

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09968

研究課題名(和文) 下肢閉塞性動脈硬化症に対する新規生体吸収型バイオステントの開発

研究課題名(英文) Development of Biodegradable Biostent for peripheral arterial disease

研究代表者

吉川 公彦 (Kichikawa, Kimihiko)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10161506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はステント内腔側表面が内皮細胞層に被覆されたバイオステントの開発を行った。ステント骨格として生体吸収型ステントを使用した。ステント骨格の網目幅が広く、粗であるために、フィブリンゲル重合化の後に金属棒を取り外す際に、フィブリン膜の破壊、欠損を生じた。最終的には金属棒の表面のテフロンコーティングを行うことで、フィブリン膜の断裂を抑制できた。次にバイオステントの動物実験に移行した。ビーグル犬内皮細胞の分離は、大腿静脈を露出、切開して行った。内皮細胞の分離培養に成功し、金属ステントのフィブリン膜内面の内皮化を達成することができた。現在ビーグル犬頸静脈にバイオステントを留置し、経過観察中である。

研究成果の概要(英文)：We have developed the Biostent concept in which the luminal surface of the stent is completely covered with the endothelial layer. The experiments were conducted using a biodegradable stents. However, due to the sparse mesh of the stent, breakage and deficiency of the fibrin membrane occurred when removing the metal rod after fibrin gel polymerization. We finally obtained the complete fibrin layer by Teflon coating on the surface of the metal rod. Then animal trials have been conducted using beagles. Isolation of endothelial cells of beagles was performed by exposing the femoral vein. The femoral vein had a small diameter of 2-3 mm in diameter, and the cut section further shrunk and shortened the vessel, so it was difficult to isolate the cells. After repeating the procedures, we succeeded in achieving endothelialization of the inner surface of the fibrin membrane. Currently the Biostent has been placed in jugular vein of beagles and under observation.

研究分野：インターベンショナルラジオロジー

キーワード：PAD IVR EVT Endothelial layer Biostent Biodegradable stent

## 1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化と高齢化社会の到来に伴い動脈硬化性疾患が急増し、下肢動脈の閉塞性動脈硬化症による間欠性跛行や重症下肢虚血に悩まされる患者は増加の一途である。画像下治療 (Interventional Radiology; IVR) 技術の進歩により、血管内治療が従来の外科的バイパス手術に置き換わって低侵襲治療として第一選択となっている。我々は、これまでに下肢動脈疾患に対して金属ステントを導入し、治療成績の向上を図ってきたが、ステント留置後慢性期においてはステント内の内膜過形成による再狭窄が問題となってきた。近年、冠動脈同様に下肢動脈においても薬剤溶出ステントが本邦に導入され、内膜過形成の主たる原因となる平滑筋細胞の増殖を抑制する事で、長期開存率向上が報告された。しかし、薬剤として使用されているパクリタキセルが内皮細胞の増殖も同時に押さえてしまうため、ステント留置後の内皮化が遅延し、かつステント金属の血管内露出による慢性期血栓症のリスクが問題とされている。

金属ステントは長期的には生体内に異物を残す点で望ましくないため、近年、生体吸収型ステントの研究が盛んに行われている。しかし生体吸収型ステントも万能ではなく、ステント吸収過程におけるステント強度の減少、血栓形成のリスクが報告されている。血管内皮細胞は内膜過形成の原因となる平滑筋細胞の増殖を抑え、血小板凝集や凝固反応を抑制し、血管の拡張収縮などの生理機能の調整や、血管内環境の恒常性維持に寄与しており、ステント開存率向上に重要な役割を果たす。生体吸収型ステント内腔表面に内皮細胞を生着させたステント、生体吸収型バイオカバードステントの研究はこれまで報告されていない。

## 2. 研究の目的

以下の3つに集約される。

1 新規生体吸収型バイオステントの開発・作成 : 血管内皮細胞層含有の生体膜を用いたバイオステントを作成し、組織学的にステント表面の内皮細胞層の確認を行う。また、*ex vivo* 実験で血小板の付着度と凝固因子の消費量を評価する。

2 新規生体吸収型バイオステント留置後の生体内における変化の観察 : ビーグル犬の頸動脈に留置した新規生体吸収型バイオステントの血管内皮化およびステントの吸収過程を経時的に観察し、従来の人工膜 ePTFE カバードステントと比較することで、その有利性を証明する。

