

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16403

研究課題名（和文）脱細胞化、再細胞化技術を用いた再生型カバードステントの開発

研究課題名（英文）Development of regenerative vascular covered stent by decellularized/recellularized technology

研究代表者

松原 健太郎（Matsubara, Kentaro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：70348671

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：生体吸収性ステントを骨格とし、脱細胞化、再細胞化により作成した血管移植片をグラフトに用いた再生型カバードステントの開発を目的に研究を開始したが、先行実験の結果をふまえて実験計画を修正した。生体吸収性ステントと金属ステントのブタ腸骨動脈留置後24週の遠隔期評価を行い、生体吸収性ステントと腸骨動脈の接触部における遠隔期の内膜肥厚による狭窄の程度や、血管壁の反応の詳細を評価し得た。またカバードステント留置後の開存性評価における、より低侵襲なレーザードプラ血流計による評価の有用性の検討を行い、ブタ足部におけるレーザードプラ血流計による計測が腸骨動脈狭窄による血流低下を検出していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、脱細胞化、再細胞化技術を用いた再生型カバードステントの開発という目的のもとに、関連する大動物実験を行った。生体吸収性ステント留置部の遠隔期の血管壁反応の詳細な評価は、これまでほとんど行われていないため、留置後24週までの病理組織学的、形態学的変化を評価できたことは、生体吸収性ステントに関わるあらゆる研究の基礎となるデータになると思われる。また大動物の血流評価における低侵襲なレーザードプラ血流計の有用性の検討は、大動物実験における手技の簡略化や、動物愛護の観点から意義のあるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to develop a regenerative covered stent using a bioabsorbable stent and decellularized/recellularized vascular grafts. We conducted a study to compare midterm vascular changes between bioresorbable stents and bare metal stents at 24 weeks after implantation in the porcine iliac artery. The bioresorbable stents showed favorable results in stenosis due to intimal thickening and vessel wall inflammation compare to bare metal stents. We also evaluated the usefulness of minimally invasive laser Doppler flowmetry in evaluation of patency of artery, and found that laser Doppler flowmetry was able to detect decrease of blood flow due to iliac artery stenosis in porcine model.

研究分野：血管外科

キーワード：生体吸収性ステント 血管内治療 カバードステント 脱細胞化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、わが国においては高齢化が急速に進行し、末梢動脈疾患 (PAD (Peripheral Artery Disease)) の患者が増加している。PAD に対する血管内治療は目覚ましい発展を遂げ、バルーンカテーテルによる血管拡張のみでは不十分だった血管内治療の治療成績は、金属ステント留置術の開発で大きく改善した。しかし血管径が比較的細く、血管の可動性が大きい大腿膝窩動脈領域では金属ステントの再狭窄、破損、血栓閉塞、遺残による追加治療の阻害が未解決の問題として存在する。ステント形状の改良や、再狭窄の原因である新生内膜過形成抑制のための薬剤溶出ステントの開発などがなされたが、遠隔期成績はいまだ十分ではない。その中で、カバードステントは金属ステントが人工血管で被覆されており、ステント破損のリスクを低減し、新生内膜の迷入による再狭窄を抑制しうることから、ひとつの有効な解決策として期待される。しかし一方で、人工血管内腔面には内皮化が生じないため、遠隔期においても血栓閉塞のリスクがあり、また異物として残存するため追加治療の阻害は避けられない。よって治療に必要な期間を過ぎた後にステント部分は吸収され、グラフト部分には自己細胞が誘導され、最終的に自己動脈壁と一体化するカバードステントを作成することができれば、金属ステントの諸問題を克服し、血管内治療の長期成績を向上できる可能性がある。

これまでわれわれは、骨格として金属ステントの代わりに生体吸収性ステントを用い、グラフトとして人工血管の代わりにブタ脱細胞化静脈を用いた新しいカバードステント開発の研究を進めてきた。ポンプを用いた循環システムと界面活性剤を中心とした洗浄液で作成したブタ脱細胞化静脈は、壁の弾性線維、膠原線維を含めた細胞外マトリックス構造だけでなく、生体血管とほぼ同等の強度、コンプライアンスも保持していた。一方われわれは、人体に存在する L-乳酸をベースとする生体吸収性ポリマーを用いた末梢血管用生体吸収性ステントの臨床応用に向けた臨床試験や基礎研究を行ってきた。このステントは、治療に必要な期間を過ぎた後に消失することで、金属ステントでみられた遠隔期のステント破損、追加治療の阻害などの問題を解決することが期待



