

機関番号：17201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590901

研究課題名 (和文) 薬剤溶出性ステント後の再内皮化誘導療法に関する研究

研究課題名 (英文) Study of Reendotheliazation after Placing the Drug Eluting Stent.

研究代表者 野出 孝一 (NODE KOICHI)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：80359950

研究成果の概要 (和文)：ヒト末梢血単核球の培養にて、シロスタゾール処理で内皮細胞への分化が誘導されることが示された。又PKA阻害薬がシロスタゾールの内皮細胞誘導作用を抑制することが明らかになった。臨床研究の方は、シロスタゾールはSESによる血管内皮再生遅延を改善する明らかな効果は認められなかった。

研究成果の概要 (英文)：

Cultured human peripheral blood mononuclear cell indicated that the effects of cilostazol induce the endothelial differentiation. Furthermore, the PKA inhibitor was established to control the cilostazol -inducing activity toward endothelial cell. It is remained unproven that cilostazol improves the delay of vascular endothelial regeneration caused by SES.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

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

冠動脈インターベンション(percutaneous coronary intervention: PCI)は虚血性心疾患の確立された治療法であるが、再狭窄は長い間PCIの最大の弱点であった。近年のシロリムス溶出性ステント(sirolimus eluting stent: SES)やパクリタキセル溶出性ステン

ト(pacritaxel eluting stent: PES)などの薬剤溶出性ステント(drug-eluting stent: DES)の登場は再狭窄率を著しく減らし、患者のQOL改善に大きく貢献した。しかしながらDESを用いてもPCI患者の長期予後改善には至っておらず、糖尿病合併例では通常のステント(bare metal stent: BMS)と比べてもむしろ悪いといった大規模臨床試験の結果も

ある。ステント植え込み後しばらくの間血管内腔にステントストラットの金属面が露出した状態が続くため急性/亜急性ステント血栓症の懸念がある。そのため植え込み後チクロピジンやクロピドグレルなどの抗血小板薬投与による予防が必要である。ステント後の傷害血管の修復過程で内皮の再生(再内皮化)がおこり、やがて新生内皮により金属面が被覆化されることでこうした懸念がなくなるため、数ヶ月で抗血小板薬は中止可能である。ところが DES には1年以上経過した後もなお抗血小板薬中止により生ずる遅発性ステント血栓症という特有の新たな合併症がある。まれではあるが決して無視することの出来ない重篤な合併症である。遅発性血栓症は DES が再内皮化を抑制するために生ずると考えられ、そのためチクロピジン/クロピドグレルの永続を余儀なくされる。また DES ステント植え込み後にステント遠位部において重篤な冠攣縮が観察されることがあり、DES 後の冠血管全体の血管内皮機能障害が示唆されている。DES 後のこうした再内皮化障害や内皮機能障害が長期予後改善へのハードルとなっている可能性が考えられる。

近年骨髄由来内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell: EPC) が血管内皮細胞へと分化し、虚血部位において血管新生をもたらす善玉であることが注目されるようになった。また骨髄幹細胞は同時に平滑筋前駆細胞 (smooth muscle progenitor cell: SMPC) をも含み、傷害血管においては局所の炎症機転トリガーとなり平滑筋細胞に分化し再狭窄や動脈硬化をひき起こす悪玉としての側面もある。しかし傷害血管においても内皮細胞への分化が生理的血管修復に必須の再内皮化という善玉現象をももたらす。

末梢血幹細胞を内皮環境下で培養すると CD31 陽性血管内皮様細胞へ分化する様子が観察されるが、シロリムスを添加するとその分化が著しく抑制されることが実験的に示されている。最近我々は臨床例でステント前後の末梢血で CD34 陽性骨髄幹細胞を経時的に観察した。BMS 植え込み後では CD34 陽性細胞数は1週間後をピークに増加し、特に再狭窄例で著明であったが SES 後では著しく抑制されていた。1週間後の時点で患者の末梢血幹細胞を培養すると BMS では全例で CD31 陽性血管内皮様細胞への著しい分化が観察され、再狭窄例では  $\alpha$ -アクチン陽性平滑筋様細胞に分化する細胞も散見された。ところが SES では内皮様細胞、平滑筋様細胞いずれの細胞への分化も著しく抑制されていた。

