(1):1-12:2002.

14. Lindeman JH, Abdul-Hussien H, van Bockel JH, Wolterbeek R, Kleemann R. Clinical trial of doxycycline for matrix metalloproteinase-9 inhibition in patients with an abdominal aneurysm: doxycycline selectively depletes aortic wall neutrophils and cytotoxic T cells. *Circulation* 119(16):2209-16:2009.

15. Mosorin M, Juvonen J, Biancari F, Satta J, Surcel HM, Leinonen M, et al. 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.

16. Hiratzka LF, Bakris GL, Beckman JA, Bersin RM, Carr VF, Casey DE Jr, et al. 2010 ACCF/AHA/AATS/ACR/ASA/SCA/SCAI/SIR/STS/SVM guidelines for the diagnosis and management of patients with Thoracic Aortic Disease: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, American Association for Thoracic Surgery, American College of Radiology, American Stroke Association, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of Thoracic Surgeons, and Society for Vascular Medicine. *Circulation* 121(13):e266-369:2010.

17. Thompson RW, Geraghty PJ, Lee JK. Abdominal aortic aneurysms:

basic mechanisms and clinical implications. *Curr Probl Surg* 39(2):110-230:2002.

18. Lee E, Grodzinsky AJ, Libby P, Clinton SK, Lark MW, Lee RT. Human vascular smooth muscle cell-monocyte interactions and metalloproteinase secretion in culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(12):2284-9:1995.

19. Newman KM, Ogata Y, Malon AM, Irizarry E, Gandhi RH, Nagase H, et al. Identification of matrix metalloproteinases 3 (stromelysin-1) and 9 (gelatinase B) in abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb* 14(8):1315-20:1994.

20. Thompson RW, Holmes DR, Mertens RA, Liao S, Botney MD, Mecham RP, et al. Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms. An elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *J Clin Invest* 96(1):318-26:1995.

21. McMillan WD, Patterson BK, Keen RR, Shively VP, Cipollone M, Pearce WH. In situ localization and quantification of mRNA for 92-kD type IV collagenase and its inhibitor in aneurysmal, occlusive, and normal aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(8):1139-44:1995.

22. McMillan WD, Patterson BK, Keen RR, Pearce WH. In situ localization and quantification of seventy-two-kilodalton type IV collagenase in aneurysmal, occlusive, and normal aorta. *J Vasc Surg* 22(3):295-305:1995.

23. Davis V, Persidskaia R, Baca-Regen L, Itoh Y, Nagase H, Persidsky Y, et al. Matrix metalloproteinase-2 production and its binding to the matrix

are increased in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(10):1625-33:1998.

24. Keen RR, Nolan KD, Cipollone M, Scott E, Shively VP, Yao JS, et al. Interleukin-1 beta induces differential gene expression in aortic smooth muscle cells. *J Vasc Surg* 20(5):774-84; discussion 784-6:1994.

25. Vorp DA, Trachtenberg JD, Webster MW. Arterial hemodynamics and wall mechanics. *Semin Vasc Surg* 11(3):169-80:1998.

26. Zou Y, Hu Y, Metzler B, Xu Q. Signal transduction in arteriosclerosis: mechanical stress-activated MAP kinases in vascular smooth muscle cells (review). *Int J Mol Med* 1(5):827-34:1998.

27. 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.

28. Wassef M, Baxter BT, Chisholm RL, Dalman RL, Fillinger MF, Heinecke J, et al. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: a multidisciplinary research program supported by the National Heart, Lung, and Blood Institute. *J Vasc Surg* 34(4):730-8:2001.

29. Thompson RW, Curci JA, Ennis TL, Mao D, Pagano MB, Pham CT. Pathophysiology of abdominal aortic aneurysms: insights from the elastase-induced model in mice with different genetic backgrounds. *Ann N Y Acad Sci* 1085:59-73:2006.

30. Sakai-Kato K, Nishiyama N, Kozaki M, Nakanishi T, Matsuda Y, Hirano M, et al. General considerations regarding the in vitro and in vivo

properties of block copolymer micelle products and their evaluation. *J Control Release* 210:76-83:2015.

31. Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 28(10):721-6:1975.

32. Martel RR, Klicius J, Galet S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol* 55(1):48-51:1977.

33. Calne RY, Collier DS, Lim S, Pollard SG, Samaan A, White DJ, et al. Rapamycin for immunosuppression in organ allografting. *Lancet* 2(8656):227:1989

34. Kahan BD, Chang JY, Sehgal SN. Preclinical evaluation of a new potent immunosuppressive agent, rapamycin. *Transplantation* 52(2):185-91:1991.

35. Hartford CM, Ratain MJ. Rapamycin: something old, something new, sometimes borrowed and now renewed. *Clin Pharmacol Ther* 82(4):381-8:2007.

36. Lawrence DM, Singh RS, Franklin DP, Carey DJ, Elmore JR. Rapamycin suppresses experimental aortic aneurysm growth. *J Vasc Surg* 40(2):334-8:2004.

37. Ferket BS, Grootenboer N, Colkesen EB, Visser JJ, van Sambeek MR, Spronk S, et al. Systematic review of guidelines on abdominal aortic aneurysm screening. *J Vasc Surg* 55(5):1296-1304:2012.

