

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：34416

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791594

研究課題名（和文）デバイスを用いた治療と再生医療の融合－白金コイルによる脳動脈瘤治療をモデルに－

研究課題名（英文）Integration of a treatment with a device and regenerative medicine - an treatment of brain aneurysm with platinum coils is presented as an example -

研究代表者

戸田 満秋 (TODA Mitsuaki)

関西大学・化学生命工学部・特別任用助教

研究者番号：50588267

## 研究成果の概要（和文）：

これまでに細胞増殖因子などのタンパクを付着させたコイルが再開通防止に有効であるとの報告があるが、これらのコイルでは滅菌が困難であり保存安定性についても難点が多く、認可に多くの困難が伴うと考えられる。本課題では DES の成功例に倣い既に治療に多く使われてきた低分子薬物と従来のコイルを複合化した新規脳動脈瘤治療用デバイスの開発を行い、当該デバイスを用いた治療と再生医療の融合を目指した。低分子薬剤として高コレステロール血症の治療薬として用いられているスタチン類を用い、リン脂質からなる脂質層を形成させ、これにスタチン類を含有させ徐々に放出することを試みた。その担持などの評価に、白金モデル表面を用いた蛍光顕微鏡、表面プラズモン共鳴法、表面プラズモン励起蛍光分析による解析を用いることができるか、また血管内皮細胞などの培養細胞を用いた検討が行えるかも試みた。結果それぞれの解析方法を組み合わせることでコイル表面へのスタチン類など低分子薬剤の担持の検討に有益な知見を得られた。以上を組み合わせリン脂質からなる脂質層にスタチン類を含有させたコイルを作成した。上記コイルは動脈瘤塞栓コイルとして高い可能性を有すると期待できる。

## 研究成果の概要（英文）：

It has been reported that embolization coils coated with some kinds of proteins, such as growth factors, are effective in the prevention of recanalization in embolized aneurysms. These coils are, however, difficult to be sterilized and unstable, therefore, not assumed to be approved easily. The aim of this project is integration of a treatment with a device and regenerative medicine via the development of a novel device for a therapy of brain aneurysms which combined conventional embolization coils and low-molecular-weight drugs, following a succeeded example, drug eluting stent. In this project, statins, which were drugs for the treatment of hypercholesterolemia, were selected as low-molecular-weight drugs. Formation of phospholipid layers onto coil surfaces, conjugation of stains into these layers and continuous release of statins from the conjugated layer were tried. The feasibility of analyses using a fluorescent microscope, surface plasmon resonance, surface plasmon field-enhanced fluorescent and cell culture were also assessed. Beneficial information for conjugation and continuous release of statins from the phospholipid layer for was obtained from these assessments and coils containing phospholipid layer conjugated with statins were composed. These coils were expected to have a high potential as embolization coils for aneurysms.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：脳神経外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：生体材料、移植・再生医療、血管内治療デバイス、脳動脈瘤

## 1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤は欧米では70%近く、また我が国でも30%近くは血管内治療で行われている。しかし、手術症例が増えるに従い、コイルコンパクションによる再開通が問題になり、再手術の必要となる症例も少なくない。動脈瘤の再開通を防止できるデバイスの開発が望まれている。

従来、薬とデバイスの複合体の認可を得ることは極めて困難であった。近年、心臓冠状動脈の狭窄の治療でドラッグ・エルーティング・ステント(DES)が劇的に再狭窄率を低下させることから、薬とデバイスの複合体であるDESが認可された。これを機に薬とデバイスの複合体の認可の道が開けた。

現在の埋め込み型医療用デバイスを用いた治療では、人工物がむきだして血液に接していることが多くとても治癒した状態ではない。その端的な例はドラッグ・エルーティング・ステントまた機械的人工弁を埋めた患者は血液凝固を防止するために抗凝固剤や抗血小板薬を一生服用し続ける必要がある。

また、再生医療研究では過去10年以上に亘って多大な研究費が投入されたにもかかわらず、未だ日常医療として定着しておらず、今後も患者数の少ない特殊な疾患にのみ適用されると予想されている。一方で幹細胞と前駆細胞、組織再生機構、組織再生を促進する因子と薬物などの多くの知見の蓄積が行われた。

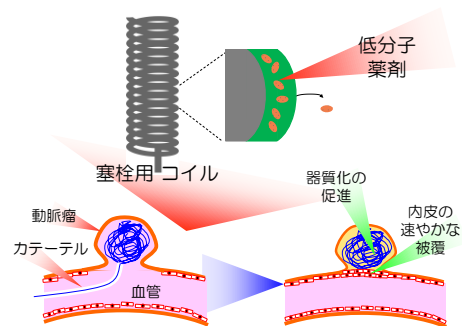
本申請者は生体材料の表面で起こる現象についての研究に注力しながら、その知見や用いてきた手技を応用し、脳神経外科医の研究グループとともに脳血管内治療用デバイスの開発に係わってきた。そこで上記のような動きを受けて、血管内治療後の再開通を防止するドラッグエルーティングコイル(DEC)の開発を考えた。

