

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591859

研究課題名(和文) 動脈瘤壁をターゲットとした新規ドラッグデリバリーシステムの基礎検討

研究課題名(英文) A novel drug delivery system targeting the aortic wall

研究代表者

保科 克行 (Hoshina, Katsuyuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90571761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：腹部大動脈瘤に対するdrug delivery systemの開発に際しての基礎的な知見を得るため、我々はラットモデルにおけるナノ粒子の特性を検討した。蛍光標識されたサイズ調節可能なナノ粒子であるpolyion complex hollow vesicle (PICsome)をラット腹部大動脈瘤モデルに全身投与することにより、ナノ粒子が腹部大動脈瘤に集積すること、その集積性が粒子サイズによって変化すること、及び中膜に集積したナノ粒子が比較的長期間残存することが明らかとなった。これらの知見から、ナノ粒子は腹部大動脈瘤に対するdrug delivery systemの有望な材料であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of nanomicelle on a rat aneurysm model for the purpose of exploiting a novel drug delivery system for the abdominal aortic aneurysm. We injected polyion complex hollow vesicle (PICsome), which is a fluorescent-labeled and size-changeable nano particle, into a rat aneurysm model. We revealed that the nano particle gathered and retained in an abdominal aortic aneurysmal wall, the degree of the aggregation was dependent on the particle size, and the particle gathered on the medial layer retained relatively for a long term. From these data, we assumed that PICsome should be a promising material for the drug delivery system for the abdominal aortic aneurysm.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：血管外科学 drug delivery system ナノミセル 腹部大動脈瘤

1. 研究開始当初の背景

(1)腹部大動脈瘤の実験モデルとその成績

瘤の拡張を抑制するもしくは縮小させる、治療法の模索は以前から行われており、いくつかの実験モデルが存在する。中でもエラストラーゼ注入ラットモデルは、安定して瘤を作成できるゴールドスタンダードとして1990年より使用されてきた。MMP inhibitor や NSAIDs など様々な薬剤の血管内・血管周囲・全身投与が行われ、また血管壁内への遺伝子導入などでも瘤抑制の良好な結果がでてきた。しかし実際に人間に行われたスタディは、全身投与のものがあるが結果はでない。動物モデルで行うことのできる瘤への直接的なアプローチ(周囲組織への局所注入や、壁への electroporation による遺伝子導入)は効率的ではあるが、実際に応用するには侵襲が大きく現実的ではない。

(2)腹部大動脈瘤への‘炎症’の関与

腹部大動脈瘤は動脈壁の炎症の結果もしくは並存する現象であることが従来いわれてきた。炎症性動脈瘤という特殊例を持ち出すまでもなく、巨大な瘤では術中に周囲組織への癒着を高度に認め剥離に難渋することも多く、炎症の存在が示唆される。実際同瘤壁の周囲にはマクロファージやリンパ球の集積を認めている。炎症性腹部大動脈瘤は、十二指腸や尿管などの周囲組織を巻き込んだ臓器障害を来し高度の癒着所見を呈し、これにはサイトメガロウイルスの介在を指摘する報告もあるが etiology は不明の難治性疾患である。小さな瘤と大きな瘤を比べて炎症所見を比較した研究では、MMP-9 の活性化を介して炎症細胞が瘤外膜に誘導され、それが瘤拡張や破裂に関与するという報告もある。炎症というキーワードから、炎症部位に特異的に作用する DDS がないかということを探していたが今まで手がかりはなかった。

(3)癌の‘炎症’とナノミセルによるデリバリー

近年、癌の新生血管を始めとする進展のプロセスにおいて、各種サイトカインの関与と組織の透過性亢進が指摘されてきた。ナノミセルを用いた薬剤内包モデルは、すでに癌部への特異的なデリバリーが証明されており、組織透過性の観点からは動脈瘤モデルに転用するに最適なモデルと考えられた。さらにエラストラーゼ注入モデルは動脈硬化性機序とは多少異なるものの、腎動脈下の限局した部位の炎症と瘤という条件を満たしている。

