

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462205

研究課題名(和文) 頭頸部血管形成術後再狭窄に対するナノ粒子を用いた診断・治療についての基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research about application of liposomes to prevent stenosis after angioplasty of craniocervical artery stenosis

研究代表者

鶴田 和太郎 (Tsuruta, Wataro)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：50642104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、血管形成術後再狭窄部で発現するE-selectin蛋白に親和性を持つ糖鎖sialyl Lewis X(SLX)を標識したナノ粒子を用いた再狭窄の診断・治療法を考案することである。今回、MRIによる再狭窄出現部位のイメージングをテーマとした、SLX標識リポソーム内にガドリニウムを封入し、再狭窄出現部位に選択的にガドリニウムを誘導して、MRIでイメージングを行うシステムを想定して実験を開始した。ラットを用いた頸動脈内膜損傷モデルにおいて、再狭窄の起点となるE-selectin発現部位にリポソームが取り込まれることが確認された。MRIを用いた再狭窄部イメージングの可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Objective of our study is to build up a new method for management of post-angioplasty restenosis using liposomes, whose surface was decorated with sialyl Lewis X (SLX). Drug delivery is controlled with the affinity between SLX and E-selectin proteins, which are expressed on vessel walls after angioplasty and promote restenosis. Main theme of this task is visualization of E-selectin positive lesion on MRI. Gd-liposome SLX, which is liposome including gadolinium (Gd) with SLX decoration was used for E-selectin targeting. In vivo experiments confirmed accumulation of Gd matched with E-selectin positive lesions after angioplasty.

研究分野：脳血管障害

キーワード：Vascular stenosis Angioplasty Liposome Drug delivery Selectin

1. 研究開始当初の背景

(1) DES が抱える問題: 近年、心血管障害ではステントを用いた治療が主流であり、また頸動脈ステント留置術も頸動脈内膜剥離術との randomized study の結果、適応を拡大しつつある。一方で術後の再狭窄が問題とされており、冠動脈では 20-30%⁽¹⁾、頸動脈狭窄でも 5%程度に起こるとされてきた⁽²⁾。再狭窄予防法については、これまで抗がん剤局所療法である DES、放射線療法、光線療法等が検討されてきたが、現在最も有効とされるのは DES であり、臨床応用されている。しかしながら、DES 留置後は長期間ステント内腔の内膜形成が不良となるため、慢性期血栓性閉塞が問題となる⁽³⁾。また、血栓性閉塞予防のための抗血小板薬長期投与は、出血性合併症のリスクにもなる。

(2) ステント留置が困難な病変の再狭窄予防: 頭蓋内血管狭窄に対する血管形成術では、血管径が小さいこと、分岐部や屈曲病変が多いことからステント留置が困難でバルーン血管形成術のみとなることが多く、高率に再狭窄が起こる。しかしバルーン血管形成術後再狭窄予防の有効な手段はこれまでなかった。

(3) 我々のこれまでの研究: 生体内において、Sialyl Lewis X (SLX) は白血球表面に発現している糖鎖であり、炎症部位に発現するリポ蛋白 E-selectin と親和性を持つ。我々は血管形成術後の血管壁にも損傷により E-selectin が発現しており、糖鎖 SLX と E-selectin の親和性を利用したターゲティングシステムにより血管形成術後の血管壁に薬剤を選択的に誘導することが可能であるという仮説を立て検証した。表面に糖鎖 SLX を標識し、内部に抗癌剤 doxorubicin を封入したリポソームナノ粒子(Dox-lipo-SLX)を作成した。予備実験では、E-selectin 発現

細胞に選択的に取り込まれた doxorubicin が確認された。また動物実験では、Dox-lipo-SLX を投与したバルーン形成術後のラット損傷血管で著明な doxorubicin の集積が観察された。さらにこのシステムによる血管形成術後の狭窄予防効果をラット頸動脈拡張損傷モデルで検証した(2006,2009 鶴田ら)。

今後臨床応用に結びつけていくためには、再狭窄出現のシグナルとなる E-selectin が血管形成術後、どのタイミングで発現し、どの期間発現し続けるのかをモニタリングし、それに合わせた薬剤投与のプロトコルを確立する必要がある。

2. 研究の目的

血管狭窄病変に対するステントを用いた血管形成術では、術後の再狭窄が問題となる。再狭窄予防法について、現在有効とされるのはドラッグエリユーティングステント (DES)であるが、慢性期血栓性閉塞や抗血小板薬長期投与の問題が存在する。我々は DES の欠点を克服し新しい再狭窄予防法を確立するため研究を開始した。本研究の目的は経静脈投与にて再狭窄発生部位へ選択的に集積するナノ粒子を用い、血管形成術後再狭窄の診断・治療法を新規に考案することである。

