

with different residual receptor activity were included and patients were not stratified by LDL-apheresis. It has been shown that an acute lowering of cholesterol by apheresis beyond a certain level results in an increase in cholesterol synthesis and there is a wide range of individual variation in the increase in cholesterol synthesis among FH patients [25,26]. The influence of dietary habits should also be considered regarding the low efficacy of ezetimibe in our study.

The dose of atorvastatin or simvastatin in our study was smaller than that used in previous studies conducted by Raal et al. [20] and Gagne et al. [8]. The possibility still exists that the efficacy of ezetimibe in our study could be improved by increasing the dose of atorvastatin up to 40 or 80 mg/day. Such a study should be carried out in the future through careful observation, case by case, avoiding the appearance of serious side effects, resulting from possible genetic differences in drug tolerance.

A marked rebound of LDL-cholesterol after each apheresis procedure shortens the period in the post-apheresis stage, during which LDL-cholesterol is kept within the range of serum concentration in which the progression of atherosclerosis is stopped [5,27]. Therefore, even a 10% reduction in such a rebound can be expected to lengthen this effective period and save lives. This 10% reduction is equivalent to increasing the dose two to four times in statin monotherapy [9].

Bile acid sequestering agents have been shown to be not only ineffective but also to increase LDL-cholesterol by strongly enhancing cholesterol synthesis [1,22,23]. An enhancement of cholesterol synthesis has also been reported for ezetimibe [21]. However, it has been shown that ezetimibe is effective in lowering cholesterol even in cases of homozygous FH [8,28,29] and the present study supports this by showing that the drug is effective even in a state where the synthesis of cholesterol is enhanced after apheresis procedure. Bile acid sequestering agents often result in an increase in TG, to a great extent in some cases [30]. There were no changes in TG levels in our patients. This shows that the mechanism of regulation of cholesterol synthesis by cholesterol and bile acids is different and is probably related to why ezetimibe is effective in patients with homozygous FH, while bile acid sequestering agents are not.

## References

- [1] Yamamoto A, Yokoyama S, Yamamura T. Intensive drug treatment for familial hypercholesterolemia. In: Paoletti R, Kritchevsky D, Holmes WL, editors. *Drugs affecting lipid metabolism*. Heidelberg: Springer Verlag; 1987. p. 269–73.
- [2] Yamamoto A, Sudo H, Endo A. Therapeutic effect of ML-236B in primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1980;35:259–66.
- [3] Thompson GR, Myant NB, Kirpatrick D, Oakley CM, Raphael MJ, Steiner RE. Assessment of long-term plasma exchange for familial hypercholesterolemia. *Br Med J* 1980;43:680–8.
- [4] Yamamoto A, Kojima S, Harada-Shiba M, et al. Plasmapheresis for prevention and regression of coronary atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1995;748:429–40.
- [5] Yamamoto A, Kawaguchi A, Harada-Shiba M, Tsushima M, Kojima S. Apheresis technology for prevention and regression of atherosclerosis. An Overview. *Ther Apher* 1997;1:233–41.
- [6] Harris M, Davis W, Brown WV. Ezetimibe. *Drugs Today* 2003;39:229–47.
- [7] Knopp RH, Dujovne CA, LeBeaut A, Lipka LJ, Suresh R, Velti EP, Ezetimibe Study Group. Evaluation of the efficacy, safety, and tolerability of ezetimibe in primary hypercholesterolemia: a pooled analysis from two controlled phase III clinical studies. *Int J Clin Pract* 2003;57:363–8.
- [8] Gagne C, Gaudet D, Bruckert E, Ezetimibe Study Group. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with atorvastatin or simvastatin in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation* 2002;105:2469–75.
- [9] Marais AD, Naoumova RP, Fitch JC, Penny C, Neuwirth CKY, Thompson GR. Decreased production of low density lipoprotein by atorvastatin after apheresis in homozygous familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 1997;38:2071–8.
- [10] Yamamoto A, Harada-Shiba M, Kawaguchi A, et al., Japan Atorvastatin/LDL-Apheresis Group. The effect of atorvastatin on serum lipids and lipoproteins in patients with homozygous familial hypercholesterolemia undergoing LDL-apheresis. *Atherosclerosis* 2000;153:89–98.
- [11] Yokoyama S, Hayashi R, Satani M, Yamamoto A. Specific removal of low-density-lipoprotein by plasmapheresis in familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis* 1985;5:613–22.
- [12] Nakamura M, Sato S, Shimamoto T. Improvement in Japanese clinical laboratory measurements of total cholesterol and HDL-cholesterol by the US Cholesterol Reference Method Laboratory Network. *J Atheroscler Thromb* 2003;10:145–53.
- [13] Hino K, et al. A new method for the homogeneous assay of serum HDL-cholesterol. *Clin Chem* 1996;42:298.
- [14] Nakamura M, Taniguchi Y, Yamamoto M, Hino K, Manabe M. Homogeneous assay of serum LDL-cholesterol on an automatic analyzer. *Clin Chem* 1997;43:260–1.
- [15] Noma A, Hata Y, Goto Y. Quantitation of serum apolipoprotein A-I, A-II, B, C-I, C-II, C-III and E in healthy Japanese by turbidimetric immunoassay: reference values, and age- and sex-related differences. *Clin Chim Acta* 1991;199:147–58.
- [16] Hattori H, Nagano M, Kawamura K, et al. A flow cytometric procedure to measure functional LDL receptors for diagnosis of familial hypercholesterolemia. In: Kostner GM, Kostner KM, Kostner B, editors. *Atherosclerosis: risk factors, diagnosis, and treatment*. SpA-Medimond Inc.; 2002. p. 357–63.
- [17] Altmann SW, Davis Jr HR, Zhu L-J, et al. Niemann-Pick C1 like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004;303:1201–4.
- [18] Feldman T, Koren M, Insull Jr W, et al. Treatment of high-risk patients with ezetimibe plus simvastatin co-administration versus simvastatin alone to attain National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III low-density lipoprotein goals. *Am J Cardiol* 2004;93:1481–6.
- [19] Ballantyne CM, Houri J, Notarbartolo A, et al., Ezetimibe Study Group. Effect of ezetimibe coadministered with atorvastatin in 628 patients with primary hypercholesterolemia: a prospective, randomized, double-blind trial. *Circulation* 2003;107:2409–15.
- [20] Raal FJ, Pappu AS, Illingworth DR, et al. Inhibition of cholesterol synthesis by atorvastatin in homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2000;150:421–8.
- [21] Davis HR, Pula KK, Alton KB, Burrier RE, Watkins RW. The synergistic hypocholesterolemic activity of the potent cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, in combination with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in dogs. *Metabolism* 2001;50:1234–41.
- [22] Miller NE, Clifton-Bligh P, Nestel PJ. Effects of colestipol, a new bile acid sequestering resin, on cholesterol metabolism in man. *J Lab Clin Med* 1973;82:876–90.

- [23] Goldfarb S, Pitot HC. Stimulatory effect of dietary lipid and cholestyramine on hepatic HMG-CoA reductase. *J Lipid Res* 1980;13:10210–3.
- [24] Yamamoto A, Matsuzawa Y, Kishino B, Hayashi R, Hirobe K, Kikkawa T. Effects of probucol on homozygous cases of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1983;48:157–66.
- [25] Pfohl M, Naoumova RP, Klass C, et al. Acute and chronic effects on cholesterol biosynthesis of LDL-apheresis with or without concomitant HMG-CoA reductase inhibitor. *J Lipid Res* 1994;35:1946–55.
- [26] Harada-Shiba M, Tajima S, Yokoyama S, et al. Siblings with normal LDL-receptor activity and severe hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 1992;12:1071–8.
- [27] Thompson GR, Mahler VMG, Mattews S, et al. Familial hypercholesterolemia regression study: a randomized trial of low-density-lipoprotein apheresis. *Lancet* 1995;345:811–6.
- [28] Hendriksz CJ, Norbury G, Tabrah S, Taylor A, Humphries SE. Homozygous hypercholesterolemia and ezetimibe: a case report. *Acta Paediatr* 2004;93:280–2.
- [29] Rodenburg J, Wiegman A, Vissers MN, Kastelein JJ, Stalenhoef AF. A boy with autosomal recessive hypercholesterolemia. *Neth J Med* 2004;62:89–93.
- [30] Witztum JL, Schonfeld G, Weideman SW. The effects of colestipol in the metabolism of very-low-density lipoproteins in man. *J Lab Clin Med* 1996;88:1008–18.

