

## 論文の内容の要旨

論文題目：ステント留置後の血管に対して、皮下脂肪由来幹細胞の投与がもたらす再内皮化の促進効果に関する研究

佐藤 倫彦

<序文>冠動脈形成術における標準的治療法である冠動脈ステント留置術は、非薬剤ステント (bare-metal stent、BMS) において大きな問題であった再狭窄も薬剤溶出性ステント (drug-eluting stent、DES) の登場により解消されつつある。しかし DES にも負の側面があることが問題となっている。免疫抑制剤の効果で新生内膜の増生は抑制されるが、同時に血管内皮細胞の再生も抑制するため、血管内皮細胞層の再生が遅延し、ステント内血栓症のリスクが長期化する。また DES 留置後の冠攣縮という現象も報告されている。これらの DES の負の側面は血管内皮層の修復抑制による再内皮化遅延に端を発していると考えられ、いかに急速にその内皮機能の回復を強化するかという治療戦略が最近注目されるようになってきた。ステントの再内皮化促進を直接狙った抗 CD34 抗体コーティングステントは EPC (endothelial progenitor cell) を捕捉することで再内皮促進を得るもので、治験では血栓症発症は低率であったが、慢性期の新生内膜抑制効果が十分に得られず、その効果は限定的であった。体外から新たな細胞を注入する stem cell 療法は著しい効果をもたらす可能性があり、EPC と BM-MSC (bone marrow-derived mesenchymal stem cell) は循環器分野では閉塞性動脈硬化症や急性心筋梗塞を中心に広く臨床研究がなされ、その効果が確認されつつあるが、これらは大量には入手しにくく、基本的に骨髄穿刺が必要であるという難点がある。脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem cells ; ASC) はそのリソースである皮下脂肪組織が局所麻酔下での脂肪吸引にて採取可能でありこの点で有利である。ASC の表面抗原は 90%以上が BM-MSC に一致し、CD29(+)CD90(+)といった間葉系のマーカーを発現し、CD45(-)CD14(-)であり血球系ではなく、また少なくともラットの ASC は CD34(-)CD31(-)であり血管内皮および EPC とも異なる。ASC が血管新生増強効果をもつことは、マウス下肢虚血モデルやラット心筋梗塞モデルを用いたいくつかの基礎研究によって確認されている。ASC の障害血管への修復効果は動物実験にて頸動脈バルーン障害や大腿動脈ワイヤー障害にて報告されているが、ステント留置血管に対する効果は報告されていない。臨床にておいてより重要なのはステントを留置した場合であり、本実験の目的はまずステント留置血管の修復に対する ASC の効果を検証することである。また虚血による血管新生においては stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) などのケモカインがその効果をもたらすが、血管障害後の修復における ASC の作用メカニズムに関しては現在のところ明らかではない。ASC は EGM-2MV で培養すると Flt-1(+) CXCR4(+)だが CD11b(-)Flk-1(-)となり虚血部位に動員されて血管新生

を促進する hemangioblast に類似した細胞となる。本実験では EGM-2MV で培養した ASC の、ステント留置血管に対する再内皮化促進効果の有無を検討する。またその多量に分泌するアドレノメデュリン (AM) に着目し、AM が再内皮化促進効果をもたらすか否かも検討した。

