

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590794

研究課題名（和文） 各種薬剤溶出性ステント術後の傷害血管修復機転に関する研究

研究課題名（英文） Wound healing response in injured vessel wall after implantation of drug-eluting stents

研究代表者

井上 晃男（INOUE TERUO）

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：20168454

研究成果の概要（和文）：

本研究では第二世代の薬剤溶出性ステント(DES)であるゾタロリムス溶出性ステント(ZES)、エベロリムス溶出性ステント(EES)における移植後の傷害血管修復機転を検討し、ベアメタルステント(BMS)および第一世代の DES と比較した。その結果 ZES、EES とともに BMS と比べ、移植後の血管内皮前駆細胞(EPC)の動員に伴う再内皮化が抑制され、そのため遠隔期に炎症反応が再燃する可能性が示唆され、第二世代の DES であってもこうした傷害血管の修復過程の問題は未解決であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated wound healing process after stent-induced vascular injury in the second generation drug-eluting stent (DES) such as zotarolimus-eluting stent (ZES) and everolimus-eluting stent (EES) and compared with bare metal stent (BMS) or the first generation DES. The BMS induced mobilization of endothelial progenitor cells (EPCs) that leads to re-endothelialization in the injured vessel wall. However, ZES as well as EES substantially inhibited the EPC mobilization and re-endothelialization, possibly leading to relapse and prolongation of inflammatory reaction at late phase. even second generation DESs remain problematic in terms of the wound healing process after vascular injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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・分子血管病態学

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 改善には大きく貢献したもののベアメタルステント(bare metal stent: BMS)と比べ、長期予後改善には至ってはいない。BMS においてもステント移植後しばらくの間は血管内腔にステント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り、アスピリンに加え、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。しかし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)がおり、やがて新生内皮により金属面が被覆化されるとこうした懸念がなくなるため、数か月で抗血小板薬は中止可能である。ところが DES の場合 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がある。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る。このようにステント後の傷害血管の生理的修復機転に必須である再内皮化が障害されることが DES にとって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が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たらす。

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ている。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 DES の一つシロリムス溶出性ステント(SES)後では著しく抑制されていた。またこうした幹細胞の増加に先立ち、

BMS では移植後 48 時間をピークとした好中球表面上でのインテグリン Mac-1(CD11b/CD18)の活性化が見られるのに対し、SES ではそれが著しく抑制されることも観察している。さらに我々は 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分化が観察され、再狭窄例では α -平滑筋アクチン(α -SMA)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(Circulation 2007; 115: 553-561)。末梢血幹細胞を内皮環境下で培養すると血管内皮様細胞へ分化する様子が観察され、平滑筋環境下の培養では平滑筋様細胞への分化が観察されるが、シロリムスを添加するといずれへの分化も著しく抑制されることが実験的に示されている(Circulation 2005; 111: 926-931)。これらの結果から、SES は急性期には局所の炎症反応を抑えることで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 SES 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、生理的血管修復を完遂せしめるような DES の登場が望まれる。

研究開始当時わが国では第一世代の DES といわれる SES 及びパクリタキセル溶出性ステント(PES)に続いて第二世代のゾタロリムス溶出性ステント(ZES)が登場し、3 種の DES が使用可能であったが、これら 3 種の DES 間での血管修復過程、溶出薬剤の骨髄幹細胞分化に及ぼす影響を比較した報告はなかった。

2. 研究の目的

その後 ZES に続く第二世代の DES としてエベロリムス溶出性ステント(EES)、さらには国産初の DES としてバイオリムス溶出性ス

テントが登場し、第一世代の SES、PES は臨床の場からはほぼ姿を消した。本研究の目的は現在わが国で使用されている ZES 及び EES の移植血管における病態とその修復機転を形態学および分子生物学的に検討し、第一世代の DES との違いを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) DES と BMS の再狭窄病変の免疫組織学的検討

アテレクトミー(DCA)で切除し、保存しておいた DES および BMS 移植後(平均 10 か月後)の再狭窄病変(SES 後再狭窄 7 病変、BMS 後再狭窄 17 病変)および動脈硬化病変 15 病変において血管内皮(von Willebrand Factor: vWF)、活性化血小板(P-selectin)、T リンパ球(CD45)、マクロファージ(CD68)それぞれのマーカーを用いて免疫染色を行い比較検討した。

(2) DES 移植後の剖検例の病理組織学的検討

EES 移植 5 か月後の急死例(86 歳男性)の剖検にてステント移植部位を組織学的に検討した。

(3) DES と BMS における移植後遠隔期の炎症反応の比較

少なくとも 1 個の DES を移植後に再狭窄を認めなかった 54 例(DES 群)および対照として BMS のみを移植後遠隔期に再狭窄を認めなかった 51 例(BMS 群)において遠隔期(DES: 平均 10 か月、BMS: 平均 7 か月)に様々な炎症マーカーを測定した(hsCRP: nephelometry、IL-6・IL-8・TNF- α ・MCP-1・myeloperoxidase: Luminex Micro-beads Array System)。