図 1 再生型カバードステント外観

できる。これらを組み合わせ、生体吸収性ステントの内側に、ブタ脱細胞化静脈を内張りし、吸収糸で縫合固定して再生型カバードステントを作成した (図 1)。血管内治療で用いる前段階として行った、ブタ腸骨動脈への端々吻合による同種動脈置換術では、14 日目の評価で、有意狭窄や壁の瘤化を認めず、また脱細胞化静脈表面に一定範囲の内皮化を確認し得た。しかし血管内治療への応用を目的に、より小口径にしたところ、早期の血栓閉塞による著明な開存度の低下を認めた。むき出しの細胞外マトリックスには血小板凝集を生じるため、特に小口径になると閉塞しやすいことが原因と考えられた。小口径の脱細胞化血管の開存性向上には、移植前に内腔に抗血栓コーティングを施すことが有用とされている。血管内皮細胞や、末梢血/骨髄由来血管内皮前駆細胞などによる再細胞化の有用性が報告され、将来的な臨床応用に向けて、細胞ソースとして、より簡便で低侵襲な細胞の入手方法が模索されてきた。研究協力者である順天堂大学形成外科の田中里佳は、少量の血液から分離した末梢血単核球 (MNC; Mononuclear cell) を、無血清生体外培養増幅法 (QQc 法; Quality and Quantity Control Culture) で増幅する画期的な方法を用いている。QQc 法により少量の血液から、より多くの再生能力の高まった細胞 (MNC-QQc 細胞) を簡便に採取できることから、難治性四肢潰瘍患者への細胞移植による血管・組織再生治療に用いられており、今回本研究における再細胞化の細胞ソースとしての応用を想起した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、血管内治療で使用可能な再生型カバードステントを作成するとともに、被覆材である脱細胞化静脈への再細胞化による開存性の向上、内膜肥厚抑制効果を検討することである。すなわち、これまで作成した再生型ステントグラフトの構成要素である脱細胞化静脈や生体吸収性ステントの血管内留置に向けた詳細な検討を行うとともに、脱細胞化静脈への MNC-QQc 細胞などの再細胞化の最適なプロトコルの確立とその効果の検証を目指す。

3. 研究の方法

当初は研究計画・方法としてブタ脱細胞化静脈への再細胞化の最適化、ブタ腸骨動脈への無細胞再生型カバードステントの留置、免疫抑制ブタ腸骨動脈への再細胞化再生型カバードステントの留置などを検討していたが、先行実験の結果をふまえた研究計画の修正や、新型コロナウイルス感染症の拡大とその感染症対策に伴う研究実施体制の変動などにより、研究計画の大幅な変更を余儀なくされた。

(1) ブタ脱細胞化静脈の壁構造の検討

脱細胞化静脈への再細胞化をするにあたり、脱細胞化後の静脈壁の細胞外マトリックス構造がしっかり保持されていることをさらに詳細に確認するため、これまでの H E 染色や E V G 染色に加え、走査型電子顕微鏡による検討を行う。脱細胞化は、これまで確立したポンプを用いた循環システムと界面活性剤 (Sodium Dodecyl Sulfate) を中心とした洗浄液を用いる。

(2) ブタ腸骨動脈への金属ステントと生体吸収性ステント留置

われわれは、生体吸収性ステントをブタ腸骨動脈に留置し、6週間後の開存性や血管壁反応の検討を先行して行っていたが、その結果留置部分に一定の炎症を伴う中等度の内膜肥厚を生じる結果が得られた。よって、本研究で用いるカバードステントの血管内留置後の遠隔期成績を評価する際にも、カバードステント外壁を構成する生体吸収性ステントと、腸骨動脈の接触部における慢性的な炎症性変化や異物反応による内膜肥厚が同様に生じる可能性が懸念された。よって生体吸収性ステント単独でブタ腸骨動脈内に留置し、留置後24週までの遠隔期における観察を行い、金属ステントの結果と比較検討する。留置部分を血管造影、血管内超音波で経時的（留置直後、6、12、24週間後）に観察し、24週後に留置部動脈を採取し、血管壁の傷害・炎症反応について病理組織学的評価を行う。

