

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19971

研究課題名(和文)フリーラジカルによるステント内再狭窄予防のための低侵襲治療の開発

研究課題名(英文) Development of minimally invasive treatment for in-stent restenosis prevention by free radicals.

研究代表者

林 啓太 (HAYASHI, KEITA)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：80770859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、既存の金属ステントに超音波照射を行うことでフリーラジカルを発生させ、ステント内再狭窄を予防する治療法の開発を目指した。In vitroでは、超音波照射によるニチノールの励起と、血管平滑筋細胞の増殖抑制効果を確認した。また、先行研究として、ミニブタ正常血管における金属ステントと生体吸収性ステントの長期的な開存性、血管壁反応、至適観察期間を検討した。結果、金属ステントでは経時的に狭窄率が増悪するのに対して、生体吸収性ステントでは留置後6週時点で最大狭窄となり、その後は徐々に狭窄が改善されることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得た、ミニブタ正常血管に金属ステントと生体吸収性ステントを長期留置した際の研究データは、後に予定しているミニブタ頸動脈へのステント留置や超音波照射によるステント狭窄予防の研究、また金属ステントや生体吸収性ステントを基盤とした新たな医療機器開発の研究におけるコントロールデータとして広く有用が可能だと考える。

研究成果の概要(英文)： The aim of this study is to develop minimally invasive treatment for preventing in-stent restenosis of peripheral artery disease. An in vitro study, we confirmed excitation of nitinol and inhibitory effect of vascular smooth muscle cell proliferation by ultrasonic exposure. Furthermore, we conducted a study to compare long-term vascular morphological changes between bioresorbable scaffolds and bare metal stents in porcine iliac artery. In this result, we found that the rate of stenosis of bare metal stents increased over time. In contrast, bioabsorbable scaffolds showed maximal stenosis at 6 weeks after placement and the stenosis gradually improved thereafter.

研究分野：血管外科

キーワード：血管内治療 ステンント 末梢動脈疾患 ステント内再狭窄 フリーラジカル 超音波 金属ステント 生体吸収性ステント

1. 研究開始当初の背景

われわれは、長年にわたって、閉塞性動脈硬化症に対する治療に取り組み、最近では低侵襲治療である血管内治療にも積極的に取り組んできた。しかしながら、この血管内治療の長期成績は、鼠径靭帯以下の下肢動脈ではバイパス術よりも劣っているのが現状で、閉塞性動脈硬化症が急増している現在では、血管内治療の長期成績の向上が血管外科領域では急務となっている。

本来血管内留置用ステントは、バルーン拡張単独で生じ得る血管壁の解離や急性再狭窄などによる早期再狭窄を予防するために開発され、血管内治療の成績を飛躍的に向上させたが、冠動脈病変と比較して動脈硬化がより高度で、ねじれや進展などの外的侵襲も加わる鼠径靭帯以下の下肢動脈では、ステント破損やステント内再狭窄が問題となり、いまだ長期成績が不良である。ステントを留置しない選択肢として、パクリタキセルやシロリムスによる薬剤コーティングバルーンや、カテーテルを用いて粥腫を摘除する atherectomy が末梢動脈領域においても臨床利用されている。それ以外にもステントによる影響を軽減するために、ステントそのものを生体に吸収させる biodegradable stent なども臨床利用されているが、どれも現在の金属ステント留置の成績を凌駕するものではない。よって現時点では、いかにステント内再狭窄を防ぐかが最大の課題となっている。