# LDLアフェレーシス —効果と限界—

国立循環器病センター動脈硬化・代謝内科  
榎野 久士

国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部  
室長  
斯波真理子

## [Summary]

家族性高コレステロール血症 (FH) ホモ接合体の心血管病予防に対する有効性が確立された治療法で、最も効果的な治療法はLDLアフェレーシスである。この治療法が登場したことにより、小児FHホモ接合体の心血管病の発症予防や、すでに発症した動脈硬化病変の改善が可能になった。しかし、この治療法は体外循環を必要とするため、4~6歳になるまで開始できず、治療開始時期が本来望まれる時期より遅れるという欠点もあり、さらに心血管病発症を完全に予防するまでには至らず、必ずしも良好な長期予後を得られないという治療効果の限界も存在している。

## Key Words:

家族性高コレステロール血症 □ ホモ接合体 □ 小児 □  
心血管病 □ LDLアフェレーシス

## はじめに

家族性高コレステロール血症 (familial hypercholesterolemia; FH) ホモ接合体は、生下時より皮膚黄色種、著明な高コレステロール血症 (600~1,000 mg/dL)、若年性動脈硬化症を呈する疾患である<sup>1)</sup>。この疾患は、LDL受容体遺伝子異常に起因する遺伝病であり、コレステラミン、HMG-CoA還元酵素阻害薬 (スタチン) などのコレステロール低下薬がほとんど無効である。それは、これらの薬剤の主な作用機序として、肝臓におけるLDL受容体の発現亢進を介するためである。そこで薬物療法の限界を克服する必要性から、LDLを血漿から強制的に除去する技術 (LDLアフェレーシス) が開発されてきた。FHホモ接合体は、生下時より著明な高コレステロール血症とそれに伴う動脈硬化症が存在することから、小児期よりこの治療法を行う必要があるが、その効果は決して十分とはいえない面もある。本稿では、小児におけるLDLアフェレーシスの有用性とその限界について述べる。

## LDLアフェレーシスの方法

### 1. 単純血漿交換法

1975年、ThompsonらによってFHで高コレステロール

表 当施設における小児LDLアフェレーシス例

アフェレーシス治療年齢	心血管疾患の所見
症例1(女) 症例2(男) 症例3(女) 症例4(女) 症例5(男)	4~26歳 6~20歳 9~29歳 6~30歳 12~34歳
	明らかな心血管病変なし 10歳時に大動脈弁上狭窄出現(圧較差70mmHg) 10歳時は冠動脈病変なし、27歳時、右冠動脈100%狭窄出現 6歳時に左主幹部(LMT)完全閉塞、10、15歳時にCABG、25歳graft50%狭窄、PTCA施行 大動脈弁狭窄(圧較差、閉鎖不全は悪化し、32歳時、大動脈弁置換術(AVR)を施行)

血症の是正、冠動脈狭窄の改善、黄色腫の消退といった臨床症状の著明な改善を認めた最初のアフェレーシス法である<sup>3)</sup>。この方法は自己の血漿を除去し、アルブミン溶液に置換することにより、血清コレステロール値を低下させる方法である。このため、免疫グロブリンやHDLなどの必要な物質も非選択的に除去されるという欠点をもつ。しかし、体外循環血液量が少ないので、現在は10歳未満のFHホモ接合体の患者にのみ用いられている。

## 2. 二重膜濾過法

住友病院の吉川、岸野らにより、わが国ですでに開発されていた二重膜濾過法がLDL除去に応用されるようになった。孔径の異なる2つの濾過膜を用い、一次膜によって血球と血漿を分離、二次膜によって血漿成分の中でも粒子の大きなLDLとVLDLを除去する方法である<sup>3)</sup>。単純血漿交換よりは選択的にLDL、VLDLが除去されるが、アルブミン(10%)やグロブリン(30~60%)も除去されてしまうことと、二次膜の目詰まりによる血漿処理量の限界という欠点を有する。

## 3. LDL吸着法(liposober system)

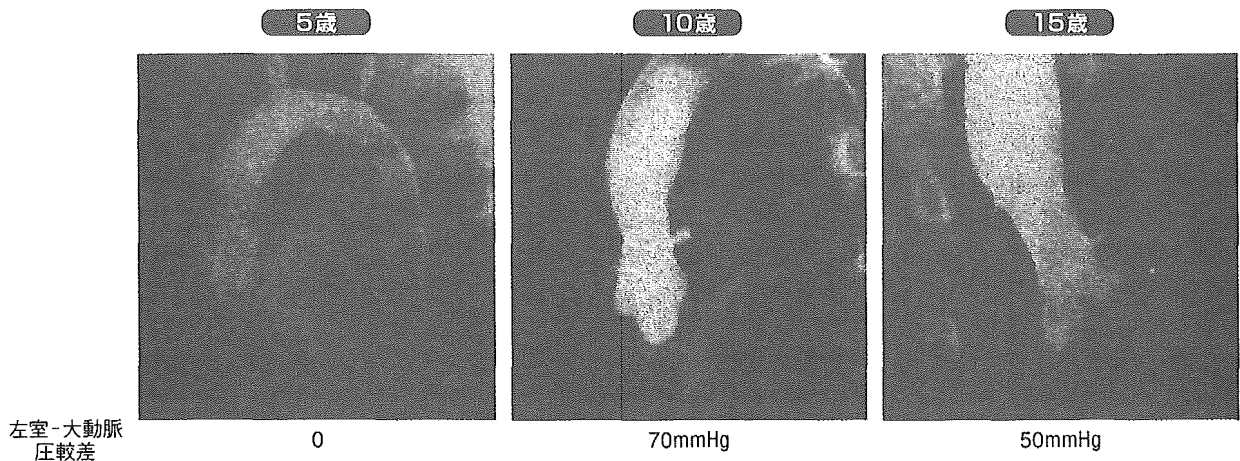
LDLがデキストラン硫酸に選択的に結合することをもとに、株式会社カネカと国立循環器病センターによって開発されたのがLDL吸着法である。血液を血球成分と血漿成分に分画したのち、陰性に荷電したデキストラン硫酸をリガンドとして多孔質ビーズに固定したカラムに通して、プラスに荷電したアポリポ蛋白質B[VLDL, LDL, Lp(a)]

などを特異的に除去する方法である<sup>4)</sup>。初期は容量400mLの大きなカラムが用いられていたが、現在は小容量(150mL)のカラム2本を用い、吸着されたLDLを高濃度のNaCl(5%)によって溶出させ交互に用いる方法がとられている。この方法はカラム容量も小さく効率もよく、血漿処理量を増加させてもLDL除去能が低下しない。したがって体外循環に伴う心負担が小さく、低体重にも比較的安全に施行できる。このシステムは、現在世界で一番のシェアを占めており、わが国でも広く用いられている。ただし、LDL吸着カラムは陰性荷電をもつために血液凝固系を活性化し、ブラジキニンが上昇することが報告されており、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬との併用は、ブラジキニン産生を急上昇させ、アナフィラキシー症状を引き起こすため禁忌である。

## 4. 直接全血リポ蛋白吸着法

(direct adsorption of lipoproteins from whole blood; DALI apheresis)

血液を血球成分と血漿成分に分離することなく、直接、LDL吸着カラムに通す方法であり、1998年からドイツを中心にはじめられた最も新しいアフェレーシス方法である。LDLの吸着体としてポリアクリルアミドを用い、陽性荷電したアポリポ蛋白Bを含むリポ蛋白を吸着する。利点としては、カラムが一つでシステムとしては簡便であり、コストもやや安価にできることや、所要時間が短いことなどがあげられる。Schmaldienstらの報告では、TC60%、TG39%、HDL-C11%といった除去率を示す<sup>5)</sup>。欠点として



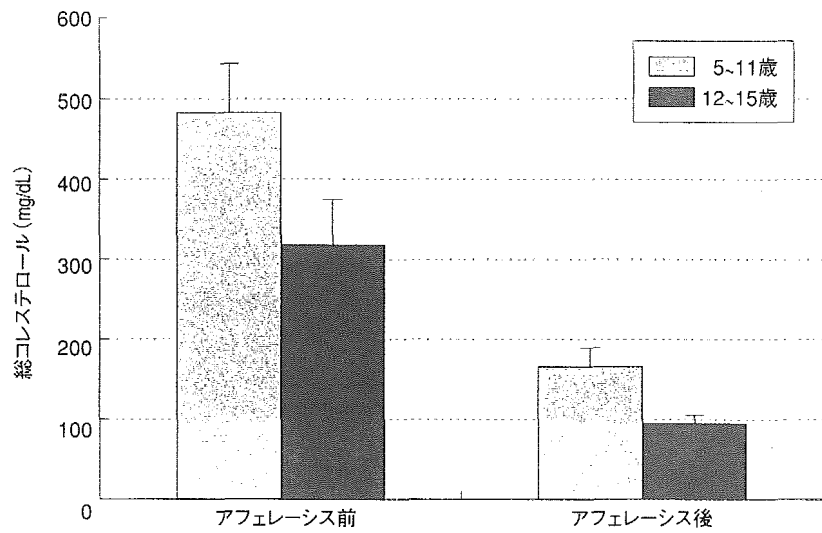
図① 症例2のAortography

は、吸着体の飽和によってLDLの除去効率が落ちるため、血漿処理量に限界があること、また体外循環量が多いことなどがあげられ、FHの小児には不適當である。またポリアクリルアミドもデキストラン硫酸と同様の陰性荷電をもち、ブラジキニン産生増加作用を有するため、ACE阻害薬は禁忌である。

#### 当施設における 小児LDLアフェレーシス治療成績

表に当施設におけるFHホモ接合体小児患者のLDLアフェレーシス治療例を示す。症例1はアフェレーシス治療にて開始から現在までの21年間、心血管疾患の発生を現在まで完全に抑制し得た例である。症例3はアフェレーシス開始後18年で冠動脈疾患を発症している。これらの例は、小児からアフェレーシスを施行することにより、少なくとも10年以上心血管病の発症を予防し得た例である。それに対し、症例2は症例1の弟であるが、6歳時にLDLア

