

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670596

研究課題名(和文)大動脈瘤に対する革新的ハイブリッド治療システムの開発

研究課題名(英文)Development of A Novel Hybrid Device for Treatment of Aortic Aneurysms

研究代表者

吉村 耕一 (YOSHIMURA, Koichi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00322248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈瘤に対するステントグラフト治療後の補助療法として、必要な時に必要な種類の薬剤を充填し局所徐放することが可能な革新的治療システムの開発を研究代表者らは目指している。まず、本治療システムを構成する標的認識ナノ担体と標的化グラフトのプロトタイプを作製した。さらに、本治療システムの特徴である充填、再充填と薬剤徐放の基本性能をマウスin vivo アッセイ系を用いて確認した。

研究成果の概要(英文)：We invented a novel drug delivery system, which provides the great therapeutic flexibility in the choice of drugs, the timing of the administration and the duration of the drug elution. In combination with endovascular aortic aneurysm repair (EVAR), our drug delivery system would provide an ideal solution for the minimally invasive and personalized treatment of aortic aneurysm, a common and fatal disease in elderly people.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・心臓血管外科学

キーワード：大動脈瘤

1. 研究開始当初の背景

(1) 大動脈瘤は、大動脈壁の局所的な脆弱化と拡張が無症状のまま進行し、破裂・突然死を来す原因不明の疾患であり、高齢者死亡原因の上位にランクされる。人工血管置換手術またはステントグラフト治療によって年間1万件以上治療されているが、病態機序に基づく治療法は未だ確立しておらず、治療困難で予後不良であることが稀ではない。近年実用化されたステントグラフト治療は、低侵襲治療法として普及しつつあるが、残存する大動脈瘤が遠隔期に再拡大し破裂する危険性があり、解決すべき課題である。

(2) 大動脈瘤は慢性炎症に伴う大動脈壁の不可逆的な組織破壊病変であり、薬物治療は不可能と信じられていた。しかし、研究代表者らは、ストレス応答シグナル分子 c-Jun N-terminal kinase (JNK) を阻害する薬物療法により大動脈瘤の組織修復促進と退縮治療が可能であることを、世界で初めて実証した (Nature Med 2005, 特許 W02006/022281)。さらに最近では、HMG-CoA 還元酵素阻害薬スタチンをはじめとして、大動脈瘤治療のための候補薬剤がいくつか報告されるようになってきた (Int J Vasc Med 2012)。そこで、薬剤を併用して大動脈瘤壁の組織治療を促せば、ステントグラフト治療の問題点である再発が防止され、長期成績を大幅に改善できるとの着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 研究代表者らは、体内留置後のステントグラフトに薬剤封入ナノ担体を自在に充填し、徐放される薬剤によって大動脈瘤壁を根治治療する革新的ハイブリッド治療システムを提案した (図1)。本治療システムの特徴は、患者の病状に応じて、薬剤の種類・量・徐放速度並びに期間がすべて任意に調整可能であることであり、オーダーメイド医療にも繋がる技術である。本研究は、研究代表者ら独自のハイブリッド治療システムのプロトタイプを完成させ、大動脈瘤モデル動物における有用性を実証することによって、実用化への橋渡しを目指すものである。

(2) 研究代表者らのハイブリッド治療システムは、「標的認識ナノ担体」と「標的化グラフト」の2つを構成要素とし、1) 標的充填、2) 薬剤徐放、3) 再充填の3つの基本機能を備えたシステムである。各構成要素の開発とマウスモデル実験系における基本性能の検証が、本研究期間内の具体的な目標として設定された。

