

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592122

研究課題名(和文) 硫酸化ジェラン線維性素材を用いた生理活性コイルの開発研究

研究課題名(英文) Development of gellan sulfate core platinum coil with bioactive substances

研究代表者

松島 聡 (MATSUSHIMA, Satoshi)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・リサーチアソシエイト

研究者番号：50252367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳動脈瘤コイル塞栓術後の再開通予防を目的に、テネイシンC担持硫酸化ジェラン加工系プラチナコイルを作成し、ウサギエラストーゼ動脈瘤モデルを用いて、実際の血管内治療に即した方法で、コイル塞栓術を行った。その結果、テネイシンC担持硫酸化ジェラン加工系プラチナコイルは、通常用いられるプラチナコイルよりも、動脈瘤頸部の新生内膜の形成、瘤内の器質化促進作用が有ることが分かった。さらにそのメカニズムに、TGF、テネイシンC、MMP-9が関連することも分かった。

研究成果の概要(英文)： We conduct this study for the aim of evaluating the effects of Gellan sulfate core platinum coil (GSCC) with tenascin-C (TNC) (GSCC-TNC). Elastase-induced rabbit aneurysms were randomly coiled with platinum coils (PCs), GSCCs or GSCC-TNCs and aneurysm-occlusion status was evaluated at 2 weeks post-coiling. In addition, a PC, GSCC or GSCC-TNC was randomly implanted in a rat blind-ended model and the organization effects were immunohistochemically evaluated for expressions of TNC, transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 2 weeks later. As a result, GSCCs showed a significantly higher ratio of organized area to the aneurysmal cavity than PCs. GSCC-TNCs had intense immunoreactivities for TNC, TGF- $\beta$  and MMP-9 in the organized thrombosis and tunica media.

GSCC-TNCs demonstrated potent aneurysm repair effects in a simulated clinical setting using rabbits possibly through the TGF- $\beta$  and MMP-9 upregulation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脳動脈瘤 脳血管内治療 生理活性 コイル

## 1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血は、一旦発症するとその死亡率は約 50%とされ、かつ生存者の 30%以上に身体的障害を残す重篤な脳血管障害である。脳動脈瘤に対する治療は、現状では手術加療しか無く、開頭手術または血管内治療（脳動脈瘤コイル塞栓術）が行われている。脳動脈瘤コイル塞栓術は、血管内から瘤内に離脱式プラチナコイルを充填し、瘤内の血栓化さらにはその後の器質化により、瘤内への血流を遮断することで破裂予防を行うもので、安全性・操作性の改善と低侵襲治療への要望もあり、従来法である開頭を伴う外科的手術に替わり、その適応は益々広がっている。しかし、脳動脈瘤コイル塞栓術にも解決すべき問題がある。第 1 に現状では約 20%に治療後の再発（再開通）がみられ、その早期診断や時機を逸しない再治療のために瀕回の画像検査を要することであり、第 2 にデバイスのほとんどが欧米からの輸入に頼っているために医療費の高騰を招くことである。

動脈瘤コイル塞栓術に従来から使用されてきたプラチナコイルは、血栓形成を促す作用しかなく、塞栓部分の完全な器質化には 6 ヶ月以上かかるため、高い再開通率の一因になっていると考えられる。脳動脈瘤コイル塞栓術後の再開通防止のため、コイルに器質化促進効果を有する物質を担持することで瘤内の早期器質化を促し、術後の再開通を予防するという観点から、これまで様々な機材の開発が行われてきた。ポリグルコール酸とポリ乳酸の共重合性生体吸収性ポリマーをプラチナコイル上に巻き付けた Matrix2® (Stryler) は臨床応用され、瘤内の器質化や動脈瘤頸部の新生内膜の形成促進、動脈瘤の再開通率の低減が期待されたが、大型の動脈瘤や広頸動脈瘤では依然として術後再開通率は高く、再開通の問題は解決されていない。その他にもプラチナコイルの金属表面に線維芽細胞を付着させる方法や徐放性の化学物質などを用いて、塩基性線維芽細胞増殖因子や血管内皮増殖因子を結合させ、瘤内へデリバリーすることが試みられているが、臨床応用には至っていない。