フェレーシスを開始したものの、10歳時に大動脈弁上狭窄(左室-大動脈圧較差70mmHg)を指摘され、15歳時には圧較差50mmHgであった(図①)。本症例は、11歳時まで2週間に1回の単純血漿交換法、12歳時より1週間に1回のLDL吸着法を行っており、そのときの血清総コレステロール値を図②に示す。12歳時以降はLDL吸着法により、コレステロールを低く保つことができたため、圧較差の増悪が避けられたと考えられる。症例4は、6歳時のアフェレーシス開始時にすでに左冠動脈主幹部(LMT)が完全閉塞しており、その後2回のCABGが必要であった。この症例は、その後、5年間LDLアフェレーシスを施行することにより、腎動脈病変の改善を認めたことを報告している(図③)⁷。このように、心血管疾患予防効果が非常に良好な症例がある一方で、数年間しか動脈硬化を抑制できなかった例や、効果が乏しかった例も存在する。ただし、症例4に関しては、アフェレーシス開始時にすでに冠動脈疾患があることから、もう少し早期に治療開始できていれば、結果は変わっていた可能性もあると考えられる。また、症例5は9歳時に大動脈弁狭窄(圧較差12mmHg)を有しており、12歳

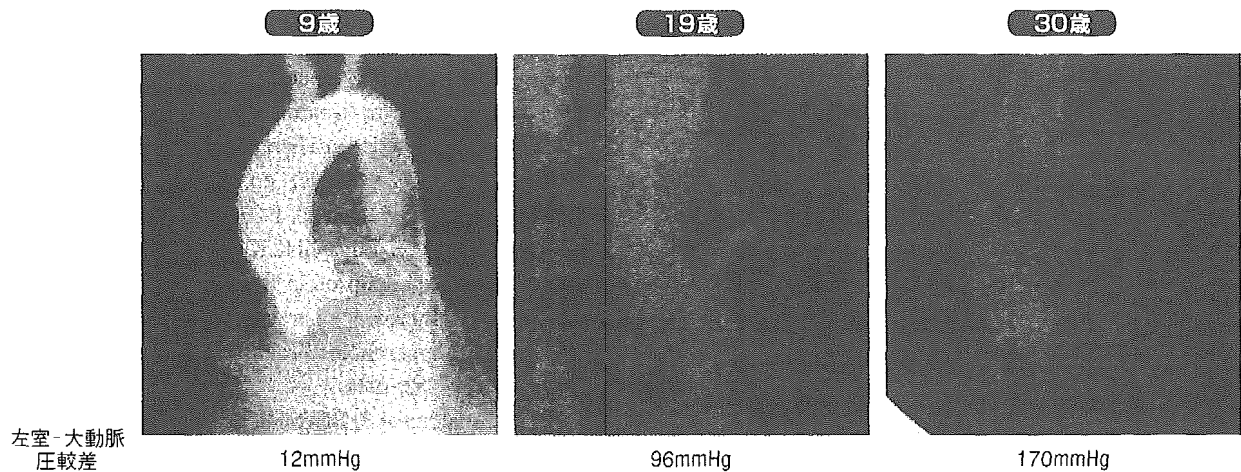


図② LDLアフェレーシス療法下の血清総コレステロール値

5-11歳：単純血漿交換法（1回/2週）  
 12-15歳：LDL吸着法（1回/週）



図③ 症例4の腎動脈病変



図④ 症例5のAortography

よりLDLアフェレーシスを開始、19歳時に圧較差96mmHg、30歳時に圧較差170mmHgと進行を認め、32歳時に大動脈弁置換術を行っている(図④)、LDLアフェレーシスによって、心血管病の予防、進行した動脈硬化の改善は、成人も含めた検討ではすでに報告されているが<sup>6)</sup>、この報告の著者らは、治療後の血清総コレステロール値を100mg/dL以下にすることを推奨している。しかし、小児においてこのレベルまでコレステロール値を低下させるだけの血漿処理量を確保できるかも問題になろう。症例5は、大動脈弁病変悪化を認めており、LDLアフェレーシスによりコレステロールを厳しくコントロールしていても、長期的には動脈硬化病変の悪化を認めるというこの治療法の効果の限界も示唆している。

このように、小児においてLDLアフェレーシス治療を施行することは、一定の心血管病予防効果を見込めるが、長期的な予後においてはまだ完全とは言えない側面も有している。

#### 小児におけるアフェレーシスの実際

FHホモ接合体において、治療開始時期は早ければ早いほどよいが、現実的には患児がLDLアフェレーシス治療に耐えられる年齢に達したときであり、一般的にはだいたい4-6歳頃である。FHホモ接合体への治療の限界の一つとして、この年齢になるまでにすでに動脈硬化病変が進行してしまう点あげられる。実際、われわれの症例でも、アフェレーシス開始時にすでに冠動脈病変を有した例があった(表、症例4)。また、体重の小さいうちは体外循環体積の大きな二重膜濾過法やLDL吸着法を用いられず、体外循環体積の少ない単純血漿交換を施行するしかない。しかし、この方法は前にも述べたように、免疫グロブリンなども除去してしまうため、2週間に1回が限界であり、LDL除去率も低い。血漿交換に関しての治療の開始時期として報告されたものとして、Stefanuttiらの生後25日の男児に血漿交換を施行し得た例がある<sup>8)</sup>。一般的には、LDL吸着法あ

るいは二重膜濾過法によるLDLアフェレーシスを行うことができるようになった時点で、これらの方法を選択する。早期に行われた例としては、3.5歳の女兒にLDL吸着法が用いられた報告があるが<sup>9)</sup>、一般的には体重が25kg(約10歳)に達したのち、小児用ラインを用いて、LDL吸着法あるいは二重膜濾過法によるLDLアフェレーシスを行うことができる。

FHホモ接合体において、心血管病の発症は10歳までに起こるとされ、18月齢で心筋梗塞を発症した例も報告されている<sup>10)</sup>。そこでできるだけ早期からの治療が必要とされるが、コレステラミンやHMG-CoA還元酵素阻害薬は、FHホモ接合体への有効性は乏しく、現状ではLDLアフェレーシスのみが効果が実証された治療法となっている。安全性に関しては、Stefanuttiらが3.5~15歳までの11症例の検討において、その副作用は軽度の低血圧とブラッドアクセス困難で、ともに頻度は2%にすぎなかったと報告している<sup>9)</sup>。

## 結 論

FHホモ接合体におけるLDLアフェレーシスは、心血管病予防の観点から可能な限り早期から施行することが望ましく、そうすることにより動脈硬化病変の退縮、発症予防が期待できる。しかし、体外循環を伴う治療法であることから、開始時期に関しては限界があること、また、長期的な治療効果に関しても、必ずしも完全ではないことも留意する必要がある。

## ■文 献

1) Goldstein JL, Brown MS: The Metabolic Basis of Inherited Disease. 5th ed., MacGraw-Hill, New York, 1982

- 2) Thompson GR, Lowenthal R, Myant NB: Plasma exchange in the management of homozygous familial hypercholesterolaemia. *Lancet* 1: 1208-1211, 1975
- 3) Kikkawa T et al: Specificity of various plasmapheresis techniques for treatment of hypercholesterolemia. *Current Practice in Therapeutic Plasmapheresis*, Shio-kawa Y, Inoue N (eds), pp.145-151, Excerpta Medica, Congress Ser. No.649, 1985
- 4) Yokoyama S, Hayashi R, Kikkawa T et al: Specific sor-bent of apolipoprotein B-containing lipoproteins for plasmapheresis. Characterization and experimental use in hypercholesterolemic rabbits. *Arteriosclerosis* 4: 276-282, 1984
- 5) Schmaldienst S, Banyai S, Stulnig TM et al: Prospective randomised cross-over comparison of three LDL-apheresis systems in statin pretreated patients with familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 151: 493-499, 2000
- 6) Yokoyama S, Yamamoto A, Hayashi R et al: LDL-apheresis; potential procedure for prevention and regression of atheromatous vascular lesion. *Jpn Circ J* 51: 1116-1122, 1987
- 7) Tatami R, Inoue N, Itoh H et al: Regression of coronary atherosclerosis by combined LDL-apheresis and lipid-lowering drug therapy in patients with familial hypercholesterolemia: a multicenter study. The LARS Investigators. *Atherosclerosis* 95: 1-13, 1992
- 8) Stefanutti C, Lanti A, Di Giacomo S et al: Therapeutic apheresis in low weight patients: technical feasibility, tolerance, compliance, and risks. *Transfus Apher Sci* 31: 3-10, 2004
- 9) Stefanutti C, Di Giacomo S, Vivencio A et al: Low-density lipoprotein apheresis in a patient aged 3.5 years. *Acta Paediatr* 90: 694-701, 2001
- 10) Motulsky AG: Current concepts in genetics. The genetic hyperlipidemias. *N Engl J Med* 294: 823-827, 1976



## 将来のインターベンション対策

# ナノテクノロジー（ナノDDS）を用いた 動脈硬化性病変の治療・予防

斯波真理子\*

SHIBA Mariko

\*国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部

### SUMMARY

1ミリの百万分の1のオーダーであるナノテクノロジーの技術が、医療の分野にも応用されてきている。ナノテクノロジーは、動脈硬化性病変の治療および予防の分野では、とくに薬物送達システム（drug delivery system：DDS）の方法として利用されている。筋肉注射による遺伝子導入法として、ジーンガン、ゼラチンハイドロゲル、アテロコラーゲンなどによる遺伝子発現の増強、発現期間の延長は、ナノテクノロジーの良い例である。血管形成術後の再狭窄予防のため、動脈壁局所への遺伝子導入には、リポソーム、ポリマーなどをDNAと結合させ、リポプレックス、ポリプレックスといった複合体を形成する技術が用いられる。全身投与のためには、ブロック共重合体を用いた高分子ミセルが開発されている。高分子ミセルは、種々のインテリジェント機能を搭載でき、標的細胞への特異的遺伝子発現を可能にする技術である。

