

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17718

研究課題名（和文）大動脈瘤ハイブリッド治療を目指したFAK阻害剤局所投与法の開発

研究課題名（英文）Development of local application of a FAK inhibitor for the hybrid treatment of aortic aneurysm

研究代表者

原田 剛佑（Harada, Takasuke）

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60650322

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）：本研究では、大動脈瘤に対するステントグラフト内挿術と薬物療法のハイブリッド治療法の開発に繋げるために、FAK阻害効果を有する徐放製剤を開発することを目的とした。生分解性ポリマーであるポリ乳酸・グリコール酸（PLGA）を基剤として、FAK阻害剤（PF573228）を含有するナノ粒子を作製した。培養マクロファージ実験系の結果から、FAK阻害剤含有PLGAナノ粒子は、FAK阻害剤単独に比べてFAK活性阻害効果が長期に持続した。限られた条件下ではあるが、ハイブリッド治療という新たなコンセプトの治療法により、大動脈瘤の炎症病態を抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、外科的治療のみでは制御困難な大動脈瘤に対して、世界初の外科的治療と薬物治療とのハイブリッド治療法の開発をめざすトランスレーショナルリサーチである。特にFAKは研究代表者が自ら発見した有望な分子標的であり、FAK阻害剤の徐放性製剤を用いる薬物療法と日常の血管外科診療で行っているステントグラフト内挿術手技とのハイブリッド治療システムが実臨床に応用されれば、大動脈瘤患者の予後とQOLの大幅な向上に繋がることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to develop PLGA nanoparticles containing a FAK inhibitor in order for the hybrid treatment of aortic aneurysm to be realized. The biodegradable PLGA nanoparticles containing FAK inhibitor PF573228 were prepared and their sustained effects of blocking FAK activity were observed in cultured macrophages. Our data suggest a possibility that inflammation in aneurysms may be controlled by a novel hybrid treatment of aortic aneurysm.

研究分野：外科学 心臓血管外科学

キーワード：大動脈瘤 薬物療法 徐放性製剤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 大動脈瘤は死亡者数が増加傾向であり、死因の上位に位置し、有病率、死亡率ともに高い疾患である(引用文献)。大動脈瘤の治療法は現在のところ外科的治療法に限られているが、従来の人工血管置換術に加え、近年、ステントグラフト内挿術の手術数が増加している。ステントグラフト内挿術は比較的低侵襲で高齢者や心肺機能低下患者にも適応となりやすいが、術後も動脈瘤自体は存在したままであるため、遠隔期にエンドリーク等により再拡大して再手術を要することがある場合には、さらに侵襲の高い治療となってしまう。このように、現状ではステントグラフト内挿術後の再拡大を完全に制御することには限界がある。

(2) 大動脈瘤の病態は、慢性炎症とそれに引き続く細胞外基質分解酵素(MMP-9等)亢進による血管壁組織破壊に特徴づけられている。モデル動物における実験的研究から、慢性炎症を持続させている分子機序が近年少なからず報告されてきたが、今もなお臨床のヒト大動脈瘤に対して有効性が実証された薬物療法はない(引用文献)。

(3) 研究代表者は、大動脈瘤病態におけるマクロファージの重要性を明らかにするとともに、シグナル分子 Focal adhesion kinase (FAK) の阻害によりマウス大動脈瘤の薬物治療に成功した(引用文献)。そのため、現状での低侵襲治療であるステントグラフト内挿術に薬物治療を効果的に組み合わせたハイブリッド治療が行えれば、より多くの大動脈瘤患者を救える治療となると着想した。具体的には、初回ステントグラフト内挿術の術中に動脈瘤限局的に再拡大を抑制する効果のある徐放製剤を投与することにより低侵襲で効率的な治療ストラテジーになり得ると構想した。

(4) DL-乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)は生体内で水と二酸化炭素に加水分解されるため、徐放性製剤の薬物担体として期待されている。PLGA ナノ粒子を活用した効率的な薬物送達のための研究が広く行われているほか、PLGA は米国食品医薬品局(FDA)で承認されるなど安全性が担保されており、薬物の構造を改変することなく含有可能であることから、有望な基材である(引用文献)。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、大動脈瘤に対する薬物併用療法を開発することである。そのために、新たなコンセプトで FAK 阻害効果を有する徐放製剤を術中単回投与する治療戦略の有用性を実験的に検証する。

(2) 大動脈瘤の拡大防止あるいは治癒促進を可能とする薬物を併用する治療戦略の可能性が実証されれば、ステントグラフト内挿術後の再手術を回避し、より効率的で低侵襲な治療システムの確立につながることを期待される。