<方法> 実験動物を用いた実験はすべて東京大学の動物実験規約に則って実施した。

【ASC の採取・培養】 4 週齢の雄 Wistar rat 単径部の皮下脂肪を採取し、コラゲナーゼで結合組織を分解した後に遠心し、沈殿した stromal vascular fraction (SVF) から ASC を採取した。ASC をフィブロネクチンでコートされた温度感受性培養皿上で EGM-2MV を培地として 37°C で培養した。3 週間後に室温に戻すと細胞層が dish からシート状に遊離されるが、その ASC シート塊を 100mm dish で 2 シート分 (細胞数  $4 \times 10^6$  個) をステント留置後のラット大動脈の周囲に留置した。【ラット大動脈へのステント留置】 ステントは BMS として Driver2.25×8mm、DES として Cypher2.5×8mm を使用した。またバルーンは NCTREK2.0×12mm (高耐圧バルーン) を使用した。8~9 週の雄 SD ラット (体重 310-400g) をペントバルビタール 35mg/kg の腹腔内投与にて麻酔し、開腹して両大腿動脈および上腸管膜動脈と右腎動脈の間をクランプした後、腹部大動脈下部を穿刺してバルーンを挿入し、まず内皮細胞層がムラなく剥離されるように腹部大動脈内を前後させながら 12 気圧 30 秒間のバルーン拡張を 3 回行った。次にステントを左腎動脈分岐部の遠位部に 6 気圧で留置、20 秒の拡張を 2 回行った。これによりステントを径 2.0~2.1mm、血管径の約 1.1 倍に拡張して留置した。挿入部位である腹部大動脈下部の血管壁は 9-0 で縫合して閉じた後、ASC シート塊を腹部大動脈周囲の結合組織内に留置して閉腹した。また Adrenomedullin を発現する Adenovirus (Ad-AM) の投与は、ステントを留置後、両側の大動脈と左腎動脈分岐の遠位側をクランプして大動脈内に閉鎖内腔を作成した後、左大腿動脈からチューブ (PE-10) を挿入して左大腿動脈の近位部とともに仮結紮し、Ad-AM を投与力価量が  $1 \times 10^9$  PFU となるように投与した。20 分間クランプしてアデノウイルスを血管壁に感染させた後、左大腿動脈のチューブ挿入部を 9-0 で縫合した。その後 2 週間~4 週間、抗血小板薬 (アスピリン、4mg/day) を飲料水中に溶解して投与しながら通常食にて飼育した。【エバンスブルー染色、再内皮化率の計測】 再内皮化を評価するタイミングにて、ラットを麻酔後、1.5%エバンスブルー1.0ml を尾静脈から注入し、1 時間後に 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行って大動脈を採取し、ステント部を縦に 2 分割してその内腔を撮影した。エバンスブルーにて青染する箇所は内皮細胞の修復していない部分、青染せず白い部分は内皮細胞の修復している部分であり、それぞれの面積を Image J にて計測しステント内の再内皮化率を定量的に算出した。ステントの入った標本の薄切切片作成には、ヒドロキシメタクリレート (HEMA) 樹脂を使用した。組織切片は HE 染色で観察して血管内皮細胞層の有無、新生内膜の肥厚を評価した。また血管内皮細胞の免疫染色はおもに抗 VE カドヘリン抗体を使用し whole mount にて免疫染色を行って評価した。実験における計測値は mean±SD で表記し、連続値の 2 群比較は

Student-Neumann-Keuls test、スコア値の2群比較は Mann-Whitney U test を用い、 $p < 0.05$  にて統計的に有意差ありと判断した。

