

- 7) Watanabe T, Kanda K, Yamanami M, Ishibashi-Ueda H, Yaku H, Nakayama Y: Long-term implantation study of biotube-autologous small-caliber vascular graft fabricated by in-body tissue architecture. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 98: 120-126, 2011.
- 8) Nakayama Y, Yamaoka S, Yamanami M, et al. Water-soluble argatroban for antithrombogenic surface coating of tissue-engineered cardiovascular tissues. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 99: 420-430, 2011.
- 9) Nakayama Y, Yahata Y, Yamanami M, et al. A completely autologous valved conduit prepared in the open form of trileaflets (type VI biovalve): mold design and valve function in vitro. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 99: 135-141, 2011.
- 10) Yamanami M, Yahata Y, Nakayama Y, et al. Development of a completely autologous valved conduit with the sinus of Valsalva using in-body tissue architecture technology: a pilot study in pulmonary valve replacement in a beagle model. *Circulation*. 122(11 Suppl): S100-S106, 2010.
- 11) Hayashida K, Kanda K, Nakayama Y, et al. Development of an in vivo tissue-engineered, autologous heart valve (the biovalve): preparation of a prototype model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 134: 152-159, 2007.
- 12) 中山泰秀, 武輪能明, 大家智憲 他, カプセル内視鏡を用いた体内組織形成過程のin situ観察, *人工臓器*. 40: S153, 2011.
- 13) Takewa Y, Nakayama Y, Yamanami M. et al, Successful aortic valve implantation using an in-body tissue-engineered, completely autologous valved conduit (BIOVALVE) in a goat model. *Circulation* 124: A14102, 2011.
- 14) Uechi M, Funayama M, Nakayama Y. et al, Transcatheter implantation of autologous in vivo tissue-engineered, valved stents (BIOVALVED STENTS) in the pulmonary position in a beagle model. *Circulation* 124: A17927, 2011.

Recent Advances

in

Cardiovascular Disease

12 November

Vol. XXXIII

No. 1

循環器病研究の進歩

目次 2012年 第33巻第1号

トピックス	国立循環器病研究センター バイオバンク —未来の医療に不可欠な研究基盤として— 2 植田初江, 宮本恵宏ほか
	早期・探索的臨床試験拠点整備事業について 11 山本晴子
新しい診断・治療法	心房細動患者のための新しい経口抗凝固薬 17 宮本康二, 清水 渉
臨床研究	アドレノメデュリンによる急性心筋梗塞症・ 末梢動脈閉塞症治療 25 安田 聡
	SAMURAI rt-PA Registryに見る わが国の脳梗塞静注血栓溶解療法の現状 31 豊田一則
	ヒートショックと冬季の心原性院外心停止の増加に関して 39 西村邦宏
基礎研究	子どもの心臓収縮と心肥大を調節する 新しい制御蛋白質NCS-1 46 西谷(中村)友重, 若林繁夫
	脱細胞技術による再生型人工血管の開発 56 山岡哲二, 馬原 淳
	脳動脈瘤治療用の多孔化カバーステント開発における 孔設計の重要性 64 中山泰秀, 田地川 勉ほか
	国立循環器病研究センターの再生医療研究の現状に関して 74 山原研一, 中山泰秀ほか
剖検症例報告	心室細動の制御が困難であった骨髄腫に伴う アミロイドーシスの一例 82 松山高明, 植田初江ほか

脳動脈瘤治療用の多孔化カバーステント開発における孔設計の重要性

中山泰秀^{*}, 田地川勉^{*2}, 西 正吾^{*3}

はじめに

Guglielmiの開発した電気脱離型(GDC)をはじめとした各種コイルを塞栓材料として用いる頭蓋内脳動脈瘤に対する血管内治療は、めざましい発展を遂げ、良好な治療成績をあげている。しかしながら、限られた大きさの動脈瘤でさえ完全に閉塞するには高価なコイルを多数必要とし、経済的な負担が莫大となる場合もある。また、コイルを用いた治療は、外科的に処置することが難しい広口径や巨大な脳動脈瘤の治療に難渋しているのが現状である。さらに、塞栓材料が親血管内に逸脱す

ると、血流を妨げ、親血管の閉塞を起こす危険性がある。処置中や術後に血栓閉塞の合併症が起こる可能性や、動脈瘤の不完全な閉塞が動脈瘤の再成長や破裂を引き起こす可能性も指摘されている。加えて、動脈瘤内でのマイクロカテーテル、マイクロガイドワイヤーの操作やコイルの留置は根本的に動脈瘤の破裂のリスクを有している。そのため、より安全かつ確実、さらに経済的な治療法の開発が望まれている。

本稿の前半ではこれまでの脳動脈瘤塞栓治療用の多孔化カバーステントの開発経緯に関して概説し、後半において確実な塞栓効果と薄い新生内膜形成を両立させるための重要課題である孔設計に関して、生体外モデル実験による指針の確立と実証について述べる。

I. カバーステントの開発経緯

1. 研究背景と開発概念

低侵襲で確実に、しかも経済的に巨大な動脈瘤まで塞栓治療できる治療機器としての多孔化カバーステントの開発は、約15年前に著者の中山と西(当時、当センター脳神経外科医長)が先駆的に開始した。当初は頭頸部ないしは心血管系の動脈硬化性狭窄病変に対して血管拡張を目的として行っていた。昨年度から始まった厚生労働省のプロジェクトである早期・探索的臨床試験拠点整備事業において、採択国内5施設のなかで唯一医療機器を取り扱う国立循環器病研究センターで医師主導治験をめざす2つのシーズの1つに選定された。難治性の内頸動脈サイフォン部、椎

Key word

covered stents
micropores
aneurysms
embolization
intimal hyperplasia

Development of microporous covered stents for treating cerebral aneurysms : Micropore designing can control aneurysm embolization and intimal hyperplasia

*Yasuhide Nakayama :

Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部

*²Tsutomu Tajikawa :

Faculty of Engineering Science, Kansai University
関西大学 システム理工学部

*³Shogo Nishi :

Department of Neurosurgery, Sapporo Higashi Tokushukai Hospital
札幌東徳洲会病院 脳神経外科

骨脳底動脈領域の特に広口径動脈瘤を治療対象とする新規デバイスとして、日本ステントテクノロジー株式会社や当センター脳神経外科と共同して商品開発ステージに発展させて研究をさらに加速化させている。

一方、補助デバイスとして、頭蓋内ステントが臨床応用され、コイル治療は広口径動脈瘤への使用も可能となっている。我々のカバーステントの開発概念は、動脈瘤の開口部に頭蓋内ステントを留置するのであれば、フィルムを取り付けたステントを開口部に留置して、開口部にフタをするだけで済むのではとの自然な発想に基づいている。わずか1個のステントを開口部に留置することで、動脈瘤内の血流が親血管から遮断されて瘤内で血栓化が起これ、動脈瘤を閉塞することが可能であると考えた。血管造影においては、カバーステントを留置すると短時間で動脈瘤が描出されなくなり、術者は効果をすぐに実感できる。瘤内の血栓は最終的に器質化され、動脈瘤の再発の危険性はほとんどない。瘤内に人工材料を全く残すことがないため周囲組織への圧迫による影響はなく、塞栓後の瘤自体の自然退縮が期待でき、瘤による圧迫の影響も解消される。これまでの治療法に比べて、瘤自体に触れることなく処置することができ安全性に優れている。患者に優しく、医師にストレスの少ない治療となり得る。

これまでもカバーステントと呼ばれる類似のデバイスが開発されている¹⁾。しかし、単純にステントをフィルムなどで覆うことでは、動脈瘤の開口部を確実にフタができるものの、親血管の血流と接するカバー材の内腔面が血栓によって閉塞する危険性が高く、安全な治療とはなり得ない。異物である人工材料は本質的に血栓性であり、表面処理などで短期的に抗血栓性が得られたとしても、永久埋め込みデバイスに必要な長期的な機能維持を担保することは不可能に近い。血栓性の

フィルム部分をできるだけ少なくする目的で、フタをする部分だけにフィルムを貼った部分カバーステントが開発されているが、開口部への位置合わせが困難であると予想される^{2,3)}。一方、自己組織膜によるカバーステントは生体適合性が高く、自己化には極めて有望であるが、緊急時に対応することはできない⁴⁾。

