

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861115

研究課題名(和文)血管新生促進作用を持つ末梢動脈用生体吸収性ステントの開発

研究課題名(英文)Development of drug-eluting bioresorbable stent with angiogenic effect

研究代表者

松原 健太郎(Matsubara, Kentaro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70348671

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)：末梢動脈疾患の新たな治療方法の開発を目指し、G-CSF溶出生体吸収性ステントの開発を目的に研究を開始したが、予備実験結果をふまえて実験計画を修正した。金属ステントをコントロールとし、生体吸収性ステントのブタ腸骨動脈における開存性や血管壁反応の違いの検討を先行させた。留置6週間後の病理学的検討で、生体吸収性ステントは金属ステントと比較して、狭窄率、血管壁炎症、損傷スコアに違いはないものの、新生内膜面積で縮小傾向、中膜面積で拡大傾向を認めた。この基礎データをもとに薬剤溶出生体吸収性ステント作成に着手しつつある。またブタ下肢虚血モデルの作成実験を重ね、手術手技、虚血肢の血管撮影手技などを確立した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop drug-eluting bioresorbable stent with angiogenic effect for peripheral arterial disease. At first, we conducted a study to compare early vascular morphological changes between bioresorbable stents and bare metal stents to assess the biocompatibility in porcine iliac arteries by histomorphometric analysis. The percentage of the stenosis and the vascular injury and inflammatory scores were similar with both stents at 6 weeks. On the other hand, the neointimal area was smaller and the media area was larger in bioresorbable stents compare to bare metal stents. On the basis of the results of the reaction of vessel walls, we are currently trying to create G-CSF eluting bioresorbable stent. In terms of a large animal model, the procedure of porcine model of hindlimb ischemia was established.

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 末梢動脈疾患

### 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、また生活習慣が欧米化した結果、末梢動脈疾患 (PAD (Peripheral Artery Disease)) の患者が増加している。間歇性跛行患者には運動療法や、抗血小板薬、血管拡張薬による薬物療法が一定の効果を認めているが、それらに抵抗性の症例や、慢性重症下肢虚血にいたった症例では、バイパス手術や経皮的血管形成術 (PTA (Percutaneous Transluminal Angioplasty)) による血行再建術が行われる。重症下肢虚血の患者は、高率に重度の併存症を有するため、より低侵襲な治療方法を確立することが求められてきた。バルンカテーテルによる血管拡張のみでは不十分であった PAD に対する PTA の治療成績は、ステント留置術の開発で大きく改善されてきた。ステントの改良が進むにつれ、従来腸骨動脈のみに許されていたステント留置が、大腿動脈にまで適応が拡がり、PTA は低侵襲かつ有効な治療法として確立しつつある。しかし現在使用されているステントは金属製であるため、病変の治療後も血管内に残存するため、術後再狭窄やステントフラクチャー、また追加治療の阻害などの問題が指摘されている。これらの問題を解決するため、われわれは、治療に必要な期間を過ぎた後に消失する生体吸収性ステントの開発と、臨床応用に向けた研究を進めてきた。具体的には、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 (ポリ-L-乳酸 (PLLA ; Poly-L-lactic acid)) を用いたステントの開発を行っている京都医療設計株式会社と協力し、末梢血管用 PLLA ステントの研究を行っている。さらに PLLA ステントは、金属ステントに比べて、ステント内に薬剤を混入することが容易であるという特徴を有しており、生体吸収性という利点だけでなく、病変局所へのドラッグデリバリーステントとしての機能も期待されている。

一方、血行再建不能な重症下肢虚血患者に対する血管新生療法は、これまでに遺伝子治療や単核球細胞移植など様々な方法が報告されてきた。しかし現段階ではどれも小規模な試験にとどまっており、遺伝子導入や細胞移植といった特殊性や試料調整の煩雑さや安全性への懸念といった問題がある。Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) は元来、癌化学療法による好中球減少症の改善や、造血幹細胞の末梢血中への動員に用いられてきた薬剤であるが、最近、虚血肢の血管新生に影響することが報告されている。G-CSF の血管新生促進作用を確認するために、我々はマウスの下肢虚血モデルを用いた先行実験を行っている。マウスの大腿動脈を結紮して下肢虚血モデルを作成し、患肢の前脛骨筋に G-CSF 5 µg を 2 回筋注 (虚血作成後 4 日目および 6 日目) する G-CSF 投与群と、非投与群 (コントロール群) を比較した。虚血作成後 10 日目および 15 日目の患肢

