

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16805

研究課題名（和文）血管内皮前駆細胞により生体外内皮化された薬剤溶出性ステントの開発

研究課題名（英文）Development of a drug-eluting stent with superior antithrombogenicity by ex vivo endothelialization of endothelial progenitor cells

研究代表者

塚田 実郎（TSUKADA, JITSURO）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：50573276

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：我々はゲッチング系ミニブタの血液からECFCを分離・増幅し、フローサイトメトリーで特性を確認した。市販のDESを骨格した新たな細胞塗布ステント作成方法を確立し、コンセプト実証実験、専用デリバリーシステム開発に成功し、特許出願を行った。さらにステント上の細胞量を間接的に計測する手法を追記しPCT出願を行った。ミニブタを使用し、両側腸骨動脈にECFC塗布ステントが留置可能であること、非石灰化研磨標本とし、顕微鏡的に観察可能なこと、negative controlの結果を得た。また1頭で、DES留置2週間後の血管造影検査でECFC塗布DES側の開存に対し、非塗布DES側で閉塞の結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲッチング系ミニブタの末梢血から、血管内皮コロニー形成細胞（ECFC）が分離できること、特定のDESを骨格とし、我々が開発した方法を用いることでECFC塗布DESが作成可能であり、今後ミニブタを用いた抗血栓性評価実験を行うための基盤が確立された。また本技術を社会実装する上で品質保証を担保することが重要となってくるため、ステント上の細胞量を間接的に計測する手法を確立した点は社会実装に向けた重要なマイルストーンとなった。また本研究を通してミニブタを用いた抗血栓性評価実験を行うために必要な手順、手技が確立できたため、安定した実験の継続が可能となった。

研究成果の概要（英文）：We isolated and amplified ECFCs from blood of Goettingian minipigs and characterized them by flow cytometry. We established a new method for creating cell-applied stent using a commercially available DES, successfully developed a proof-of-concept experiment and a dedicated delivery system, and filed a patent application. Furthermore, we added a method to indirectly measure the amount of cells on the stent and filed a PCT application. Using miniature pigs, we obtained the results that ECFC-applied stents could be implanted in bilateral iliac arteries, that non-calcified polished specimens could be observed microscopically, and that negative control results could be obtained. Angiography in one pig 2 weeks after DES implantation showed patency on the ECFC-applied DES side and occlusion on the non-applied DES side.

研究分野：放射線科学

キーワード：生体外内皮化 薬剤溶出性ステント 血管内皮コロニー形成細胞 抗血栓性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

経皮的血管形成術やステント留置術は、冠動脈疾患や末梢動脈疾患治療における第一選択として広く普及している。血管に対するステント留置は内皮細胞障害および内膜損傷を起し、同部の炎症が平滑筋細胞の遊走を惹起し、新生内膜過形成が生じてステント留置部に再狭窄を引き起こす。DES の登場により、ステント留置後の新生内膜過形成は著しく減少したが、溶出された薬剤がステント内腔の内皮化遅延を引き起こすことに起因する遅発性ステント血栓症が臨床的課題となっている。遅発性ステント血栓症の頻度は決して高くないが、20-40%の高い死亡率を有する重篤な合併症である。この問題に対して、現在臨床的には長期にわたる抗血小板剤二剤併用療法(Dual antiplatelet therapy: DAPT)が行われているが、長期にわたる DAPT は出血性疾患の増加につながり、繰り返す入院や死亡率上昇との強い関連が示唆されている。

これらを背景として、血管内適合性を向上させ、DAPT 使用期間を短縮することが可能な新たな DES の開発が望まれている。

この問題を解決する技術の一つにステント表面の早期再内皮化手法がある。通常の血管壁では内皮細胞が一酸化窒素やプロスタサイクリン、ウロキナーゼといった物質を分泌することで血栓形成を阻害するとともに、平滑筋細胞の増殖や遊走も阻害している。このため、留置後のステント表面に内皮細胞層を素早く再生させることは、血栓形成阻害および新生内膜過形成阻害において重要な役割を担っている。

そこでステント表面の早期再内皮化を達成可能な手法の一つである、生体外内皮化を用いて DES 表面に血管内皮コロニー形成細胞(Endothelial colony-forming cell; ECFC)加工した場合、通常の DES と比較して高い生体適合性・抗血栓性を有するか、また生体内留置後に血栓形成のリスクを低減し、DAPT 使用期間を短縮するか、という点が本研究で解明したい学術的背景であった。

2. 研究の目的

ステント表面の早期再内皮化手法として、生体外でステント表面を内皮化させる生体外ステント内皮化と、留置したあとに血管内を循環している細胞を捕捉するための生体分子をステント表面に持たせる生体内ステント内皮化とが存在する。生体外ステント内皮化は、歴史的にペアメタルステントを用いた多くの技術が研究されてきているが、現在までにこの技法を用いて DES を内皮化した報告はみられていない。

そこで本研究では、血管壁側のみに薬剤が塗布され、血管内腔側には薬剤が存在しない DES を材料として使用し、DES に対して生体外ステント血管内皮化技法を世界で初めて応用した DES の開発を行う。これは世界的に報告のない独創的なデザインであり、留置後血栓形成阻害および新生内膜過形成阻害の点でもたらされる臨床的価値は大いに期待されることである。また近年ステント表面加工の技術にも向上がみられるが、患者自身の ECFC を使用して生体外でステント表面に塗布するという手法は究極の抗血栓性を有するテーラーメイド医療と考えられ、本研究により遅発性ステント血栓症を克服することが可能となれば、長期にわたる抗血小板剤二剤併用療法(DAPT)に伴う出血性疾患の減少が期待され、より長期的安全が担保されたステント留置術が可能となる。