(3) ブタ腸骨動脈狭窄モデルにおけるレーザードブラ血流計による血流評価の有用性の検討

カバードステント留置後の遠隔期の経時的な開存性評価において、手技の簡略化や動物愛護の観点から、より低侵襲なレーザードブラ血流計による評価の有用性を検討する。バルーン擦過によるブタ腸骨動脈狭窄モデルを作成し、バルーン擦過の2-3週間後に擦過部の狭窄率を血管内超音波で計測する。また患側および健側の足部をレーザードブラ血流計（ポケットLDF、株式会社ジェイ・エム・エス）で計測し、患側/健側比を算出し、動脈狭窄率との相関を検討する。

4. 研究成果

(1) ブタ脱細胞化静脈の壁構造の検討

走査型電子顕微鏡による評価で、脱細胞化処理による有効な内皮細胞の除去と細胞外マトリックス構造の保持を認めた。現状の脱細胞化プロトコールで、再細胞化の足場としての血管壁構造が保持されていることを確認し得た。

(2) ブタ腸骨動脈への金属ステントと生体吸収性ステント留置 (n=4)

留置部分を血管造影、血管内超音波で経時的（留置直後、6、12、24週間後）に観察した結果、生体吸収性ステントでは6週間後に狭窄が最も強く表れ内腔面積が減少するが、その後12週後、24週後には徐々に狭窄が改善し、内腔面積も増加していくという結果が得られた。金属ステントを腸骨動脈に留置した場合の24週後の評価では、狭窄率は経時的に進行し、内腔面積も減少を続ける結果が得られた（図2）。24週後のステント留置部血管壁の傷害、炎症についての病理組織学的評価（スコアリング）では、金属ステントと比較して、生体吸収性ステントは血管壁傷害スコア、炎症スコアともに優位に低値であった（図3）。これらより、生体吸収性ステントは従来の金属ステントとは違う遠隔期の血管壁への反応を有することが示された。

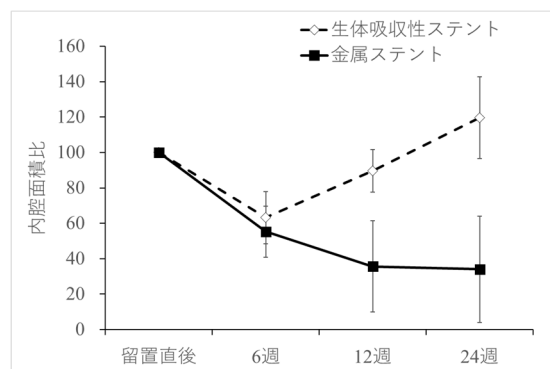


図2 ブタ腸骨動脈ステント留置部の内腔面積比の経時的変化

	生体吸収性ステント	金属ステント	P-value
炎症スコア	1.25 ± 0.516	1.67 ± 0.832	<0.001
傷害スコア	0.80 ± 0.430	1.74 ± 0.908	<0.001

図3 ブタ腸骨動脈ステント留置部の病理組織学的検討

(3) ブタ腸骨動脈狭窄モデルにおけるレーザードブラ血流計による血流評価の有用性の検討 (n=5)

バルーン擦過2-3週間後の評価で、ブタ外腸骨動脈の血管内超音波検査での狭窄と、病理組織学的な内膜肥厚を確認し得た。そして、その外腸骨動脈狭窄率は、レーザードブラ血流計計測値の患側/健側比と負の相関を示し、ブタ足部におけるレーザードブラ血流計による計測が外腸骨動脈狭窄による血流低下を検出し得ることが示された（図4）。

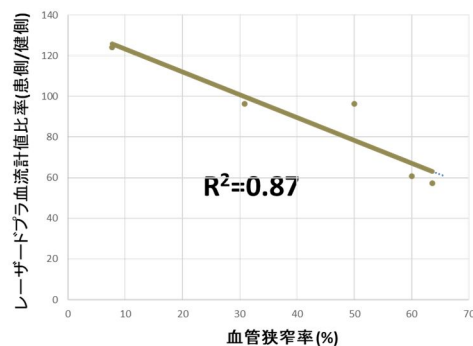


図4 足部レーザードブラ血流計値と外腸骨動脈狭窄の関係

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松原健太郎
2. 発表標題 異物を残さない再生型ステントグラフト開発に向けた基礎的研究
3. 学会等名 第46回日本血管外科学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------