### POINTS

- DDSとして、ナノテクノロジーが用いられている。
- 遺伝子導入ベクターとして、ナノテクノロジーが応用されている。
- 高分子ミセルは、標的細胞への特異的遺伝子発現を可能にする技術である。

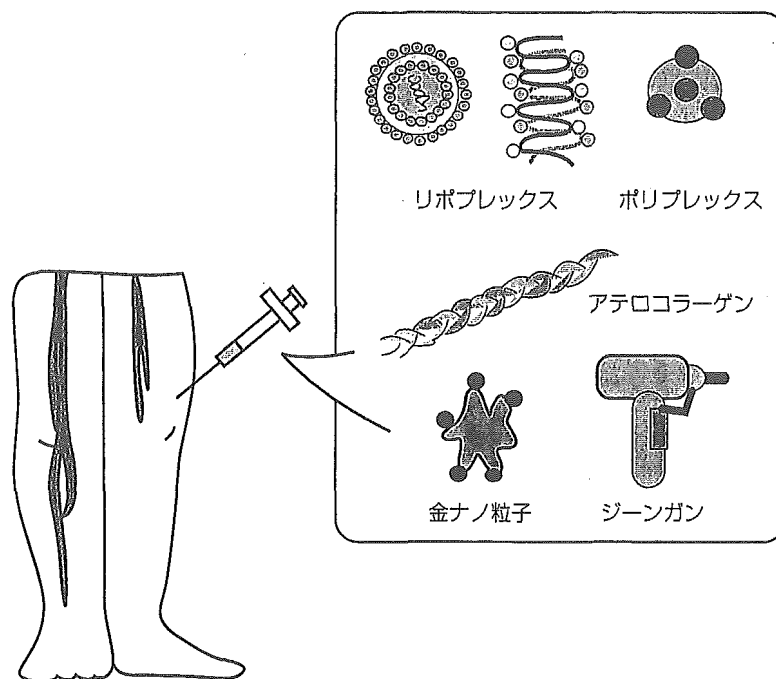
### KEY WORDS

ナノテクノロジー、薬物送達システム（drug delivery system：DDS）、リポプレックス、ポリプレックス、高分子ミセル

## はじめに

近年、ナノテクノロジーという1ミリの百万分の1という超微小スケールでの技術が注目を浴びており、この20年以内に情報、医療、環境などの分野に革命的な変化をもたらすことが予測されている。ナノテクノロジーの歴史は、1905（明治38）年、アインシュタインが砂糖分子の直径が1nmであるという論文を発表したことによ

り、幕が開けられた。1959（昭和34）年にはファインマンが、微小世界の可能性について、“There is a plenty of room at the bottom.”という講演をおこない、bottom（底）とは原子、分子レベルの場であり、そこに技術の大きな可能性があること示唆した。1974（昭和49）年に、谷口紀男教授が1mm以下の精度を象徴することばとして「ナノテクノロジー」という造語を初めて使用した。1985（昭和60）年、カール、クロトー、スモーリーが直



図① therapeutic angiogenesis に用いられるナノテクノロジー  
(筆者作成)

径 1 nm のフラーレンを発見した。フラーレンは、直径 1 nm, サッカーボールの 6 角形の頂点に炭素原子 C が存在し、金属よりは高温で超伝導をもつといったすぐれた特性があり、新たな素材になると注目された。1991 (平成 3) 年には、飯島澄男氏がフラーレンの一種であるカーボンナノチューブを発見している。2000 (平成 12) 年にはアメリカ合衆国のクリントン大統領 (当時) が国家ナノテクノロジー戦略 (National Nanotechnology Initiative : NNI) を発表、この分野の予算の増大、分野の拡大が促進された。

2001 (平成 13) 年、わが国でも総合科学技術会議のもとでナノテクノロジーの推進戦略が定められ、とくに医療の分野では、ゲノムシーケンズの効率化、体内装置の効率化、薬物送達システム (drug delivery system : DDS), 人工臓器の最適化、視覚、聴覚の援助、センサーシステムによる病気の早期発見、早期治療などに応用するべく研究が進められている。動脈硬化性病変の治療および予防に対して、ナノテクノロジーの技術を用いたいくつかのアプローチがすでになされており、とくに、DDS の方法として応用されている。虚血を改善するための、therapeutic angiogenesis と呼ばれる治療的血管新

生療法、狭窄した動脈壁へ直接アプローチする方法、高脂血症などの動脈硬化症の明らかな危険因子を改善する方法などである。いずれも、目的の臓器に必要な薬剤を到達させる方法として、ナノテクノロジーが用いられている。

本稿では、動脈硬化性病変の治療、予防に応用されているナノテクノロジーの例を紹介する。

## ■ 1. ナノテクノロジーは、therapeutic angiogenesis に用いられ、naked DNA 筋肉注射の作用を増強する

閉塞性動脈硬化症 (arteriosclerosis obliterans : ASO) およびビュルガー病の下肢の虚血部位に対し、血管新生を促す因子である血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF), 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF), 肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor : HGF), アンジオポエチン (Ang-1) の筋肉内投与が、側副血行路を発達させる方法として有効であることが報告されてい

る。当初は、虚血動脈内へのペプチドの投与がおこなわれていたが、血管新生の効果を得るためには持続的な増殖因子の供給が必要であることがわかってきた。

現在、VEGF, bFGF, HGF, Ang-1などのnaked plasmid DNAを患肢の筋肉組織に注射する方法が広くおこなわれており、わが国では、大阪大学においてHGFを用いた臨床試験がおこなわれ、現在は各地で臨床治験がおこなわれている。naked plasmid DNAの筋肉注射法は安全性に富み、治療効果発現に必要な2~4週間の遺伝子発現が可能である。ただし、遺伝子発現効率はウイルスベクターにくらべて低く、治療的な効果を得る量の蛋白質の発現を得るためにさまざまな工夫がなされている(図●)。遺伝子発現効率を上昇させるため、また上昇した効果を持続させるための方法として、物理的および化学的方法が報告されている。物理的方法としては、超音波照射法、電気穿孔法、ジーンガンなどが報告されている。化学的方法としては、カチオン性リポソームを用いてDNAとの複合体(lipoplex)を作製する方法、ポリマーを用いてDNAとの複合体(polyplex)を作製する方法、ブロック共重合体を用いる方法、リポソームとポリマーの両方を用いるlipopolyplexを作製する方法、およびゼラチンやコラーゲンなどの蛋白と結合する方法が報告されている。これらの方法は、ナノのサイズの方法を用いて微粒子を形成し、新しい性質が生じたものであり、ナノテクノロジーの良い例である。以下に、ナノテクノロジーを用いた筋肉への遺伝子導入法を記す。

ジーンガンは、プラスミドDNAを金粒子でコートして微粒子とし、ガスなどの圧力で細胞のなかに遺伝子を導入する方法であり、遺伝子組み換え植物の作製にも用いられる方法である。Lauritzenら<sup>1)</sup>は、ジーンガンにより、筋肉への遺伝子導入が10~100倍に上昇すると報告している。ただし、ジーンガンは筋肉を露出しなければならないこと、組織を傷つけること、などの欠点がある。

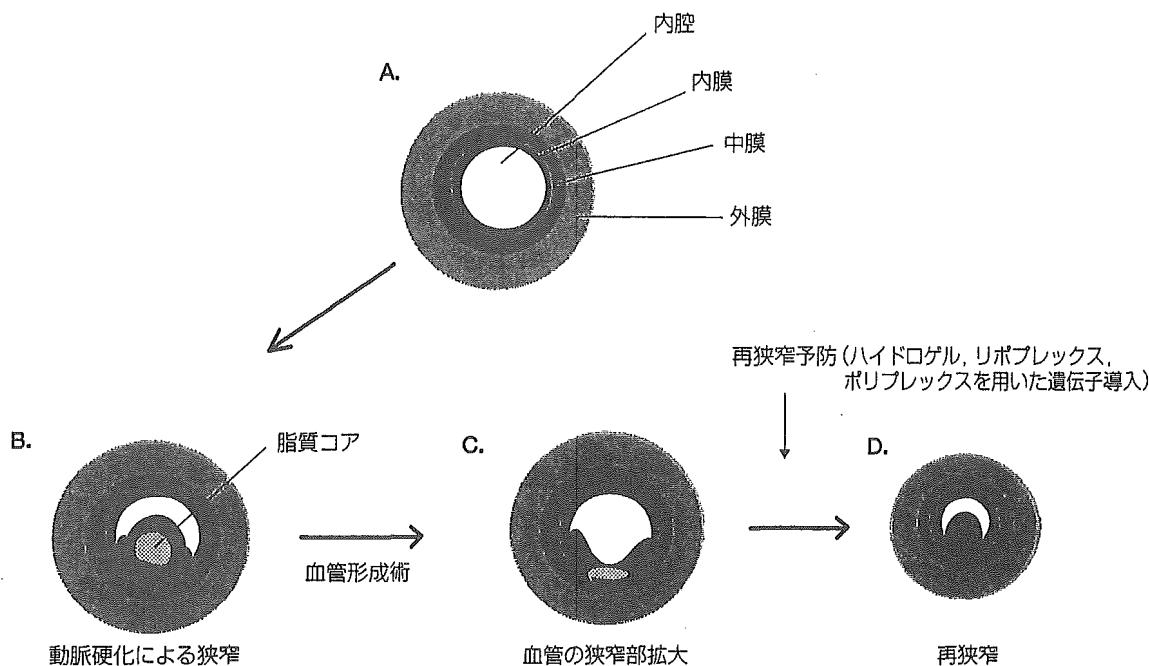
リポフェクチン、リポフェクタミンなどのカチオン性リポソームは、アニオン基をもつDNAと静電結合してリポプレックスと呼ばれる複合体を形成する。また、これらのリポソームはDNAを濃縮する作用があり、細胞外の環境において、DNAが分解されるのを防ぐ。陽電荷をもつリポプレックスは、細胞表面の陰電荷に結合して、

