

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

学位番号乙第 2673 号

学位申請者 : きたむらのりこ
北村範子

主論文 : Basic fibroblast growth factor as a potential stent coating material inducing endothelial cell proliferation

(次世代薬剤溶出性ステント開発における基礎検討～
bFGF の血管壁細胞に対する反応性評価)

著者 : Noriko Kitamura, Terumitsu Hasebe, Tomohiro Matsumoto,
Atsushi Hotta, Tetsuya Suzuki, Takuji Yamagami, Hitoshi Terada

公表誌 : Journal of Atherosclerosis and Thrombosis 21 (5) : 477-485, 2014

論文内容の要旨 :

【研究背景および目的】

動脈硬化症を原因とした血管狭窄に対する低侵襲治療技術として血管内治療が広まっているが、治療に用いるステントは、器具を構成する金属材料の生体適合性が不十分であり、留置後に発生する血管の再狭窄が問題となっている。再狭窄を引き起こさないステント材料の開発は、治療技術の向上に寄与する重要な課題である。再狭窄の発生は、ステント表面での血液細胞成分の付着・凝固やステント拡張に伴い発生する血管壁の創傷を起点とした平滑筋細胞の過剰増殖が主要因とされ、これらを抑制する手法・材料が研究されてきた。薬剤溶出性ステント (DES) は、従来の金属ステントの表面に細胞増殖を抑制する薬剤を含浸させたポリマーを被覆し徐放することで再狭窄を防ぎ、薬剤徐放が続くかぎり効果を発揮する。一方で、この薬剤は創傷治癒に寄与する内皮細胞の増殖も阻害するため、薬剤が切れた後、治癒しなかった創傷を起点とした再狭窄が数多く報告されており、恒久的な高い生体適合性のある再狭窄を防ぐステントの研究開発は、いまだ重要なテーマである。

そこで、本研究課題では、大きなテーマとして、薬剤含浸ポリマーを金属表面に被覆し、薬剤徐放速度制御及び長期的生体適合性の確保できるステントの開発を目標として掲げた。本研究では、その重要な一端を担う薬剤徐放の制御に重点を置き、薬剤の至適濃度の評価を行った。また、材料表面の内皮細胞適合性を向上させ、患部

の内皮化を増進する事で平滑筋細胞の増殖を抑えられると考え、徐放薬剤には細胞増殖因子である bFGF を選定し、内皮細胞増殖にあたる影響を評価した。

【研究方法】

使用する細胞としては、細胞研究で汎用されているヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) およびヒト大動脈血管平滑筋細胞 (HASMC) を用いた。HUVEC に関しては、帝王切開患者から同意を得た後、臍帯から細胞を分離し使用した。

1) 細胞増殖はマルチプレートに 20000 cell/ml で細胞を播種し、bFGF を添加後 1、2、3 日目の増殖を CCK-8 Kit を用いて吸光度を測定した。

2) 細胞遊走はメンブレン付きマルチプレートに 1000000 cell/ml で細胞を播種し、メンブレン下部に遊走した細胞を蛍光染色し、蛍光顕微鏡で観察し、画像解析ソフトで遊走した細胞の面積比として換算した。

3) bFGF 濃度 1、10、100 ng/ml で培養した HUVEC から蛋白を抽出し、ウエスタンブロット法で各濃度における eNOS の発現を評価した。

【結果】

血管内皮細胞は bFGF 10 ng/ml をピークに濃度依存性に増殖および遊走を示した。一方で血管平滑筋細胞は増殖および遊走を示すが、濃度による差はみられなかった。また、血管拡張作用の指標として eNOS の発現をみたところ、bFGF 10 ng/ml で最も発現が高かった。

【考察】

これまでステントにおける薬剤徐放を考える際、細胞を増殖させないことを前提に研究されてきたが、本研究では逆に、細胞増殖因子と呼ばれる細胞の増殖を促す物質を用いることを考えた。bFGF は生体内に存在し、細胞の増殖や分化の調節を行っているタンパク質の一種である。創傷治癒・再生医療の分野ですでに多く研究され、血管新生作用に注目した研究も多く行われている。血管新生因子にはこのほか血管内皮細胞増殖因子や肝細胞増殖因子などがあるが、毛細血管レベルの新生であったのに対し、bFGF では小動脈のレベルであり、新生される血管の質が違うことがわかっている。bFGF は線維芽細胞の増殖を促進する物質として発見されたが、その後の研究でこれ以外にもいくつかの増殖促進作用があることが明らかになった。とくに血管内皮細胞に対する強い増殖、遊走促進作用が注目され、分化因子、栄養因子としての働きも報告されている。正常な血管を構築するためには血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞の相互作用が必要であるものの、bFGF は血管壁細胞すべての増殖に関与しており、ステント再狭窄の原因となる平滑筋細胞や線維芽細胞を増殖するとされてきたが、本研究において、bFGF の投与後、平滑筋細胞の過剰増殖はせず、また内皮細胞も早期増殖は励起されるが、ピークを超えた後にはさらなる増殖はしないことがわかった。

