

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10659

研究課題名(和文) 核酸医薬とステントグラフトのハイブリッド治療による大動脈瘤進展抑制効果の検討

研究課題名(英文) Endovascular treatment with oligonucleotide therapeutics for aortic aneurysm

研究代表者

白谷 卓 (SHIRAYA, Suguru)

鳥取大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：20601933

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)：大動脈瘤に対するステントグラフト治療が一般的になりつつあるが、ステントグラフト治療後でも瘤が縮小しないものも少なからず存在する。我々は、ステントグラフト外側に、大動脈瘤の進展抑制効果を示されている核酸医薬 NFκBデコイを塗布したものを作成した。家兎の大動脈瘤モデルを作成し、この大動脈瘤内にNFκBデコイ塗布ステントグラフトを挿入留置し、その効果について検討した。その結果、大動脈瘤壁内にNFκBデコイが導入されたことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大動脈瘤に対する治療は、血管内治療であるステントグラフト治療の普及により低侵襲化が可能となった。しかしながら、ステントグラフト治療を行っても、エンドリークがないにもかかわらず、瘤が縮小しないものあるいは拡大するものも散見される。治療後の大動脈瘤縮小を目的として、ステントグラフト治療に核酸医薬であるNFκBデコイを応用することの効果について検討した。今回はステントグラフト外側にNFκBデコイを塗布したものをを用いることにより、大動脈瘤壁にNFκBデコイが導入されることを示すことができた。この治療方法の確立により、ステントグラフト治療の効果を上げることができ、この分野の治療に貢献すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In these days, the number of the cases of endovascular treatment for aortic aneurysms is increasing because of its less invasiveness. However, the sac of aortic aneurysm does not necessarily shrink after endovascular treatment even in the absence of endoleaks. In the previous study, we showed the oligonucleotide, NFκB decoy, could prevent enlargement of the aortic aneurysm in the rat model. In this study, we aimed to show the endograft containing NFκB decoy has more effect than the endograft alone to prevent the enlargement of the aortic aneurysm. Using the rabbit model, we could show the induction of NFκB decoy oligonucleotide into the aneurysmal wall by placing the endograft containing NFκB decoy.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：大動脈瘤 核酸医薬 ステントグラフト

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、大動脈瘤に対するステントグラフト治療の発達・普及は目覚しく、これの応用により、低侵襲な大動脈瘤治療が可能となっている。しかしながら、ステントグラフトによる瘤壁に対する圧負荷の軽減のみでは瘤の進展抑制が不十分であることも多く、その解決には新たなアプローチが必要であると考えられる。大動脈瘤の拡大進展メカニズムとして炎症機転の関与が示唆されており、われわれは炎症を制御する転写因子 NFκB および炎症で惹起されるマトリックス分解酵素を制御する転写因子 Ets が大動脈瘤拡大に関与していることを報告した。さらに、モデル動物を用いた検討で、おとり型 (Decoy 型) 核酸医薬の血管局所導入による NFκB/Ets 転写活性阻害が大動脈瘤の拡大進展を抑制することを報告してきた。これは大動脈瘤に対する新しい分子治療製剤につながると考えられ、このような製剤の開発は大動脈瘤治療において画期的な新しい治療方法となる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、核酸医薬を用いた転写因子制御治療概念をステントグラフト治療に付加し、分子治療製剤とステントグラフト治療のハイブリッド治療の有用性・優位性についてウサギ大動脈瘤モデルを用いて検証し、Decoy eluting ステントグラフト開発の基礎的検討を行う。また核酸医薬には、転写因子 NFκB, Ets, STAT 6 のデコイと、これらの活性を複数抑制できるキメラデコイとして、従来より報告してきた NFκB/Ets とともに、新しく開発した NFκB/STAT6 も用いる。

### 3. 研究の方法

#### (1) In vitro における各種デコイの効果の検討

THP-1 cell を用い、10 ng/mL の LPS で刺激後、medium 中に放出される IL-1b, TNF-a, MMP-9 を測定し、各種デコイの効果について検討した。各 well の細胞数は、 $1 \times 10^5$  とした。また、デコイは 30  $\mu\text{mol/L}$  の濃度で投与した。

群分けは、1) Control (刺激のみ) 2) Scrambled 3) NFκB/STAT6 chimera 4) NFκB/Ets chimera 5) NFκB 6) STAT6 7) Ets 6) Untreat (刺激なし) とした。

