

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462116

研究課題名(和文)自家生体組織膜で被覆したstent Biocovered stentの開発

研究課題名(英文)stent covered with autologous tissue "Biocovered stent"

研究代表者

坂井 修(Osamu, Sakai)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10298432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに中・小口径血管用に作製し、移植実験を行ったBiocovered stentを、大口径血管に応用すべく、実験に取り組んだ。大口径血管においては、バルーン拡張型ステントではなく、自己拡張型ステントが主流であるため、気管ステントであるGianturco Z-stentと、20mm径シリコンチューブを用いた。試行錯誤の結果、皮下に作製したBiotubeを摘出せずに、その内腔にZ-stent展開し、その中に再度シリコンチューブを挿入した。4週間後に摘出し、Z-stentと自己組織膜が一体化した大口径用Biocovered stentを得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：We tried experiments to apply Biocovered stent, which was prepared for medium and small caliber vessels and performed a transplant experiment, to large-diameter vessels. For large diameter vessels, self-expanding stents are mainstream not the balloon expandable stent, so Gianturco Z - stent which is a tracheal stent and 20 mm diameter silicone tube were used. As a result of trial and error, without removing Biotube produced subcutaneously, Z-stent was deployed in the lumen, and the silicone tube was inserted again into it. After 4 weeks, it was removed, and Biocovered stent for large diameter integrated Z-stent covered with autologous tissue membrane was able to be obtained.

研究分野：血管外科

キーワード：生体内組織形成術 カバードステント ステントグラフト

1. 研究開始当初の背景

血管疾患治療に用いられている covered stent の現状としては、末梢血管疾患(閉塞性疾患)においては、腸骨動脈以下の閉塞性疾患に対する低侵襲な血管内治療が普及し、浅大腿動脈領域では covered stent のバイパス手術と遜色のない開存率が報告されている。一方で膝窩動脈以下末梢レベルの小口径動脈では、covered stent であっても自家動脈とのコンプライアンスの差から生じる stent 両端部での内膜肥厚による狭窄や、抗血栓性の不足による閉塞などを生じるため、現状では有効なデバイスがない。また、大動脈疾患(拡張性疾患)においては、胸部・腹部大動脈瘤に対する covered stent による血管内治療(ステントグラフト内挿術)が普及し、有効性が証明されている。一方で現在のデバイスは柔軟性に乏しく屈曲部位での追従性に劣り、動脈との一体化(癒着)に時間を要するため、自家動脈との隙間から動脈瘤内への血液漏れ『endoleak』、遠隔期の留置位置ずれ『migration』、コンプライアンス低下による心負荷の増加が、解決すべき問題点である。

また両者に共通した問題点として、移植後の人工物感染がある。一旦人工物が感染すると抗生物質投与による保存的治療では鎮静はほぼ不可能であり、人工物を摘出しなければならぬ。しかし、(特にハイリスク患者では)摘出・置換という再手術は非常に危険で極めて死亡率が高い。

合成膜の代わりに自家生体組織膜で stent をカバーする事が出来れば、合成膜の欠点を克服して感染に対する抵抗性・細動脈への使用に耐えうる強力な抗血栓性・急速な自家組織進入を誘導できる高い生体適合性・強い屈曲やコンプライアンスへの高い追従性が獲得出来ると考える。

体内に非毒性・非溶解性の異物を埋入すると、生体防御機構によってカプセル状の組織体で皮膜化されることは古くから知られている。この反応を利用して我々は、患者の体内で、簡便かつ安全に様々な形態の自家組織結合体を形成する再生医療技術、『生体内組織形成技術』を開発してきた。

この技術を用いて作製した管状結合組織小口径代替血管“Biotube”は、生体血管に近いコンプライアンスを有し、かつ実験動物の自家動脈への移植で、高い耐久性、良好な開存性、迅速な内皮化、階層状の動脈構造の再構築が、移植後に体内で誘導されることが確認できている。

これらのデータを基に、自家生体組織膜で覆われた covered stent “Biocovered stent”を開発し、小口径・大口径血管への応用を試みている。

