

論文の内容の要旨

論文題目 ラット頸動脈内膜肥厚モデルにおけるナノ医療の検証
氏名 谷口良輔

【背景】

アテローム性動脈硬化症の初期病変である内膜肥厚は、血管内皮細胞の傷害により惹起されるという傷害反応説が有力である。血管内皮細胞が傷害をうけると、中膜における平滑筋細胞 (smooth muscle cell: SMC) が局所で増殖を始め、内弾性板を越えて内膜側に遊走し更に増殖する。これに細胞外基質 (extracellular matrix: ECM) の合成が加わり、内膜肥厚が形成される。

内膜肥厚は冠動脈疾患に対するステント治療後の再狭窄や、末梢動脈疾患に対するバイパス術後のグラフト狭窄の原因であり、現在まで様々な治療法が試みられてきたもののこれを完全に予防するには至っていない。従来の薬物療法は、低分子量化合物の拡散性から薬剤が全身に分布し、疾患部位以外への副作用が問題となる。薬剤の体内分布を量的、時間的、空間的に制御する必要性から、近年ではナノサイズのキャリアーを用いた drug delivery system (DDS) が検討されてきた。

動脈硬化病変においては、血管内皮細胞が傷害され欠損している部位が多分に存在するため、そのような部位においては内膜組織の ECM が直接血流にさらされていることとなる。そこで、適切にサイズ調整されたナノ粒子であれば、ECM 分子間に存在する微細な間隙を通じて血中からこの内膜肥厚病変に特異的に侵入し分布し得るという仮説を立てた。今回、ラット頸動脈内膜肥厚モデルを用いて、ナノ粒子の局所集積特性を明らかにし、更にはこれを応用した選択的薬物デリバリー治療の可能性について検討した。

【方法】

内膜肥厚病変におけるナノ粒子の集積性評価

内膜肥厚の動物モデルとして、バルーンカテーテルにより左総頸動脈全長に擦過傷害を加えるバルーン擦過モデルを用いた。集積性評価のためのナノ粒子として polyion complex nanocarrier (PIC-nanocarrier) を用いた。これはポリエチレングリコール (PEG) とポリアミノ酸由来の荷電性セグメントからなる荷電性高分子の静電相互作用による自己組織化集合体である。その特徴として①血中滞留性が良好、②サイズ調整が容易かつ厳密、③生体適合性に優れることが挙げられる。この表面に蛍光色素 (Cy5) を付与し、全身投与後の内膜肥厚病変への集積特性を評価した。

PIC-nanocarrier の投与タイミングをバルーン傷害直後 (内皮損傷のみで内膜肥厚は全くない状態)、傷害後 7 日目 (内膜肥厚が形成されている状態) 又は 14 日目 (更に内膜肥厚が形成されている状態) とし、ナノ粒子直径を 40、100 又は 200 nm の 3 サイズとした (それぞれ PICs-40、PICs-100、PICs-200)。これを尾静脈内投与後 1、8 又は 24 時間後に検体 (両側総頸動脈と連続する大動脈弓) を摘出し、in vivo 蛍光・発光イメージング装置を用いて蛍光強度を測定した (各組合せ n = 4)。更に同検体の (免疫) 組織学的評価をレーザー共焦点顕微鏡を用いて行った。

内膜肥厚病変に対する epirubicin 内包ナノ粒子の薬理学的効果

上記のサイズ効果の検証結果に基づき、粒子直径約 49 nm の epirubicin 内包ナノ粒子 (NC-6300) を全身投与し、ラット頸動脈内膜肥厚病変に対する薬理学的効果を検証した。まず NC-6300 の内膜肥厚病変への集積性を確認するため、NC-6300 を蛍光色素 (Alexa647) で標識した同サイズのナノ粒子をバルーン傷害後 7 日目のラットに尾静脈内投与し、8 時間後に検体を摘出し、蛍光イメージング、免疫組織学的を同様に行った ($n = 3$)。

続いて epirubicin 量 6 mg/kg の NC-6300、6 mg/kg の epirubicin (free epirubicin 群) 又は NC-6300 製剤の添加基剤である 10% スクロースのみ (vehicle 群) をバルーン傷害後 7、10、13 日目に尾静脈内投与した (各 $n = 4$)。初回投与から 14 日目に検体を摘出し組織学的評価を行った。

【結果】

ナノ粒子の集積性評価

バルーン傷害直後に PIC-nanocarrier を投与した群では、PICs-40、PICs-100、PICs-200 の全ての粒子サイズにおいて、投与後比較的早い段階で、傷害側頸動脈に明らかな Cy5 発光をイメージングにおいて認めた。非傷害側には明らかな Cy5 発光は認めなかった。定量評価においても傷害側は非傷害側と比べて随所で有意な蛍光強度の上昇を認めた。イメージングにおいて Cy5 発光を認めた検体の組織学的評価では、中膜を中心に Cy5 陽性粒子を認め、SMC 細胞質との共存性は明らかでなかった。