3. 研究の方法

令和 2 年度は基礎となる研究の論文化(Tsukada J, J Tissue Eng Regen Med. 2020 Oct;14(10):1415-1427)と、動物実験を行うための準備を行った。国内メーカーと協力して効率的な生体外内皮化のための専用のデリバリーシステム(DS)を考案し、コンセプト実証実験として、ECFC を DES に塗布させたのち、細胞外マトリックスでコーティングしたシリコンチューブ内で培養し、周囲細胞外マトリックスの様子を観察した。また動物実験で使用するゲッチング系ミニブタを購入し、採血を行い、ECFC の分離を試みた。また腹部大動脈アプローチにより、両側腸骨動脈にステントが留置可能かどうか、血管造影検査が行えるかどうか、閉創ののちミニブタが飼育可能かどうか、食餌に抗血小板薬を混入して飼育可能かどうかを確認した。

令和 3 年度は、invitro endothelialization stent に関する review article(Tsukada J et al., Development of In Vitro Endothelialised Stents - Review. Stem Cell Rev Rep. 2022 Jan;18(1):179-197)を論文化した。また前年までの in vitro 実験で課題となっていた、デリバリーシステム内での効率的な細胞塗布方法について、新たな知見を得たためデザインを刷新し、有効性を検証した。また実際にミニブタの両側腸骨動脈に留置した DES を病理切片を顕微鏡的に観察し、血栓化や新生内膜肥厚を評価できるかどうか確認した。さらに研究の negative control として必要な血管損傷モデルの作成を行い、同部に細胞塗布なしの DES を留置し、抗血小板薬を投与しなかった場合、ステントが閉塞するかどうかを確認した。

令和 4 年度は、前年度に実施可能であることが確認された動物実験を 3 回施行した。ミニブタ末梢血から安定して ECFC を分離することが課題であったが、本年度は分離工程の一部見直しにより、安定した ECFC 分離が可能となった。このため本年度 1 頭目では実際に ECFC 塗布 DES を作成したのち、片側の損傷腸骨動脈には通常の DES を、反対側の損傷腸骨動脈には ECFC 塗布 DES

を留置し、DAPT を 3 日間継続させ、2 週間後の血管造影検査によるステント開存を評価した。2 頭目においては DAPT を 1 日間に短縮した結果を確認した。さらに同様の実験を行った 3 頭目では残念ながら手技中に心停止が生じ、結果を得るに至らなかったため、より安全に実験が行えるように手技工程を一部修正した。

さらに特願中の「血管内留置デバイスの製造方法および血管内留置デバイスの製造用保持具」の内容をさらに拡充するため、ステント表面上に存在する細胞量を間接的に計測する手法について実験を行い、実験の結果を追記して PCT 出願を行った。

4 . 研究成果

我々はゲッチング系ミニプタの血液から ECFC を分離・増幅し、フローサイトメトリーで目的とする ECFC が分離、増幅できたことを確認した。また市販の特定の DES を骨格した新たな細胞塗布ステント作成方法を確立し、コンセプト実証実験および専用デリバリーシステム開発に成功し、特許出願を行った。さらにステント上の細胞量を間接的に計測する手法を発見し、この内容を追記して PCT 出願を行った。ミニプタを使用し、両側腸骨動脈に ECFC 塗布ステントが留置可能であること、検体を非石灰化研磨標本とし、顕微鏡的に観察可能なこと、血管損傷モデルを作成し、ECFC 非塗布ステントを DAPT なしに留置した場合、血栓閉塞するという negative control の結果を得た。また 1 頭で、DES 留置 2 週間後の血管造影検査で ECFC 塗布 DES 側の開存に対し、非塗布 DES 側で閉塞の結果を得た。

本研究によりゲッチング系ミニプタの末梢血から、ECFC が分離できること、特定の DES を骨格とし、我々が開発した方法を用いることで、ECFC 塗布 DES を作成できることが確認された。この結果、ミニプタを用いた抗血栓性評価実験を行うための基盤が確立された。また本技術を社会実装する上で品質保証を担保することが重要となってくるため、ステント上の細胞量を間接的に計測する手法を確立した点は社会実装に向けた重要なマイルストーンとなった。また本研究を通じてミニプタを用いた抗血栓性評価実験を行うために必要な手順、手技が確立できたため、安定した実験の継続が可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsukada Jitsuro, Mela P., Jinzaki M., Tsukada H., Schmitz-Rode T., Vogt F.	4. 巻 18
2. 論文標題 Development of In Vitro Endothelialised Stents - Review -	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reviews and Reports	6. 最初と最後の頁 179 ~ 197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12015-021-10238-3	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Tsukada Jitsuro, Wolf Frederic, Vogt Felix, Schaaps Nicole, Thor?e Boveleth Sven, Keijdener Hans, Jankowski Joachim, Tsukada Hiroko, Jockenh?vel Stefan, Jinzaki Masahiro, Schmitz Rode Thomas, Mela Petra	4. 巻 14
2. 論文標題 Development of in vitro endothelialized drug eluting stent using human peripheral blood derived endothelial progenitor cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	6. 最初と最後の頁 1415 ~ 1427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/term.3107	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 血管内留置デバイスの製造方法および血管内留置デバイスの製造用保持具	発明者 塚田実郎、徳永武士	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-012899	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 血管内留置デバイスの製造方法および血管内留置デバイスの製造用保持具	発明者 塚田実郎、徳永武士	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-012899	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------