我々のカバーステントでは、小口径人工血管開発の経験を活かして、「血管再生」をキーワードに、ステント内腔面で新生血管形成を促進化させるために逆転の発想を行った。素人考えでは、カバーフィルムに穴を開けると瘤内へ血流が入り込み、塞栓効果が損なわれると思われるかもしれない。しかし、フィルムに多数の微細孔を設けて、あえて細胞の交通性を持たせる構造学的な挑戦を行った。ステント留置後にはカバーフィルム外周は血管組織と密着しており、血管構成細胞とりわけ抗血栓性のために必須である血管内皮細胞をカバーフィルム内腔面へ早期に誘導することで新生内膜形成が促進され、内膜肥厚を抑制する狙いである。それに伴ってカバー材自体の機械的バリアーに加えて組織化による生物学的バリアーを兼ね備えることができ、塞栓効果がより確実なものとなる。

2. 第一世代

カバー材として、人工心臓などで実績のあった血液適合性が高いエラストマーである、セグメント化ポリウレタンを選択した。開発当初の多孔化カバーステント(図1B)の作製は、先ず精密微細加工性に優れたエキシマレーザー加工によってマイクロ孔を厳密に配置させた多孔質ポリウレタンフィルムを準備し、その断端をバルーン拡張型ステントに顕微鏡下で10.0ナイロン糸にて縫合し、ステント外周に巻き上げる途中でも適時追加縫合を加え、最終的に端々接着によって筒状とす

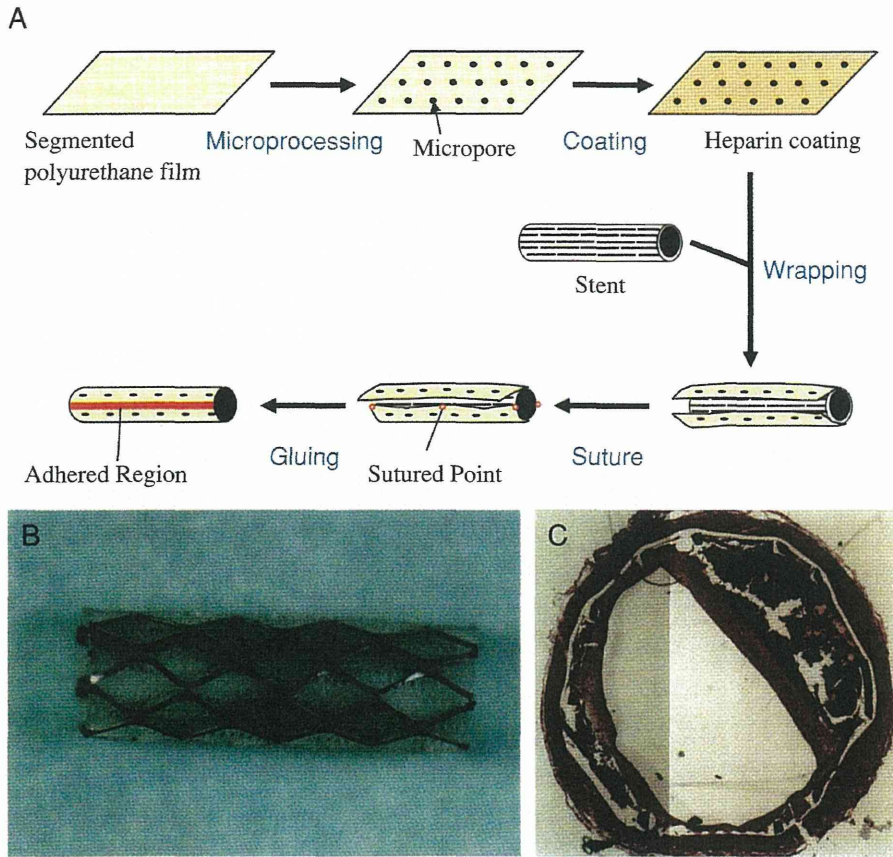


図1. ラッピング法によるカバーステントの作製方法 (A)、得られたカバーステント (B)、円周方向に孔密度を変化させたカバーステントをビーグル犬の頸動脈に留置して形成された新生内膜組織

るラッピング法で行っていた (図1A)^{5~7)}。

円周方向に90度ごとの領域で孔密度を変化させたカバーステントをイヌ血管内に留置すると、孔密度の増加に伴って、内膜肥厚が抑制されることが分かった (図1C)⁸⁾。孔の無い領域では表面は厚い血栓で覆われ、孔密度が低い場合も厚い血栓が形成され、その内面に厚い内膜組織を伴っていた。一方、孔密度が高く、開口面積が広い領域では、薄い新生内膜が形成された。設計時の予想の通り、開口率を高くすることによって薄い新生内膜形成がもたらされることが実証できた。

しかし一方で、カバー材の内腔面に露出す

るステントストラットでの血栓形成や、フィルム端部の接着部における孔の遮蔽など製作上の構造的欠陥が明らかとなり、従来のラッピング法からの抜本的な見直しが必要となった⁹⁾。

3. 第二世代

現在のカバーステントは、作製方法をディッピング法に変更し、現行の商品試作モデルへと引き継がれている (図2A)¹⁰⁾。ディッピング法は、ステントをマウントしたステンレス製のマンドリル棒をポリウレタン溶液に浸漬、乾燥を繰り返し行って製膜するもので、

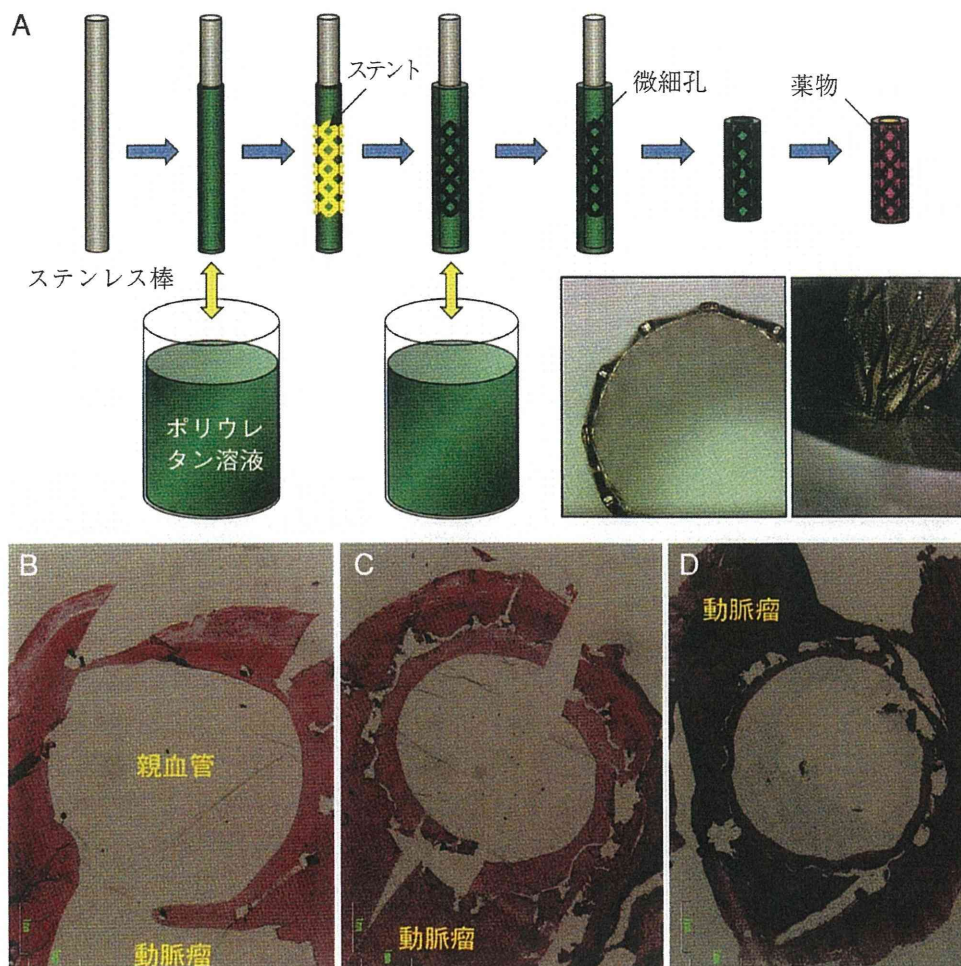


図2. ディッピング法によるカバーステントの作製方法と得られたカバーステントの断面ならびにカテーテルへのマウント過程 (A), ビーグル犬頸動脈に作製した実験的動脈瘤の塞栓状態と内膜肥厚. ベアーステント (B), 開口率12.6%のカバーステント (C), 開口率23.6%のカバーステント (D)