ステント内再狭窄は、ステント留置後の血管平滑筋細胞の異常増殖による内膜肥厚が原因とされている。この血管平滑筋細胞の異常増殖を抑制するために、薬剤溶出性ステントが冠動脈領域に続き、末梢動脈領域でも臨床利用されているが、長期成績に有意な差はなく、抗血小板剤の長期内服が必要であったり、早期血栓閉塞があったりと問題点も多い。そこでわれわれは、血管平滑筋細胞の異常増殖を抑制するための手段として、フリーラジカルの細胞傷害作用に着目した。近年、二酸化チタンに超音波を照射することでフリーラジカルが発生することが確認された。現在臨床で使用される血管内治療用のステント素材はナイチノール（チタンとニッケルの合金）であり、われわれの研究でナイチノールステントに超音波を照射することでフリーラジカルが発生することも確認できている。実際に、それを血管平滑筋細胞に応用して、ステントからのフリーラジカルがステント留置部局所での血管平滑筋細胞の異常増殖を抑制することが確認できれば、ステント内再狭窄の予防につながると考える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ステント内再狭窄をより低侵襲に克服することにある。すなわち、現在臨床利用されている金属ステントに超音波を照射し、フリーラジカルを発生させ、血管平滑筋細胞の異常増殖を抑制することにより、外来などで簡便に繰り返し施行できる低侵襲なステント内再狭窄抑制の方法を開発することである。すでにウサギの内膜肥厚モデルで実験モデルは確立されているが、本研究では実臨床への導入を視野におき、解剖学的によりヒトに近いとされるミニブタを用いて、実際に臨床で使用されている血管内留置用のナイチノールステントに超音波を照射し、その血管平滑筋細胞の増殖抑制効果及び周囲組織への影響を検討する。

3. 研究の方法

初年度初めに、ブタ頸動脈への金属ステントの留置実験の準備として、麻酔手技、ステント留置手技、血管造影手技の確立を図った。この予備実験で行った留置実験において、ブタ動脈ではステント留置部の内膜肥厚所見がヒトより強く認められる傾向が示唆されたため、当初の実験計画を以下のように修正した。

(1) 超音波照射によるナイチノールの励起の確認

Phosphate buffered saline (PBS) に活性酸素検出用試薬である Aminophenyl Fluorescein (APF) を加え、APF が $10 \mu\text{mol/l}$ になるようにした試薬に、金属ステントを切断した切片 120mg を浸し、1MHz の超音波を照射する。超音波の intensity を 0.1、0.3、0.6、0.9 に設定し、照射時間を 15 秒、30 秒、60 秒として、各条件での APF の蛍光度を測定する。

(2) 超音波照射による血管平滑筋細胞の増殖抑制効果の確認と至適条件の検討

A431 (ヒト扁平上皮癌細胞) に 1MHz の超音波を照射する。超音波の intensity を 0.1、0.3、0.6、0.9 に設定し、照射時間を 15 秒、30 秒、60 秒として、各条件での A431 の細胞数の変化を測定する。各条件で 4 回ずつの照射後の細胞数の変化率を算出し、各条件での細胞数の変化率は 4 回の測定の平均値とする。同様の実験を培養血管平滑筋細胞に対して行い、細胞障害作用の最も少ない超音波の設定 (intensity、照射時間) について検討する。

(3) ミニブタ腸骨動脈への金属ステントと生体吸収性ステントの留置、至適条件の検討

ブタ正常血管において金属ステントの内膜肥厚がヒトより強く出ることから、両側頸動脈への金属ステント留置では脳虚血発症のリスクが高いと判断し、比較対象を生体吸収性ステントとした。そのため、ミニブタ正常血管における金属ステントと生体吸収性ステントの経時的な構造変化を確認するために、本実験を追加した。

全身麻酔下に、ミニブタの総頸動脈を露出して、これを穿刺し、透視装置下でガイドワイヤー下に腸骨動脈へカテーテルを誘導し、左外腸骨動脈に金属ステントを、右外腸骨動脈に生体吸収性ステントを留置する。留置前後および留置後6週、12週、24週にそれぞれ血管造影と血管内超音波検査を施行し、開存性や血管壁の反応の違い、内膜肥厚の程度を確認する。経時的な経過を追うことで、適切なフォローアップ時期を検討する。

(4) ミニブタ頸動脈での超音波照射によるステント内再狭窄抑制効果の検討

全身麻酔下に、ミニブタの大腿動脈を露出して、これを穿刺し、透視装置下でガイドワイヤー下に頸動脈へカテーテルを誘導し、左総頸動脈に金属ステントを、右総頸動脈に生体吸収性ステントを留置する。留置前後で血管造影検査、血管内超音波検査を施行し、開存性やステント破損の有無を確認する。術後は1週間ごとに、体表より1MHzの超音波を10分照射する。金属ステントの場合、ナイチノールの励起、フリーラジカルの発生によって内膜肥厚抑制効果があると考えられるが、生体吸収性ステントではその効果はないため、両者を比較することで、本研究の効果が既存の生体吸収性ステントと比較して遜色ないものか、有意に効果があるものかを検討する。

