

令和 3 年 8 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02886

研究課題名(和文) 大動脈瘤拡張・破裂予防に向けた薬学および力学的アプローチ

研究課題名(英文) Pharmacological and mechanical approach to the prevention of the aortic aneurysm dilatation and rupture

研究代表者

保科 克行 (Hoshina, Katsuyuki)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：90571761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の柱であるラット大動脈瘤モデルを用い、ナノミセルによるDrug Delivery systemの構築を試みた。ナノミセルに内包する薬剤は、電荷によって制限されてきたが、今回スタチンを内包することが可能となった。スタチンは高脂血症に対する治療薬であるとともに、抗炎症作用がある。今回ピタバスタチン内包ミセルが腹部大動脈瘤に集積していることが組織的に確認され、瘤縮小に関与していることが示された。同時に大動脈血流のシミュレーションを行い、ナノミセルが瘤内でどのような挙動を示すかについて検討したところ、その濃度勾配を可視化することができた。瘤の部位による薬剤効率のシミュレートに移っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤の投与方法は注射や内服があるが、薬剤毒性を考えると容量に限界がある。病変部に限局して到達する方法として、ナノ粒子を用いた薬剤投与を検討してきた。スタチン、特にピタバスタチンは日本人のデータが多くある抗脂質薬で、抗炎症作用も併せ持ち心血管イベントも減らすデータがある。これを内包したナノ粒子の挙動をシミュレートできれば、より臨床応用に近づくと考えられる。動物モデルから毒性が少ないことが今回わかり、また動脈瘤の形状によって、その作用する部位や量が想定できれば、オーダーメイドの治療につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Using the aortic aneurysm model of rat, we attempted to construct a drug delivery system using nanomicelles. The drugs contained in nanomicelles have been limited by electric charge, but now it is possible to include statins. Statins are therapeutic agents for hyperlipidemia and also have anti-inflammatory effects. The pitavastatin-encapsulating micelles were found to be accumulated in abdominal aortic aneurysm pathologically, and we found that the micelle prevented the aneurysm expansion.

At the same time, a simulation of aortic blood flow was performed to examine how nanomicelles behaved in the aneurysm, and the concentration gradient was successfully visualized. However, the action of micelles on the wall has just begun to be examined microscopically. We are moving to simulating drug efficiency at the site of the aneurysm.

研究分野：血管外科

キーワード：Drug delivery system 大動脈瘤 ナノ粒子 ピタバスタチン シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

腹部大動脈瘤 (abdominal aortic aneurysm: 以下 AAA) は破裂に至ると死に直結するため、その予防のために手術が行われる。手術の侵襲に耐えられない場合は座して破裂を待つしかなく、保存的治療の可能性が模索されてきた。薬剤投与や運動療法などの臨床研究が試みられてきたが、有効なものは皆無であった。AAA 拡張の原因もしくは促進要因として「炎症」があるということは多くの傍証があり、抗炎症が瘤抑制のキーになると考えられてきた。

大動脈瘤の動物モデルでは、瘤に直接薬剤を作用させる実験系において退縮効果が多く報告されており、われわれも報告している (Hoshina K, et al. J Vasc Surg 2003, 2004)。しかし臨床応用には投薬 (静注・内服) が現実的で、そのために炎症の部位に薬剤を効率的に到達させること、すなわち Drug Delivery System (以下 DDS) を構築することが必須であると考えられた。

われわれはラットを用いたエラストーゼ注入大動脈瘤モデルを選択してきた。適度な大きさのミセルがエラストーゼ注入によって粗になった (組織間隙が開大した) 大動脈瘤部で捕捉されるため、DDS を実験上構築しやすいためである。われわれは医工連携によって、ラパマイシンを内包したナノミセルの提供をうけてミセルサイズやモデルの環境を検証した。その上でこの瘤モデルに投与し、(1) ミセルが瘤部分に集積し、(2) 退縮効果を示すことを明らかにした。(Shirasu T, et al. PLoS One 2016) しかしこのミセルに他の抗炎症効果のある薬剤を内包する試みを行ってきたが、いずれも不成功となっており (Suhara M, et al. in submission) 当実験系は発展できずにいた。

今回、連携研究者の三浦裕らが設計した新規の高分子ミセルでは、フェニルボロン酸と薬剤の構造に含まれるジオールの弱酸性下における可逆的な反応を利用しており、炎症性部位選択的なコントロールドリリリースが可能になっている。最大の特長は分子量や薬物導入率を制御することによって粒径の調製が可能である (Deshayes S, et al. J Am Chem Soc 2013)。そのため抗炎症効果を有するスタチンの内包が可能であるとされ、これを第一候補として上記実験系で使用することができるようになった。