ステントストラットは形成されるポリウレタンカバーフィルム内に完全に埋没され、さらに内腔面は平滑となる利点を有する。この方法は、バルーン拡張型や自己拡張型ステントの双方に対応可能である^{11,12)}。カバーフィルムとステントは完全に一体化しており、デリバリーカテーテルへのマウントによる縮径、留置による拡張を繰り返しても破損することはない。カバーフィルムの内外面には目的に

応じた薬物を固定させることができ、内面に抗血栓性のためにヘパリンやアルガトロパンを外面に内膜増殖の抑制のためにFK506 (免疫抑制剤) やスタチンを配することによって、動脈硬化性動物実験においても内膜肥厚を顕著に抑制できることを報告してきた^{6,7,10,12,13)}。

イヌ頸動脈に対して自家静脈片をパッチとして袋状に縫合することで、実験的に動脈瘤を作製し、自己拡張型の多孔化カバーステン

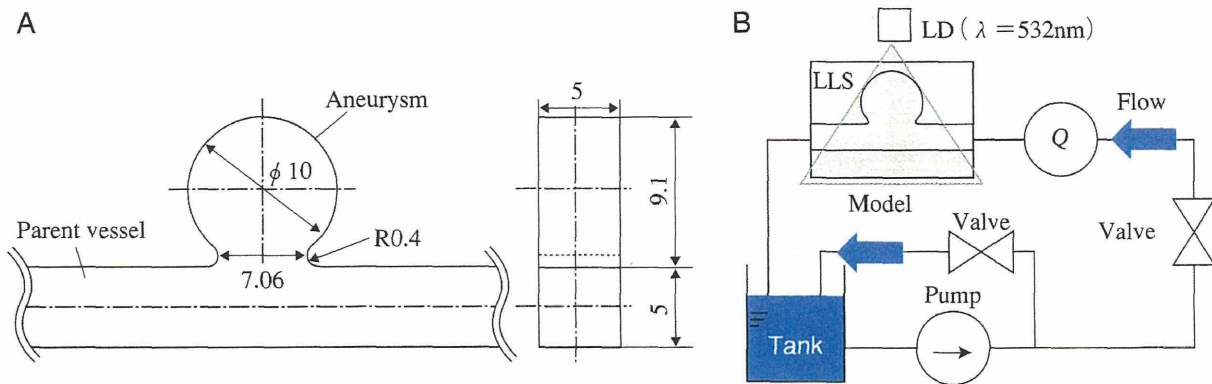


図3. 動脈瘤モデル (A) と生体外模擬実験用の循環回路の概略図 (B)

トの留置による動脈瘤の塞栓効果と内膜肥厚の抑制効果を調べた。ステント単体を留置した場合、動脈瘤の塞栓率は30%程度であったのに対して、カバーステントでは100%全例で直後に塞栓できた(図2B~D)。12カ月後も瘤の再発はなく、瘤内は器質化されていた^{14, 15)}。塞栓効果は開口率の違いで差はなかったが、再生した新生内膜の厚さは開口率が高いほうが有意に薄かった。検討した最大開口率である23.6%において、確実な動脈瘤の塞栓効果と内膜肥厚の抑制効果を認めた。ここで、さらに開口率を増やすことで、より早期の内皮形成による内膜肥厚のさらなる抑制が期待できる。しかし、同時に親血管からの血液流入量の増加によって塞栓性能が低下することが懸念される。従って、カバーステントにおいて、微細孔の大きさと開口率の両者の孔設計が機能発現に最も重要な因子となる。

II. 孔設計のための生体外実験

カバー材に加工する微細孔の孔径と開口率の最適化をめざして、円孔の直径と開口率を系統的に変化させた微細多孔膜モデルを作製し、それを2次元動脈瘤モデルの開口部に設置し、生理的流れ条件下で瘤内流れの可視化

計測を行うことでその留置効果を定量的に調べた¹⁶⁾。

1. 実験条件

本カバーステントの治療対象の血管径は $d = 3 \sim 6\text{mm}$ であり、平均血流量を $Q = 0.1 \sim 0.6\text{L/min}$ 、心拍数を $\text{HR} = 60 \sim 100\text{bpm}$ ($f = 1 \sim 1.67\text{Hz}$)、血液の密度と粘度を $\rho = 1,040\text{kg/m}^3$ 、 $\mu = 4.62\text{mPa} \cdot \text{s}$ (動粘度 $\nu = 4.44\text{mm}^2/\text{s}$)とした。流れの力学的相似則に基づいて親血管における Reynolds 数 ($\text{Re} = Ud/\nu = 4Q/\pi d\nu$) と Womersley 数 ($\alpha = d(2\pi f/\nu)^{0.5}/2$) を、それぞれ求めると、 $\text{Re} = 170 \sim 960$ 、 $\alpha = 1.78 \sim 4.61$ となり、親血管内の流れは層流で準定常流れとみなせることから、同じ Reynolds 数の定常流で再現することとした。

親血管の直径は5mm、瘤はside-wall型とした。瘤の寸法は親血管直径の2倍の直径10mmの球形ドーム型とし、瘤開口部直径を約7mmとした(図3A)。瘤直径とネック幅の比で定義される Aspect ratio (AR)が⁸⁾、破裂の危険性が高まり治療の判断基準である1.6を参考に1.43とし、また瘤赤道面直径と深さの比で定義される Bottleneck ratio (BR)は0.706とした。なお、実際の動脈瘤と親血管の3次元形状では親血管の流れ方向に対して直交す

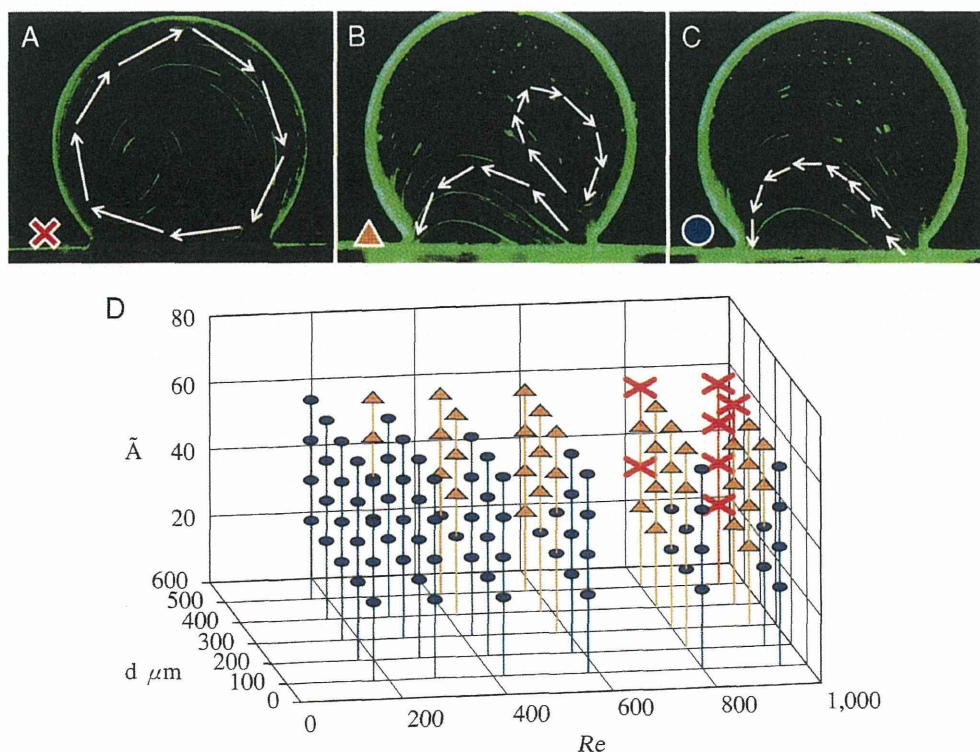


図4. 動脈瘤モデル内の3種類のフローパターン (A～C) とフローパターンマップ (D)

る平面内への速度成分を有する2次流れを伴う複雑な流れになることから、実験モデルでは親血管は直管とし、親血管と瘤はそれらを側面から投影した2次元モデルに単純化した。ただし、親血管モデル内で流れによって生じる圧力損失を実際の血管と一致させるため、親血管と動脈瘤の奥行きは親血管直径と同じ5mmとして両者の水力平均直径を一致させた。