3. 研究の方法

(1) 治療システムのプロトタイプ開発

標的化グラフトの作製

既存の人工血管をピオチン化し、さらにニュートラピジンを結合することで、ピオチンを

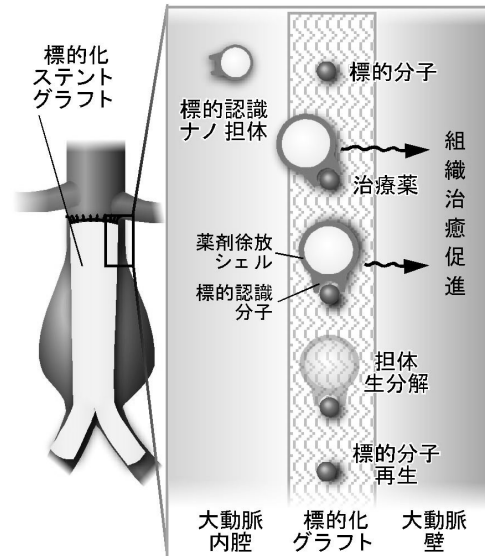


図1. ハイブリッド治療システムの概念
薬剤封入標的認識ナノ担体は、血中から標的化グラフトに充填される。ナノ担体の生分解による薬剤徐放の後、標的分子は再生され再充填可能となる。薬剤は、瘤壁の退縮治療を促進する。

有するナノ担体が認識可能な標的化グラフトを作製することとした。

標的認識ナノ担体の作製

研究分担者の黒田らによって開発されたバイオナノカプセル (BNC) (Nature Biotechnol 2003) ならびに BNC-リボソームの融合体 (J Control Release 2008) を基盤技術として利用し、標的認識ナノ担体を作製することとした。

(2) 治療システムの基本性能の検証

基本性能である生体内における標的充填ならびに再充填を実証するために、標的化グラフトをマウス下大静脈内に留置後に標的認識担体を静脈内投与して血管内での結合を検証するマウス in vivo 結合アッセイ系を用いた。

(3) 治療システムの大動脈瘤治療効果の検討

標的化グラフトに結合した標的認識ナノ担体から徐放される薬剤の効果を、マーカー蛋白を指標としたバイオアッセイ系で検証することとした。そのため、マウス腹部大動脈を大動脈瘤誘発性の 0.5M CaCl₂ (Nature Med 2005) で刺激し、その後に薬剤内包 BNC-リボソーム融合体を結合したグラフト片を大動脈近傍に留置し、対照群では薬剤非含有 BNC-リボソーム融合体を結合したグラフト片を留置した。

4. 研究成果

(1) 治療システムのプロトタイプ開発

標的化グラフトの作製

生体適合性ポリマーであるポリ-2-(ヒドロキシエチル)メタクリレート (pHEMA) の側鎖にビオチン基を導入した。生成されたビオチン化 pHEMA ポリマー溶液中に既存のポリエステル製人工血管 (Woven polyester 人工血管, 日本ライフライン社) を浸漬することによって、表面をビオチン標識したグラフトを作製した。

標的認識ナノ担体の作製

蛍光イメージング検出用に Cy3 蛍光標識し、さらにビオチン標識を施して Cy3-ビオチン-BNC-リポソーム融合体を作製した。作製した Cy3-ビオチン-BNC-リポソーム融合体の標的認識能は、非ビオチン化の Cy3-BNC-リポソーム融合体を対照とした *in vitro* の結合アッセイによって確認された。

可溶性と分光学的特性の検討から、標的認識ナノ担体に封入する薬剤として JNK 阻害剤 SP600125 (Tocris 社) とピタバスタチン (Toronto Research Chemicals 社) を選択し、研究分担者黒田らの方法 (J Control Release 2008) を用いて、これらの薬剤を封入した BNC-リポソーム融合体の作製を行った。封入された薬剤量は界面活性剤 SDS 処理により確認され、さらに、この薬剤内包 BNC-リポソーム融合体の標的認識能は標的化グラフトとの *in vitro* 結合アッセイにおいて確認された。

(2) 治療システムの基本性能の検証

標的充填の検証には、あらかじめニュートラピジンと結合させたビオチン化グラフトを標的化グラフトとして用い、マウス下大静脈内に留置した。続いて、Cy3-ビオチン-BNC-リポソーム融合体を静脈注射し、対照実験では非ビオチン化の Cy3-BNC-リポソーム融合体を用いた。その結果、Cy3-ビオチン-BNC-リポソーム融合体のグラフトへの集積が対照に比べ顕著なことが、摘出標本の蛍光観察により確認された。

