

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06244・19K21340

研究課題名（和文）大動脈瘤に対するマクロファージ特異的FAK阻害療法の開発

研究課題名（英文）Development of pharmacotherapy specific to macrophages for the 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） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、大動脈瘤治療薬の開発に繋げるために、マクロファージ特異的に効果を発揮する抗体製剤の開発を目的とした。マウス骨髄由来マクロファージをLPS添加により刺激するとNALP3蛋白が増加するが、抗NALP3抗体の導入によりLPS刺激後のNALP3蛋白増加を顕著に抑制することに成功した。限られた条件下ではあるが、マクロファージ内への抗体導入という新たなコンセプトの治療法により、マクロファージ特異的に瘤関連の炎症分子発現を抑制できる可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大動脈瘤は破裂による突然死を来し、高齢者男性死因の上位を占める疾患である。大動脈瘤の治療法は外科的治療に限られているため、全身副作用の無い安全な薬物療法の開発が待ち望まれている。本研究の成果が、大動脈瘤に対する抗体製剤の開発と実用化に繋がれば、多くの大動脈瘤患者が無侵襲に治療可能となり、患者予後の改善が期待される。また、大動脈瘤のみならず広く慢性炎症性疾患に対して、新たな作用機序の抗炎症薬の提供に繋がる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to develop an antibody therapeutic that has a beneficial effect specifically on macrophages, in order for pharmacotherapy of aortic aneurysm to be realized. Murine bone marrow-derived macrophages up-regulated NALP3 expression in response to LPS stimulation. We found that the LPS-induced increase in NALP3 was effectively suppressed by the delivery of anti-NALP3 antibody into the macrophages. Our data suggest a new concept for controlling inflammation by antibody therapeutics specific to macrophages.

研究分野：外科学 心臓血管外科学

キーワード：大動脈瘤 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 大動脈瘤は破裂による突然死を来し、高齢者男性死因の上位を占める臨床上重要な疾患である。大動脈瘤の治療法は現在のところ、人工血管置換術あるいはステントグラフト内挿術の外科的治療法に限られる。いずれも侵襲的な治療法であり、高齢化が進んでいる現状では手術に耐えられなければ治療不可能となることもある。現在の治療法では患者予後の改善に限界があるため、大動脈瘤の進行防止あるいは修復治療を可能とする内科的治療法、特に薬物療法の開発が急務である。その上、大動脈瘤は破裂すれば致命的であるが、無症状で経過する疾患であるため、破裂前の薬物療法中に副作用が発生すれば患者の大きな不利益となる。したがって、大動脈瘤治療には、全身副作用の無い安全な薬物療法が求められる。

(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、マクロファージにおける focal adhesion kinase (FAK、接着斑キナーゼ)の活性化が大動脈瘤の炎症増幅と組織破壊の原因であることを発見した。さらに、シグナル分子 FAK の阻害によりマウス大動脈瘤の治療に成功した(引用文献)。さらに、FAK 阻害剤はモデル動物のみならず培養ヒト瘤壁組織においても有効であったことから、FAK を大動脈瘤治療の分子標的することは有望な戦略と考えられる。しかし、FAK は細胞外基質との細胞接着からのシグナル伝達に関わる分子であり細胞増殖や細胞運動に重要な生理的役割を果たすため、全身における包括的な FAK 阻害は種々の副作用のリスクを伴う。そのため、FAK 阻害による大動脈瘤治療を実用化するためには、マクロファージ特異的に FAK 阻害を達成できるような薬剤の開発が不可欠である。

(4) 最近、マクロファージの細胞内に抗体を導入することにより、抗体と標的蛋白、内因性 Tripartite motif-containing protein 21 (Trim21) とが結合し、これら標的蛋白を含む複合体がプロテアソーム系で迅速に分解消失しうることが発見された(引用文献)。研究代表者は、この方法の特異性の高い標的蛋白質の阻害方法として応用し、マクロファージ特異的に効果を有する薬剤を開発することを着想した。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、世界初の大動脈瘤治療薬を開発することである。そのため、本研究期間内に、新たなコンセプトでマクロファージ特異的に効果を発揮する抗体製剤を開発し、その有用性を実験的に検証する。

