

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560283

研究課題名(和文) ハイドロダイナミック遺伝子治療装置の制御パラメータ導出手法の開発

研究課題名(英文) Development of the controllable parameter deriving method of hydrodynamic gene therapy equipment

研究代表者

尾田 雅文 (ODA, Masafumi)

新潟大学・産学地域連携推進機構・教授

研究者番号：80372473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円、(間接経費) 1,320,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、物理的非ウイルスベクターによる遺伝子治療の臨床応用を目指し、大型動物における効率的かつ再現性の高い局所的ハイドロダイナミック遺伝子導入のための新規導入システムの安全性確立を目的とした。導入実験後のラット肝臓の形状を3D CADによるモデリング作業を経て、内部の血管も含むラット肝臓CADモデルを作成した。FEモデルを作成し、有限要素応力解析システムを用いて解析した。その結果、FEモデルの形状変化が、実験時の実際のラット肝臓の変形と定性的かつ定量的に一致したことから、肝臓内の応力状態の推定結果に基づき、適切な薬液導入圧力を与えられる制御パラメータの決定が可能となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This research aimed at safety establishment of the new introduction system for the efficient local hydrodynamic gene therapy with high reproducibility in large animals, aiming at clinical application of the gene therapy by a physical non-viral vector. FE model reproducing the liver modification at the time of gene therapy was created, and it analyzed using the FEM system. As a result, elongation of the rat liver at the time of an experiment with an actual form change of FE model. The results brings suitable fluid pressure based on the estimated result of a stress state in liver.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・知能機械学・機械システム

キーワード：バイオメカニクス 遺伝子治療 有限要素応力解析 制御パラメータ 肝臓疾患

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療の臨床試験は 1980 年代後半より開始された。中でもハイドロダイナミック遺伝子導入法(HGD)は、in vivo で一回の手技によりマウス肝細胞の約 40%に遺伝子を導入することが可能な方法として 1999 年に報告された。本法は、マウス尾静脈へ大量の生理食塩水を短時間で注入することにより肝組織内圧の急激な変化を誘導し、細胞膜に一時的な微小孔を形成させ、核酸単体を含む種々の物質を直接肝細胞内に導入することが可能である。HGD 法は、現時点で最も導入効率の高い非ウイルスベクターであると同時に、導入法に基づく発癌や免疫反応などの生物学的な副作用を起こす可能性が極めて少ない特徴を有する。

一方、HGD 法では、大量の生理食塩水を急速に静注することによる全身循環動態への影響が甚大である。また、同法を大動物に適用した際の安全性と効率性を兼ね備えた遺伝子導入法が確立しておらず、未だ一般臨床における治療選択肢として普及するに至っていない。

申請者と共同で研究を推進するグループは、ハイドロダイナミック遺伝子導入法の導入効率を規定する因子の同定 (Gene Ther (2007) 14; 129-137)、高い遺伝子導入効率を確保するための条件解析 (Mol Ther (2008) 16; 1098-1104)、循環動態上の安全性を担保する要件の解析 (Mol Ther (2009) 17; 491-499)、ならびにコンピュータ制御下薬物送達システムの開発を系統的に展開してきた。カテーテルを用いた局所的な HGD 法は必要溶液量の減量に有効であるが、各臓器局所が注入溶液に対して不測の排液路を提供するため、注入量と注入時間を規定しても誘導される物理的なインパクトが一定せず、遺伝子導入効率の点で極めて再現性が低い。すなわち、図 1 のように生理食塩水の注入速度と注入部近傍の圧力増加の関係は、注入対象や個体差の影響を受けることから、局所的な HGD 法において高い導入効率とその再現性を保障するためには、組織内圧をパラメータとする注入制御システムが必要となる。

