

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462100

研究課題名(和文) ナノDDSを用いた虚血肢に対する治療法確立

研究課題名(英文) Novel approach to acute limb ischemia with nano-DDS

研究代表者

西山 綾子 (Nishiyama, Ayako)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：90705526

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)：ラットの左下肢の動脈を切除して急性下肢虚血モデルを作成すると、側副血行路(自然にできる脇道)が半膜様筋と尾骨大腿筋に形成された。このラットモデルに、蛍光標識したPICsomeというナノサイズの中空粒子を全身投与すると、同じ2つの筋肉に集まることがわかった。PICミセルという別の手法を用いて、血管新生を強化する物質を同様にナノ粒子化して投与したが、同様の集積は認められなかった。PICミセルの生体内での安定性が低いため、集積前に壊れてしまっているものと考えられた。今後は粒子の強度を高めた投与量を増やしたりする一方、画像診断への応用なども視野に研究を進めていきたい。

研究成果の概要(英文)：We made an acute hindlimb ischemia model by resecting left femoral artery. In this model, collateral arteries (naturally-made bypass blood flow) developed mainly in two kinds of thigh muscles, called semi-membranous and caudofemoralis muscle. We injected fluorescent-labeled hollow nano-size particle, called "PICsome" into this model intravenously. PICsomes accumulated to the same muscles as described above. We also administered another nano-particle called "PIC micelle" which include the agent to promote the angiogenesis. However, there was no similar accumulation to the muscles. Because PIC micelle has less stability in the living body, we suppose that they dissolved spontaneously before accumulating to the target muscles. In future, we are planning to achieve accumulation and therapeutic improvement by enhancing the stability of PIC micelle or increasing the dosage. Moreover, we expect that this study can expand to other fields such as diagnostic imaging device.

研究分野：血管外科

キーワード：急性下肢虚血 血管新生療法 ドラッグデリバリー ナノメディシン

1. 研究開始当初の背景

急性下肢虚血は、文字どおり下肢への血流を担う動脈が突然に閉塞することによって生じる疾患である。急速な虚血進行により数時間で壊死が進行するため、下肢切断を余儀なくされることもある重篤な疾患である。閉塞の原因となった血栓・塞栓を外科的に摘除することが治療の基本となるが、発症後時間を経過した症例では再灌流障害により心停止や急性腎障害等の重篤な病状を呈しうる。

一方で、動脈本幹の閉塞や狭窄に伴って自然なバイパス血流を発達させるシステムが生体には備わっており、これを側副血行路という。急性下肢虚血では、この側副血行路の発達が虚血の進行に追いつかずに疼痛や壊死が生じるため、血栓・塞栓除去や緊急バイパス手術で早期に血流を再開する必要がある。

しかし背景因子として動脈硬化性病変を伴っている場合、血栓・塞栓の除去が困難であったり、除去できても早期に再開塞したりすることが多く、また侵襲の大きな手術を緊急で行う際には心筋梗塞・脳梗塞などの発症リスクが通常より高く、大きな危険が伴う。高齢化や生活の欧米化に伴い、動脈硬化性疾患の罹患者は増加傾向にあり、今後このような病態を呈する患者はますます増加して行くことが見込まれる状況である。

側副血行路の発達には炎症が関与することがすでに知られている¹⁾。炎症の起きている部位では毛細血管の内皮細胞間隙が開大して血管透過性が亢進している。この開大した間隙のみを通過できるサイズのナノキャリアを用いることで、血管新生因子や炎症性サイトカインなどを側副血行路形成部位にデリバリーすることができれば、静注という簡便かつユビキタスな方法で急性下肢虚血の治療を行うことができるようになることを考えた。

2. 研究の目的

急性下肢虚血に対し、静注薬物により側副血行路の発達を促進させる新たな治療法を創成する。

3. 研究の方法

(1) ラットの左大腿動脈を切除し、急性下肢虚血モデルを作成した。術後 14 日目に下肢の動脈造影を施行し、側副血行路の発達する筋肉を同定した。

(2) 蛍光標識したポリイオン複合体型中空ナノ粒子 (PICsome) を静注し、翌日に(1)で同定した筋肉への集積性を評価した。使用する PICsome の粒径は 100nm と 30nm の 2 種類とした。

(3) インターロイキン(IL)-1b を、ポリエチレングリコール(PEG)とジエチレントリアミンを付加したポリアスパラギン酸(pAsp[DET])の共ポリマーを用いてミセル化した (PIC micelle)。この際、IL-1b の表面電化を負に

調節する必要があるため、citraconic acid anhydrate (Cit) と 2,5-dihydro-4-methyl-2,5-dioxo-3-furanpropanoic acid (FP) という 2 種類の低分子を結合させて表面電化を負に変換した²⁾。

