

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18170

研究課題名（和文）一方向性徐放フィルムの開発～肺静脈狭窄の完全抑制を目指して～

研究課題名（英文）Development of a unidirectional sustained-release film - Toward complete suppression of pulmonary vein obstruction

研究代表者

正木 直樹（MASAKI, Naoki）

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：00837403

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：薬剤徐放効率を改善させるべく一方向にのみ徐放するラパマイシンフィルムを開発し、有効性を検討していた。一方向性の徐放に関しては柔軟性を確保した薬剤を含むdrug layerと吸収速度を調整するbarrier layerから成る2層構造フィルムを想定し各layerの基材としてポリカプロラクトン単剤、ポリ-L-乳酸単剤、配合比率の異なるPLGAで検証した。ブタの肺静脈モデルを使用する以前に、侵襲の少ないブタ頸静脈を露出しフィルムを貼付する実験を計画した。一方向性に薬剤が継続的に徐放されることを検討したが基材の剛性が強く、血管周囲のみに貼付した状態の維持に難渋し安定した結果を出すのが困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はブタ肺静脈狭窄モデルを確立しそのメカニズム解明と薬剤徐放フィルムによる予防効果を示してきたが完全な予防には至っていない。本研究では効果的な予防法確立を目的として、薬剤徐放効率を改善させるべく一方向に徐放するラパマイシンフィルムを開発し、肺静脈狭窄症予防への有効性を検討している。

一方向性のラパマイシンフィルムの試作品を開発し、生体での実験を開始した。侵襲の大きいブタ肺静脈狭窄モデルに用いるところまでは叶わなかったが、新たにブタの頸静脈モデルを使用することで細径の血管吻合モデルの作成に繋がる形になった。今後は眼科領域で使用されている経強膜ドラッグデリバリーシステムの応用を検討していく。

研究成果の概要（英文）：In order to improve the efficiency of sustained drug release, we developed a rapamycin film that releases the drug only in one direction, and examined its effectiveness. For unidirectional sustained release, a two-layer film consisting of a flexible drug layer and a barrier layer that adjusts the absorption rate was assumed, and polycaprolactone, poly-L-lactic acid, and PLGA in different ratios were used as the base material for each layer. Before using the porcine pulmonary vein obstruction model, we planned an experiment in which the porcine jugular vein was exposed and the film was applied. We investigated unidirectional sustained release of the drug, but the rigidity of the base material was so strong that it was difficult to maintain the film applied only around the blood vessel, making it difficult to obtain stable results.

研究分野：小児心臓血管外科学

キーワード：総肺静脈灌流異常症 肺静脈狭窄症 薬剤徐放フィルム ラパマイシン

## 1. 研究開始当初の背景

総肺静脈還流異常症(TAPVC)の術後遠隔期成績に影響を及ぼす最大の因子として吻合部に生じる術後肺静脈狭窄症(PVO)があげられるが、その発症メカニズム・予防法は確立されていない。我々は臨床に即した PVO モデルを確立し、PVO 発症に血管平滑筋細胞の形質変化・増生が関与していることを示して、ラパマイシン徐放フィルムを適用することで一時的に肺静脈狭窄を予防し、進行を遅らせることを示した。しかし現段階では完全な予防には至っていない。本研究ではより効果的な PVO 予防法確立を最終目的の一つとして、一方向にのみ徐放するラパマイシンフィルムを開発し、肺静脈狭窄症予防への有効性を検討する。

また心臓血管外科領域において種々の血管吻合手術があるが、遠隔期の成績に影響するのは吻合部狭窄である。特に血液透析に用いる前腕動静脈シャントの狭窄、閉塞へのインターベンションは数多く行われているが透析新規導入患者の近年の増加傾向から、本研究の成果が介入できる余地があるものと思われる。吻合手技を伴う心臓血管外科領域における普遍的な臨床応用を模索していく。

## 2. 研究の目的

術後肺静脈狭窄(PVO)の動物モデルは報告がなく PVO の発症メカニズム、その予防に関しては十分な研究がなされていない。我々先行研究で、切開、縫合を伴う実臨床に即した世界に類を見ないブタ肺静脈狭窄症モデルを確立し、PVO 発症に血管平滑筋細胞の形質変化・増生が関与していることを示してきた。本研究では本モデルを用い肺静脈狭窄症における吻合部の変化、肺実質内の肺静脈に生じる病理組織学的な変化、分子生物学的な変化をさらに追究することにより、術後肺静脈狭窄症が発症する新たなメカニズムの解明に加え、一方向性薬剤徐放フィルムの技術を応用した PVO の新たな予防法を確立することを目的とする。また、平滑筋細胞増生を主体とした内膜肥厚が本態である細径の血管吻合部狭窄に対して普遍的に応用できる可能性を秘めており、PVO 予防のみならず、血管吻合部狭窄の普遍的な予防に関しても可能性を模索して行く。

