

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591281

研究課題名(和文)脳表人工膜内新生血管の脳梗塞予防・縮小効果

研究課題名(英文)Tissue engineered blood vessel sheet to prevent cerebral infarction

研究代表者

伊藤 義彰 (Itoh, Yoshiaki)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90265786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円、(間接経費) 1,320,000円

研究成果の概要(和文)：主幹動脈の狭窄・閉塞によって生じた虚血に対して、血管新生を惹起・促進することで血流改善を図り、脳梗塞を予防する治療法が試みられている。われわれは、虚血部の脳表を被覆する人工血管シートを作成し、人工的に側副血行路を作成、その後作成した中大脳動脈閉塞による脳梗塞が縮小する効果を得た。あらかじめコラーゲン中にGFPでラベルしたヒト脳微小血管内皮細胞および間質前駆細胞10T1/2を撒き込みディッシュ上で膜状にし、人工血管シートを作成した。マウスの頭頂骨を開窓し硬膜を切除した上で軟膜の上に、人工血管シートを載せさらに観察用の頭窓を装着して開創部を閉塞した。結果について学会にて報告し論文化した。

研究成果の概要(英文)：Background: Therapeutic angiogenesis is now actively studied as a method to alleviate cerebral infarction after major artery occlusion. We developed a tissue engineered blood vessel sheet to facilitate bypass flow in an animal model of arterial occlusion. Methods: Human brain microvessel endothelial cells were labeled with GFP and were seeded in collagen membrane together with 10T1/2 cells, mesenchymal precursor cells. After craniectomy in immunosuppressed mouse (SCID mouse), the membrane with endothelial cells were placed over the cortex and pia matter. Results: Mature vessel structure was observed after 3 days and blood flow from cortical arteriole was observed after 5 days. Size of cerebral infarct induced by permanent MCA occlusion became much smaller than control. Conclusion: Tissue engineered pial vessel may be useful in prevention of cerebral infarction after major artery occlusion.

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：人工血管 脳虚血治療 血管新生 内皮細胞

### 1. 研究開始当初の背景

(1)主幹動脈閉塞・狭窄症の治療の現在：アテローム血栓症による主幹動脈の狭窄・閉塞に対しては、内科的治療として糖尿病、脂質異常症、高血圧、喫煙などのリスクファクターのコントロールが行われる。この中でスタチン製剤は脂質異常症を改善するだけでなく動脈硬化病変の退縮にも効果があるとされる。また、抗血小板薬、抗凝固薬が血栓形成の予防薬として投与される。また外科的治療としては、頸部内頸動脈の狭窄・閉塞症に対しては、頸動脈内膜剥離術(CEA)および頸動脈ステント挿入術(CAS)が行われている。こうした治療法の進歩により、最近 10 年間で明らかに脳梗塞の発症は減少してきているにも関わらず、依然として脳血管の動脈硬化が著しく、可能な限りの治療を尽くしてもアテローム血栓が増大し脳梗塞を発症してしまう症例が少なくない。

(2)脳循環の側副血行路：脳循環には元来の側副血行路として Willis 動脈輪が備わっており、左右の前大脳動脈、同側の内頸動脈と後大脳動脈はそれぞれ前交通動脈、後交通動脈で連絡している。しかし Willis 動脈輪の発達は個人差が大きく主幹動脈が側副血行路を有していない症例も、まれならず存在する。さらに脳表では前大脳動脈と中大脳動脈、中大脳動脈と後大脳動脈の間で軟膜動脈吻合(Leptomeningeal Anastomosis: LMA)が存在するが、この側副血行路にも個人差がある。さらに硬膜動脈、軟膜動脈、眼動脈などを介する外頸動脈系と内頸動脈系との側副血行路もあるが、生理的状況下においてはほとんど機能していない。

(3)脳梗塞の予防としての側副血行路：アテローム血栓症やもやもや病などにより緩徐に脳虚血が進行する場合や繰り返し脳虚血がもたらされると、脳は血管新生、血管リモデリングによって LMA を発達させたり内頸動脈・外頸動脈の吻合を発達させたりすることが知られており、脳梗塞の発症の予防に役立つ。また脳実質の毛細血管が拡張し血流改善に働くことも知られている。しかし側副血行路による血流の補充はしばしば不十分であり、残念ながら動脈狭窄の伸展によって脳梗塞に至ってしまう。