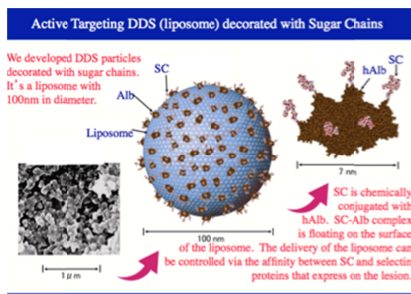
3. 研究の方法

今回の研究では、ナノ粒子に封入した造影剤を用い、血管狭窄発生部位に集積させ、E-selectin の発現を生体イメージとしてモニタリングする方法を確立することとした。

* 造影剤封入リポソーム

リポソームに封入する造影物質として、臨床の MRI で広く用いられているガドリニウムを用いることとした。内膜損傷後に内膜から中膜に発現するレクチン

蛋白である E-selectin と親和性のある糖鎖 Sialyl Lewis X (SLX) を表面に標識し、内部にガドリニウムを封入したリポソーム Gd-liposome SLX を用いた。



* ラット頸動脈拡張損傷モデル

使用動物; Wister rat, 10-12W♂, 350-400g

吸入全身麻酔導入維持。

頸部正中切開し総頸動脈近位部を確保。

外頸動脈、内頸動脈を露出。

外頸動脈を末梢側で結紮。

総頸動脈近位を絹糸でクランプ。

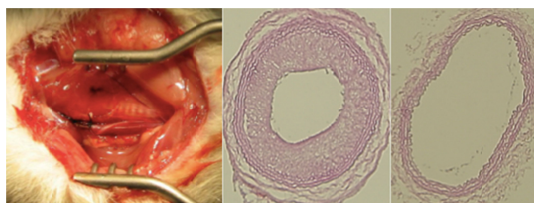
内頸動脈起始部をクリップでクランプ。

外頸動脈に横切開を加え、Balloon catheter (Hyperglide 4x10mm)

を外頸動脈から総頸動脈に逆行性に挿入。

血管拡張: Bifurcation から中枢側 10mm の範囲で(3.5mm 径で 10 秒間)および ローション(60°)の手技を 6 回。

Balloon catheter を抜去し、外頸動脈を



結紮。

内頸動脈および総頸動脈のクランプを解除し閉創。

左: 術野 中央: 再狭窄所見 右: コントロール

(1) ラット頸動脈拡張損傷モデルにおける E-selectin 発現の検証実験

目的: 内膜損傷後、再狭窄の起点となる E-selectin の発現のタイミングを評価し、

Gd-liposome SLX 投与の至適時期を明らかにする。

方法: ラット頸動脈拡張損傷モデルの作成を行い、Day1、Day2、Day3、Day7、Day14 でそれぞれ sacrifice し、左右頸動脈を摘出。凍結切片を作成し、蛍光免疫染色法を用いて、E-selectin および CD31 の発現を検証した。

(2) Gd 封入リポソームの頸動脈内膜損傷部位への取り込み評価試験

目的: Gd-liposome SLX (蛍光標識+) の内膜損傷血管への取り込みを組織所見で明らかにする。

方法: 12-13 週令 Wister rat ♂ n=3 300-350g N=4

イソフルラン吸入麻酔下に、ラット右総頸動脈に Balloon injury を行い、48 時間後に尾静脈か Gd-liposome SLX 0.1mmol/kg を投与する その 24 時間後に検体を採取する。ソムノペンチル 100mg/kg ip。

* 組織評価方法:

1 次抗体

) Mouse anti

E-selectin(8)+10%BSA(80)+PBS(712) = 800

) Mouse anti

SLX(8)+10%BSA(80)+PBS(712) = 800

2 次抗体 1 : 200 RT 1h

Anti mouse AF555(8)+PBS(1592) = 1600

(3) Gd-liposome 体内動態評価試験

目的: Gd-liposome SLX の内膜損傷血管及び正常組織への取り込みを計測し、損傷部位への Drug Delivery System(DDS)としての有効性と再狭窄出現部位の画像診断法への発展性を検証する。

方法:

10 週令 300-350g Wister rat n=4

ラット右総頸動脈に balloon angioplasty を行い、48 時間後に尾静脈から Gd-liposome SLX 200 μ l を静注。その 6 時間後に左右総頸動脈、右頸静脈、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、動脈血、皮膚、筋、脳を検体として採取。検体をヘパリン生食で洗浄し、血液を除去。-20 で冷凍保存。ICP 法で Gd 濃度を測定する。

