

令和元年9月11日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10731

研究課題名(和文) スtent留置後血管に対する骨髄幹細胞移植による内膜新生メカニズムの解析

研究課題名(英文) Prevention of neointimal hyperplasia induced by an endovascular stent via intravenous infusion of mesenchymal stem cells

研究代表者

小松 克也 (Katsuya, Komatsu)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60749498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ステント留置(carotid artery stenting: CAS)後の再狭窄はステントstrutにおける炎症反応により惹起される内皮の過形成が原因と考えられ、脳梗塞再発の原因となる。一方、我々はこれまでに脳梗塞などの動物実験モデルに対する骨髄間葉系幹細胞の静脈内投与の治療効果を報告してきた。本研究では、実験動物にステント留置術を行い、内膜損傷モデルを作製した後に、骨髄間葉系幹細胞を経静脈的に投与し、血管内膜の状態を種々の方法で解析した結果、骨髄間葉系幹細胞の投与により、ステントstrutに対する炎症反応を抑制されることにより内膜の過形成が抑制されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の脳血管内治療は脳血管障害に対する重要で低侵襲な治療法としての立場を確立してきた。しかし、頸動脈ステント留置術や経皮的血管形成術・ステント留置術におけるステントの再狭窄は脳卒中の再発のリスクファクターの一つとして知られている。本研究では、骨髄間葉系幹細胞の経静脈的投与によるステントstrutに対する炎症反応を抑えることにより内膜の過形成が抑制されることを示した。以上より、骨髄間葉系幹細胞による治療法により、ステント留置術後の脳血管障害の再発を抑えることが可能となることが示唆されたことは、脳血管障害の多い本邦において、社会的意義が高いものと思われる。

研究成果の概要(英文)：In-stent restenosis causes recurrent ischemic events. Neointimal hyperplasia induced by an inflammatory response to the stent strut may be a possible mechanism of in-stent restenosis. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells (MSCs) has been reported to show therapeutic efficacy for cerebral stroke presumably by an anti-inflammatory effect. This study aimed to determine whether MSCs can reduce or prevent neointimal hyperplasia induced by an endovascular stent. We deployed two types of stents using an animal model. Stents were implanted in the common carotid artery (CCA), and superficial cervical artery (SCA). Infused MSC immediately after deployment of stents prevented in-stent stenosis of CCA and SCA. Intravenous infusion of MSCs inhibited the inflammatory reaction to an implanted stent strut, and prevented progressive neointimal hyperplasia in the stented CCA and SCA. Thus, MSC treatment could attenuate the recurrence of cerebral ischemic events after stenting.

研究分野：脳血管障害学

キーワード：再生医療 骨髄幹細胞 頸動脈損傷 血管内膜増殖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の脳血管内治療の進歩に伴い、急性期の再開通療法の再開通率は 80-90%にまで上昇している(ISC2015)。さらに、protection device による遠位塞栓の予防法を併用した頸動脈ステント留置術(carotid artery stenting: CAS)の短期および長期治療効果および安全性の証明を受けて、内頸動脈狭窄症に対する CAS の重要性はますます高まっている(脳卒中治療ガイドライン 2015)。

一方、我々は、今までに脳梗塞などの動物実験モデルに対する骨髄幹細胞の静脈からの全身投与が治療効果を有することを報告してきた。治療発現のメカニズムとして、移植細胞による神経栄養因子を介した神経栄養・保護作用、サイトカインによる抗炎症作用、脱髄軸索の再有髄化、損傷軸索の再生、軸索の Sprouting、血管新生、神経系細胞への分化、免疫調節作用などが多段階に作用することが判明している。さらに、脳梗塞においては、ヒトを対象とした臨床試験(脳梗塞 12 症例へ自己骨髄幹細胞の静脈内移植)の良好な結果を踏まえて、現在、札幌医科大学では、脳梗塞に対する医師主導治験(Phase III)を行っている。

一般に留置されたステントの内壁は 3 カ月間で内膜が形成するとされており、その期間中、抗血小板の内服を必要とする。また、ステントを留置された一部の症例は、ステント内血栓症や再狭窄を生じるため、臨床的に問題となっている。ステント内血栓症とは、留置したステントに血栓化が惹起され、頸動脈の閉塞、または、血栓性の塞栓症を引き起こし、脳梗塞の発症など重大な転帰をたどることがある。また、再狭窄をきたす症例では、ステント留置術により内膜と中膜の亀裂、解離が生じ、中膜の弾性線維、平滑筋細胞が伸展することにより、炎症反応を惹起させ、新生内膜形成を誘導されるが、その内膜新生が過剰に起こり、ステント内再狭窄が発症すると考えられている。これらのステント内血栓および再狭窄に対して、抗血小板療法では予防できない症例が少なからず存在する。

