

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 白須拓郎

【序文】大動脈瘤は瘤径拡大とともに破裂のリスクが増大し、いったん破裂すると致死的な疾患である。現在のエビデンスでは腹部大動脈瘤径 50–55mm 以上の症例に対する侵襲的治療により破裂を予防することが勧められているが、瘤径がそれに満たない小瘤径の腹部大動脈瘤に対しては経過観察が行われているのみである。自然経過とともに徐々に瘤径が拡大する大動脈瘤に対して、これまでに瘤径拡大の抑制効果に関する様々な薬物の治療効果が検証されてきたが、動物実験で治療効果が確認された薬剤のいずれもヒトにおける治療効果が実証されていない。その大きな原因の一つとして、動物実験における薬剤投与量とヒトへの投与量の間に数 10 倍から 100 倍もの大きな隔たりがあることが挙げられる。すなわち、大動脈瘤局所に有効に薬物が送達されて初めて治療効果があげられると我々は考えた。

大動脈瘤壁に有効にかつ選択的に薬物送達を行うため、我々はナノ粒子に着目した。ナノ粒子は主に腫瘍組織に対する選択的な薬物送達のための手法として近年盛んに報告されている。その集積には腫瘍血管の増生と血管透過性亢進、未発達なリンパ管による集積増強のメカニズムが働いていると考えられている。大動脈瘤壁では内膜が脱落し、中膜弾性板や細胞外マトリックスが破綻しており、慢性炎症が引き起こされている。その結果としての新生血管増生や血管透過性亢進は、ナノ粒子による選択的な薬物送達に有利に働くと考えられた。これらをもとに、ナノ粒子による大動脈瘤への選択的な薬物送達および大動脈瘤形成抑制効果に関して検討することを本研究の目的とした。

【実験 1】ラパマイシン内包ナノ粒子の腹部大動脈瘤への集積に関して検討した。両親媒性のブロック共重体である poly(ethylene glycol)-*b*-poly(γ -benzyl L-glutamate) (PEG-*b*-PBLG)を作成し、これを疎水性相互作用で自己組織化させ、その内部に疎水性薬剤であるラパマイシンを物理封入す

ることで、瘤径 106nm のラパマイシン内包ナノ粒子を作成した。また、PEG-*b*-PBLG に Alexa647 succinimidyl esters を付加し、同様に Alexa647 で蛍光ラベル化したラパマイシン内包ナノ粒子を作成した。動物モデルにはラットエラスターゼ誘導腹部大動脈瘤モデルを用いた。まず、ラットにおける血漿消失率を検証すると、投与後 10 時間でも投与量の 9.0%が残存しており、血中滞留性は比較的良好であると考えられた。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経静脈的に全身投与したところ、正常大動脈では血中薬物濃度の低下と呼応するように単調減少して投与後 8 時間以降では蛍光強度が観察されなくなるのに対して、形成された大動脈瘤部位では投与後 8 時間に蛍光強度の遅延性のピークを示し、投与後 24 時間後まで高い蛍光強度が確認された。投与後 24 時間の大動脈瘤組織切片の観察において、Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子は弾性板が破壊された中膜の領域を中心に豊富に存在していた。一方、弾性板破壊とは無関係な中膜、外膜レベルにも Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子が所々確認される部位があったが、別の組織で検証した CD31 で染色される medial neovascularization の分布と関連している可能性が考えられた。大動脈瘤壁に集積した Alexa647 蛍光ラベル化ラパマイシン内包ナノ粒子の多くは CD68 で染色されるマクロファージと共局在し、マクロファージに貪食されていると考えられた。

【実験 2】大動脈瘤形成抑制効果を検討した。実験 1 と同じラットエラスターゼ誘導大動脈瘤モデルを用いて、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、薬剤投与はエラスターゼ注入後 (day0)、day2、day4、day6 の 4 回行った。薬剤投与群は、ラパマイシン内包ナノ粒子 1mg/kg 投与群 (RAP/nano-1 群)、ラパマイシン内包ナノ粒子 0.1mg/kg 投与群 (RAP/nano-0.1 群)、ラパマイシン単剤 1mg/kg 投与群 (free/RAP-1 群)、ラパマイシン単剤 0.1mg/kg 投与群 (free/RAP-0.1 群) および phosphate buffered saline (PBS) 1ml/kg 投与群 (PBS 群) にランダムに割付けした。大動脈径の変化では、エラスターゼ注入直後はどの群間にも有意差なく一定の初期拡張が認められたが、day7 では RAP/nano-1 群、RAP/nano-0.1 群は PBS 群と比較して有意に大動脈径拡大が抑制され、また、同容量のラパマイシン単剤投与群と比較しても有意な大動脈径拡大抑制効果が確認された。血球計数検査および生化学検査で、RAP/nano-1 群、RAP/nano-0.1 群いずれにも有意な異常値は認められなかった。組織学的検討では、PBS 群、