(4)血管新生による虚血性脳血管障害の治療：内科的治療により血管新生を促す方法は、実験動物レベルで試みられている。血管新生を促す因子として最も強力なのは VEGF であり、さまざまな投与方法が試みられているが、有効な血流改善は確立されていない。その他の血管新生因子としては、angiopoietin/TIE2, semaphorin/neuropilin, BDNF, NGF, NT-3, p75NGFR, Ephs/ephrins, NOGO, GM-CSF など様々な因子が血管新生・血管リモデリングに関与していることが報告

されており、実験動物レベルでの血管新生、虚血耐性の獲得は報告されているものの、いずれも効果は限定的でヒトへの応用には程遠い。

### 2. 研究の目的

(1)主幹動脈の狭窄・閉塞による脳梗塞の形成には、側副血行路の発達が大なる影響を及ぼす。特にアテローム血栓症では脳血流低下は緩徐に進行するため、軟膜動脈血管吻合(LMA)が発達する余地が多分にあるが、現在側副血行路を発達させる臨床的治療法は皆無である。

(2)我々はこれまでに、内膜剥離後の再内皮化の研究、in vitro 血管モデルの研究、低酸素脳症や慢性脳虚血における血管新生を研究し報告している。

(3)本研究ではこれまでの結果を踏まえ、血管構成細胞および血管前駆細胞を移植することで虚血耐性を強化するような治療的血管新生モデルを作成、臨床的応用を模索する。

### 3. 研究の方法

(1) (培養、人工血管の準備は伊藤が行い、動物への移植は鳥海、星野が担当) 血管内皮細胞の準備：同種移植であればマウス血管内皮細胞を利用する。ヒトへの応用を考え、ヒト細胞を利用する場合、HUVEC (human umbilical vein endothelial cell)、human brain microvessel endothelial cell などが市販されており、すぐに利用できる。異種移植の場合はレシピエントに SCID マウスなどの免疫不全動物を利用する。

(2)周皮細胞など：in vitro モデルの結果でも明らかのように、内皮細胞単独では、血管構造を維持することはできず脆弱な血管しかできず、またできた血管は容易にアポトーシスに陥ってしまう。そのため、周皮細胞や feeder 細胞の同時移植が必要である(J Cereb Blood Flow Met 投稿中)。ヒト血管周皮細胞は市販のものが利用可能である。feeder 細胞としては、mouse embryonic fibroblast (MEF) を利用でき、これらを比較検討する。

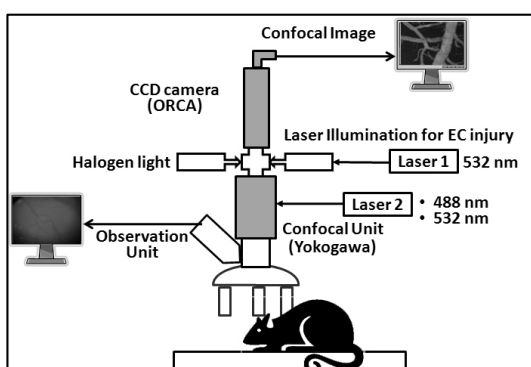
(3)膜状支持組織 scaffold：さまざまなゲル物質が市販されている。最も広く用いられるのは BD のマトリゲルであり、当研究室でも in vitro 血管新生モデルで capillary-like structure を容易に形成することを報告している。そのほかに、hydrogel や collagen が市販されており硬度、血管構造の維持力などに差があり比較検討する。

(4)人工血管膜の移植：血管の形成には既存の血管との接合が不可欠であり、膜の移植は血管形成が起きる前に行う必要がある。上記のように当研究室では頭窓の作成を確立し

ている (Stroke. 2009;40(10):3378 )。直径 3mm で bregma から後方・側方にそれぞれ 2.5mm を中心とした頭窓を作成する。硬膜は剥離し、軟膜上に人工血管膜を静置しクオート製の頭窓を設置する。これにより数カ月にはわたって繰り返し脳表を観察することができる。