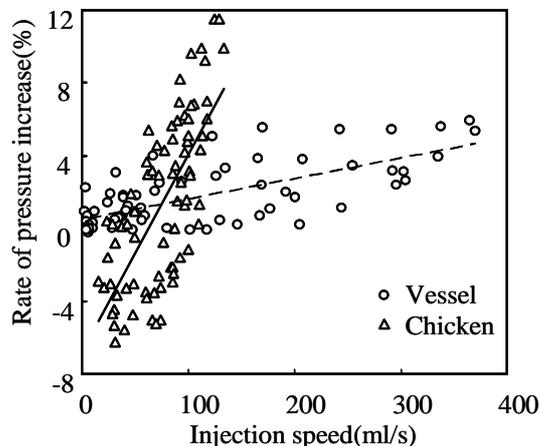


Fig.1 注入速度と圧力変化の関係

一方、申請者は図 2 に示す超音波 3 次元形態計測とその結果に基づき、予め用意した標準 CAD モデルを Free Form Deformation 法を適用することで、生体を対象とした個体有限要素 (FE) モデルを作成する手法ならびに、得られた FE モデルを利用して、生体内に作用する力を数値シミュレーションで明らかにする手法を提案し、義足ソケットや NPPV 用鼻マスクの最適形状決定に適用可能であることを示した。

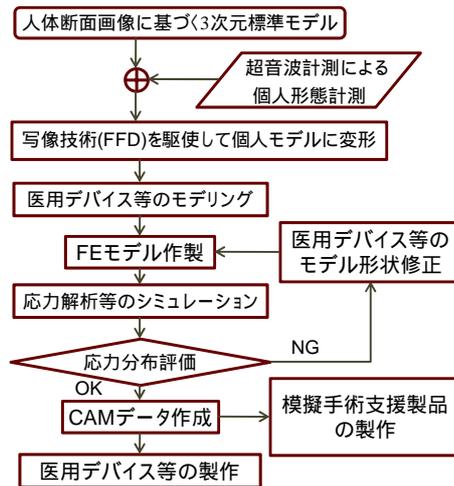


Fig.2 生体モデリング手法

2. 研究の目的

本研究は、大動物へ安全かつ効率的に遺伝子を導入するための技術を GCP 準拠レベルで確立することにより、新規遺伝子治療法開発のための臨床試験前段階へと展開するための要件を整えることを目的とする。臨床試験へと展開するためには、介入行為全体が GCP に準拠していることが求められており、本研究では、遺伝子導入にコンピュータ制御を適用することで、安全性と効率の担保を図る極めて独創的な研究である。すなわち、他の企業あるいは研究施設から同様の報告が世界的に認められてない GCP 準拠レベルへと発展させる本研究は臨床応用を目指すためには欠くことのできないステップである。具体的には、遺伝子導入の際に大量に静注する生理食塩水による循環動態への影響を最小にとどめるためのアルゴリズム構築の一環として、導入量と圧力関係を個々の個体について事前に知り、これを制御パラメータとして考慮することが有効と考えられる。そこで、超音波エコーによる注入部位の事前観察結果から、前出の制御パラメータの最適値を求める手法の確立を目標とする。

本研究では、申請者を含む研究グループが、動物での有用性を確認してきた高圧ガスによる注入システムの問題点を解決し、Good Clinical Practice (GCP) に準拠した導入機を開発する。同様の報告は他に見当たらず、

本研究の新規性は極めて高い一方で、同グループは、すでに局所的なハイドロダイナミック遺伝子導入により、大型動物で肝臓の広範囲に効率よく遺伝子導入を達成している他、肝臓のみならず筋肉や腎臓などへも薬物を送達することを報告しており、本計画の実現性は極めて高い。したがって本研究の成果は、様々な臓器の実質細胞へ直接薬物を送達するという、全く新しい概念の治療法開拓へと繋がる。さらに同グループは、ハイドロダイナミック遺伝子導入によって、核酸以外の様々な物質を細胞内へ送達することが可能であることも報告してきた。すなわち、送達可能な物質は荷電、サイズ、分子構造など、全く化学的に異なる物質のみならず、赤血球や血小板など、細胞内小器官と呼べるような巨大な構造体まで、多岐にわたっている。したがって本研究の成果は、遺伝子治療領域のみならず、薬物送達システムの新規開発というイノベーションの創出へと応用されることが強く期待されている。

