

Title	異物を残さない組織再生型ステントグラフトの開発
Sub Title	Development of novel stent-grafts composed of bioresorbable Poly-L-lactic acid scaffold stents and decellularized porcine blood vessels by tissue-engineering technology
Author	下河原, 達也(Shimogawara, Tatsuya)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>本研究では、異物の残らない組織再生型ステントグラフトの開発を試みた。ブタ脱細胞化血管とポリL乳酸を主体とした生体吸収性ステントを縫合固定し、ステントグラフトを作成した。将来的な血管内治療への応用の前段階として、ブタ同種移植術による短期生体適合性評価を行い、良好な開存性、耐久性を確認し、さらに従来のステントグラフト被覆材である人工血管と比較して、良好な内皮化を確認し得た。また、動脈瘤に対する血管内治療への応用に先立ち、ブタ腹部大動脈への静脈パッチ形成術による形態学的な腹部大動脈瘤モデルを確立した。</p> <p>The goal of our research is to develop a tissue-engineered stent-graft (TESG) composed of bioresorbable stent and decellularized porcine blood vessels, which is expected to disappear of residual foreign material and integrate with aortic wall over time due to host cell recruitment. The aims of this study are to assess the characteristics of decellularized scaffolds, to create the TESG and to evaluate short term compatibility after implantation in porcine model. To create the TESG, the decellularized porcine vein using our optimized protocol was sutured inside the BRS. Prior to utilization for endovascular treatment, a surgical implantation in porcine model was successfully performed, and the short term results showed good patency and durability of TESG. Furthermore, the area of endothelialization was significantly greater in TESG compare to prosthetic graft. A porcine abdominal aortic aneurysm model was developed for evaluation of TESG in endovascular treatment.</p>
Notes	<p>研究種目：若手研究(B)</p> <p>研究期間：2015～2017</p> <p>課題番号：15K19926</p> <p>研究分野：心臓血管外科</p>
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K19926seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K19926seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19926

研究課題名(和文) 異物を残さない組織再生型ステントグラフトの開発

研究課題名(英文) Development of novel stent-grafts composed of bioresorbable Poly-L-lactic acid scaffold stents and decellularized porcine blood vessels by tissue-engineering technology

研究代表者

下河原 達也 (shimogawara, tatsuya)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：20649941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、異物の残らない組織再生型ステントグラフトの開発を試みた。ブタ脱細胞化血管とポリL乳酸を主体とした生体吸収性ステントを縫合固定し、ステントグラフトを作成した。将来的な血管内治療への応用の前段階として、ブタ同種移植術による短期生体適合性評価を行い、良好な開存性、耐久性を確認し、さらに従来のステントグラフト被覆材である人工血管と比較して、良好な内皮化を確認し得た。また、動脈瘤に対する血管内治療への応用に先立ち、ブタ腹部大動脈への静脈パッチ形成術による形態学的な腹部大動脈瘤モデルを確立した。

研究成果の概要(英文)：The goal of our research is to develop a tissue-engineered stent-graft (TESG) composed of bioresorbable stent and decellularized porcine blood vessels, which is expected to disappear of residual foreign material and integrate with aortic wall over time due to host cell recruitment. The aims of this study are to assess the characteristics of decellularized scaffolds, to create the TESG and to evaluate short term compatibility after implantation in porcine model. To create the TESG, the decellularized porcine vein using our optimized protocol was sutured inside the BRS. Prior to utilization for endovascular treatment, a surgical implantation in porcine model was successfully performed, and the short term results showed good patency and durability of TESG. Furthermore, the area of endothelialization was significantly greater in TESG compare to prosthetic graft. A porcine abdominal aortic aneurysm model was developed for evaluation of TESG in endovascular treatment.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：組織再生型ステントグラフト 脱細胞化 生体吸収性ステント 内皮細胞 平滑筋細胞 腹部大動脈瘤モデル

## 1. 研究開始当初の背景

感染性動脈瘤や大動脈消化管瘻のような致死性的かつ緊急を要する動脈疾患に対しては、低侵襲治療が望まれるにも関わらず、人工物遺残に伴う感染が問題となるため、既存のステントグラフトを用いた血管内治療は困難を極める。ステントグラフト治療と再生医学を融合させることで、異物を残さず最終的に自己動脈壁と一体化するステントグラフトを作成できれば、これら感染を伴う症例に対する低侵襲治療を実現しうる可能性がある。

