

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461105

研究課題名(和文) 内皮前駆細胞を流血中で捕捉・内皮化する新規ステントの開発と臨床応用

研究課題名(英文) Vascular endothelial growth factor-bound stents: application of in situ capture technology of circulating endothelial progenitor cells in porcine coronary model.

研究代表者

山岸 正和 (Yamagishi, Masakazu)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：70393238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：VEGF-固定ステント長期留置モデルにおいて、ステント表面は新生内膜で完全に被覆されていた。また、ステント周囲には炎症細胞はわずか、新規の平滑筋細胞の増殖を認めていることから、血管修復反応は終了していると考えられた。新生内膜の増殖の抑制効果については、既存の薬剤溶出性ステントと比較して新生内膜の増殖は有意に抑制されていた。短期モデルにおいて、ステント表面はすでに新生内膜で被覆されていることが確認された。留置後早期に新生内膜の増殖を認め、抗血小板薬の内服期間の短縮化が期待されると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We developed VEGF-bound stents that may enable selective capture of EPCs followed by rapid endothelialization. Metallic stents were first coated with poly-(ethylene-co-vinyl alcohol), and then chemically bound with either VEGF. These stents were placed in porcine coronary arteries. Stent surface was evaluated by immunohistochemistry and by scanning electron microscope. VEGF-bound stents, small populations of KDR positive cells adhered to the stent struts. After long-term stenting, struts were fully covered with newly regenerated tissue. SEM images showed that the uniform tissue formed on struts was morphologically similar to native endothelium and was continuously connected with adjacent native endothelium. VEGF-bound stents provide highly selective capture of EPCs, followed by rapid formation of intact endothelium tissue at an early period of stenting. These results suggest that VEGF-bound stents could represent a promising therapeutic option for cardiovascular stenting.

研究分野：循環器内科

キーワード：血管内皮前駆細胞 冠動脈ステント 新生内膜

## 1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患の主要治療法としてステントを用いての経皮的冠動脈形成術が広く臨床応用されてきた。この際、血栓形成や新生内膜肥厚による再狭窄を抑制するため、免疫抑制剤 (sirolimus, everolimus) や抗がん剤 (paclitaxel) などの細胞増殖抑制機能を持つ薬剤溶出性ステント (DES) が臨床応用され、一定の成果を挙げているが、

(1) 内皮細胞 (EC) の増殖を過度に抑制するため、ステント表面の新生内膜被覆の遅延が起こり、そのため遅発性血栓形成の危険性が持続する。

(2) 従来の薬剤非溶出性ステントに比し長期の抗血小板剤内服が必要となる。

(3) これに伴うさまざまな事象 (急性血栓症、冠動脈攣縮など) が報告されている。

この際、ステント留置早期に健全な内皮化が起これば、これらの問題が解決される可能性が高いといえる。これを実現するために流血中に存在する極微量の血管内皮前駆細胞 (EPC) を流血下で効率良くステント表面で捕捉し、EC に分化が図られ内皮組織を形成する技術が試みられている。先行する EPC 捕捉を意図したステント技術 (米国: 商業化; J. Am. Coll. Cardiol., 2005) は、ステント表面に CD34 抗体を固定したものであり (EPC は monocyte fraction 中の多数の CD34 抗原表面を有する細胞群の一つ)、留置早期に CD34 陽性細胞で被覆されるが、多数の非 EPC 細胞によるものと推定されている。事実、臨床評価も有意な結果が報告されていない。すなわち、より高い EPC 捕捉選択性を有するステントの開発が望まれてきた。かかる開発研究は欧米では進みつつあり、我が国でも喫緊に取り組むべき課題である。

## 2. 研究の目的

流血中に微量に存在する EPC を冠動脈ステント表面で高効率且つ高選択的に捕捉し、迅速なる冠動脈内皮への分化を誘導し self-endothelialization するステントを開発してきた。

VEGF 固定化による EPC の高選択的 EPC 捕捉技術、持続的細胞内シグナル伝達機構の活性化による分化誘導、流体力学による分化誘導の増強効果が学術的に新しく、独創性がある。また、早期内膜形成によるステントの高い安全性と信頼性を保証し、従来の合併症 (事象) をなくした新しいステントの医療現場への提示が可能となる。