前脛骨筋を採取し、CD31 免疫蛍光染色で毛細血管密度を評価した。G-CSF 投与群はコントロール群と比較して、毛細血管密度は高値を示し、G-CSF 投与はマウス下肢虚血モデルにおいて、血管新生を促進することが示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、末梢血管用生体吸収性ステントに、血管新生促進作用が期待される G-CSF を混入させ、G-CSF 溶出生体吸収性ステントを開発し、PTA と血管新生療法を融合させた、PAD に対する新たな治療方法を開発することにある。従来のステント留置術は、狭窄病変局所の治療のみを目的として開発されてきたが、生体吸収性ステントのドラッグデリバリー機能に着目し、血管新生促進作用をもつ薬剤を持続的に溶出すれば、局所治療と同時に末梢領域の血管新生を促すことが可能になる。これは PTA と血管新生療法の 2 つの治療を同時に行うという、まったく新しくかつ強力な PAD に対する治療の選択肢になりうると思う。

今回われわれは、京都医療設計株式会社と協力し、生体吸収性ステントに G-CSF を含有させた末梢血管用ステントの開発を試みる。そしてミニプタを用いた大動物実験で、G-CSF 溶出生体吸収性ステントの臨床応用に向けてその有効性と安全性を検証する。

### 3. 研究の方法

初年度初めに、ブタ腸骨動脈への生体吸収性ステントの留置実験の準備として、麻酔手技、ステント留置手技、血管造影手技の確立を図った。この予備実験で行った留置実験において、ブタ動脈ではステント留置部の内膜肥厚所見がヒトより強く認められる傾向が示唆されたため、当初の実験計画を以下のように修正した。

#### (1) ブタ腸骨動脈への金属ステントと生体吸収性ステントの留置

全身麻酔下に、ミニプタの総大腿動脈を露出し、これを穿刺し、透視装置下でガイドワイヤー下に腸骨動脈へカテーテルを誘導し、左腸骨動脈に金属ステントを、右腸骨動脈に生体吸収性ステントを留置する。金属ステントをコントロールとして、生体吸収性ステントのブタ腸骨動脈における開存性や血管壁反応の違いを検討する。新生内膜が形成される術後 6 週間後に、全身麻酔下に造影カテーテルを用いて血管撮影を行い、開存率、ステントフラクチャーなどの損傷の有無を確認する。その後安楽死させ、ステント留置部腸骨動脈の病理学的検査を行う。ステントを留置した腸骨動脈の組織切片を作成し、新生内膜面積、中膜面積、閉塞面積を算出し、形態学的なステント内再狭窄などを評価する。また、血管壁損傷スコア、炎症スコアを病理学的に評価する。

## (2) G-CSF 溶出生体吸収性ステントの分解性と強度の検討

ステントの安定性を確保するため、研究協力を得ている京都医療設計株式会社と、PLLA に G-CSF を混入させた際の PLLA の結晶化度を最適化し、さらに分解性試験を実施して分解性と強度について評価する。

## (3) ブタ下肢虚血モデルの作成

Buschmann らの用いたブタの末梢動脈疾患モデル (Buschmann IR, et al. Atherosclerosis 2003; 167:33-43) を参考にして、ブタの下肢虚血モデルを作成する。すなわち、全身麻酔下にブタの大腿動脈を露出し、大腿深動脈分岐直下の浅大腿動脈を結紮する。さらにその 4cm 遠位側にも結紮をおき、浅大腿動脈を二カ所で結紮する。

## (4) ミニブタ下肢虚血モデルで、薬剤非含有生体吸収性ステントと G-CSF 溶出生体吸収性ステント留置による患肢の血管新生の比較検討

ミニブタ下肢虚血モデルの作成と同時に、患肢の腸骨動脈にステントを留置する。薬剤非含有生体吸収性ステント留置群をコントロール群として、G-CSF 溶出生体吸収性ステント留置群と比較する。血流改善の評価方法としてはレーザー Doppler 法、血管内皮細胞密度測定、血管造影を行う。レーザー Doppler 法では結紮後に経時的に測定を行い、健常側との比で血流を評価する。組織の血管内皮細胞密度の測定は、患肢の筋肉を血小板内皮細胞接着分子の抗体 CD31 を用いて免疫蛍光染色して行う。血管造影は、頸動脈からカテーテルを挿入し、ヨード造影剤を注入して X 線撮影を行う。