生体外模擬実験用の循環回路は、タンクに貯められた模擬血液 (45wt%グリセリン水溶液、密度 $\rho = 1,090\text{kg/m}^3$ 、動粘度 $\nu = 4.0\text{mm}^2/\text{s}$) を遠心ポンプによって圧送し、バルブと流量計で流量を調整した後親血管モデルに流入させ、その後タンクに戻す閉ループ系とした (図3B)。作動流体中に散乱粒子 (二酸化ケイ素粉末、密度 $\rho = 1,950\text{kg/m}^3$ 、平均粒径 $d =$

$20\mu\text{m}$) を混入しておき、半導体レーザーを光源とした厚さ1mmのレーザーシートを照射することで、動脈瘤モデル内の流れを高輝度化し、側方に設置した高速度カメラで流れの可視化像を撮影した。動脈瘤内の流脈線画像の再構築や、相互相関法による Particle Image Velocimetry (PIV) によって速度ベクトル場とせん断速度分布を求めた。

2. 動脈瘤モデル内のフローパターン

開口率100%のモデルのみでは、瘤内全域にわたる非常に速い旋回流が観察された (図4A)。瘤開口部近傍の流体が親血管内流れの粘性せん断によって誘起され、瘤壁に沿って循環流となった Cavity flow の一種と考えられる (せん断応力誘起型)。一方、孔径が最も小さい $100\mu\text{m}$ 多孔薄膜を留置すると、逆回

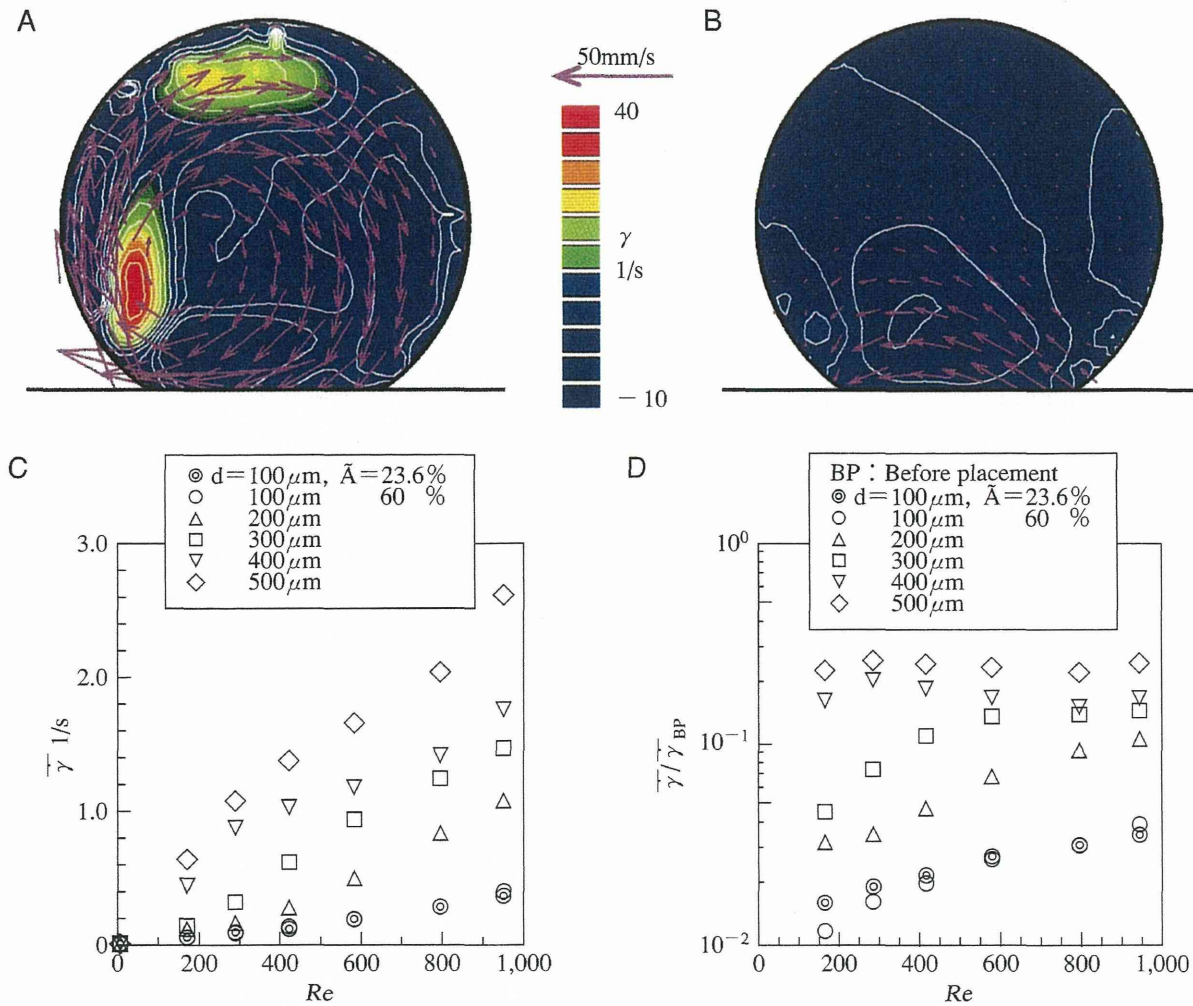


図5. 動脈瘤モデル内の速度ベクトル場から求めた空間分布 (A, B)、瘤内の平均せん断速度と Re との関係 (C)、多孔膜留置前の瘤内平均せん断速度との比 (D)

転で旋回速度の遅い半円状の渦流れが現れた (図4C)。親血管の主流で生じている管摩擦圧力損失と同様に、多孔薄膜で生じた非常に小さな管摩擦圧力差が駆動力となったと考えられる (圧力損失誘起型)。また、孔径を大きくすると、一定の開口率や Reynolds 数において2つの型が共存する3つ目のパターンとなった (遷移型) (図4B)。

すべての孔径 (d μm), 開口率 (\bar{A} %), Reynolds 数 (Re) の組み合わせで起こるフローパ

ターンをまとめた (図4D)。孔径が小さい $100\mu\text{m}$ の場合には、開口率を高くしたり、Reynolds 数を大きくしてもフローパターンはせん断応力誘起型のまま変化がなかった。一方、孔径 $200\mu\text{m}$ 以上の場合、開口率を高くしたり、Reynolds 数を大きくすると徐々にフローパターンに変化を生じるようになり、最大孔径 $500\mu\text{m}$ の場合、せん断応力誘起型から遷移型を経て圧力損失誘起型へのダイナミックなパターン変化を示し、開口率が高い

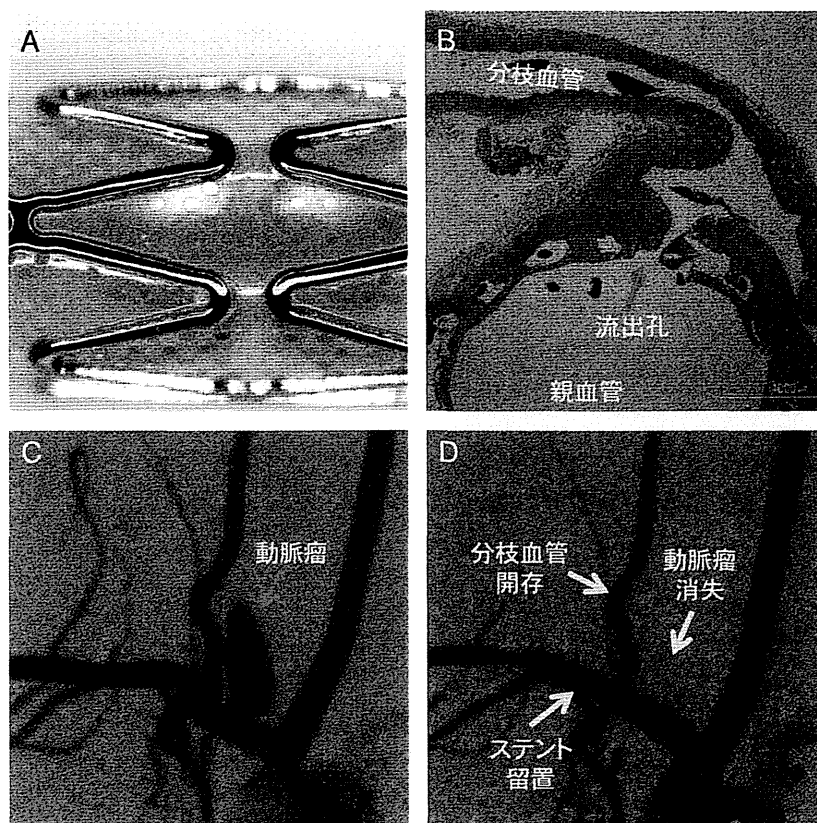


図6. 多孔質カバーステントの商品モデル(A)、ウサギで作製した実験的動脈瘤(C)とカバーステント留置による塞栓治療(D)、ならびに分枝血管の開存(B, D)

