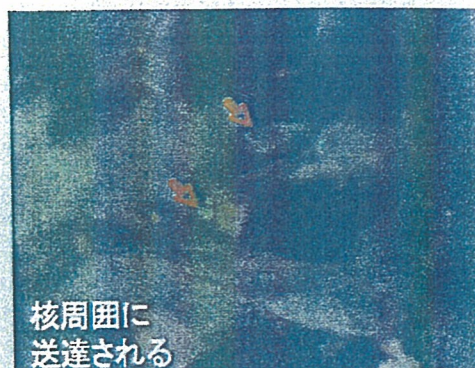


FITCナノ粒子0.25mg/mL 投与60分後  
90%以上の細胞に取り込まれる



短時間で高率に導入される

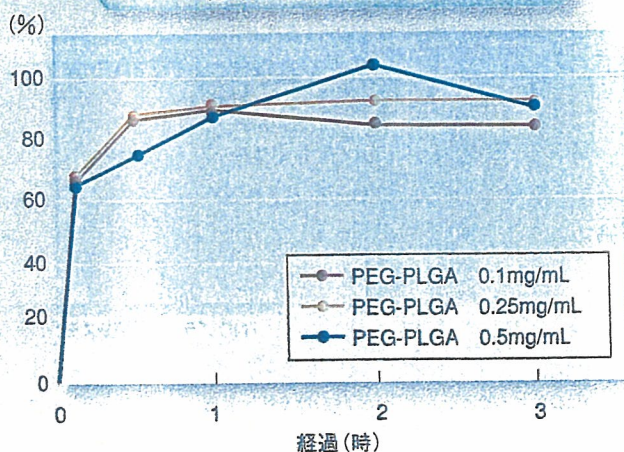


図4 PEG-PLGAナノ粒子の*in vitro*での細胞への取り込み

PEG-PLGAナノ粒子は非貪食細胞である血管平滑筋細胞に速やかに取り込まれた。白矢印は核を示す。核周囲に蛍光が認められた。

ティングする技術を模索していた。PLGAナノ粒子は実験室レベルの製造が行われていたが、川嶋らの開発した球形晶析法はこれを量産製造することを可能とする技術であることに注目した<sup>26)</sup>。培養ヒト単球細胞 (THP-1) および冠動脈平滑筋の培養液に蛍光色素封入ナノ粒子を添加したところ、90%以上のPLGAナノ粒子は30分以内に細胞内に取り込まれることを観察した(図4)。われわれは共焦点走査型レーザー顕微鏡により、ナノ粒子が細胞表面でなく、たしかに細胞質に存在することを確認した。非貪食細胞にも取り込みが認

められるため、ファゴサイトーシス以外の機序でエンドサイトーシスが起きていると考えられる。また興味深いことに、細胞質内でも特に核周囲に集積していた。

Rejmanらが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、また細胞内の集積する場所が異なることを明らかにした<sup>27)</sup>。われわれの結果もRejmanらの観察と類似したものとなった。

われわれの観察により、PLGAナノ粒子が優れ

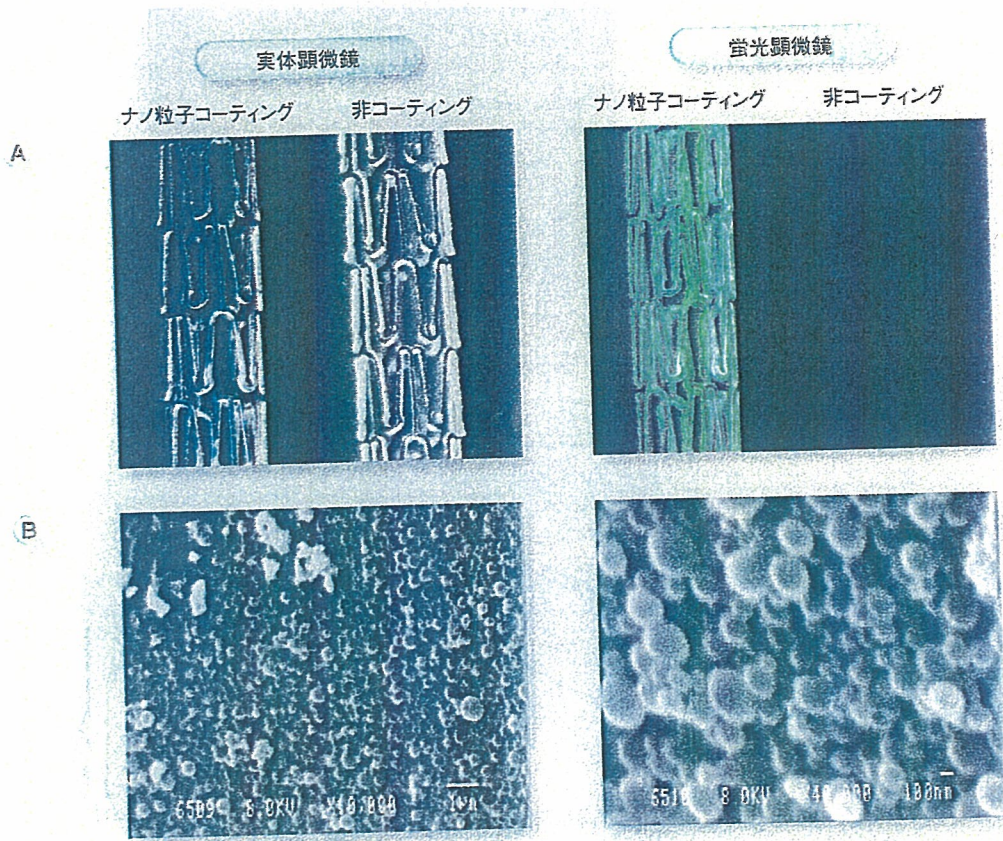


図5 カチオン電着コーティング

A: 蛍光色素封入PLGAナノ粒子をステント表面にカチオン電着にコーティングを行った。蛍光下で観察するとコーティングされたナノ粒子が検出された。

B: コーティングしたステントの表面を走査電子顕微鏡にて観察すると、ナノ粒子の形状が保たれたままステント表面に付着している。

た細胞内送達能をもつことが確認できた。したがって、薬物を封入することで、PLGAの加水分解による細胞内での薬剤の徐放が可能である。

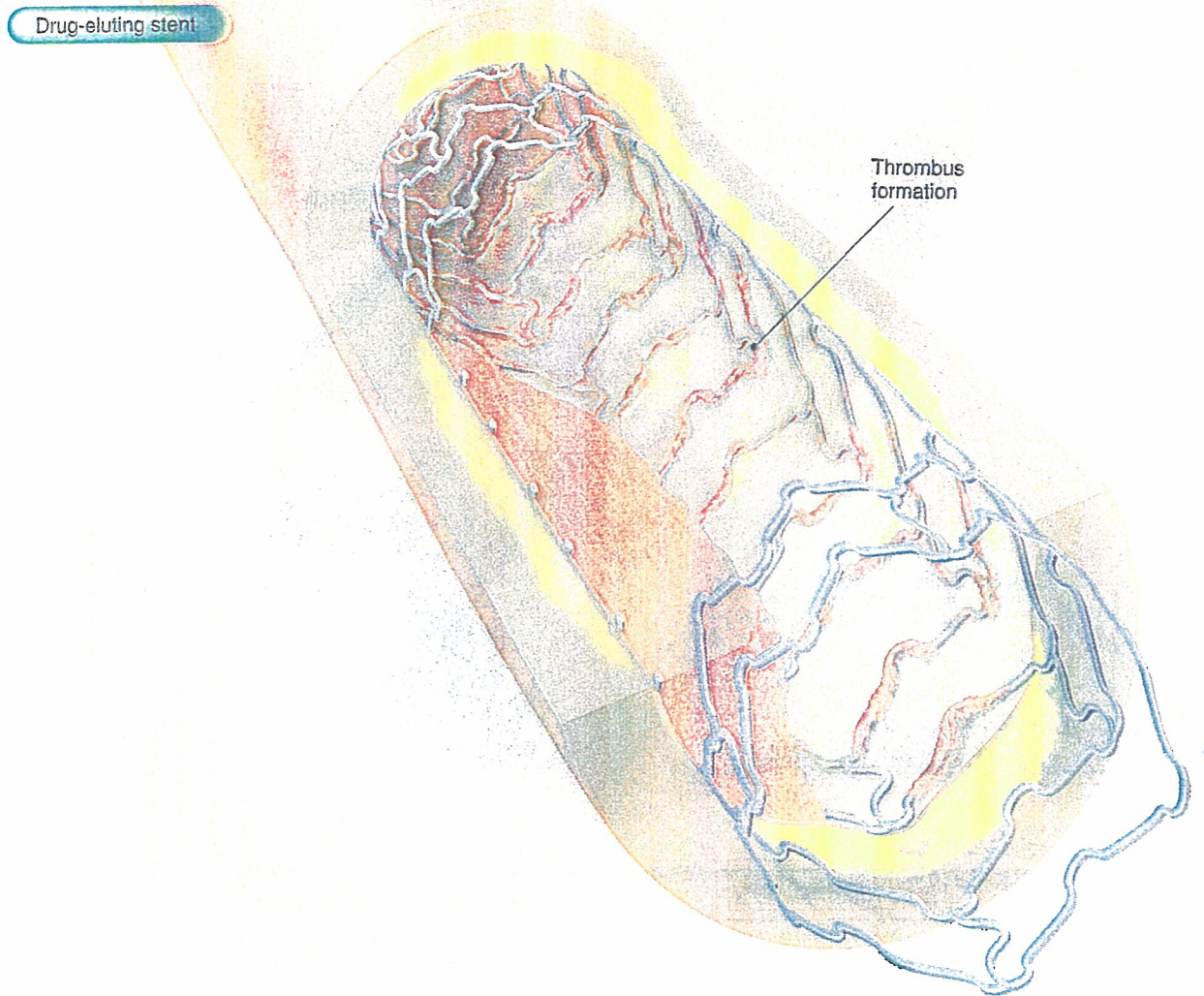
### 生体吸収性ポリマー製ナノ粒子の電着コーティングによる溶出ステントの作製

PLGAナノ粒子をいかにステント表面にコーティングすべきか? われわれはカチオン電着塗

装 (cationic electro-deposition coating) の応用を考えた。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。

PLGAナノ粒子表面にキトサンを修飾することでナノ粒子のゼータ電位を正にコントロールすることが可能であり、これによってステントのカチオン電着コーティングが可能となった。ディップ方式やスプレー方式では複雑な形をしたステントではポリマー量にムラができるが、このように分