細胞内取り込みを促す。リポソームのなかには、エンドソームの膜に作用して、DNAを細胞質に遊離するはたらきをもつものもある。このため、DNAはリポソームでの分解を免れ、遺伝子導入効率が上昇する。リポプレックスは、筋芽細胞培養細胞への遺伝子導入は可能であるが、分化した筋管や、*in vivo*での遺伝子導入では、有効ではない。実際、リポプレックスは筋肉注射による遺伝子導入では、naked plasmid DNAにくらべてかえって遺伝子導入効率が低いものが多い。それは、筋線維がグリコサミノグリカンに富む細胞外基質に囲まれており、この陰性荷電をもつ細胞外基質にリポプレックスがトラップされてしまうからであると考えられている。

ポリエチレンイミン(polyethyleneimine: PEI)、ポリアミドアミンなどのカチオン性ポリマーも培養細胞への遺伝子導入には有効であるが、筋肉注射による遺伝子導入には無効である。カチオン性リポソームと同じように、陰性荷電をもつ細胞外基質にリポプレックスがトラップされてしまうためであると考えられている。

ポリビニルピロリドン(polyvinylpyrrolidone: PVP)のような非イオン性ポリマーや、ブロック共重合体が筋肉注射による遺伝子発現を増強することが報告されている。Auwerら<sup>2)</sup>は、PVPがDNAを濃縮せずに保護的にはたらい、naked plasmid DNAにくらべて遺伝子導入効率を約10倍上昇させると報告した。Kabanovら<sup>3)</sup>は、非イオン性キャリアのpluronic(ポリエチレンオキシドとポリプロピレンオキシドのブロック共重合体)が、筋肉注射による遺伝子の発現量をnaked plasmidの10倍に増加すること、また、遺伝子発現細胞が、広範であることなどを報告している。ゼラチンハイドロゲルやアテロコラーゲンは、主に徐放効果による遺伝子発現期間の延長をはかるものであるのに対し、pluronicはNF- $\kappa$ Bのようなsignaling pathwayを活性化することにより、遺伝子の転写を増加させることを介して、遺伝子発現量を増加させるものであろう、と報告されている。

Tabataら<sup>4)</sup>は、DNAと生分解性ゼラチンハイドロゲルとのコンプレックスを虚血肢モデルウサギの筋肉に注射した。naked plasmid DNA注射とくらべて遺伝子発現効率の上昇、発現期間の延長、投与DNAの分解の遅延を認め、線維芽細胞成長因子4(FGF4)投与による虚血



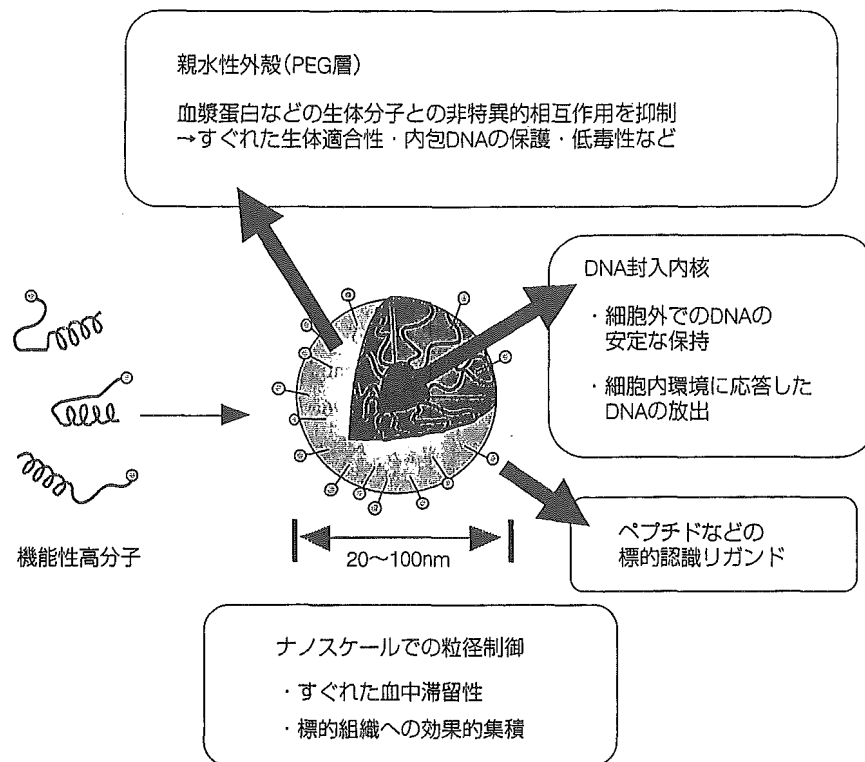
図② 血管形成術後の再狭窄予防にナノテクノロジーが用いられる  
(筆者作成)

肢の血流の改善を認めた。ゼラチンハイドロゲルはプラスのチャージをもつため、マイナスのチャージをもつ DNA を内包してコンプレックスを作製すること、そのコンプレックスからの徐放効果で、長期間の発現を促すと報告している。Ochiya ら<sup>6)</sup>は、カチオン性のアテロコラーゲンを用いてプラスミド DNA を内包した minipellet と呼ばれる直径 0.6 nm、長さ 10 nm の円柱状の粒子を作製した。HST-1/FGF-4 遺伝子の投与により、60 日にわたって血小板の増加を認めたと報告している。アテロコラーゲンにより、DNA が DNase などによる分解から守られ、投与局所において徐放効果があると考えられている。

## ■ II. 動脈壁局所への遺伝子導入技術に使われるナノテクノロジーは、リポソームやポリマーなどと DNA を結合させ粒子をつくり、目的細胞での取り込みを可能にする技術である

冠動脈硬化による内腔の狭窄、閉塞の治療のために、経皮的血管形成術がおこなわれる(図②)。血管形成術は、

バルーンカテーテルあるいはステント留置術がおこなわれるが、再狭窄の危険性がそれぞれ 30~40% および 10~30% 存在する。血管形成術後の再狭窄予防のために、中膜平滑筋細胞増殖を抑制する *c-myc*, *cdc-2*, *cdk-2*, *ras*, *bcl-x* の遺伝子導入, E2F, NF- $\kappa$ B などの転写因子のデコイの導入などが有効であると報告されている。VEGF, HGF などの成長因子が、実験動物において内膜新生を抑制すること、一酸化窒素 (NO) や C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP), プロスタサイクリン I<sub>2</sub> が平滑筋細胞の増殖を抑制し、内皮細胞の修復をおこなうことなどが報告されている。これらの遺伝子を、血管形成術後の動脈壁へ導入するには、局所投与と全身投与が考えられる。まず、局所投与としては、ハイドロゲル、リポソーム、ポリマーを用いる方法などが報告されている。Isner ら<sup>7)</sup>は、ハイドロゲルポリマーで覆われたバルーンカテーテルを用い、血管形成術の際にバルーンを膨らませて血管壁に遺伝子を導入する方法を報告した。バルーン擦過後にステントを留置したあと VEGF 遺伝子を局所に投与し、内膜肥厚およびステント内血栓を減少させることができたと報告している。局所へのリポソームを用いた方法では、Armeanu ら<sup>7)</sup>が、ブタの再狭窄モデルに対し、カチオニックリポソームを用いて遺伝子導入に



図③ 遺伝子デリバリーのための高分子ミセル型ナノ DDS の設計 (西山伸宏ら, 2004<sup>14)</sup>より引用)

成功している。Murohara ら<sup>9)</sup>は、カテーテルによる lipotransfection により、プロスタサイクリン合成酵素をウサギ再狭窄モデルに投与し、有効性を報告している。Cohen-Sacks ら<sup>9)</sup>は、生分解性のポリマーである poly-DL-lactide/glycolide と PDGF 受容体のアンチセンス遺伝子を用いて 300 nm のサイズの粒子を作製してラット再狭窄モデルへ投与し、有効性を報告している。

リポソームおよびポリマーを用いて DNA とコンプレックスし、リポプレックス、ポリプレックスを作製した場合、*in vitro* および局所投与では有効であるが、全身投与には不適切である。粒子の表面電位が高いため、血液中の陰電荷を帯びている血漿蛋白と静電的に作用して凝集体を形成し、そのほとんどは肺および肝臓に集積するからである<sup>10)</sup>。全身投与による遺伝子導入を可能にするには、DNA コンプレックスに、高い血中安定性をもたせること、標的部位への DNA コンプレックスの取り込み機構を搭載すること、標的細胞内での遺伝子の発現を可能にすることなどの条件が必要である。

■ おわりに：全身投与のための遺伝子導入技術に用いられるナノテクノロジーは、DNA の血中での安定性を高め、標的細胞への選択的取り込みを可能にする

Kataoka らのグループ<sup>11)</sup>は、ポリエチレングリコール (polyethylene glycol : PEG) とポリ L リジンのブロック共重合体と、DNA との複合体 (高分子ミセル) を作製し、遺伝子導入ベクターの開発をおこなっている (図③)。ブロック共重合体のポリ L リジン部分は陽電荷をもつポリマーであり、この部分が、陰電荷をもつ DNA と結合する。親水性のポリエチレングリコールが粒子の表面を覆い、core-shell 型の会合体が生じるため、高分子ミセルは表面電位が低い。このため、高分子ミセルはほかの蛋白質との相互作用が少なく、血中安定性に富む。筆者と Kataoka ら<sup>12)</sup>との共同研究で、naked DNA を静脈注射した場合 15 分で分解されるのに対し、高分子ミセルの状態では循環血流中に 3 時間以上安定な状態で存在するこ