これらの結果から、SES は骨髄幹細胞の動

員を抑え、平滑筋細胞への分化を抑制することで再狭窄が予防できる反面、内皮細胞への分化も抑制するため再内皮化が障害され遅発性血栓症などの合併症をひき起こしうるものと考えられる。このように現状の DES において再内皮化障害は大きな問題である。平滑筋細胞の増殖を抑えるとともに、早期に再内皮化を誘導し、血管修復を終息させるような薬物療法の併用が重要と思われる。しかしながら現在のところ有効な薬剤は見つかっていない。

## 2. 研究の目的

抗血小板薬シロスタゾールは phosphodiesterase-3 (PDE-3) 阻害作用により血小板活性化を抑制する薬剤であり、閉塞性動脈硬化症 (ASO) や脳梗塞の治療に用いられる。シロスタゾールは急性/亜急性ステント血栓症の予防効果は低いものの平滑筋増殖抑制作用があり、再狭窄予防効果が臨床的にも明らかにされている。最近このシロスタゾールに再内皮化誘導作用が期待される実験成績が示された。しかしながら SES 後の傷害血管における再内皮化・血管修復に対する有用性は明らかとはなっていない。

本研究はシロスタゾールが SES ステント植え込み後の EPC の動員、内皮細胞への分化に及ぼす影響、再内皮化誘導作用を基礎的、臨床的に検討し、DES におけるシロスタゾール療法の有用性を検討することを目的とする。

- 1 基礎的検討: シロリムスはヒト末梢血幹細胞を内皮環境下で培養した際の血管内皮細胞への分化を著しく抑制するが、シロスタゾールがこうした分化抑制の改善効果を有するか否かを明らかにする。さらにこうした効果を有するならばそれがシロスタゾールの PDE-3 阻害作用によるものかどうかを検討する。
- 2 臨床的検討: SES ステント植え込み例でシロスタゾールを投与した際の骨髄幹細胞の末梢血への動員を検討、さらに遠隔期にステント植え込み部位の新生内皮の被覆を血管内視鏡で観察することにより、本薬の SES 後の再内皮化誘導効果を明らかにする。

本研究で DES 後のシロスタゾールによる再内皮化誘導効果を明らかにすることにより、遅発性血栓症の懸念、チクロピジン/クロピドグレルの永続を回避でき、患者の QOL の改善に貢献できるとともに DES 後の長期予後改善へも期待がもたれる。

### 3. 研究の方法

[平成 21 年度]

ヒト末梢血単核細胞を分離、血管内皮細胞環境下で培養すると内皮様細胞への分化の様子が観察され、シロリムスを添加するといずれへの分化も障害されることがわかっている<sup>1)</sup>。そこで本研究ではそこにシロスタゾールを添加した際、シロリムスによる分化の抑制が改善されるか否かを in-vitro で検討する。さらにもっとも強力に改善するシロスタゾールの濃度を明らかにする。

(1) 末梢血単核細胞の分離、培養

健康人肘静脈よりヘパリン採血を行ない、新鮮血から density gradient 法にて単核細胞を分離し、内皮細胞メディウムで 14 日間培養する。培養は fibronectin をコーティングした 96 ウェルのプレート上で、各ウェルとも  $1 \times 10^6$  細胞ずつ分注して行う。

(2) 薬剤添加

1 内皮細胞メディウムでの培養に際し 0.1ng/mL のシロリムスを添加する。

2 シロスタゾール: 1 のメディウムに 1、10、100 $\mu$ M の各濃度のシロスタゾールを添加する。

(3) 免疫染色

内皮様細胞の同定: 培養 14 日目にウェルに固層化された細胞を DiI-Ac-LDL で 4 時間インキュベートする。PBS で洗浄、固定後 FITC-BS lectin で染色。DiI-Ac-LDL/FITC-BS lectin 陽性細胞を内皮様細胞として観察する。

[平成 22 年度]

シロスタゾールは PDE-3 阻害により c-AMP を増加させ、protein kinase A (PKA) を活性化することでその作用を発揮する。シロスタゾールによるシロリムスの内皮細胞への分化抑制の改善効果が明らかとなった場合、PKA 阻害により抑制されるかどうかを観察することにより、シロスタゾールのこうした効果が PDE-3 阻害作用によるものかどうかを検討する。

上記実験で単核細胞の内皮細胞メディウムでの培養に際し、シロリムス (0.1ng/mL)、シロスタゾール (もっとも強力な効果の得られた濃度) に加え、PKA 阻害薬 myristoylated cell-permeable PKA inhibitor peptide sequence (14-22) amide (PKAI) (1 $\mu$ M) を添加した場合の内皮様細胞への分化を観察する。

