

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18169

研究課題名（和文）脱細胞化ウシ心膜を用いた生体吸収性ステントグラフトの開発

研究課題名（英文）Development of biodegradable stent grafts using decellularized bovine pericardium

研究代表者

中西 仙太郎（Nakanishi, Sentaro）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：90596298

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：予定していたブタなどの大動物を用いた動物実験はコロナ禍のため大動物用の動物実験施設が使用不能であったため施行できなかったが、代替としてラットにおける生体吸収性素材（ポリカプロラクタン）を用いた人工血管植え込み実験を多数施行した。良好な中期開存性を確認したが、8か月経過してもポリカプロラクタンは完全には吸収されておらず、本研究の主題である生体吸収性素材を用いたステントグラフト開発のためにはマテリアルのさらなる改良が必要であることが示唆された。一方、生体吸収性ステントについてはマグネシウム骨格も用いた実験を行っており、現在も継続中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以下の3編の論文を発表し、生体吸収性素材を用いた血管再生の分野の研究発展に貢献した。Leal BBJ, et al. Front Cardiovasc Med. 2022, Wakabayashi N, et al. Front Cardiovasc Med. 2022, Kikuchi Y, et al. Biomater Sci. 2022

研究成果の概要（英文）：The planned large animal experiment using pigs and other animals could not be conducted due to the unavailability of the animal experiment facility for large animals due to the Coronavirus pandemic, but numerous experiments were conducted using biodegradable materials (polycaprolactone) for rat artificial blood vessel implantation as an alternative. Good mid-term patency was confirmed, but after 8 months, polycaprolactone had not been completely absorbed yet, suggesting that further improvement of the material is necessary for the development of stent grafts using biodegradable materials, which is the main topic of this study. On the other hand, experiments using biodegradable stents with magnesium frameworks are also ongoing.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：ステントグラフト Polycaprolacton 人工血管 3Dプリンター

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ステントグラフト内挿術の台頭により大動脈における治療方針は大きな変革期を迎えており、人工血管置換術がゴールドスタンダードであった感染性動脈瘤や大動脈解離、若年者症例に対して使用されるケースも増加してきている。しかし、人工物を体内に残すことによる弊害、若年者に対する生体適合性を含めた不透明な長期成績、ステントグラフトの剪断力における内膜損傷、留置対象血管との固着性不足に伴うずれなど、改良の余地が多分に残されている分野である。

### 2. 研究の目的

本研究では人工血管の代わりに脱細胞化したウシ心膜を用いて、それに生体吸収性ステントを組み合わせたオリジナルのステントグラフトを作成し、豚を用いた実験モデルにおけるステントグラフトの生体反動的・力学的側面の向上の可能性を模索し、さらなる症例の適応拡大と治療成績向上の可能性を図ることを目的としている。

### 3. 研究の方法

仮説：『被覆材料として生体製材を使用したステントグラフトでは、人工血管で被覆したステントグラフトよりも組織適合性が高く、自己組織と同一化して成長する』

上記仮説を立証すべく、以下の点を3年の研究期間において検討する。

1.ステントを縫合した生体材料と人工血管の双方における血管内皮への反応を病理学的な評価・比較して、生体材料の組織適合性の高さを明らかにする。

2.ステントを縫合した生体材料と人工血管の双方における力学的強度・固着度を比較し、ステントグラフトの留置後の位置異常に対する有効度を算出する。3.40kg程度の豚の血管に脱細胞ステントグラフトを留置したのち、1年後の成長した豚におけるステントグラフト自体の組織追従性を検討する。平成31年度「ウシ心膜脱細胞の適正化」脱細胞化した心膜の弾性力・張力を検証し、溶液の濃度を変更して最適な脱細胞液濃度を検討。平成32年度「脱細胞化心膜+ステント(以下脱細胞ステントグラフト)の豚血管内への留置、経過観察」調節した薬剤濃度において、ウシ心膜(Edwards lifescience社)を脱細胞化・脱細胞化したウシ心膜に生体吸収性ステント(京都医療設計;Remedy stent 径5mm-9mm、材質:生体吸収性ポリマー)を縫着・豚を全身麻酔にて安定させ、全身麻酔下の豚の大腿動脈を露出、ヘパリンを0.1ml/kg投与・大腿動脈を遮断して切開し、透視下で愛護的に下行大動脈まで脱細胞ステントグラフト、カバードステント(BIRD;Fluency plusステント径8mm,10mm 人工血管材質:ePTFE、ステント:ニチノール)を到達させて留置、バルーンで適切な圧で圧着させる。各ステントグラフトを豚10頭ずつに予定する。切開した血管を縫合の上、血管遮断を解除させる。十分な止血、吻合部より末梢側の血流の状態を確認の上閉創。生体吸収性ステントウシ心膜・術後24週経過観察群・48週経過観察群にそれぞれ5頭ずつ振り分け、その間に適宜血流・形態評価を行う。血流評価:4週間毎に超音波検査にて評価形態評価:術後1週間、12週、24週、48週にCTにて評価。平成33年度「留置した脱細胞ステントグラフトの評価」全身麻酔の上、留置したステントグラフト部位を露出して、外膜ごしに留置部位血管を視診し、その周囲と留置部位以外の血管と比較する。経静脈的にカリウムを投与し、豚を安楽死させる。留置した脱細胞ステントグラフトを自己動脈と一塊にして広範囲に愛護的に摘出する。ステントグラフト留置部位の血管変性と強度、力学的評価、24週・48週経過観察群の両群での血管径拡大に伴う追従性を評価する。