NFκB/STAT6 の配列を図 1 に示す。



図 1. NFκB/STAT6 の配列

#### (2) マウス大動脈瘤モデルを用いた核酸医薬の効果

C56BL/6J mouse オス 7 週齢を用い、CaCl<sub>2</sub> を用いた腹部大動脈瘤モデルを作成する。これを開腹操作のみの Sham 群と生理食塩水をかけるのみの Control 群、デコイを導入した Decoy 群の 3 群に分けた。具体的な手順を以下に示す。

Infrarenal aorta 剥離後、0.5 M CaCl<sub>2</sub> 100 $\mu\text{L}$  を染み込ませた綿を全周性に巻き、15 分間インキュベーションする。

生理食塩水で洗浄

アテロコラーゲン 50  $\mu\text{L}$  を基材にデコイ 30  $\mu\text{g}$  を動脈外側から導入。導入には KOKEN 社の導入キット AteloGene Local Use Quick Gelation を使用し、Control 群では生理食塩水をかけるのみとした。

4 週後に Sacrifice し、腹部大動脈を摘出、写真を撮影し動脈径を測定する。

#### (3) ウサギ大動脈瘤モデルを用いた Decoy eluting ステントグラフトによる瘤拡大進展抑制効果の検討

エラストラーゼ浸漬によりウサギ大動脈瘤モデルを作成した。具体的には、Infrarenal aorta 剥離後、エラストラーゼを染み込ませた綿を全周性に巻き、30 分間インキュベーションする。その後、生理食塩水で洗浄し閉腹した。1 週間後、瘤化した大動脈内にステントグラフト (GRAFTMASTER, Abbott, III) を X 線透視下に留置し、瘤壁とステントグラフトの間にあらかじめ留置しておいたマイクロカテーテルより、蛍光色素 (FITC) を結合させたデコイ (100 nmol) を生理食塩水に溶かし、注入した。翌日に Sacrifice、大動脈を摘出し、組織学的に検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) In vitro における各種デコイの効果の検討

TNF $\alpha$  に関しては、各種デコイの効果はほぼ同等で、Control に比して有意に TNF $\alpha$  の分泌を抑制した(図 2)。一方、MMP-9 に関しては、キメラデコイが NF $\kappa$ B 単独デコイよりも有意に分泌抑制効果が認められた。また有意差はないものの、NF $\kappa$ B/STAT6 が最も有効である傾向が認められた(図 3)。