とがわかった。高分子ミセルは、20~100 nm の粒径を有しており、培養細胞においても、また *in vivo* においても、DNA の遺伝子導入を促進することを確認している。

高分子ミセルには、さまざまなインテリジェント機能を搭載することが可能である(図③)。高分子ミセルの外殻の PEG 末端にペプチドを結合することにより、リガンド機能をもたせ、特異的な受容体を介して、標的細胞に遺伝子を導入することが可能である。Kataoka ら<sup>13)</sup> は、ラクトースを導入した高分子ミセルが、ヒト肝癌細胞 (HepG2 細胞) にアシアログリコプロテイン受容体を介して取り込まれることを報告している。このように、高分子ミセルは標的細胞への選択的遺伝子導入を可能にすることなどから、動脈硬化性病変の遺伝子治療のためのナノ DDS として、大きな期待が寄せられている。



#### 文 献

- 1) Lauritzen HP *et al* : Gene gun bombardment-mediated expression and translocation of EGFP-tagged GLUT4 in skeletal muscle fibres *in vivo*. *Pflugers Arch* 444 : 710-721, 2002
- 2) Anwer K *et al* : Synergistic effect of formulated plasmid and needle-free injection for genetic vaccines. *Pharm Res* 16 : 889-895, 1999
- 3) Kabanov A *et al* : Pluronic Block Copolymers for Gene Delivery. *Adv Genet* 53 PA : 231-261, 2005
- 4) Kasahara H *et al* : Biodegradable gelatin hydrogel potentiates the angiogenic effect of fibroblast growth factor 4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia. *J Am Coll Cardiol* 41 : 1056-1062, 2003
- 5) Ochiya T *et al* : New delivery system for plasmid DNA *in vivo* using atelocollagen as a carrier material : the Minipellet. *Nat Med* 5 : 707-710, 1999
- 6) Isner JM *et al* : Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 348 : 370-374, 1996
- 7) Armeanu S *et al* : Optimization of nonviral gene transfer of vascular smooth muscle cells *in vitro* and *in vivo*. *Mol Ther* 1 : 366-375, 2000
- 8) Numaguchi YK *et al* : Catheter-based prostacyclin synthase gene transfer prevents in-stent restenosis in rabbit atheromatous arteries. *Cardiovasc Res* 61 : 177-185, 2004
- 9) Cohen-Sacks H *et al* : Novel PDGFbetaR antisense encapsulated in polymeric nanospheres for the treatment of restenosis. *Gene Ther* 9 : 1607-1616, 2002
- 10) Plank C *et al* : Activation of the complement system by synthetic DNA complexes : a potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum Gene Ther* 7 : 1437-1446, 1996
- 11) Katayose S *et al* : Water-soluble polyion complex associates of DNA and poly (ethylene glycol)-poly (L-lysine) block copolymer. *Bioconjug Chem* 8 : 702-707, 1997
- 12) Harada-Shiba M *et al* : Polyion complex micelles as vectors in gene therapy--pharmacokinetics and *in vivo* gene transfer. *Gene Ther* 9 : 407-414, 2002
- 13) Wakebayashi D *et al* : Lactose-conjugated polyion complex micelles incorporating plasmid DNA as a targetable gene vector system : their preparation and gene transfecting efficiency against cultured HepG2 cells. *J Control Release* 95 : 653-664, 2004
- 14) 西山伸宏ほか : 明日の医学・医療を拓く最先端医工学研究. 血管疾患の遺伝子治療のためのドラッグデリバリーシステム (DDS) の設計. *血管医学* 5 : 105-111, 2004

#### SHIBA Mariko

国立循環器病センター研究所  
バイオサイエンス部室長  
しば・まりこ

1959年、京都府生まれ。  
1984年3月、滋賀医科大学医学部卒業。  
1984年4月、滋賀医科大学第三内科入局。

1995年5月、国立循環器病センター研究所循環動態機能部・室員。

1996年7月、研究休職、米國ケースウェスタンリザーブ大学医学部生化学教室 (Dr. Richard W. Hanson) 留学。

2002年4月より現職。  
国立循環器病センター動脈硬化代謝内科医長併任。

専門：高脂血症，代謝内科。

研究テーマ：循環器疾患にかかわる遺伝子の機能解析，循環器疾患に対する遺伝子治療。

趣味：読書，百人一首。



# ARHノックアウトマウス

国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部 室長 斯波真理子

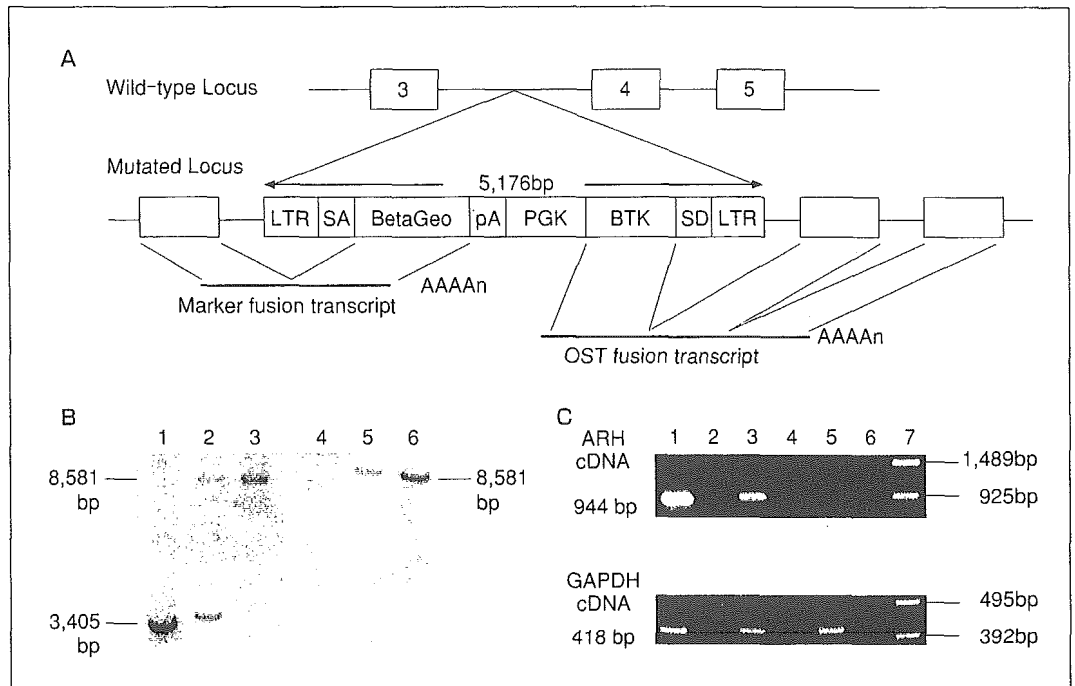


図1 ARHノックアウトマウスの作製

A: ARHノックアウトマウス作製の方法  
 B: マウス肝臓のDNAのサザンブロット解析。DNAをApalにより切断し、膜に転写の後、ARHの第3エキソンと第3イントロン部分によりハイブリダイゼーション (Lane 1~3), Neo geneによりハイブリダイゼーション (Lane 4~6) を行った  
 C: ARHおよびGAPDHのmRNAのRT-PCR。Lane 1と2: ARH<sup>+/+</sup>, 3と4: ARH<sup>-/-</sup>, 5と6: ARH<sup>+/+</sup>, Lane 1, 3, 5 reverse transcriptaseあり, 2, 4, 6: reverse transcriptaseなし (文献7より引用)

## ●はじめに

われわれは1991年に、家族性高コレステロール血症 (FH) ホモ接合体と同様の症状 (著明な高コレステロール血症, 巨大な黄色腫, 若年性動脈硬化症) を呈するが, 皮膚線維芽細胞においてLDL受容体が完全に正常である姉弟例を報告した<sup>1, 2)</sup>。この論文がautosomal recessive hypercholesterolemia (ARH)の, 世界ではじめての報告であった。その後, 同様の症例の報告がいくつかあり<sup>3, 4)</sup>, 2001年, Hobbs HらのグループがARH家系の連鎖解析により, ヒトでは第1染色体にあるこの病気の原因遺伝子 (ARH) を同定した<sup>5)</sup>。われわれは, われわれの家系について遺伝子解析を行い, 同じ症状をもつ姉弟例のARH遺伝子の第6エキソンに1塩基挿