2. 研究の目的

(1)腹部大動脈に特異的にナノミセルが集積するか

エラストラーゼ注入モデルにおいて、炎症部位へのナノミセルの集積の確認が第一である。動脈硬化性変化によって完全に内膜・中

膜レベルで破壊された腹部大動脈瘤と、エラストラーゼによって多大なダメージを受けたラット動脈壁は類似しており、ナノミセルが特異的に同組織へ浸透することが予想される。まずは可視化を第一段階と考えている。蛍光ラベルされたミセルを、肉眼的にまたはイメージスキャナーによって観察し、できれば定量したい。

(2)DDS の効果は？

次に DDS の効率の確認が行われる。まず腹部大動脈瘤部とコントロールである胸部大動脈の組織内濃度の比較をする。これで差があれば、組織内濃度と血中濃度の比較をし、十分に組織内濃度が高いことを確認し DDS 効率を確認する。

(3)実際に瘤は抑制されるか？

In vivo での実際の瘤抑制効果はラット約10匹ずつを比較する。

(4)メカニズムは？

組織内遺伝子発現、およびミクロレベルでの組織対比(平滑筋および内膜・外膜の維持)がなされる予定である。

3. 研究の方法

(1)エラストラーゼ注入ラットモデルの作成

腹部動脈瘤を安定して供給することがこの研究の基本・成功のかぎとなる。SDラットの腹部大動脈内にエラストラーゼ溶液を1時間かけて注入し、開放する。これにより2-4日後に瘤ができる。安定した瘤径を得るためには手技の確立、エラストラーゼのロットの固定とそのロットでの最適化が必要である。

(2)ナノミセルの導入

親水性外殻と疎水性内殻で構成されたナノミセルを使用する。すでに癌の研究で使用されている Epirubicin 内包ミセルを使用し、最適化を行う。全身投与後に蛍光ラベルされたミセルを腹部大動脈レベルにおいて肉眼的に、または蛍光顕微鏡によって確認する。次に組織内薬剤濃度の測定および、血中濃度の測定を行う。ミセルに内包する薬剤の種類は、順次検討する。

(3)予備実験と研究手法の修正

はじめに、我々はラット腹部大動脈瘤に対するナノ粒子の集積性の有無を検討するために予備実験を行った。ラット術後7日目にナノキャリア株式会社から提供を受けたエピルビシン内包ミセルを投与した。投与直後、投与後1時間、4時間にラットを sacrifice し、腹部大動脈瘤(AAA)及び胸部大動脈(TA)を採取した。採取した検体の組織内エピルビシン濃度を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて測定した(外注)(Fig. 3)。予備実験の結果からは、ナノ粒子がラット腹部

大動脈瘤に集積する可能性は示唆されたものの、データ間のばらつきが大きく有意な結果は得られなかった。さらに、予備実験においては以下のような問題点が明らかとなった。

- ・モデル作成が不安定であり、手術中あるいは手術後に死亡する個体が多かった。
 - ・エピルピシンミセルの供給量に限界があり、各種条件を変更して実験を繰り返すことが困難であった。
 - ・測定 (HPLC) が外注であり、実験者にとってブラックボックスとなっていた。
- これらの問題点を解決するために以下のように実験手法を変更し、本実験を行った。
- ・モデル作成の際の麻酔方法をイソフルラン吸入による全身麻酔とする。
 - ・ナノ粒子の材料として PICsome* を用いる。
 - ・蛍光標識されたナノ粒子を用い、すべての測定・評価は蛍光を用いて行う。

(4) Cy5 labeled PICsome の合成

(*PICsome について : Polyion complex hollow vesicle (PICsome) は、両親媒性ブロック共重合体の疎水性相互作用を集合体形成の駆動力とする既存のポリマーソームとは異なり、生体適合性に優れた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。PICsome は、調整の際に有機溶剤や超音波処理を必要としないという点で既存のポリマーソームに対して大きな利点を有しており、また、ポリマー溶液の濃度を変えることで容易にサイズ制御が可能である)