3 次世代のバイオマテリアルの開発  
血管内皮細胞に代わるバイオマテリアルとして脂肪組織由来幹細胞を用いたバイオステン

トの開発を行う。

## 3. 研究の方法

ビーグル犬の大腿動脈の一部を採取し、平滑筋細胞、内皮細胞を分離培養する。平滑筋細胞の培養溶液には DMEM (Gibco) に 10%、内皮細胞には EBM2 (Lonza) を使用する。平滑筋細胞は passage 5 まで、内皮細胞は passage 4 まで培養する。ステントは生体吸収されるポリ乳酸 (PLLA) 製 REMEDY ステント (京都医療設計) 6mm 径/36mm 長を使用する。1ml 当たり  $10 \times 10^6$  個の筋線維芽細胞を含有した fibrin gel をステントの中に内筒を挿入したシステムに注入し、ステント周囲に gel を行き渡らせる (ステントの fibrin gel による molding)。Fibrin の重合に 45 分間待ち、その後内筒を取り外し、Bioreactor に接続する。流量は 200ml/min に、流圧は 120/80mmHg に設定し、2 週間の conditioning を行う。その後ステント部分のみ取り外し、1ml 当たり  $4 \times 10^6$  個の内皮細胞を含有した EBM-2 をステント内に注入、内皮細胞がステント内全周に均一に接着するよう回転させながら 6 時間かけて内皮化を促す。その後 Bioreactor に再接続し、1 週間さらに conditioning を行う。漏斗状の筒を用いて、crimp しながら作製されたステントを 9F シース内に充填する。

ビーグル犬の大腿動脈を穿刺、ステントを充填した 9F シースを頸動脈に挿入し、生体吸収型バイオステントを頸動脈に留置する。対側の頸動脈には 6mm 径 5cm の市販の人工膜 ePTFE カバードステント Viabahn (W. L. Gore & Associates, Inc.) を留置する。2 週間おきに超音波で各ステントの開存率を評価する。3 か月、6 か月、12 か月後に血管造影でステント開存の有無を再評価した後にステントを摘出し、免疫染色、走査型電子顕微鏡での膜の構成成分、血管内皮層の評価を行う。また、生体吸収型バイオステントは骨格のステントの吸収程度も評価する。

## 4. 研究成果

生体吸収ステントのストラットの網目幅が金属ステントのものより広く、粗であるために、フィブリンゲル重合化の後に金属棒を取り外す際に、フィブリン膜の破壊、欠損を生じた。フィブリンゲルを支える骨組みとして生体吸収ステントが十分では無いことが判明した。フィブリン膜の破壊を生じないように、フィブリノゲンの濃度の変更や使用ステントの変更を試みたが、最終的には金属棒の表面のコーティングを行うことで、フィブリン膜の破壊を抑制することができた。

次にビーグル犬の動脈内皮細胞の培養の確立を行った。ビーグル犬から大腿動脈を露出し、5cm ほど分離採取した (図 1)。ビーグル犬大腿動脈は極めて細径であり、径 3mm 程度であったため、内皮細胞の採取、培養にも非

常に難渋したが、細胞増殖に成功した(図2)。

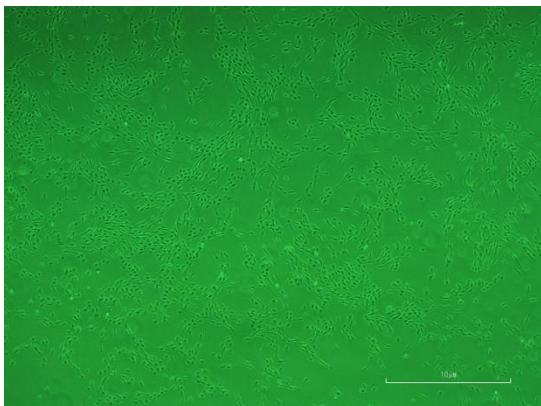
しかしステントの骨格の柔軟性の欠如と、粗なステント構造のために、カテーテル内への収納の際にフィブリン膜の著明な破壊が生じ、収納が困難であった。ステント収納法を改善するために、市販の金属ステントを用いたバイオステント(図3)収納実験へと移行した。

最終的にはステントを血管テープで2-3mmに圧縮した状態で、ステント端に外科用縫合糸を縫い付け、外科縫合糸を血管シースに引き込むことで、ステントのシース内への収納に成功した。ビーグル犬へのバイオステント留置試験にも成功した。現在経過観察中で、成果を論文報告する予定である。

<図1: ビーグル犬から大腿静脈採取>



<図2: ビーグル犬大腿動脈内皮細胞>



<図3: バイオステント>



## 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)

- ① Ichihashi S, Wolf F, Schmitz-Rode T, Kichikawa K, Jockenhoevel S, Mela P. In Vitro Quantification of Luminal Denudation After Crimping and Balloon Dilatation of Endothelialized Covered Stents. Cardiovasc Intervent Radiol. 2017 Aug;40(8):1229-1236.

[学会発表] (計 1 件)

- ① Ichihashi S, Wolf F, Schmitz-Rode T, Kichikawa K, Jockenhoevel S, Mela P. Impact of crimping and balloon dilatation on endothelialized covered stents. CIRSE 2016 2016年9月10-14日バルセロナ スペイン

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 公彦 (KICHIKAWA, Kimihiko)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10161506

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

市橋 成夫 (Shigeo Ichihashi)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号: 60597102