1 臨床的検討

[平成 21 年度、平成 22 年度、平成 23 年度]

SES ステント植え込み例に対し、シロスタゾール投与後の骨髓幹細胞の動員<sup>2)</sup>、ステント

植え込み部位局所の再内皮化を評価し非投与群との間で比較検討する。

1. 対象

(1) 対象疾患: ASO または脳梗塞を合併し、待機的に主要責任病変に対し少なくとも 1 個の SES ステント植え込みを行う慢性冠動脈疾患症例で以下の選択基準、除外基準を満たすもの

(2) 選択基準

- ① 狭窄率、病変長、対照血管径: 不問
- ② 年齢: 不問
- ③ 性別: 不問
- ④ 診療区分: 入院→薬剤介入後は外来でフォロー
- ⑤ 文書による同意が得られる患者

(3) 除外基準

- ① 出血している患者 (血友病、毛細血管脆弱症、頭蓋内出血、消化管出血、尿路出血、喀血、硝子体出血等) [出血を悪化させる恐れがある] および出血傾向にある患者
- ② うっ血性心不全の患者
- ③ 試験薬剤の成分に対し白血球減少、肝機能障害、腎機能障害等の重篤な副作用、過敏症の既往歴がある患者
- ④ 重篤な肝機能障害のある患者
- ⑤ 重篤な腎機能障害のある患者
- ⑥ 妊婦、授乳中、または妊娠している可能性のある患者
- ⑦ その他、実施責任者が不相当と判断した患者

2. 方法

(1) 研究デザイン: 無作為化並行群間試験

(2) 群分け: 乱数表に基づきシロスタゾール投与群・非投与群に群分けする

(3) 投薬方法: 抗血小板薬として全例 PCI 施行 2 日前よりアスピリンを 100mg/日 + チクロピジン 200mg/日 或るいはクロピドグレルは 75mg/日を投与する。

シロスタゾール投与群: ステント植え込み後、上記薬剤に加えシロスタゾールを 200mg/日を経口投与する。副作用が出た場合には、主治医の判断により減量または中止する。

シロスタゾール非投与群: 上記薬剤のみとする。

他の狭心症治療薬、生活習慣病治療薬に関しては不問

(4) ステント植え込み: ステント植え込みは方法・部位・サイズ・長さ・個数・を問わない。複数ステント留置の場合、少なくとも SES ステントが 1 個留置されること。

(5) 採血: PCI 前、2 日後、7-14 日後に採血を行い以下の項目を測定する。

① 骨髄幹細胞・血管内皮前駆細胞 (7-14 日後)

② 炎症マーカー (2 日後)

(6) 血管内視鏡: PCI 半年後に行いステント植え込み部位を観察する。

(7) 評価項目

① 骨髄幹細胞・血管内皮前駆細胞測

定 (PCI 前、7-14 日後): フローサイトメトリーを用いて以下のマーカーで検出する

骨髄幹細胞: CD34+

内皮前駆細胞: CD34+/CD133+

② 炎症マーカー・代謝マーカー (PCI 前、2 日後)

ELISA・Luminex Microbeads Array System にて測定

hsCRP、MRP8/14、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、G-CSF、HMW adiponectin、PTX3、MMP-9、NT-proBNP 等

③ 血管内視鏡: 再内皮化の評価を血

管内視鏡で行う。(6 ヶ月後のフォローアップ時): SES ステントの留置された主要 1 病変に対し、再内皮化の肉眼的評価を以下の基準で行う。

Grade 1 ステントストラットがはっきりした光沢を持って浮き出ている。

Grade 2 ステントストラットが浮き出ているが光沢はない。

Grade 3 ステントストラットが認識されるが浮き出していない。

Grade 4 ステントストラットが認識されない。

### 3. 評価

(1) 主要評価項目: 6 ヶ月後の再内皮化

(2) 副次評価項目

① 骨髄幹細胞・血管内皮前駆細胞

② 炎症マーカー

③ 血栓性合併症・再狭窄

### 4. 目標症例数

シロスタゾール投与群 10 例

シロスタゾール非投与群 10 例

合計 20 例

### 4. 研究成果

【平成 21 年度】ヒト末梢血単核細胞を分離、血管内皮細胞環境下で培養すると内皮様細胞への分化への様子が観察され、シロリムスを添加するといずれへの分化も障害されることがわかっている。そこで本研究ではそこにシロスタゾールを添加した際、シロリムスによる分化の抑制が改善されるか否かを in-vitro で検討した。さらにもっとも強力に改善するシロスタゾールの濃度を明らかにした。

