

## 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24年12月10日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591852

研究課題名（和文） 骨髄幹細胞治療の特性を利用した脳動脈瘤に対する血管内治療

研究課題名（英文） Endovascular treatment of experimental aneurysms in swine model by use of mesenchymal stem cells-coated stents.

研究代表者

飯星 智史（IIHOSHI SATOSHI）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60457710

研究成果の概要（和文）：

今回私が行った研究は、現在脳動脈瘤治療の最先端治療としてカテーテルを使用した血管内治療に、骨髄幹細胞研究を合わせた、未来への治療の第1歩となる研究を行った。実臨床の血管内治療で使用するステントにこの骨髄幹細胞を生着させ、ミニブタ脳動脈瘤モデルにおいて治療効果の判定を行った。結果的には優位な効果を認めることはできなかったが、今後の未来への治療としてきわめて重要な1歩を踏み出したと考えている。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to determine whether implanting exogenous mesenchymal stem cells on stents could enhance aneurysmal neck healing. I thought hypotheses included that mesenchymal stem cells-coated stents can improve angiographic and histopathologic results after endovascular treatment.

Mesenchymal stem cells-coated stents were not effective for accelerating organization of the aneurysms cavity and developing neointima after endovascular treatment.

This is a promising novel procedure to repair aneurysm, and may provide a new way to induce plasticity in mesenchymal stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

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：移植再生医療、脳血管内治療、再生医学、神経科学、発生分化

## 1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤患者に対する治療として、従来の外科的クリッピング術などの侵襲的治療ではなく、動脈瘤頸部を血管内より閉塞させるステント治療の開発、また、このステントやコイルに骨髄幹細胞を生着させ、血管内皮細胞を促進、治癒し、脳動脈瘤を根治するのが主目的である。

我々は、これまで脳梗塞治療に対して骨髄

細胞をドナー細胞とした神経再生研究に注目し、基礎的研究成果を数多く報告してきた。また、その中でも特に神経再生作用の強い細胞群（骨髄幹細胞）が、経静脈内投与でも脳梗塞に対して著明な治療効果が認められることを報告してきた。

これらの基礎研究結果に基づき、平成19年1月より、実際に臨床研究を開始した。脳梗塞亜急性期の患者を対象とした自己骨髄

幹細胞の静脈内投与について、安全性と治療効果について検討しているところであるが、現在までのところ、自己の細胞を用いていることもあり、安全性については問題が無く、また、治療効果についても、従来の脳梗塞治療による症状経過と比較して、極めて良いと思われる症例も散見され始めているなどの成果が出ている。

骨髄幹細胞は、既に実用化されている細胞であり、脳神経疾患への応用も強く期待されている細胞である。脳神経疾患に対する骨髄幹細胞 (MSC) の治療メカニズムは幾つか推測されており、我々も基礎研究結果を多数報告している (研究業績を参照)。大きく分けて、①サイトカインによる神経栄養・保護作用、②血管新生作用 (血流の回復)、③神経再生、の3つがある。

これまで当科では脳梗塞治療、脊髄損傷、脳腫瘍などに対してこの骨髄幹細胞をドナー細胞として、良好な結果をえて、また、今後の臨床応用にむけた研究を日々続けている。

## 2. 研究の目的

今回この骨髄幹細胞を使用して、特に②の血管新生作用、血管内膜増殖作用に着目し、脳神経外科疾患の長年の夢である、脳動脈瘤治療根治へ向けた、より低侵襲な治療としての第一歩となるべき研究である。脳動脈瘤は40-50人に1人は持っているといわれ、存在だけでは全く症状はないが、いったん破裂してしまうと重症なクモ膜下出血を引き起こす。このクモ膜下出血の死亡率は40%前後で、後遺症が残存する可能性も極めて高い。よってこのクモ膜下出血を予防し、また未破裂の状態の脳動脈瘤を治療することにより、重症な後遺症や死亡をより少なくすることが、全世界の脳神経外科医の長年の夢であった。この脳動脈瘤に対する治療は開頭クリッピング術が **golden standard** であり、この治療に一石を投じたのが 2002 年に発表された ISAT 報告である。これは血管内よりカテーテルを使用し、動脈瘤内へプラチナコイルを挿入、再破裂を予防する治療で、クリッピング術と比較し、有意に治療成績、患者の予後を改善した。その後日本を含め全世界で、このコイル塞栓術が発展し、現在は脳動脈瘤治療に対するコイル塞栓術は日本では約 30% 前後、欧米では 60% 前後と、低侵襲も相まって増加の一途である。今後さらなる発展を目指し、日々研究、技術の向上が図られている。例えば、さまざまな動脈瘤に対応できるように長さや、大きさの種類があることはもちろんであるが、コイル自体に 3D 形状を施したもの、非常に柔らかく動脈瘤の壁に密着するもの、コイルに血栓誘導を施したもの、など