## 2. 研究の目的

開発目標としているDECの要件は、①動脈瘤の再開通を防止できる。②操作性が従来のコイルと同等。③認可を得ることが出来る可能性が高い。④滅菌可能。⑤保存安定性に優れている等とした。従来から細胞増殖因子などのタンパクを付着させたコイルが再開通防止に有効であるとの報告があるが、タンパクの細胞増殖因子などは滅菌や保存安定性さらに認可のことを考えるとデバイスとの適合性は悪く、そのようなコイルは上記の④と⑤を満たすことが出来ない。DESの成功は既に治療に多く使われてきた低分子薬物

と従来のステントとの複合化により安全性、滅菌可能と保存安定性を担保したことにある。本研究では、DESの成功例に倣い既に治療に多く使われてきた低分子薬物と従来のコイルを複合化することとした。同じ考えは他の医療デバイスにも適用でき、組織再生を促進する薬物との複合化を通じて患者数の多い疾患での再生医療が実現できると考えた。

## 3. 研究の方法



本研究では例題として、白金コイルと薬物を組み合わせることで、動脈瘤部位に血管壁の再生と血管内皮層の再生を行うことを目指した。本研究では細胞増殖を誘導する低分子薬剤を用いることを考え、これらの薬物とコイルの複合体を用いてより完全な動脈瘤治療を実現することを目指した。具体的には

- ・動脈瘤内の再開通の予防効果のある薬物の選定
- ・ドラッグエルーティングコイルの試作
- ・ラットを用いたドラッグエルーティングコイルの評価
- ・再開通の予防効果機構の解明

を順次進めてゆき動脈瘤部位に血管壁の再生と血管内皮層の再生をもたらす当該コイルの開発を行うことを企図した。

## 4. 研究成果

### (1) 薬剤の選定

循環器疾患において血管保護作用を示すことが報告されている低分子薬剤を、ラット動脈瘤モデルを用いて検討を行い、担持状態を走査型電子顕微鏡を用いて検討した。

結果、入手性や取り扱いの容易さ、またコスト等を勘案し、本課題においては高コレステロール血症の治療薬として用いられているスタチン類を、コイルに担持する薬剤として用いることが適当であるという結論に至った。

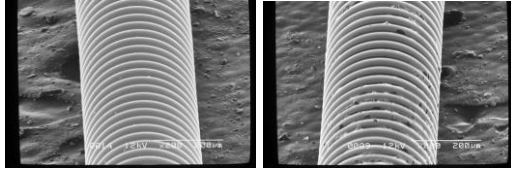


Figure 1. SEM images of uncoated and simvastatin coated coils

## (2) 表面への薬剤担持法の検討

上記薬剤の選定過程において、スタチン類を白金コイル上に塗布しただけでも一定の治癒効果を認めたが、薬物を徐放することによる効果の増強を期待し、薬物のコイル表面担持法について検討を行った。またその際にラット動脈瘤モデル以外の評価法として、蛍光顕微鏡、表面プラズモン共鳴法、表面プラズモン励起蛍光分析による解析を試みた。

本課題ではスタチン類をリン脂質に含有させ、表面に担持させる方法を試みた。まず白金コイルのモデル表面としてガラス基板を用い、蛍光物質で標識されたリン脂質を用いて、リンカー分子の有無によって表面に担持させるかを検討した。結果リンカーを用いない場合は脂質の蛍光は検出されるが、人為的に退色させた部位を作成したところ 10 分程度で退色部位の蛍光が回復し、脂質膜がモデル基板上で流動していることを示す結果がえられ、既報の内容と一致した。一方リンカーを用いて表面に担持せしめたリン脂質はリンカーを用いない場合に比べ検出された蛍光も強く、人為的に退色させた部位を作成し、退色部位の蛍光が回復過程を観察したところ、蛍光強度が回復しないことが確認できた。これはリンカーを用いてリン脂質を表

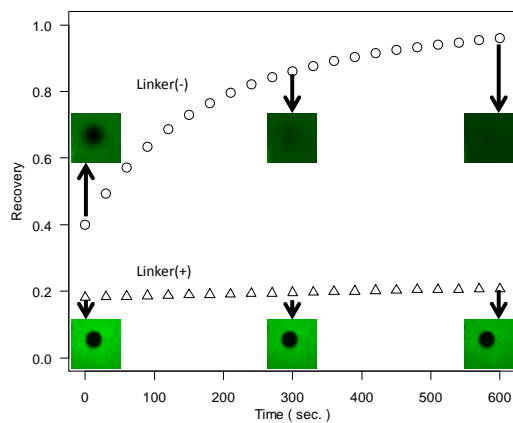


Figure 2. Recoveries of fluorescent intensities after photobleaching and representative time-lapse images around a photobleaching spot.