(1) 末梢血単核細胞の分離、培養健常人肘静

脈よりヘパリン採血を行ない、新鮮血から density gradient 法にて単核細胞を分離し、内皮細胞メディウムで 14 日間培養した。培養は fibronectin をコーティングした 96 ウェルのプレート上で、各ウェルとも 1

□106

細胞ずつ分注して行った。

(2) 薬剤添加  
1 内皮細胞メディウムでの培養に際し 0.1ng/mL のシロリムスを添加した。

2 シロスタゾール: 1 のメディウムに 1、10、100 $\mu$ M の各濃度のシロスタゾールを添加した。

(3) 免疫染色

内皮様細胞の同定: 培養 14 日目にウェルに固着化された細胞を DiI-Ac-LDL で 4 時間インキュベートした。PBS で洗浄、固定後 FITC-BS lectin で染色。DiI-Ac-LDL/FITC-BS lectin 陽性細胞を内皮様細胞として観察した。

SES ステント植え込み例に対し、シロスタゾール投与後の骨髄幹細胞の動員、ステント植え込み部位局所の再内皮化を評価し非投与群との間で比較検討した結果、シロスタゾール投与群の方が有意に再内皮化が促進された。

【平成 22 年度】

シロスタゾールによるシロリムスの内皮細胞への分化抑制の改善効果が明らかとなったので、平成 22 年度は PKA 阻害により抑制されるかどうかを観察することにより、シロスタゾールのこうした効果が PDE-3 阻害作用によるものかどうかを検討した。

上記実験で単核細胞の内皮細胞メディウムでの培養に際し、シロリムス (0.1ng/mL)、シロスタゾール (もっとも強力な効果の得られた濃度) に加え、PKA 阻害薬 myristoylated cell-permeable PKA inhibitor peptide sequence (14-22) amide (PKAI) (1 $\mu$ M) を添加した場合の内皮様細胞への分化を観察した。シロスタゾールの内皮細胞への分化誘導効果は PKAI により抑制された。

【平成 23 年度】平成 23 年度は臨床的検討として SES ステント植え込み例に対し、シロスタゾール投与後の骨髄幹細胞の動員、ステント植え込み部位局所の再内皮化を評価し非投与群との間で比較検討した。

方法

1) 投薬方法: 抗血小板薬として全例 PCI 施行 2 日前よりアスピリンを 100mg/日 + チクロピジン 200mg/日 或るいはクロピドグレルは 75mg/日を投与する。

シロスタゾール投与群: ステント植え込み後、上記薬剤に加えシロスタゾールを 200mg/日

を経口投与する。シロスタゾール非投与群：上記薬剤のみとする。

2) 採血：PCI 前、2 日後、7-14 日後に採血を行い以下の項目を測定する。

骨髄幹細胞・血管内皮前駆細胞(7-14 日後)

3) 血管内視鏡：PCI 半年後に行いステント植え込み部位を観察する。

血管内視鏡で評価した SES ステント植え込み術に対する再内皮化の程度は、対照群とシロスタゾール群では、有意差はなかった。一方、末梢血中の CD34 陽性細胞濃度は、シロスタゾール群で高い傾向にあったが、対照群と比較して、有意差はなかった。

以上のことから、シロスタゾールは SES による血管内皮再生遅延を改善する明らかな効果は認められなかった。

今後の課題として、シロスタゾールを使用した更に症例数が多い対象群での多施設介入研究において、薬剤溶出性ステントを植え込んだ症例における、心血管イベントをエンドポイントにおいた臨床研究が望まれる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

①Inoue T, Taguchi I, Abe S, Toyoda S, Nakajima K, Sakuma M, Node K. Activation of matrix metalloproteinase-9 is associated with mobilization of bone marrow-derived cells after coronary stent implantation. *Int J Cardiol.* 152(3):332-6 2011(査読有)

②Yano M, Watanabe K, Yamamoto T, Ikeda K, Senokuchi T, Lu M, Kadomatsu T, Tsukano H, Ikawa M, Okabe M, Yamaoka S, Okazaki T, Umehara H, Gotoh T, Song WJ, Node K, Taguchi R, Yamagata K, Oike Y. Mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species impair insulin secretion in sphingomyelin synthase 1-null mice. *J Biol Chem.* 286(5):3992-4002 2011(査読有)