脱細胞化とは、生体から採取した組織から細胞を除去し、コラーゲンを主成分とする細胞外マトリックス骨格を得ることである。脱細胞化組織は、臓器固有の立体構造を保持するため、人工材料と比較して再生を促進する特徴を有することから、近年、臓器再生の研究に盛んに用いられている。心血管系の脱細胞化に関しては、1980年代から研究がなされており、力学的特性、非免疫原性、再細胞化能力など、native vesselと比較して遜色ないとされており、既に同種脱細胞化心臓弁などが一部臨床応用されている。脱細胞化グラフトは、天然の細胞外マトリックス骨格を保持するため、移植後速やかに血管内皮細胞や血管平滑筋細胞などの自己細胞が誘導されるという特徴を有することから、最終的に自己動脈壁と一体化することが期待される。

一方、これまでに我々は、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））を用いた生体吸収性末梢血管用ステント（Igaki-Tamai stent, 商品名: Remedy、京都医療設計株式会社）の臨床応用に向けた研究を行ってきた。本ステントは、血管用生体吸収性ステントとして世界で初めて商品化に成功した Made in Japan のステントであり、大動物実験を経て 2000 年に冠動脈領域において臨床応用された。本ステントは、治療に必要な期間を過ぎた後に加水分解により消失するため、従来の金属性ステントでみられた血管内治療における術後再狭窄やステント破損、追加治療の阻害などの問題を解決することが期待されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、人工物遺残に伴う感染が問題となる症例に対しても使用可能な、異物を残さない組織再生型ステントグラフト（TESG; Tissue Engineering StentGraft）の作成を試みることであり、すなわち、生体由来の臓器骨格を有効利用した臓器再生のツールとして近年注目されている脱細胞化を血管グラフトに施すことで、細胞の無い血管移植片を作成し、生体吸収性末梢血管用ステントと組み合わせることにより、TESG の作成を目指す。TESG は、動脈内挿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ることで自己動脈と一体化する

ことが期待される。

## 3. 研究の方法

(1) ブタ動静脈の脱細胞化処理の最適化、および脱細胞化グラフトの病理組織学的・力学的評価

ブタから動静脈を採取し、肝臓の脱細胞化に用いている脱細胞化システムとプロトコル(Yagi et al. Cell Transplant 2012)を応用し、血管の脱細胞化を行う。具体的には、トリプシン、界面活性剤(SDS; Sodium Dodecyl Sulfate)を、ポンプを用いた循環システムで順次循環させて細胞を除去する。脱細胞化による細胞障害性をより減弱する目的で、洗浄液濃度および洗浄時間の検索を行い、至適な脱細胞化プロトコルを確立する。

作成した脱細胞化グラフトは、病理組織学的評価として、HE 染色、DAPI 染色、Elastic Van Gieson 染色を行い、細胞成分の遺残の有無、弾性繊維、コラーゲン繊維といった細胞外マトリックス構造の評価を行う。また、脱細胞化グラフトの力学的特性を、脱細胞化処理を施していない未処理血管をコントロール群として引張試験により比較検討する。また、脱細胞化プロトコルの有効性を DNA 定量にて行う。

### (2) TESG の作成

至適な脱細胞化プロトコルによって得られた脱細胞化グラフトを用いて TEGS の作成を試みる。すなわち、生体吸収性ステントの内側に同グラフトを内張りし、吸収性モノフィラメント系で縫合固定することで、TESG を作成する。

### (3) TEGS のブタ腸骨動脈への同種移植

最終的に血管内治療に用いる前段階として、TESG の短期的な機能および生体適合性評価を行う必要があり、当初の計画を下記の如く修正した。

すなわち、ブタ腸骨動脈を露出、一部切除し、端々吻合による同種移植術を行う。コントロール群として、企業製 SG の被覆材である ePTFE グラフトを PG 群として設定し、SG 群と比較検討する。機能評価は、血管造影検査ならびに血管内超音波検査(IVUS)により行う。また、移植した TEGS に自己細胞が誘導されると予想される移植後 2 週間以降に、移植片の開存性、移植片へのレシピエント血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の誘導・生着の状況を病理組織学的(HE 染色、EVG 染色、CD31・desmin 等の免疫蛍光染色)に評価する。

### (4) ブタ腹部大動脈瘤モデルの作成

大動脈瘤に対する血管内治療に応用する前段階として、形態学的なブタ腹部大動脈瘤モデルを Eton らの報告(Eton et al. J Vasc Surg. 1996)に基づいて作成する。具体的には、ブタ腹部大動脈を一部切開し、自家静脈を用いたパッチ形成術を施すことで、嚢状瘤

モデルを作成する。作成したモデルに血管造影検査を行い、形態学的な評価を行う。

#### 4. 研究成果

(1) ブタ動静脈の脱細胞化処理の最適化、および脱細胞化グラフトの病理組織学的・力学的評価

脱細胞化プロトコルの optimization を行い、脱細胞化工程における細胞障害性を最小限に抑えつつ、有効な細胞除去の得られるプロトコルの確立に成功した。脱細胞化グラフトの病理組織学的評価を、HE 染色、DAPI 染色、EVG 染色にて行い、血管壁細胞成分が十分に除去されている一方で、壁の立体構造や弾性線維、膠原線維を含めた細胞外マトリックス構造が凍結融解による影響は認めものの、概ね保持されていることを確認した（図 1A-F）。また、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて脱細胞化グラフトと未処理血管の血管内腔表面構造の評価を行ったが、同様に、脱細胞化手技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（図 1G,H）。さらに、脱細胞化プロトコルの有効性の評価を DNA 定量検査にて行い、脱細胞化後の血管片内 DNA 含有量は、未処理血管と比較して極めて低値であり、効率的に細胞成分を除去しうるプロトコルであることを確認した（図 1I）。次いで、膠原線維、弾性線維を含めた細胞外マトリックス構造の物理的強度を評価するために、その力学的特性を引張試験により評価した。その結果、脱細胞化グラフトは未処理血管と比較して応力、伸展率ともに同等であり、脱細胞化処理に伴う物理的強度の減弱は認めないことを確認した。また、脱細胞化動脈と静脈を比較検討した結果、応力、伸展率は同等であった。

以上より、1. 界面活性剤を用いた脱細胞化処理により良好な脱細胞化が可能である、2. 脱細胞化処理に伴う細胞外マトリックス構造への有意な影響はほぼ認められず、物理的強度が保持されている、3. 脱細胞化動脈・静脈では、両者の物理的強度に有意差は認めない、という結果をふまえ、本研究で作成するステントグラフトの被覆材料として、壁が薄く加工が容易である脱細胞化静脈を選択した。

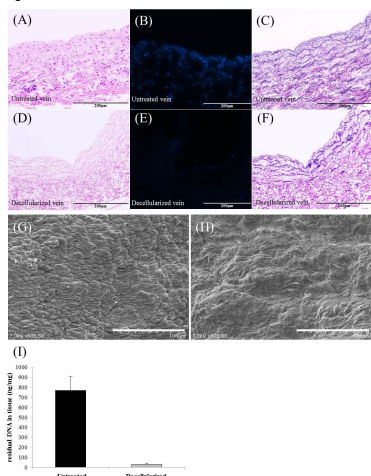


図 1. 脱細胞化グラフトの各種評価 (A-C)未処理血管 (左: HE、中央: DAPI、右: EVG) (D-F)脱細胞化グラフト(同上) (G、H) SEM 所見 (左: 未処理、右: 脱細胞化) (I) DNA 定量

#### (2) TEGS の作成

生体吸収性末梢血管用ステントの内側に、作成したブタ脱細胞化グラフトを内張りし、TEGS を作成した（図 2）。

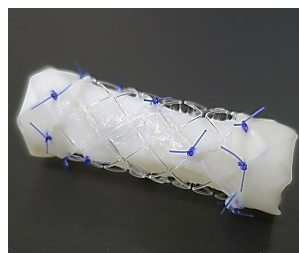


図 2. 脱細胞化グラフトと生体吸収性ステントによる TEGS の作成

#### (3) ブタ腸骨動脈への同種移植術

全例で手技的成功が得られ、術中血管造影検査ならびに IVUS で移植直後における TEGS、PG の良好な開存を確認し得た。計 3 頭に同種移植術を施行し、移植後 14 日目で短期機能評価を行った。その結果、移植後 14 日目時点で、SG 群は全例開存が得られていたが、PG 群では閉塞 1 例、狭窄 1 例を認めた。血管造影検査および血管内超音波検査で血管片内腔の評価を行ったが、移植した SG のグラフト部分の破綻、瘤化は認めなかった（図 3）。

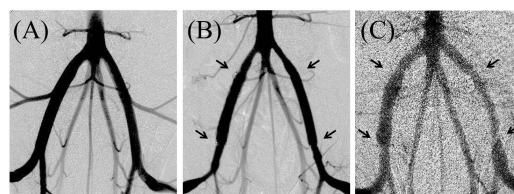


図 3. ブタ腸骨動脈血管造影所見 (A)移植前 (B)移植直後 (右: TEGS、左: PG) (C)移植後 14 日 矢印: グラフト端

病理組織学的検査では、SG 群で吻合部から移植片へと連続する内皮細胞および筋線維芽細胞の遊走を一定範囲において認めたが、PG 群ではほとんど認めなかった。また PG 群において、移植片内腔の血栓付着が多い傾向が確認された（図 4）。免疫蛍光染色により、SG 群では移植片内に CD31 陽性および Desmin 陽性細胞を認め、細胞外マトリックス構造のみの脱細胞化グラフトに血管を再構築しうる細胞成分の遊走を確認した（図 5）。以上から、TEGS は、従来の SG 被覆材である ePTFE と比較して、良好な内皮化と抗血栓性を有しており、短期的には生体への応用化が期待できる結果が得られた。



