

令和元年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10652

研究課題名(和文)急性下肢虚血に対するナノ粒子を活用した新規治療戦略の構築

研究課題名(英文)New treatment strategy for acute lower limb ischemia by using nano-micell

研究代表者

小山 博之(KOYAMA, HIROYUKI)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：10241994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：手術不能の重症末梢動脈疾患に対する血管新生療法には未解決の問題が多い。今回、新たな血管新生療法としてポリイオン複合体型ナノ粒子による側副血行路形成部位へのドラッグデリバリーシステムの開発を試みた。本研究に於いては、その粒子サイズを精密に調整することによって、全身投与での標的部位への集積効率を制御できることが明らかにされた。更に、側副血行路形成の促進が期待できるIL-1を薬物として内包した粒子の合成に成功した。しかし、この粒子の標的部位への集積は微弱であり、その要因が粒子の血中安定性の違いに帰することが推察された。今後、薬物内包ナノ粒子の分子設計の再検討ならびに粒子調整条件の最適化が望まれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下肢虚血に対する薬剤投与は、静脈注射での力価では毒性がでる可能性があるため、出来る限り低容量が望ましい。その点ナノミセルを用いたドラッグデリバリーでは、病変部のみに集積し、同部でreleaseされるため効率的である。ただ内包する薬剤とナノミセルとの相性があり、サイズ、電荷など、臨床応用に向けてまだハードルがある。今回の成果で、内包化の最適化が示され、今後の臨床応用への重要なデータを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：There are many unsolved problems in angiogenesis therapy for inoperable severe peripheral artery disease. In this study, we attempted to develop a drug delivery system to the collateral circulation site by polyion complex type nanoparticles as new angiogenesis therapy. The present study revealed that precise adjustment of the particle size can control the accumulation efficiency at the target site in systemic administration. Furthermore, we succeeded in synthesizing particles containing IL-1 as a drug, which can be expected to promote collateral circulation. However, the accumulation of the particles at the target site was weak, and it was inferred that the factor is attributed to the difference in the particle stability in blood. In the future, reexamination of the molecular design of drug-containing nanoparticles and optimization of the particle adjustment conditions are desired.

研究分野：Vascular Surgery

キーワード：Nano-micelle ischemia

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血栓症による急性下肢虚血では、通常狭窄性動脈病変が準備状態として存在し、既にある程度の側副血行路が発達していることが多いため、塞栓症に比して緩徐に経過するのが一般的である。狭窄性動脈病変がベースにあるため、従来の治療では効果が不十分であったり、早期再発をきたす例が少なくない。そのようなケースに対しては、保存的治療を行いつつ側副血行路のさらなる発達を待つか、血行再建術の追加が考慮される。しかし、保存的治療では症状の改善に相当の時間を要する上に慢性虚血に移行する可能性が高く、血行再建術は高侵襲であり実施困難なケースも多い。したがって、より有効性が高く低侵襲な新規治療法の開発が望まれるところであるが、応募者らは側副血行路の発達促進治療にその可能性を見出している。

2. 研究の目的

側副血行路形成の急性期には炎症機転が深く関与しており、これを利用した選択的ドラッグデリバリーや新規イメージング技術の構築を目標とする。

3. 研究の方法

(1) 側副血行路発達部位におけるナノ粒子の分布特性を検討する

応募者らは、ラットの大腿動脈全切除による虚血肢モデルにおいて、内転筋・半膜様筋・恥骨筋内に側副血行路が発達することを見出している。さらに、上記モデル作成翌日に直径 100nm の中空型ポリオンコンプレックス ナノ粒子(PIC ナノ粒子)を静注し、虚血肢の内転筋・半膜様筋・恥骨筋へ選択的に蓄積することも確認している。これらは、側副血行路発達部位における炎症機転を利用することにより、ナノ粒子の同部位への選択的集積が可能であることを示唆している。この知見をさらに深化させるため、選択的集積にとって最適な粒子系と粒子量を探索する。直径 50nm・100nm・200nm の 3 サイズの PIC ナノ粒子を作成し、Cy5 で蛍光標識する。雄ラットの左大腿動脈を全切除し、切除後 1 日目に PIC ナノ粒子を尾静脈より静注する。静注後 1・3 日目に大腿部の各筋肉を回収し、筋肉内における PIC ナノ粒子のマクロ分布を生体イメージングシステムによって観察する。その後各筋肉から凍結切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡でミクロ分布を評価する。平滑筋アクチンや CD68 等に対する蛍光染色により血管平滑筋細胞や単級/マクロファージ等との共局在も検討する。同様の検討を投与する粒子量を変化させて行う。

