

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15305

研究課題名(和文)次世代パルスレーザーを用いた冠動脈高度石灰化病変の新規デバイス開発に向けての検討

研究課題名(英文)The effect of next generation pulse laser system on calcification was evaluated.  
The first step to develop a new device to treat heavily calcified coronary artery lesions.

研究代表者

秦野 雄 (HATANO, Yu)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00736407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては405nmパルスレーザーの特性に着目し、石灰化に及ぼす影響について検討を行った。石灰化した細胞株への影響を検討したところ、レーザー照射によって石灰化部分に変化が生じ、元素解析においてもCa含量の減少を認めた。またレーザー照射によって細胞生存も同時に影響を受けることが明らかとなった。レーザーの効果を実験的に安定して得ることは難しく、出力のコントロールについて課題があることが明らかとなった。またラットの大動脈を用いた実験を計画したが、低蛋白/高アデニン食では血管内膜側の石灰化を誘導できないことが分かった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the characteristics of a 405 nm pulse laser and the effect on calcification was investigated. At first, we check the effect of laser irradiation on calcified cell line, we obtained the result that calcification was affected by laser irradiation and elemental analysis showed a decrease in Ca content. We also showed that cell survival was affected by laser irradiation. However, the effect of the laser irradiation was unstable, and we thought that it was necessary to improve the experimental system including laser output. We also planned experiments using the rat aorta, but we found that we could not induce mineralization on the intima of the blood vessel with low protein / high adenine diet.

研究分野：循環器内科

キーワード：血管石灰化 レーザー治療

### 1. 研究開始当初の背景

生活習慣の欧米化に伴い、冠動脈形成術(PCI)の適応となる虚血性心疾患の患者数は年々増加している。近年のデバイスの改良や技術の向上などにより PCI の治療成功率は目覚ましく向上しているが、その一方で慢性完全閉塞性病変、血栓性病変、高度石灰化病変など複雑な冠動脈狭窄病変の治療手技はまだ発展途上の領域である。近年、エキシマレーザーによる PCI が血栓性病変に対する有効な治療法として注目されるようになった。エキシマレーザーは塩化キセノンを経質として発生する波長 308nm のレーザーであるが、血栓を蒸散させることによってレーザー照射後のバルーン拡張に伴う冠動脈内血栓による末梢塞栓のリスクを減らすことが可能である。エキシマレーザーによる PCI は今後ますます普及することが予想される。しかしながら、複雑な冠動脈狭窄病変のうち高度石灰化病変に対してはエキシマレーザーによる PCI も無効である。現在、高度石灰化病変の治療に有効なデバイスはカテーテルの先端に小さなダイヤモンドの粒を装着した丸い金属を高速回転させて石灰病変を粉砕するロータブレードのみである。しかし、ロータブレード治療は数少ない熟練した医師が勤務する限られた施設でしか施行できず、微小な塞栓物質による合併症の懸念もある。安全かつ汎用性の高い冠動脈石灰化病変に対する新規の治療デバイスの開発を模索する中で、パルスエネルギーの尖頭値が高いことによる非線形光学効果によって蛋白質と無機物質に対する非熱的加工性が期待される、405nm パルスレーザーの特性に着目した。

### 2. 研究の目的

現在、通常の冠動脈狭窄病変に対するバルーンカテーテルを用いた PCI による治療手技はほぼ確立しているが、血栓性病変、ステント内再狭窄病変、慢性完全閉塞性病変、高度石灰化病変など複雑な冠動脈狭窄病変に対する PCI による治療手技は未だ確立していない。エキシマレーザーを用いた PCI は血栓性病変、ステント内再狭窄病変、慢性完全閉塞性病変の治療に大変有用であり、手技も比較的容易であるため今後広く普及することが予想される。一方、高度石灰化病変に対する治療法としては、現在ロータブレードによる PCI が唯一有効であるが、手技が煩雑であり施行できる施設も限られている。さらに、ロータブレード治療により生じる微小な塞栓物質による合併症の懸念もある。本研究は、次世代型の波長 405nm の青紫色ピコ秒パルス半導体レーザー(以下、405nm パルスレーザーと略す)が石灰化の強い冠動脈硬化病変の狭窄解除に有用かどうかを検討し、新規の有効な経皮的冠動脈形成術として確立することを目指すものである。