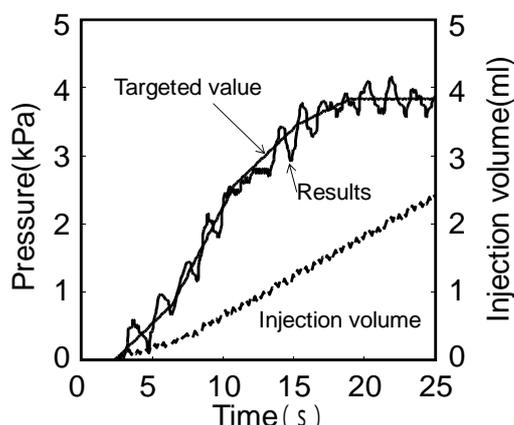


Fig.3 時間 脈管内曲線の一例

本研究の各段階を遂行することにより、GCP に準拠し、臨床使用が可能な遺伝子導入機に要求される制御パラメータが明確となる。よって、図 3 に示す現有試作機で解決すべき圧力目標プロファイルからの差を、減少させることが可能となる。すなわち、ヒトに近い体格と肝臓の組織学的な構築を有するブタ等の大型動物に対しても遺伝子導入効率が高い局所的な HGD 法を安全に適用可能な電動モーターの推力を備えることで、注入溶液に対して開放系であってもシグモイド型の時間 - 脈管内圧曲線を高精度に再現するための制御パラメータを事前に評価可能とするシステムと相互補完し、非ヒト霊長類に実用可能な注入システムが完成する。さらには、ヒトに近似の体格を有するもヒトの肝臓と比較して非常に線維成分が多いブタの肝臓を対象とした場合の注入パラメータと、ヒトの肝臓に類似するイヌの肝臓を対象とした場合の注入パラメータを比較することにより、ヒトに類似する肝組織構築を有する非ヒト霊長類における至適な注入パラメータを類推することが可能となり、非ヒト霊長

類を用いた注入条件の決定に際して、必要となる動物の数を減らすことが可能となる。

以上より本研究は、HGD 法による肝臓を対象とした遺伝子治療の臨床応用、ひいては遺伝子治療全体の臨床適応を格段に促進させるものと期待されている。

### 3. 研究の方法

ハイドロダイナミック遺伝子導入法の臨床試験に使用可能な Good Clinical Practice (GCP) に準拠する遺伝子導入機の試作機を用い、大動物における肝臓への局所的なハイドロダイナミック遺伝子導入の効果と安全性確保に向けた検証を行う。この際、導入システムの最適制御をおこなうための制御パラメータを、有限要素解析に基づいて、予め明らかにする手法を検討する。

研究の推進に当たり、現有機器である有限要素応力解析システム (ABAQUS)、3D スキャナー (VIVID910) を効率的に駆使するとともに、申請者は、新潟大学医歯学総合研究科に所属し大動物における血管造影下ハイドロダイナミック遺伝子導入に関して世界で最も多くの経験を有している研究者グループと連携して本研究を推進する。

注入装置ならびに同装置の最適制御決定のプロセスについては申請者が担当する一方で、ハイドロダイナミック遺伝子導入法開発に従事する連携研究者から助言、協力を得ることが可能であり、本研究の実現性・優位性は非常に高い。

- 1) 注入局所脈管内圧プロファイル制御装置の改良：肝臓を対象とした HGD 法における理想的な加圧プロファイルは、マウスにおいて確立されている尾静脈からの HGD 時に肝臓で生成される加圧プロファイルに類似したものと推測される。したがって制御装置には、局所注入の対象領域のボリュームが不明で、かつ予測不能の注入溶液量が対象領域から漏出するという条件下であっても、全身的な HGD 時に生成される圧力プロファイルを注入局所に再現可能であることが要求される。現有の試作機は、カテーテル内に挿入された圧力センサからの出力値に基づき、制御回路により電動アクチュエータを的確に駆動し、臨床使用される耐圧シリンジ、既存の耐圧チューブ等を介して局所注入を実現している。これを、体重 60kg の 1% に相当する 600ml を許容最大注入量と仮定し、臨床応用を鑑みて大型動物に対応可能な 150ml 耐圧シリンジを用いる装置に改良する。
- 2) 注入部形態計測装置の試作と 3 次元力学的シミュレーション：注入対象となる臓器を形態計測可能な環境を構築する。さらに、本装置を用いた外部からの圧迫荷重に対する変形挙動観察の他に、注入部位組織切片を力学的に評価する。NPPV 鼻マスク最適形状に関する研究で得られた知見を発