(2) 側副血行路発達を促す生理活性物質のナノ粒子への組み込み方法を確立する

実際の薬剤内包ナノ粒子の構成素材としては、ブロック共重合体である polyethylene glycol - poly(cationic amino acid)を用いる計画である(Adv Drug Deliv Rev,47,113,2001)。内包させる生理活性物質としては、まずインターロイキン 1 (IL-1)・IL-1・単球走化因子 1(MCP-1)・血管内皮増殖因子(VEGF)・酸性線維芽細胞増殖因子(aFGF)の内包化を試み、その方法を確立したい(J Am Coll Cardiol,55,17,2010)。生理活性物質の表面電荷の関係で内包化が困難な場合は、分子表面に様々な修飾を加えて表面電荷を調整することにより内包可能になるか検討する。その場合、修飾によってその因子が本来持っている生理活性が損なわれないかどうかも検討する。

(3) ナノ粒子による急性虚血肢に対する治療効果を評価する

側副血行路の発達を促す生理活性物質の内包化に成功したら、粒子径を最適なサイズに調整し、急性虚血肢に対する治療効果の評価を実施する。前述のラット急性虚血肢モデルを作成した翌日、適切な量の生理活性物質を内包した適切な量のナノ粒子を静注する。評価は術後 14・21・28 日に実施する。治療効果は、虚血肢機能のスコア化、レーザードップラーイメージング装

置による血流量計測で評価する。また大腿部の各筋組織を採取し、組織標本による側副血行路発達の形態学的評価に加え、免疫染色やウエスタンブロット法による arteriogenesis 関連タンパク (MCP-1, FGF receptor1, MMP-2, MMP-9, TIMP etc) の発現や細胞増殖を検討する。また、ナノ粒子投与が一回だけでは不足な場合は、炎症機転が持続している虚血作成後 1 週間までの間を目安に複数回注射することも検討する (Virchows Arch, 436, 257, 2000)。

(4) 側副血行路発達が惹起されている部位をナノ粒子を用いてイメージングする

側副血行路の発達メカニズムが誘導されている部分に、ナノ粒子が選択的に集積することを活用し、金属内包ナノ粒子を用いて同部位をイメージングする方法を開発する。すでに研究分担者の三浦は、鉄とガドリニウムのナノ粒子への内包技術を保持している。これに対し、現状で応募者らが使用可能な検出機器はマイクロ CT のみであるため、本研究では鉄内包ナノ粒子を用いて検討を進める予定である。ラット急性虚血肢モデルの作成後早期に単回あるいは複数回にわたり、鉄内包ナノ粒子を静注する。その 1・3 日後に様々な条件でマイクロ CT 撮影を試行し、集積部位のイメージングが可能か否かを評価することに加え、イメージデータを三次元構築して組織標本所見と比較検討する。側副血行路発達が惹起されている部分をイメージングできれば、その三次元化イメージをガイドとして、同部位に注射針を穿刺して、そこから直接に側副血行路の発達を促す生理活性物質を注射するという治療法も成立しようと考えている。

(5) 内包生理活性物質の差異による治療効果の違いを評価する

様々な生理活性物質において、内包の実現性・粒子の安定性・治療効果と必要な物質量を比較検討し、最適な物質の探索を行う。前述の候補に加え、腫瘍壊死因子 (TNF) やトランスフォーミング増殖因子 (TGF)、低酸素誘導因子 1 (HIF-1) といった他のサイトカインに加え、非ペプチド小分子として SC-3-149 (Tissue Eng, 12, 1 903, 2006)、sokotrasterol sulfate や cholestanetrisulfate (Circ Res, 99, 257, 2006) など血管再生効果が指摘されており、候補に上がる可能性がある。

(6) 生理活性物質内包ナノ粒子投与の安全性を評価する

arteriogenesis を促進・誘導する生理活性物質を使用するにあたり、最大の問題点は腫瘍や増殖性疾患の発生・増悪のリスクが存在することである。以前より bFGF に腫瘍の進行を促進する作用があることや、VEGF と未熟児網膜症・増殖性糖尿病性網膜症との関連が指摘されている。Arteriogenesis に関連する生理活性物質を全身投与することでこれらの有害事象が増加しないかどうかを確認することは、臨床応用を考慮する段階で重要と考えられる。ナノ粒子内包生理活性物質を投与したラットを長期飼育し、microCT や犠牲死後の解剖で腫瘍発生有無を確認する・網膜の組織学的評価を行う等を検討している。