とより低い Reynolds 数で遷移に至った。定性的には孔径が小さいほど、開口率が高くても瘤内の流れに変化を及ぼしにくいと言える。

3. 最適孔設計の予測

多孔薄膜留置前には、瘤開口部で瘤内血液が駆動されるため、親血管下流側ネック部近傍で流れが瘤壁に沿って急速に曲げられており、局所的に高い速度、せん断速度を示した(図5A)。一方、留置後は、これらの力学パラメータの分布は親血管上流側ネック部付近で最も大きな値を示したが、明らかにこれらの値が小さくなっていった(図5B)。力学パラ

メータの分布傾向と指示値が多孔薄膜留置前後で大きく変わっていることから、瘤内フローパターンの変化によってある程度、多孔薄膜の留置効果を予測できると考えられた。

各開口率、開口直径の薄膜ごとに瘤内の平均せん断速度を求め、Reynolds 数との関係、ならびに薄膜留置前の動脈瘤内平均せん断速度との比を求めた(図5C)。薄膜の留置によって、動脈瘤内せん断速度を薄膜留置前と比べ1/5以下に抑制でき、孔径が小さいほど抑制効果が高かった。最小孔径 $100\mu\text{m}$ では最大開口率60%でも最小開口率10%とほぼ同様に大きく流れを抑制した。

また、貝原らによる静脈血栓症の発症機構

に関する研究を参考に¹⁷⁾、せん断速度 1/s 以下を瘤内血流が停滞することによって血液が凝固・血栓化するための指標とした。孔径 200 μm 以下の微細孔であれば開口率 60%でも血栓化が期待できるが、孔径が 300 μm 以上と大きい場合には $\text{Re} > 600$ において血栓形成できないことが予測された(図 5D)。動脈瘤内の塞栓には孔径が大きく影響し、孔径 200 μm 以下において、開口率を 60%と大きくしても塞栓治療が可能であることが明らかとなった。孔径はさらに小さくすることで、より確実な塞栓効果が期待でき、大開口率化によって薄い新生内膜形成との両立が実現できると予想される。

最後に

現在、ウサギの右腕頭動脈の総頸動脈分岐部において実験的に総頸動脈瘤を作製し、日本ステントテクノロジー社製のバルーン拡張型カバーステント試作品を第三世代として(図 6A)留置実験を行っている。拡張前の 2mm 径のカバーステントに孔径 100 μm の微細孔を開口率 30%で開け、3mm 径に拡張させて(孔径、開口率ともに約 1.5 倍になる)動脈瘤の開口部に留置しても、直後に瘤内への血流はほぼ停止した(図 6D)¹⁸⁾。生体外実験の指針が実証された。さらに分枝血管の完全な開存も確認でき、頭蓋内穿通枝に対する安全性も確かめることができた(図 6B, D)。2015 年度の医師主導治験の実施に向けて、さらにデバイスの完成度を高め、非臨床試験を充実させていく予定である。

謝 辞

孔設計の実験を担当いただきました、関西大学の中川雄太氏、紅林芳嘉氏、市川智紀氏、吉田直之氏に感謝申し上げます。

§ 文 献

- 1) Palmaz JC : Review of polymeric graft materials for endovascular applications. *J Vasc Interv Radiol* 1998;9:7-13.
- 2) Ionia CN, et al : Asymmetric vascular stent : Feasibility study of a new low-porosity patch-containing stent. *Stroke* 2008;39:2105-2113.
- 3) Rangwala HS, et al : Partially polyurethane-covered stent for cerebral aneurysm treatment. *J Biomed Mater Res Part B : Appl Biomater* 2009;89B:415-429.
- 4) Nakayama Y, et al : Development of in vivo tissue-engineered autologous tissue-covered stents (biocovered stents). *J Artif Organs* 2007;10:171-176.
- 5) Nakayama Y, et al : Fabrication of micropored elastomeric film-covered stents and acute-phase performance. *J Biomed Mater Res* 2003;64A:52-61.
- 6) Nishi S, et al : Embolization of experimental aneurysms using a heparin-loaded stent graft with micropores. *Cardiovasc Radiat Med* 2003;4:29-33.
- 7) Nishi S, et al : Occlusion of experimental aneurysms with heparin-loaded, microporous stent grafts. *Neurosurgery* 2003;53:1379-1404.
- 8) Nakayama Y, et al : Surface microarchitectural design in biomedical applications : In vivo analysis of tissue ingrowth in excimer laser-directed micropored scaffold for cardiovascular tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2000;51:520-528.
- 9) Nakayama Y, et al : Development of microporous covered stents : Geometrical design of the luminal surface. *Int J Artif Organs* 2005;28:600-608.
- 10) Nakayama Y, et al : Fabrication of drug-eluting covered stents with micropores and differential coating of heparin and FK506. *Cardiovasc Radiat Med* 2003;4:77-82.
- 11) Sato S, et al : Development of self-expandable covered stents. *J Biomed Mater Res Part B : Appl Biomater* 2007;83B:345-353.
- 12) Sato S, et al : Evaluation of self-expandable, FK506-coated, covered stents in canine animal model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;90:647-652.
- 13) Nishi S et al : Newly developed stent graft with micropored and heparin impregnated SPU film-Long-term follow-up study in vivo. *Interven Neuro-daiol* 2001;7:161-166.

- 14) Nishi S, et al : High-performance self-expanding stent graft : development and application to experimental aneurysms. *J Artif Organs* 2009;12:35-39.
- 15) Nishi S, et al : Development of microporous self-expanding stent grafts for treating cerebral aneurysms : designing micropores to control intimal hyperplasia. *J Artif Organs* 2011;14:348-356.
- 16) 紅林芳嘉, 他 : 生体外模擬実験による脳動脈瘤治療用多孔薄膜カバードステントの開発ー孔径・孔密度の違いが瘤内流れに及ぼす影響ー. 第24回バイオエンジニアリング講演会講演論文集 2012;11-47:7F23.
- 17) Kaibara M : Thrombus formation and blood flow-Focusing on venous thrombus. *Jpn J Soc Biorheol* 2004;18:82-90.
- 18) Nakayama Y, et al : Drug eluting stents with microporous polymeric covering as a scaffold for acquisition of extremely thin neointimal lying without disturbing branching vascular flow. *Circulation* 2010; 122:A12157.

Recent Advances
in
Cardiovascular Disease

12 November

Vol. XXXIII

No. 1

循環器病研究の進歩

目次 2012年 第33巻第1号

トピックス	国立循環器病研究センター バイオバンク —未来の医療に不可欠な研究基盤として— 2 植田初江, 宮本恵宏ほか
	早期・探索的臨床試験拠点整備事業について 11 山本晴子
新しい診断・治療法	心房細動患者のための新しい経口抗凝固薬 17 宮本康二, 清水 渉
臨床研究	アドレノメデュリンによる急性心筋梗塞症・ 末梢動脈閉塞症治療 25 安田 聡
	SAMURAI rt-PA Registry に見る わが国の脳梗塞静注血栓溶解療法の現状 31 豊田一則
	ヒートショックと冬季の心原性院外心停止の増加に関して 39 西村邦宏
基礎研究	子どもの心臓収縮と心肥大を調節する 新しい制御蛋白質NCS-1 46 西谷(中村)友重, 若林繁夫
	脱細胞技術による再生型人工血管の開発 56 山岡哲二, 馬原 淳
	脳動脈瘤治療用の多孔化カバースtent開発における 孔設計の重要性 64 中山泰秀, 田地川 勉ほか
	国立循環器病研究センターの再生医療研究の現状に関して 74 山原研一, 中山泰秀ほか
剖検症例報告	心室細動の制御が困難であった骨髄腫に伴う アミロイドーシスの一例 82 松山高明, 植田初江ほか