### 3. 研究の方法

(1) 405nm パルスレーザーの石灰化した細胞株への照射による影響についての検討  
ガラスボトムシャーレに間葉系幹細胞由来の細胞株である KUSA-A1 を播き、グリセロリン酸、アスコルビン酸、デキサメサゾン を添加し、14 日間培養して石灰化誘導を行った。石灰化誘導した KUSA-A1 細胞に 405nm パルスレーザーを照射する。照射後の細胞を Alizarin red S 染色で染め、石灰化に対する影響の評価を行った。細胞へのレーザー照射実験は東京医科歯科大学内にあるソニーオープンラボにて行う。レーザー照射細胞を走査電子顕微鏡にて解析し、405nm パルスレーザーの照射が石灰化した細胞に与える影響について検討する。

(2) 405nm パルスレーザーの動脈石灰化病変をきたした *ex vivo* 動物モデルへの照射による石灰化病変およびその周囲組織に与える影響についての検討  
アデニンを豊富に含む高 Ca/P 食餌を Sprague Dawley (SD) ラットに投与してアデニン誘発腎不全ラットモデルを作成し、このラットから大動脈を摘出する。石灰化した摘出動脈の横断切片を作成して 405nm パルスレーザーを照射し、横断切片を病理組織学的に評価・検討する。具体的には Von Kossa 染色や走査電子顕微鏡検査によるレーザー照射を受けた石灰化病変についての評価を行う。

(3) 低分子化合物の検索、培養細胞伸展システムが石灰化細胞に与える影響の検討  
3-(1)と同様の方法で石灰化細胞を作成し、低分子化合物を添加した上で培養を継続し、Calcein を用いた蛍光法によって石灰化の定量化を行う。また、新たな血管石灰化モデルとして培養細胞伸展システムを導入し、伸展刺激による骨芽細胞の骨化促進および低分子化合物による影響についても検討を行う。

### 4. 研究成果

(1) 405nm パルスレーザーの石灰化した細胞株への照射による影響  
蛍光顕微鏡を用いて、石灰化細胞にレーザーの照射を施行した。図 1 は Alizarin red S 染色後の写真で、赤い部分が石灰化細胞である。中心の長方形部分がレーザー照射部分であり、中央は黒色となっており、その周囲にかけても石灰化の減少が得られていることが視覚的にわかる。次に、パルスレーザーが細胞の生存に与える影響を調べるために、Calcein AM および PI 染色を用いた実験を行った。図 2 に示す通り、レーザー照射部位において Calcein AM の蛍光が低下し、PI の蛍光が顕著にみられることが分かった。つまりレーザーは石灰化のみでなく細胞の生存にも影響する可能性が示唆された。

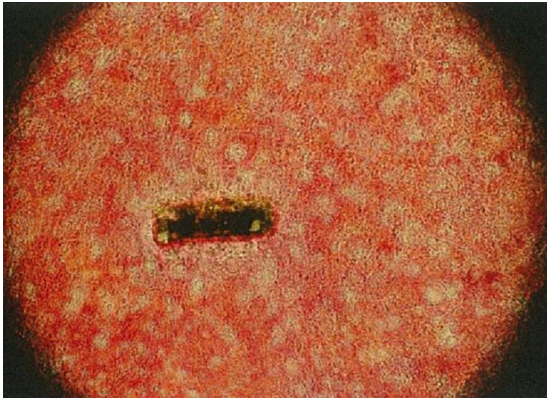


図1 石灰化に対するレーザーの影響

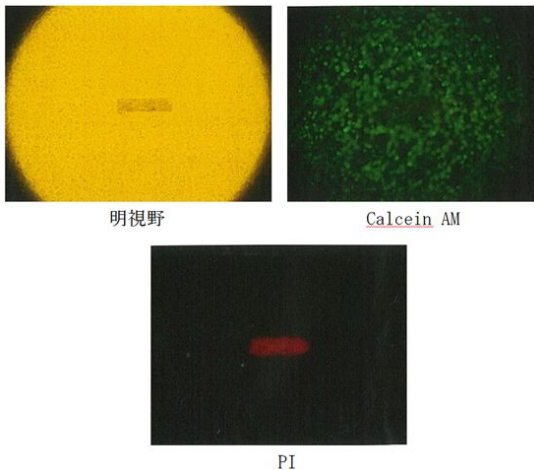


図2 レーザーが細胞生存に与える影響

次に走査電子顕微鏡を用いて、レーザーが石灰化に与える影響の観察を行ったところ、石灰化のみでなく、周囲の細胞にもレーザーが影響を与えている可能性が考えられた(図3)。