(5) 新生血管の画像化：既存の血管の上に作成した人工血管を確認するために、移植する内皮細胞は GFP 発現にてあらかじめラベルしておく必要がある。

(6) 脳表コンフォーカル顕微鏡：脳表の新生血管を確認するために、コンフォーカル顕微鏡を用いる (図)。



血流の確認には、FITC-dextran を尾静脈より投与して、新生血管の中を流れる血流を確認する。

(7) 新生血管の免疫組織学的検討：新生血管の組織構造を血管内皮細胞、周皮細胞、血管平滑筋、アストロサイトなどの細胞マーカーで標識して検討する。また各種インテグリンの発現を確認する。

(8) 脳虚血モデルの作成：動物の MCA 閉塞モデルには、田村法による MCA 永久虚血モデル、糸あげ法による一過性虚血モデルがある。何れの虚血モデルも当研究室では習熟している。再現性、均一性の点からは直達法である田村法が優れている (Stroke. 2009;40(10):3378 )。

(9) MCA 閉塞後の血流動態の検討：血流は、mean transit time、レーザドップラー法にて検討する (装置は現有)。微小循環は、FITC-dextran または TR-labeled RBC にて評価する。 (Stroke. 2009;40(10):3378 )

(10) 梗塞巣の体積測定：TTC 染色後、連続切片を評価する。

(11) 新生血管の評価：脳血液関門 blood brain barrier の形成について Evans Blue などの色素漏出試験にて評価する必要がある。血管拡

張性について、アセタゾラミドなどの薬剤反応性、CO2 反応性で評価する。

(12) 出血の危険性の評価：新生血管は脆弱で易出血性の可能性がある。病理学的評価のほか、血圧負荷試験などにて耐性を確認し臨床への応用の可能性を検討する必要がある。

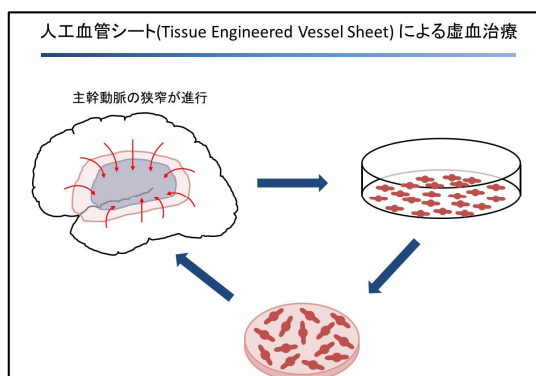
(13) 血管新生促進因子の検討：VEGF をはじめ、angiopoietin/TIE2, semaphorin/neuropilin, BDNF, NGF, GM-CSF などが人工血管新生モデルにおよぼす効果を検討する。

(14) 骨髄由来 Endothelial Progenitor Cell (EPC) の有用性の検討：モデルにより血管新生に EPC が寄与することが知られている。本モデルにおける EPC の効果を検討する。骨髄からの hematopoietic progenitor cell の分離、末梢からの投与は習熟している (J Cereb Blood Flow Met. 2009; 29: S376)。

(15) 以上の検討の結果、マウスにおいて軟膜上の膜内人工血管の形成に成功し、かつ主幹動脈の閉塞に対して、側副血行路としての血流改善作用があり脳梗塞予防・縮小効果が認められた場合は、さらに霊長類にて同様に人工血管による脳梗塞予防効果を検討する。また脳出血などの安全性を確認すると同時に、長期的な人工血管の経過を追跡する

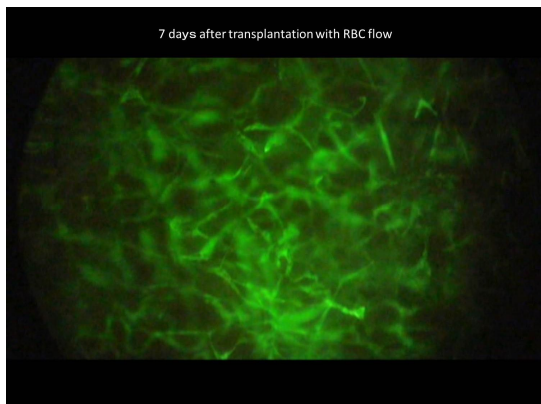
#### 4. 研究成果

(1) 主幹動脈の狭窄・閉塞によって生じた虚血に対して、血管新生を惹起・促進することで血流改善を図り、脳梗塞を予防する治療法が試みられている。われわれは、虚血部の脳表を被覆する人工血管シートを作成し、人工的に側副血行路を形成、その後には作成した中大脳動脈による脳梗塞が縮小する効果を見た。