申請者の研究室では、脳動脈瘤コイル塞栓術後の再開通率を下げることを目的に、テネイシン C 担持硫酸化ジェラン加工系プラチナコイルの開発を行ってきた。これは、硫酸化ジェランという機能性生体材料を繊維状に加工し、プラチナコイルの中空系としたコイルの作製を行い、そのコイルに、器質化促進作用を有する細胞外マトリックス蛋白であるテネイシン C という機能蛋白を結合させることで、通常のプラチナコイルと物性は変えずに瘤内の血栓の器質化を促す作用を持つものである。これまでに、テネイシン C 担持硫酸化ジェラン加工系プラチナコイルの作成における至適条件と器質化効果を、ラッ

トの頸動脈結紮モデルを用いて検証し、その至適条件を決定し、器質化促進効果を示した。(Transl Stroke Res.2014;5:595-603.) この報告で、テネイシン C 担持硫酸化ジェラン加工系プラチナコイルが瘤内血栓の器質化を促し、動脈瘤コイル塞栓術後の再開通を予防できる可能性を示した。

## 2. 研究の目的

本研究では、脳動脈瘤コイル塞栓術後の再開通率を低減することを目的に、我々の過去の経験と最新の知見を基に、これまでの研究成果をさらに発展させる形で、ヒトの脳動脈瘤に近似したウサギのエラスターゼ動脈瘤モデルを用いて、テネイシン C 担持硫酸化ジェラン加工系プラチナコイルによる瘤内の器質化促進効果を評価する。また、器質化促進作用に関わるメカニズムを解明する。さらに、今後の臨床応用に向けて、コイルの操作性およびコイル塞栓術後の安全性の評価を併せて行う。

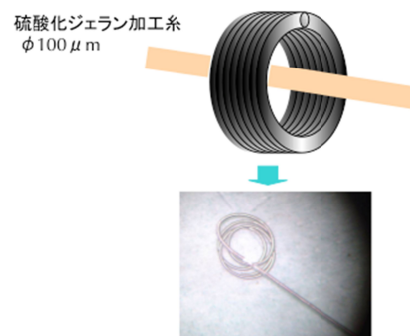
## 3. 研究の方法

### 実験 1

#### (1)コイル作成

食品添加物として用いられ、安全性が高い多糖類のジェランを基に、ヘパリン活性をもつ分子として開発された硫酸化ジェランを繊維状に加工し、脳動脈瘤コイル塞栓術に用いるプラチナコイルの一次コイルの中を通す伸展予防用（ストレッチレジスタント）の糸として使用する。これを硫酸化ジェラン加工系プラチナコイルとした。

硫酸化ジェラン加工系プラチナコイルの作製



さらに、硫酸化ジェランと、器質化促進作用を有するテネイシン C というマトリックス細胞蛋白を結合させることにより、通常のプラチナコイルと物性は変えずに瘤内の血栓の器質化を促す作用を持つコイルを製作する。硫酸化ジェラン加工系入りコイルをテネイシン C 溶液 10 μg/ml に 30 分間浸漬したものを、テネイシン C 担持硫酸化ジェラン加工系