多岐にわたる。そこで当科で考えたのはこのコイルに骨髄幹細胞を生着させ、この細胞の血管内膜増殖作用を利用して、動脈瘤内に充填されたコイルが早期 (2 週間前後) に血管内膜を形成、正常血管より分離し、脳動脈瘤を根治させる。また動脈瘤内へコイルを充填させず、動脈瘤頸部をステントで覆いかぶせ、正常血管と分離し破裂を予防し、これに血管内膜増殖作用を有した骨髄幹細胞を生着させることで、より早期に血管内膜を形成させ、破裂を予防し、脳動脈瘤を根治させることが目的である。

この研究結果を臨床応用することで、死亡率や後遺症を有する確率が極めて高い、クモ膜下出血患者の治療に一日でも早く、1 人でも多く治療することが、社会的にも求められている。

## 3. 研究の方法

体重30キロ前後のミニブタの総頸動脈分岐部に静脈にてパッチをあてた動脈瘤モデルを作製する。全身麻酔で脳動脈瘤モデルを作製し、大腿動脈経路でカテーテルを挿入し、作製した動脈瘤をコイルを用いて塞栓する。または動脈瘤頸部にステントを留置する。使用するデバイスや方法、器具などは実際の臨床治療で行うものと同様のものを用意する。生着させる細胞は、骨髄由来の骨髄間葉系幹細胞で、あらかじめコイルやステントに浸し、細胞を密着させる。

(1) 上記ミニブタ動脈瘤モデルに対して、骨髄幹細胞コイルによる動脈瘤塞栓術の治療効果を検討

また骨髄幹細胞コイルを用いて、血管内膜増殖効果の判定を通常プラチナコイルと病理学的に比較、検討し、内膜新生時期についても検討する。

(2) 上記ミニブタ動脈瘤モデルに対して、骨髄幹細胞ステントによる動脈瘤頸部留置術の治療効果を検討

骨髄幹細胞ステントを用いて、血管内膜増殖効果の判定を通常ベアステントと病理学的に比較、検討し、内膜新生時期についても検討する。

またステント単独治療群とコイル+ステント治療群でも比較検討し、血管内膜の状態を、病理学的に検討する。

(3) 骨髄幹細胞コイル、ステントの生着数の検討

現在までの予備的動物実験結果より、脳梗塞や脊髄損傷ラットへ骨髄幹細胞の静脈内投与は1,000,000個投与することで、機能の回復が得られることが判明している。現在は、細胞数、投与時期の検討を行い、治療プロトコルの最適化を目指している。今回コイルやステントへ生着させる骨髄幹細胞の血管内膜増殖効果が期待でき

る最適な数や、時期を比較検討し、病理学的検討を行う。

(4) 上記ミニブタ動脈瘤モデルに対して、骨髄幹細胞コイル塞栓術、ステント留置術による動脈瘤破裂予防効果を検討

骨髄幹細胞コイルやステントにて治療を行った動脈瘤の長期の破裂予防効果を比較検討する。また血管内膜新生の効果が破裂予防効果ももたらしているか、比較検討する。

(5) 骨髄幹細胞への血管新生因子 (VEGF, Angiopoietin, PIGF等) の遺伝子導入と治療効果判定

我々は、既に、骨髄幹細胞に対する高率な遺伝子導入系を持っており、幾つかの遺伝子を効率に導入することに成功してきた。すなわち、我々のこれまでの基礎研究より、骨髄幹細胞への遺伝子導入は、通常の adenovirus vector では最高でも 20% 程度しか導入効率は得られないことが判明している。しかし、改変型ファイバーアデノウイルス、すなわち、ファイバーノブに種々のインテグリンと高い結合能をもつ、RGD モチーフを導入した RGD ファイバー改変型アデノウイルスを使用すると、ほぼ 100% の高い導入効率が得られる。RGD ファイバー改変型アデノウイルスは、アデノウイルスの細胞側受容体であるコックサッキー・アデノウイルス受容体 (CAR) の発現低下で、アデノウイルスによる遺伝子導入に抵抗性の細胞でも高い遺伝子導入効率を示す。今回ターゲットとなっている骨髄幹細胞は CAR 発現が低いいため、アデノウイルスによる遺伝子導入に比較的抵抗性であったが、RGD ファイバー改変型アデノウイルスは、野生型に比較し、数十倍、遺伝子導入効率を改善することが判明している。