free/RAP-1 群および free/RAP-0.1 群で中膜への炎症細胞浸潤が目立ったのに対して、RAP/nano-1 群および RAP/nano-0.1 群では炎症細胞浸潤はほとんど認められなかった。それと一致するように、前者 3 群では弾性板の破壊が顕著であったが、後者 2 群では弾性板の層構造が良く保存されていた。CD68 に対する免疫染色を行いマクロファージの浸潤を評価したところ、RAP/nano-1 群および RAP/nano-0.1 群では PBS に比較して有意に単位面積当たりのマクロファージの浸潤が抑制されていた。Gelatin zymography において、RAP/nano-1 群では free/RAP-1 群および PBS 群と比較して有意に pro matrix metalloproteinase (MMP)-2 および cleaved MMP-2 の活性が抑制されていた。また、炎症性サイトカインである interleukin (IL)-1 α 、IL-1 β 、cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1 の発現量も free/RAP-1 群と比較して RAP/nano-1 群で抑制されていた。

【考察】ナノ粒子が選択的に送達され、治療効果を発揮するためには、血中タンパク質及び細胞内皮系との相互作用を避けて良好な血中滞留性を示し、標的臓器に選択的に集積し、標的となる細胞に作用することが必要であると考えられる。我々の作成したラパマイシン内包ナノ粒子は、ラット血液中で比較的良好な血中滞留性を示したが、これは高い生物学的適合性を示すことで知られる PEG を外殻にもつ構造によるところが大きいと考えられた。

次に、我々の作成したラパマイシン内包ナノ粒子が大動脈瘤に特異的に集積し、長時間にわたって大動脈瘤組織に停滞した現象には、大動脈瘤の特徴的な組織像と局所の慢性炎症が強く関連していると考えられた。すなわち、大動脈瘤組織では内膜の脱落、弾性板や細胞外マトリックスの破壊などが起こった結果、微細な欠陥が生じ、ナノ粒子が集積しやすい環境が形成さる。また、大動脈瘤組織中で高発現している MMPs や IL-1 β などの血管新生因子は血管透過性を亢進させ、ナノ粒子の集積向上に寄与する。そして、いったん大動脈瘤に集積したナノ粒子は血中薬物濃度が低下してもそれと連動しては低下せず、長時間にわたり高い大動脈瘤組織中の濃度を保った。すなわち大動脈瘤組織中から流出、拡散や分解しにくかったと考えられる。これは我々の作成したラパマイシン内包ナノ粒子が大動脈瘤集積に適切な範囲のナノ粒子径であったことが原因の一つと考えられた。また、組織学的に確認されたラパマイシン内包ナノ粒子の局在は、弾性板破壊が著しい部位とは無関係な領域にも一部認められた。これは、CD31 に対する免疫染色により確

認された大動脈瘤に特徴的な新生血管である **medial neovascularization** の分布と関連している可能性が考えられ、第 2 のナノ粒子の集積機序であると考えられた。

そして、標的臓器である大動脈瘤に送達されたナノ粒子は標的細胞に作用することによって治療効果を発揮すると考えられる。大動脈瘤の形成・増大に関係する様々な細胞の内最も重要な細胞の一つがマクロファージである。本実験では大動脈瘤組織に分布したナノ粒子の多くがマクロファージに貪食されていることが明らかになった。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、貪食されたことで、ナノ粒子の多くが直接的にマクロファージに作用したと考えられた。

上記のように大動脈瘤に選択的に集積し、多くがマクロファージに直接的に作用したと考えられたラパマイシン内包ナノ粒子は、同容量のラパマイシン単剤およびコントロールとしての **PBS** を投与した群と比較して有意に大動脈径拡大を抑制した。その機序として、ラパマイシン内包ナノ粒子投与群ではラパマイシン単剤投与群と比較して **IL-1 α** 、**IL-1 β** 、**CINC-1** などの炎症性サイトカイン発現量および **MMP-2** 活性の有意に抑制していることが確認された。また、ラパマイシン内包ナノ粒子投与群でマクロファージの浸潤を抑制する傾向にあり、弾性板や中膜平滑筋細胞は保たれていることが示された。これらの結果はラパマイシンをナノ粒子化することにより、選択的な薬物送達が行われ、大動脈瘤局所での抗炎症作用を増強したことを示している。

【結論】ラパマイシン内包ナノ粒子は大動脈瘤に選択的にかつ有効に集積し、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て直接的に作用することにより、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浸潤抑制、**MMP-2** 活性抑制に寄与し、中膜弾性板の層構造は保存された。その結果、ラパマイシン単剤投与と比較して有意に大動脈径拡大を抑制した。