

【301】

氏 名（本籍）	つる た わ た ろ う 鶴 田 和 太 郎（茨 城 県）		
学 位 の 種 類	博 士（医 学）		
学 位 記 番 号	博 甲 第 5115 号		
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科		
学 位 論 文 題 目	Application of liposomes incorporating doxorubicin with sialyl Lewis X to prevent stenosis after rat carotid artery injury (ラット頸動脈損傷後狭窄予防へのシアリルルイスエックス修飾ドキソルビシン封入リポソームの適用)		
主 査	筑波大学教授	医学博士	榊 原 謙
副 査	筑波大学教授	医学博士	坪 井 康 次
副 査	筑波大学准教授	博士（医学）	増 本 智 彦
副 査	筑波大学講師	博士（医学）	瀬 尾 由 広

論 文 の 内 容 の 要 旨

（目的）

近年、虚血性心疾患に対するステントを用いた血管形成術は広く行われており、確立された治療方法である。また、頸動脈狭窄に対するステント留置術も頸動脈内膜剥離術（CEA）との randomized study により同等以上の成績が証明された。本邦でも平成 20 年 4 月に頸動脈ステント留置術が保険認可され、その適応を拡大しつつある。一方でステント留置後の再狭窄が問題とされており、冠動脈では 20-30%、頸動脈でも 5% に起こることが報告されている。ステント留置後の再狭窄に対しては drug eluting stent（DES）の有効性が確認され、臨床応用されている。しかしながらステント内腔の内膜形成が遅れる可能性から、長期的な多剤抗血小板療法が必須とされており、継続不能例の中には遅発性血栓性閉塞例の報告もみられている。

本研究の目的は経静脈投与した抗がん剤を内膜損傷部へ選択的に誘導する Active targeting chemotherapy を用いた新規の再狭窄予防法を考案することである。

（対象と方法）

表面に糖鎖 Sialyl Lewis X（SLX）を標識し、内部に抗癌剤 doxorubicin を封入したリポソーム（Dox-lipo-SLX）を作成した。生体内において、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 E-selectin と親和性を持つことが知られている。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、SLX と E-selectin の親和性を利用した Active targeting により血管形成術後の患部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。さらにこの Active targeting chemotherapy 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。

1-1. Dox-lipo-SLX の調整

Doxorubicin 封入 liposome の調整をコール酸透析法により行った Doxorubicin liposome（Dox-Lipo）。その後酸化還元（反応）によるカップリング反応を用いて、liposome 表面に SLX を修飾して Doxorubicin liposome SLX（Dox-lipo-SLX）を作成した。

1-2. 血管平滑筋細胞における E-selectin の発現と doxorubicin の取り込み

血管平滑筋細胞を Dox-lipo-SLX, Dox-lipo, free doxorubicin 投与 (doxorubicin 濃度 $5\mu\text{g/ml}$) と control に分け 15 分の暴露後 doxorubicin の蛍光観察を行った。また E-selectin を抗体により block したのもを作成し、doxorubicin の取り込みを比較した。同標本から acid alcohol 法により doxorubicin を抽出し、標本中の doxorubicin を photometer により定量した。

1-3. ラット頸動脈拡張損傷モデル

イソフルレンガス麻酔下、頸部正中切開にて右頸動脈分岐部、内頸外頸動脈を露出し、外頸動脈に横切開を加え、バルーンカテーテル (SENTRY 3.5mm x 10mm) を外頸動脈から総頸動脈へ逆行性に挿入し血管拡張術を行った。

1-4. ラット頸動脈拡張損傷モデルにおける E-selectin の発現

ラット頸動脈の血管拡張術後、1, 2, 3, 7 日で頸動脈を採取した。(ツメル) 凍結切片を作成。抗 E-selectin 抗体、2 次抗体で染色し、E-selectin の経時的発現を蛍光顕微鏡で観察した。

1-5. Doxorubicin liposome を用いた Active targeting system

ラット右総頸動脈に血管拡張術を行い、24 時間後に尾静脈から Dox-lipo-SLX, Dox-lipo, free doxorubicin (doxorubicin 濃度 0.08mg/kg) を静注し、24 時間後に頸動脈を採取し doxorubicin 集積部位を観察した。同標本から acid alcohol 法により doxorubicin を抽出し、標本中の doxorubicin を photometer により定量した。

1-6. Doxorubicin liposome の再狭窄予防効果

Dox-lipo-SLX による血管拡張術後の再狭窄予防効果を評価するため、ラットを投与薬剤により Dox-lipo-SLX, Dox-lipo, free doxorubicin, 生理食塩水の 4 群 ($n=7\times 4$) に分けた。薬剤は PTA 後、3 回 (1, 2, 5 日後) doxorubicin 濃度 0.08mg/kg で投与された。PTA 後 14 日で頸動脈を採取し狭窄の評価を行った。