(3) 本研究期間内の達成目標は、単回の局所投与で長期間効果を発揮できる薬剤を開発することである。そのために、PLGA を活用して、大動脈瘤近傍に直接投与とできる徐放製剤を新規に作製し、*in vitro* で効果を検証する。また、マウス大動脈瘤モデルを用いて、生体における薬剤の有用性を実証する。

### 3. 研究の方法

(1) FAK 阻害剤含有 PLGA ナノ粒子を作製するために、PLGA (752H)(Sigma-Aldrich 製)とジクロロメタン(富士フィルム和光純薬株式会社)を混合し、FAK 阻害剤(PF573228)(Selleckchem 社) 50mM 40  $\mu$ l を加えた。さらに、0.5%ポリビニルアルコール(富士フィルム和光純薬株式会社)を少しずつ加えて AWADA TURN (富士フィルム和光純薬株式会社)により攪拌した(引用文献)。

(2) 薬剤含有 PLGA ナノ粒子の効果を検証するための培養実験系を確立するために、野生型雄マウス(C57BL/6)から腹腔マクロファージを採取して培養し、培養マクロファージへの炎症性刺激として Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) を添加した(引用文献)。この培養マクロファージ実験系に作製した FAK 阻害剤(PF573228)含有 PLGA ナノ粒子を添加し、活性化型 FAK の蛋白発現および内部標準として  $\beta$ -Actin をウエスタンブロット法により定量解析した。

(3) マウスの腎動脈下大動脈に 0.5M 塩化カルシウムを塗布することで大動脈瘤のモデルマウスを作製した(引用文献)。塩化カルシウム刺激後 3 週間目に FAK 阻害剤の投与を開始し、さらに 3 週間後にマウスモデルの大動脈を採取し、マクロ解析及び組織学的解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 水中油滴 (O/W 型) エマルション法に準じて、PLGA を基剤とする FAK 阻害剤 (PF573228) 含有ナノ粒子 (40  $\mu\text{m}$  以下) を作製する実験系を確立した。

(2) 作製した FAK 阻害剤含有 PLGA ナノ粒子を培養マクロファージに添加した結果、FAK 阻害剤単独では TNF- $\alpha$  刺激後 24 時間の FAK 活性化を抑制できなかったが、FAK 阻害剤含有 PLGA ナノ粒子は、TNF- $\alpha$  刺激後 24 時間においても FAK 活性阻害効果が示された。すなわち、FAK 阻害剤含有マイクロスフェアの徐放効果の可能性が示された (図 1)。

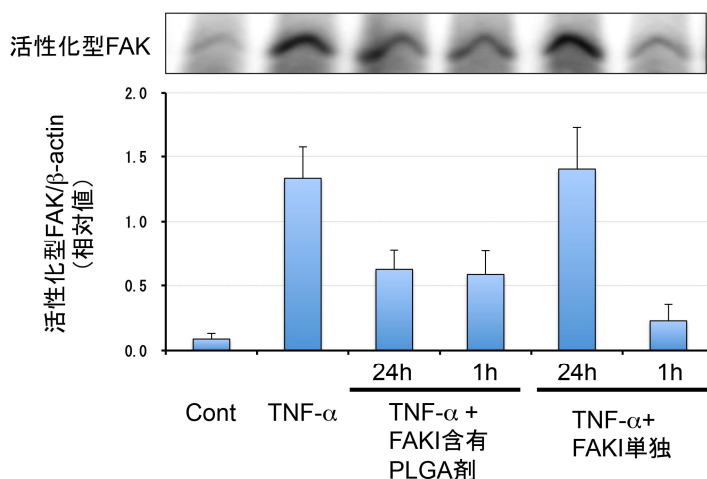


図 1 FAK 阻害剤含有 PLGA マイクロスフェアによる徐放効果

(3) マウス大動脈瘤モデルにおける検討の結果、FAK 阻害剤投与により、マクロ解析において瘤径の拡大が抑制されるとともに、組織学的解析において壁細胞の FAK 活性化、炎症細胞浸潤並びに組織破壊が抑制され、マウス大動脈瘤の病態進行が阻止されることが示唆された。

(4) 限られた実験条件下ではあるが、ステントグラフト内挿術と FAK 阻害効果を有する徐放製剤を用いた薬物併用療法という新たなコンセプトの治療法により、大動脈瘤の炎症病態を抑制できる可能性が示唆された。