### 4. 研究成果

予定していたブタなどの大動物を用いた動物実験はコロナ禍のため大動物用の動物実験施設が使用不能であったため施行できなかったが、代替としてラットにおける生体吸収性素材(ポリカプロラクタン)を用いた人工血管植え込み実験を多数施行した。良好な中期開存性を確認したが、8か月経過してもポリカプロラクタンは完全には吸収されておらず、本研究の主題である生体吸収性素材を用いたステントグラフト開発のためにはマテリアルのさらなる改良が必要であることが示唆された。一方、生体吸収性ステントについてはマグネシウム骨格も用いた実験を行っており、現在も継続中である。

The planned large animal experiment using pigs and other animals could not be conducted due to the unavailability of the animal experiment facility for large animals due to the Coronavirus pandemic, but numerous experiments were conducted using

biodegradable materials (polycaprolactone) for rat artificial blood vessel implantation as an alternative. Good mid-term patency was confirmed, but after 8 months, polycaprolactone had not been completely absorbed yet, suggesting that further improvement of the material is necessary for the development of stent grafts using biodegradable materials, which is the main topic of this study. On the other hand, experiments using biodegradable stents with magnesium frameworks are also ongoing.

以下に本研究プロジェクトにおいて発表した論文の要約を付記する

Leal BBJ, Wakabayashi N, Oyama K, Kamiya H, Braghirolli DI, Pranke P. Vascular Tissue Engineering: Polymers and Methodologies for Small Caliber Vascular Grafts *Front Cardiovasc Med.* 2021 Jan 11;7:592361.

Cardiovascular disease is the most common cause of death in the world. In severe cases, replacement or revascularization using vascular grafts are the treatment options. While several synthetic vascular grafts are clinically used with common approval for medium to large-caliber vessels, autologous vascular grafts are the only options clinically approved for small-caliber revascularizations. Autologous grafts have, however, some limitations in quantity and quality, and cause an invasiveness to patients when harvested. Therefore, the development of small-caliber synthetic vascular grafts (<5 mm) has been urged. Since small-caliber synthetic grafts made from the same materials as middle and large-caliber grafts have poor patency rates due to thrombus formation and intimal hyperplasia within the graft, newly innovative methodologies with vascular tissue engineering such as electrospinning, decellularization, lyophilization, and 3D printing, and novel polymers have been developed. This review article represents topics on the methodologies used in the development of scaffold-based vascular grafts and the polymers used in vitro and in vivo.

Kikuchi Y, Oyama K, Yoshida T, Naruse D, Tsutsui M, Kunioka S, Wakabayashi N, Kamiya H. Insulin therapy maintains the performance of PVA-coated PCL grafts in a diabetic rat model *Biomater Sci.* 2022 Jul 27. doi: 10.1039/d2bm00531j. Online ahead of print.

Vascular tissue engineering has shown promising results in "healthy" animal models. However, studies on the efficacy of artificial grafts under "pathological conditions" are limited. Therefore, in this study, we aimed to characterize the performance of polyvinyl alcohol (PVA)-coated poly-ε-caprolactone (PCL) grafts (PVA-PCL grafts) under diabetic conditions. To this end, PCL grafts were produced via electrospinning and coated with the hydrophilic PVA polymer, while a diabetic rat model (DM) was established via streptozotocin injection. Thereafter, the performance of the graft in the infrarenal abdominal aorta of the rats was evaluated in vivo. Thus, we observed that the healthy group showed CD31 positive/αSM positive cells in the graft lumen. Further, the patency

rate of the PVA-PCL graft was 100% at 2 weeks ( $n = 7$ ), while all the DM rats ( $n = 8$ ) showed occluded grafts. However, the treatment of DM rats with neutral protamine Hagedorn insulin (tDM) significantly improved the patency rate (100%;  $n = 5$ ). Furthermore, the intimal coverage rate corresponding to the tDM group was comparable to that of the healthy group at 2 weeks (tDM vs. healthy: 16.1% vs. 14.7%,  $p = 0.931$ ). Therefore, the present study demonstrated that the performance of the PVA-PCL grafts was impaired in DM rats; however, insulin treatment reversed this impairment. These findings highlighted the importance of using a model that more closely resembles the cases that are encountered in clinical practice to achieve a clinically applicable vascular graft with a small diameter.