これまでの実験で、内径 3 mm のバルーン

拡張型冠動脈 stent を径 3 mm のシリコンチューブにマウントしてウサギ皮下に埋入すると、4 週間には完全に自家組織膜に覆われていた。これを摘出し、そこからシリコンチューブを抜去することで Biocovered stent を得た。ステント骨格は完全に自家組織膜で覆われており、バルーンカテーテルへのマウント・再拡張操作を繰り返しても自家組織膜の損傷は無く、バルーンカテーテルを用いた血管内治療への応用が可能である事が確認できた。

同種血管内移植実験として、バルーンカテーテルにマウントした Biocovered stent をウサギの大腿動脈経由で腹部大動脈(径 3 mm)内に留置した。留置は容易であり、4 週後の血管造影で良好な開存を確認出来た。摘出した Biocovered stent 内腔は平滑で、血栓形成を認めなかった。同様に内径 9 mm の自己拡張型 stent と径 8.5 mm のアクリルチューブによる Biocovered stent も作製可能である事を予備実験ですでに確認し、大口径血管への応用の可能性を確認している。

2. 研究の目的

stent を合成膜シートで覆った“covered stent”は、現在動脈疾患の臨床で急速に普及しているが、生体適合性や抗血栓性が十分ではなく、また感染に弱いなどの問題を有している。

本研究では、人工物の代わりに自家生体組織膜を用いればこれらの欠点を補えるという発想の元に、我々が開発してきた生体内組織形成技術を応用して、自己の体内において簡便に作製出来る生体適合性の高い covered stent “Biocovered stent”の開発を目的としている。

3. 研究の方法

予備実験では PTA バルーンカテーテルにマウントした中・小口径 Biocovered stent を、ウサギの総大腿動脈より 4 Fr. シース経由で腹部大動脈に留置した。しかし、これを大口径血管にそのまま応用するには問題点がある。血流の多い中大口径血管では、バルーンカテーテルは血流に押されて目的部位で拡張できずに末梢へと流されてしまう。これでは的確な治療とならないために、臨床においてはバルーン拡張型 stent ではなく、自己拡張型 stent が使用されている。本研究において対象となるのは、ヒトの大動脈に適應できる 20 から 30mm 径の stent であり、まずは至適な自己拡張型 stent の選択から始まり、それによる Biocovered stent の作製法の確立を行う。作製できた Biocovered stent は、移植前に組織学的検討を行い、移植実験に用いるに値する物かどうかを検証する。加えて、それを展開・留

置するための、有効なデリバリーシステムを作製する。そして最終的にはこれらを用いた大口径血管への移植（留置）実験を行い、移植後の特性を検証する。

4. 研究成果

大口径血管用の自己拡張型 stent としては、入手可能である Gianturco Z-stent の拡張時径 40mm、長さ 50mm（2 連 stent）と、拡張時径 40mm、長さ 75mm（3 連 stent）の 2 種類を準備した。マウントする基材としてはシリコンチューブを選択し、径は 20mm と 18mm を準備した。

バルーン拡張型 stent と異なり、拡張時 40mm 径の stent をシリコンチューブの径（20もしくは18mm）に単純に縮めてマウントさせることは無理であるので、工夫が必要となる。吸収系で外から結紮する方法では、結紮系を減らすと固定が不安定となり、シリコンチューブから浮く部分が出来て、stent 骨格が自己組織膜で十分に覆われない部分が出来てしまった。一方で固定を増やすと、吸収系の部分での炎症反応を来し、これもまた不均一で移植実験に用いるに値しない物であった。

他の固定方法、接着剤の使用等も試みてみたが、いずれも思うような効果は得られず、固定という考え方は捨てるを得なかった。

これまでに、Biotube の作製において、その厚みを増すために、一旦作製した Biotube を組み合わせて一体化させる方法を考案しており、この方法を応用した方法を用いる方針とした。Biotube を作製する手技と同様に、20mm 径シリコンチューブをビーグル犬の皮下に植え込み、4 週後にそれを摘出して 20mm 径の Biotube を得た。この内腔に Z-stent を展開し、その内腔に再び 20mm 径シリコンチューブを挿入した上で、再度ビーグル犬の皮下に植え込んだ。