展・応用することで、血管を含む3次元モデリングを行い、これに前出の圧迫荷重が作用した際の変形挙動観察結果と数値シミュレーション結果を比較し、解析モデルの妥当性を評価する。続いて、前述の装置により注入された際の臓器の損傷程度を評価するとともに、モデルを用いた解析結果を比較検討することで、生体への負荷が最小かつ効果が最大となる注入速度を求める。一方、これまでの検討から、犬肝臓を対象とした局所的なHGDにより核酸単独を効率的に肝細胞内へ導入するためには、注入開始後5秒から10秒程度の間には脈管内圧が100mmHgから150mmHg上昇する必要があると推察される。よって、脈管内圧力を再現するよう、ポンプ注入速度を階段状に上昇させることが必要である。この間、注入速度、注入溶液量、脈管内圧をモニターし、圧力補正に要する制御パラメータの各定数を設定するために、注入速度と圧力変化の関係を予測可能な数値シミュレーション環境を構築する。

- 3) 圧力履歴の再現性評価：HGD 原法は手動的な急速静注を適用しており、その結果、定量注入である。これに対し高圧ガスをエネルギー源とした定圧注入による HGD では、当然のことながら異なる圧力履歴が生成される。いかなる内圧プロファイルが局所的な HGD において対容量的に導入効率の点で優れているのかを明らかにするために、改良する導入システムを用いて、両者の圧力履歴の再現し、ラット等を対象として生理食塩水で希釈されたヨード造影剤を注入し、透視下に溶液の広がりに関して画像学的な評価を行なうとともに、数値シミュレーションと併せて評価する。
- 4) 最適な圧力履歴の検討：肝臓は肝静脈と門脈という2系統の独立した低圧系を有しており、豊富な脈管間交通と相俟って、注入溶液が容易に対象領域外へ漏出する。一方、肝静脈、下大静脈と門脈を一時的であっても同時に閉塞した場合、全身循環動態に与える影響は無視し得ない。下大静脈への漏出は、注入カテーテルおよびバルーンの閉塞位置が移動と、静脈径の拡大による閉塞効果の減少が推察される。よって、注入初期から急速注入を行うことは不利と考えられるため、複数のシグモイド波内圧プロファイルに関して、注入溶液量と全身循環動態への影響を評価し、数値シミュレーションと併せて、必要な内圧上昇を得るのに最も循環動態への影響が少ない圧力履歴を選択・検討し、導入システムの最適制御パラメータの導出手法を確立する。

#### 4. 研究成果

肝臓の断面画像データを基づいて、医療用 CAD システム (Mimics) を利用して表面形状モデルを作成した。モデルを作成する必要条件として、スライス幅を 0.5mm、1 ピクセル

の値を 0.031mm に設定した。

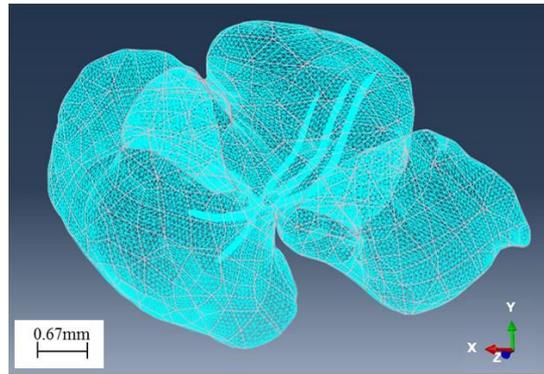


Fig.4 肝臓 FE モデル

図 4 は、作成した肝臓および血管の 3 次元 FE モデルを示す。作成したモデルは、数値解析ソフトウェア (Abaqus) プリプロセッサを用いてメッシュを作成した。肝臓モデルの要素総数は 75,340、節点の総数は 159,450 であり、一方、血管モデル要素総数は 108,302、節点の総数は 24,153 である。ここで両モデルの要素形状は 4 面体として、要素特性としてソリッドを設定し、均質モデルとして解析を行った。