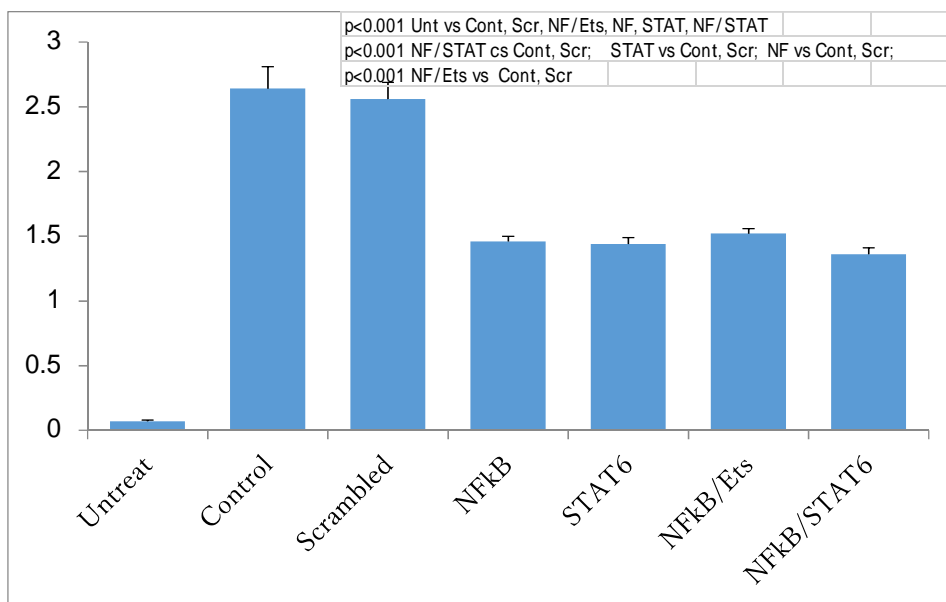


図 2. 各種デコイの TNF $\alpha$  分泌に及ぼす効果

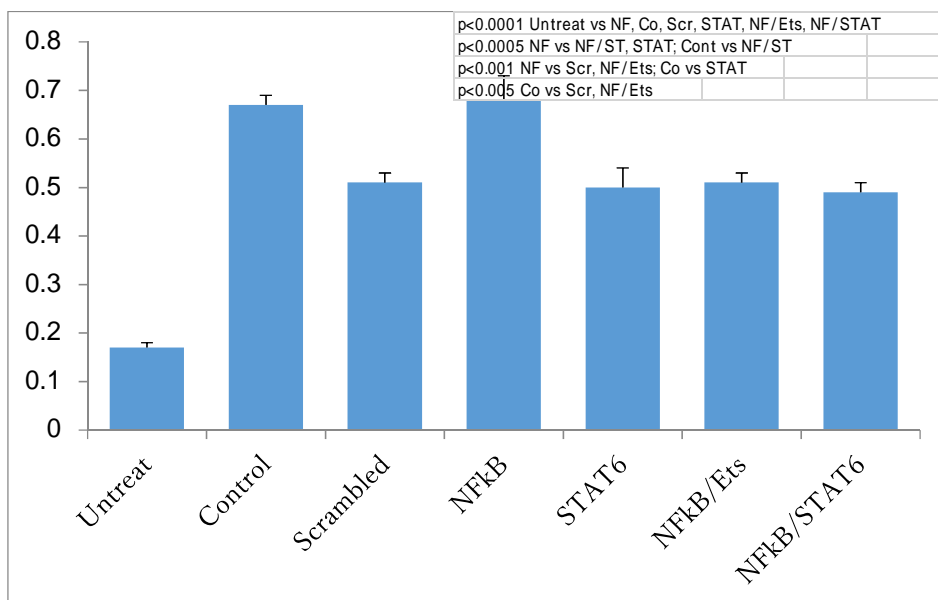


図 3. 各種デコイの MMP-9 分泌に及ぼす効果

##### (2) マウス大動脈瘤モデルを用いた核酸医薬の効果

(1)の実験で得られた結果より、NF $\kappa$ B/STAT6 のキメラデコイを今後の in vivo 実験で用いることとした。ウサギの大動脈瘤モデルを用いたステントグラフトの実験に進む前に、まず、マウス大動脈瘤モデルを用いて、NF $\kappa$ B/STAT6 のキメラデコイが、in vivo でも効果を示すかどうかを確認する実験を行った。その結果、NF $\kappa$ B/STAT6 デコイにより、大動脈瘤径の拡大は有意に抑制された(図 4)。また、瘤壁の TNF $\alpha$ , MCP-1, IL-1 $\beta$  の発現も著明に抑制されていた(図 5)。