(4) ヒト末梢血幹細胞の血管内皮様細胞、血管平滑筋様細胞への分化と DES の溶出薬剤によるその抑制(in-vitro 実験)

健常例 5 例から抽出した末梢血幹細胞を血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を含む内皮メディウムおよび血小板由来成長因子(PDGF)を含む平滑筋メディウム上で培養し、内皮様細胞、平滑筋様細胞それぞれへの分化を観察し、シロリムス、ゾタロリムス、エベロリムスの 3 薬による抑制作用を比較した。

(5) ステント後の EPC の動員と再内皮化の評価

ステント留置 38 例(年齢 70 \pm 9 歳、BMS15 例、ZES9 例、EES14 例)において留置前、後 7 日目にフローサイトメトリーを用いて末梢血中の EPC (CD34+/CD133+/CD45low 細胞)数を測定した(図 1)。

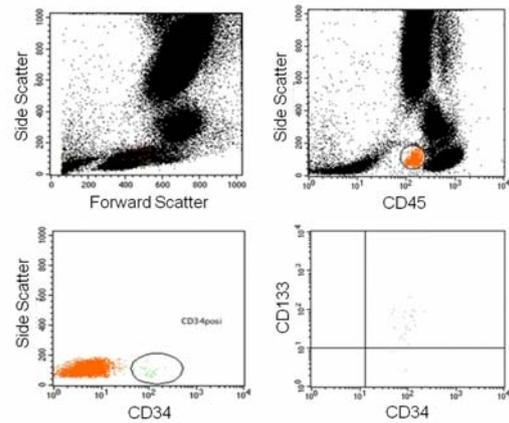


図 1 CD34+/CD133+/CD45low EPC の検出

そのうち 17 例(BMS5 例、ZES6 例、EES6 例)では遠隔期(平均 10 か月)に光干渉断層法(OCT)を用いて全ステントストラットについて新生内膜による被覆化を観察し(図 2)、非被覆率を算出した。

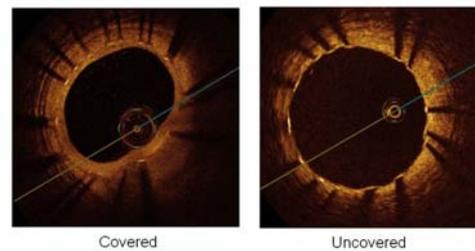


図 2 OCT による新生内膜被覆化の観察

4. 研究成果

(1) DCA 標本における免疫組織学的検討では BMS 後再狭窄病変に比べ SES 後再狭窄病変では CD45 陽性 T リンパ球、CD68 陽性マクロファージの集簇が著明であり(図 3)、SES 病変、BMS 病変、動脈硬化病変の 3 間で比較すると CD45 陽性領域(9.1, 3.2, 6.1%)、CD68 陽性領域(9.3, 1.6, 8.9%)の面積率は SES 後再狭窄病変で最も高値(CD45: P<0.05, CD68: P<0.01)であった。

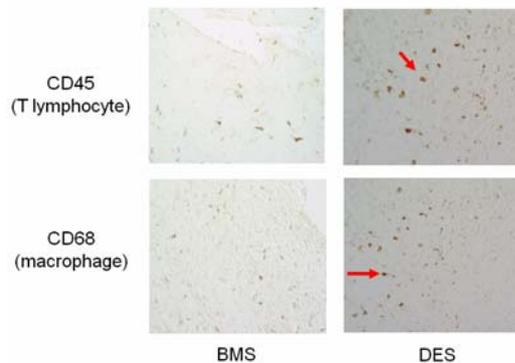


図 3 CD45 陽性 T リンパ球、CD68 陽性マクロファージの集簇

3 病変それぞれで組織表面への P-selectin 陽性活性化血小板の粘着(57%, 60%, 92%)は同等であり、vWF 陽性血管内皮の被覆(46, 67, 92%)は SES 後再狭窄病変で少ない傾向(P=0.06)がみられた。

本結果から DES 後の再狭窄病変は BMS 後の再狭窄病変に比べ、再内皮化が少なく炎症反応が高度であることが判明した。このことから DES と BMS では再狭窄機序が異なる可能性、DES では再内皮化障害に加え、急性期に抑制された炎症反応が遠隔期に再燃する可能性が示唆された。