しかし、感染等の問題で安定した Biocovered stent を得ることが出来なかった。

Biotube とは異なり、大きな組織を摘出して再植え込みしなければならないことによる負荷が易感染に結びついたと考えられた。

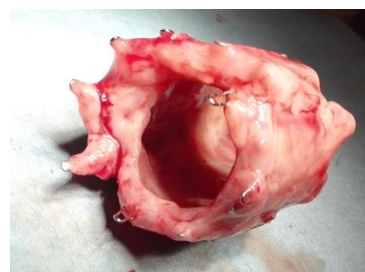
そこで、基材を植え込んだ 4 週後に完成した Biotube を完全に摘出せずに、片端だけを剥離して一旦基材を取り出し、摘出されてい

ない Biotube の内腔に Z-stent を展開。その内腔に再度基材を挿入して閉創し、更に 4 週後に摘出する方法を考案した。

この方法で作製した Biocovered stent は、内腔は完全に自己組織で覆われており平滑で、stent 骨格の露出はなかった。



一方、外側は一部 stent 骨格が露出している部分があった。また、植え込み中の動物の体動などが影響していると考えられる stent 骨格の変位が認められ、Z-stent 展開時にままの形態を維持することは困難であった。



作製を行ってきた上での問題点としては、シリコンチューブ 20mm に対して、Z-stent は最大拡張時に 40mm と過拡張過ぎるために、外側の骨格露出が生じているのではないかという懸念がある。また、Z-stent は骨格間の接続（bridge）が弱く、外力による変形を来しやすく、形態を維持できないと思われる。本研究においては、入手可能な stent として Z-stent を選択したが、これには限度があると考えられる。他の入手可能な stent の存在を再度調べる必要があるが、当面は stainless wire を加工して、自己で stent を作製している。

また、前実験では大型犬で大口径 Biotube を作製していたが、今回は様々な問題からビーグル犬を使わざるを得なかった。ビーグル犬で作製した Biotube の印象としては、大型犬ほどの厚み、強度を有していなかった。これが、Biocovered stent 作製後の外側への骨格露出につながっていると考えられる。動物種による大口径 Biotube の差の検討は、追加実験として取り組むべき課題であり、今後安定した Biocovered stent 作製実験を行う上で、動物種の選択は重要事項であると考えられる。

続いて移植実験に向けてのデリバリーシステムであるが、こちらも難航している。まずは、安定した Biocovered stent 作製が得られていない点はあるが、市販の stent graft に比

べて Biocovered stent は厚く、市販のデリバリーシステムに納めるのは困難であった。

厚みのコントロールは現時点では可能な手技ではない。また、血流に押されずに目的部位に展開するために、市販のデバイスは様々な工夫が加えられているが、それをどのように我々の Biocovered stent に応用していくのかも難しい課題である。

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12件)(全て査読あり)

Kawajiri H, Sakai O, Endovascular repair of traumatic aortic injury using a modified, commercially available endograft to preserve aortic arch branches. *Ann Vasc Surg.* 28, 2014, 1032

Sumikura H, Nakayama Y, In vitro evaluation of a novel autologous aortic valve (biovalve) with a pulsatile circulation circuit. *Artif Organs.* 2014 Apr;38(4):282-9.

Mizuno T, Nakayama Y, Preparation of an autologous heart valve with a stent (stent-biovalve) using the stent eversion method. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2014 Jul;102(5):1038-45.

Kawajiri H, Sakai O, Two-stage hybrid repair of Kommerell diverticulum with supra-aortic debranching. *Thorac Cardiovasc Surg.* 63, 2015, 134-8

Nakayama Y, In-body tissue-engineered aortic valve (Biovalve type VII) architecture based on 3D printer molding. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2015 Jan;103(1):1-11.

Kawajiri H, Kanda K, Nakayama Y, Development of tissue-engineered self-expandable aortic stent grafts (Bio stent grafts) using in-body tissue architecture technology in beagles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2015 Feb;103(2):381-6.

Kawajiri H, Kanda K, Nakayama Y, Implantation study of a tissue-engineered self-expanding aortic stent graft (bio stent graft) in a beagle model. *J Artif Organs.* 2015 Mar;18(1):48-54.

Ishii D, Nakayama Y, Development of in vivo tissue-engineered microvascular grafts with an ultra small diameter of 0.6 mm (MicroBiotubes): acute phase evaluation by optical coherence tomography and magnetic resonance angiography. *J Artif Organs.* 2016

Kato N, Kanda K, First Successful Clinical Application of the In Vivo

Tissue-Engineered Autologous Vascular Graft. *Ann Thorac Surg.* 2016 Oct;102(4):1387-90.