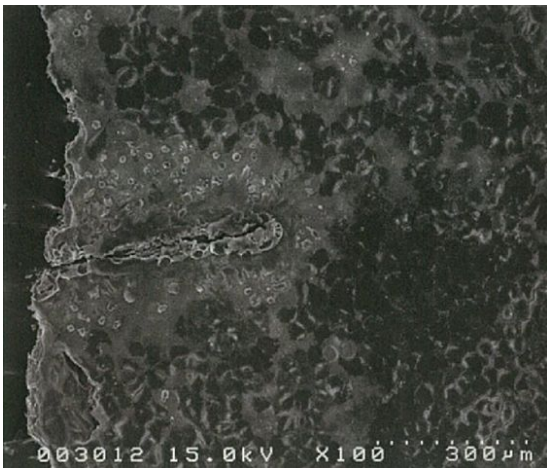


図3 走査電子顕微鏡画像

さらにEDSを用いて、元素解析を行ったところ、レーザー照射部位においてCaが周囲と比較して低下している可能性が示された(図4)。しかし再現性をもって確認することができなかった。

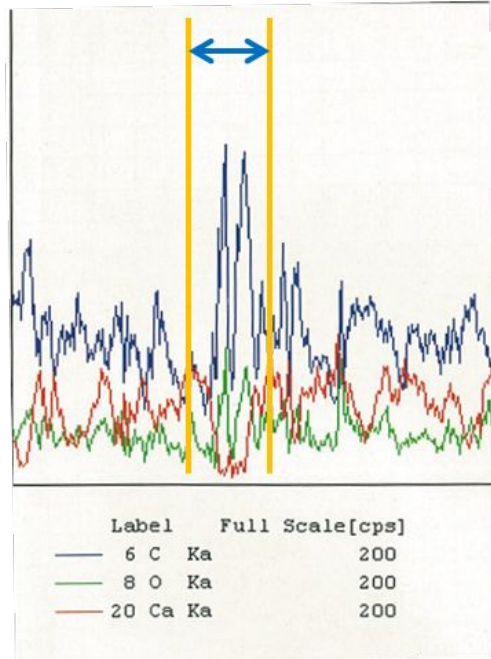


図4 EDSを用いた元素解析

より簡易に定量評価を行うため、Caを検出して蛍光を発するCalceinを用いて、定量的にレーザーが石灰化に与える影響を評価しようとしたが、レーザー出力が安定せず、一定した結果を得ることができなかった。

#### (2)大動脈の石灰化モデル作成

これらの実験と並行して、大動脈の石灰化モデル作成を行った。SDラットを購入し、低蛋白/高アデニン食を4週間負荷した後に解剖し、血管の石灰化状態をVon Kossa染色で確認をした。その結果、石灰化は血管の中層に存在することがわかり、当初想定していた血管内膜の石灰化を得ることができず、モデルの変更が必要であると考えた。

#### (3) 低分子化合物の検索、培養細胞伸展システムが石灰化細胞に与える影響の検討

平成29年度は低分子化合物とレーザー照射を組み合わせることで、より安定したレーザーの効果を得られる可能性があるのではと考え、石灰化に影響を及ぼしうる低分子化合物の探索を開始した。石灰化シグナルに関連する低分子化合物を中心に探索を行ったが、石灰化に影響を及ぼし得る低分子化合物の発見には至らなかった。また、新たな血管石灰化モデルとして培養細胞伸展システムを導入し、伸展刺激による骨芽細胞の骨化促進および低分子化合物による影響についても検討も開始したが、実験系の作成に時間を要し、有意な結果を得るには至らなかった。

#### 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 0件)

( )

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秦野 雄 (HATANO, Yu)  
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：00736407

### (2) 研究分担者

磯部 光章 (ISOBE, Mitsuaki)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・非常勤講師  
研究者番号：80176263

足利 貴志 (ASHIKAGA, Takashi)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・寄付講座教授  
研究者番号：00251512

前嶋 康浩 (MAEJIMA, Yasuhiro)  
東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：40401393

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者