

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590819

研究課題名（和文） 血管内皮前駆細胞選択的捕捉 VEGF 固定化ステントの開発に関する研究

研究課題名（英文） Research of endothelial progenitor cell-capture STENT

研究代表者

山岸 正和 (YAMAGISHI MASAKAZU)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：70393238

研究成果の概要（和文）：ヒト末梢血単核球由来の血管内皮前駆細胞（EPC）marker陽性細胞を分離、mRNAの発現解析等を実施。KDR陽性細胞が少数であることを証明。培養にてコロニー形成するEPCの出現を観察し、質的解析を実施。EPC同定評価に必要な実験系の確立を行い、一定の成果を得た。同時に、数種類のステントを作成し、大型動物（ブタ）冠動脈にステントを留置、その効果の検証を重ねた。EPC捕捉STENT留置群においては、新生内膜の増殖が抑制されうる傾向にあるものと推測された。急性血栓閉塞を発症した症例はなく、安全性のあるデバイスに成りうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The positive cell of human endothelial progenitor cell (EPS) markers were isolated from peripheral blood mononuclear cell and were analyzed mRNA level by real time RT-PCR. There were few KDR positive cells into the human mononuclear cell. Endothelial colony formation cells (early EPS) colonies were identified on day 14 to 21 after it were cultured. We assessed immunophenotyping of early EPC using fluorescence microscope and characterized the early EPS by non-quantitative RT-PCR. We established method of experiment for identification of EPSs. Then, anesthetized domestic swine (weight  $25 \pm 5$  kg, 2 months old) were implanted 25 EPC-capture stents (n=13) and 25 polymer-coated stents (n=13) into left coronary artery. The arteries were harvested at 14 days after the stenting. Histological analysis was performed by hematoxylin-eosin staining and stent strut surface were assessed by electron microscopy. In morphometric analysis, each layer of vascular wall was calculated in the section. Procedural success was achieved in all swine and all stents were patent without thrombosis. Electron microscopy suggest that uniformly endothelialization at the stent strut surface, and hematoxylin-eosin staining showed that neointimal thickening were thin and uniformly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：再生医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：臨床心血管病態学

## 1. 研究開始当初の背景

狭心症・心筋梗塞などの虚血性心疾患の主要治療法として、ステントを用いての経皮的冠動脈形成術(PCI)が広く臨床応用されてきた。しかし、PCIにはバルーンやステントなどによる物理的な血管内皮障害に伴い血栓形成、再狭窄を惹起することが示されてきた。ステント内に生じる再狭窄に対しては、薬剤溶出性ステント(DES)の臨床応用によりある程度の成果が挙げられてきた。しかしながらDES内に新生内膜被覆の遅延が起こり、従来の非薬剤溶出性ステントでは認められなかった超遅発性ステント内血栓症を合併する症例も報告されるようになった。従って従来のステント以上に抗血小板剤の長期間内服が必要となり、長期間内服による副作用の問題や、DES留置後に外科的治療が必要になる症例に対しての術前薬剤中止による血栓症の問題が生じるなど、一部は社会問題化しつつある。

これに対し、ステント留置後の非血栓性が確保(抗血栓性と早期に内皮化完了)され、新生内膜肥厚の抑制が生理的に制御可能なステントが開発されれば、これらの問題点が一挙に解決し得る可能性がある。

生体内での内皮細胞の増殖においては、流血中の血管内皮前駆細胞(Endothelial Progenitor Cell: EPC)の応用が考えられる。しかしながら、内皮前駆細胞は、末梢血からの採取確率が極めて低く、純化・高速増殖には不確定要因が多い上、長い培養期間が必要である。近年EPC capture coating stentが報告されたが(J Am Coll Cardiol. 45:1574-9, 2005)、これは内皮前駆細胞が表面抗原としてCD34を有していることを利用し、金属ステントであるR-stent表面にCD34抗体をコーティングしたもので、血管内に留置された場合に循環血液中の内皮前駆細胞をステント表面に付着させることを可能とした。しかしながらCD34を表面抗原に有する細胞は造血前駆細胞をはじめ数多く存在するため、純粋に血管内皮前駆細胞のみを選択的に補足することは困難であり、その結果ステント内血栓症や過剰な新生内膜形成を惹起する可能性を示唆する。本研究では流血中EPCのみを選択的に補足し定着し、最終的に「自己化」し得るステントの開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

内皮前駆細胞のみを選択的に捕捉し、経時的に内皮細胞への分化、増殖、単層形成化による抗再狭窄効果を示す新しい血管治療用ステントを作成し、動物実験で検証により、従来から困難とされていた「自己化」ステントの臨床応用に取り組みんとするものである。