(2) 大動脈瘤進展の重要な役割を担うマクロファージを標的として特異的に薬剤を作用させることで、既存の薬剤全身投与法に比べてより少ない副作用でより大きな効果が望める。さらに、新規薬剤の開発・製品化に伴い広く産業・経済への波及効果が期待される。

3. 研究の方法

(1) 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並びに骨髄マクロファージを採取して培養した。培養マクロファージの免疫系を活性化するために Lipopolysaccharide (LPS) を添加した。各種炎症分子の蛋白発現、内因性 TRIM21 蛋白および内部標準として Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) または β -Actin をウエスタンブロットで定量解析した。

(2) 培養マクロファージへの抗体導入法を確立するために、抗体導入試薬 Ab-Carrier (プロテノバ社) 導入装置 Nucleofector (ロンザ社) などを用いて、野生型雄マウス由来の腹腔マクロファージまたは骨髄マクロファージに、蛍光標識抗体を添加した。マクロファージ細胞内への抗体導入の有無は蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(3) 培養マクロファージへの抗体導入による目的蛋白の特異的阻害効果を検証するために、抗体導入試薬 Ab-Carrier または導入装置 Nucleofector を用いて、野生型雄マウス由来の腹腔マクロファージまたは骨髄マクロファージに抗体を導入した。使用した抗体は、炎症系分子である c-jun N-terminal kinase (JNK)、IKK α や NACHT, LRR and PYD Domains-Containing Protein 3 (NALP3) を標的とするものであった。培養マクロファージへの炎症刺激として LPS を添加した。標的分子の蛋白発現並びに内部標準として GAPDH または β -Actin をウエスタンブロットで定量解析した。

4. 研究成果

(1) 腹腔マクロファージ並びに骨髄マクロファージの両方において、LPS 刺激後に、内因性 TRIM21 蛋白と NALP3 蛋白の発現が増加した。すなわち、LPS 刺激によりマクロファージが活性

化する培養実験系を確立した。

(2) 抗体導入試薬 Ab-Carrier の使用により腹腔マクロファージ並びに骨髄マクロファージの両方において、添加した蛍光抗体がマクロファージ細胞内に取り込まれていることを蛍光顕微鏡で検出した。導入装置 Nucleofector を用いると、導入試薬 Ab-Carrier と比較して、マクロファージ細胞内への蛍光抗体の導入効率が増加する傾向がみられた。

(3) 導入装置 Nucleofector を用いて、マウス骨髄由来マクロファージに抗 NALP3 抗体を導入した場合に、LPS 刺激後の NALP 蛋白増加が顕著に抑制された。しかし、抗 IKK 抗体の導入では、明らかな IKK 蛋白の抑制効果を検出するには至らなかった。また、抗体導入試薬 Ab-Carrier の使用による抗体導入時や、腹腔マクロファージを用いた実験では、明らかな標的蛋白の発現抑制効果は認められなかった。

(4) 限られた条件下ではあるが、マクロファージ内への抗体導入という新たなコンセプトの治療法により、マクロファージ特異的に瘤関連炎症分子の発現を抑制できる可能性を明らかにした。

< 引用文献 >

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.

Clift D, McEwan WA, Labzin LI, Konieczny V, Mogessie B, James LC, Schuh M. A Method for the Acute and Rapid Degradation of Endogenous Proteins. *Cell* 171(7): 1692-1706.e18., 2017.

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 0件）

1. 著者名 原田剛佑、森景則保、大塚遼、溝口高弘、永瀬隆、佐村誠、末廣晃太郎、濱野公一	4. 巻 38
2. 論文標題 高位腹部大動脈閉塞に対して血管内治療を行った1例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 血管外科	6. 最初と最後の頁 75-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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4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 虚血組織に特異的に発現する細胞表面抗原の同定とエクソソームを用いたcell-free再生療法の開発
3. 学会等名 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田剛佑
2. 発表標題 慢性B型大動脈解離に対するneobranching techniqueを用いたre-entry閉鎖
3. 学会等名 日本血管外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田剛佑
2. 発表標題 Leriche症候群に対する血管内治療の経験
3. 学会等名 日本脈管学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田 剛佑
2. 発表標題 腹部大動脈瘤進展の病態においてマクロファージが担う役割
3. 学会等名 日本脈管学会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----