4. 研究成果

急性下肢虚血モデル作成 24 時間後に径 30nm と 100nm の蛍光ナノ粒子を静注し、内転筋等に粒子が集積するかを確認した。ナノ粒子はポリイオン複合体型中空粒子 (PICsome) を用いた。径 100nm の PICsome を投与した群では、投与 24 時間後・72 時間後において内転筋・恥骨筋で健側より有意に強い蛍光集積が認められた。径 30nm の PICsome を投与した群では、いずれの筋肉にも有意な集積の差は認められなかった。次にナノミセル化する薬剤を選定した。血管新生を

誘導する物質としてサイトカインを用いることとした。各種のサイトカインを机上でシミュレーションしたところ、IL-1bが最も安定してミセルを形成する可能性が高かったため、IL-1bのミセル化を行った。無水シトラコン酸(Cit)と2,5-dihydro-4-methyl-2,5-dioxo-3furanpropanoic acid(FP)の2種類の低分子を用いて表面電荷の調節を行い、ポリエチレングリコール鎖とポリ陽イオンの複合ポリマーを用いてPICmicelleを作成することに成功した。一方、低分子を表面に結合させたペプチドは表面構造が変化することから活性を失うことがあるため、その検証を行った。修飾前のIL1b・Cit, FPをそれぞれ結合させた計3種類のIL-1bを、予め培養した線維芽細胞に投与した。投与24時間後に培養液を回収し、産生されるIL-8の量を定量することでそれぞれのIL-1bの生理活性を評価した。Citを結合させたIL-1bはほぼ完全に活性を失っていたが、FPを結合させたIL-1bは修飾前の1/2程度の活性を有していた。昨年からの進捗は、径100nmの径より大きいものを検証することが最適化には必須であることを指摘され、その追加実験を行ってきた。その結果、100nmで最も効率的に取り込まれることが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- (1) Makino Y, Miyahara T, Nitta J, Miyahara K, Seo A, Kimura M, Suhara M, Akai A, Akagi D, Yamamoto K, Hoshina K. Proresolving lipid mediators Resolvin D1 and Protectin D1 isomer attenuate neointimal hyperplasia in the rat carotid artery balloon injury model. J Surg Res 2019[Epub ahead of print]
- (2) Suhara M, Miura Y, Cabral H, Akagi D, Anraku Y, Kishimura A, Sano M, Miyazaki T, Nakamura N, Nishiyama A, Kataoka K, Koyama H, Hoshina K. Targeting ability of self-assembled nanomedicines in rat acute limb ischemia model is affected by size. J Control Release 2018;286: 394-401
- (3) Akagi D, Hoshina K, Akai A, Yamamoto K. Outcomes in Patients with Critical Limb Ischemia due to Arteriosclerosis Obliterans Who Did Not Undergo Arterial Reconstruction. Int Heart J 2018[Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計2件)

- (1) 須原 正光, 赤木 大輔, 佐野 允哉, 仁田 淳, 宮原 和洋, 瀬尾 明彦, 木村 賢, 牧野 能久, 赤井 淳, 高山 利夫, 山本 晃太, 西山 綾子, 三浦 裕, Horacio Cabral, 小山 博之, 保科 克行, 渡邊 聡明: 急性下肢虚血下の側副血行路形成に対するナノ粒子を利用したドラッグデリバリーシステムの有用性 第58回日本脈管学会総会 2017年10月19日 名古屋 口演
- (2) 須原 正光, 小山 博之, 三浦 裕, 片岡 一則, 保科 克行, 渡邊 聡明: 急性下肢虚血に対するナノ粒子を用いた新たな治療戦略の探求 第15回日本再生医療学会総会 2016年3月17日 大阪 口演

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：宮原 拓也

ローマ字氏名：MIYAHARA TAKUYA

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号（8桁）：20704943

研究分担者氏名：三浦 裕

ローマ字氏名：MIURA YUTAKA

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院工学系研究科（工学部）

職名：客員研究員

研究者番号（8桁）：40557980

研究分担者氏名：保科 克行

ローマ字氏名：HOSHINA KATSUYUKI

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：90571761

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。