我々は、同ウイルスベクターを用いて、既に、遺伝子組換え骨髄幹細胞の作成に成功している。すなわち、骨髄幹細胞に BDNF などの神経栄養因子を導入すると、骨髄幹細胞を単独で移植した場合と比較して、著明な神経保護効果が期待できることが判明した (研究業績を参照)。これらの基礎データに基づき、今回は、血管新生因子作用による動脈瘤内膜増殖を期待して VEGF, Angiopoietin, PIGF など高発現する骨髄幹細胞を作成し、治療効果の向上を目指す。

\* 上記の遺伝子組み換え骨髄幹細胞の治療効果は下記のように判定する。

ミニブタ動脈瘤モデルは、前述のように作成し、骨髄幹細胞コイル、ステントを留置する。治療効果の検討は具体的に以下のごとく行う。ドナー細胞を生着させたコイル

やステントを免疫抑制下のミニブタ動脈瘤へ留置し、血管造影を 1 週間に 1 度行い、形態を評価し、1 ヶ月後に病理学的解析を行う。LacZ gene 若しくは Green fluorescence protein gene (GFP) を transfection することによりドナー細胞を遺伝的にマークした後生着させ、宿主血管内皮の組織内でのドナー細胞を同定する。

① 骨髄幹細胞の動脈瘤内皮での生着・分化を組織学的に検討：上記の如く、ドナー細胞を遺伝的にマークし、動脈瘤組織内でのドナー細胞を追跡し、宿主組織内での生着・増殖・分裂・分化・遊走・組織修復を組織学的に解析する。

② 血液内でのサイトカインの上昇を検討：血管新生因子 (VEGF, Angiopoietin, PIGF など) を高発現する骨髄幹細胞を使用した場合、動脈瘤部位および全身血液における同因子の上昇を ELISA により計測すると同時に、免疫組織学的にも検証する。

#### 4. 研究成果

動脈瘤の治療効果を動脈瘤治療 2 週間後に検討したが、血管撮影上は骨髄幹細胞使用による動脈瘤閉塞効果の優位性は認められなかった。しかし、骨髄幹細胞ステント治療群において血管内膜新生が多い傾向にあった。この研究全体においては優位さを認めず、この結果だけでは判定できない要素 (動脈瘤の大きさ、形、塞栓コイルの充填率、骨髄幹細胞の生着数、種類など) が多くあり、今後現在の治療にこの細胞治療を組み合わせる治療法は、患者一人一人へのテーラーメイド治療としてきわめて重要な研究であり、その第 1 歩を踏み出したと考えている。

#### 具体的な研究結果

(1) ミニブタ動脈瘤モデルに対して、骨髄幹細胞コイルによる動脈瘤塞栓術の治療効果を検討

結果：塞栓術治療後 2 週間での治療効果判定では優位な効果は示されなかった。しかし、瘤再発や増大などの有害事象的な現象は全く見られなかった。

(2) ミニブタ動脈瘤モデルに対して、骨髄幹細胞ステントによる動脈瘤頸部留置術の治療効果を検討

結果：塞栓術治療後 2 週間での治療効果判定では、こちらも優位な効果は示されなかった。しかしステント内に増殖する内皮細

胞様の膜が見られ、形成初期の段階である可能性がある。瘤の増大や再発などは見られなかった。

(3) 骨髄幹細胞コイル、ステントの生着数の検討

結果：こちらに関しても生着数に優位さは認められなかった。逆に問題点としてステントやコイルに生着していたがはがれ落ちてしまった可能性も否めないと考えする。

(4) ミニプタ動脈瘤モデルに対して、骨髄幹細胞コイル塞栓術、ステント留置術による動脈瘤破裂予防効果を検討

結果：今回は塞栓治療2週間で検討した。よって2週間の期間において破裂予防効果はあると断言できるが、それ以上の期間は不明である。しかし病理学的結果から推測すると実臨床での治療とほぼ同等かそれ以上の治療効果はあると判断する。

(5) 骨髄幹細胞への血管新生因子 (VEGF, Angiopoietin, PlGF等) の遺伝子導入と治療効果判定

結果：遺伝子導入実験や血管新生因子の測定を解析したが、それによる優位な血管内膜増殖効果、動脈瘤塞栓効果ははっきりと認められるものはなかった。

結果のまとめ

今回は治療2週間のモデル実験が主であったが、通常コイル、ステントと比較し、骨髄幹細胞コイル、ステントによる明らかな動脈瘤塞栓効果を認めてはいない。しかし、実臨床での治療においても2週間で完全塞栓にいたり、血管内膜が新生されるわけではないので、長期的な予後は不明であるが、病理学的には骨髄幹細胞ステント治療群において血管内膜新生が多い傾向が見られた。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯星 智史 (IIHOSHI SATOSHI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60457710

(2) 研究分担者

寶金 清博 (HOUKIN KIYOHIRO)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：90229146

(H21)