③Kawano H, Node K. The role of vascular failure in coronary artery spasm. *J Cardiol.* 57(1) 2-7 2011(査読有)

④Inoue T, Ikeda H, Nakamura T, Abe S, ⑤Taguchi I, Kikuchi M, Toyoda S, Miyazono M, Kishi T, Sanai T, Node K. Potential

benefit of statin therapy for dyslipidemia with chronic kidney disease: Fluvastatin Renal Evaluation Trial (FRET). *Intern Med.* 50(12):1273-8 2011(査読有)

⑥Inoue T, Taguchi I, Abe S, Toyoda S, Sakuma M, Node K. Inhibition of intestinal cholesterol absorption might explain cholesterol-lowering effect of telmisartan. *J Clin Pharm Ther.* 36(1):103-10 2011(査読有)

⑦Noda H, Iso H, Yamashita S, Ueno H, Yokode M, Yamada N, Ouchi Y; Defining Vascular Disease (DVD) Research Group. Risk stratification based on metabolic syndrome as well as non-metabolic risk factors in the assessment of carotid atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 18(6):504-12 2011(査読有)

⑧Inoue T, Croce K, Morooka T, Sakuma M, Node K, Simon DI. Vascular inflammation and repair: implications for re-endothelialization, restenosis, and stent thrombosis. *JACC Cardiovasc Interv.* 4(10):1057-1066 2011. (査読有)

⑨Hiwatashi A, Iwabuchi M, Yokoi H, Tayama S, Sakamoto T, Noda K, Shibata Y, Hikichi Y, Node K, Ueno T, Nobuyoshi M. PCI using a 4-Fr "child" guide catheter in a "mother" guide catheter: Kyushu KIWAMI® ST registry. *Catheter Cardiovasc Interv.* 76(7):919-23 2010(査読有)

⑩Inoue T, Node K. Molecular Basis of Restenosis and Novel Issues of Drug-Eluting Stents. *Circulation Journal* 73(4) 615-621 2009(査読有)

⑪Matsuo K, Inoue T, Node K. Estimated glomerular filtration rate as a predictor of secondary outcomes in Japanese patients with coronary artery disease. *Journal of Cardiology* 53(2): 232-239 2009(査読有)

[学会発表] (計 6 件)

①野出孝一  
心不全における遠隔治療—IT による在宅管理 (HOMES-CHF)  
第 15 回日本心不全学会学術集会

2011年10月13日 鹿児島

②佐久間理吏、挽地裕、下村光洋、兒玉和久、小松愛子、野出孝一  
左冠動脈主幹部におけるKBTステント留置後の一剖検症例 “micro focus CTによるKBT後のstent strut評価”  
第18回CVIT九州地方会 2011年8月27日 沖縄

③井上洋平、柴田剛徳、福島裕介、仲間達也、三根大悟、相良秀一郎、西平賢作、野村勝政、足利敬一、栗山根廣、松山明彦、野出孝一  
ステント留置後のLate luminal loss-シロリムス溶出性ステントとパクリタキセル溶出性ステントとの比較  
第110回日本循環器学会九州地方会  
2011年6月25日 福岡

④Node K. The regulatory effect of statin on the coronary plaque from the view point of molecular mechanism  
The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide  
2010年6月14日 京都

⑤Node K. Role of Calcium Antagonists in Coronary Artery Disease-In view of their vasoprotective action-  
The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide  
2010年6月14日 京都

⑥Node K. 血管不全と心腎連関  
XXth World Congress of the International Society for Heart Research 2010年5月16日 京都

[図書] (計3件)

①福富達也、野出孝一  
そこが知りたい抗血栓療法 糖尿病と抗血栓療法 218-225 2011

②挽地裕、野出孝一  
ステントを用いた左主幹部病変治療の可能性と限界: in vitroからの知見  
Coronary Intervention 231(6):605-610 2010

③挽地裕、野出孝一

DESの基本構造 Basic Efficiently of Drug-eluting Stent  
医学のあゆみ 231(6):605-610 2010

[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

野出 孝一 (NODE KOICHI)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号: 80359950

(2) 研究分担者

佐久間 理吏 (SAKUMA MASASHI)

佐賀大学・医学部・医員

研究者番号: 10530199

(3) 連携研究者

なし