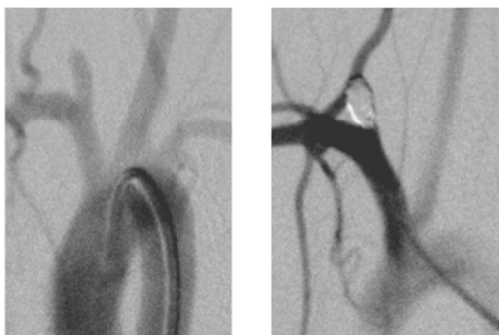
プラチナコイルとした。

## (2)ウサギのエラスターゼ動脈瘤モデルの作製

New Zealand white rabbit を使用する。全身麻酔下に、右総頸動脈を剥離確保し、4Fr シースを逆行性に総頸動脈に 3cm ほど挿入する。透視下にて造影剤を注入し、腕頭動脈および総頸動脈起始部を確認し、fogarty balloon catheter にて総頸動脈起始部を閉塞させる。総頸動脈閉鎖腔に、エラスターゼを 20 分間注入する。全機材を抜去し、総頸動脈を絹糸にて結紮し、皮膚切開部を縫合する。

## (3)コイル塞栓術

全身麻酔下に、右総腸骨動脈を確保し、4Fr シースを留置する。診断用のカテーテルを腕頭動脈に誘導し、血管撮影を行い、動脈瘤の有無、形状を評価する。動脈瘤塞栓術用のマイクロカテーテルを動脈瘤内に留置し、透視下に、動脈瘤コイル塞栓術を施行する。コイル塞栓術に使用するコイルは、プラチナコイル (A 群)、硫酸化ジェラン加工系プラチナコイル (B 群)、テネイシン C 担持硫酸化ジェラン加工系プラチナコイル (C 群) の 3 群に分ける。また、これらコイルの操作性を評価する。



エラスターゼ動脈瘤

コイル塞栓術

## (4)標本の摘出および固定

コイル塞栓術 2 週間後に、動脈瘤の摘出を行う。全身麻酔下に、左総頸動脈を確保し、4Fr シースを逆行性に留置する。カテーテルを上行大動脈に留置し、血管撮影を行い、コイル塞栓術後の評価を行う。ウサギを sacrifice し、動脈瘤を摘出し、ホルマリン固定を行う。

## (5)評価

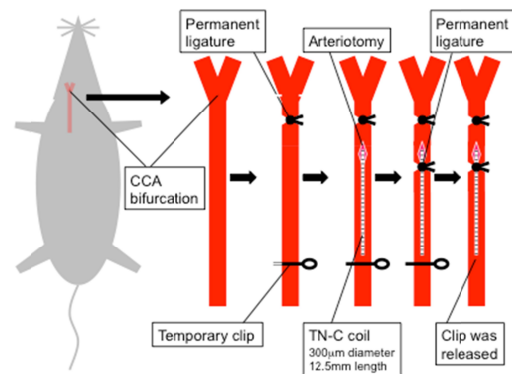
コイル塞栓後の動脈瘤標本を、樹脂包埋し、研磨標本作製する。ヘマトキシリンエオジン染色にて、動脈瘤頸部の新生内膜の形成、瘤内部の器質化を評価する。

## 実験 2

器質化促進効果が TGF- $\beta$ 、テネイシン C、MMP-9 と関連したメカニズムと関連するかを

評価するため、以下の実験を行う。

全身麻酔下に、ラットの右総頸動脈を結紮し、盲端にした部分を動脈瘤モデルとし、瘤内にコイルを留置し、閉鎖する。コイルは、プラチナコイル (A 群)、硫酸化ジェラン加工系プラチナコイル (B 群)、テネイシン C 担持硫酸化ジェラン加工系プラチナコイル (C 群) の 3 群に分ける。

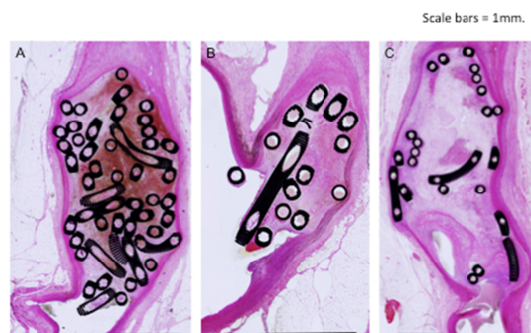


2 週間後にコイル留置部を摘出し、ホルマリン・パラフィン固定後にコイルを取り除き、ヘマトキシリンエオジン染色により、瘤内器質化の評価を行う。さらに、transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )・テネイシン C、matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) の抗体による免疫組織化学的染色を行う。