Wakabayashi N, Yoshida T, Oyama K, Naruse D, Tsutsui M, Kikuchi Y, Koga D, Kamiya H. Polyvinyl alcohol coating prevents platelet adsorption and improves mechanical property of polycaprolactone-based small-caliber vascular graft *Front Cardiovasc Med.* 2022 Aug 11;9:946899.

The low patency of synthetic vascular grafts hinders their practical applicability. Polyvinyl alcohol (PVA) is a non-toxic, highly hydrophilic polymer; thus, we created a PVA-coated polycaprolactone (PCL) nanofiber vascular graft (PVA-PCL graft). In this study, we examine whether PVA could improve the hydrophilicity of PCL grafts and evaluate its *in vivo* performance using a rat aorta implantation model. A PCL graft with an inner diameter of 1 mm is created using electrospinning (control). The PCL nanofibers are coated with PVA, resulting in a PVA-PCL graft. Mechanical property tests demonstrate that the PVA coating significantly increases the stiffness and resilience of the PCL graft. The PVA-PCL surface exhibits a much smaller sessile drop contact angle when compared with that of the control, indicating that the PVA coating has hydrophilic properties. Additionally, the PVA-PCL graft shows significantly less platelet adsorption than the control. The proposed PVA-PCL graft is implanted into the rat's abdominal aorta, and its *in vivo* performance is tested at 8 weeks. The patency rate is 83.3% (10/12). The histological analysis demonstrates autologous cell engraftment on and inside the scaffold, as well as CD31/ $\alpha$ -smooth muscle positive neointima regeneration on the graft lumen. Thus, the PVA-PCL grafts exhibit biocompatibility in the rat model, which suggests that the PVA coating is a promising approach for functionalizing PCL.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Leal Bruna B. J., Wakabayashi Naohiro, Oyama Kyohei, Kamiya Hiroyuki, Braghirolli Daikelly I., Pranke Patricia	4. 巻 7
2. 論文標題 Vascular Tissue Engineering: Polymers and Methodologies for Small Caliber Vascular Grafts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcvm.2020.592361	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ise Hayato, Oyama Kyohei, Kunioka Shingo, Shirasaka Tomonori, Kanda Hirotsugu, Akhyari Payam, Kamiya Hiroyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Hypothermic circulatory arrest does not induce coagulopathy in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10047-022-01324-5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kunioka Shingo, Shirasaka Tomonori, Narita Masahiko, Shibagaki Keisuke, Kikuchi Yuta, Saijo Yasuaki, Kamiya Hiroyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Five-minute test to prevent postcardiotomy reexploration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JTCVS Techniques	6. 最初と最後の頁 121 ~ 129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xjtc.2021.08.049	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakanishi Sentaro, Wakabayashi Naohiro, Ise Hayato, Kitahara Hiroto, Hirofuji Aina, Ishikawa Natsuya, Kamiya Hiroyuki	4. 巻 69
2. 論文標題 Proximalized Total Arch Replacement Can Be Safely Performed by Trainee	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Thoracic and Cardiovascular Surgeon	6. 最初と最後の頁 336 ~ 344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0040-1713354	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Leal BBJ, Wakabayashi N, Oyama K, Kamiya H, Braghiroli DI, Pranke P.	4. 巻 7
2. 論文標題 Vascular Tissue Engineering: Polymers and Methodologies for Small Caliber Vascular Grafts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcvm.2020.592361.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugimura Y, Chekhoeva A, Oyama K, Nakanishi S, Toshmatova M, Miyahara S, Barth M, Assmann AK, Lichtenberg A, Assmann A, Akhyari P.	4. 巻 15
2. 論文標題 Controlled autologous recellularization and inhibited degeneration of decellularized vascular implants by side-specific coating with stromal cell-derived factor 1 and fibronectin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1748-605X/ab54e3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 若林尚宏、菊池悠太、吉田巧、成瀬大輔、小山恭平、紙谷寛之
2. 発表標題 ポリカプロラクトン製小口径代用血管の親水化加工
3. 学会等名 第74回 日本胸部外科学会 定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊池悠太、筒井真博、若林尚宏、小山恭平、紙谷寛之
2. 発表標題 糖尿病ラットを用いた生体吸収性小口径人工血管の機能評価
3. 学会等名 第74回 日本胸部外科学会 定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊池悠太、小山恭平、筒井真博、紙谷寛之
2. 発表標題 糖尿病病態下における生体分解性小口径人工血管の機能評価
3. 学会等名 第34 回代用臓器・再生医学研究会総会
4. 発表年 2022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