(5) 測定手法

プロトン核磁気共鳴法 ($^1\text{H-NMR}$)

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルは JNM-AL 300 (JEOL, Japan) もしくは JNM-ECS 400 (JEOL, Japan), によってそれぞれ 300 MHz、400 MHz において測定された。溶媒は非イオン性のものについては d_6 -DMSO を用い、イオン性のものについては D_2O を用いた。温度はサンプルによって常温もしくは 80 において測定された。

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

溶出液は NMP に 50 mM の臭化リチウムを溶解させたものを用いた。カラムは TSKguradcolumn Super AW4000 と二つの SuperAW3000 (いずれも東ソー株式会社, 東京) を直列して用いた。温度は 40 , 溶出速度は 0.3 ml/min で測定を行った。

水系サイズ排除クロマトグラフィー (水系 SEC)

アニオンを持つポリマーについては、溶出液として 10 mM の濃度のリン酸緩衝液 (pH = 7.4, NaCl = 500 mM) を用い、カチオンを持つポリマーについては 10 mM の濃度の酢酸緩衝液 (pH = 4.0, NaCl = 500 mM) を用いた。カラムは Superdex 200 を用い、溶出速度は 0.75 ml/min, 常温で測定を行った。

(6) 原料の合成

BLA-NCA の合成

b-Benzyl-L-aspartate (BLA) 14.6 g (65.5 mmol, 1 equiv) を室温で 12 時間ほど真空乾燥した後、THF 140 ml を加えて 40 分激しく攪拌して BLA を微分散させた。Triphosgene 8.42 g (28.4 mmol (phosgene 換算 : 85.2 mmol, 1.30 equiv)) を別のナスフラスコに入れ、THF 16 ml を加えて 5 分ほど攪拌して溶解させた。この THF 溶液をシリンジにて BLA の入ったフラスコに加え、50 で 2 時間反応させた。

その後、反応溶液を室温付近まで冷却させ、シリンジ操作により激しく攪拌させた hexane (600 ml) 中へスムーズに滴下することで NCA を沈殿させた。30 分ほど攪拌を続けた後、-20 で一晩静置した。次いで、得られた沈殿をガラスフィルターを装着したガラス器具を用いて Ar 下で濾過した。フィルター上に残った白色粉状固体を真空乾燥させた (室温、2 時間)。乾燥を終えた白色粉状固体に対し、THF 100 ml を加えて再溶解させ、再び hexane 500 ml 中に再沈殿させた。前回同様、30 分間の攪拌を続けた後、-20 で一晩静置した。

2 回の再沈殿操作を経た “粗 NCA” の上澄み液をシリンジ操作にて、予め真空乾燥させておいた別のナスフラスコに移した。“粗 NCA” に残る溶媒、そして上澄み液それぞれを突沸に注意しながら減圧除去させた後、真空乾燥させた。溶媒等を入れる前のナスフラスコ重量、そして作業後の重量との差から、それぞれの NCA 量を見積もり、THF/NCA が 7 - 8 ml/g となるように再び THF を加え溶解させた。次に、THF 量に対して約 8 割の体積を目安とし、シリンジにてゆっくりと注意深く hexane を加えていった。hexane の滴下は、NCA の THF 溶液が白く濁る直前で止めた。この溶液を冷蔵庫 (4) で数時間、さらに -20 下で一晩静置することで NCA を結晶として析出させた。この再結晶操作は 5 - 6 回繰り返し行った。また、再結晶操作では、析出した NCA と上澄み液に溶解した NCA では純度に差が生じるため、純度がほぼ同程度と思われるものを適宜混合し、純度として 3 段階ほどに分けた。