本研究では、(1) 長期留置モデル (ブタ) による新生内膜肥厚の抑制効果、抗血小板投与剤期間の大幅短縮と遅発性血栓抑制の実証、(2) より迅速なる EPC の捕捉および能動的に内膜肥厚を抑制する表面マトリックス層の設計と生体内での有効性の実証、(3) これらを含めて臨床応用への工程を明確にして、新しい概念と技術の優位性による独自のステントを医療に提供することを目的とす

る。

## 3. 研究の方法

ブタ (25 ~ 35kg) の冠動脈に標的ステントを留置し、抗血小板剤 (アスピリン 200mg/日、クロピドグレル 75mg/日) を投与するモデルを用いて、

(1) 新生内膜肥厚 VEGF を材料表面に直接固定したステント (Platform) の長期留置モデルによる新生内膜肥厚の変化を、新生内膜肥厚の程度と新生組織の性状を評価する。

(2) 抗血小板薬の長期投与の問題解決の糸口を探る。具体的には、内皮化が留置早期におこれば抗血小板剤の投与は原理的には必要がなく、潜在する副作用・合併症を大幅に軽減あるいは抑止できることになる。抗血小板剤投与 (投与量と投与期間) のプロトコルをもとに実施し、血栓形成の有無を調べ、投与の早期停止時期を決定する

## 4. 研究成果

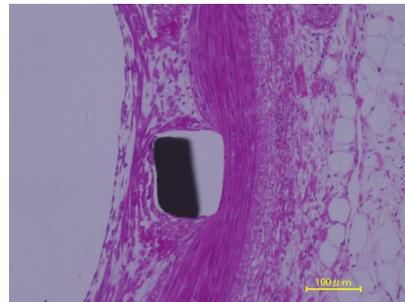


図 1. VEGF - 固定ステント長期留置モデルの HE 染色

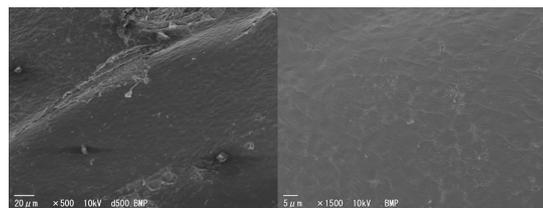


図 2. VEGF - 固定ステント長期留置モデルの走査型電子顕微鏡写真

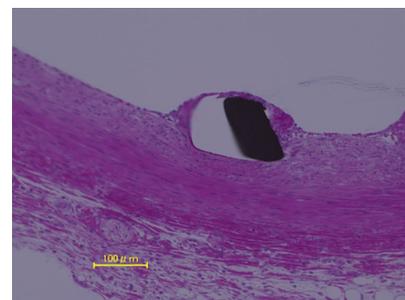


図 3. VEGF - 固定ステント短期留置モデルの HE 染色

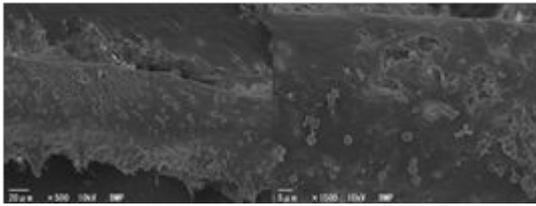


図 4 . VEGF - 固定ステント短期留置モデルの走査型電子顕微鏡写真

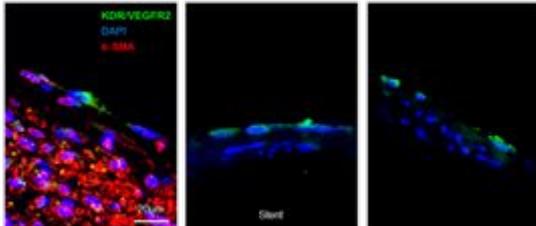


図 5 . VEGF - 固定ステント短期留置モデルの免疫染色 (KDR)

VEGF - 固定ステント長期留置モデルにおいて、ステント表面は新生内膜で完全に被覆されていた(図1)。また、ステント周囲には炎症細胞はわずかで、新規の平滑筋細胞の増殖を認めていることから、血管修復反応は終了していると考えられた。走査型電子顕微鏡で観察すると、その表面は平滑(なめらか)であった。

新生内膜の増殖の抑制効果については、新生内膜の肥厚を既存の薬剤溶出性ステントと比較した。VEGF - 固定ステントにおける新生内膜の肥厚は  $51.4 \pm 4.5 \mu\text{m}$ 、薬剤溶出性ステントにおける新生内膜肥厚は  $76.4 \pm 23.6 \mu\text{m}$  であり、新生内膜肥厚は VEGF - 固定ステントで有意に抑制されていた。

抗血小板薬の投与期間の短縮化については、VEGF - 固定ステント短期留置モデルにおいて検討した。

短期モデル(2日)において、ステント表面はすでに新生内膜で被覆されているのが確認された(図3)。また、走査型電子顕微鏡の観察でも、表面は荒いがステントが新生内膜で被覆されているのが確認された(図4)。免疫染色においても KDR で陽性を認め、新生内皮細胞の存在が確認された(図5)。

ブタにおける血管修復反応は、ヒトのそれと比較すると5~6倍速いと言われている(J Am Coll Cardiol 1994, Catheter Cardiovasc Interv 2001, Circulation 1999)。本研究結果では、ステント留置後2日でステントが新生内膜で被覆されているのが確認され、ヒトの期間に換算すると約2週間と推定された。これらの結果から、抗血小板薬はステント留置1か月で2剤から1剤に減量できると考えた(より安全性を考慮して1か月とした)。

## 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 2 件)

1. Takabatake S, Hayashi K, Nakanishi C, Hao H, Sakata K, Kawashiri MA, Matsuda T, Yamagishi M. Vascular endothelial growth factor-bound stents: application of in situ capture technology of circulating endothelial progenitor cells in porcine coronary model. J Interv Cardiol 2014; 27:63-72. 査読有

2. Tagawa S, Matsuda T, Aomizu T, Kuwana M, Ohtake H, Watanabe G, Yamagishi M. Surface-bound vascular endothelial growth factor promotes prolonged activation of endothelial cells: a new technology for capturing endothelial progenitor cells by intravascular stents. J Tissue Sci Eng. 2014;5:1000140,doi:10.4172/2157-7552.1000140. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Masayuki Mori, Chiaki Nakanishi, Kenji Sakata, Takuya Nakahashi, Jun-ichiro Yokawa, Hirofumi Okada, Shohei Yoshida, Tsuyoshi Yoshimuta, Kenshi Hayashi, Masa-aki Kawashiri, Masakazu Yamagishi. Early Endothelialization of Biolimus A9 with Bioresorbable Polymer Stent (Nobori®) in Porcine Coronary Model. 第 80 回日本循環器学会学術集会、2016 年 3 月 20 日、仙台

2. Masayuki Mori, Takuya Nakahashi, Shu Takabatake, Chiaki Nakanishi, Kenji Sakata, Hirofumi Okada, Shohei Yoshida, Kenshi Hayashi, Tsuyoshi Yoshimuta, Masa-aki Kawashiri, Takehisa Matsuda, Masakazu Yamagishi. Ultra-Early Endothelialization of Biolimus A9 with Bioresorbable Polymer Stent (Nobori®) in Porcine Coronary Model: Possible Mechanism for Low Frequency of In-stent Thrombosis and Restenosis. AHA 2014 年 11 月 17 日、ダラス、アメリカ

〔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:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山岸 正和 (Yamagishi Masakazu)  
金沢大学・医学系・教授  
研究者番号：70393238

### (2) 研究分担者

坂田 憲治 (Sakata Kenji)  
金沢大学・附属病院・講師  
研究者番号：20456411

吉田 昌平 (Yoshida Shohei)  
金沢大学・附属病院・助教  
研究者番号：30623657

森 雅之 (Mori Masayuki)  
金沢大学・附属病院・医員  
研究者番号：30707526

羽尾 裕之 (Hao Hiroyuki)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：40393243

中西 千明 (Nakanishi Chiaki)  
金沢大学・附属病院・助教  
研究者番号：80623660

川尻 剛照 (Kawashiri Masa-aki)  
金沢大学・附属病院・准教授  
研究者番号：90345637

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )