

(3) 出版物

<著書>

1. 伊原喜子、江頭健輔：10) アンジオテンシン II と炎症 THE ARB メディカルレビュー社 2006；109-117

<総説>

1. 大谷規彰、江頭健輔：特集 冠動脈インターベンション新時代- DES の登場で何が変わるか 「将来のインターベンション対策 単球走化性促進因子；MCP-1 を標的とした再狭窄予防対策- 遺伝子溶出ステントの展望-」分子心血管病 先端医学社 2006；7(1)：63(63)-70(70)
2. 竹本真生、江頭健輔：血管内皮を標的とした血管予防を探る 「スタチンによる多様性効果と心血管イベント発症予防の関連を探る」Vascular Medicine 7月号 vol.2 no.3：16(220)-21(225)
3. 竹本真生、江頭健輔：急性冠症候群と炎症- 炎症をターゲットとした治療戦略 心臓 日本心臓財団 2006；38(11)：1083-1088
4. 船越公太、江頭健輔：遺伝子プラスミド溶出ステント（遺伝子・再生医学講座）Angiology Frontier メディカルレビュー社 2006；5(4)：59-64
5. 船越公太、江頭健輔：ステント内再狭窄の分子機構と生体吸収性ナノ粒子電着による遺伝子溶出ステントがもたらす新たな治療戦略. 日本薬理学雑誌 社団法人日本薬理学会 2007；129(3)：171-176
6. 船越公太、江頭健輔：ナノ DDS 制御コーティング技術の創製による次世代ステント内再狭窄抑制対策の開発. Mebio メジカルビュー社 2007；24(4)：106-117

【研究成果の刊行物・別刷】

次のページ以降に番号のところに○をつけた論文の別刷りを添付します。

Angiotensin II Type 1 Receptor Blockade Attenuates In-Stent Restenosis by Inhibiting Inflammation and Progenitor Cells

Kisho Ohtani, Kensuke Egashira, Yoshiko Ihara, Kaku Nakano, Kouta Funakoshi, Gang Zhao, Masataka Sata, Kenji Sunagawa

Abstract—The precise mechanism by which angiotensin II type 1 receptor blocker reduces in-stent restenosis in clinical trials is unclear. We, therefore, investigated the mechanism of in-stent neointima formation. Male cynomolgus monkeys and rabbits were fed a high-cholesterol diet and were allocated to untreated control and type 1 receptor blocker groups. Five days after grouping, multilink stents were implanted in the iliac artery. The type 1 receptor blocker reduced the development of in-stent neointima formation by $\approx 30\%$ in rabbits and monkeys. To investigate potential mechanisms, we examined the expression of renin–angiotensin system markers, all of which increased in monocytes and smooth muscle-like cells in the neointima and media within 7 days. The type 1 receptor blocker attenuated increased oxidative stress, the enhanced expression of markers of the rennin–angiotensin system and monocyte chemoattractant protein-1, and macrophage infiltration. The effects of type 1 receptor blocker on the differentiation of peripheral blood mononuclear cells into vascular progenitor cells were also examined. Treatment with type 1 receptor blocker suppressed the enhanced differentiation to smooth muscle progenitor cells induced by stenting. The type 1 receptor blocker attenuated in-stent neointima formation by inhibiting redox-sensitive inflammatory changes and by reducing recruitment of the progenitor cells. These potential actions of type 1 receptor blocker on inflammation and progenitor cells constitute a novel mechanism of suppression of in-stent restenosis by type 1 receptor blocker. (*Hypertension*. 2006;48:664-670.)

Key Words: angiotensin II ■ oxidative stress ■ monocytes

Coronary intervention with metal stent implantation is performed in >1.5 million patients with atherothrombotic lesions worldwide and has become the major revascularization technique.¹ The clinical benefits of this procedure are reduced by in-stent restenosis. In-stent restenosis results exclusively from neointima formation because of proliferation/migration of smooth muscle cells and inflammatory changes in response to stent-associated injury.² Recent clinical trials demonstrated great benefits of drug-eluting stents (containing sirolimus, paclitaxel, etc) in preventing restenosis and improving clinical outcomes.^{3,4} However, systemic medical therapies for stent-associated thrombosis and for control of risk factors are essential therapy in addition to drug-eluting stents for the prevention of future coronary events. This notion is supported by recent reports showing multiple atherosclerotic plaque ruptures at sites other than the culprit lesion, as observed in acute coronary syndrome by intravascular ultrasound analysis.⁵ The renin–angiotensin system (RAS) has been implicated in the pathogenesis of restenosis and acute coronary syndrome^{6–11} and, thus, may be a potential

target for the prevention of in-stent restenosis and atherothrombotic events. Indeed, a recent, single-center VALSartan for Prevention of REstenosis after Stenting of Type B2/C lesions (Val-PREST) trial demonstrated that treatment with angiotensin II type 1 (AT₁) receptor blocker (ARB) reduces the incidence of restenosis and revascularization in selected patients with type B2/C lesions.¹² The same group compared valsartan with angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition after bare metal stent implantation in the VALSartan Versus ACE inhibition (VALVACE) trial and reported greater benefits from systemic valsartan treatment than from angiotensin-converting enzyme inhibitors in reducing restenosis.¹³

However, the precise mechanism by which ARB reduces in-stent restenosis in Val-PREST and VALVACE trials is unclear. Although the central role of RAS in the pathogenesis of atherosclerotic vascular disease is evident, the role of RAS in the pathogenesis of in-stent neointimal formation has not been fully addressed. For example, upregulation of ACE is reported in postballoon restenotic samples,¹⁴ but no previous study examined the expression of RAS components (ACE, angiotensin II, AT₁ receptor,

Received May 1, 2006; first decision June 2, 2006; revision accepted July 14, 2006.

From the Department of Cardiovascular Medicine (K.O., K.E., G.Z., Y.I., K.F., K.N., K.S.), Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan; and the Department of Cardiovascular Medicine (M.S.), Graduate School of Medical Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Correspondence to Kensuke Egashira, Department of Cardiovascular Medicine Graduate School of Medical Science, Kyushu University, 3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan. E-mail egashira@cardiol.med.kyushu-u.ac.jp

© 2006 American Heart Association, Inc.

Hypertension is available at <http://www.hypertensionaha.org>

DOI: 10.1161/01.HYP.0000237974.74488.30

and AT₂ receptor) and subsequent cellular events after stenting. This point is important because: (1) the mechanism underlying neointimal formation differs considerably between injury methods, and (2) metallic stent implantation now becomes the major revascularization technique. Therefore, the first aim of the present study was to determine the effects of ARB on experimental in-stent restenotic lesions. To gain clinical significance for the results, we used a nonhuman primate model of in-stent neointima formation.¹⁵ We then aimed to investigate the underlying mechanism in a rabbit model. We demonstrate that: (1) increases in local expression of RAS begin at early stages after stenting, and (2) treatment with ARB attenuates in-stent neointima formation associated with reduction in oxidative stress, inflammatory changes, and AT₁ receptor expression.

There is accumulating evidence from experimental studies that vascular smooth muscle cells within the neointima of the atherosclerotic vessel wall may originate from bone mar-

row.¹⁶ Furthermore, a recent study demonstrated that smooth muscle progenitor cells (SMPCs) are present in circulating human blood¹⁷ and that bone marrow-derived smooth muscle cells are highly represented in the intima of human atherosclerotic vessels.¹⁸ Angiotensin II reportedly enhances the proliferation and differentiation of myeloid precursors from CD34⁺ hematopoietic stem cells through interaction with the AT₁ receptor on CD34⁺ cells.^{19,20} Thus, it is possible that RAS is involved in recruitment and differentiation of bone marrow cells to SMPCs. Therefore, the second aim of this study was to investigate the effects of ARB on the differentiation of peripheral blood mononuclear leukocytes to SMPCs after stenting in rabbits.

Methods

Animal Model of In-Stent Restenosis

The study protocol was reviewed and approved by the Committee on Ethics on Animal Experiments, Kyushu University Faculty of Medicine, and the experiments were conducted according to the

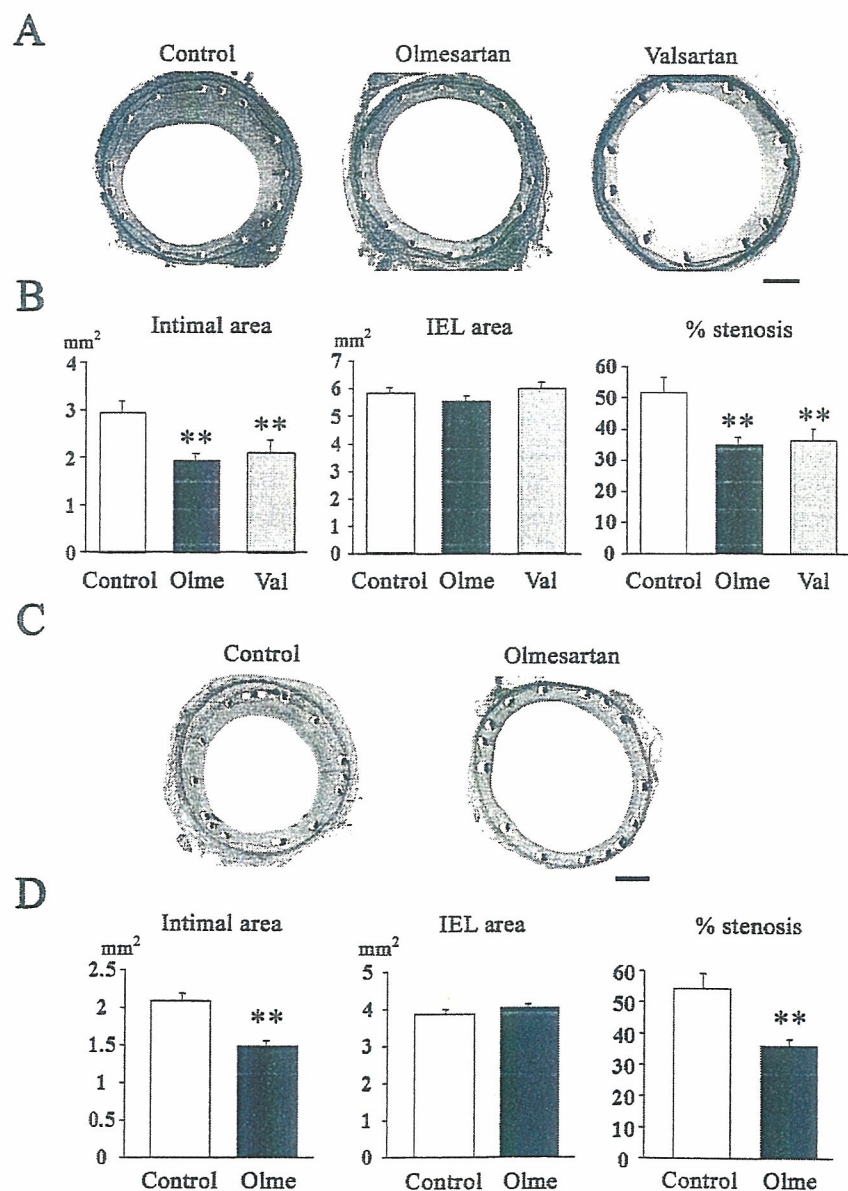


Figure 1. Inhibitory effect of ARB on in-stent neointima formation in monkeys (a and b) and rabbits (c and d). a, Iliac artery sections from the control group, the olmesartan group, and the valsartan group 28 days after stenting, stained with elastic-van-Gieson in monkeys. Bar=500 μm. b, Effect of olmesartan and valsartan on intimal area, IEL area, and % stenosis 28 days after stenting in monkeys (n=8 each). **P<0.01 vs the control group. c, Iliac artery sections from the control group and the olmesartan group 28 days after stenting, stained with elastic-van-Gieson in rabbits. Bar=500 μm. d, Effect of olmesartan on intimal area, internal elastic lamina (IEL) area, and % stenosis 28 days after stenting in rabbits (n=8 each). **P<0.01 vs the control group.

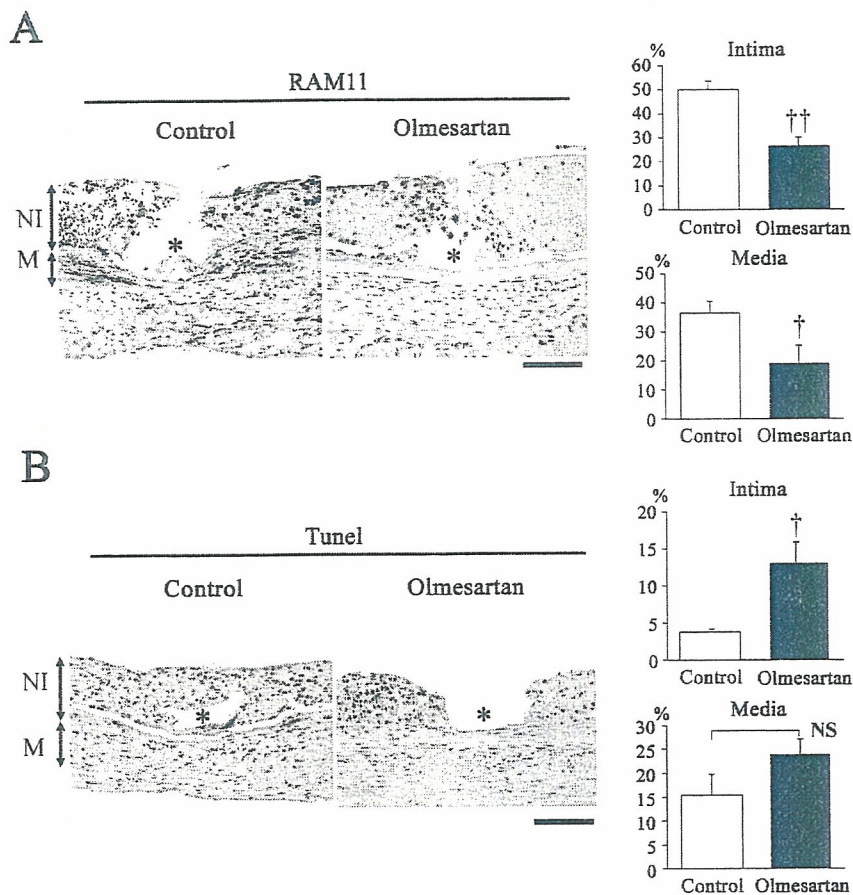


Figure 2. Effects of ARB on inflammation and cell death in rabbits. a, Effect of olmesartan on inflammation (RAM11-positive monocyte/macrophage) 7 days after stenting (n=8 each). Summary of quantitative analyses is presented in bar graph. The percentage of immunopositive cells per total cells in each section was calculated, and the average of the 5 sections was reported for each animal. † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs the control group. * indicates stent strut; NI, neointima; M, media. Bar=100 μm . b, Effects of olmesartan on cell death. TUNEL-stained artery sections 7 days after stenting and summary of quantitative analyses are presented (n=8 each). The percentage of immunopositive cells per total cells in each section was calculated, and the average of the 5 sections was reported for each animal. † $P < 0.01$ vs the control group. * indicates stent strut; NI, neointima; M, media. Bar=100 μm .

National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. An enhanced Methods section is available online at <http://hyper.ahajournals.org>.

Results

Inhibitory Effects of ARBs on Neointima Formation After Stenting in Monkeys and Rabbits

As we reported previously,¹⁵ significant neointima formation was observed 28 days after stenting in control, untreated monkeys (Figure 1). Treatment with olmesartan or valsartan reduced this neointima formation.

Neointima formation was also examined 28 days after stenting in rabbits (Figure 2). Treatment with olmesartan reduced the degree of neointima formation to a similar extent as seen in monkeys. As expected, serum angiotensin II levels rose on day 28 in the olmesartan group (data not shown).

There were no treatment effects of ARBs on serum cholesterol levels. In monkeys, the total cholesterol levels before and 28 days after stenting were 444 ± 43 and 429 ± 37 mg/dL in the control group, 469 ± 30 and 488 ± 44 mg/dL in the olmesartan-treated group, and 469 ± 30 and 488 ± 44 mg/dL in the valsartan-treated group. In rabbits, the total cholesterol levels before and 28 days after stenting were 919 ± 81 and 1072 ± 93 mg/dL in the control group and 997 ± 97 and 1128 ± 108 mg/dL in the olmesartan-treated group. There was no significant

treatment effect on body weight among the groups (data not shown).

Inhibitory Effects of ARB on Markers of RAS (ACE, Angiotensin II, AT₁ Receptor, and AT₂ Receptor) and Oxidative Stress After Stent Implantation in Rabbits

To investigate potential mechanisms underlying the beneficial effects of ARBs on in-stent neointima formation, we examined whether markers of RAS are increased after stent implantation in rabbits (Figure I, available online). Immunohistochemical staining revealed that such markers (ACE, angiotensin II, AT₁ receptor, and AT₂ receptor) increased on day 10 in nearly all of the cells in the neointima (regenerated endothelial cells, monocytes, and smooth muscle-like cells) and in some cells in the media (Figure Ia). Such increased immunoreactivity declined spontaneously. Interestingly, treatment with olmesartan reduced the enhanced expression of AT₁ receptor but did not affect the expression of AT₂ receptor (online Figure I).

Because oxidative stress plays a central role in vascular pathobiology induced by angiotensin II, we then examined superoxide production by dihydroethidium (DHE) fluorescence on day 10 (Figure Ic). No apparent DHE fluorescence was detected in the nonstented normal artery. The fluorescent signal was markedly increased in the neointima, media, and adventitia of stented arteries from the control group. Treat-

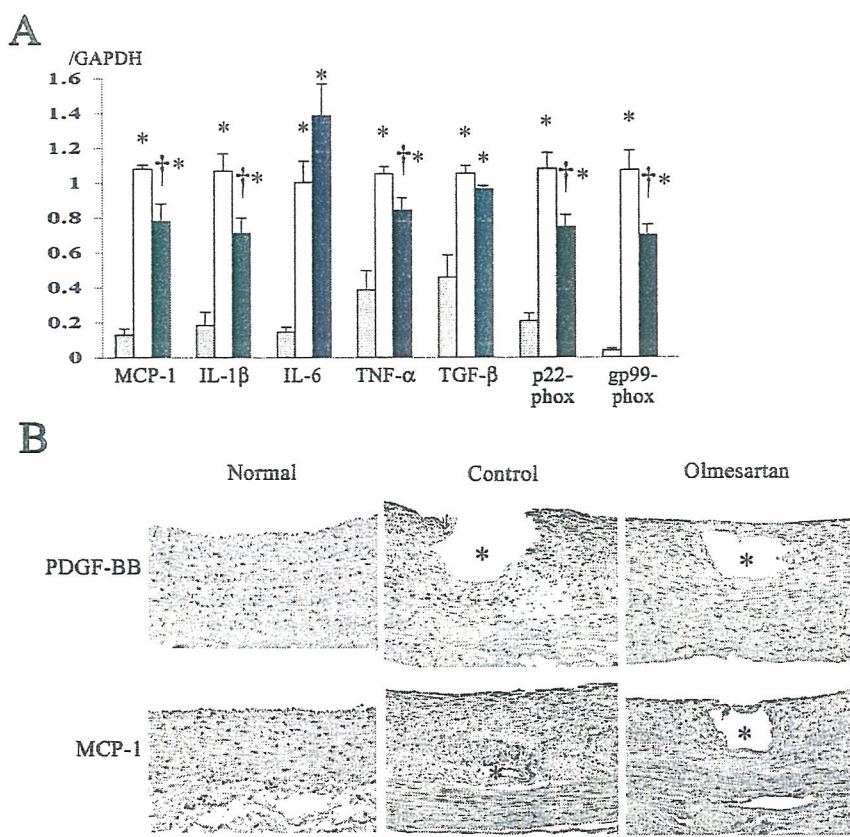


Figure 3. Effects of ARB on gene expression of proinflammatory factors, and immunohistochemical expression of PDGF and MCP-1. a, Effect of olmesartan on relative mRNA levels of various proinflammatory factors and NADPH oxidases 7 days after stenting in normal controls (□, n=8), the no-treatment group (▤, n=8), and the ARB-treated group (■, n=8). * P <0.01 vs uninjured normal artery; † P <0.05, vs the control group. b, Iliac artery sections from the uninjured normal animals and those from the control and olmesartan groups 10 days after stenting stained immunohistochemically with PDGF-BB and MCP-1. * indicates stent strut. Bar=100 μ m. These immunohistochemical experiments were repeated 5 times, all with representative results.

ment with olmesartan partly attenuated the increased DHE fluorescence after stent implantation.

Inhibitory Effects of ARB on Inflammatory Changes and Apoptotic Cell Death in Rabbits

As we reported previously,¹⁵ inflammatory changes and apoptotic cell death became evident 7 to 10 days after stent implantation in rabbits (Figure 2a and 2b). Treatment with olmesartan reduced such inflammatory changes and enhanced cell death in the intima after stenting.

Inhibitory Effects of ARB on Expression of Proinflammatory Factors and NADPH Oxidase Subunits

Treatment with olmesartan reduced the increased mRNA levels of monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor- α , p22phox, and gp91phox in rabbits (Figure 3a). Olmesartan did not affect the increased levels of IL-6 and transforming growth factor- β . Immunohistochemical staining performed 10 days after stenting revealed increased immunoreactive platelet-derived growth factor (PDGF)- β and MCP-1 in cells in the neointima and in smooth muscle cells in the media. This was attenuated by olmesartan treatment (Figure 3b). Treatment with olmesartan did not affect neovascularization in the neointima and adventitia or re-endothelialization 28 days after stenting (data not shown).