## 4. 研究成果

### 実験 1

全例で手技が成功し、手技に関連する死亡はなかった。コイルの操作性は 3 群で変わらなかった。各グループ間で動脈瘤の大きさ、塞栓率は、統計的に同等であった。A 群と比較し、B 群では新生内膜の形成および瘤内血栓器質化促進効果を持つことが分かった。さらに、C 群では、B 群と比較し、さらに強い新生内膜の形成および瘤内血栓器質化促進効果を持つことが明らかとなった。



### 実験 2

全例で手技が成功し、手技に関連する死亡はなかった。A 群では、瘤内の器質化は認め

ず、TGF- $\beta$ ・テネイシン C・MMP-9 陽性細胞は少なかった。B 群では、瘤内の器質化は半数で認め、TGF- $\beta$ ・テネイシン C・MMP-9 陽性細胞は中膜平滑筋層および器質化部分で認めた。C 群では、瘤内の器質化は 75%で認め、TGF- $\beta$ ・テネイシン C・MMP-9 陽性細胞は中膜平滑筋層および器質化部分で認めた。

以上より、テネイシン C 担持硫酸化ジェラン加工系プラチナコイルは、従来用いられるプラチナコイルよりも、動脈瘤頸部の新生内膜の形成、瘤内の器質化促進作用が有ることが分かった。さらにそのメカニズムに、TGF- $\beta$ 、テネイシン C、MMP-9 が関連することも分かった。

瘤内の早期器質化に有効であるテネイシン C は、単体では組織内に導入することは困難であるが、硫酸化ジェランを用いることで確実・安定的に導入可能となり、エラストラーゼ動脈瘤モデルでも器質化促進効果が示された。今後、長期留置における効果と安全性を検討し、臨床応用に向けての課題を評価する予定である。

## 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 1 件)

Hamada K, Miura Y, Toma N, Miyamoto K, Imanaka-Yoshida K, Matsushima S, Yoshida T, Taki W, Suzuki H. Gellan sulfate core platinum coil with tenascin-C promotes intra-aneurysmal organization in rats. Transl Stroke Res 5: 595-603, 2014. 査読有 DOI: 10.1007/s12975-014-0352-z

[学会発表](計 2 件)

三浦洋一、種村 浩、藤本昌志、濱田和秀、当麻直樹、今中-吉田恭子、松島 聡、吉田利通、滝 和郎、鈴木秀謙. ウサギエラストラーゼ動脈瘤での Gellan Sulfate Core Platinum Coil with Tenascin-C の瘤内器質化促進効果. 第 39 回日本脳卒中学会, 2014 年 3 月 13 日~15 日, 大阪国際会議場(大阪市).

三浦洋一、種村 浩、藤本昌志、濱田和秀、当麻直樹、松島 聡、宮本啓一、今中-吉田恭子、吉田利通、滝 和郎、鈴木秀謙. ウサギのエラストラーゼ動脈瘤モデルにおける gellan sulfate core platinum coil with tenascin-C の瘤内器質化促進効果. 第 72 回日本脳神経外科学会学術総会, 2013 年 10 月 16 日~18 日, パシフィコ横浜(横浜市).

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

松島 聡 (MATSUSHIMA, Satoshi)  
三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト  
研究者番号: 50252367

### (4)研究協力者

三浦 洋一 (MIURA, Yoichi)  
鈴鹿回生病院  
研究者番号: 10420390

濱田 和秀 (HAMADA, Kazuhide)  
桑名西医療センター  
研究者番号: 00464165

当麻 直樹 (TOMA, Naoki)  
三重大学・医学系研究科・講師  
研究者番号: 80362341

鈴木 秀謙 (SUZUKI, Hidenori)  
三重大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 90345976