面に固定することにより、流動性の脂質膜になっていないことを示唆し、この方法でのリン脂質の表面担持がコイル表面での薬物担

持とそこからの徐放に有用であることが示唆された。

また蛍光標識されていないリン脂質に蛍光物質を含む水溶液を含有させ、表面での蛍光物質の存在状態と表面プラズモン励起蛍光分析装置にて検討した。結果リンカーを用いて蛍光物質を含む水溶液を浸したリン脂質を表面に担持せしめた場合蛍光物質が表面に存在することを示す強いシグナルが得られたが、リンカーを用いない場合は検出器の感度を上げてバックグラウンドシグナル以上のシグナルが検出されなかった。

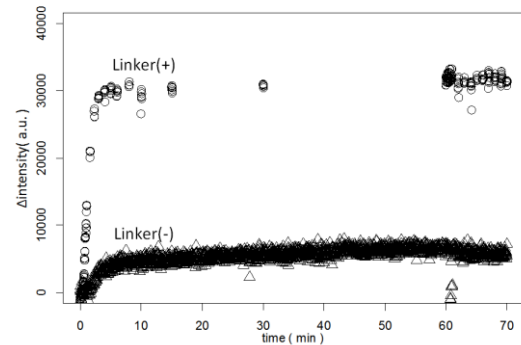


Figure 3. SPFS sensorgrams ( fluorescent intensities ) immobilizing fluorescent dye-containing phospholipid with or without a linker on a sensor chip.

以上の方法からラット脳動脈瘤モデル以外の手法を用いて低分子薬剤の担持が可能であることを示した。

## (3) リン脂質膜からのスタチン類放出の検討

次にスタチン類の溶液をリン脂質に担持させ、一定時間 PBS 内でインキュベートののち、PBS 側に放出されたスタチン類の濃度を HPLC を用いて測定することで、スタチン類含有リン脂質からのスタチン類の放出挙動を検討した。結果、リン脂質からスタチン類が 150 時間程度まで徐放されていることが確認

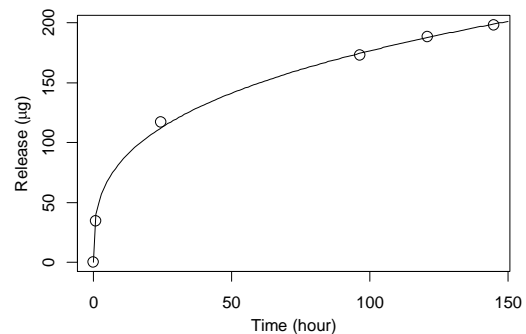


Figure 4. Release profile of pitavastatin from phospholipid.

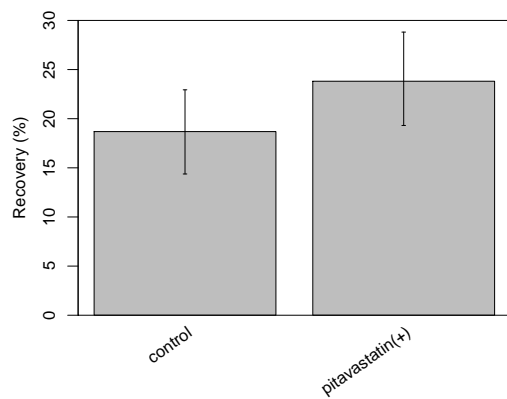


Figure 5. Rate of recovery of HBVSMC cell to a scratched area.

できた。

#### (4) 培養細胞を用いた評価

また培養細胞である HBVSMC を用いて、人為的に培養細胞接着面を擦過し、スタチンの有無によって擦過面への細胞移動が促進されるかどうかの検討を行った。結果血中での最高濃度程度までスタチンを添加すると、HBVSMC の擦過部への移動が若干促進されることがわかった。

以上まとめるとリン脂質とリンカーを用いてコイル表面上にスタチン類を担持できることを示し、それらの担持の評価にラット系動脈瘤モデル以外の手法を用いることができた。またスタチン類を担持させたコイルはラット系動脈瘤モデルによりモデル動脈瘤閉塞に良好な結果がえられ、本方法は動脈瘤塞栓コイルとして高い可能性を有すると期待できる。

#### 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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① TODA Mitsuaki, et. al., “Prototype of a surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy apparatus with a condensed optical system”, 5th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2012), 2012/03/16, 愛知県名古屋市
- ② TODA Mitsuaki, et. al., “Quantitative Measurement of Alpha-Fetoprotein and Prostate Specific Antigen using Surface Plasmon Field Enhanced Fluorescence Spectroscopy”, 3rd Asian Biomaterials Congress, 2011/09/17, Busan, Korea.
- ③ 戸田 満秋 他, “表面プラズモン場励起蛍光法を用いたバイオマーカーの高感度検出の試み”, 第 21 回バイオ・高分子シンポジウム, 2011 年 7 月 26 日, 大阪府吹

田市.

- ④ 戸田 満秋 他, “集光光路を用いた表面プラズモン励起蛍光装置による $\alpha$ -フェトプロテインの高感度計測の試み”, 第 60 回高分子学会年次大会, 2011 年 5 月 26 日, 大阪府大阪市.

[図書] (計 0 件)

[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

戸田 満秋 (TODA Mitsuaki)

関西大学・化学生命工学部・特別任用助教

研究者番号: 50588267

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし