海外留学補助金による研究経過・成果報告書

研究テーマ

血管内皮前駆細胞を塗布した薬剤溶出性ステントの開発

研究背景

経皮的血管形成術やステント留置術は、冠動脈疾患や末梢動脈疾患治療における第一選択として広く普及している。しかしながら、血管に対するバルーン拡張やステント留置は内皮細胞障害および内膜損傷を起こし、炎症が平滑筋細胞の遊走を惹起し、その結果新生内膜過形成が起きてステント留置部に再狭窄を引き起こすことが知られている。薬剤溶出性ステント(Drug-eluting stent: 以降、DES)の登場により、ステント留置後の新生無膜過形成は著しく減少したが、同時にステント留置後の内皮化遅延をも引き起こすことによるステント血栓症が依然として克服すべき課題となっている。この問題を克服する一つの方法として現在臨床的には二剤抗血小板薬の長期投与がなされているが、長期にわたる抗血小板剤は出血性疾患の増加につながり、繰り返す入院や死亡率上昇との強い関連が示唆されている。この問題を解決するために研究が進んでいる生体吸収性ステントも、近年のランダム化試験のメタアナリシスではDESと比較し時間依存性の高い血栓形成が報告されており、有用性を示せていない。このため、ステントの生体適合性を向上させる新たな手法の開発が望まれている。

通常の血管壁において、内皮細胞は一酸化窒素やプロスタサイクリン、ウロキナーゼといった物質を分泌することにより、血栓形成を阻害するとともに平滑筋細胞の増殖や遊走も阻害している。このため、留置後のステント表面に内皮細胞層を再生することは、新生内膜過形成の阻害において重要な役割を担っている。生体内において留置されたステント表面の再内皮化には一定の時間が必要であるが、tissue-engineering技術を用いて細胞をin vitroでステント表面に塗布することが可能であり、この方法を用いることで、留置されたステントの再内皮化を促進することが可能である。過去に通常のステントに対して内皮細胞を塗布した研究はいくつか報告があるが、DESに対して細胞を塗布した研究については現時点で報告がない。

研究目的

本研究の目的は、DESの血栓形成問題を克服するべく、血管内前駆細胞をin vitroで塗布したDESの開発を行うことである。

研究成果

1. 塗布細胞

ステントへの塗布細胞として過去に最も良く使用されているのは成熟血管内皮細胞であるが、ヒト成熟血管内皮細胞を取得するためには動脈ないし静脈を採取する必要があり、患者にとって侵襲性が高い。採取に際する低侵襲性と高い増殖能を有する点において、血管内前駆細胞(endothelial progenitor cell: 以降、EPC)は近年in vitroの内皮化研究に適した新たな資源とみなされている。我々はEPCをヒト末梢血から分離し、実験に必要な細胞数になるまで継代した。(図1) その後、各細胞株に対してフローサイトメトリーを用いた蛍光活性化セルソーティング分析により細胞特性を確認し、本研究に適した後期成長血管内皮前駆細胞(late-outgrowth EPC)であることを確認した。

2. 骨格となるステント

DES から溶出される薬剤は前述の通り、平滑筋細胞の増殖のみならず内皮細胞の増殖をも阻害する性質を有する。このため、骨格となるステントとして一般的な DES を使用した場合、塗布した細胞はステント表面において増殖しないと予想される。この問題を克服するため、我々は反管腔側のみにポリマーなしで薬剤を溶出するデザインのステントを骨格として選択することとした。また素材として生体適合性の高いチタンが含有されたナイチノールを選択し、ステントの種類は臨床的汎用性の高い自己拡張型ステントを使用することとした。

3. ステント拡張条件下での塗布実験

3-1. 方法

繰り返し実験に使用する目的で、DES を 1cm 長ごとに切り分けた。ステント片を細胞接着性の低いシリコンチューブ内に留置し、両端をシリコン栓で塞いだ。その後、栓とチューブの間に鈍針を 2 本留置し、一方から EPC 含有培養液を注入し、他方からチューブ内空気が脱出するようにして細胞をステント片に塗布した。その後ステント入りシリコンチューブを長軸方向に自動回転するバーにくくりつけ、細胞培養器内に留置した。短時間の塗布時間の後、ステントをシリコンチューブから抜き出し、免疫細胞染色のためメタノールで固定した。

3-2. 結果

管腔側、反管腔側の両側に多数の EPC が塗布されたことが確認された。(図 2)

4. In vitro での流速実験

4-1. 方法

生理的なずり応力下におけるステント表面への EPC 接着能を評価するため、手作りの流動循環生体反応システムを作成し、ステント表面への細胞接着能を評価した。(図 3)EPC 塗布ステントは清潔環境下で流動循環生体反応システム内へ留置された。流動循環生体反応システムは内部を血管内皮細胞用の培養液で満たし、標準的設定の細胞培養器内に留置された。回路内は生理的な血圧と同等条件に設定され、流速は生理的なずり応力となるように調整された。流速を 1 時間保った後、ステントを回路から外した。細胞塗布時間が細胞接着能に与える影響を調べる目的で、二つの異なる塗布時間(短時間および長時間)を比較した。

4-2. 結果

塗布時間を長く設定したステントの方が、短く設定したステントに比べて多くの EPC がステント表面に生着していたことが確認された。この結果をうけて、我々は塗布時間を短時間から長時間へと変更した。

5. ステント圧縮条件下での塗布実験

臨床的に使用する状況において、ステントはデリバリーカテーテルシステム内に収納された状態となっている。細胞塗布ステントを標的血管に留置するために、過去の研究ではバルーン拡張型ステントを骨格として用いて、ステント拡張状態において細胞を塗布した後、ステントを圧縮してデリバリーカテーテルシステム内に収納するという方法がとられていた。しかしながらこの方法では、塗布した細胞が収納過程で損傷するため、ステント留置前の内皮細胞層が不完全な状態となってしまう危険性があった。加えてステントを標的血管で拡張させる留置方法では、バルーンによりさらなる塗布細胞損傷が引き起こされることになる。この問題を解決するため、我々は自己拡張型ステントを骨格として選択し、デリバリーカテーテルシステムと同径の血管シース内にステントを収納した状態で細胞を塗布する実験を行うこととした。

5-1. 方法

クリンピングデバイスを用いてステント片を圧縮し、清潔環境下で血管シース内へ収納した。EPC 含有培養液をシースの側孔から注入し、細胞をステントに塗布した。その後ステント入りシースを長軸

方向に自動回転するバーにくくりつけ、細胞培養器内に留置した。長時間に設定した塗布時間の後、ステントをシースから取り出し、免疫細胞染色のためメタノールで固定した。

5-2. 結果

十分な数の塗布細胞がステントの側面および管腔側に生着していた。一方、ステント反管腔側には生着細胞は認められなかった。

現在進行中の研究

6. ステント圧縮条件下での塗布実験

EPC 塗布ステントを標的血管に留置した後、EPC がステント管腔側で成長・分裂して表面を被包化するかどうかを評価するため、現在 tissue-engineering 技術を使って作成した人工グラフト内へ EPC 塗布ステントを留置し、流動循環生体反応システムを用いた生理的血圧・ずり応力環境下におけるステント管腔側を評価する実験が進行している。

7. 血液適合性実験

EPC 塗布ステントの血管内留置後の血液適合性を評価するため、流動循環生体反応システム内培養液における亜硝酸塩を代理マーカーとした一酸化窒素含有量の計測と、走査型電子顕微鏡を用いた血小板接着能評価実験を計画している。

8. 溶出薬剤動態評価実験

細胞塗布工程における溶出薬剤動態を評価するため、培養液内、シース内、塗布ステントに含有される薬剤濃度を、塗布前・塗布後・ステント留置後の三時点で液体クロマトグラフィー質量分析を用いて解析する実験が進行している。

図 1

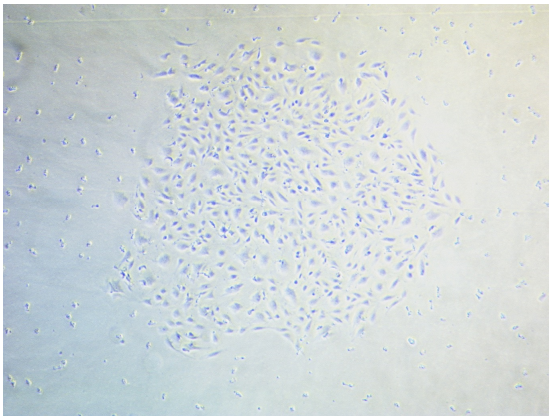


図 2

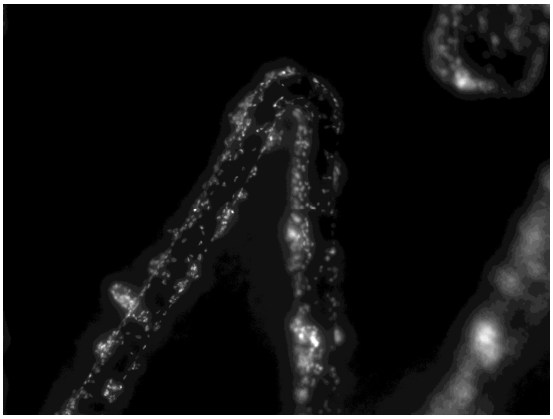
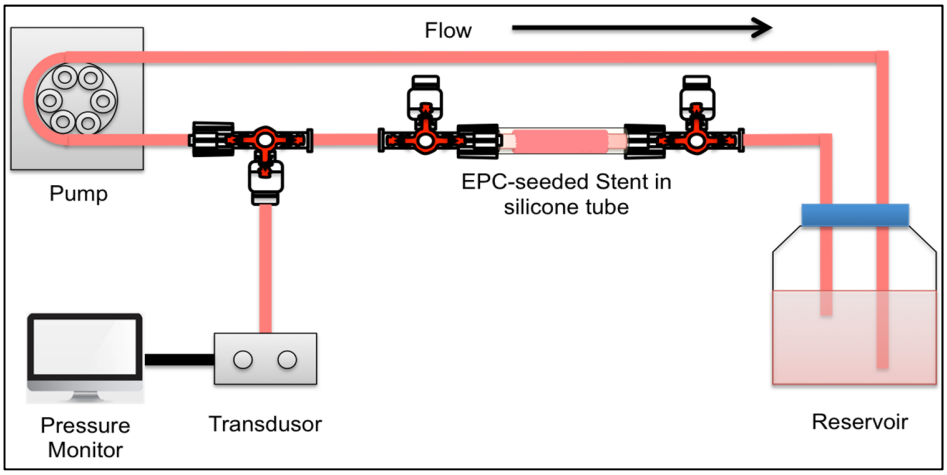


図 3


Flow
Pump
EPC-seeded Stent in
silicone tube
Pressure
Monitor
Transdusor
Reservoir