Takewa Y, Nakayama Y, Implanted In-Body Tissue-Engineered Heart Valve Can Adapt the Histological Structure to the Environment. *ASAIO J.* 2018 May/Jun;64(3):395-405.

Terazawa T, Nakayama Y, Wall thickness control in biotubes prepared using type-C mold. *J Artif Organs.* 2018 Mar 30.

Ishii D, Nakayama Y, One year Rat Study of iBTA-induced "Microbiotube" Microvascular Grafts With an Ultra-Small Diameter of 0.6 mm. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2018 Jun;55(6):882-887.

[学会発表](計41件)

1. 坂井 修, TEVAR におけるアクセスルート損傷対策、日本血管外科学会学術総会、2014
2. 坂井 修, 初期成績から見た Endurant スtent グラフトシステムの利点と欠点、日本 IVR 学会総会、2014
3. 坂井 修, Conformable Gore TAG の初期成績、関西胸部外科学会、2014
4. Sakai O, Actual length of Endurant limbs is smaller than their nominal length. Annual ESAO congress, 2014
5. 坂井 修, Gore TAG を用いた TEVAR の成績、日本胸部外科学会定期学術総会、2014
6. 坂井 修, Conformable Gore TAG の初期成績、日本人工臓器学会、2014
7. M. Yamanami, K. Kanda, Y. Nakayama. Long-term results of autologous tissue extremely small-caliber vascular grafts (biotubes) in a rat abdominal aorta replacement model. International Congress of the European Society for Cardiovascular and Endovascular Surgery. 2014
8. K. Kanda, O. Sakai, Y. Nakayama. Development of in vivo tissue-engineered cardiovascular prostheses. International Congress of the European Society for Cardiovascular and Endovascular Surgery. 2014
9. H. Kawajiri, K. Kanda, Y. Nakayama. Development and implantation of tissue engineered self-expandable aortic stent grafts (bio stent grafts) using in-body tissue architecture technology in beagles. European Society of Cardiology Annual Meeting. 2014
10. Y. Takewa, Y. Nakayama, K. Kanda. Tatsumi. Key factors to develop