#### < 引用文献 >

- Sakalihasan N, Michel JB, Katsargyris A, Kuivaniemi H, Defraigne JO, Nchimi A, Powell J, Yoshimura K, Hultgren R. Abdominal aortic aneurysms. Nat Rev Dis Primers 2018; 4: 34. doi: 10.1038/s41572-018-0030-7.
- Yoshimura K, Morikage N, Nishino-Fujimoto S, Furutani A, Shirasawa B, Hamano K. Current Status and Perspectives on Pharmacologic Therapy for Abdominal Aortic Aneurysm. Curr Drug Targets 19(11): 1265-1275, 2018.
- Harada T, Yoshimura K, Yamashita O, Ueda K, Morikage N, Sawada Y, Hamano K. Focal Adhesion Kinase Promotes the Progression of Aortic Aneurysm by Modulating Macrophage Behavior. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 37(1): 156-165, 2017.
- 竹内一成. DDS のための乳酸・グリコール酸共重合体を用いたナノ粒子製剤の開発. Drug Delivery System 34: 314-315, 2019.
- 笹井愛子、辻本広行. PLGA ナノ粒子調製技術とその実用化. JETI 62: 51-54, 2014.
- 富山成章、大河内秀昭、中村千鶴子、中野真汎. アクリルピシジン封入 PLGA ナノスフェアの門脈内投与によるラット転移性肝がんに対する治療効果. 医歯薬学 34: 40-47, 2008.
- 辻本広行、川島嘉明. 医工薬/産官学連携の研究体制を特徴とする PLGA ナノスフェアシステムのプラットフォームとナノメディカルシステムへの展開および実用化. 製剤機械技術学会誌 20: 5-14, 2011.
- 笹井愛子、松崎香織、辻本広行、三羽信比古、山本浩充、川島喜明. マランゴニ現象を利用した PLGA ナノ粒子調製技術と実用化. オレオサイエンス 12: 339-345, 2012.
- 原香織. DDS 機能を有する PLGA ナノ粒子の製剤設計開発と実用化. 薬剤学 71: 326-331, 2011.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suehiro Kotaro, Morikage Noriyasu, Harada Takasuke, Samura Makoto, Nagase Takashi, Takeuchi Yuriko, Mizoguchi Takahiro, Ike Soichi, Suzuki Ryo, Hamano Kimikazu	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of leg compression and calf muscle contraction by active ankle motion on venous hemodynamics in sitting individuals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Phlebology: The Journal of Venous Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/02683555221077741	査読の有無 有
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 Saito Toshiro, Kurazumi Hiroshi, Suzuki Ryo, Matsunaga Kazumasa, Tsubone Sarii, Lv Bochao, Kobayashi Sei, Nagase Takashi, Mizoguchi Takahiro, Samura Makoto, Suehiro Kotaro, Harada Takasuke, Morikage Noriyasu, Mikamo Akihito, Hamano Kimikazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Perivascular Adipose Tissue Is a Major Source of Nitric Oxide in Saphenous Vein Grafts Harvested via the No Touch Technique	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.120.020637	査読の有無 有
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 Suehiro Kotaro, Mizumoto Yukie, Morikage Noriyasu, Harada Takasuke, Samura Makoto, Nagase Takashi, Takeuchi Yuriko, Mizoguchi Takahiro, Suzuki Ryo, Kurazumi Hiroshi, Hamano Kimikazu	4. 巻 -
2. 論文標題 Hardness Sensed by Skin Palpation in Legs with Lymphedema Is Predominantly Correlated with Dermal Thickening	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lymphatic Research and Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/lrb.2020.0133	査読の有無 有
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 Suehiro Kotaro, Fujita Motoki, Morikage Noriyasu, Harada Takasuke, Samura Makoto, Suzuki Ryo, Kurazumi Hiroshi, Tsuruta Ryosuke, Hamano Kimikazu	4. 巻 14
2. 論文標題 Hyperbaric Oxygen Therapy Is an Effective Adjunctive Therapy to Manage Treatment-Resistant Venous Leg Ulcers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Vascular Diseases	6. 最初と最後の頁 273 ~ 276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3400/avd.cr.21-00030	査読の有無 有
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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原田剛佑
2. 発表標題 破裂性腹部大動脈瘤に対するEVAR～弱点を克服して標準治療へ～
3. 学会等名 第49回日本血管外科学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田剛佑
2. 発表標題 当科におけるEVAR後遠隔期合併症に対する治療と問題点
3. 学会等名 第62回日本脈管学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田剛佑
2. 発表標題 Validity of an endovascular aneurysm repair strategy for ruptured abdominal aortic aneurysm in our institution
3. 学会等名 第48回日本血管外科学会学術総会
4. 発表年 2020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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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