本研究では、ステント留置術を施行した内膜損傷動物モデルに対して、骨髄幹細胞移植を行い、ステント内膜形成に及ぼす影響に関する詳細に解明することを目的とした。

2. 研究の目的

ステント留置術を施行した内膜損傷動物モデルに対して、骨髄幹細胞移植を行い、ステント内膜形成に及ぼす影響に関する詳細に解明すること

3. 研究の方法

ミニブタ動脈内膜損傷モデルに対してステント留置術を施行し、その後に骨髄幹細胞(MSC)を経静脈的に移植する。いくつかの観察タイムポイントを設定し、血管造影検査、血管内超音波検査(IVUS)、組織学的に経静脈骨髄幹細胞移植後に生じるステント内膜における新生内膜形成の過程を解析した。

Göttingen Minipig (weight 30-38kg) に対して、全身麻酔導入後にステント留置術を施行した。ステント留置術の 1 週間前からアスピリン 100mg/日、ランソプラゾール 15mg/日(プロトンポンプ阻害薬)を経口投与した。全身麻酔導入後にブタ総頸動脈(CCA)には 5mm のバルーンカテーテルを拡張させ内膜損傷を加えた後に 10x24mm Carotid WALLSTENT®を留置し、ヒト総頸動脈ステントモデルを想定した。同時にブタ浅頸動脈(SCA)には 3mm のバルーンカテーテルを用いて内膜損傷を加えた後に 3.0x23mm MULTI-LINK8®を留置し、ヒト中大脳動脈ステントモデルを想定した。いずれもバルーンカテーテルによる後拡張を実施し、IVUS を用いて拡張が完全であることを確認した。ステント留置術後 2 週間目に血管撮影と IVUS による評価を行い、ヒト骨髄間葉系幹細胞投与群(MSC 投与群)と MSC なしの培養液のみを投与するプラセボ群とに無作為に分け、静脈より経静脈投与を行った。免疫抑制剤であるシクロスポリン A (10mg/kg) は MSC あるいはプラセボ投与前日から経口投与した。MSC 投与あるいはプラセボ投与後、1 日目、7 日目、28 日目に血管撮影および IVUS による評価を行った。2 群間のステント内新生内膜形成の程度について比較検討し、MSC 移植によるステント内膜過形成に対する抑制効果を検討した(図 1)。

1.1 血管造影検査: ステント留置後、全身麻酔下に血管造影を行い、血栓の有無、ステント内狭窄の進行程度の評価を行った。

1.2 組織学的解析: ステント留置から 35 日後にミニブタを還流固定したのちに、ステント留置を行った血管と対側の総頸動脈(対照群)を摘出し組織切片を作成した。

1.2.1 HE 染色: 新生内膜面積を評価し、骨髄幹細胞の内膜新生に与える影響を評価した。

1.2.2 免疫組織学的解析: ステント留置により生じた内膜損傷により惹起された炎症に関するマクロファージ等の細胞浸潤の程度と密度とを炎症スコアを用いて評価し定量化を行った。

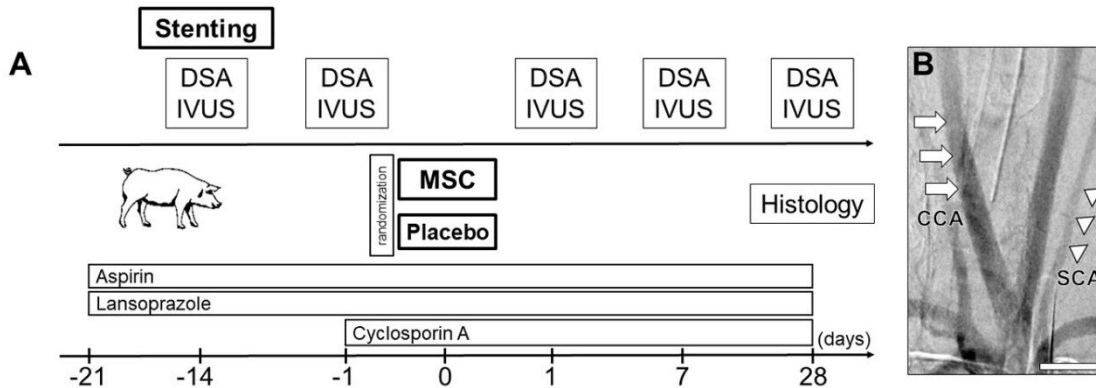


図1：実験プロトコル (A) およびステント留置血管 (B) CCA：総頸動脈、SCA：浅頸動脈 (Nakazaki et al, J Neurosurg, in press)