留置後6週時点で再度全身麻酔下に血管造影検査と血管内超音波検査を行い、開存率、ステント破損の有無を確認する。その後安楽死させ、ステント留置部頸動脈の病理学的検査を行う。ステントを留置した頸動脈の組織切片を作成し、新生内膜面積、中膜面積、閉塞面積を算出し、形態学的なステント内再狭窄などを評価する。また、血管壁損傷スコア、炎症スコアを病理組織学的に評価する。

4. 研究成果

(1) 超音波照射によるナイチノール励起の確認

1MHzの超音波の照射の条件をintensity=0.1、0.3、0.6、0.9に設定し、照射時間を15秒、30秒、60秒として、各条件で4検体ずつAPFの蛍光度を測定した。各条件での蛍光度は4検体の平均値とした。結果、intensity、照射時間とナイチノールの励起には明らかな相関関係は認められなかった(表1)。

		Intensity			
		0.1	0.3	0.6	0.9
照射時間 (秒)	15	45502	40510.5	39483	37184.75
	30	42341	39204.75	38482.5	38078.25
	60	39847.74	37171.75	37213.5	42511

表1: 超音波照射によるAPF蛍光度の測定

(2) 超音波照射による血管平滑筋細胞の増殖抑制効果の確認と至適条件の検討

1MHzの超音波の照射の条件をintensity=0.1、0.3、0.6、0.9に設定し、照射時間を15秒、30秒、60秒として、A431の細胞数の変化率を測定した。結果、intensity、照射時間と細胞障害には明らかな相関関係は認めなかった(図1)。

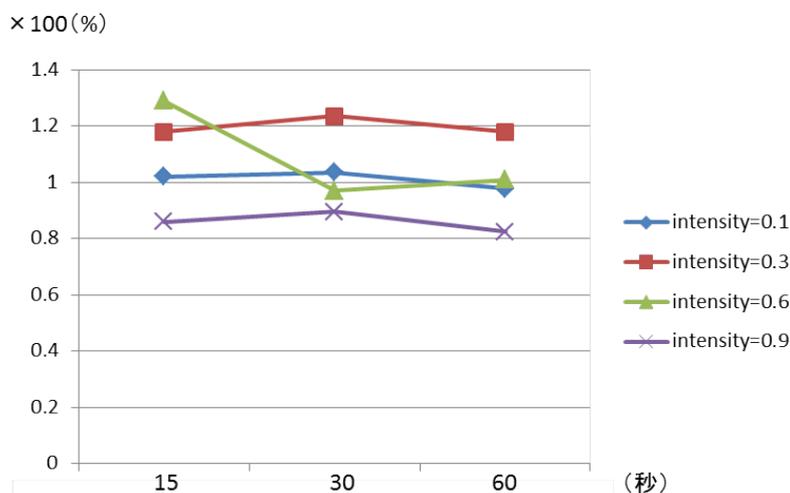


図1: 超音波照射によるA431の細胞数の変化率

- (3) ミニブタ腸骨動脈への金属ステントと生体吸収性ステントの留置、至適条件の検討
 ミニブタ 4 頭に対して手技を行い、4 頭全例で手技的成功を得た。1 頭のみ留置後 12 週の時点で金属ステントの閉塞を認めたが、それ以外は全例留置後 24 週まで開存を認めた。血管造影検査の結果、生体吸収性ステントは留置後 6 週時点で最大狭窄となり、その後は徐々に狭窄が改善されるのに対して、金属ステントでは経時的に狭窄率が増悪した (図 2)。血管内超音波検査の結果、留置後 6 週での最大狭窄部位での面積狭窄率 (%AS at MLA; the percent area stenosis at minimum lumen area) は金属ステント群、生体吸収性ステント群で差は認めなかったが、留置後 12 週、24 週での %AS at MLA は生体吸収性ステント群が金属ステント群より有意に小さかった (図 3)。また、留置直後の血管径を 100%とした際の、経時的な内腔面積の変化を算出すると、金属ステントでは経時的に内腔面積が小さくなるのに対して、生体吸収性ステントでは留置後 12 週以降は血管壁のリモデリングにより内腔面積が徐々に増加する可能性が示唆された (図 4)。
 以上の結果から、ミニブタ頸動脈での超音波照射によるステント内再狭窄抑制効果の検討では留置後 6 週時点での評価が適切だと判断した。