血管拡張術後の再狭窄は新生内膜増殖と収縮性リモデリングの 2 つの機序により起こることが知られている。そのため、狭窄の評価として①新生内膜増殖面積、収縮性リモデリングを反映した②血管周囲長比 (患側中膜外周長/対側中膜外周長)、両者を反映した③血管内腔残存率 (患側内腔面積/対側内腔面積) の 3 項目を計測した。さらに細胞増殖能の評価として PCNA 陽性細胞数、アポトーシスの評価として TUNEL 陽性細胞数の計測を行った。各種パラメータは血管分岐部から中枢側に 3, 4, 5mm の 3 カ所で計測し平均値を用いた。

(結果)

2-1. 血管平滑筋細胞における E-selectin の発現と doxorubicin の取り込み

doxorubicin の蛍光は Dox-lipo-SLX で最も高い強度を示し、定量化でも同様の所見であった。一方、抗 E-selectin 抗体による E-selectin 抑制試験では doxorubicin の蛍光強度は減少した。これらの結果から、Dox-lipo-SLX は E-selectin を認識して集積していることが示唆された。

2-2. ラット頸動脈拡張損傷モデルにおける E-selectin の発現

ラット頸動脈の血管拡張術後 2, 3 日を中心に、内膜から中膜内に E-selectin の発現が観察された。

2-3. Doxorubicin liposome を用いた Active targeting system

Dox-lipo-SLX を投与されたラットでは、損傷を受けた血管内膜から中膜に doxorubicin の取り込みが観察され、Dox-lipo や free doxorubicin を投与されたラットと比較して強い集積がみられた。定量化でも同様の所見であった。また血管壁の E-selectin 発現部位に一致して doxorubicin が集積しているところも確認された。これらの結果から、ラット頸動脈拡張損傷モデルにおいても Dox-lipo-SLX は E-selectin を認識して集積していることが示唆された。

2-4. Doxorubicin liposome の再狭窄予防効果

血管内腔残存率は Dox-lipo-SLX 群で有意に大きく、狭窄予防効果があると考えられた。TUNEL 陽性細胞

数も有意に多くの細胞にアポトーシスが誘導されていることが示唆された。Dox-lipo-SLX 群で、血管周囲長比は有意に大きく、収縮性リモデリングが抑制されていることが示唆された。新生内膜増殖面積は最も小さかったが有意差は control 群に対してのみ認められた。PCNA 陽性細胞数も最も小さく細胞増殖能が抑制されていることが示唆されたが、有意差は control 群に対してのみ認められた。

(考察)

3-1. Dox-lipo-SLX を用いた Active targeting Drug Delivery System (DDS)

実験結果から Dox-lipo-SLX はラット血管拡張損傷モデルで、Active targeting DDS として機能し、血管狭窄を予防していることが示唆された。

→新生内膜増殖面積では control 群に対してのみ統計学的有意差がみられたが、リモデリングを反映する血管周囲長比と新生内膜増殖と収縮性リモデリングの両者を反映する血管内腔残存率では他の全ての群と比較し統計学的有意差がみられた。これらの結果については、血管形成術後の再狭窄の主因である新生内膜増殖と収縮性リモデリングの中で、ラット頸動脈拡張損傷モデルでは新生内膜増殖より収縮性リモデリングが強く影響していることに起因すると考えられた。

3-2. Active targeting DDS の血管形成術後狭窄予防に対する可能性

冠動脈領域では DES の使用で再狭窄予防効果が向上しているが、遅発性血栓性閉塞にかかわる問題が残されている。またステント留置に関しては微細血管病変、長い病変、分岐病変、多発病変における再狭窄予防については未だ方法が確立していない。DDS を用いた再狭窄予防ではステントの介在を必要としないため、病変の部位や性状に関する問題は含んでいない。そのためステント留置が困難でバルーン血管形成術のみを行った場合にも狭窄予防効果が得られると考えられる。

3-3. 本研究の限界

本研究の限界はヒトの動脈硬化性血管と本実験で用いたラット頸動脈モデルの違いにある。ラット頸動脈の新生内膜増殖と収縮性リモデリングは、バルーンによる機械的損傷により引き起こされたが、ヒトの動脈硬化性血管ではステントにより圧縮された脆弱プラークの炎症や新生血管 (vasavasorum) の増生を含んでいる。それゆえ、新生内膜増殖は本研究の結果と比し、より持続的に起こる可能性がある。臨床例で Dox-lipo-SLX の DDS をどのようなプロトコールで用いるかを決定するためには、経時的な新生内膜増殖活性を理解しなければならず、ヒトでの E-selectin 発現について詳細に検討する必要がある。

(結論)

本研究で表面に SLX を修飾した doxorubicin 封入リポソーム (Dox-lipo-SLX) がラット頸動脈拡張損傷後の狭窄予防に効果があることがわかった。さらに、この SLX と E-selectin の親和性を利用した Active targeting chemotherapy は臨床での血管形成術後の再狭窄予防に適応できる可能性がある。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、SLX と E-selectin の親和性を利用した Active targeting chemotherapy は血管形成術後の再狭窄予防に臨床で適応できる可能性を示した。なお本論文は、鶴田和太郎氏が筆頭著者として Biomaterials にすでに掲載されている。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。