4. 研究成果

本研究において、使用されたミニブタにはステント留置に伴う有害事象やヒト間葉系幹細胞投与に伴う有害事象はなく、安全性が示された。

血管撮影所見

ステント留置前、MSC 投与群とプラセボ投与群の CCA および SCA の血管径に差はなかった (CCA; MSC : 4.96 ± 0.33 mm、プラセボ : 4.82 ± 0.08 mm、 $p=0.699$ 、SCA; MSC : 2.68 ± 0.16 mm、プラセボ : 2.83 ± 0.38 mm、 $p=0.424$)。MSC 投与あるいはプラセボ投与直前 (ステント留置から 14 日後) についても CCA および SCA の狭窄率に差はなかった (CCA; MSC : $8.8 \pm 1.7\%$ 、プラセボ : $8.4 \pm 3.7\%$ 、 $p=0.878$ 、SCA; MSC : $6.8 \pm 2.7\%$ 、プラセボ : $6.8 \pm 2.0\%$ 、 $p=0.995$)。MSC 投与またはプラセボ投与 7 日目には、両群で狭窄率の進行が認められた。投与 28 日後にプラセボ投与群に比して MSC 投与群において、狭窄率は低かった。(CCA; MSC : $24.6 \pm 2.7\%$ 、プラセボ : $35.9 \pm 8.0\%$ 、 $p=0.028$ 、SCA; MSC : $16.8 \pm 4.2\%$ 、プラセボ : $24.2 \pm 3.7\%$ 、 $p=0.044$)。以上の血管撮影の分析により MSC の静脈内投与により CCA および SCA へのステント留置により誘発される新生内膜過形成が抑制されることが明らかになった。

血管内超音波検査 (IVUS) 所見

MSC 投与またはプラセボ投与の直前に実施した IVUS では、各群の狭窄率に差はなかった (CCA; MSC : $9.0 \pm 2.7\%$ 、プラセボ : $8.8 \pm 2.1\%$ 、 $p=0.892$ 、SCA; MSC : $7.4 \pm 2.2\%$ 、プラセボ : $7.0 \pm 2.2\%$ 、 $p=0.857$)。MSC 投与またはプラセボ投与から 7 日目に両群で狭窄率の進行を認めたが、両群間に差はなかった。投与 28 日目にはプラセボ投与群に比して MSC 投与群において、狭窄率は低かった。(CCA; MSC : $18.7 \pm 4.1\%$ 、プラセボ : $27.6 \pm 6.1\%$ 、 $p=0.042$ 、SCA; MSC : $12.0 \pm 3.2\%$ 、プラセボ : $19.0 \pm 3.3\%$ 、 $p=0.025$)。以上の IVUS 所見の分析でも同様に、MSC の静脈内投与により CCA および SCA へのステント留置により誘発される新生内膜過形成が抑制されることが明らかになった。

組織学的所見 (H-E 染色)

ステント留置を行っていない対側から採取された CCA (対照群) においては、MSC 投与群およびプラセボ投与群のいずれにおいても新生内膜過形成はなかった。ステント留置を行った CCA および SCA において、MSC 投与群ではプラセボ投与群に比して新生内膜の過形成は抑制されていた (CCA; MSC : $38.0 \pm 3.8\%$ 、プラセボ : $49.4 \pm 10.3\%$ 、 $p=0.048$ 、SCA; MSC : $33.1 \pm 4.3\%$ 、プラセボ : $49.4 \pm 9.3\%$ 、 $p=0.010$) (図 2)。炎症細胞浸潤の評価ではステント留置を行っていない対側から採取された CCA には両群ともに炎症細胞は観察されなかった。ステント留置を行ったプラセボ群においては、ステントストラット周囲に多数の炎症細胞浸潤が認められ、MSC 投与群においては少なかった。炎症スコアを用いて定量化すると、MSC 投与群ではプラセボ投与群に比して有意に炎症スコアが低値であった (CCA; MSC : 1.39 ± 0.14 、プラセボ : 1.83 ± 0.18 、 $p=0.002$ 、SCA; MSC : 1.40 ± 0.15 、プラセボ : 1.89 ± 0.22 、 $p=0.005$) (図 3)。これらの所見からステント留置により動脈壁には炎症細胞浸潤が起こること、MSC 投与により炎症細胞浸潤を抑制し、新生内膜過形成およびステント内狭窄を抑制することが明らかになった。