Homo-P(Asp-AP)₈₂ の合成

凍結乾燥された homo-PBLA (DP = 82,200 mg) を NMP 10ml に溶解した。次に NMP (5.6 ml) と 1,5-diaminopentane (DAP; 5.6ml; BLA と 50 モル等量) を混合したものを homo-PBLA 溶液に加え、4 で一時間攪拌した。攪拌後の溶液を氷浴下に 5N HCl aq. 40ml で中和し、0.01M HCl を外液とした透析操作を 3 日間、さらに蒸留水を外液とした透析操作を 24 時間行った後に凍結乾燥を行い 188.8 mg の Homo-P(Asp-AP) を回収した。 $^1\text{H-NMR}$ 測定の結果からはベンジル基に由来するシグナルは消失しており、また Homo-P(Asp-AP) に関連するすべてのシグナルが確認された (Fig. 9)。 $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): 0.8 (3H, a), 1.38 (164H,

f1 and f2), 1.42 (164H, g1 and g2), 1.60 (164H, e1 and e2), 2.70 (164H, c1 and c2), 2.92 (164H, d1 and d2), 3.14 (164H, h1 and h2), 4.58 (82H, b1 and b2). Homo-P(Asp-AP)のゲル浸透クロマトグラムは単峰性を示した

Poly (ethylene glycol)-Poly (-benzyl-L-aspartate) (PEG-PBLA₇₅)の合成

¹H-NMRによって測定されたPEG(3.52, a)のメチレンプロトンのピーク面積とBLA unit(7.27, c)のフェニル基由来のプロトンのピーク面積を比較することにより, BLAの重合度は75と計算された. ¹H-NMR (d₆-DMSO): 2.59-2.89 (166H, CH₂CO, f), 3.52(180H, OCH₂CH₂ a), 4.62 (70H, COCHNH, e), 5.01 (152H, COOCH₂Ph, d), 7.27 (377H, COOCH₂Ph, c), 7.92(64H, COCHNH, b).

Poly (ethylene glycol)-Poly(-aspartic acid) (PEG-P(Asp)₇₅)の合成

¹H-NMRによって測定されたPEG(3.70, a)のメチレンプロトンのピーク面積と, -P(Asp) segment (4.47, 4.67, b1, b2)のメチレンプロトンのピーク面積を比較することにより, BLAの重合度は75と計算された. また, ¹H-NMRによりポリマー主鎖の分解がないことならびに脱保護反応が速やかに進行したことを確認した (Fig. 13). ¹H-NMR (D₂O): 2.76 (155H, c1 and c2), 3.70 (180H, a), 4.47 (59H, b2) and 4.67 (19H, b1). PEG-P(Asp)のゲル浸透クロマトグラムは単峰性を示した.

PEG-P(Asp)₇₅-Cy5の合成

PEG-P(Asp) (45-75, 15.0 mg)を2 mlの0.1 M 炭酸ナトリウム緩衝剤 (pH 9.3)に溶解したものを, Cy5 monofunctional dye (Cy5-NHS, 1 mg)に加え, 室温で一時間激しく攪拌した. 未反応のCy5-NHSを蒸留水 / EtOHを外液とした透析操作により除去した後, 凍結乾燥を行い, 14.7mgのPEG-P(Asp)-Cy5を回収した.

(7)PICsomeの合成

PEG-P(Asp)-Cy5とHomo-P(Asp-AP)を別々に10 mMリン酸緩衝液に溶解 (PB, 0 mM NaCl, pH 7.4)した. これらの溶液を0.22 μmのmembrane filterで濾過した後に, -COO⁻とNH₃⁺の電荷が等量になるように混合し, ボルテックスミキサー (2000 rpm, 2 min)で攪拌することによりCy5 labeled PICsomeを合成した.

(8)架橋PICsomeの合成

EDC 10 mgを10 mMのリン酸緩衝液1 mlに溶解して調製したEDC溶液 (670 μl)を960 μlのPICsome溶液に加え, 4にて12時間静置した. 反応溶液を限外ろ過膜 (MWCO; 300,000) (g = 800, 4, 10 times)にて処理することにより精製した. 得られた架橋PICsome溶液のアニオンポリマー濃度はおお

よそ10 mg/mLに調製した. 得られたPICsomeの化学的物性はzetasizerならびにcryo-TEMにより確認した

(9)3D in-vivo イメージング

IVIS® Imaging System (Xenogen, Alameda, CA)は, 生体の発する微弱な発光 (酵素発光または蛍光)を-90度に冷却されたCCDカメラで検出することにより, 生体内の遺伝子発現やタンパク質の挙動を生きたまま体外からモニタリングすることを可能にする装置である. また, IVIS® Imaging Systemは, 体表面における測定値から生体内の光源の強さを計算しており, 生体内の発光を三次元的に再構築することが可能である. さらに, ソフトウェア Living Image®を用いることにより, IVIS® Imaging Systemで得られた三次元画像と, CT画像から得られる三次元再構築像を合成することが可能であり, これにより生体内の発光部位を詳細に検討することが可能である.