- histogenesis in a novel autologous heart valve implantation. European Society of Cardiology Annual Meeting. 2014
11. M. Yamanami, T. Watanabe, K. Kanda, Y. Nakayama. Long-term performance of autologous tissue ultra-small-caliber vascular grafts (biotubes) in a rat abdominal aorta replacement model. European Society of Cardiology Annual Meeting. 2014
 12. Y. Takewa, Y. Nakayama, K. Kanda. A tailor made valve surgery with a novel autologous bioprosthesis. European Society of Cardiology Annual Meeting. 2014
 13. Yamanami M, Watanabe T, Kanda K, Nakayama Y. Long-term Auto-implantation of autologous tissue small caliber vascular grafts (Bio-tubes). European Association of Artificial Organs Annual Meeting 2014
 14. Kawajiri, Kanda K. Development and Implantation of Tissue Engineered Selfexpandable Aortic Stent Grafts (Bio Stent Grafts) using in-body Tissue Architecture Technology in Beagles. European Association of Artificial Organs Annual Meeting 2014
 15. Watanabe T, Kanda K. Autologous Connective Tissue Membrane (Bio-Sheet) as a Substitute for Self-Pericardium. European Association of Artificial Organs Annual Meeting 2014
 16. Kawajiri H, Kanda K, Watanabe T, Nakayama Y. Development and Implantation of Tissue Engineered Self-expandable Aortic Stent Grafts. American Heart Association Annual Meeting 2014
 17. 坂井 修, Gore TAG による TEVAR の成績、日本血管外科学会学術総会、2015
 18. 坂井 修, C3 デリバリーシステム中樞ネック追従性向上のための工夫、日本血管内治療学会総会、2015
 19. 坂井 修, Conformable Gore TAG による TEVAR の初期成績、日本人胸部外科学会定期学術総会、2015
 20. R. Iwai, Y. Nakayama. Rapid in vivo maturation of BIOTUBE vascular grafts by giant drops patching of adipose-derived stromal cells (ADSCs). European Society of Cardiology Annual Meeting. 2015
 21. Y. Takewa, Y. Nakayama, K. Kanda. E. Tatsumi. A tailor made valve surgery with a novel autologous bioprosthesis. European Society of Cardiology Annual Meeting. 2015
 22. Yamanami M, Watanabe T, Kanda K, Nakayama Y. Development of shelf-ready xenogeneic vascular grafts; xenobiotubes. European Association of Artificial Organs Annual Meeting 2015
 23. Takewa Y, Kanda K, Nakayama Y. Development of a novel autologous bioprosthesis for a tailor made valve surgery. European Association of Artificial Organs Annual Meeting 2015
 24. Watanabe T, Kanda K. In Vivo Tissue Engineered Small Diameter Vascular Graft; Application To Off-pump CABG In The Porcine Model. American Heart Association Annual Meeting 2015
 25. Kawajiri H, Sakai O, Brachiofemoral through-and-through wire technique for hybrid arch repair. ISMICS 2016
 26. 岡 克彦, 坂井 修, Complicated B 型解離に対する治療戦略、日本血管外科学会総会、2016
 27. 山南 将志, 渡辺 太治, 神田 圭一, 『バイオチューブ・マトリックス』を活用した異種由来自己再生型小口径代用血管の開発、第 44 回日本血管外科学会学術総会、2016
 28. 岡 克彦, 坂井 修, 大動脈解離に対するステントグラフト内挿術、Metallic Stents & Grafts 研究会、2016
 29. 岡 克彦, 坂井 修, 腹部ステントグラフト内挿術 1000 例のレビュー、日本脈管学会総会、2016
 30. 山南 将志, 渡辺 太治, 神田 圭一, いつでも使用可能な異種由来自己再生型小口径代用血管『バイオチューブ・マトリックス』の開発、第 54 回日本人工臓器学会、2016
 31. Masashi Yamanami, Taiji Watanabe, Keiichi Kanda. The Development Of Xenogeneic, Self-Organizing Small-Diameter Vascular Graft Using Biotube Matrix. ESAO 2016
 32. 坂井 修, 非解剖学的血行再建と塞栓術により止血を得た食道癌術後、気管-腕頭動脈瘻の 1 例、関西胸部外科学会、2017
 33. 山南 将志, 渡辺 太治, 神田 圭一, 異種由来自己再生型小口径代用血管「バイオチューブ・マトリックス」の開発、第 16 回日本再生医療学会総会、2017
 34. 山南 将志, 渡辺 太治, 神田 圭一, 異種由来自己再生型小口径代用血管の開発血管の開発、第 16 回日本心臓血管外科再生治療研究会、2017
 35. Yamanami M, Watanabe T, Kanda K. Development Of In Vivo Tissue Engineered Xenogeneic Vascular Graft. Third International Symposium on Vascular Tissue Engineering. 2017

36. Fujita S, Kanda K. First Clinical Application Of The Human Bio tube To The Congenital Heart disease. Third International Symposium on Vascular Tissue Engineering. 2017
37. Yamanami M, Watanabe T, Kanda K. The Development of Xenogeneic, Self-Organizing Small-Caliber Vascular Grafts. TERMIS European Chapter Meeting 2017
38. Yamanami M, Watanabe T, Kanda K. Application of the xenogeneic decellularized tube matrix produced by in vivo tissue engineering to the 'off-the-shelf' small-caliber vascular graft. ESAO 2017
39. 山南将志、坂井 修、組織工学的手法で作製した脱細胞化結合組織膜の動脈パッチ移植への応用、日本心臓血管外科学会学術総会、2018
40. 山南将志、坂井 修、脱細胞化生体組織由来結合組織膜の動脈パッチ移植への応用、再生医療学会、2018
41. 山南将志、坂井 修、脱細胞化結合組織膜の動脈パッチ移植実験、心臓血管外科再生医療研究会、2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

該当無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂井 修 (OSAMU Sakai)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究員)・助教

研究者番号：10298432

(2)研究分担者

渡辺 太治 (TAIJI Watanabe)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究員)・特任助教

研究者番号：20448723

神田 圭一 (KEIICH Kanda)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究員)・講師

研究者番号：60295649

中山 泰秀 (YASUHIDE Nakayama)

国立研究開発法人国立循環器病研究セン

ター・研究所・室長

研究者番号：50250262