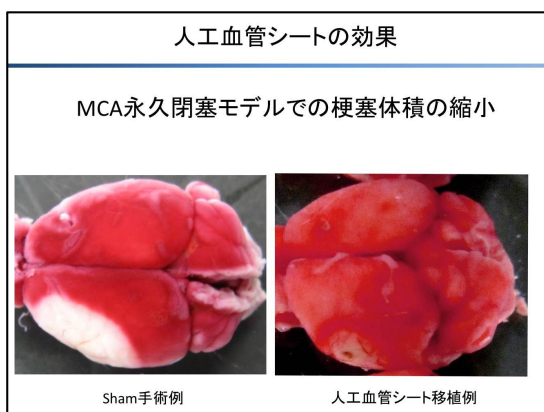


(2) 作成には移植細胞の拒絶が起きないように、免疫不全マウス (severe combined immunodeficient (SCID) mouse) を用いた。あらかじめコラーゲンの中に GFP でラベルしたヒト脳微小血管内皮細胞および間質前駆細胞 10T1/2 を撒き込みディッシュ上で膜状に

し、人工血管シートの準備をした。マウスの頭頂骨を開窓し硬膜を切除したうえで軟膜の上に、人工血管シートを載せさらに観察用の頭窓を装着して開窓部を閉鎖した。



(3)この状態で経時的に血管新生を観察すると、3日目には内皮細胞は互いに連結しあい血管系の基礎が形成された。さらに5日目には血管に管腔構造が認められ、7日目には人工血管内に血流が認められた。血流の確認には、赤血球をラベルして血球成分の通過を確認する方法、さらに rhodamine-dextran にて血漿成分をラベルして人工血管内が染色される方法の2通りで確認できた。その上で、田村法により中大脳動脈を永久結紮したところ、脳梗塞巣は著明に縮小した。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

Itoh Y, Toriumi H, Yamada S, Konoeda F, Suzuki N. Cilostazol suppresses leukocyte rolling and adhesion on cerebral microvessels after ischemia/reperfusion. *Microvascular Reviews and Communications*. 査読あり、5(1), 2012, 2-8

伊藤義彰、黒井俊哉、鳥海春樹、海老根妙子、畝川美悠紀、山田哲、此枝史恵、鈴木則宏. 虚血組織に対する治療的血管新生. 脳

循環代謝、査読なし、23, 2012, 90-94

Guo H, Itoh Y, Toriumi H, Yamada S, Tomita Y, Hoshino H, Suzuki N. Capillary remodeling and collateral growth without angiogenesis after unilateral common carotid artery occlusion in mice. *Microcirculation*. 査読あり、18(3), 2011, 221-7

Itoh Y, Toriumi H, Yamada S, Hoshino H, Suzuki N. Astrocytes and pericytes cooperatively maintain a capillary-like structure composed of endothelial cells on gel matrix. *Brain Res* 査読あり、1406, 2011, 74-83

〔学会発表〕(計6件)

伊藤義彰、脳小血管病における neurovascular unit の障害. 第53回日本神経学会学術大会、2012年5月23日、東京

伊藤義彰、虚血組織に対する治療的血管新生. 第23回日本脳循環代謝学会. 2011年11月2日、東京

〔図書〕(計10件)

伊藤義彰、中外医学社、「炎症性プラークのイメージング」Annual Review 神経、2013、144-149

伊藤義彰、中外医学社、脳卒中診療こんなときどうする Q&A 第二版、2011年、336-340

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 義彰 (ITOH, Yoshiaki)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：90265786

(2)研究分担者

畝川 美悠紀 (UNEKAWA, Miyuki)  
慶應義塾大学・医学部・特任助教  
研究者番号：10548481

星野 晴彦 (Hoshino, Haruhiko)  
慶應義塾大学・医学部・講師(非常勤)  
研究者番号：50407110

(3)連携研究者

なし