作成したラット腹部大動脈瘤モデルに100 nmのCy5 labeled PICsomeを尾静脈からの静脈注射により投与 (ラット体重1 kgあたりPICsome 1 ml)した. 投与後24, 48時間に1.5~2%のイソフルラン吸入で麻酔し体幹部を除毛し, 吸入麻酔を継続したままで, IVIS® Imaging system (透過光, excitation 640nm, emission 680nm)で観察を行った. IVIS® Imaging systemによる観察後, 引き続き吸入麻酔下に頸部正中を切開し, 左総頸動脈を露出. 左総頸動脈からポリエチレンチューブ (PE-10)を中枢側に挿入, 先端を胸部下行大動脈に留置し, 造影剤イオメプロール1 mlを約20秒間かけて注入しながら, 小動物用CT撮影装置であるin vivo micro X-ray CT system R_mCT2 (Rigaku Co., Tokyo, Japan)を用いてCT撮影を行った. IVIS® Imaging systemの三次元画像構築, 及びCT画像との合成はソフトウェア Living Image®を用いて行った.

(10)2D ex-vivo イメージング

3D in-vivo イメージングの信頼性を高めるため, さらに2D ex-vivoでのイメージングを行った. 作成したラット腹部大動脈瘤モデルに100 nmのCy5 labeled PICsomeを尾静脈からの静脈注射により投与 (ラット体重1 kgあたりPICsome 1 ml)した. 投与後1, 4, 8, 48, 96時間にsacrificeし, 胸部大動脈から腸骨動脈までを連続した検体として採取した. PBSで洗浄後にIVIS® Living Imageで観察した (反射光, excitation 640 nm, emission 680 nm). 腹部大動脈瘤の部位の単位面積あたりの蛍光強度をLiving Image®を用いて測定した.

(11)定量測定

はじめに, 100 nm Cy5 labeled PICsomeの希釈系列を作成し, 蛍光強度の測定を蛍光光

度計 NanoDrop 3300 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) を用いて行ったところ, PICsome の蛍光強度は希釈系列に沿って線形に推移することが確認された (Fig. 18). 従って, 投与量・測定方法を規格化すれば, 蛍光強度を測定することにより PICsome の動態を定量的に評価することが可能であると考えられた. 各測定は3回行って平均値を採用, 線形回帰は最小2乗法を用いて行った.

次に作成したラット腹部大動脈瘤モデルに 40, 100, 200 nm の PICsome を尾静脈からの静脈注射により投与 (ラット体重 1 kg あたり PICsome 1 ml) した. 投与後 1, 4, 8, 48 時間 (100 nm は 96 時間も追加) に過量麻酔にて sacrifice し, 右心房から 5 ml 採血後, 下大静脈を離断し左心室を穿刺した. 左心室から PBS 150 ml で全身を還流し, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 肺, 胸部大動脈, 腹部大動脈瘤を採取した (各 n=5). 血液は 2000 G で 5 分間遠心し, 血清の蛍光強度を NanoDrop 3300 で測定した.

その他の臓器検体は, 100 mg あたり 200 μ l の Lysis Buffer を添加したのちに液体窒素で凍結し, Multi-beads shocker (Yasui Kikai Corporation, Osaka, Japan) を用いてホモジナイズした. 1500G, 3分 で遠心後, 上清の蛍光強度を NanoDrop 3300 で測定した. 各 n=5 として検体を採取し, さらに測定は各検体につき 3 回行い, 平均値を採用した. 測定値を, 各 PICsome 原液の蛍光強度測定値で除し, % dose / 100 mg organ とした.