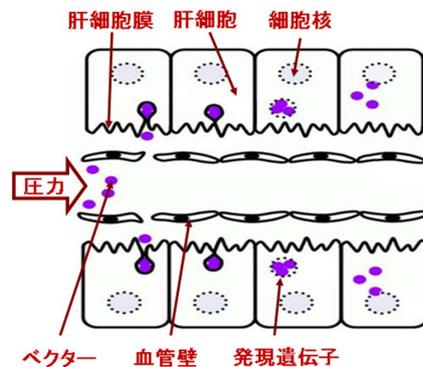


Fig.5 HGD 法による注入液の導入

図 5 に示す様に、HGD 法を適用した肝臓内では、カテーテルから注入される加圧注入液により、血管壁ならびに肝細胞壁に微細な孔が生ずる。注入液は、この孔を通じて細胞内に浸入する。このような状態を厳密にシミュレーション解析するためには、流体力学ならびに弾・塑性力学のそれぞれの観点で計算モデルを構築する必要がある。しかしながら、本研究では解析に必要とする解析時間やコストを削減するために、解析の簡単化を図った。すなわち、熱応力解析において、熱膨張係数と温度を変更することで、対象となる部位の変形 (膨張) を任意に決定できる。そこで、本研究では、注入液を血管に導入することによる血管の変形を、血管の温度上昇による熱膨張として考えた。一方、注入液の浸透による肝細胞の変形は、血管に近いほど、薬液浸透の影響は大きい一方で、距離が大きくなるほど、その影響は小さくなる。これを、熱伝導の考え方に置き換えれば、個々の肝細胞に到達する熱変化が大きい血管近傍の膨

張大きく、距離に応じて、その影響は小さくなり、距離による影響については、熱伝導率に依存する。

そこで、本研究では熱応力解析問題として、肝臓の挙動をシミュレーション可能な環境を構築するとともに、このために血管を含む肝臓モデルを作成した。ここで、モデルの精度を考慮し、肝臓および血管モデルをそれぞれ個々に作成した後、両者の位置を合わせて一体化することとした。

一方、解析に際しては、図6のように肝臓モデルの内面と血管表面を密着するとともに、同図に示す肝臓の領域に対して、三軸方向について節点の変位を拘束する境界条件を設定した。

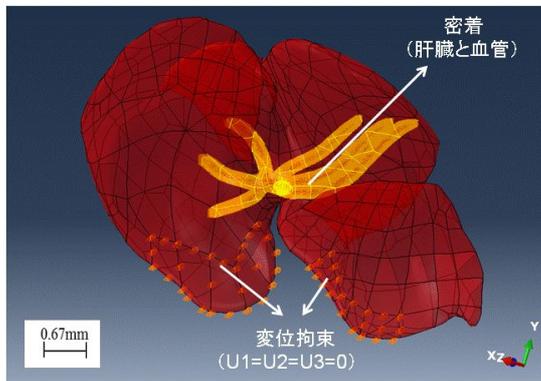


Fig.6 境界条件

本研究では、熱応力解析に基づき HGD 法による肝臓内圧力履歴をシミュレーション可能とするために、要素の物性値として、ヤング率、ポアソン比、熱膨張係数、伝導率、比熱、密度のそれぞれの材料物性値を設定する必要がある。ここで、ヤング率、ポアソン比、比熱および密度については、文献値に基づく値をそれぞれ設定した。一方、熱膨張係数および熱伝導率については、実際の HGD 法を施した肝臓を対象として、応力履歴と変形状態を実験的手法で明らかにし、得られた結果と同等の変形履歴が得られる値を、それぞれ設定することとした。

図7に、ラットを対象として行った実験で得られた注入時の圧力履歴を示す。この結果、実験直前と直後の肝臓表面の任意2点間のひずみ量は約19%であった。

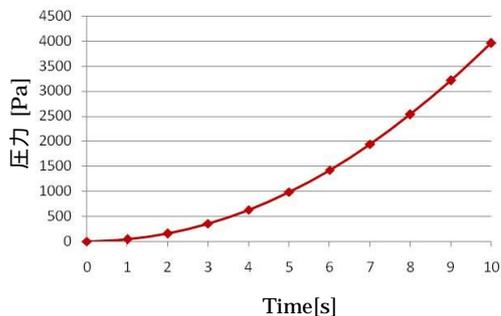


Fig.7 圧力履歴

Table 1 物性値

組織	ポアソン比	比熱 [J/kg·k]	熱伝導率 [W/m·k]	熱膨張係数 [1/k]
肝臓	0.5	3300	0.03	0.0215
血管	0.5	3300	0.03	0.0215