(2) EES 移植後の剖検例の検討では新生内膜により表面が被覆化されているストラットも観察されたが、むき出しのストラットも多く、ストラット近傍の潰瘍形成もみられた。またマクロファージや巨細胞などの炎症細胞浸潤、巨細胞によるポリマーの食食像、新生血管など高度な炎症性変化が認められた(図 4)。

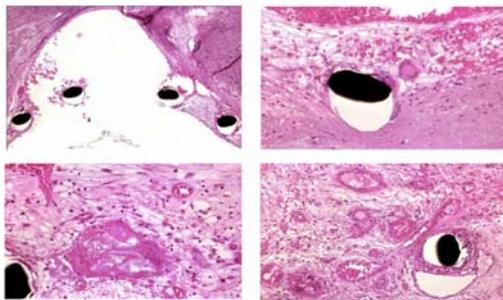


図 4 ZES 移植部位の組織像

本剖検結果から、第二世代の DES である EES といえども、遠隔期の移植部位局所の炎症反応の再燃は著明であり、血管修復機転に問題があると思われた。

(3) スtent 移植後遠隔期の炎症マーカーを比較すると DES 群では BMS 群に比べ IL-6 値 ≥ 2.22 pg/mg の例が有意に多く(21 vs 4%, $p=0.003$)、IL-8 値も高値を示した(4.51 ± 2.40 vs 3.84 ± 1.34 pg/ml, $P=0.015$)。DES 群のうち SES(n=8)、ZES(n=36)、EES(n=21)の比較では IL-6、IL-8 とも差はなかった。

本結果から再狭窄を免れた場合でも DES の場合、BMS と比べ遠隔期に炎症反応が再燃し、それは第二世代の DES においても同様と考えられた。

(4) 1 週間の培養で末梢血幹細胞は CD31 陽性血管内皮様細胞、 α -SMA 陽性血管平滑筋様細胞へと分化した。次にこれらの培養時にシロリムス、ゾタロリムス、エベロリムスの 3 薬を添加した(0.01, 0.1, 1 nM)ところこれらの分化は容量依存的に抑制された。血管平滑筋様細胞への分化の抑制(コントロールを 100%と

して)はシロリムス(各用量で 10%, 7%, 3%)に比べエベロリムス(26%, 12%, 4%)、ゾタロリムス(29%, 19%, 11%)で軽度であり、エベロリムスよりもゾタロリムスでより軽度であった。一方血管内皮様細胞への分化の抑制はシロリムス(28%, 19%, 2%)に比べエベロリムス(34%, 23%, 7%)、ゾタロリムス(44%, 47%, 4%)で軽度であったがゾタロリムスよりエベロリムスの方が軽度であった(図 5)。

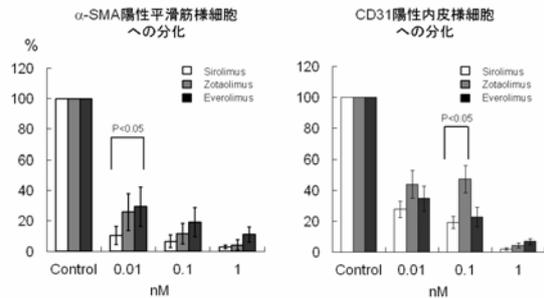


図 5 DESの溶出薬剤による末梢血幹細胞の血管平滑筋様細胞・血管内皮様細胞への分化の抑制

本結果から溶出薬剤の薬理作用からみると SESに比べ第二世代のDESであるEES, ZESの方が平滑筋細胞増殖抑制効果すなわち再狭窄予防は劣るものの、再内皮化誘導すなわち生理的血管修復には優れる可能性が考えられた。またZESよりもEESのほうが再狭窄予防、再内皮化誘導ともに優れ、より良好な血管修復をもたらす可能性が示唆された。

(5) スtent 移植 7 日目の EPC 数の変化率は BMS、ZES、EES の各群でそれぞれ $74 \pm 59\%$ 、 $13 \pm 55\%$ ($P < 0.05$ vs BMS)、 $1 \pm 40\%$ ($P < 0.001$ vs BMS)であり、BMS に比べ ZES、EES では EPC の増加が抑制されていた。またこの抑制は ZES に比べの EES の方がより高度であった。OCT による遠隔期の新生内膜非被覆率は BMS、ZES、EES それぞれで -0.27 ± 0.93 、 0.31 ± 0.33 、 1.28 ± 0.99 log (%) ($P < 0.01$ vs BMS)であり、BMS に比べ EES では新生内膜非被覆化が抑制されていた(図 6)。