(12) 組織学的検討

作成したラット腹部大動脈瘤モデルに 100 nm の Cy5 labeled PICsome を尾静脈からの静脈注射により投与 (ラット体重 1 kg あたり PICsome 1 ml) した. 投与後 1, 8, 48 時間に sacrifice し腹部大動脈瘤を採取した. 10 μ m 厚の新鮮凍結切片を作成し Hoechst で細胞核を染色後, 共焦点レーザー顕微鏡 LSM 780 (Carl Zeiss AG, Germany) で観察した. また, 100 nm PICsome 投与後 24 時間の検体を 10 μ m 厚の新鮮凍結切片とし, Hoechst で細胞核を, 一次抗体 Monoclonal Antibody anti rat CD68 (BMA BIOMEDICALS, T-3003), 二次抗体 Alexa Fluor[®]488 Goat Anti-Mouse IgG でマクロファージを染色後, 共焦点レーザー顕微鏡 LSM 780 (Carl Zeiss AG, Germany) で観察した. なお, 画像処理, マクロファージと PICsome の co-localization の評価はソフトウェア ZEN (Zeiss Efficient Navigation) を用いて行った.

(13) 統計解析

すべてのデータは平均値と標準偏差で記載した. 平均値の差の検定は統計ソフトウェア JMP 9.0.0 を用いて, Student の t 検定を行い, $p < 0.05$ を有意水準とした.

4. 研究成果

(1) 瘤形成の確認

術後 7 日目の時点で, 腎動脈下の腹部大動脈は紡錘状に拡張していた. 腹部大動脈瘤頸部の直径は 1.87 ± 0.21 mm に対して, AAA の直径は 4.81 ± 0.92 mm となっており, 十分な瘤形成が確認された.

(2) 3D in-vivo & 2D ex-vivo イメージング

3D in-vivo イメージングでは, PICsome 投与後 24, 48 時間後のラットで腹部大動脈瘤の近傍に Cy5 由来の蛍光シグナルが観察された. また 2D ex-vivo イメージングでも, PICsome 投与後 1, 4, 8, 48, 96 時間すべての検体において, 腹部大動脈瘤に一致して Cy5 由来の蛍光シグナルが観察された. 腹部大動脈瘤の部位の単位面積あたりの蛍光強度を測定すると (n=1), 投与後 4~48 時間に蛍光強度のピークの存在が示唆された. IVIS[®] Imaging System を用いたイメージングの結果からは, PICsome がラット腹部大動脈瘤に集積する可能性が示唆された.

(3) 定量測定 (臓器分布)

NanoDrop を用いた定量評価では, すべてのサイズの PICsome において, 腹部大動脈瘤は常に胸部大動脈に比して強い蛍光強度を示した (n=5, student t-test $p < 0.05$). 40 nm の PICsome では, 腹部大動脈瘤を含むすべての臓器において蛍光強度は投与後時間の経過とともに減弱しており, AAA の蛍光強度は投与後 1 時間が最も強かった. 一方, 100 nm の PICsome では, AAA 以外の臓器では蛍光強度はおおむね単調減少であったが, AAA においては, 投与後 1 時間よりも, 4, 8, 48 時間のほうが腹部大動脈瘤の蛍光度が強かった. 投与後 4, 8, 48 時間の測定値間では有意差はなく, 96 時間の蛍光強度は有意に弱かった. また, 200 nm の PICsome では 40 nm, 100 nm の PICsome に比べて AAA 集積効率は悪いものの, 腹部大動脈瘤における動態は 100 nm に類似していた. さらに, 200 nm PICsome は肝臓, 腎臓, 肺への移行が乏しい一方で, 脾臓への集積が多かった. すなわち, 40 nm の PICsome では腹部大動脈瘤にすばやく集積し wash out されるのも早い一方, 100 nm 以上の PICsome では集積にやや時間がかかるものの wash out されづらいという結果が得られた. また得られた臓器分布の結果から, 各臓器の投与後 48 時間までの AUC (Area Under the Curve) を計算すると, AAA における AUC は 100 nm PICsome で最も大きく, AAA への集積効率は 100 nm PICsome で最も高いことが明らかとなった.