再充填性能を確認するために、あらかじめニュートラピジンと結合させたビオチン化グラフトを標的化グラフトとして、マウス下大静脈内に留置した。再充填群のマウスでは、非蛍光標識のビオチン-BNC-リポソーム融合体をまず静脈注射し、さらに 24 時間後に Cy3 蛍光標識のビオチン-BNC-リポソーム融合体を静脈注射した。対照群のマウスでは Cy3-ビオチン-BNC-リポソーム融合体を単回のみ静脈注射した。標的化グラフトを摘出し実体蛍光顕微鏡で観察した結果、再充填群のグラフト上にも対照群と同等に Cy3 蛍光の集積が確認され、本治療システムの再充填能が確認された。

(3) 治療システムの大動脈瘤治療効果の検

討

CaCl₂ 刺激 24 時間後、マウスを犠牲死させて大動脈組織を摘出し、マトリクス分解酵素 MMP-9 をウエスタンブロット法で定量した。その結果、ピタバスタチン内包 BNC-リポソーム融合体を結合した薬剤徐放性グラフトでは、対照グラフトに比し MMP-9 の有意な減少が確認された。

さらに、本治療システムの瘤治療効果 (瘤径縮小、組織構築再生促進) をマウス大動脈瘤モデルで検討中である。より具体的には、CaCl₂ 刺激によるマウス大動脈瘤モデルを用い、CaCl₂ 刺激処置時にビオチン標識の標的化グラフトを大動脈近傍の下大静脈内に留置し、大動脈瘤形成後に本システムによる治療を開始した。瘤治療効果として瘤径、組織構築のほか、炎症・細胞外マトリクス分子を現在解析中である。

またさらに、本治療システムの安全性・安定性を検証するために、標的化グラフトの長期留置後の抗血栓性、並びに遠隔期におけるビオチンとニュートラピジンの抗原性の有無を今後解析する予定である。

(4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

ステントグラフト内挿術後の薬物療法によって残存瘤の退縮治療を促進しようとするアイデアは比較的単純なものであり、これまで知られていなかったわけではない。一件のみだが、ステントグラフト内挿術後の薬剤内服効果を検証した臨床試験がある (Hackmann, J Vasc Surg. 2008)。しかし薬剤の全身投与の場合、全身副作用の懸念から、薬剤を有効濃度まで十分増量できない場合が少なくない。一方で、局所投与なら全身副作用が防止でき、同時に瘤壁局所濃度の増加が容易となり、さらなる有効性が期待できるはずである。しかも、ステントグラフトは薬剤徐放基盤として利用可能である。実際、この発想は米国から薬剤放出性ステントグラフト (Deen, WO/2004/004603, 2004) として特許申請済みである。しかしながら、この方法による薬剤徐放持続期間には限界があり、十分な瘤退縮治療効果は望み難い。さらに、薬剤の副作用が発生した場合に薬剤の中止や変更が不可能であるという致命的な欠点が存在する。

研究代表者らは、「標的化ステントグラフトを体内に留置した後に、標的認識能を備えた薬剤封入ナノ担体を投与することによって、任意の薬剤をステントグラフトに充填して徐放させる革新的ハイブリッド治療システム」を提案した (前頁 図 1)。この治療システムは、ステントグラフト内挿術後の補助薬物療法の一形態として、他に類を見ない世界唯一の独創性の高いアイデアである。

(5) 今後の展望

本治療システムの有用性が実証され、実用化に繋がれば、大動脈瘤診療の現状を打開する

革新的な治療法となり、患者の生命予後と生活の質（QOL）を飛躍的に向上すると期待される。また、本研究課題の技術は全ての体内留置型医用デバイスに応用可能であるため、幅広い疾患領域において日本発の革新的医薬品・医療技術の開発に繋がるものと期待できる。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

吉村耕一、大動脈瘤・大動脈解離の病態研究と新規治療戦略、新潟血管外科研究会、2013年10月26日、新潟市・万代シルバーホテル

6．研究組織

(1)研究代表者

吉村 耕一 (YOSHIMURA, Koichi)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00322248

(2)研究分担者

黒田 俊一 (KURODA, Shun'ichi)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：60263406

青木 浩樹 (AOKI, Hiroki)
久留米大学・循環器病研究所・教授
研究者番号：60322244

(3)連携研究者

堤 宏守 (TSUTSUMI, Hiromori)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90211383