## 3. 研究の方法

平成20年度

基本となるステントの人工基底膜の作成、VEGFのステント表面固定、さらに、動物実験着手の準備を進め、20年-22年度で精力的な動物(ラット腹部大動脈から開始し、ミニブタ頸動脈まで)[短期(1週間)から長期(1年)の移植]を行い、前駆細胞の接着の有無、内皮化および抗血栓性を期間毎に調べ、ステント内腔層設計の手直し改良を行う。流血下で、経時的に接着捕捉、コロニー化を経て、このような単層充填内皮化を誘導するシナリオの有効性を検証する。具体的には、

1) 動物移植実験(研究代表者、全体総括・指導(金沢大学:山岸教授)、研究分担者(金沢大学:坂田助教)):まず、ラット腹部大動脈へのVEGF固定ステント留置を試み、基本設計について評価する。その後、ミニブタの頸動脈(内径3-4mm)に本ステントを移植し、経時的に摘出する。また、ミニブタにおいては、摘出前に生体内での内皮形成を観察するため、血管内超音波法を用いて、ステント内腔を十分観察する。上記の移植期間は1週間、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月とし、各n=5の移植実験を行う。

2) 動物実験の評価(研究代表者、全体総括・指導(金沢大学・循環器内科:山岸教授)、研究分担者(金沢大学・循環器内科:坂田助教、金沢工大:松田教授)):

Flk-1、Tie-2、CD34、AC133等により接着細胞を免疫染色し、蛍光顕微鏡により前駆細胞および分化した内皮細胞を検出する。また、走査電子顕微鏡にて血栓形成、血小板の付着等を検出す

る。

- 3) 人工細胞外マトリックスの最適化 (金沢工大: 松田教授): VEGF 固定化量および固定化法の改良。

平成 21 年度

- 1) 力学的適合性の検証 (研究代表者、全体総括・指導 (金沢大学・循環器内科: 山岸教授)、研究分担者 (金沢大学・循環器内科: 坂田助教、金沢工大: 松田教授)): 急性動物実験を継続する一方、内腔面の非血栓性およびコンプライアントステントによる内膜肥厚抑止の程度に注目した解析を進める。組織構築を *in situ* で前駆細胞を捕捉して形成できれば、臨床応用可能なステントが作成しえたこととなり、循環器領域に大きなインパクトを与えると予想できる。

平成 22 年度

- 1) 平成 21 年度に引き続いて徹底的な動物実験、評価および改良を行い、作業原理が正しいかどうか検証する。
- 2) さらに急性実験のみならず、慢性動物実験における (2 年) 内皮播種状態及びそれに伴うステント再狭窄予防効果の検証を行い、一部では血管内超音波法による生体内での内皮増殖状況も評価する予定である。

#### 4. 研究成果

基礎実験として、ヒト末梢血単核球から得られる血管内皮前駆細胞において陽性となる CD34 陽性細胞、VEGF2 受容体抗体 (KDR) 陽性細胞、CD133 陽性細胞を分離し、mRNA の発現解析とともにフローサイトメトリーを使用した量的解析を実施した。健常ヒト末梢血中には存在する KDR 陽性細胞が少数であることが証明された。また、ヒト末梢血単核球細胞の培養を行い、捕捉されうるであろう細胞の経時的な mRNA の発現を確認した。培養初期より CD34 陽性細胞の発現をみるものの、KDR の発現はなく、20 日目以降 KDR が発現しうる可能性が示唆された。また、長期培養の過程においてより多くのコロニーを形成する血管前駆細胞の出現を観察し、その質的解析を実施したところ、KDR の発現をみた。以上、血管壁前駆細胞の同定評価に必要な実験系の確立を行い、所定の成果を得た。