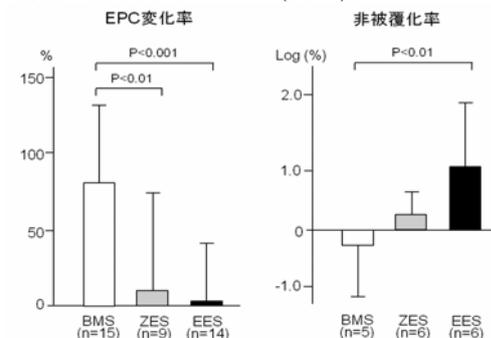


図 6 スtent 移植後 7 日目の EPC 変化率と遠隔期の新生内膜非被覆率

さらに7日目のEPC数の変化率と新生内膜非被覆率との間には負の相関傾向(R=0.42, P=0.06)が見られた(図7)。

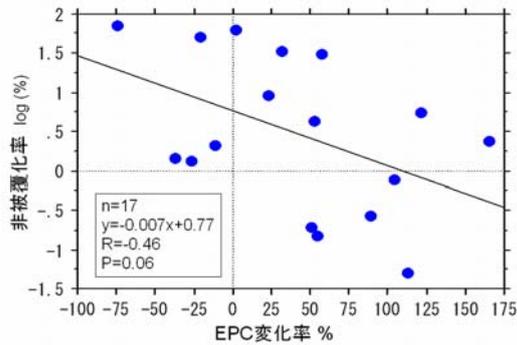


図7 EPCの変化率と新生内膜非被覆率との関係

本結果からステント移植後 EPC が動員され、それが再内皮化と関連することが示唆された。また第二世代の DES においてもこれらが抑制され、血管修復に支障をきたすと考えられた。さらに ZES に比べ EES の方がより血管修復への支障が大きい可能性が考えられた。

以上の結果から、ステント移植後の傷害血管の修復過程で、EPC の動員が再内皮化誘導に重要な役割を持ち、DES ではそれらが抑制されることにより生理的血管修復が損なわれる可能性があると考えられた。また血管修復の破綻により DES では急性期に抑制されていた炎症反応が遠隔期に再燃し、それが遅延する可能性が示唆された。第二世代の ZES や EES は第一世代の SES に比べると多少は良好な血管修復をもたらすが、決して満足すべきものではなく、未だ大きな問題を残していると考えられる。ZES と EES の比較では溶出薬剤の薬理作用をみた in-vitro の実験結果からは後発の EES に期待がもたれたが、実際にステント移植を行った臨床例ではむしろ EES の方が血管修復は不良であった。

第二世代の DES であっても傷害血管の修復過程に問題があり、今後血管修復の面でさらに優れた DES の登場が望まれる。

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5件)

- ① Inoue T, Croce K, Morooka T, Sakuma M, Node K, Simon DI. Vascular inflammation and repair: implication for reendothelialization, restenosis, and stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol Intv* 2011; 4: 1057-1066 査読有

DOI: 10.1016/j.jcin.2011.05.025.

- ② Abe S, Yoneda S, Kanaya T, Oda K, Nishino S, Kageyama M, Taguchi I, Masawa N, Inoue T. Pathological features of in-stent restenosis after sirolimus-eluting stent vs. bare metal stent placement. *Cardiovasc Pathol* 2012; 21: e19-e22 査読有
DOI: 10.1016/j.carpath.2011.02.003.
- ③ Yoneda S, Abe S, Taguchi I, Masawa N, Inoue K, Inoue T. Inflammation and impaired wound healing after zotarolimus-eluting stent implantation. *Cardiovasc Pathol* 2012 ;21: 511-514 査読有
DOI: 10.1016/j.carpath.2012.01.003
- ④ Yoneda S, Abe S, Kanaya T, Oda K, Nishino S, Kageyama M, Taguchi I, Masawa N, Inoue T. Late phase inflammatory response as a feature of in-stent restenosis after drug-eluting stent implantation. *Coron Artery Dis* 2013 (in press) 査読有
- ⑤ Taguchi I, Yoneda S, Abe S, Toyoda S, Nasuno T, Nishino S, Kageyama M, Tokura M, Ogawa M, Node K, Inoue T. The late phase inflammatory response after drug-eluting stent implantation. *Heart Vessels* 2013 [Epub ahead of print] 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23649933>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 晃男 (INOUE TERUO)
獨協医科大学・医学部・教授
研究者番号：20168454

(2) 研究分担者

阿部 七郎 (ABE SHICHIRO)
獨協医科大学・医学部・教授
研究者番号：80275718

田口 功 (TAGUCHI ISAO)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80316570

佐久間 理吏 (SAKUMA MASASHI)
佐賀大学・医学部・医員
研究者番号：10530199
(H22のみ)

野出 孝一 (NODE KOICHI)
佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：80359950
(H22のみ)

(3)連携研究者

佐久間 理吏 (SAKUMA MASASHI)
佐賀大学・医学部・医員
研究者番号：10530199
(H23より)

野出 孝一 (NODE KOICHI)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：80359950
(H23より)