AAA のたどるステップの中で“拡張”は破裂を想起させ、また臨床的に大きさの変化をフォローしやすいためにしばしば研究のエンドポイントとして使用される。しかし、最後に瘤壁破綻の機序を議論するには、材料工学を中心とした力学的解析が必要である。動物モデルでできた瘤は小さく、その形状を評価することはなされたことがなかった。しかし当該ラット大動脈瘤はエラストーゼのロットやユニットを固定することで瘤の大きさがある程度調整できる、エラストーゼ注入により組織が均一に損傷を受け紡錘瘤ができやすい、という利点がある。大小二種類の瘤を作り分けることは可能であり、薬剤が滞留する瘤の部位や濃度分布の違い、また破裂部位の同定までの観察を検討している。その際、瘤内の turbulence によって薬剤がどのように滞留するか、また破裂の部位はどのような構造特性になっているのか、の力学的検討に移行していく予定である。

われわれは臨床応用に直結した医工連携、を掛け声として 2012 年に大動脈瘤シミュレーション研究会を設立し、様々なテーマについて研究・発表してきた。特に壁応力の勾配については嚢状瘤の研究においてパラメーターの設定を含めて議論を尽くしてきたアドバンテージがある。

血行 (流体) 力学的解析に関しても、研究分担者の大島らが脳動脈瘤における実験系をライフワークとしており AAA にも応用が容易である。

2. 研究の目的

本研究の最大の特徴は、発生から拡張までに多くの因子が関与する AAA に対して複数の実験系を組み合わせることにある。DDS においてはナノミセル内包薬剤に限界があることが知られているが、今回採用する新規高分子ミセルはその壁を破る可能性が高い。抗炎症作用を有し、動脈硬化疾患の予後改善のエビデンスのあるスタチンを内包できることは非常に有用であり、臨床実現性が高い実験系になると考える。また大小の瘤を比較することも初めての試みであり、特に流体力学的には興味深い。また、動物実験においては“拡張を抑制する”= 瘤破裂の予防、というシナリオがほとんどであったが、本研究では拡張抑制、薬剤の分布、壁応力の変化をそれぞれ関連付けて研究を行うことに独自性があると考えられる。

3. 研究の方法

(1) スタチン内包高分子ミセルの合成

PEG-Poly(L-lysine) Block Copolymer の合成、フェニルボロン酸付加ポリマー (PEG-PLys (FPBA)) の合成、Alexa647 蛍光ラベル化スタチン内包高分子ミセルの合成、ピタバスタチン内包高分子ミセルの合成を順に行っていった。次に細胞培養を平滑筋細胞で行い、共焦点顕微鏡で同平滑筋細胞への薬剤取り込みの評価をおこなった。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

細胞毒性は平滑筋細胞に対して Cell Counting Kit 8 を用いて行った。

(2) 大動脈瘤内流体解析

大動脈瘤の CT データから、瘤モデルを作成。拍動流を与え、瘤の流れをシミュレートした。(速度、よどみなど)

(3) 大動脈瘤構造力学的解析

大動脈瘤壁を有限要素法で解析。徐々に拡張させていった場合、次の時系列でどのような形状になるかをシミュレートした。実際の拡張しつつある大動脈瘤の症例の画像をもとに、モデルによる理論上の形状と実際の形状を比較した。

4. 研究成果

(1) ピタバスタチン内包モデルについて

□ 酸性条件下で内包されている薬剤であるピタバスタチンを放出することができるために、フェニルボロン酸を使用した高分子ミセルの合成を行った。ミセルは平滑筋細胞の細胞質内に取り込まれ、リソソームとの共同在が確認された。

□ 細胞毒性は通常のピタバスタチンに比べて約 30 倍低かったことが示された。

□ エラスターゼ注入大動脈モデルにおいて、ピタバスタチン内包ミセル投与は容量依存的に瘤径拡大抑制効果を認めた。

□ 中性脂肪値はミセル群で低い、その他の血液生化学的値に差異はなく、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉の組織像においても明らかな異常は認めなかった。

□ 組織的検索では、HE 染色で大動脈壁への炎症細胞の集束がミセル群では有意に低かった。また EVG 染色でミセル群では弾性板が保持されていた傾向があった。SMA 免疫染色で、大動脈中膜内の SMA 陽性細胞がミセル群で有意に多く存在していた。CD68 免疫染色では CD68 陽性マクロファージの大動脈壁への集積がすべての群で認められたが、ミセル群では CD68 陽性細胞の集積が少なかった。