## 4. 研究成果

### (1) ブタ腸骨動脈への金属ステントと生体吸収性ステントの留置

ミニブタ 5 頭に対し手技を行い、5 例全例で手技的成功を得た。留置 6 週間後に施行した血管撮影にて金属ステント、生体吸収性ステントともに全例で開存していた (図 1)。

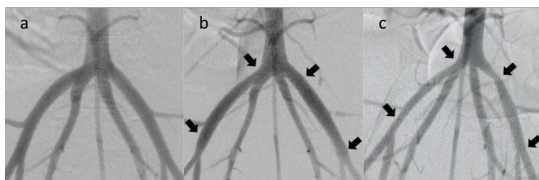


図 1 ブタ腸骨動脈血管撮影像 a. ステント留置前 b. ステント留置直後 (右: 生体吸収性ステント、左: 金属ステント、矢印: ステント端) c. 留置 6 週間後

留置 6 週間後のステント留置部の切片を作成し、H E 染色を行い、病理組織学的検討を行った (図 2)。新生内膜面積 (内弾性板内面積 - 血管内腔面積) は、生体吸収性ステント群において、金属ステント群と比較して有意

に縮小していた ( $5.83 \text{ mm}^2$  vs.  $16.85 \text{ mm}^2$ ,  $P < .001$ )。一方で、中膜面積 (外弾性板内面積 - 内弾性板内面積) は金属ステント群と比較して、生体吸収性ステント群で有意に拡大していた ( $5.08 \text{ mm}^2$  vs.  $3.09 \text{ mm}^2$ ,  $P < .001$ )。また狭窄率 (新生内膜面積 / 内弾性板内面積) は生体吸収性ステント群と金属ステント群で有意差を認めなかった ( $63.1\%$  vs.  $58.9\%$ ,  $P = .524$ )。

また留置 6 週間後のステント留置部の血管壁炎症スコア ( $0.073 \pm 0.021$  vs.  $0.027 \pm 0.010$ ,  $P = .062$ ) と、血管壁損傷スコア ( $0.053 \pm 0.014$  vs.  $0.023 \pm 0.009$ ,  $P = .085$ ) は、ともに生体吸収性ステント群と金属ステント群で有意差を認めなかった。

これらの結果より、生体吸収性ステントでは金属ステントと比較して、留置 6 週間後の狭窄率、血管壁炎症、損傷スコアに違いはないものの、異なった血管壁への反応を示していることが示された。また、これらの血管壁反応の基礎データをもとに G-CSF 溶出生体吸収性ステント作成に着手しつつある。

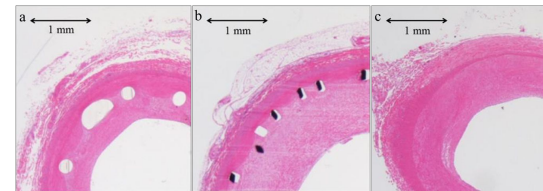


図 2 ステント留置 6 週間後のブタ腸骨動脈の病理組織像 a. 生体吸収性ステント留置部 b. 金属ステント留置部 c. ステント非留置部

## (2) ブタ下肢虚血モデルの作成

ブタ下肢虚血モデルの作成を複数回繰り返し、手術手技の確立を図り、また術前、術後の血管撮影検査の手技の安定を図った。図 3 の如く動脈結紮を行い、下肢虚血が導入されていることを血管撮影で確認し得た。

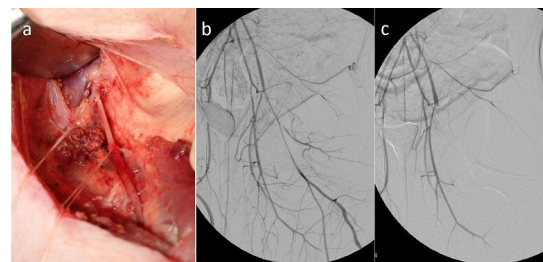


図 3 ブタ下肢虚血モデル a. 左浅大腿動脈結紮時の術野 b. 動脈結紮前の左鼠径部血管撮影 c. 動脈結紮後の左鼠径部血管撮影

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

松原 健太郎 (Kentaro Matsubara)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：70348671

##### (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

( )