(4) 組織学的検討

HE 染色では弾性繊維の破壊, 炎症細胞浸潤といった典型的な experimental AAA の特徴が確認された. なお, 炎症細胞浸潤は AAA の周囲全周に認められるのに対し, 弾性繊維は

一部残存している部位が観察された。また LSM による観察では、PICsome の分布に 2 つの特徴的な傾向がみられた。まず 1 つ目は、「部位依存性」とも呼ぶべき傾向である。我々のモデルでは、瘤壁の弾性繊維が破壊されている部位と比較的保たれている部位が混在していたが、PICsome の蛍光は弾性繊維が破壊されている部位に多く観察され、弾性繊維が比較的保たれている部位への分布は少なかった。次に 2 つ目の傾向は「時間依存性」と呼ぶべきで、投与 1 時間後の検体では、中膜の内腔側ごく一部に PICsome が観察されるのみであったのに対し、投与 8 時間後の検体では、PICsome が中膜だけでなく、外膜や周囲組織にも広く分布していた。さらに 48 時間後では PICsome は主に中膜に残っているのみで外膜や周囲組織にはほとんど分布がみられなかった。また、マクロファージ免疫染色からは、AAA の全周にわたってマクロファージが分布していること、及びマクロファージと PICsome が co-localize していないことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Hoshina K, Shigematsu K, Okamoto H, Miyata T, et al. The effect of recombinant human soluble thrombomodulin on disseminated intravascular coagulation in an abdominal aortic aneurysm. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2013;25:389-391 (DOI:10.1097/MBC.000000000000031)

Hoshina K, Okamoto H, Shigematsu K, Miyata T, et al. Study design of PROCEDURE study. A randomized comparison of the dose-dependent effect of pitavastatin in patients with abdominal aortic aneurysm with massive aortic atheroma: prevention of cholesterol embolization during endovascular and open aneurysm repair with Pitavastatin (PROCEDURE) study. *Ann Vasc Dis* 2013;6:62-66. (DOI:10.3400/avd.oa.12.00064)

Hoshina K, Okamoto H, Shigematsu K, Miyata T, et al. Outcomes and morphologic changes after endovascular repair for abdominal aortic aneurysms with a severely angulated neck: A device-specific analysis. *Circ J* 2013;77:1996-2002 (DOI:10.1253/circj.CJ-13-0204)

Nemoto M, Hoshina K, Takayama T, Miura S, Nakazawa T, Kato M, Shigematsu K, Miyata T, Watanabe T. Statins reduce extensive aortic atheromas in patients with abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Dis* 2013;6:711-777 (10.3400/avd.oa.13-00065)

〔学会発表〕(計 3 件)

保科克行、岡本宏之、重松邦広、宮田哲郎ほか 腹部ステントグラフト術後 3 年以上の検討: デバイスと瘤の interaction にみる有害事象の兆し 第 41 回日本血管外科学会学術総会 2013 年 5 月 30 日 大阪

保科克行、岡本宏之、重松邦広、宮田哲郎ほか Type 2 Endoleak に対するコイル塞栓術 3 例と今後の治療戦略について 第 17 回大動脈ステントグラフト研究会 2013 年 7 月 20 日 青森

保科克行、岡本宏之、重松邦広、宮田哲郎ほか 大動脈ステントグラフトの branch protection: 最善の手法とは? 第 54 回日本脈管学会総会 2013 年 10 月 10 日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

保科 克行 (HOSHINA, Katsuyuki)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 90571761

(2) 研究分担者

宮田 哲郎 (MIYATA, Tetsuro)
東京大学・医学部附属病院・届出研究医
研究者番号: 70190791

重松 邦広 (SHIGEMATSU, Kunihiro)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20215966

岡本 宏之 (OKAMOTO, Hiroyuki)
東京大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号: 60348266