バルーン傷害後 7、14 日目に PIC-nanocarrier を投与した群では、PICs-40 投与後のみ、24 時間経過後も傷害側頸動脈に明らかな Cy5 発光をイメージングにおいて認め、定量評価においても非傷害側と比べて有意な蛍光強度上昇を認めた。一方、PICs-100 や PICs-200 投与後においては、いずれの時間においても明らかな Cy5 発光や蛍光強度上昇を認めなかった。Cy5 発光を認めた PICs-40 投与後の検体の組織学的評価では、内膜肥厚病変の血管内腔近傍に Cy5 陽性粒子を認め、SMC 細胞質ともマクロファージとも概ね共存性を認めなかった。

NC-6300 の集積性、薬理学的効果

Alexa647 標識化 NC-6300 投与後のイメージングでは傷害側頸動脈にのみ明らかな発光を認め、組織学的評価でも Alexa647 陽性粒子を内膜肥厚病変全体に認めた。

Vehicle 群の体重は観察期間中、増加し続けた。NC-6300 群の体重増加はこれより低いものの、減少に転じることなく増加し続けた。一方、free epirubicin 群の体重は減少し続け、初回投与から 10 日目までに全匹死亡した。前二者の組織学的評価では内膜肥厚病変の中膜に対する面積比は NC-6300 群が有意に vehicle 群より小さく ($P < 0.05$)、内膜肥厚病変中の細胞数も有意に少なかった ($P < 0.001$)。

【考察】

本研究では、まずラット頸動脈バルーン擦過モデルを用いて内膜肥厚病変へのナノ粒子集積におけるサイズ効果を検証した。本モデルではバルーン傷害後約 4 日で内膜肥厚病変が出現し始

め、更に数日後には明らかなものとして認識される。本研究の最終目標は既存の動脈硬化病変に対する特異的な DDS の開発であるため、明確に認識できる内膜肥厚病変を伴う動脈を実験対象にする必要があった。そのため PIC-nanocarrier をバルーン傷害後 7 や 14 日後にも投与するプロトコルを採用した。過去の研究ではナノ粒子をバルーン傷害直後に投与するプロトコルがほとんどであることから、本研究のデザインは、より現実の病態に近似したものであると言えよう。

実際、PIC-nanocarrier 投与時に内膜肥厚病変が形成されているか否かでその集積性は明らかに異なる挙動を示した。バルーン傷害直後に投与した時には、全サイズの PIC-nanocarrier が速やかに血管全層に集積した。これはバルーン傷害に伴う内皮細胞の剥皮や内弾性板の微小な亀裂等、血管壁の微小な構造変化に起因すると考えられる。一方、バルーン傷害後 7 や 14 日目に PIC-nanocarrier を投与した時には、内膜肥厚病変には前記のような傷害による亀裂は無いため、PICs-40 のみが内膜 ECM 分子間の微細な間隙を経由して侵入したと考えられる。これは SMC やマクロファージとの非共存性からも裏付けられた。

もう一つ PICs-40 の集積性に関して明らかとなった特徴として、内膜肥厚病変内に留まる時間が長いということがあげられる。バルーン傷害後 7 日目に投与した群では、投与後 1、8、24 時間において有意な集積を認め、少なくとも 23 時間局所に留まっていたこととなる。これを DDS に応用すると、ある程度の持続的なドラッグデリバリーが得られ、内膜肥厚病変での細胞内取り込みの確率を増やすことが出来ると考えられた。

サイズ効果の知見に基づき、今度は細胞増殖抑制効果を持つ epirubicin を内包し、同様の性質を持つナノ粒子 (NC-6300) によるドラッグデリバリーを試み、内膜肥厚病変に対する薬理学的効果を検証した。NC-6300 は生体適合性に優れた PEG を外殻に持つため、その“ステルス効果”によりエピルビシンを内包したまま体循環を回ることが出来る。このため epirubicin が緩徐にデリバリーされ、急速なデリバリーとなる free epirubicin と比べて急性毒性が著明に軽減された。そして、何より NC-6300 の全身投与により vehicle 群と比べて有意に内膜肥厚が抑制された。この結果は、十分量の NC-6300 ミセルが静脈内投与後に内膜肥厚病変に集積し、局所で epirubicin を遊離し細胞内へのデリバリーに成功したことを示唆する。この epirubicin のデリバリーにより内膜肥厚病変における細胞増殖を抑制し、内膜肥厚形成を抑えた。

【結論】

本研究においてナノ粒子を用いた内膜肥厚病変に対する有効な DDS を実現するには、100 nm 以上ではなく 40 nm がナノ粒子直径として適切であることを示した。更にこのサイズ効果の検証に基づき、epirubicin 内包ナノ粒子の薬理学的効果を示した。複雑なリガンドや抗体等を用いず、単純なサイズ調整のみで内膜肥厚病変への特異的な集積性を証明し得たことは新たな知見といえよう。ヒトにおける動脈硬化病変とラット内膜肥厚病変との相同性から、本研究のナノ粒子を用いた DDS は将来的にヒトにおける動脈硬化関連疾患に対する治療に応用できると考えられる。