**<結果>**まずラット大動脈のバルーン障害モデルにてASCシート塊の外膜側投与による再内皮化促進効果を day 7 にて評価した。ASC 群でのバルーン傷害部の再内皮化率は対照群に比べて明らかな改善を認めた ( $0.83 \pm 0.08$  vs.  $0.38 \pm 0.04$ ,  $p < 0.001$ , 各  $n=8$ )。BMS 留置モデルでは、留置後 day 14、day 28 でのステント内の再内皮化率を評価し、day 14 では ASC 投与群が対照群と比較して有意な再内皮化率の促進を認めた ( $0.76 \pm 0.10$  vs.  $0.40 \pm 0.16$ ,  $p < 0.001$ , 各  $n=6$ )。一方で day 28 では対照群でも良好な再内皮化を認めるため有意な群間差は無くなった。DES 留置モデルでも留置後 day 14 と day 28 の再内皮化率を評価し、day 14 にて ASC 群の方が対照群よりも有意に再内皮化率が高かった ( $0.55 \pm 0.15$  vs.  $0.32 \pm 0.11$ ,  $p < 0.05$ , 各  $n=4$ )。しかし BMS 留置時と比べてその効果はやや限定的であり、また day 28 では有意な群間差を認めなかった。またバルーンモデルと BMS 留置モデルの一部の標本にて、抗 VE-Cadherin 抗体で whole mount にて免疫染色を行い、その樹脂包埋切片を検討した。エバンスブルーの不染領域では、組織切片像 (HE 染色) にて回復した内皮細胞層を認め、同部の免疫染色も陽性であり、エバンスブルー染色と組織切片像の対応関係が確認された。また新生内膜抑制効果の有無を BMS 留置後 day 28 のステント切片にて検討、新生内膜 (Intima) と中膜 (Media) の面積比 (I/M 比) を計算し、1 mm 毎の切片の平均値を算出した結果、ASC 投与群にて対照群と比較して有意な新生内膜の抑制を認めた (I/M 比は  $0.41 \pm 0.01$  vs.  $0.54 \pm 0.02$ ,  $p < 0.01$ , 各  $n=4$ )。また ASC 群投与群による抗炎症作用の有無を検討するため、ASC 群、対照群それぞれの day 14 での 1mm 毎の組織切片を顕微鏡にて観察し、stent strut 周囲に浸潤が認められる炎症細胞の数を4段階 (0~3) のスコア値により半定量化した結果、ASC 群における炎症スコア値は対照群に比べて有意な低下を認めた ( $1.10 \pm 0.06$  vs.  $1.58 \pm 0.11$ ,  $p < 0.05$ , 各  $n=4$ )。またアドレノメデュリンの遺伝子を発現する Adenovirus (Ad-AM) を BMS 留置後の血管内腔に投与し、Ad-GFP を投与する群と比較してその効果を検証した結果、Ad-AM 群の day 14 での再内皮化率は Ad-GFP 群に比べて有意に高値であった ( $0.62 \pm 0.10$  vs.  $0.42 \pm 0.06$ ,  $p < 0.05$ , 各  $n=4$ )。

**<考察>**ステント留置による血管障害は、バルーンやワイヤーによる傷害よりも強くかつ持続的である点で本質的に異なっており、ASC がそれに対して修復促進作用をもたらすか否かは不明であったが、本実験により実際に再内皮化の促進効果をもたらすことが示された。また外膜側からの投与で効果を認めたことにより、ASC が血管内皮細胞へ分化して再内皮化を促進したというよりはASCが分泌するサイトカインの効果で再内皮化が促進された可能性が示唆された。これはASCが血管周囲細胞のような間質系細胞に分化して、サイトカインの外分泌によりその効果を発揮するという最近の認識と合致する。また Ad-AM 投与で再内皮化が促進された事より、ASC の効果の少な

くとも一部は AM の作用を介する可能性が考えられた。また DES 留置血管に対しても再内皮化の促進効果を認め、ASC は DES との hybrid therapy 等を考慮できる要件を備えている可能性が示唆された。また本実験では ASC が BMS 留置血管に対して day 14 に抗炎症効果を、day 28 に新生内膜抑制効果をもたらすことが示された。ASC は早期の再内皮化による抗血栓効果のみならず、抗炎症作用などそれ以外の効果も併せもち、効果的な新生内膜抑制効果をもたらさうる可能性が示唆された。

**<結論>**持続性に炎症を惹起するステント留置モデルにおいても、ASC は再内皮化を促進し、さらに新生内膜形成を抑制し、炎症細胞浸潤を抑制した。ASC は局所で血管内皮細胞などの血管を構築する細胞に分化したというよりもサイトカインを分泌してその作用を発揮した可能性が示唆された。また ASC が分泌する様々なサイトカインの中でもアドレノメデュリンの関与が示唆された。ステント留置後に、ASC そのものあるいは ASC が分泌するいくつかのサイトカインを投与することにより、再内皮化と新生内膜形成抑制を同時に促進できる可能性が示唆された。