# ARH knockout mouse

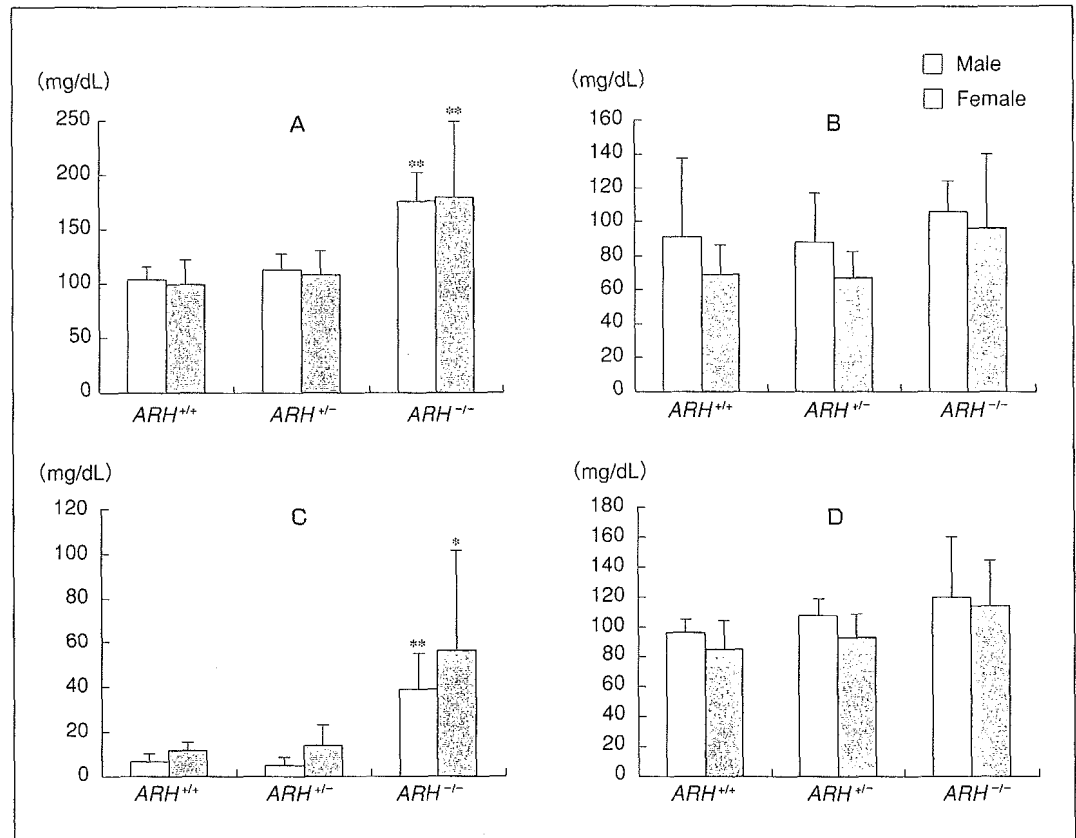


図2 ARHノックアウトマウスの血清脂質プロフィール

A: 血清総コレステロール値, B: 中性脂肪値, C: LDLコレステロール値, D: HDLコレステロール値. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$

入の新しい異常があることを見出し、報告した<sup>6)</sup>。患者皮膚線維芽細胞においても、ARH遺伝子およびARH蛋白質の発現は認められなかった。また、この変異部位にSNPが存在することも報告した<sup>6)</sup>。

## ●ARHノックアウトマウスの作製

ARHの機能を詳しく調べるため、われわれは、マウスの第4染色体上に存在するARH遺伝子の第3イントロンにinsertional mutagenesisの方法を用いて5,176塩基を挿入し、ARHノックアウトマウスを作製した(図3A)。サザンプロットにより、ARH<sup>-/-</sup>において5,176塩基の挿入を認めた(図3B)。RT-PCRにより、ARH<sup>+/+</sup>



## ◆見る脂質のページ◆

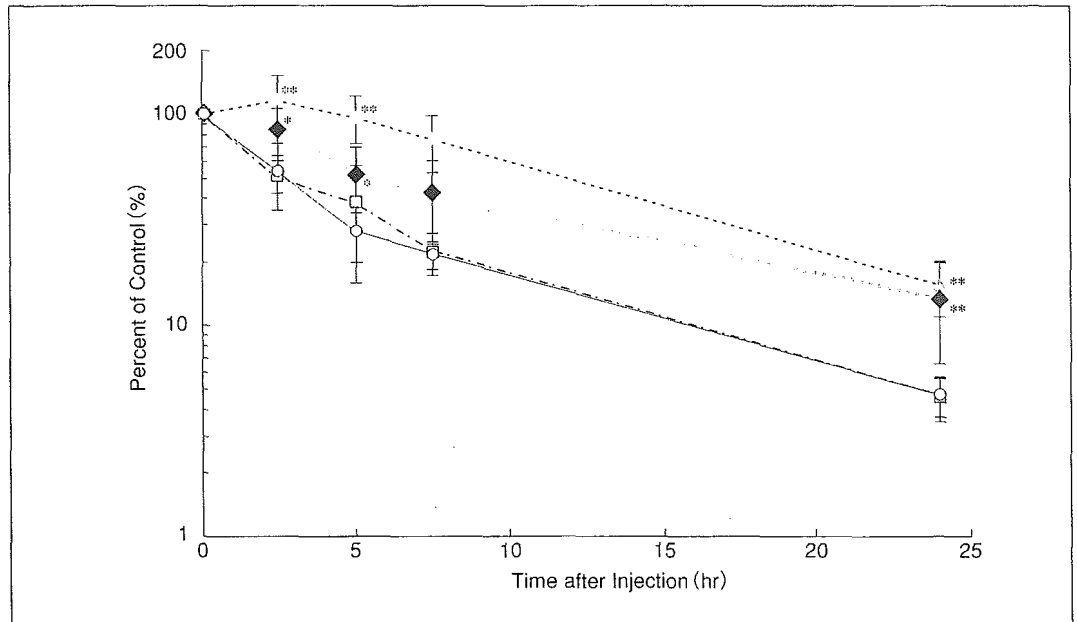


図6 125I-LDLのターンオーバースタディ

○: ARH<sup>+/+</sup>, □: ARH<sup>+/-</sup>, △: ARH<sup>-</sup>, ◆: LDLR<sup>-</sup>. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (vs. ARH<sup>+/+</sup>)

(文献7より引用)

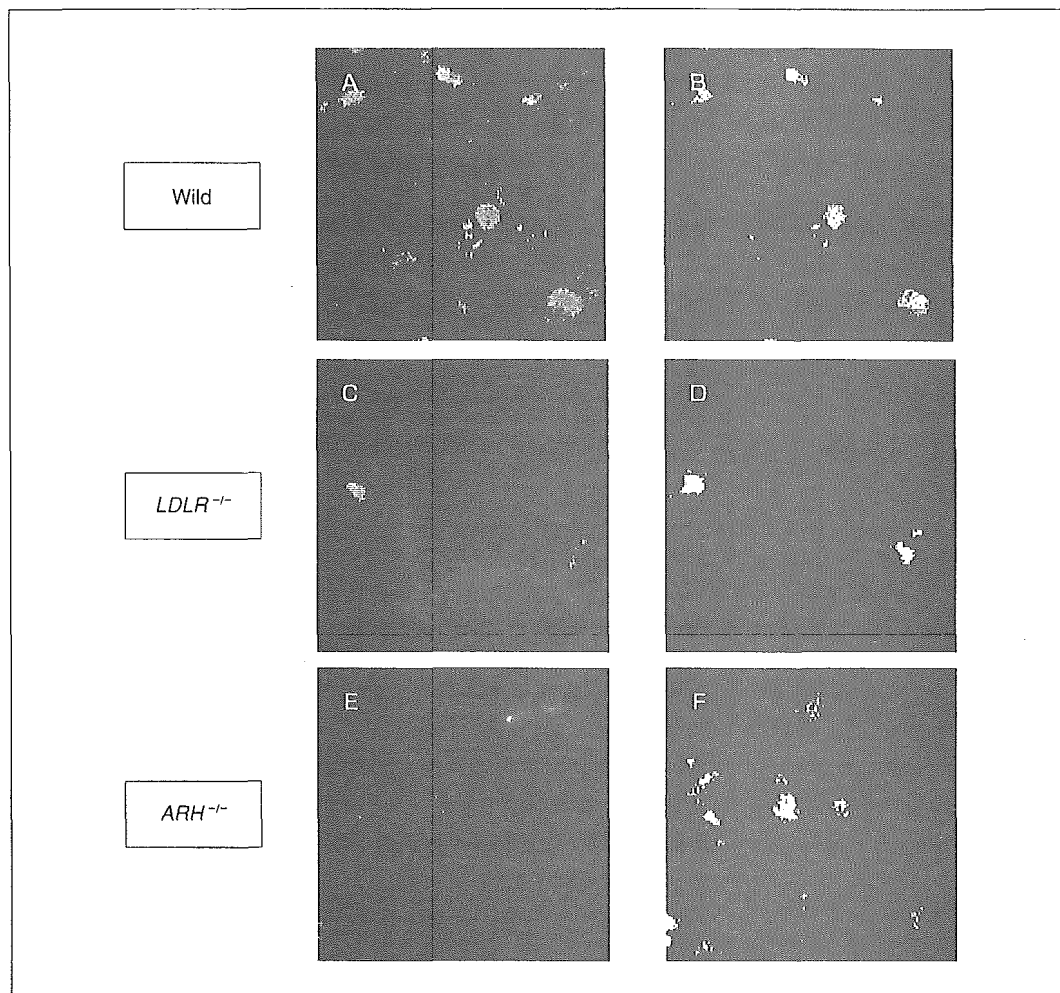
およびARH<sup>+/-</sup>ではARHのmRNAは発現していたが、ARH<sup>-</sup>では発現を認めなかった(図6C)⁷)。

Jones CらはARH遺伝子のエキソン4とPGKneobpA selection cassetteを置き換える、homologous recombinationの方法を用いてARHノックアウトマウスを作製した⁸)。