【結語】

bFGF は内皮細胞の増殖性に対して濃度依存的に影響を及ぼす一方、平滑筋細胞に対しては濃度依存性を示さなかった。従って、bFGF は至適濃度 10 ng/ml で平滑筋細胞の過増殖なく、ステント内腔の内皮細胞の早期被覆に有用であると考えられた。さらに再狭窄を励起する反応の抑制とともに留置したステントを取り巻く血管の新生に寄与する可能性もあり、創傷治癒の回復と末梢虚血の予防が期待される。

1. 論文審査の要旨および担当者

学位番号乙第 2673 号	氏 名	北 村 範 子
論文審査担当者	主 査	中 村 正 人
	副 査	東 丸 貴 信
	副 査	岩 渕 聡
	副 査	盛 田 俊 介
	副 査	赤 坂 喜 清
<p>論文審査の結果の要旨 :</p> <p>動脈硬化による狭窄に対する血管内治療の重要な課題に再狭窄がある。この問題に対する有力な戦略として薬剤溶出性ステントがあり、平滑筋増殖抑制に主眼をおいた免疫抑制剤や抗癌剤が臨床で用いられている。しかし、内皮化遅延が生じるため、血管損傷の修復遅延に伴う合併症が危惧される。逆に、内皮化促進は平滑筋増殖を抑制する可能性がある点に着目し本研究が行われた。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) およびヒト大動脈血管平滑筋細胞 (HASMAC) を用い 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml の basic FGF (fibroblast growth factor) による増殖作用を添加後 1. 2. 3 日に測定した。遊送作用はメンブレンつきマルチプレートでメンブレン下に遊送した細胞を蛍光染色し面積比として換算した。basic FRG は 10ng/ml をピークとして HUVEC を用量依存性に増殖、遊走させた。basic FGF は HASMAC に対しても増殖作用、遊走作用を認めたが濃度依存性は認められなかった。次いで basic FGF で培養した HUVEC からタンパクを抽出、eNOS の発現を評価した。basic FGF 10mg/ml で eNOS の発現がもっとも高かった。以上から、basic FGF は 10ng/ml で平滑筋の過増殖なく内皮の増殖 (ステントの被覆化) が期待できると結論した。</p> <p>平成 26 年 8 月 25 日 (月) 19 : 30 から医学部 3 号館 2 階ミーティングルームで岩渕教授、東丸教授、赤坂教授、中村の出席のもと審査が行われた。盛田教授は公務のため欠席、書面審査を行った。basic FGF を選択した理由、正常人大動脈内皮細胞ではなく HUVE を選択した理由について質問があり、北村氏は他の増殖因子 VEGF、EGF、PDGF などの論文によると内皮細胞が弱い弱であったためかいずれも第 2 相の臨床試験結果がネガティブであった。このためさらに上流の増殖因子である basic FGF に着目したこと、HUVEC は簡便でありデータが充実しており他の研究成績と比較が容易であるとを理由として挙げた。増殖実験について 3 日目以降のデータの有無、図 1 と図 3 の整合性について質問があった。北村氏は図 1 で 3 日目の細胞数が減った理由として、培地内で内皮細胞が増殖できるぎりぎりな状態が 3 日と判断した。3 日以降のデータはあるがさらに細胞数は減少したと答えた。したがって、2 日目までのデータで 10ng/ml で最大増殖、最大の遊走能を示したと判断すると回答した。リン酸化 eNOS 発現測定に関しては、未測定であるため NO 産生を定量するデータはなくこの論文の限界であると述べた。なお、論文における図 3 の上段、下段が逆であったため審査会において北村氏から訂正があった。</p> <p>basic FGF の平滑筋、内皮細胞の両者に対する増殖、遊送作用を検討したものはなく、今後の臨床応用を期待させる重要な論文であると判断され、厳正なる審査の結果、学位に値すると結論された。</p>		