国立循環器病研究センターの再生医療研究の現状に関して

山原研一^{*}，中山泰秀^{*2}，寒川賢治^{*3}

はじめに

国立循環器病研究センターでは、循環器疾患をはじめとする各種難治性疾患に対し、間葉系幹細胞や骨髄・臍帯血単核球といった体性幹細胞，また、各種生理活性ペプチドを用いた再生医療研究を行っている。体性幹細胞に関しては、間葉系幹細胞が胎児付属物である卵膜に多数存在することを明らかにし、卵膜由来間葉系幹細胞移植による難治性循環器疾患に対する治療効果のメカニズム解明に力

を入れている。骨髄単核球に関しては、脳梗塞に対する細胞治療研究の成果が、現在、当センターにて行われている臨床研究につながっている。さらに、ナトリウム利尿ペプチド、アドレノメデュリン、グレリンといった生理活性ペプチドが持つマルチな生理作用の発見を通じ、それぞれが特徴的な組織再生効果を有することを見出し、その成果が最近の各種難治性疾患における臨床研究につながっている。さらには、生体外での細胞操作を一切必要としない新たな概念の再生医療技術として「生体内組織形成術」を提案し、その研究を行っている。

I. 体性幹細胞による再生医療研究 (再生医療部)

1. 難治性疾患に対する卵膜由来間葉系幹細胞の組織再生保護効果

間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells : MSC) は、自己複製能を有し、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞など様々な細胞への分化能を有する体性幹細胞であり、再生医療における重要な細胞ソースの一つとして期待されている。MSCは多くの間葉系組織に存在するが、特に骨髄や脂肪由来のMSC研究が進んでいる。再生医療部では、以前からこれら組織由来のMSCが持つ組織再生作用に着目し、下肢虚血や心筋梗塞モデルにおいて骨髄や脂肪MSC移植による治療効果を報告してきた^{1,2)}。

このように、組織再生を目的とした研究が進んできたMSCであるが、最近はその免疫調節作用が注目されている(図1)。MSCは

Key word

再生医療
細胞
治療
単核球
間葉系幹細胞
生理活性ペプチド

Current status of regenerative medical research in NCVC

* Kenichi Yamahara :

Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
国立循環器病研究センター研究所 再生医療部

*2 Yasuhide Nakayama :

Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部

*3 Kenji Kangawa :

Director General, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
国立循環器病研究センター研究所 所長

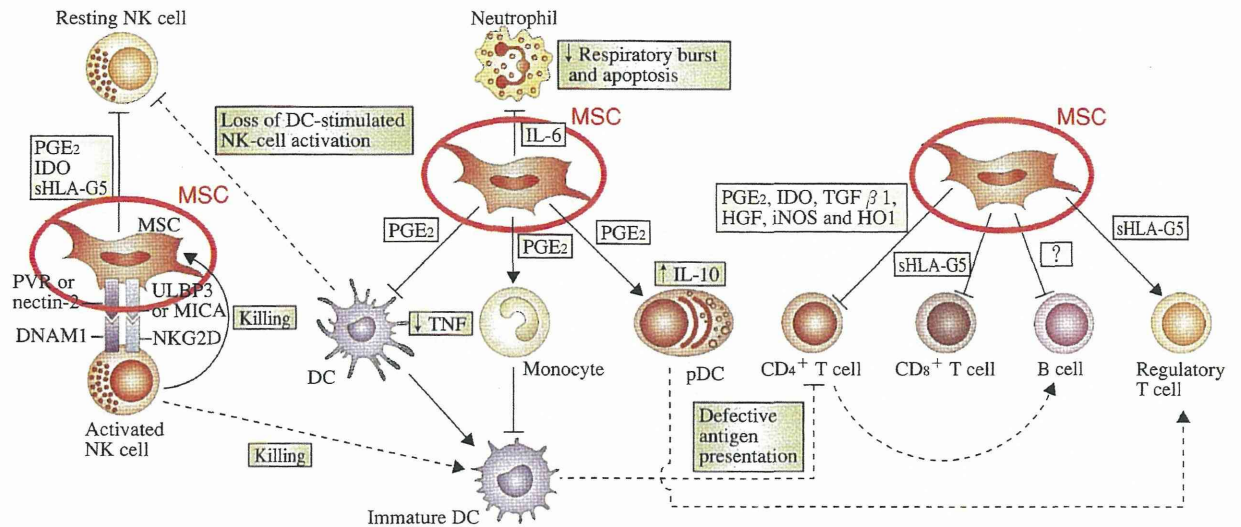


図1. MSCによる免疫制御システム

自身が産生する PGE₂, IL-6, IDO, TGFβ1, HGF, iNOS, HO1, sHLA-G5 など様々な液性因子を介し、T細胞、DC細胞、NK細胞、単球、好中球などの各種血球系細胞の活性を抑えると報告されている。著者らの検討においても、自己免疫性心筋炎モデルにおいて骨髄MSCを静脈内投与したところ、その病態が著明に改善された³⁾。MSC移植により心筋炎組織には血管再生のみならずマクロファージ浸潤の抑制が認められたことから、移植MSCが組織再生に加え免疫調節効果を発揮して病態改善に至ったものと考えられた。

一方、細胞を用いた再生医療を実現するには、必要な時に必要な数の細胞を確保するシステムを構築する必要がある。特にMSCは細胞治療に必要な細胞数を確保するには長時間の培養が必要となることから、自己移植の場合オンデマンドな治療をすることはできない。また、骨髄MSCは患者により樹立不可能な場合もあり、骨髄は必ずしも細胞治療に相応しいMSCソースではない。また、骨髄にせよ脂肪にせよ、その採取には侵襲性を

伴う。

そこで、再生医療部では新たなMSCソースの探索を行い、当センター周産期・婦人科部の協力を得て、胎児付属物に着目した。胎児付属物はその採取に侵襲性を伴わず、通常出産時に破棄される組織である。胎児付属物のなかでも卵膜に着目し、卵膜から脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞に分化可能なMSCが分離できること、下肢虚血モデルにおいて卵膜MSC移植は骨髄MSC移植に匹敵する組織再生能を有することを確認した⁴⁾。さらに、骨髄MSC同様、卵膜MSCも自己免疫性心筋炎モデルの病態を改善するが、その主要なメカニズムが自己免疫性心筋炎の発症に関係するヘルパーT(Th)細胞Th1/Th17の分化・増殖を抑制することを見出した^{5,6)}。すなわち、自己免疫性心筋炎ラットに卵膜MSCを移植し、末梢血におけるTh1/Th17をFACSにて解析したところ、卵膜MSC移植により炎症極期におけるTh1/Th17割合が有意に減少していた。さらに、Th細胞と卵膜MSCをTh1およびTh17分化誘導条件下で共培養すると、

Th1 および Th17 への分化および細胞増殖が有意に抑制された⁶⁾。この結果は、自己免疫性心筋炎における静脈内投与された卵膜 MSC による治療効果が、心臓に限局した炎症抑制だけでなく、全身的な免疫応答を抑制することによる可能性を示唆している。

また、腎臓病領域においても、メサングウム増殖性腎炎モデルである Thy-1 腎炎ラットに卵膜 MSC を移植したところ、病態改善に至ることを確認している⁷⁾。すなわち、卵膜 MSC の経静脈的移植により尿蛋白の抑制を認め、組織学的検討ではメサングウム細胞および基質の増加、さらにはマクロファージ浸潤が有意に抑制された。卵膜 MSC 移植による治療効果が腎再生か腎保護かは議論の余地があるところである。GFP を発現する卵膜 MSC を経静脈的に移植したところ、24 時間後における腎(糸球体, 間質, 尿細管), 肺, 肝臓, 脾臓ではその生着を認めたものの, 7 日後にはほぼ消失しており, 腎臓において再生に貢献可能なほど多くの卵膜 MSC の存在は認められなかった。卵膜 MSC の培養上清をメサングウム細胞に添加したところ, 炎症性サイトカイン・ケモカインである TNF- α ・MCP-1 発現がメサングウム細胞において減少すること, 培養上清に COX-2 阻害剤を添加したところ, この効果が消失したことから, 移植卵膜 MSC から産生されるプロスタグランジン E₂ が腎保護の一端を担っている可能性が考えられた。

2. 虚血性脳血管疾患に対する単核球の組織再生保護効果

脳血管など全身の血管網の恒常性維持には、末梢血中に存在する骨髓由来血管血球系幹細胞 (CD34 陽性細胞など) の関与が示唆されている。そこで、独自に開発した再現性の高い脳梗塞モデルマウスにおいて、骨髓由来血管血球系幹細胞を経静脈的に投与し、血