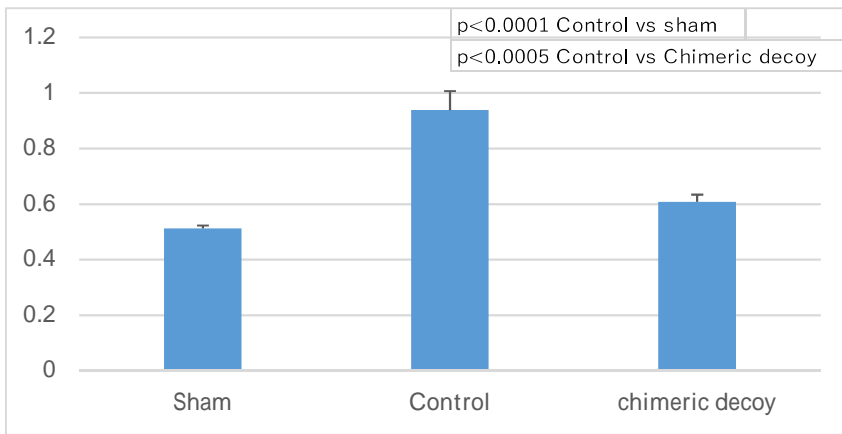


図4. NFkB/STAT6 キメラデコイが大動脈瘤径に及ぼす効果

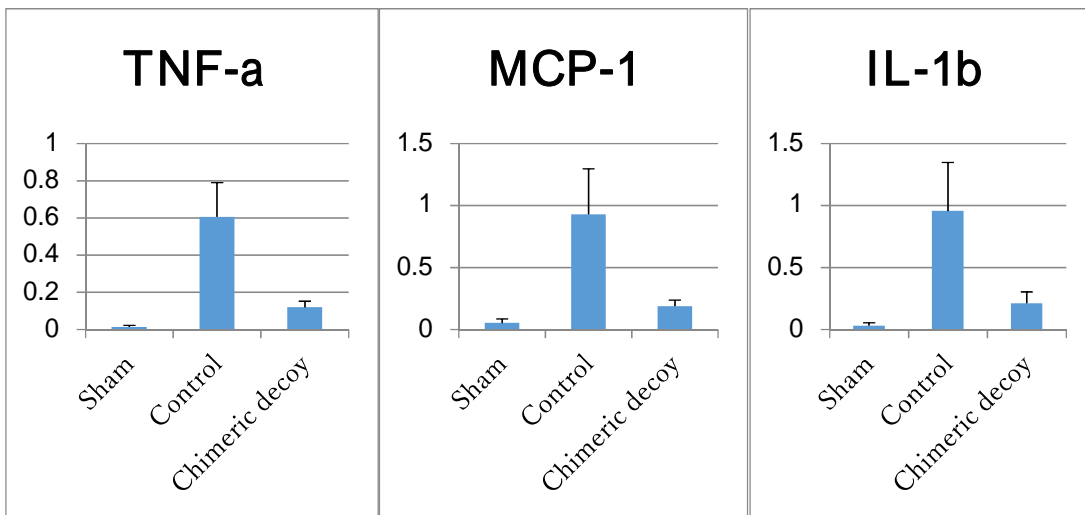


図5. NFkB/STAT6 キメラデコイが大動脈瘤壁の TNF $\alpha$ , MCP-1, IL-1b 発現に及ぼす効果

(3) ウサギ大動脈瘤モデルを用いた Decoy eluting スtentグラフトによる瘤拡大進展抑制効果の検討

本来は、stentグラフト留置後、1週間程度の観察をし、瘤拡大抑制効果を検討する予定であったが、作成したウサギ大動脈モデルにstentグラフト留置すると翌日にはウサギの状態が悪くなり、生存させることが難しい状態となったため、翌日に sacrifice した。

瘤拡大抑制効果については検討できなかったが、採取した大動脈を組織学的に検討したところ、瘤壁への decoy oligonucleotide の導入を確認することができた(図6)。

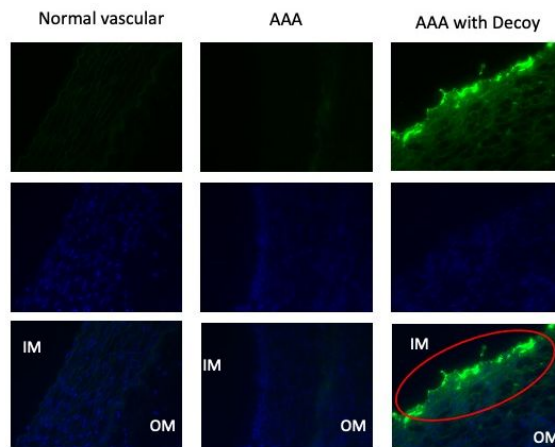


図6. 蛍光色素観察( $\times 400$ ) NFkB/STAT6 キメラデコイ注入部位で瘤壁内膜側に蛍光色素がみられ、デコイの導入が確認された。

(4) 結果のまとめ

新しく作成したキメラデコイ NFκB/STAT6 が、in vivo で従来われわれが用いていた NFκB/Ets と同等の炎症抑制効果を示した。

マウス大動脈瘤モデルを用いた実験では、NFκB/STAT6 キメラデコイは、著明な瘤拡大進展抑制効果、炎症抑制効果を示した。

ウサギ大動脈瘤モデルを用いた drug eluting スtent グラフトの基礎実験では、stent グラフト留置後、ウサギの長期生存が得られず、瘤の拡大進展を抑制するかどうかまでは確認できなかった。しかしながら、stent グラフト留置後 1 日目の大動脈瘤壁の組織学的検討では、この方法により、大動脈瘤壁にデコイが導入されることは確認でき、この方法により瘤の拡大進展が抑制できる可能性が示唆された。

今後のさらなる実験研究の追加が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shiraya Suguru, Nakamura Yoshinobu, Harada Shingo, Kishimoto Yuichiro, Onohara Takeshi, Otsuki Yuki, Kurashiki Tomohiro, Horie Hiromu, Nishimura Motonobu	4. 巻 15
2. 論文標題 Debranching thoracic endovascular aortic repair for distal aortic arch aneurysm in elderly patients aged over 75?years old	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cardiothoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 13-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13019-020-1047-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白谷 卓
2. 発表標題 75歳以上の高齢者に対する弓部大動脈瘤への治療戦略—propensity score matchingを用いたdebranch TEVARとTARの比較—
3. 学会等名 第116回日本外科学会総会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	青木 元邦 (AOKI Motokuni) (00346214)	森ノ宮医療大学・保健医療学部・教授  (34448)	
研究分担者	中村 嘉伸 (NAKAMURA Yoshinobu) (80335538)	鳥取大学・医学部・准教授  (15101)	
研究分担者	西村 元延 (NISHIMURA Motonobu) (90291442)	鳥取大学・医学部・教授  (15101)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	森下 竜一  (MORISHITA Ryuichi)  (40291439)	大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授    (14401)	