同時に動物モデルにおけるステント植え込みの至適条件を検索するために、ラット大動

脈に頸動脈・大腿動脈アプローチにより小径通常型 ステントの植え込みを実施。植え込み部位・植え込み時の留意点などを把握した。

ステントコーティング剤に係る人工細胞外マトリックスの最適化のため、ヘパリン徐放量、VEGF 固定量、固定化法の改良を試みた。内膜面の非血栓性およびコンプライアンスによる内膜肥厚抑止の程度に注目し、内腔層設計の改良を実施し、重要性を再確認した。臨床応用を見据え、ヒト末梢血中の血管内皮前駆細胞の性状評価を、動脈硬化症例と健常人とで比較することにてある傾向が見出された。また、主目的の血管内皮前駆細胞捕捉ステントの改良・設計・開発により、自己化ステントの構築を目指し、検証を積み重ねてきた。一昨年度から引き続き、動物モデルにおけるステント植え込みの各種至適条件を再検索するために、小径通常型 ステントおよびコーティング内容の異なる数種類 (内皮前駆細胞捕捉ステント) のステント植え込みを継続的に実施した。コーティングの異なるステントは CD34 抗体コーティング、VEGF 受容体抗体コーティング、VEGF 固定化コーティングステントを各々作製した。植え込み期間の差異 (48 時間モデル、2 週間モデル)、ステント内に補足された細胞が存在するか否か、新生内膜増殖の差異 (断面による)、ステント周囲の組織に及ぼす影響等を免疫生化学的 (CD34、VEGF2 受容体抗体 (KDR)、VWF 等を使用)、組織学的に検証を重ねてきた。また、ステント内面を電子顕微鏡にて視覚的に評価した。通常型ステント植え込み群に比較し各コーティングステント植え込み群において、新生内膜の増殖が抑制されている傾向がみられた。臨床応用を視野に安定性、安全性の評価として、留置後血行動態の破綻はなく、急性血栓閉塞を発症しドロップアウトとなった症例はなく、安全性のあるデバイスに成りうる可能性が示唆された。

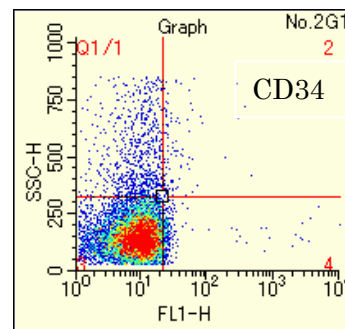


図 1 ブタ動脈血 CD34 陽性細胞



図2 プタ 冠動脈造影

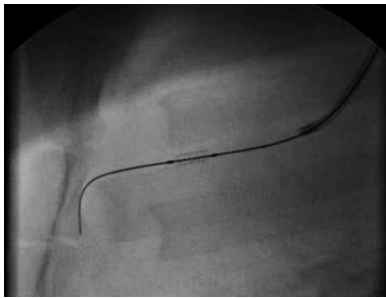


図3 STENT 留置術

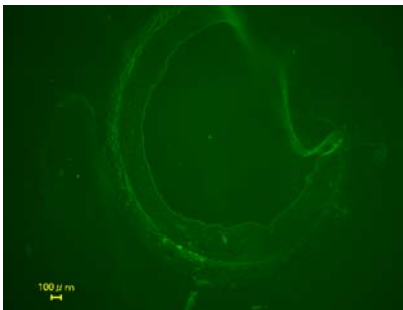


図4-1 プタ冠動脈断面 蛍光染色像

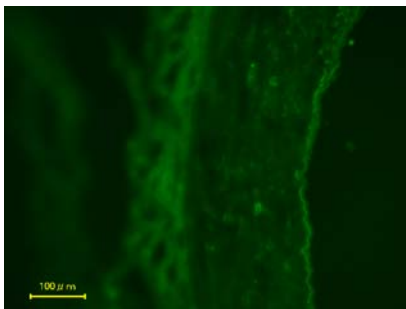


図4-2 強拡大像



図5 CD34 抗体固定化 STENT の肉眼所見

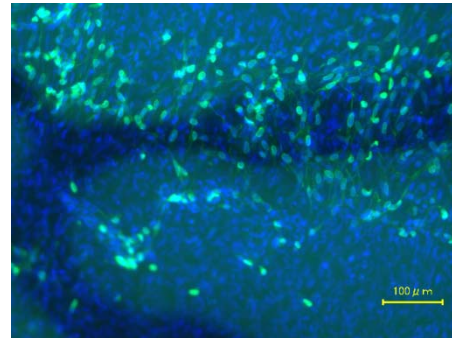


図6 CD34 抗体固定化 STENT 染色

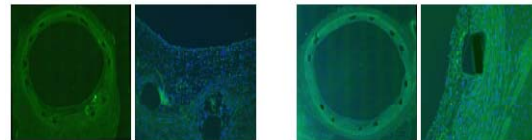


図7 ポリマーコートステント断面 (左図)  
CD4 抗体固定化ステント断面 (右図)

## 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1件)  
Nakanishi C, Yamagishi M et al, Activation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of Mesenchymal stem cells, Biochem Biophys Res Commun, 374(2008), 11-16, 査読有

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山岸 正和 (YAMAGISHI MASAKAZU)  
金沢大学・医学系・教授  
研究者番号：70393238

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

松田 武久 (MATSUDA TAKEHISA)  
金沢工業大学・付置研究所・教授  
研究者番号：60142189

坂田 憲治 (SAKATA KENJI)  
金沢大学・附属病院・助教  
研究者番号：20456411