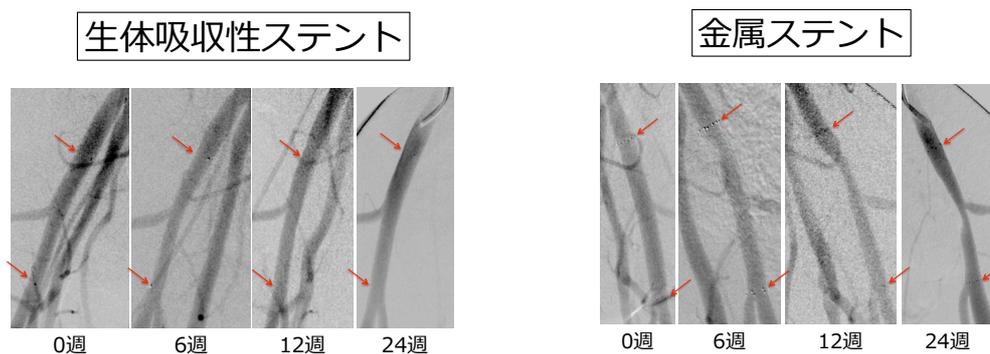


図 2 : ミニブタ腸骨動脈にステントを留置した際の経時的な血管造影検査所見

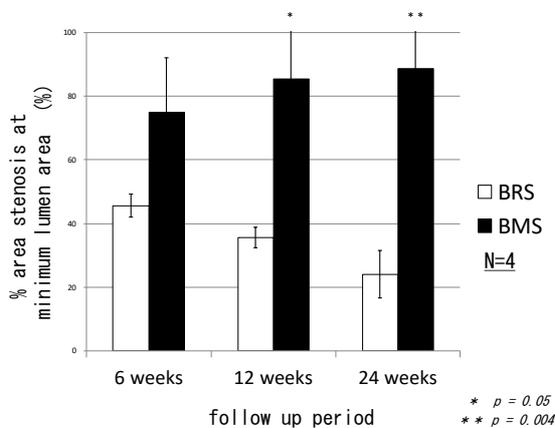


図 3 : 最大狭窄部位での面積狭窄率の経時的変化

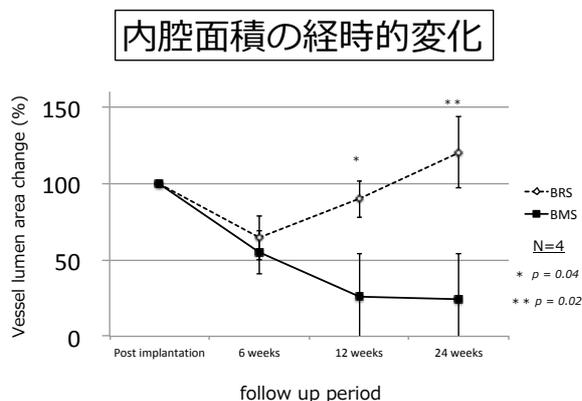


図 4 : 内腔面積の経時的変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 2 件）

- (1) 林啓太、ミニブタ腸骨動脈における生体吸収性ステントと金属製ステントの比較検討、第45回日本血管外科学会学術総会、2017年
- (2) Keita Hayashi, Comparison of vascular remodeling between the bioresorbable Poly-L-lactic acid scaffold and the metallic stent in porcine iliac artery, 18th congress of Asian Society of Vascular Surgery, 2017

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。