管・神経再生効果に関して検討を行った。その結果、①脳梗塞後の血管血球系幹細胞投与は梗塞周囲における血管再生を促進すること、②脳梗塞後の血管再生は内因性の神経再生を誘導すること、③血管血球系幹細胞投与による脳梗塞後の血管再生は、脳神経組織の再生を誘導し、さらには脳機能回復をもたらすことを明らかにした⁸⁾。この結果を踏まえ、心原性脳塞栓症患者に対し、自己骨髓由来の血管血球系幹細胞を含有する単核球を用いた細胞治療研究を厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」による認可を経て、現在行っている。

さらに、新生児虚血性脳障害に対する細胞治療応用を目指し、再現性の高い新生仔マウス中大脳動脈閉塞モデルを確立し、臍帯血由来血管血球系幹細胞を用いた移植実験を進めている。新生仔では成体に比して再生能が高いため、細胞治療を行っても対照群との差が病理学的・行動学的に少なく評価が難しいものの、細胞治療により部分的ではあるが効果を認めている (投稿準備中)。

II. 生理活性ペプチドを用いた組織再生保護療法の開発 (再生医療部・生化学部)

国立循環器病研究センターに関連の深いナトリウム利尿ペプチド、アドレノメデュリン、グレリンといった生理活性ペプチドを用いた組織再生保護に関する基礎研究を推進しており、現在これらの成果を基盤とした各種難治性疾患に対するトランスレーショナルリサーチが進められている (図2)。

1. ナトリウム利尿ペプチド

ナトリウム利尿ペプチド (natriuretic peptide: NP) は利尿・ナトリウム利尿・血管拡張などの生理作用を有するホルモンであり、現在までに3種類が発見されている。心臓か

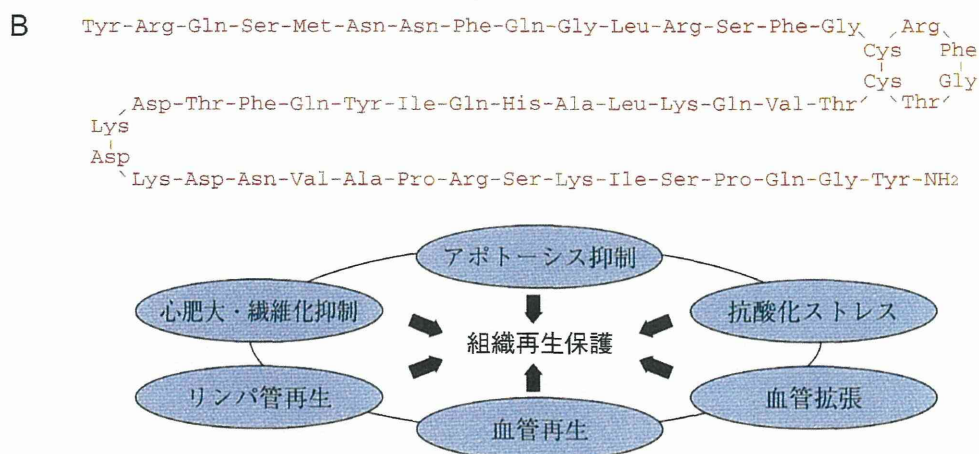
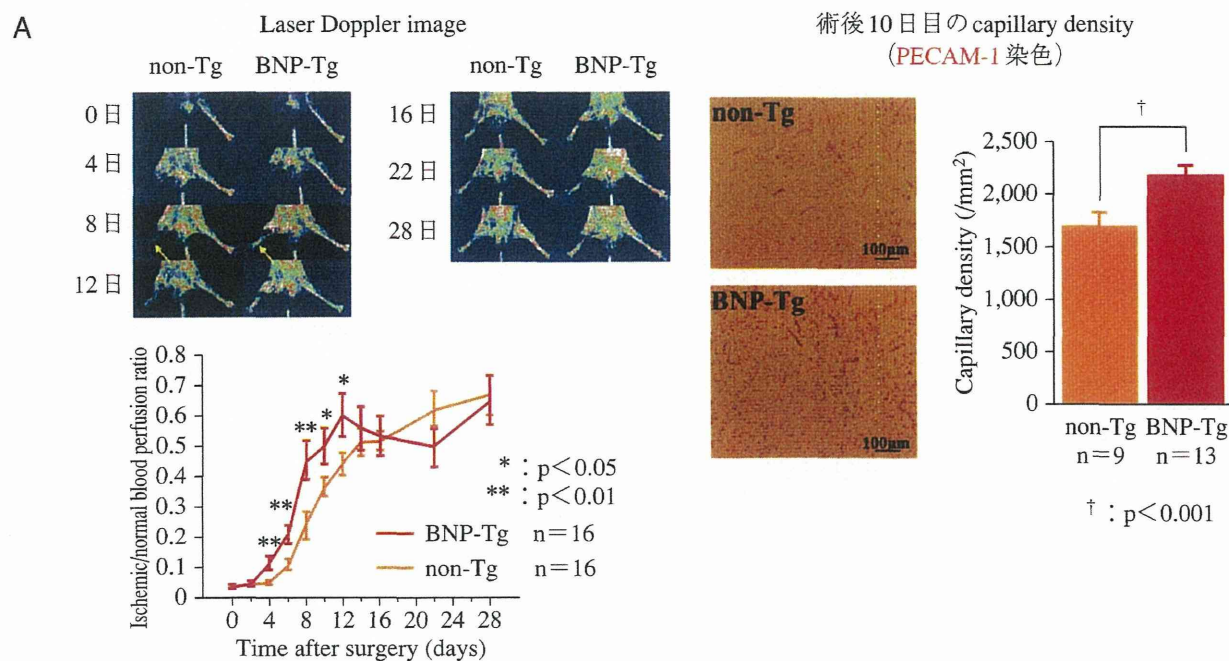
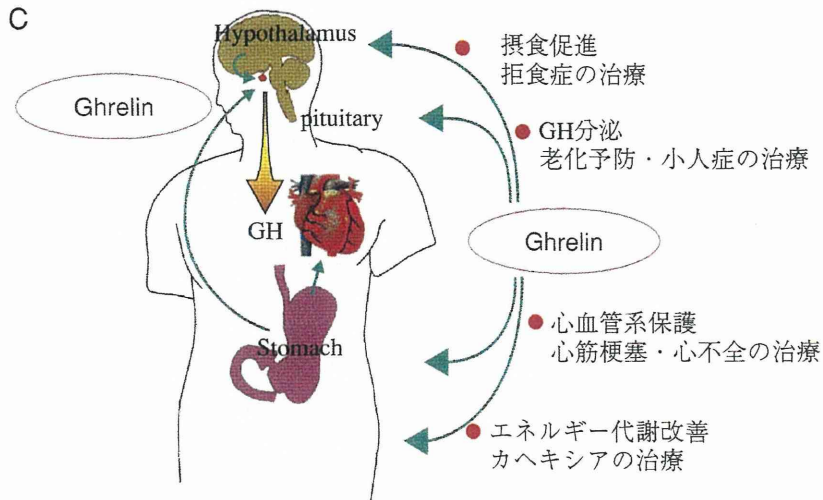


図2. 各種生理活性ペプチドによる組織再生保護効果
A : ナトリウム利尿ペプチドによる血管再生
B : アドレノメデュリンによる組織再生保護効果

ら産生させる心房性 (ANP) および脳性 (BNP) ナトリウム利尿ペプチドは、それぞれ心不全の治療薬および診断薬として既に臨床応用されている。近年、著者らは ANP および BNP

が持つ血管再生作用を明らかにし^{9,10)}、下肢末梢動脈閉塞症例に対して ANP を投与することで、病態が改善することを確認している¹¹⁾。また、C 型ナトリウム利尿ペプチド



(図2の続き) 各種生理活性ペプチドによる組織再生保護効果
C: グレリンの多彩な生理作用と臨床応用

(CNP)が肺高血圧症や急性心筋炎に対し治療効果を有することを動物実験で明らかにした¹²⁾。現在、これらNPファミリーの他の難治性疾患に対する新たな治療薬としての可能性について検討を重ねている。

2. アドレノメデュリン

アドレノメデュリン (adrenomedullin: AM) は強力な血管拡張作用を有する循環調節ペプチドとして北村、寒川らにより1993年に発見された¹³⁾。その後、著者らを含む多くの研究成果から、血管再生や抗炎症、抗アポトーシス作用などの多彩な生理作用を有することが明らかとなってきた。AM投与が心虚血再灌流モデルにおける心筋障害が軽減し、梗塞サイズ縮小および心機能改善に至ることを証明し¹⁴⁾、この結果を踏まえ、急性心筋梗塞患者に対するAM投与を行ったところ、梗塞サイズの有意な縮小および梗塞領域の壁運動の改善を認めた¹⁵⁾。現在、AMの血管再生作用に着目した下肢末梢動脈閉塞症例に対する臨床研究を推進している。また、最近AMが血