## 3. 研究の方法

研究計画は以下の 4 つの段階で行う。

### (1) 一方向性ラパマイシン徐放フィルムの作製

ラパマイシンは脂溶性の物質であるため、同様に脂溶性の生体吸収性素材である PLGA を用いる。その際、一方向性徐放、長期間徐放(3 ヶ月)に対する工夫として薬剤を含む drug layer と、薬剤を含まない barrier layer から構成される多層性フィルムを検討している。barrier layer には柔軟性は有しているがより吸収速度の遅い生体吸収性素材 X を用いて作製することで、上記薬物動態特性を有する徐放システムを確立することを検討している。

### (2) 一方向性ラパマイシン徐放フィルムの徐放特性の検証

U 字管を用いリン酸緩衝液内でインキュベートし、各時点で液相に溶出したラパマイシン濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定し、in vitro での一方向徐放性能、徐放速度を検証する(測定法に関してはすでに当教室で確立済みでありそれを用いる)。ブタ頸静脈周囲にフィルムを埋め込み、各時点で血管組織、血管周囲組織を摘出し、組織内濃度を測定し、in vivo での一方向徐放性能、徐放速度を検証する。

### (3) 大動物を用いた一方向性ラパマイシン徐放フィルム効果の検討

当科で確立した PVO モデルを用いる。生後 6 週、体重約 15kg のブタを使用する。左開胸で手術を施行する。左上肺静脈を単純遮断下に亜全周性に切開し 7-0 モノフィラメント糸で吻合する。手技施行後 1 週毎に 8 週間までカテーテル検査を施行し PVO について形態的、血行動態的評価を行う。ブタを再度全身麻酔後、血管造影にて吻合部狭窄の程度を評価する。加えて、各肺動脈圧、肺動脈楔入圧、肺血管抵抗を測定する。その後、犠牲死させ、吻合部の肉眼的所見を観察後、吻合部周囲の肺静脈、肺実質内の肺静脈を摘出し、ホルマリンで 24 時間固定した後にパラフィン包埋し、1.5 $\mu$ m の連続薄切切片を作製する。エラスティカ・マッソン染色にて組織形態計測を行う。組織形態計測はデジタル画像としてコンピュータに取り込み、盲検化された検者による解析を行う。また、新生内膜における p-mTOR、Ki-67 陽性細胞数、比率を解析し、ラパマイシンの有効性を検証する。

#### (4) 肺実質内肺静脈に肺静脈狭窄病変が進展する機序の解明

PVO 進展の機序解明を図るためコントロール群の各時点で採取した肺実質内の肺静脈を用い免疫染色、タンパク解析を行う。その際右肺静脈の対応する部分も摘出しコントロールとして用いる。またこれらの末梢肺静脈における変化がラパマイシンフィルムによる治療介入でどのように変化するのも合わせて検証する。免疫染色やタンパク解析を行うことで平滑筋細胞の関与、細胞増殖、内皮細胞の関与、炎症の関与の検討を行う。

#### 4. 研究成果

一方向性の徐放に関しては血管周囲に貼付することから柔軟性を確保した薬剤を含む drug layer と吸収速度を調整する barrier layer から成る 2 層構造フィルムを想定し各 layer の基材としてポリカプロラクトン単剤、ポリ-L-乳酸単剤、配合比率の異なる PLGA で検証してきた。それぞれの in vitro での吸収速度の検証を行った。

実際にラパマイシンを含有している drug layer での一方向性の徐放、徐放速度の検証を行なっている。コントロールとしてはラパマイシンの含有のない基材のみを使用して行なった。in vitro での実験は困難であり、in vivo の実験を先行し実際の生体反応を検討することにした。ブタの実際の肺静脈モデルを使用する以前に、比較的アプローチが簡便で、侵襲の少ないブタ頸静脈を露出しフィルムを貼付する実験を計画した。一方向性に薬剤が継続的に徐放されることを検討したが基材の剛性が強く、血管周囲のみに貼付することが難しく安定した結果を出すのが困難であった。

今後は東北大学創生応用医学研究センターの阿部俊明教授、永井展裕助教の協力を得て眼科領域で研究中の経強膜ドラッグデリバリーシステムを血管壁に応用できないか協議し、実験計画を立案していく方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------