この様にして得られた実験結果と同等な解析結果が得られる熱膨張係数、熱伝導率について、検討を行った結果、表1のように物性値をそれぞれ設定することで、同等の結果が得られることが判った。ここで、肝臓表面の前出実験結果を得た位置でのひずみ量は18.4%であり、ほぼ同等の結果が得られた。また、大型動物を対象としたHGD法適用の際に、治療効果が最も期待されるシグモイド状圧力曲線で注入液を導入すると効果が一番高いことを考慮し、解析を行う際の設定パラメータの一つである温度についても、検討を進めた結果、図8に示すように実験時と同等のシグモイド曲線を得ることができた。

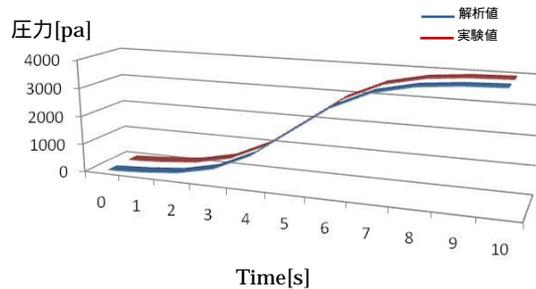


Fig.8 圧力履歴

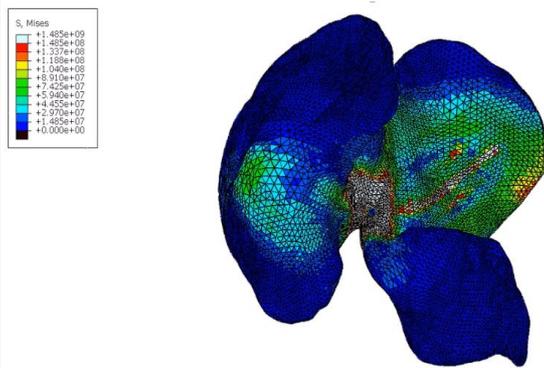


Fig.9 Mises 応力分布

ここで図9は、薬液導入圧力が、最大値、すなわち4kPaとなる際の解析結果の一例として、肝臓表面のMises応力分布を示している。図より、血管およびその周辺領域に作用する応力は大きいことが判る。

これらのことから、本研究で作成した肝臓の解析モデルを駆使することで、HGD適用時における肝臓内の応力分布を事前を知ることが可能となり、注入機の圧力履歴を決定する上で、貴重なデータを提供することが可能

であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2件)

- (1) T. Yokoo, K. Kamimura, T. Suda, M. Oda et al., Novel electric power - driven hydrodynamic injection system for gene therapy, 査読有, Vol.2013, pp.1-8, 2013.
- (2) 尾田雅文, 他 2 名, NPPV 鼻マスクのフィットニングに関する力学的検討, ライフサポート, 査読有, Vol.25, No.4, pp.124 - 129, 2013.

〔学会発表〕(計 3件)

- (1) ハイドロダイナミック遺伝子治療を対象とした肝臓モデルの構築, 李升国, 尾田雅文, 須田剛土, 他 3 名, 日本機械学会北陸信越支部大 50 期総会・講演会, 2013 年 3 月, 福井大学
- (2) ハイドロダイナミック遺伝子治療装置の制御パラメータ導出法に関する研究, 李升国, 尾田雅文, 須田剛土, 他 3 名, 日本機械学会第 23 回バイオフィロンティア講演会, 2012 年 10 月, 弘前文化センター
- (3) 大塚紀彰, 尾田雅文, 他 3 名, 肝疾患遺伝子治療用インジェクターの制御パラメータ導出手法に関する実験的研究, 日本機械学会北陸信越支部第 49 期総会・講演会, 2012 年 03 月, 金沢工業大学

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: 時間 脈管内圧制御に基づく細胞内薬物送達システム及び細胞内薬物送達方法  
発明者: 須田剛土, 上村顕也, 尾田雅文  
権利者: 新潟大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-136490

出願年月日: 平成 22 年 6 月 15 日

国内外の別: 国内

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

尾田 雅文 (ODA, Masafumi)

新潟大学・産学地域連携推進機構・教授

研究者番号: 80372473

##### (2) 研究分担者

須田 武士 (SUDA, Takeshi)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号: 10361916

##### (3) 連携研究者

原 利昭 (HARA, Toshiaki)

新潟工科大学・工学部・教授

研究者番号: 50134953

##### (4) 連携研究者

上村 顕也 (KAMIMURA, Kenya)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号: 00579146