### ●ARHノックアウトマウスの解析 (in vivo)

ARHノックアウトマウスのChow diet (Cholesterol 0.1%) 下の血清脂質プロフィールを図7に示す。血清総コレステロール値は、ARH<sup>-/-</sup>において高値であり、ARH<sup>+/-</sup>は、ARH<sup>+/+</sup>と同等であった(図7A)。血清中性脂肪値は、いずれの群でも変化はなかった(図7B)。コレステロールは、LDL分画において著明な上昇を認めしたが、HDL分画では変化はなかった(図7C, D)。125I-LDLのターンオーバースタディでは、ARH<sup>-/-</sup>においてLDLR<sup>-/-</sup>と同様の代謝回転の遅延を認めた(図6)。ARH<sup>+/-</sup>のLDL代謝回転は、ARH<sup>+/+</sup>と同等であった。125I-LDLの代謝回転の遅延が

ARH knockout mouse



図④ Dii-LDL静注後の肝臓組織の蛍光顕微鏡写真

A, C, E: Dii-LDL 50 μg投与4時間後の肝臓組織. B, D, F: 抗マウスマクロファージ抗体で染色

(文献7より引用)

LDLの肝臓での取り込み低下によるものかどうかを調べるため、Dii-LDL静注後の肝臓組織を蛍光顕微鏡で観察した(図④)。wild typeの肝臓では、細胞質に蛍光活性を認めたが、LDLR<sup>-/-</sup>では認めなかった。ARH<sup>-/-</sup>では、LDLR<sup>-/-</sup>と同様、その細胞質に蛍光活性を認めなかった。強い蛍光活性をもつ細胞は、BM8(マウスpan-macrophageに対する抗体)により染色され、Kupffer細胞であることがわかった。

## ◆見る脂質のページ◆

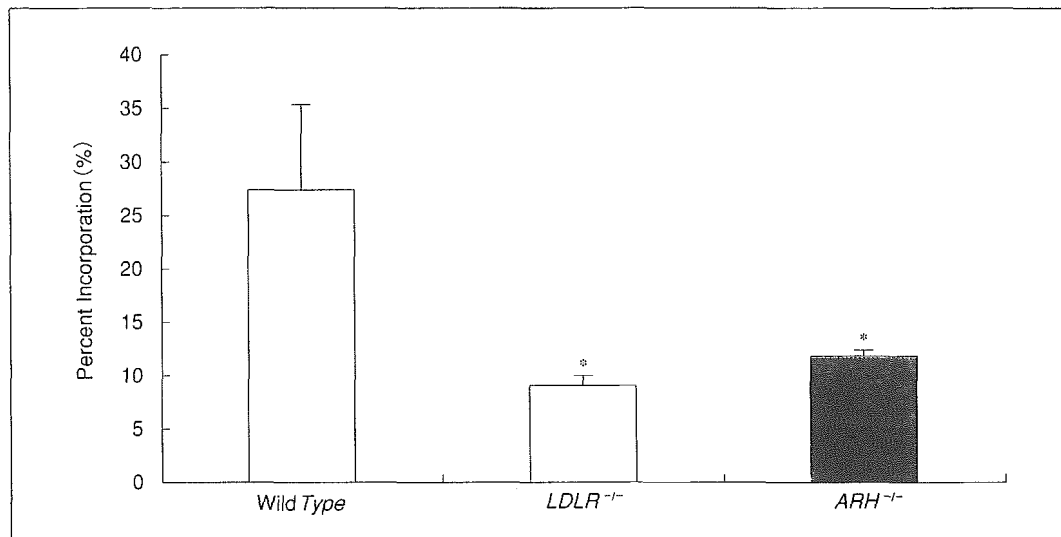


図5 [3H] cholesteryl oleoyl ether-LDL静注後の肝臓組織への取り込み

\*p < 0.05 (vs. wild type)

(文献7より引用)

さらに、[3H] Cholesteryl oleoyl ether-LDLの肝臓への取り込みを測定した(図5)。ARH<sup>-/-</sup>においてLDLR<sup>-/-</sup>と同様のLDLの取り込みの低下を認めた。

Jonesらは、ARH<sup>-/-</sup>のコレステロール食負荷により著明になる高コレステロール血症を報告している。さらに、ARH<sup>-/-</sup>の<sup>125</sup>I-LDLの代謝回転の遅延とともに、<sup>125</sup>I- $\alpha$ 2 macroglobulinの代謝回転は正常であることを報告している。これは、*in vitro*でARH蛋白がLDL受容体のほかに、LRPに結合することから、ARH<sup>-/-</sup>において $\alpha$ 2 macroglobulinの代謝も遅延すると予測されていた。しかし、*in vivo*では影響がないことがわかった。さらに、ARH<sup>-/-</sup>の肝臓組織を用いてimmunolocalization studyを行い、LDL受容体蛋白がシヌソイド表面に多量に存在することを示した。

以上より、ARHがLDL受容体の細胞内取り込みにかかわっていること、肝臓細胞での取り込み低下がARH<sup>-/-</sup>の高コレステロール血症をきたしていることがわかった。

### ●ARHノックアウトマウスの解析 (*in vitro*)

*in vivo*での現象を*in vitro*でさらに詳しく解析するため、われわれはARHの初代培養肝細胞でのLDL取り込みを測定した。初代培養肝細胞において、<sup>125</sup>I-LDLの取り込み能(図6A)、分解能(図6B)ともに正常に近く、著明な低下を認めるLDLR<sup>-/-</sup>マウ

# ARH knockout mouse

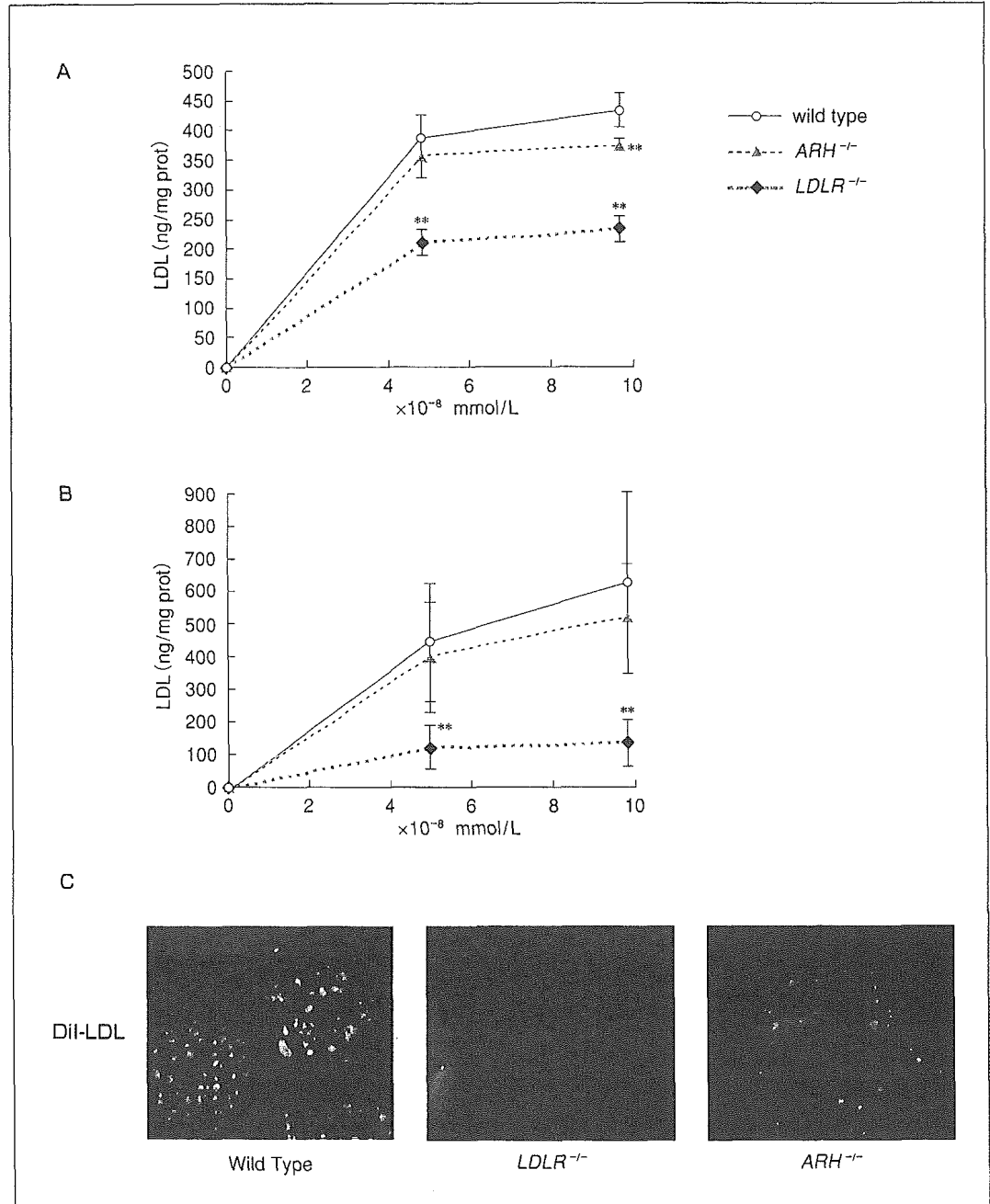


図6 初代培養肝細胞を用いた実験

A:  $^{125}\text{I}$ -LDLの細胞内取り込み能, B:  $^{125}\text{I}$ -LDLの代謝能, C: DiI-LDLの細胞内取り込み, \*\* $p < 0.01$  (vs. wild type) (文献7より引用)