管再生のみならず、リンパ管再生も促進することを確認し¹⁶⁾、その臨床応用に向け検討を続けている。

3. グレリン

グレリン (ghrelin) は、1999年新たな成長ホルモン分泌促進物質としてヒトとラットの胃から児島、寒川らにより発見されたペプチドである¹⁷⁾。グレリンは主として胃内分泌細胞で産生され、その受容体GHS-Rを介し、直接的にあるいは求心性迷走神経を経由して視床下部に働き、GH分泌や摂食亢進を促す。さらにグレリンによる心血管作用も確認されている。心筋梗塞後心不全モデルラットにグレリンを連続投与すると、血清GHの上昇とともに左室駆出率の増加、左室リモデリング進展の抑制、カヘキシアの是正が認められた¹⁸⁾。慢性心不全患者へのグレリン投与でも心係数の増加や血行動態の改善を認めており、心機能改善および低栄養状態の是正によるグレリンの心不全治療薬としての有用性が示唆された¹⁹⁾。現在、グレリンが持つ摂食亢

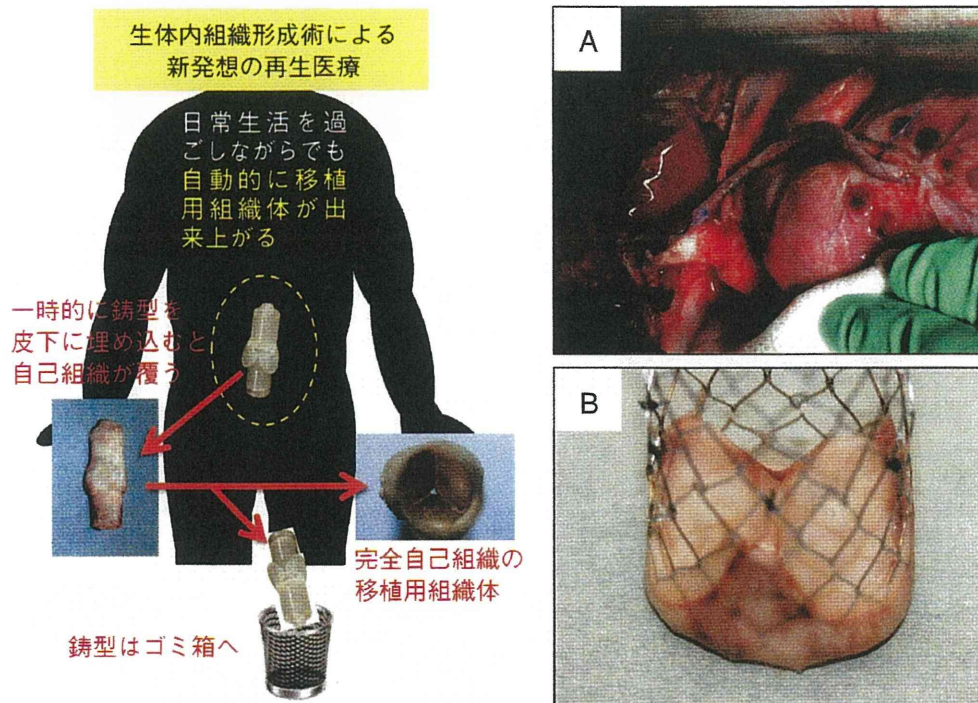


図3. 生体内組織形成術による新しい概念による再生医療技術
 バイオバルブ自家移植用心臓弁の作製例として、体内に3次元鋳型を埋入し、内部の基材を取り除き、周囲に形成された自己組織が心臓弁組織として移植に用いられる。
 A：バイオチューブ人工血管のブタ冠動脈バイパス術への応用
 B：経カテーテル的大動脈弁植え込み術 (TAVI) 用のステントと一体化したバイオバルブ
 心臓弁

進および筋力増進作用を用いた、慢性閉塞性肺疾患・呼吸不全症例に対する多施設共同研究を行っており、その有用性が明らかになりつつある²⁰⁾。

Ⅲ. 生体内組織形成術に基づく再生医療 (生体医工学部, 人工臓器部)

従来の再生医療では必須であった、体外での細胞操作を一切必要としない新たな概念の再生医療技術として「生体内組織形成術」を提案し、その研究を行っている(図3)²¹⁾。皮下に短期間高分子製の基材を埋入することで、移植用の自家組織体が自動的に作製できる技術であり、免疫反応や毒性がなく生体適

合性に優れており、さらに感染症において有利と考えられるなど、移植用の組織体としては極めて理想的と考えられる。また、移植後に自己化を経て体内で成長する可能性も大いに期待される。さらに、所望の形状に自由に設計でき、多数作製できる利点も有し、体内をバイオリクターとして用いるために、特殊な高度滅菌施設や設備は必要なく、経済性に優れている。現在、循環器系組織体の開発を京都府立医科大学や日本大学などと共同で進めており、バイオチューブと名付けられた小口径人工血管や、バイオバルブと名付けられた心臓弁が具体化されつつある。

おわりに

再生医療は、機能を失ってしまった細胞・組織に対し、新しい細胞・組織を誘導・導入することによって機能回復させる医療である。細胞移植による再生医療は、そのソースとして体性幹細胞以外にES細胞やこれに近いiPS細胞があり、その特徴である無限の増殖性と分化能から、「再生医療の切り札」と期待されている。しかしながら、ES/iPS細胞から目的とする新しい細胞・組織まで、その増殖・分化をコントロールしつつ確実に誘導するには、まだ多くの基礎研究が必要なのが現状であり、臨床応用までの道のりはハードルが高い。そこで我々は、①体性幹細胞移植による細胞治療法の確立とそのメカニズム解析、②生理活性ペプチドによる内在性幹・前駆細胞の賦活による組織再生保護治療法の開発、③生体内組織形成術による自家移植用循環系組織体の開発、といった研究を通じて再生医療の早期臨床応用を目指し、社会の要求に応えていきたいと考えている。

§ 文献

- 1) Iwase T, Nagaya N, Fujii T, et al : Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hind-limb ischemia. *Cardiovasc Res* 2005;66(3):543-51.
- 2) Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, et al : Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 2006;12(4):459-65.
- 3) Ohnishi S, Yanagawa B, Tanaka K, et al : Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42(1):88-97.
- 4) Ishikane S, Ohnishi S, Yamahara K, et al : Allogeneic injection of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells induces therapeutic angiogenesis in a rat model of hind limb ischemia. *Stem Cells* 2008;26(10):2625-33.
- 5) Ishikane S, Yamahara K, Sada M, et al : Allogeneic administration of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells attenuates acute myocarditis in rats. *J Mol Cell Cardiol* 2010;49(5):753-61.
- 6) Ohshima M, Yamahara K, Ishikane S, et al : Systemic transplantation of allogeneic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells suppresses Th1 and Th17 T cell responses in experimental autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 2012;53(3):420-8.
- 7) Tsuda H, Yamahara K, Ishikane S, et al : Allogeneic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells contribute to renal repair in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;299(5):F1004-13.
- 8) Taguchi A, Soma T, Tanaka H, et al : Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 2004;114:330-8.
- 9) Yamahara K, Itoh H, Chun TH, et al : Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3404-9.
- 10) Tokudome T, Kishimoto I, Yamahara K, et al : Impaired recovery of blood flow after hind-limb ischemia in mice lacking guanylyl cyclase-A, a receptor for atrial and brain natriuretic peptides. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1516-21.
- 11) Park K, Itoh H, Yamahara K, et al : Therapeutic potential of atrial natriuretic peptide administration on peripheral arterial diseases. *Endocrinology* 2008;149:483-91.
- 12) Obata H, Yanagawa B, Tanaka K, et al : CNP infusion attenuates cardiac dysfunction and inflammation in myocarditis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;356:60-6.
- 13) Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al : Adrenomedullin : a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192:553-60.
- 14) Okumura H, Nagaya N, Itoh T, et al : Adrenomedullin infusion attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Circulation* 2004;109:242-8.
- 15) Kataoka Y, Miyazaki S, Yasuda S, et al : The first clinical pilot study of intravenous adrenomedullin