Effects of ARB on Transdifferentiation of Mononuclear Cells to Vascular Progenitor Cells

To investigate the potential contribution of vascular progenitor cells, peripheral blood mononuclear cells (MNCs) were

isolated and cultured to stimulate the differentiation into SMPCs or endothelial progenitor cells (EPCs), as described previously.^{16,17} The cells cultured in the PDGF-BB-enriched and basic fibroblast growth factor-enriched medium exhibited a hill and valley morphology that is characteristic of smooth muscle cells within 2 weeks. The smooth muscle cell phenotype was confirmed by immunostaining with antibodies specific for smooth muscle cell markers: SMPCs expressed α -smooth muscle actin (SMA), myosin, and calponin, which were all detected in human coronary artery smooth muscle cells and were not detected in MNCs and Cos-7 cells (data not shown). Expression of α -SMA gene in SMPCs was also confirmed by PCR analysis (data not shown). As reported,^{16,17} the expression of inflammatory markers (MCP-1, IL-1 β , etc) was greater in SMPCs than in cultured rabbit aortic smooth muscle cells (data not shown). The cells cultured in the vascular endothelial growth factor-enriched medium exhibited the typical cobblestone morphology of EPCs. The EPCs stained positively for von Willebrand factor and VE-cadherin and incorporated acetylated low-density lipoprotein (data not shown).

Analysis of colony-forming areas showed that the degree of transformation to SMPC was greater in MNCs from animals fed a high-cholesterol diet than in those from untreated, normal animals (Figure 4A). The transformation to SMPCs further enhanced in MNCs from animals that underwent stenting. Treatment of rabbits with olmesartan for 5 to 7 days suppressed the increased transformation to SMPCs induced by stenting. In contrast, there were no differences in the degree of transformation to EPCs among the groups. Immunohisto-

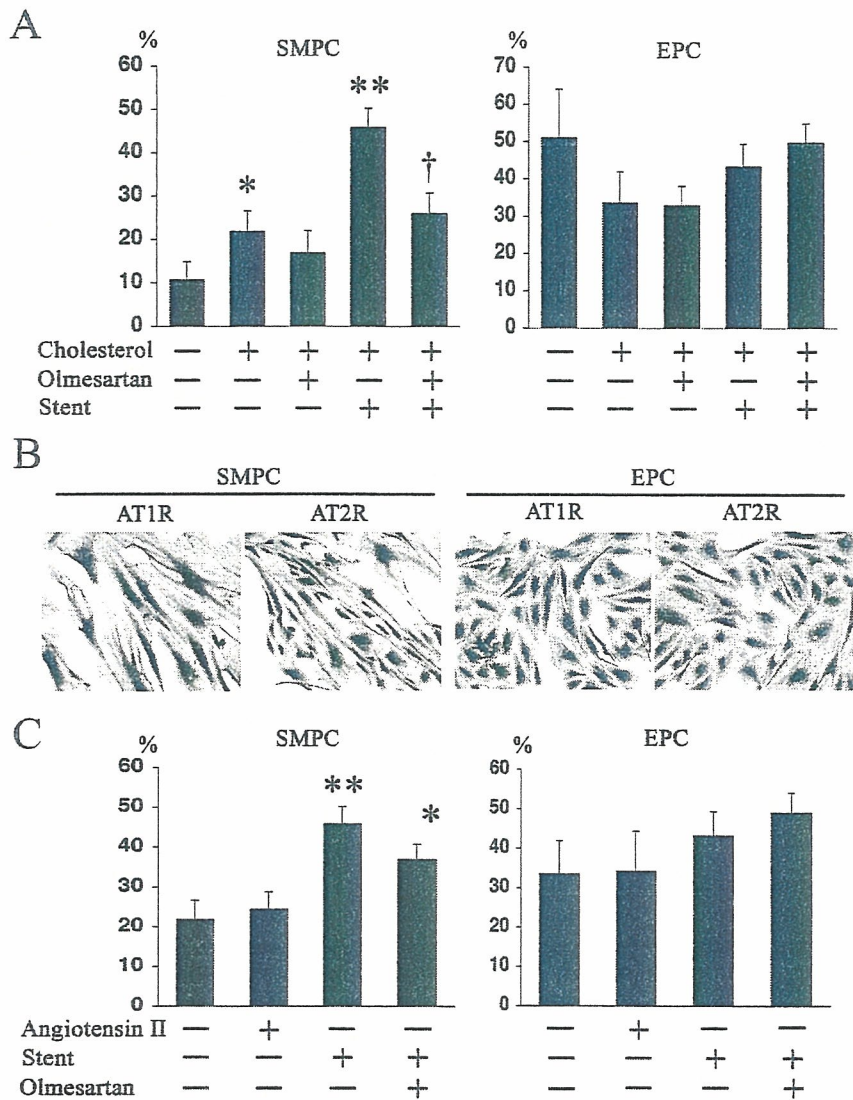


Figure 4. Effects of ARB on transdifferentiation of MNCs to SMPCs or EPCs. a, The degrees of transformation of MNCs to SMPCs (the percentages of α -SMA-positive area per well) or EPCs (the percentages of von Willebrand factor-positive area per well) in normal rabbits and those that received the high-cholesterol diet, high-cholesterol diet plus in vivo olmesartan treatment, high-cholesterol diet and stenting, or high-cholesterol diet, in vivo olmesartan treatment, and stenting (n=8 to 9 each). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control (cholesterol [-] olmesartan [-] stent [-]). † $P < 0.05$ vs high-cholesterol diet plus stenting (cholesterol [+] olmesartan [-] stent [+]). b, Immunohistochemistry for AT1 receptor and AT2 receptor in SMPCs and EPCs. c, The degree of transformation of MNCs from rabbits fed a high-cholesterol diet to SMPCs or EPCs. The effects of in vitro addition of angiotensin II were examined. In addition, the in vitro effects of olmesartan on the stent-induced increase in transformation were examined (n=8 to 9 each). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control (angiotensin II [-] olmesartan [-] stent [-]).

chemical staining was then performed to examine the presence of AT₁ receptor and AT₂ receptor. Both receptors were found in SMPCs and EPCs (Figure 4B). We considered the possibility that AT₁ signals might be involved in increasing the transformation capacity of MNCs and, therefore, examined the effects of in vitro administration of angiotensin II or olmesartan on the transformation of MNCs. Angiotensin II did not enhance transdifferentiation, and olmesartan did not suppress transdifferentiation in vitro (Figure 4C).

Plasma ARB levels and Arterial Blood Pressure

The maximum drug concentration (C_{max}) levels of olmesartan at 15 mg/kg per day and valsartan at 50 mg/kg per day were 107±17 and 300±24 ng/mL, respectively. The C_{max} level of olmesartan at 3 mg/kg per day was 537±24 ng/mL in rabbits. Therefore, the dose of olmesartan used in rabbits is within a clinically relevant dose range. The C_{max} levels after oral administration of olmesartan at 5, 10, and 20 mg/body in hypertensive subjects are reported to be 149±21, 273±17, and 470±23 ng/mL (n=6, each), respectively. The C_{max} values after oral administration of valsartan at 80 and 160 mg/body in hypertensive subjects are reported to be

2830±920 and 5260±2300 ng/mL, respectively, according to the manufacturer’s interview form. Thus, the doses of olmesartan and valsartan used in the present study are within or below the clinically relevant dose range.

Treatment with olmesartan showed no effect on systolic and diastolic arterial pressure. Systolic and diastolic pressure were 94±2 and 59±5 mm Hg in the control group and 92±2 and 52±6 mm Hg in the olmesartan group.

Discussion

We have demonstrated for the first time that oral treatment with 2 types of ARBs (valsartan and olmesartan) attenuated in-stent neointimal formation in nonhuman primates (cynomolgus monkeys), supporting the conclusions of the VALPREST and VALVACE trials,^{12,13} which involved a relatively small number of patients. Although it is uncertain which animal model is most appropriate for the evaluation of in-stent neointima formation (restenotic changes), a nonhuman primate model may have an advantage over nonprimate animal models, because vascular inflammatory and proliferative responses to injury in nonhuman primates are more similar to those in humans than are other, nonprimate models.

Hence, the use of nonhuman primates may work for evaluation of the efficacy of ARB on in-stent neointima formation in clinically relevant conditions.

To obtain mechanistic insight into the beneficial effects of ARB, we first examined the time course of local expression of RAS components in rabbits (Figure 2). We found that expression of all of the components (ACE, angiotensin II, AT₁ receptor, and AT₂ receptor) increased, mainly in cells composed of neointima (monocytes and smooth muscle cells), at early stages (7 to 10 days after stenting), and persisted until 28 days after stenting. This RAS activation colocalized with increased NADPH oxidase-dependent DHE fluorescence (generation of superoxide anion) and was associated with increased levels of NADPH oxidase subunit mRNAs, consistent with previous reports showing that increased reactive oxygen species can be detected in activated smooth muscle cells after balloon injury.^{21,22} These *in vivo* observations are also consistent with previously published *in vitro* data suggesting that proliferation and migration of smooth muscle cells are critically mediated by oxidative stress via AT₁-mediated activation of NADPH oxidases.^{23–29} Interestingly, treatment with ARB not only attenuated the levels of oxidative stress markers but also reduced the level of immunoreactive AT₁. These data suggest the presence of a positive feedback loop in which activation of AT₁ further enhances expression and activity of the AT₁ receptor *in vivo*, as seen in the present study.

It is known that oxidative stress-induced inflammatory and proliferative processes are central to neointima formation after vascular injury.^{24,25} We and others have demonstrated that¹ increased monocyte-mediated inflammation or MCP-1 expression is associated with greater neointima formation after stenting,^{26,27} and² anti-MCP-1 gene therapy^{15,28–30} or administration of blocking antibody against the MCP-1 receptor³¹ markedly reduces neointima formation after vascular injury. However, no previous study examined whether or not those inflammatory and proliferative changes after stenting depends on the AT₁ receptor. In the present study, we, therefore, examined the effects of ARB on monocyte recruitment and MCP-1 expression after stenting and found that ARB reduced monocyte/macrophage recruitment, as well as MCP-1 immunoreactivity and gene expression. Furthermore, ARB inhibition increased the expression of growth-promoting factors, such as PDGF and IL-1 β . These data suggest that the beneficial effects of ARB may be attributed to the inhibition of oxidative stress-induced inflammatory and proliferative changes.

Recent studies have shown that peripheral blood contains bone marrow-derived progenitor cells, which contribute to neointima formation after injury.^{16,18,32} However, the role of RAS in the recruitment/differentiation of progenitor cells into the neointimal cells after stenting has not been addressed. Here we found that differentiation to SMPCs increased in MNCs from rabbits fed a high-cholesterol diet and was further enhanced in those rabbits that had also undergone stenting. Differentiation into EPCs was not affected by either the diet or stenting. *In vivo* treatment with ARB suppressed the increased differentiation into SMPCs induced by diet or stenting. In contrast, *in vitro* treatment with angiotensin II or ARB did not affect the capacity to differentiate into SMPCs

or EPCs. Therefore, the capacity to recruit or form SMPCs from MNCs after stenting might be determined by an AT₁ receptor-mediated pathway *in vivo* and, thus, contribute to in-stent neointima formation.

It must be mentioned that ARB did not significantly reduce arterial blood pressure in rabbits. Although arterial pressure was not measured in monkeys, the dose of ARB used in the present study is reported to show no effects on arterial blood pressure in monkeys.³³ Plasma ARB level was within or below the clinical range. Furthermore, ARB did not affect serum lipid levels. Therefore, the beneficial effect of ARB on in-stent neointimal formation is likely to be independent of its effects on arterial blood pressure or serum lipid.

Perspectives

This study provides experimental evidence suggesting that oral treatment with ARB at a clinical dose range attenuates in-stent neointima formation in rabbits and nonhuman primates. The beneficial effects were associated with reduced local oxidative stress, reduced expression of MCP-1 and other inflammation-promoting factors, and reduced recruitment/differentiation of SMPCs, suggesting that ARB is of potential clinical benefit in patients who have undergone vascular interventions.

Sources of Funding

This study was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (14657172 and 14207036) from the Ministry of Education, Science, and Culture, Tokyo, Japan; by Health Science Research Grants (Comprehensive Research on Aging and Health, and Research on Translational Research) from the Ministry of Health Labor and Welfare, Tokyo, Japan; and by the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the Organization for Pharmaceutical Safety and Research, Tokyo, Japan.

Disclosures

None.

References

1. Topol EJ, Serruys PW. Frontiers in interventional cardiology. *Circulation*. 1998;98:1802–1820.
2. Hoffmann R, Mintz GS, Dussaillant GR, Popma JJ, Pichard AD, Satler LF, Kent KM, Griffin J, Leon MB. Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. A serial intravascular ultrasound study. *Circulation*. 1996;94:1247–1254.
3. Holmes DR Jr, Leon MB, Moses JW, Popma JJ, Cutlip D, Fitzgerald PJ, Brown C, Fischell T, Wong SC, Midei M, Snead D, Kuntz RE. Analysis of 1-year clinical outcomes in the SIRIUS trial: a randomized trial of a sirolimus-eluting stent versus a standard stent in patients at high risk for coronary restenosis. *Circulation*. 2004;109:634–640.
4. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy C, Mann JT, Turco M, Caputo R, Bergin P, Greenberg J, Popma JJ, Russell ME. One-year clinical results with the slow-release, polymer-based, paclitaxel-eluting TAXUS stent: the TAXUS-IV trial. *Circulation*. 2004;109:1942–1947.
5. Rioufol G, Finet G, Giron I, Andre-Fouet X, Rossi R, Vialle E, Desjoux E, Convert G, Huret JF, Tabib A. Multiple atherosclerotic plaque rupture in acute coronary syndrome: a three-vessel intravascular ultrasound study. *Circulation*. 2002;106:804–808.
6. Daemen MJ, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res*. 1991;68:450–456.
7. Bell L, Madri JA. Influence of the angiotensin system on endothelial and smooth muscle cell migration. *Am J Pathol*. 1990;137:7–12.
8. Tharaux PL, Chatziantoniou C, Fakhouri F, Dussaule JC. Angiotensin II activates collagen I gene through a mechanism involving the MAP/ER kinase pathway. *Hypertension*. 2000;36:330–336.

9. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001;10:321-329.
10. Prasad A, Koh KK, Schenke WH, Mincemoyer R, Csako G, Fleischer TA, Brown M, Selvaggi TA, Quyyumi AA. Role of angiotensin II type 1 receptor in the regulation of cellular adhesion molecules in atherosclerosis. *Am Heart J*. 2001;142:248-253.
11. Wolf G. Free radical production and angiotensin. *Curr Hypertens Rep*. 2000;2:167-173.
12. Peters S, Gotting B, Trummel M, Rust H, Brattstrom A. Valsartan for prevention of restenosis after stenting of type B2/C lesions: the VAL-PREST trial. *J Invasive Cardiol*. 2001;13:93-97.
13. Peters S, Trummel M, Meyners W, Koehler B, Westermann K. Valsartan versus ACE inhibition after bare metal stent implantation—results of the VALVACE trial. *Int J Cardiol*. 2005;98:331-335.
14. Ohishi M, Ueda M, Rakugi H, Okamura A, Naruko T, Becker AE, Hiwada K, Kamitani A, Kamide K, Higaki J, Ogihara T. Upregulation of angiotensin-converting enzyme during the healing process after injury at the site of percutaneous transluminal coronary angioplasty in humans. *Circulation*. 1997;96:3328-3337.
15. Ohtani K, Usui M, Nakano K, Kohjimoto Y, Kitajima S, Hirouchi Y, Li XH, Kitamoto S, Takeshita A, Egashira K. Antimonocyte chemoattractant protein-1 gene therapy reduces experimental in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits and monkeys. *Gene Ther*. 2004;11:1273-1282.
16. Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*. 2002;8:403-409.
17. Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation*. 2002;106:1199-1204.
18. Caplice NM, Bunch TJ, Stalboerger PG, Wang S, Simper D, Miller DV, Russell SJ, Litzow MR, Edwards WD. Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:4754-4759.
19. Mrug M, Stopka T, Julian BA, Prchal JF, Prchal JT. Angiotensin II stimulates proliferation of normal early erythroid progenitors. *J Clin Invest*. 1997;100:2310-2314.
20. Rodgers KE, Xiong S, Steer R, diZerega GS. Effect of angiotensin II on hematopoietic progenitor cell proliferation. *Stem Cells*. 2000;18:287-294.
21. Nunes GL, Robinson K, Kalynych A, King SB, 3rd, Sgoutas DS, Berk BC. Vitamins C and E inhibit O₂- production in the pig coronary artery. *Circulation*. 1997;96:3593-3601.
22. Shi Y, Niculescu R, Wang D, Patel S, Davenpeck KL, Zalewski A. Increased NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species in coronary arteries after balloon injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:739-745.
23. Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res*. 2001;88:888-894.
24. Egashira K. Clinical importance of endothelial function in arteriosclerosis and ischemic heart disease. *Circ J*. 2002;66:529-533.
25. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation*. 2003;108:2034-2040.
26. Farb A, Weber DK, Kolodgie FD, Burke AP, Virmani R. Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulation*. 2002;105:2974-2980.
27. Welt FG, Rogers C. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1769-1776.
28. Usui M, Egashira K, Ohtani K, Kataoka C, Ishibashi M, Hiasa K, Katoh M, Zhao Q, Kitamoto S, Takeshita A. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy inhibits restenotic changes (neointimal hyperplasia) after balloon injury in rats and monkeys. *Faseb J*. 2002;16:1838-1840.
29. Egashira K, Zhao Q, Kataoka C, Ohtani K, Usui M, Charo IF, Nishida K, Inoue S, Katoh M, Ichiki T, Takeshita A. Importance of monocyte chemoattractant protein-1 pathway in neointimal hyperplasia after periarterial injury in mice and monkeys. *Circ Res*. 2002;90:1167-1172.
30. Egashira K. Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease: special reference to monocyte chemoattractant protein-1. *Hypertension*. 2003;41:834-841.
31. Horvath C, Welt FG, Nedelman M, Rao P, Rogers C. Targeting CCR2 or CD18 inhibits experimental in-stent restenosis in primates: inhibitory potential depends on type of injury and leukocytes targeted. *Circ Res*. 2002;90:488-494.
32. Skowasch D, Jabs A, Andrie R, Dinkelbach S, Luderitz B, Bauriedel G. Presence of bone-marrow- and neural-crest-derived cells in intimal hyperplasia at the time of clinical in-stent restenosis. *Cardiovasc Res*. 2003;60:684-691.
33. Takai S, Kim S, Sakonjo H, Miyazaki M. Mechanisms of angiotensin II type 1 receptor blocker for anti-atherosclerotic effect in monkeys fed a high-cholesterol diet. *J Hypertens*. 2003;21:361-369.

ステント内再狭窄の分子機構と生体吸収性ナノ粒子電着による 遺伝子溶出ステントがもたらす新たな治療戦略

船越 公太, 江頭 健輔

要約：我々はステント内再狭窄に炎症が重要な役割を果たしていることに注目し、単球走化因子 (MCP-1) のステント内再狭窄での関わりを明らかにした。そして変異型 MCP-1 タンパク (7ND タンパク) の遺伝子導入はステント内新生内膜形成を有意に抑制した。我々は電着塗装の応用でポリ乳酸グリコール酸共重合体 (PLGA) ナノ粒子をステントにコーティングする技術を開発した。緑色蛍光タンパク (GFP) 遺伝子プラスミドを封入したナノ粒子をコーティングしたステントをブタ冠動脈に留置したところ、28日後にも発現が確認された。我々は単球走化因子 (MCP-1) のステント内再狭窄での関わりを明らかにし、変異型 MCP-1 タンパク (7ND タンパク) の遺伝子導入はステント内新生内膜形成を有意に抑制することを明らかにしてきた。次には 7ND 遺伝子プラスミドを封入したナノ粒子を用いた遺伝子プラスミド溶出ステントを作製し、有効性を評価する予定である。

1. はじめに

我々は数年前にプラスミド溶出ステントの開発に取りかかり、7ND プラスミド溶出ステントの作成に成功した。しかし不十分な点がいくつかあり、臨床応用を考えた時、未完成であった。そこで新たなテクノロジーを導入して、新たなプラスミド溶出ステントに着手した。我々はこの新しいプラスミド溶出ステントは非常に画期的なステントになると考えている。

この総説ではまず動脈硬化病変 (とくにステント内再狭窄) における炎症と単球走化因子 (Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP-1) の役割について概説し、次に MCP-1 をターゲットとした治療戦略に

ついて紹介する。そして最後に臨床応用のための医療器具へどのようにシステムを構築するのか概説する。

2. 炎症はステント内再狭窄にいかにかかわるのか

1) 経皮的冠動脈インターベンションの問題点

冠動脈疾患とは冠動脈の狭窄・閉塞による急性・慢性心筋虚血である。したがって、この狭窄・閉塞部位をカテーテルと呼ばれる細い管を用いて再開通させる経皮的冠動脈インターベンション (Percutaneous Coronary Intervention, PCI) という治療戦略が最も有用となる。バルーンによる血管形成術 (Plain Old Balloon Angioplasty, POBA) では、血管自体の弾力による初期の縮み (弾性リコイル) や晩期における外膜の線維化による血管外からの収縮機転 (血管リモデリング) により、4-5 割の患者において再狭窄という現象が認められる。

2) ステント内再狭窄とは新生内膜過形成である

そこで、この再狭窄を防ごうとして用いられるのが POBA 後に血管内に留置されるステントという薄い金属のメッシュ様支持構造物である。

しかしこのステント治療後にも再狭窄が 2-3 割の患者に認められ、薬剤溶出ステントの出現まで、非常に大きな医学的課題であった。

ステント内再狭窄では POBA 後の再狭窄とは異なり、ステント内に形成される新生内膜が再狭窄の原因である。新生内膜は POBA 後にも認められるが、ステント留置後にはさらに強い新生内膜形成が生じ、これが再狭窄を引き起す (1, 2)。

新生内膜の形成についてはヒトの病理組織像の観察

キーワード：ステント内再狭窄、薬剤溶出ステント、単球走化因子 (MCP-1)、変異型 MCP-1 タンパク (7ND タンパク)、ポリ乳酸グリコール酸共重合体 (PLGA) ナノ粒子

九州大学大学院医学研究院 循環器内科学 (〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1)

e-mail: funakosh@cardiol.med.kyushu-u.ac.jp egashira@cardiol.med.kyushu-u.ac.jp

原稿受領日：2006年11月29日、会誌編集委員会依頼原稿

Title: Molecular mechanism of in-stent restenosis and novel treatment strategy of gene-eluting stent developed with bioabsorbable nano-particle electrodeposition. Author: Kouta Funakoshi, Kensuke Egashira

により, 次のような経過で起きることが明らかとなっている。

まずステント留置直後からステントストラット表面に血小板の付着とフィブリンの析出が認められる。

そして好中球の接着・浸潤と引き続いて単球の接着・浸潤が起きる。

2週間を過ぎると, この微小血栓を置き換えるように, 遊走してきた平滑筋細胞が増殖し, 初期の新生内膜を形成する。

それ以後, 平滑筋細胞が糖タンパクやプロテオグリカンといった細胞外基質を産生し, 新生内膜が増殖していく。

ステント植え込み後4-5カ月を過ぎても, POBAとは異なり, 炎症反応が持続する。すなわちストラット周囲のマクロファージとT細胞の浸潤である。またストラット表面にはマクロファージを起源とする多核の異物巨細胞が見られる。また毛細血管の新生が認められる。

ステント植え込み後の新生内膜の形成は約6カ月でピークに達する。

その後は細胞外基質が徐々に糖タンパクやプロテオグリカンからコラーゲンに置換され, ステント植え込み後の組織修復反応が完成する。

なお新生内膜の平滑筋細胞の由来に関しては中膜平滑筋細胞が脱分化して遊走するとの説が広く認められているが, 骨髄由来の平滑筋幹細胞とする説(3)もあり, 未だ議論の余地がある。

3) ステント内再狭窄におけるマクロファージの役割

ヒトの病理像による観察から単球・マクロファージがステント内再狭窄に何らかの役割を果たしていることが推定される(4)。

しかも, 動物モデルにおいて, ステントストラット周囲の単球・マクロファージの浸潤の程度が新生内膜面積に相関するという報告(5)や, ヒトにおいてステント留置後早期の流血中の単球の増加が新生内膜量に相関する(6), あるいは単球・マクロファージの浸潤の程度が新生内膜面積に相関する(7)との報告もあることから, 単球・マクロファージが実際に中心的な役割を果たしていると考えられる。

この浸潤した単球・マクロファージが何をしていた, どのように再狭窄にかかわっているのかに関しては次のようなものが考えられる。

a. マス効果

初期病変においては多数の単球・マクロファージが新生内膜に浸潤しており, 浸潤した単球・マクロファージの体積により新生内膜の体積が増加する。

b. 生理活性物質の産生による効果 (表1)

単球・マクロファージはさまざまな炎症性疾患で中心的な役割を果たすことが知られている。単球は100以上の生理活性物質を産生することが知られており, このうち主要なものを表1にまとめた。

b-1. 中膜平滑筋細胞への作用

活性化した単球・マクロファージはさまざまな増殖因子を産生する。この増殖因子が中膜平滑筋細胞の遊走・増殖, 血管新生を引き起こすと考えられる。また活性酸素種の産生を介して, 増殖因子・サイトカインの産生を引き起こす(表1)。

b-2. 細胞外基質の消化

細胞外基質は細胞の遊走を妨げる障壁の役割を果たしている。さまざまなタンパク分解酵素(e.g. 細胞外基質分解酵素群)が単球・マクロファージにより産生され, これによって単球・マクロファージ自身の浸潤・遊走と平滑筋細胞の遊走が促進される。

表1 単球・マクロファージによって産生される生理活性物質

補体
凝固因子 (ビタミン K 依存の第 VII 因子, 第 X 因子, 第 V 因子およびプロトロンビン, フィブリンノーゲン, 組織因子)
プロスタグランジン
ロイコトリエン
増殖因子 (PDGF, TGF- β , MCSF, GCSF)
サイトカイン (TNF- α , IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, INF- γ)
PAF, lyso-PC
ケモカイン (MCP-1, -2, -3, IL-8, RANTES, ELC, PARC, MIP-1, eotaxin, MDC, TARC, LARC)
活性酸素種 (ROS)
タンパク分解酵素 (エラスターゼ, カテプシン G, MMPs)

PDGF, platelet-derived growth factor; TGF- β , transforming growth factor; MCSF, monocyte/macrophage colony stimulating factor; GCSF, granulocyte colony stimulating factors; PAF, platelet activating factor; lyso-PC, lysophosphatidylcholine; MCP, monocyte chemoattractant protein; RANTES, regulated upon activation, normal T-cell expressed; ELC, EB11-ligand chemokine; PARC, pulmonary and activation regulated chemokine; MIP, macrophage inflammatory protein; MDC, macrophage-derived chemokine; TARC, thymus and activation-regulated chemokine; LARC, liver and activation-regulated chemokine; IL, interleukin; IFN, interferon; TNF, tumor necrosis factor

b-3. 炎症を遷延させるサイトカイン・ケモカインの産生

浸潤した単球・マクロファージは MCP-1 の産生をおこない、さらなる単球・マクロファージの浸潤をおこす。また一般的に慢性炎症部位ではインターロイキン (IL)-1 や腫瘍壊死因子 (TNF)- α 系のサイトカインを分泌することで T 細胞を活性化がおき、一方 T 細胞は IL-4 またはインターフェロン (IFN)- γ といったサイトカインを出してマクロファージを融合させて多角の異物巨細胞をつくる事が出来る。病理組織学的観察により異物巨細胞が認められていることが明らかになっており、これは間接的にこのマクロファージと T 細胞のサイトカインによる相互活性化が起きていることを示唆する。

c. アポトーシスした細胞の消化

中膜平滑筋細胞はステント留置による機械的傷害により一部はアポトーシスに陥る。この細胞はおそらく留置直後に浸潤する好中球と、24 時間後以降に浸潤するマクロファージによってクリアランスされる。好中球は食食後にアポトーシスをおこすため、好中球の死骸もマクロファージによって片づけられる。

4) ステント内再狭窄における単球・マクロファージ浸潤の抑制効果

MCP-1 は単球・マクロファージの浸潤に関わる最も重要な因子であることが知られている。

MCP-1 がステント内再狭窄において重要な役割を果たしていることは、ヒト POBA 後の血中濃度による観察などにより推測されていた(8)。

我々のグループは MCP-1 の変異型タンパク 7ND に注目した。7ND は MCP-1/CCR2 系で優性阻害的な拮抗物質として働く(9, 10)。

我々は高脂血症ウサギのステント内再狭窄モデルを作成しステント留置 3 日前に 7ND プラスミドを筋注して MCP-1/CCR2 の抑制を試みた。28 日後の新生内膜面積は約 60% に減少した。ステント留置後 7 日のステント留置部の血管を採取し、免疫組織学的観察を行なったところ、RAM11 陽性細胞(マクロファージ)の浸潤が減少していた。また血管の RT-PCR を行なったところ、生食筋注群との比較で、TNF- α , MMP-2, MMP-9 の mRNA レベルは変わらなかったが IL-6, IL-1 β , VEGF の mRNA の抑制が認められた。

次に我々はステント留置直後に留置部へ局所投与カテーテル (Remedy[®], Boston-Scientific 社) を用いてアデノウイルスベクターによる 7ND 遺伝子導入を行なった。28 日後の新生内膜形成は上記の全身投与モ

デルと同様に強力に抑制された(11)。

ステント内再狭窄に対する、7ND 療法は優れた戦略であることは間違いない。しかし、アデノウイルス投与は臨床応用しづらいため、局所投与でかつアデノウイルスベクターを用いない方法の開発が必要であると考えられた。

3. 薬剤送達システム (Drug Delivery System, DDS) の開発

1) 薬剤溶出ステント

21 世紀になり、PCI は新たな時代に突入した。それは薬剤溶出ステント (Drug Eluting Stent; DES) の登場である。日本でも 2004 年より Cypher[®] (Johnson & Johnson 社) が認可され、それ以後、その再狭窄の低さから、たちまち市場を席巻している。Cypher[®] の再狭窄率は実に 5-10% 以下である。

2) DES の構造

DES は薬剤の局所投与をステントプラットフォームを用いて行なう DDS であり、基本構造は脂溶性の治療因子を脂溶性のポリマーに混ぜたものをステント表面にコーティングしている。この方法は局所投与カテーテルによる薬剤の投与が薬剤の滞留性に劣っており、効果がほとんど認められなかったことによる反省から試みられた。

DES 始まりは 1990 年代初頭である。このころ、米国で豊胸手術に用いられたシリコンをめぐる幾多の訴訟があり、多くの企業が生体内でポリマーを用いることに消極的であった。

しかし一部の企業はポリマーをキャリアマトリックスとして用い、ステントから薬剤を徐放することを考え、これが薬剤溶出型ステントの成功へとつながることになった。

3) キャリアマトリックス

DES はステントプラットフォームと治療因子 (薬剤) とキャリアマトリックスの組み合わせによって可能となった。そしてさまざまな組み合わせが試みられた中、BxVELOCITY プラットフォームにシリムスとメタクリル酸共重合体 (アクリル系樹脂) の組み合わせ (Cypher[®], Johnson & Johnson 社), Express プラットフォームにパクリタキセルとラクチド-エプシロンカプロラクトン共重合体 (ナイロン系樹脂) の組み合わせ (TAXUS Express[®], Boston Scientific 社) の 2 つが広く使用されるに至っている。

さてキャリアマトリックスの条件として次の 6 つがあげられる。(1) 治療因子の徐放、(2) 生体適合性 (炎症惹起しない、またモノマー毒性がない)、(3) 非

血栓性, (4) 柔軟性および接着性 (ステント拡張時に剥離しないこと), (5) 滅菌操作に対する安定性であり, 上記の2つのDESに用いられたポリマーはいずれの条件も満たしているとされている。

4) 第一世代遺伝子溶出ステントの構造

7NDによる局所治療のため, 我々はプラスミド溶出ステントの開発にとりかかった。まず従来のDESの構造の応用を考えた。すなわち適切なキャリアマトリックスを選択し, これにプラスミドを混ぜるという方法である。(特許出願, 論文準備中)

キャリアマトリックスとしてポリビニルアルコールを選択し, これを架橋して不溶化した。また初期のバースト溶出を抑制するためポリ乳酸をコーティングしトップコートとした。

ポリビニルアルコールにプラスミドを溶解させ, それをコーティングするという手順をとるため, コーティング量は多少ばらつくが500-700 μg のプラスミドがコーティングされた。

マーカー遺伝子としてLacZプラスミドを用いて遺伝子導入の確認を行い, 3日後に摘出した血管をX-Gal染色するとステント留置部位に青染を認め, 遺伝子導入が確認された。

次にコレステロール負荷ウサギの腸骨動脈に7NDプラスミドコーティングステント, LacZプラスミドコーティングステントを留置し, 28日後の摘出血管を薄切して新生内膜面積を評価したところ, 有意な抑制を認めた。

5) 第一世代遺伝子溶出型ステントの欠点

しかしこの遺伝子溶出型ステントには以下のような欠点があることが同時に明らかになった。

a. トップコートとプラスミド保持マトリックスとの接着性

トップコートに水分子の侵入を防ぐために脂溶性のポリマーを使用した。脂溶性のポリマーと水溶性のポリマーは接着が悪く, また水中で水を含んだ時の膨張率が異なるため, 血管内で剥離する可能性がある。

b. 遺伝子溶出速度

一般的なDESが脂溶性の薬剤を脂溶性のポリマーに混ぜているため, 血中での徐放が可能になるが, 水溶性ポリマーでは水溶性であるプラスミドは速やかに拡散してしまうため徐放することが出来ない。

c. 遺伝子導入効率

In vitroの実験ではプラスミドの導入率を上昇させるためにカチオン性脂質などの試薬を用いるが, このような試薬を用いることが出来ないため放

出されたプラスミドの導入率は低い。

我々が以前7ND療法を行なった既出の2つのモデルと比較し, 治療効果は小さかった。この差は遺伝子導入効率の違いにあると思われた。

したがって従来のDESの構造を模した水溶性ポリマーによるプラスミド溶出型ステントでは臨床応用の観点から不十分と考えられ, 革新的なコーティング方法が必要と考えられた。

4. 次世代プラスミド溶出ステントの作成

1) ナノ粒子の応用

そこで我々が注目したのは「ナノテクノロジー」である。

近年さまざまな物質をナノサイズに加工することが競われており, 大きな注目を浴びている。しかし医療分野での実用化は遅々として進んでいないのが実情である。

我々は生体吸収性ポリマーである乳酸・グリコール酸共重合体 (co-poly-lactic acid/glycolic acid, PLGA) に注目した。このポリマーは吸収糸などの材料として30年以上, 医療分野で使われており, 生体適合性にすぐれた素材である。加水分解によって分解し, また分解のスピードは乳酸とグリコール酸の配合比を変えることで調節できることが知られている。武田薬品工業株式会社のPLGAマイクロ粒子による酢酸リユプロレリン長期徐放型注射剤は画期的なDDS製剤として知られており, 3カ月に1回の皮下投与で, 十分な血中濃度を保つことが出来る。

ところがPLGAは析出する結晶が針結晶であるためナノサイズの小さな球状結晶を作るのは技術的に困難とされていた。これを可能にしたのが川島らによる球形晶析法で, これによって直径200 nm程度のPLGAナノ粒子の量産製造が初めて可能となった。

我々は2005年よりこの技術を持つ企業との共同研究を開始し, このナノ粒子にさまざまな治療因子を封入し, DESへの応用を試みた。

なお生体吸収性分子には加水分解によるものと生体の酵素による分解によるものの2種類が知られているが, 酵素の反応は個人差があるため安定した徐放速度が得られないという欠点があり, PLGAはその点優位性があるとされている。

2) ナノ粒子の特徴

我々は培養ヒト冠動脈平滑筋および単球細胞 (THP-1) におけるナノ粒子の取り込みを観察した。

培養液にナノ粒子を添加したところPLGAナノ粒子は30分以内に細胞内へ取り込まれることを観察した。

また興味深いことに細胞質内の核周囲に集積している像が観察された。

Rejman らはさまざまな大きさのラテックスビーズを用いることで、細胞へのエンドサイトーシスの機序が粒子径によって異なること、そして細胞内での集積部位が異なることを示したが(12)、我々の結果も Rejman らの観察と類似したものとなった。しかしエンドサイトーシスがどのような機序で起こるのかは詳細は不明である。

エンドサイトーシスは大きく3つ、すなわちファゴサイトーシス、ピノサイトーシス(カベオリン依存性、クラスリン依存性、クラスリン非依存性)、マクロピノサイトーシスに分類されているが、どの機序でナノ粒子のエンドサイトーシスが起きているのか、またどの機序でのエンドサイトーシスが遺伝子導入に適切なのかは今後検討していかなければならない。

3) どのようなコーティングを行うのか?

このナノ粒子をステント表面にコーティングする技術について工夫が必要であった。我々はナノ粒子の電荷を制御し、これを用いてステント表面に電気的に接着した。この方法は電着塗装(electro-deposition paint)という塗装方法を応用したものである。このステントを培養ヒト平滑筋細胞の培養液中に浸したところ、ステントから遊離したナノ粒子が細胞に取り込まれることを確認した。

この点は非常に大切な点である。電着コーティングにより優れた細胞内送達能は損なわれなかった。したがって、従来の薬剤溶出型ステントは薬剤のステントからの溶出がポリマーによって徐々に起こるのに対し、我々のナノ粒子コーティングステントは薬剤の溶出が細胞内で起こるといった点が異なっている。

我々はこの方法を用いることで、第一世代の遺伝子溶出型ステントの欠点を克服できると考えた。

すなわち優れた細胞内送達により遺伝子導入効率が向上し、細胞内での徐放により遺伝子発現期間の延長が期待される。

4) 遺伝子発現の確認

我々はナノ粒子コーティングによる GFP プラスミド溶出型ステントを作成し、正常ブタ冠動脈前下行枝に留置した。14日後、28日後に屠殺し、摘出した冠動脈を蛍光下に観察すると、ステントストラット部に一致して GFP の蛍光を認めた。

一般的にプラスミドの遺伝子導入では導入後数日以内に発現が低下することが知られており、我々の方法では28日と長期にわたって遺伝子の発現を認めており、これはナノ粒子による発現期間の延長によると思われる

た。

新生内膜の平滑筋細胞の遊走・増殖はステント留置後7-14日後より始まることが知られており、従来のプラスミド導入方法では治療標的の発現に一致した治療因子の局所送達は困難と考えられてきた。しかし我々のナノ粒子を用いた次世代遺伝子プラスミド溶出ステントによって長期の遺伝子発現が可能となり、平滑筋細胞の遊走・増殖を治療対象とすることが可能になった。この革新的な技術によってナノ粒子の細胞内分解時間の制御、プラスミド封入率の向上、多層・多剤コーティングなどが可能であり、本成果の臨床的意義は極めて大きいと思われた。

今後は遺伝子封入率の向上および吸着量の増量を測ってこのシステムの改善をしていくのと同時に、次世代7ND プラスミド溶出ステントの作成および効果の確認をしていく予定である。

5. ステントプラットフォームの改良

優れた DES を開発するためには、DES の3要素である治療因子、キャリアマトリックス、ステントプラットフォームのそれぞれの開発が必要である。

我々の方法により優れた治療因子である7ND プラスミドを新規ナノ粒子を担体としてステントにコーティングすることができた。我々は次にステントプラットフォームを改良することを考えている。

生体吸収性のステントプラットフォームを用いることが出来れば、生体吸収性のマトリックスを用いているので、生体完全吸収性 DES の開発が可能となる。

そもそもステントは弾性リコイルや血管リモデリングを防ぐためのもので、それ以降ステントが残存することは異物反応や機械的傷害のため、かえって再狭窄を促進する方向に働くと考えられている。また生体完全吸収性になることで、再治療が可能となる。

現在、ヒトの臨床試験が行なわれている生体吸収性のステントプラットフォームは、ポリマーを用いた Igaki-Tamai ステント(井垣医療設計)、BVS (Abbott 社)、REVA (REVA Medical 社、BostonScientific 社と提携)と金属を用いた AMS (Biotronic 社)がある。

ポリマーを用いたステントは強度や可塑性に劣っており、リコイルも大きい。したがって、金属を用いるという Biotronic 社の戦略は妥当なものと思われた。Biotronic 社の AMS はマグネシウム合金を用いたもので、約1カ月で腐食により半径方向力(radial force)を失う(13)。

我々は Biotronic 社のマグネシウム合金とは異なるマグネシウム合金を用いてステントの試作品を作製し、

約3カ月間でステント構造が消失することを確認した。Bitoronic社のものと異なり、適切な期間強度を保つことが可能であり、かつ加工も簡便であるといった利点がある。今後このステントプラットフォームを用いることで、生体完全吸収性DESを作成する予定である。

6. 今後の展開

冠動脈疾患において安定化プラークによる労作性狭心症、不安定化プラークの破綻による急性冠症候群に対するPCIは確立されたものがある。

しかし、破綻する前の不安定化プラークに関しては、現在のところ我々はほとんど無力である。近年、この不安定化プラークをMRIなどにより検出しようという試みが数多く行なわれおり、おそらく近い将来にも臨床の現場で、日常的に不安定化プラークの画像化が行われるようになると思われる。

そして、その先には不安定化プラークに対する治療ということが行われるようになると思われるのだが、我々の7ND遺伝子溶出ステントはその候補になりうると考えられる。

なぜなら、不安定化プラークの破綻・びらんにはマクロファージの産生するMMP等のタンパク分解酵素による細胞外基質の分解が大きな役割を果たしているからである。生体完全吸収性7ND溶出ステントならば、不安定化プラークが発生するたびに治療が可能であり、臨床的な意義は極めて大きい。

7. おわりに

薬剤溶出ステントはその優れた再狭窄抑制効果のため、瞬く間に市場を席卷し、ほとんど全ての循環器内科医は無邪気にも薬剤溶出ステントは究極の治療法だと信じてきた。

2003年にはFDAがCypherとTaxusに関する血栓性閉塞に関する勧告を行ない、また一部の病理学者らによる有害事象の報告があったが(14, 15)、余り省みられることはなかった。

こうして2006年までに全世界で実に600万人以上の患者にDESが使用された。

しかし2006年になり、衝撃的な臨床試験の解析が

相次いで報告されている。

最初は、2006年3月の米国心臓病学会でのことであり、Pfistererら(Basel大学, スイス)はBASKET-LATE(BASKETスタディの追跡観察)を発表した。DES群でclopidogrel中止後の遠隔期に心臓死、非致死的心筋梗塞が有意に多かったと報告した。

2006年9月の世界心臓病学会/欧州心臓病学会では、まずCamenzindら(Geneva大学, スイス)のメタ解析の発表があり、BMS群との比較で総死亡と心筋梗塞の相対危険度はCypherで38%上昇、Taxusで15%上昇していた。そしてNordmann(Basel大学, スイス)によるメタ解析の発表があり、BMS群と比べて心血管死は差はなかったものの、非心血管死はCypher群で上昇傾向が認められたと報告した。

2006年10月のTCTではStoneら(Columbia大学)によるメタアナリシスが発表され、CypherおよびTaxusの双方で留置後1年から4年で晩期血栓症のリスクが有意に上昇していた。なお心筋梗塞、死亡、循環器疾患による死亡、心筋梗塞での死亡は有意差を認めなかった。

このように長期安全性に対する懸念が強まり、2006年には最もDESの使用に積極的な米国でさえDESの市場占有率は減少傾向にある。

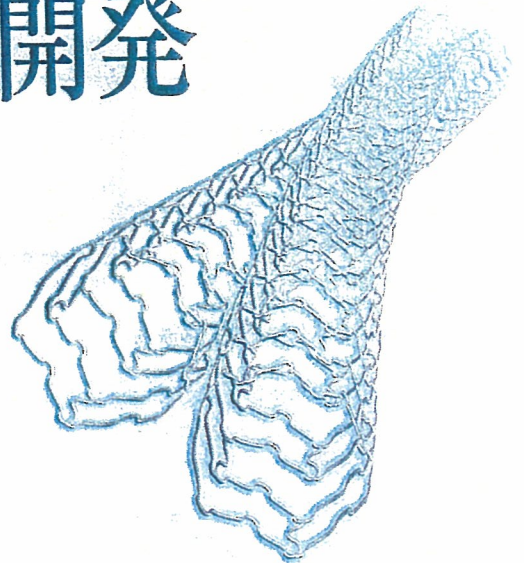
したがって新たなDESの開発は急務であり、我々の研究によって少しでも臨床に貢献できればと考えている。

文 献

- 1) Komatsu R, et al. *Circulation*. 1998;98:224-233.
- 2) Gomes WJ, et al. *Ann Thorac Surg*. 2003;76:1528-1532.
- 3) Tanaka K, et al. *Circ Res*. 2003;93:783-790.
- 4) Osterud B, et al. *Physiol Rev*. 2003;83:1069-1112.
- 5) Kornowski R, et al. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:224-230.
- 6) Fukuda D, et al. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:18-23.
- 7) Farb A, et al. *Circulation*. 2002;105:2974-2980.
- 8) Oshima S, et al. *Jpn Circ J*. 2001;65:261-264.
- 9) Mori E, et al. *Circulation*. 2002;105:2905-2910.
- 10) Ohtani K, et al. *Gene Ther*. 2004;11:1273-1282.
- 11) Nakano K, et al. *Atherosclerosis*. 2006;in press.
- 12) Rejman J, et al. *Biochem J*. 2004;377:159-169.
- 13) Waksman R, et al. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2006;68:607-617;discussion 618-619.
- 14) Virmani R, et al. *Circulation*. 2004;109:701-705.
- 15) Ong AT, et al. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:2088-2092.

ナノDDS制御コーティング技術の創製による次世代ステント内再狭窄抑制対策の開発

船越公太 (九州大学大学院医学研究院循環器内科学)
江頭健輔 (九州大学大学院医学研究院循環器内科学助教授)



P o i n t

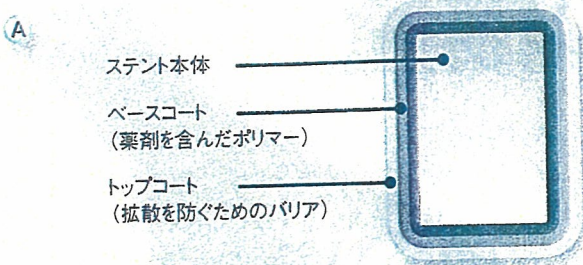
- 2006年10月のカテーテル治療学会では、Stoneらによるメタ解析が発表され、CypherおよびTaxusの双方で留置後1年から4年で晩期血栓症のリスクが有意に上昇していた。なお心筋梗塞、死亡、心血管死は有意差を認めなかったと報告された。
- 薬剤溶出ステント群に好ましくない事象が認められる原因としては、①シロリムスやパクリタキセルの非特異的な細胞増殖抑制作用のため内皮再生が妨げられる。②永久に残存するポリマーに対する異物・過敏反応が起きる、というような原因が考えられる。
- 動物モデルやヒトの病理像における観察より、単球・マクロファージがステント留置後約1週間後よりストラット周囲に浸潤していることが明らかになっており、何らかの関与をしていることが考えられる。われわれは単球・マクロファージの浸潤に関わる最も重要な因子である単球走化因子(MCP-1)に注目した。
- キャリアマトリックスとしては、生体吸収性ポリマーの使用が不可欠と考え、乳酸・グリコール酸共重合体 (co-poly-lactic acid/glycolic acid; PLGA) を第一候補に考えた。そしてPLGAナノ粒子が優れた細胞内送達能をもつことが確認できた。
- PLGAナノ粒子をステント表面にコーティングする方法としては、カチオン電着塗装 (cationic electro-deposition coating) の応用を用いた。カチオン電着塗装とは電気メッキのように金属製の被塗物を陰極として通電すると分散液中のプラスに荷電した塗料が金属表面に静電的に接着するという方法である。

はじめに

2003年に米国でCypher®ステントが米国食品医薬品局 (FDA) によって承認されて以来、薬剤溶出ステント (Drug Eluting Stent; DES) はその優れた再狭窄抑制効果のため市場を席巻している。2006年にはステント市場の9割をDESが占有し、2006年末までに全世界で実に600万人以上の患者に使用されている¹⁾。

しかし2006年はDESの使用の長期安全性に疑問を投げ掛ける臨床試験が次々と発表され、多くの臨床家に大きな衝撃を与えた歴史的な年でもあった。晩期ステント内血栓症のリスクに関する数々の報告である²⁾。したがって、第一世代のDES使用基準は反省の時を迎えたともいえる。また、より安心な次世代治療法の開発が急務となってきた。

この総説では、まず従来のDESについて概説する。次に2006年に発表された臨床試験およびFDAの勧告に関して説明する。そして、ステント内再狭窄における単球・マクロファージの役割とその抑制というわれわれが考案してきた治療戦略



B プタ冠動脈におけるシロリムス徐放カーブ

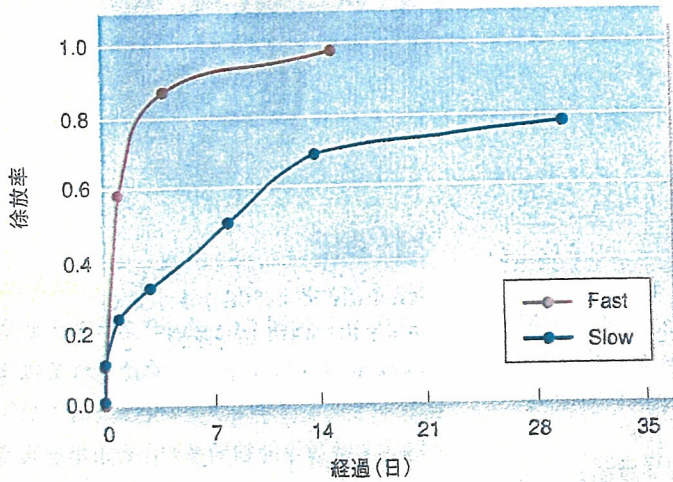


図1 ステンツの基本構造

A: ステンツ表面のポリマー層から薬剤が徐放される
 B: 開発時のCypherは2種類のコーティングが開発された。最終的にはslow releaseのコーティングが採用された。

について述べる。最後にその戦略を活かすための遺伝子溶出ステントを作製する技術について説明する。

従来の薬剤溶出ステント

ほとんどのDESは共通した基本構造を有する。脂溶性の薬剤を脂溶性のポリマーに溶かしてステント表面をコーティングするという構造である(図1)。したがって用いるポリマーと薬剤、ステントの組み合わせでさまざまなDESの設計が可能となる。なかでも Bx VELOCITY® プラット

フォームにシロリムスとメタクリル酸共重合体(アクリル系樹脂)の組み合わせ(Cypher®, Johnson & Johnson社)、Express™ プラットフォームにバクリタキセルとラクチド-ε-ブシロノカプロラクトン共重合体(ナイロン系樹脂)の組み合わせ(TAXUS® Express2™, Boston Scientific社)の2つは2003年と2004年のFDAの認可以来、その強い再狭窄抑制効果から世界的に爆発的に使われるようになった。

なおポリマーとして必要な特性は、①治療因子の徐放、②生体適合性(炎症を惹起しない、またモノマー毒性がない)、③血液適合性(血栓を作らない)、④柔軟性および接着性(ステント拡張

時に剥離しないこと)、⑤滅菌操作に対する安定性であり、上記の2つのDESに用いられたポリマーはいずれの条件も満たしているとされていた。

■ 現行のDESの安全性に対する懸念

2003年10月に早くもFDAがCypherに関する有害事象を通知していた³⁾。認可から半年でステント留置後1ヵ月以内の血栓症が290件以上報告されたための動きであったが、あまり省みられることはなかった。その後も一部の臨床家による、留置後1年以上経った超遠隔期にさえ血栓症が認められたとの症例報告⁴⁾や抗血小板薬中止直後にステント内血栓症による急性心筋梗塞が生じたという報告^{5,6)}、抗血小板薬の投与にもかかわらず0.35%の患者で認められたとの報告⁷⁾が相次いだ。またVirmaniらのグループを筆頭とした病理学者的研究者らが、ブタ冠動脈モデルで炎症の遷延と内皮再生の遅延が認められるとの報告⁸⁾や、ヒトの留置後6~12ヵ月のアテレクトミーの標本や剖検例の観察より、動物モデル同様に炎症の遷延、フィブリンの沈着、内皮再生の遅延が認められるという報告⁹⁾を続けていた。しかしこのような病理学者サイドからの警鐘は多くの臨床家からは“特別な(例外的)事象”とみなされ、DESの使用症例は年々増加し、2006年末には全世界で少なくとも600万人の患者に使用されたことになる。

ところが2006年になり、衝撃的な臨床試験の解析が相次いで報告されている。最初は、2006年3月の米国心臓病学会でのことであり、Pfistererら(Basel大学、スイス)はBASKET-LATE試験(Basel Stent Kosten Effektivitats Trial-Late Thrombotic Events)を発表した。DES群ではクロピドグレル(プラビックス[®])中止後の遠隔期に心臓死、非致死的心筋梗塞が有意

に多かったと報告²⁾した。

2006年9月の世界心臓病学会/欧州心臓病学会¹⁰⁾では、まずCamenzindら(Geneva大学、スイス)のメタ解析の発表があり、ベアメタルステント(bare metal stent; BMS)群との比較で総死亡と心筋梗塞の相対危険度がCypherで38%上昇、Taxusで16%上昇していた(図2)。そしてNordmannら(Basel大学、スイス)によるメタ解析の発表があり、BMS群と比べて心血管死の差はなかったものの、非心血管死はCypher群で上昇傾向が認められたと報告した¹¹⁾。Wenaweserら(ロッテルダム胸部センター、オランダ)の報告した臨床試験では血栓症の累積発症率は2.9%とそれほど多くなかったものの、年を追って発症が落ち着くどころかむしろ、危険度は年々増加傾向(約0.6%の増加/年)にあるとした。またBoston Scientific社は2006年6月までの内部データの解析により、BMS群と比較してTAXUSステント群で晩期血栓症のリスクが小さいものの有意に上昇していたと報告した。

2006年10月のカテーテル治療学会(TCT)¹²⁾では、Stoneら(Columbia大学、米国)によるメタ解析が発表され、CypherおよびTAXUSの双方で留置後1年から4年で晩期血栓症のリスクが有意に上昇していた。なお心筋梗塞、死亡、心血管死は有意差を認めなかった。

2006年12月、FDAは諮問委員会を招集し、勧告を発表した¹³⁾。さまざまな立場の専門家の討議上、またエビデンスに基づいた結論にとどめるべきとの立場上(適切なスタディデザインの臨床試験が少ないなか)、DESの使用に関する明確で具体的な結論には達しなかった。適応の範囲内での使用に関しては晩期ステント血栓症の危険は有意に上昇するものの、死亡および非致死性心筋梗塞は上昇しないとした一方、認可外使用(米国では全DES使用の60%を占める)では、晩期ステント血栓症のみならず、死亡および非致死性心筋

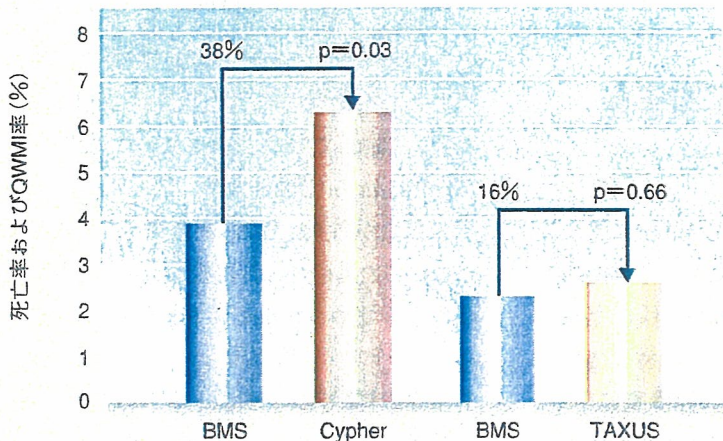


図2 死亡率およびQ波を伴う心筋梗塞率
(Presentation by Dr. Camenzind. ESC/WCC 2006より)

Camenzindらは2006年9月、欧州心臓病学会にて“薬事溶出ステントの安全性：第一世代薬剤ステントのメタ解析”と題した発表を行った。この解析では死亡率、Q波を伴う心筋梗塞率などは、論文として発表された無作為割り付け臨床試験の結果から算出された。Cypher群、TAXUS群はそれぞれ対応する臨床試験でのコントロールBMSと比較された。死亡率およびQ波を伴う心筋梗塞率はCypher群で有意に上昇していた(6.3% vs. 3.9%、相対危険度1.38、 $p=0.03$)。一方、TAXUS群では傾向を認めるものの、その差は統計学的に有意なものではなかった(2.6% vs. 2.3%、相対危険度1.16、 $p=0.68$)。QWMI；Q-wave myocardial infarction/Q波を伴う心筋梗塞

梗塞の危険が上昇すると警告した。またクロピドグレルの使用に関してはCypher留置後3ヵ月、TAXUS留置後6ヵ月という使用法が推奨されていたが、留置後少なくとも1年内服するのが望ましいとした。

このように、DES群に好ましくない事象が認められる原因としては、以下のような原因が考えられる。①シロリムスやパクリタキセルの非特異的な細胞増殖抑制作用のため内皮再生が妨げられる。②永久に残存するポリマーに対する異物・過敏反応が起きる。

単球・マクロファージの再狭窄におけるかわり

動物モデルやヒトの病理像における観察より、単球・マクロファージがステント留置後約1週間後よりストラット周囲に浸潤していることが明らかになっており¹⁴⁾、何らかの関与をしていることが考えられる。

実際、ウサギのステント留置モデルでは単球浸潤数と新生内膜面積が相関しており¹⁵⁾、ビスフォスフォネート封入リポソームにより、単球・マクロファージを一時的に減少させることで、ステント内再狭窄が抑制されるという報告¹⁶⁾がある。またヒトにおけるスタディでは、ステント留置後の流血中の単球数¹⁷⁾やアテレクトミー標本中のマクロファージ数¹⁸⁾がステント内再狭窄の予測因子になるという報告、剖検例による病理組織学的研究により、炎症細胞の浸潤と新生内膜面積が比例し、再狭窄例では非再狭窄の単球浸潤が約3倍であったとの報告¹⁹⁾がある。

われわれは単球・マクロファージの浸潤にかかわる最も重要な因子である単球走化因子(monocyte chemoattractant protein-1；MCP-1)に注目した²⁰⁾。われわれはこのMCP-1を強く抑制するために、MCP-1の変異型蛋白7NDを用いることにした。7NDはMCP-1に対するdominant-negative抑制薬として働くからである^{21,22)}。

まずわれわれは高脂血症ウサギのステント内再狭窄モデルを作成し、ステント留置3日前に7ND

プラスミドを筋注した。28日後の新生内膜面積は約60%に減少した。ステント留置後7日のステント留置部の外腸骨血管を採取し、免疫組織学的観察を行ったところ、RAM11陽性細胞(マクロファージ)の浸潤が減少していた。また血管のRT-PCRを行ったところ、生食筋注群との比較で、TNF- α 、MMP-2、MMP-9のmRNAレベルは変わらなかったが、IL-6、IL-1 β 、VEGFのmRNAの抑制が認められた²³⁾。

次にわれわれはステント留置直後に留置部へ局所投与カテーテル(Remedy[®]、Boston Scientific社)を用いてアデノウイルスベクターによる7ND遺伝子導入を行った。28日後の新生内膜形成は上記の全身投与モデルと同様に強力に抑制された²⁴⁾。

このようにステント内再狭窄に対する、7ND療法は優れた戦略であることは間違いない。しかし、局所投与でかつアデノウイルスベクターを用いない方法の開発が臨床応用のために急務と考えた。

第一世代の遺伝子溶出ステントの構造

7NDによる局所治療のため、われわれは遺伝子プラスミド溶出ステントの開発に取りかかった。まず従来のDESの構造の応用を考えた。すなわち適切なキャリアマトリックスを選択し、これにプラスミドを混ぜるという方法である。キャリアマトリックスとしてポリビニルアルコールを選択し、これを架橋して不溶化した。また初期のバースト溶出を抑制するためポリ乳酸をコーティングしトップコートとした。ポリビニルアルコールにプラスミドを溶解させ、それをコーティングするという手順を取り、コーティング量は500~700 μ gであった。マーカー遺伝子としてLacZプラスミドを用いて遺伝子導入の確認を行い、3日後に摘出した血管をX-Gal染色するとステント留

置部位に青染を認め、遺伝子導入が確認された。

次にコレステロール負荷ウサギの腸骨動脈に7NDプラスミド溶出ステント、LacZプラスミド溶出ステントを留置し、28日後の摘出血管を薄切して新生内膜面積を評価したところ、有意な抑制を認めた(論文投稿中)(図3)。また、同様に水溶性ポリマーを用いてNF- κ Bデコイをコーティングしたステントでは、ステント内新生内膜形成は抑制された²⁵⁾。

しかしこれらの遺伝子溶出ステントには以下のような解決すべき問題点があることが同時に明らかになった。

1. トップコートとプラスミド保持マトリックスとの接着性

トップコートに水分子の侵入を防ぐために脂溶性のポリマーを使用した。脂溶性のポリマーと水溶性のポリマーは接着が悪く、また水中で水を含んだときの膨張率が異なるため、血管内で剥離する可能性がある。

2. 遺伝子溶出速度

一般的なDESでは脂溶性の薬剤を脂溶性のポリマーに混ぜているため、血中での徐放が可能になるが、水溶性ポリマーでは水溶性であるプラスミドは速やかに拡散してしまうため徐放することができない。

3. 遺伝子導入効率

*in vitro*の実験ではプラスミドの導入率を上昇させるためにカチオン性脂質などの試薬を用いるが、このような試薬を用いることができないため放出されたプラスミドの導入率は低い。

われわれが以前7ND療法を行った既出の2つのモデルと比較し、第一世代プラスミド溶出ステントの治療効果は小さかった。この差は遺伝子導入

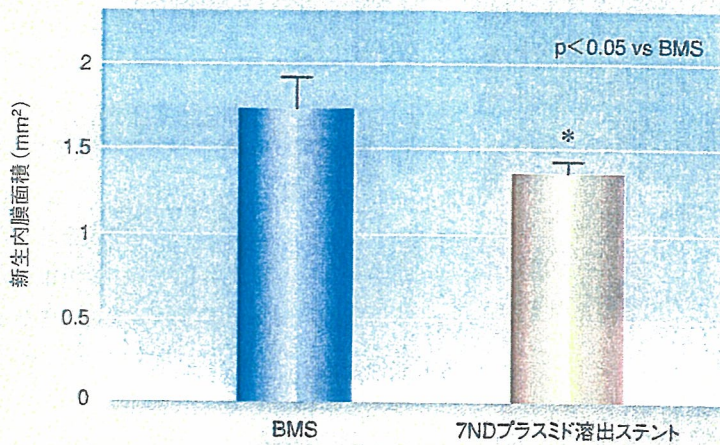
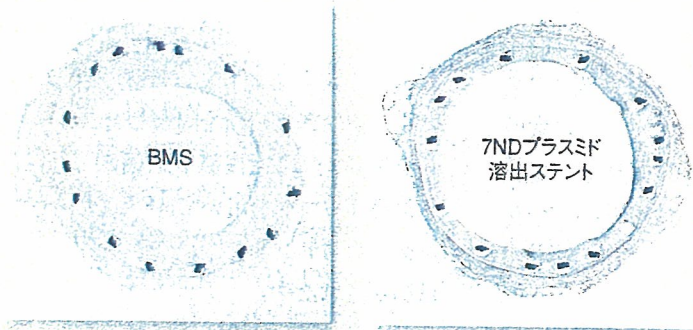


図3 7NDプラスミド溶出ステントとBMSとの新生内膜面積の比較

コレステロール負荷したウサギの腸骨動脈にステント留置を行い、28日後に塗擦しステント部の腸骨動脈を摘出した。7NDプラスミド溶出ステント群で新生内膜面積は減少した。

効率の違いにあると思われた。したがって従来のDESの構造を模した水溶性ポリマーによるプラスミド溶出ステントでは臨床応用の観点から不十分と考えられ、革新的なコーティング方法の開発が必要と考えられた。

生体吸収性ポリマー

われわれはキャリアマトリックスとして、生体吸収性ポリマーの使用が不可欠と考えた。すなわち、徐々に生体に吸収されることで、残存ポリマーによる異物反応が半永久的に残る従来の

DESに対して優位性をもつと考えられたからである。生体吸収性ポリマーとしては乳酸・グリコール酸共重合体 (co-poly-lactic acid/glycolic acid ; PLGA) を第一候補に考えた。このポリマーは吸収糸などの医療材料として30年以上実績のある、きわめて生体適合性に優れた生体吸収性ポリマーであるからである。しかしPLGAは本来、固くて脆い性質をもっているため、ステントをPLGAフィルムでコーティングしたときには、ステント拡張時にポリマーの脱落、ヒビ割れなどが起こると考えられる。また可塑剤の使用は可塑剤の溶出の影響など、安全性の懸念が残る。われわれはPLGAを他の方法によりステントにコー