38. Svensjö S, Björck M, Wanhainen A. Update on screening for abdominal aortic aneurysm: a topical review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 48(6):659-672014.
39. Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, Chen Q, Murakami M, Kimura M, et al. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat Nanotechnol* 6(12):815-23:2011.
40. Miura Y, Takenaka T, Toh K, Wu S, Nishihara H, Kano MR, et al. Cyclic RGD-linked polymeric micelles for targeted delivery of platinum anticancer drugs to glioblastoma through the blood-brain tumor barrier. *ACS Nano* 7(10):8583-92:2013.
41. Cabral H, Nishiyama N, Okazaki S, Koyama H, Kataoka K. Preparation and biological properties of dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) (DACHPt)-loaded polymeric micelles. *J Control Release* 101(1-3):223-32:2005.
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. Anidjar S, Salzmänn JL, Gentric D, Lagneau P, Camilleri JP, Michel JB. Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation* 82(3):973-81:1990.
44. 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):139-47:1992.

45. Nugent LJ, Jain RK. Two-compartment model for plasma pharmacokinetics in individual blood vessels. *J Pharmacokinet Biopharm* 12(4):451-61:1984.

46. Napoli KL, Wang ME, Stepkowski SM, Kahan BD. Distribution of sirolimus in rat tissue. *Clin Biochem* 30(2):135-42:1997.

47. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9(7):671-5:2012.

48. Holmes DR, Liao S, Parks WC, Thompson RW. Medial neovascularization in abdominal aortic aneurysms: a histopathologic marker of aneurysmal degeneration with pathophysiologic implications. *J Vasc Surg* 21(5):761-72:1995.

49. Daugherty A, Cassis LA. Mouse models of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(3):429-34:2004.

50. Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol* 9(5):324-37:2009.

51. Woo HN, Chung HK, Ju EJ, Jung J, Kang HW, Lee SW, et al. Preclinical evaluation of injectable sirolimus formulated with polymeric nanoparticle for cancer therapy. *Int J Nanomedicine* 7:2197-208:2012.

52. Crowe A, Bruelisauer A, Duerr L, Guntz P, Lemaire M. Absorption and intestinal metabolism of SDZ-RAD and rapamycin in rats. *Drug Metab Dispos* 27(5):627-32:1999.

53. Ernsting MJ, Murakami M, Roy A, Li SD. Factors controlling the

pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *J Control Release* 172(3):782-94:2013.

54. Otsuka H, Nagasaki Y, Kataoka K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 55(3):403-19:2003.

55. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm* 5(4):505-15:2008.

56. Cabral H, Kataoka K. Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies. *J Control Release* 190:465-76:2014.

57. Bertrand N, Leroux JC. The journey of a drug-carrier in the body: an anatomo-physiological perspective. *J Control Release* 161(2):152-63:2012.

58. Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Itty Ipe B, et al. Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol* 25(10):1165-70:2007.

59. Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP, et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res* 55(17):3752-6:1995.

60. Chugh R, Sangwan V, Patil SP, Dudeja V, Dawra RK, Banerjee S, et al. A preclinical evaluation of Minnelide as a therapeutic agent against pancreatic cancer. *Sci Transl Med* 4(156):156ra139:2012.

61. Kobayashi H, Watanabe R, Choyke PL. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target? *Theranostics* 4(1):81-9:2013.

62. Jack L. Cronenwett, K. Wayne Johnston. Rutherford's Vascular Surgery 7th edition volume one. Maureen M. Tedesco, Ronald L. Dalman. 117:2005.
63. Choke E, Cockerill GW, Dawson J, Wilson RW, Jones A, Loftus IM, et al. Increased angiogenesis at the site of abdominal aortic aneurysm rupture. *Ann N Y Acad Sci* 1085:315-9:2006.
64. Reeps C, Pelisek J, Seidl S, Schuster T, Zimmermann A, Kuehnl A, et al. Inflammatory infiltrates and neovessels are relevant sources of MMPs in abdominal aortic aneurysm wall. *Pathobiology* 76(5):243-52:2009.
65. Nooteboom A, Van Der Linden CJ, Hendriks T. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta mediate endothelial permeability induced by lipopolysaccharide-stimulated whole blood. *Crit Care Med* 30(9):2063-8:2002.
66. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 156(4):1363-80:2000.
67. Sano M, Sasaki T, Hirakawa S, Sakabe J, Ogawa M, Baba S, et al. Lymphangiogenesis and angiogenesis in abdominal aortic aneurysm. *PLoS One* 9(3):e89830:2014.
68. Moore JE Jr, Xu C, Glagov S, Zarins CK, Ku DN. Fluid wall shear stress measurements in a model of the human abdominal aorta: oscillatory behavior and relationship to atherosclerosis. *Atherosclerosis* 110(2):225-40:1994.



69. Thompson M, Cockerill G. Matrix metalloproteinase-2: the forgotten enzyme in aneurysm pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1085:170-4:2006.
70. Shen M, Lee J, Basu R, Sakamuri SS, Wang X, Fan D, et al. Divergent roles of matrix metalloproteinase 2 in pathogenesis of thoracic aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35(4):888-98:2015
71. World Population Prospects 2015 [Internet]. New York: United Nations, Department of Economic and Social Affairs [cited 2015 Oct 9]. Available from: <http://esa.un.org/unpd/wpp/DVD/>
72. Mallat Z. Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34(12):2509-19:2014.
73. Nahrendorf M, Keliher E, Marinelli B, Leuschner F, Robbins CS, Gerszten RE, et al. Detection of macrophages in aortic aneurysms by nanoparticle positron emission tomography-computed tomography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(4):750-7:2011.
74. Richards JM, Semple SI, MacGillivray TJ, Gray C, Langrish JP, Williams M, et al. Abdominal aortic aneurysm growth predicted by uptake of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide: a pilot study. *Circ Cardiovasc Imaging* 4(3):274-81:2011.
75. Sidloff DA, Stather PW, Choke E, Bown MJ, Sayers RD. Type II endoleak after endovascular aneurysm repair. *Br J Surg* 100(10):1262-70:2013.