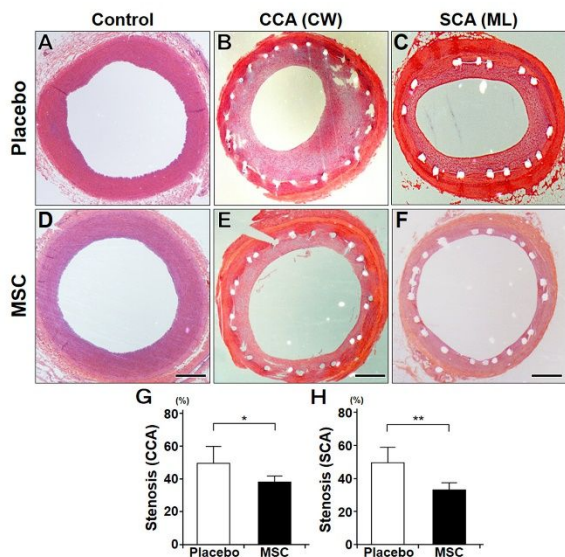


図2
対照血管とステント留置血管の組織所見
プラセボ群 (A, B, C) MSC 群 (D, E, F)
対照血管 (A, D) CCA (B, E) SCA (C, F)
CCA 狭窄率 (G) と SCA 狭窄率 (H)

プラセボ投与群に比して、MSC 投与群では CCA および SCA におけるステント留置部の狭窄率は低下している。

CCA : 総頸動脈、SCA : 浅頸動脈
CW : Carotid WALLSTENT、ML : MULTI-LINK8
(Nakazaki et al, J Neurosurg, in press)

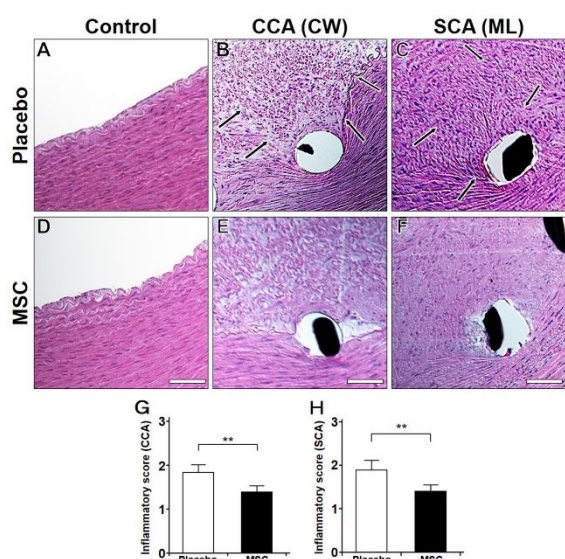


図3
対照血管およびステント留置血管における炎症細胞浸潤
プラセボ群 (A, B, C) MSC 群 (D, E, F)
対照血管 (A, D) CCA (B, E) SCA (C, F)
炎症スコアの比較 (G:CCA, H:SCA)

対照血管には炎症細胞浸潤はなく、プラセボ投与群に比して、MSC 投与群では CCA および SCA におけるステントストラット周囲の炎症細胞浸潤は抑制されている。

CCA : 総頸動脈、SCA : 浅頸動脈
CW : Carotid WALLSTENT、ML : MULTI-LINK8
(Nakazaki et al, J Neurosurg, in press)

これらの結果から頸静脈的に投与された骨髄間葉系幹細胞により、ステント周囲における炎症反応は抑制し、留置されたステント内部への新生内膜過形成が抑制されることが示された。

5 . 主な発表論文等

Masahito Nakazaki, MD, PhD, Shinichi Oka, MD, PhD, Masanori Sasaki, MD, PhD, Yuko Kataoka-Sasaki, MD, PhD, Rie Onodera, PhD, Katsuya Komatsu, MD, PhD, Satoshi Iihoshi, MD, PhD, Manabu Hiroura, Akira Kawaguchi, MD, PhD, Jeffery D. Kocsis, PhD, and Osamu Honmou, MD, PhD, Prevention of neointimal hyperplasia induced by an endovascular stent via intravenous infusion of mesenchymal stem cells. Journal of Neurosurgery, 2019. ahead of print.

〔雑誌論文〕(計 1 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：佐々木 祐典
ローマ字氏名：Masanori Sasaki
所属研究機関名：札幌医科大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号（8桁）：20538136

研究分担者氏名：鱒淵 昌彦
ローマ字氏名：Masahiko Wanibuchi
所属研究機関名：札幌医科大学
部局名：医学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：30343388

研究分担者氏名：三上 毅
ローマ字氏名：Takeshi Mikami
所属研究機関名：札幌医科大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号（8桁）：30372816

研究分担者氏名：飯星 智史
ローマ字氏名：Satoshi Iihoshi
所属研究機関名：札幌医科大学
部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：60457710

研究分担者氏名：三國 信啓

ローマ字氏名：Nobuhiro Mikuni

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：60314217

研究分担者氏名：本望 修

ローマ字氏名：Osamu Honmou

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：90285007

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。