この処理により表面構造が変化した IL-1b に生理活性が残っているかを確認するため、それぞれを線維芽細胞に投与して IL-8 の産生能を測定した。

(4) FP で表面修飾した IL-1b を(3)の方法でミセル化し、虚血モデルに投与して集積を検討した。

4. 研究成果

(1) 側副血行路は主に半膜様筋・尾骨大腿筋に形成されていた(図 1)。

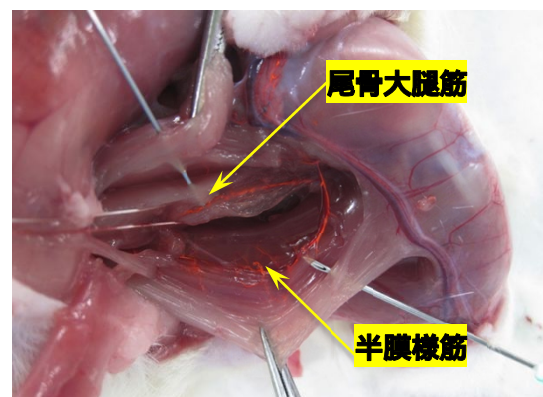
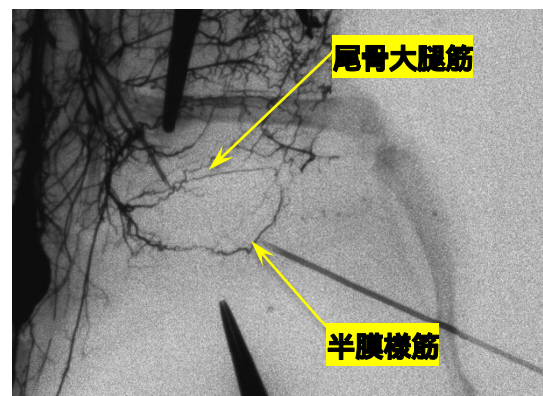


図 1. 虚血モデルの動脈造影

上: レントゲン像

下: 肉眼像

造影剤としてオレンジ色の酸化鉛を用いているため、肉眼でも良好に細動脈が同定できている。

(2)

径 100nm の PICsome が、虚血側 (左側) の半膜様筋・尾骨大腿筋に有意に集積した (次頁図 2,3)。

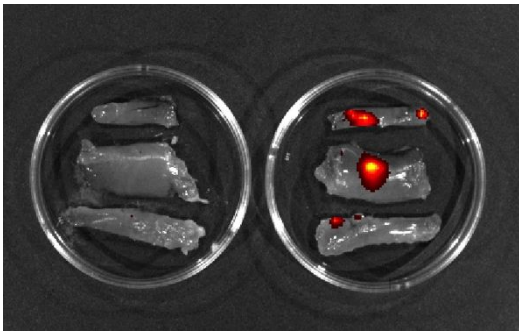


図 2. In vivo imaging system による蛍光集積。画面左が健康側、右が虚血側の大腿筋群である。上から尾骨大腿筋・半膜様筋・半腱様筋。

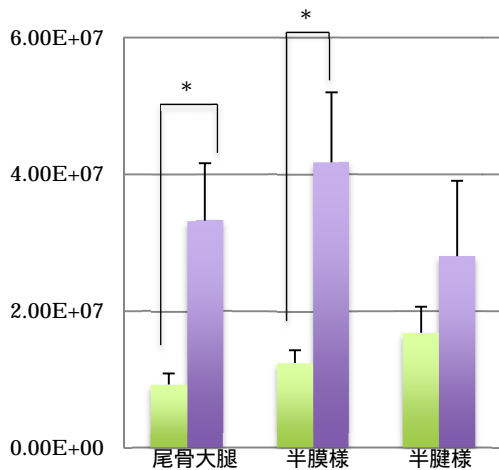


図 3. 100nm の PICsome 投与翌日の各筋肉の最大蛍光強度の定量化グラフ
緑が健康側・紫が虚血側 *; $p < 0.05$

一方、径 30nm の PICsome は虚血側への有意な集積を認めなかった (図 4)。

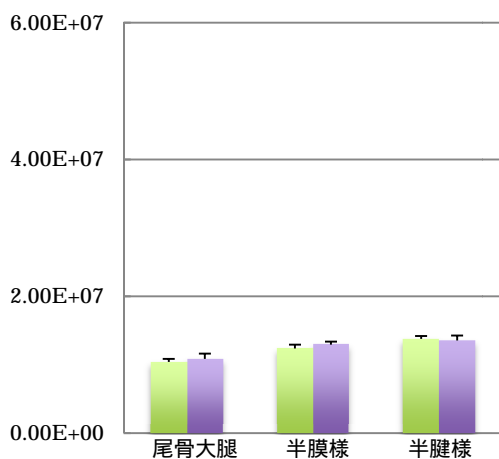


図 4. 30nm の PICsome 投与翌日の各筋肉の最大蛍光強度の定量化グラフ
緑が健康側・紫が虚血側

(3) 未処理の IL-1b(Original), Cit で表面修飾した IL-1b(Cit-IL-1b), FP で表面修飾

した IL-1b(FP-IL-1b)をそれぞれ線維芽細胞に投与し、産生される IL-8 の濃度を ELISA 法で測定した。
Cit-IL-1b にはほとんど活性が認められなかったが、FP-IL-1b には Original の 4 割程度の活性が認められた(図 5)。

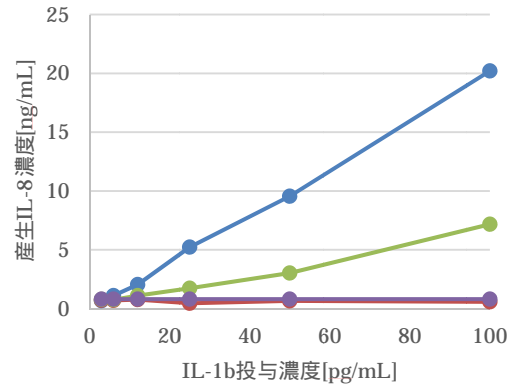


図 5. 表面修飾 IL-1b の生理活性
青 : Original, 緑 : FP-IL-1b
赤 : Cit-IL-1b, 紫 : Negative Control

(4) FP で表面修飾した IL-1b を、PEG-pASP[DET]ポリマーを用いて径 90nm の PIC micelle を作成しえた。それを虚血モデルに投与したが、有意な集積は認められなかった(図 6)。

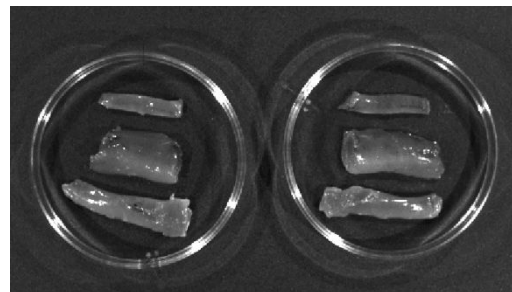


図 6. 蛍光 IL-1b ミセル投与後の各筋肉の蛍光集積
筋肉の並びは図 2 に準ずる

まとめ

同じサイズのナノ粒子を投与しても、PICsome と PIC micelle ではその集積性に違いが認められた。PICsome は極めて生体内安定性が高く、逆に PIC micelle は標的部位で内包薬剤を放出するデザインとなっていることから安定性が低い。この差が集積の差として現れているものと考えられた。

しかし、安定性の高い粒子であれば側副血行路発達部位にナノ粒子が集積するというのは世界的にも報告のない知見であり、今研究での非常に有意義な成果と考えられる。

現時点で薬剤内包ナノ粒子の集積や治療効果は出せていないが、今後 PEG-pASP[DET]ポリマー間に架橋構造を追加して PIC micelle の強度を高める・投与量を増やす・別の内包物質をミセル化する等で集積・治療効果を上げられれば、臨床応用の可能性も見

えてくると考えらえる。

一方で、直接的な治療効果の他に、例えば金属粒子やガドリニウム造影剤などを内包させると、CTやMRIで側副血行路が発達する部位を同定できるイメージングデバイスとしての応用も考えられる。血管新生因子の局所投与はこれまで一定の成果を上げているが、我々は薬剤の投与部位を選択することが治療効率を高めることを過去に報告した³⁾。実際の症例においては様々な部位の動脈閉塞・狭窄が混在しており、側副血行路の形成部位も症例により多岐にわたる。個々の症例に応じて最適の局所投与部位を同定することができれば、効率的かつ効果的な個別治療が可能になると考えられ、応用範囲の広い研究であると考えている。

<引用文献>

1) Silvestre JS, et al. Post-ischaemic neovascularization and inflammation. *Physiol Rev* 2008;78:242-249

2) Kim A, et al. Intracellular Delivery of Charge-Converted Monoclonal Antibodies by Combinatorial Design of Block/Homo Polyion Complex Micelles. *Biomacromolecules*. 2016;17:446-53.

3) Nishiyama A, et al. Therapeutic site selection is important for the successful development of collateral vessels. *J Vasc Surg*, 2014;62:190-199

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 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕なし

出願状況(計 0件)

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〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 綾子(NISHIYAMA Ayako)
東京大学・医学部附属病院・登録研究員
研究者番号: 90705526

(2) 研究分担者

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

三浦 裕(MIURA Yutaka)
東京大学・大学院工学系研究科・客員研究員
研究者番号: 40557980

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

(3) 連携研究者

九郎丸 正道(KUROHIMARU Masamichi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号: 00148636

(4) 研究協力者

須原 正光(SUHARA Masamitsu)
東京大学・医学部附属病院・病院診療医