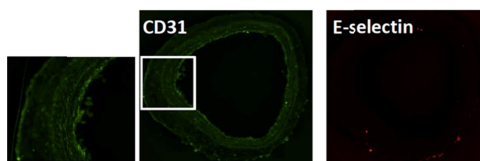
4. 研究成果

(1) ラット頸動脈拡張損傷モデルにおける E-selectin 発現の検証実験

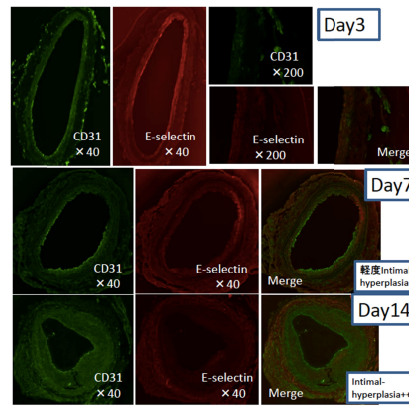
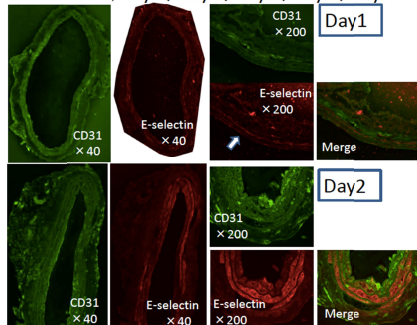
Day1-Day3 で内膜および中膜において、E-selectin の発現を認めた。また、内膜の損傷により、内膜 CD31 の発現が低下した。Day2-3 で E-selectin 発現が最も強かった。Day7 以降は、E-selectin 発現は消失し、Intimal hyperplasia (IH) が形成され始めていた。IH の最内層において CD31 が陽性であり、内皮化が示唆された。

これらの結果から、ラットモデルにおいて、Gd-liposome SLX の至適投与時期として、内膜損傷から 48 時間であると判定した。

Lt CCA (Day14) Control



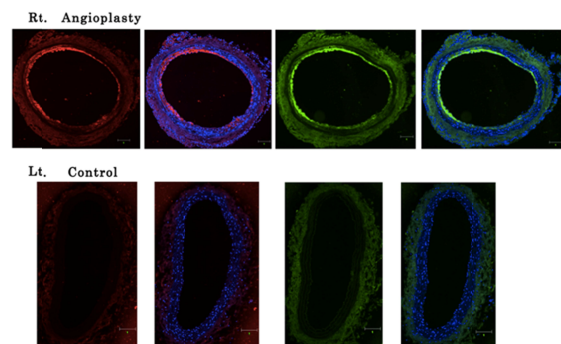
• Rt CCA; Day1, Day2, Day3, Day7, Day14



(2) Gd 封入りポソームの頸動脈内膜損傷部位への取り込み評価試験

E-selectin 発現の部位に一致して、蛍光標識した SLX が確認でき、Gd-liposome SLX 発現が E-selectin に targeting していることが確認された。

この結果により、Gd-liposome SLX と E-selectin の affinity による DDS が機能していることが示唆された。

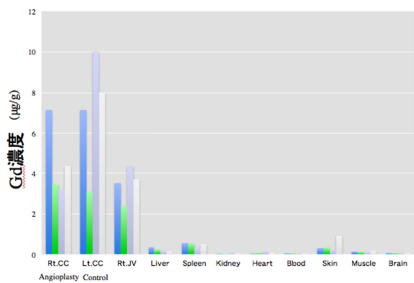


Red ; E-selectin

Green ; Gd 封入りポソーム

(3) Gd-liposome 体内動態評価試験

ICP での濃度測定では、内皮損傷側(右)とコントロール(左)でガドリニウム濃度に有意な差は認められなかった。原因としてラット頸動脈では血管体積が非常に小さいこと、周囲の結合織との分離が不十分であったことが影響したことが考えられた。



<引用文献>

- (1) Bauters C, Meurice T, Hamon M, et al.
Mechanism and prevention of
restenosis: from experimental models to
clinical practice. Cardiovasc Res 1996;
31: 835-46.
- (2) Koebbe CJ, Liebman K, Veznedaroglu E,
et al. The role of carotid angioplasty and
stenting in carotid revascularization.
Neurol Res 2005; 27 Suppl 1: 53-8.
- (3) The BASKET-LATE-Study. Basel stent
cost-effectiveness trial—late thrombotic
events trial. Herz 2006; 31:259.

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

- (1) 「頸動脈血管形成術後再狭窄に対するナノ粒子を用いた治療システムについての基礎研究」(発表予定)

鶴田和太郎、細尾久幸
日本脳神経外科学会第75回学術総会 2016年
9月29日～10月1日 福岡国際会議場(福岡市)

- (2) 「頸動脈血管形成術後再狭窄に対するナノ粒子を用いた診断治療についての基礎研究」細尾久幸、鶴田和太郎
第31回日本脳神経血管内治療学会学術総会
2015年11月19-21日 岡山コンベンションセンター(岡山市)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
鶴田和太郎 (TSURUTA Wataro)
筑波大学 医学医療系 准教授
研究者番号：50642104

(2)研究分担者
鶴嶋英夫 (TSURUSHIMA Hideo)
筑波大学 医学医療系 准教授
研究者番号：50315470

伊藤嘉朗 (ITO Yoshiro)
筑波大学 医学医療系 講師
研究者番号：90733014

(3)連携研究者
()

研究者番号：