□ Zymography で、Pro MMP-9 活性は 5mg/kg のミセル群で有意に抑制されており、MMP-2 活性はコントロール群との差異は認めなかった。

□ ミセルの瘤への経時的な集積の増大が認められた。ミセルの多くは肝臓、脾臓および腎臓への取り込みが多く、胆汁排泄性と考えられる。多くの容量が臓器にトラップされてしまっており、ステルス性は低いことが再確認された。

(2) 流体解析

シミュレーションでは瘤の小弯側で流れが遅く、turbulence が起こることが可視化できた。

しかし、実際の薬剤の取り込みは壁構造に依存する。そのため壁の情報が必須であり、過去の電子顕微鏡写真などからいくつかもモデルを作成した。現在は透明化技術を用いて作成を続けている。

(3) 構造解析

数カ月のスパンでは、瘤拡張による形状はほぼ実臨床と似た形態をとることができた。

しかし、1年を超えるとシミュレーションでは実形状とはずれてくることがわかった。

これは石灰化などの壁の固さなどの構造によるものと考えている。現在は石灰化情報を湧現要素法の pixel に当てはめてシミュレーションを試みている。

以上より、実際のナノミセルのデリバリーに対して、血行力学的な分布のシミュレーション、また構造解析によるシミュレーションは研究を継続して追いかけている状態である。それぞれほぼ手法は決まっているので、臨床画像データの蓄積によって、より効果的なドラッグデリバリー、また破裂予測される部位への対処法を見出せるものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 Yuhn Changyoung, Hoshina Katsuyuki, Miyahara Kazuhiro, Oshima Marie	4. 巻 92
2. 論文標題 Computational simulation of flow-induced arterial remodeling of the pancreaticoduodenal arcade associated with celiac artery stenosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanics	6. 最初と最後の頁 146 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiomech.2019.05.043	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 -
1. 著者名 Nakayama Atsuko, Morita Hiroyuki, Hoshina Katsuyuki, Komuro Issei	4. 巻 83
2. 論文標題 Quantification of Abdominal Aortic Aneurysm Calcification Using the Agatston Method Can Predict Accelerated Expansion Rate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 689 ~ 689
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-18-0576	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyahara Kazuhiro, Hoshina Katsuyuki, Nitta Jun, Kimura Masaru, Yamamoto Sota, Ohshima Marie	4. 巻 12
2. 論文標題 Hemodynamic Simulation of Pancreaticoduodenal Artery Aneurysm Formation Using an Electronic Circuit Model and a Case Series Analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Vascular Diseases	6. 最初と最後の頁 176 ~ 181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3400/avd.oa.19-00005	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nitta Jun, Hoshina Katsuyuki, Isaji Toshihiko	4. 巻 98
2. 論文標題 Changes in blood flow distribution after hypogastric artery embolization and the ischaemic tolerance of the pelvic circulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e14214 ~ e14214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.000000000014214	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yuhn C, Miyahara K, Hoshina K, Kobayashi M, Oshima M.
2. 発表標題 Computational simulation of vascular remodeling of the pancreaticoduodenal arcades in the presence of celiac artery stenosis
3. 学会等名 8th World Congress of Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akai T, Okata S, Matsuura S, Hanada K, Sano M, Ohashi Y, Miyahara K, Fukuhara N, Isaji T, Takayama T, Hoshina K
2. 発表標題 Impact of sacrifice of the inferior mesenteric artery or the internal iliac artery in abdominal aortic aneurysm surgery in colorectal cancer resection case.
3. 学会等名 International Union of Angiology, Japan Chapter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayama T, Shirasu T, Kimura M, Matsuura S, Hanada K, Okata S, Sano M, Miyahara K, Fukuhara N, Isaji T, Akai T, Hoshina K
2. 発表標題 Endovascular Treatment of Internal Iliac Artery Aneurysm with Gore IBE system
3. 学会等名 International Union of Angiology, Japan Chapter Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学血管外科 研究 https://vascular-1su.jp/research/
--

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	大島 まり (Oshima Marie) (40242127)	東京大学・大学院情報学環・学際情報学府・教授 (12601)	
研究分担者	山本 創太 (Yamamoto Sota) (80293653)	芝浦工業大学・工学部・教授 (32619)	
研究分担者	高山 利夫 (Takayama Toshio) (80802694)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	
研究分担者	山本 晃太 (Yamamoto Kota) (00753542)	東京大学・医学部附属病院・登録研究員 (12601)	

	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
研究協力者	三浦 裕 (Miura Yutaka) (40557980)	東京大学・工学系研究科・客員研究員 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関