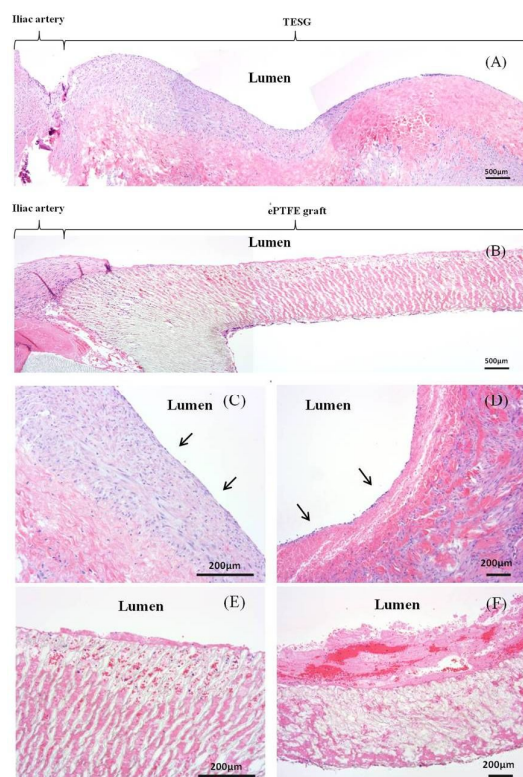


図 4. 移植後 14 日目に摘出した移植片の HE 染色所見 (A,C,D) TEGS (B,E,F) ePTFE (A,B,C,E) 長軸切片 (D,F) 短軸切片

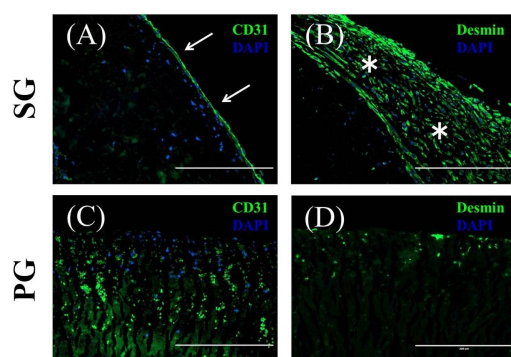


図 5. 移植後 14 日目に摘出した移植片の免疫蛍光染色所見 (A,B) TEGS (C,D) ePTFE 矢印: CD31 陽性細胞 アスタリスク: Desmin 陽性細胞

#### (4) ブタ腹部大動脈瘤モデルの作成

TEGS を腹部大動脈瘤に対する血管内治療に用いるため、形態学的な腹部大動脈瘤モデルの作成を行った。全身麻酔下にブタ腹部大動脈を露出し、横切開を加えた。次いで、生体内から静脈を採取し、長軸方向に切開を加え、静脈パッチを作成した。その後、横切開を加えた腹部大動脈を被覆する形で、パッチを非吸収糸で縫合固定した(図 6)。形態学的な囊状瘤が形成されていることを、血管造影検査で確認した。

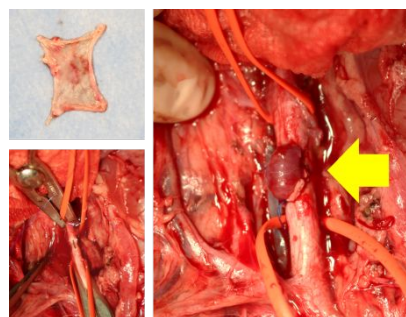


図 6. 形態学的なブタ腹部大動脈瘤モデルの作成

#### 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 4 件)

(1) 下河原達也、組織再生型ステントグラフトのブタ同種移植実験における人工血管との比較検討、第 58 回日本脈管学会総会、2017 年

(2) 下河原達也、組織再生型ステントグラフトのブタ同種移植実験における検討、第 44 回日本血管外科学会学術総会、2016 年

(3) 下河原達也、生体由来の代用血管開発に向けた脱細胞化血管の作成、第 36 回日本静脈学会総会、2016 年

(4) Tatsuya Shimogawara, Development of novel stent-grafts composed of bioresorbable Poly-L-lactic acid scaffold stents and decellularized porcine blood vessels by tissue-engineering technology, 17<sup>th</sup> Congress of the Asian Society for Vascular Surgery, 2016

〔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

下河原 達也 ( Shimogawara, Tatsuya )  
慶應義塾大学・医学部 ( 信濃町 )・助教  
研究者番号：20649941

### (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