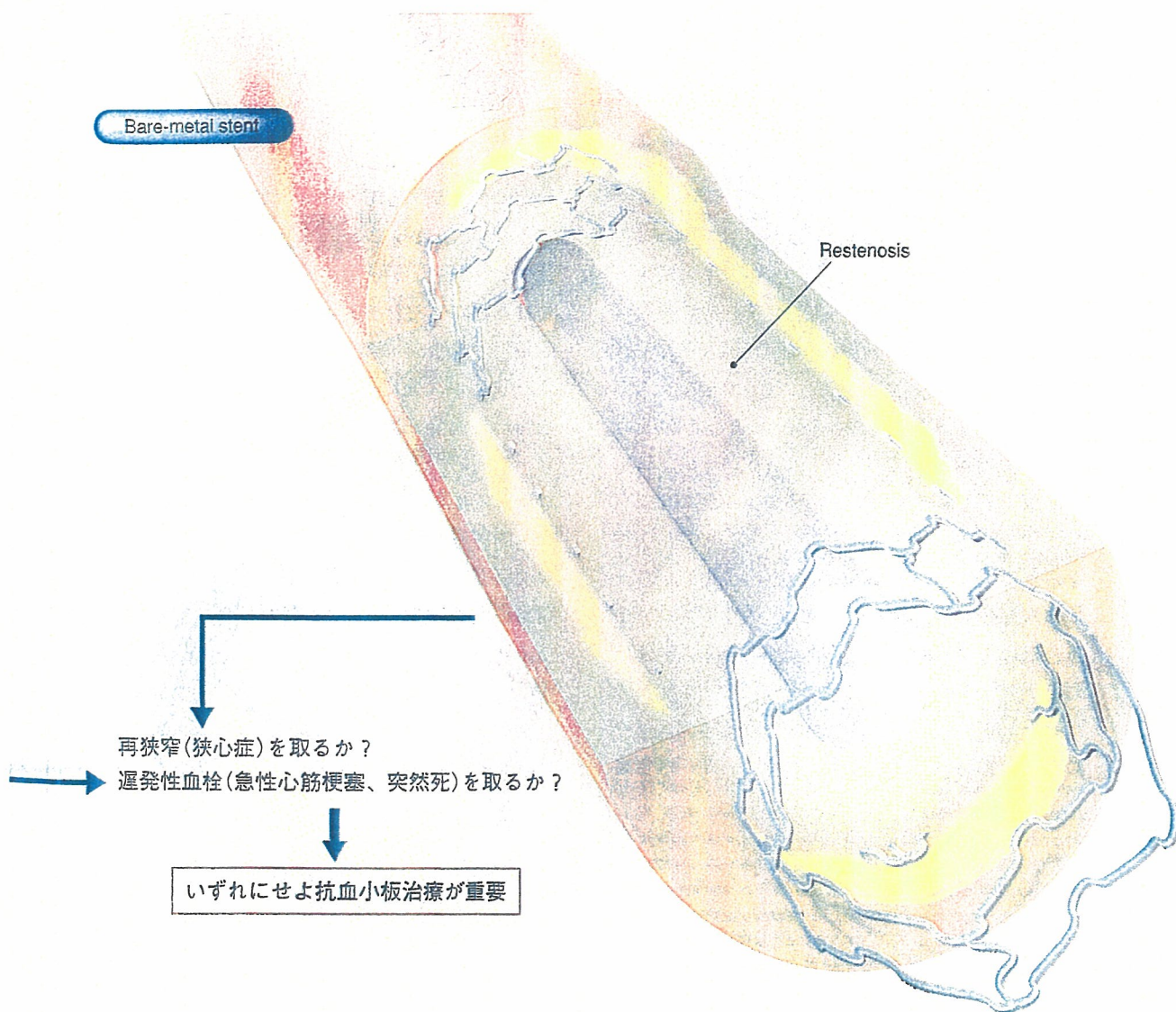
図6 第一世代の薬剤溶出ステントは晩期血栓症を増加させる両刃の剣



散液中に浸漬することでストラット間に分散液がまわりこみ、非常に均一にコーティング可能になる。このステント表面を走査型電子顕微鏡で観察したところ、直径200nmのPLGAナノ粒子が粒子の形状が破壊されずに接着されている像が観察された(図5)。

次にこのようにして作製したFITC封入PLGAナノ粒子電着コーティング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、電着コーティングは優れた細胞内送達能を損なわなかった。したがって、従来のDESがステント表面からの薬剤の徐放によって長期間の効果を得ているのに対し、われわれの開発したナノ粒子電着コーティングステントでは、遊離したナノ粒子が細胞内で徐放



されるという点で異なっている。

われわれはこの方法を用いることで、第一世代の遺伝子溶出ステントの欠点を克服できると考えた。すなわち、優れた細胞内送達能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。

現在は、7NDなどの遺伝子プラスミド、メチル酸イマチニブ(グリバック®)などの分子標的薬を用

いてナノ粒子電着ステントを作製し、再狭窄抑制効果を検討中である。

## おわりに

21世紀に入り、われわれはDESという最も有効な治療法を手に入れたと思われた。しかし、現

行の第一世代のDESは多くの臨床試験が示すように、晩期血栓症を増加させる両刃の剣であることが判明した(図6)<sup>1)</sup>。晩期血栓症の主因はステントに搭載された免疫抑制剤、抗癌剤が内皮再生を阻害し、血管の修復の遅延を起こした結果、組織因子発現亢進やフィブリン沈着増加をもたらしたことによるものであろう<sup>9,28)</sup>。決してDESという方法論が誤っていたのではなく、現在と異なる薬剤、異なるポリマー・担体の組み合わせで克服できる問題と考えられる。つまり、現在のDESを超えるものを開発するには、生物学的アプローチのみならず、薬学・化学・工学的なアプローチを合わせた集約的な研究が必要である。この流れのなか、1990年代に星の数のようにあった数々のベンチャーステント企業は大手医療機器メーカーに吸収合併され、ますます一部のメーカーへと集

約されつつある。BMS時代に最大手の一つであったGuidant社でさえ、ステント部門がAbbott社へと吸収される時代である。

日本国内へと目を向けると、DESを開発している世界的企業はなく、小規模のステントメーカー数社が次世代DESを導入・開発している。国内外で開発が進んでいる次世代DESにおいてコーティングが予定されている薬剤はいずれもシロリムス類似のものであり、現行のDESを超える革新的医療機器となるかどうかは不明である。大学の研究室レベルで本格的に次世代DESの研究開発に挑戦しているのはわれわれのグループであり、無謀な挑戦かもしれない。わが国の先端技術(医、工、ナノ)と叡知を結集して革新的技術とし、わが国発世界標準の薬剤・遺伝子溶出ステントを開発していきたい。

## 文献

- 1) Shuchman M. Trading restenosis for thrombosis? New questions about drug-eluting stents. *N Engl J Med* 2006; 355: 1949-52.
- 2) Pfisterer M, Brunner-La Rocca HP, Buser PT, Rickenbacher P, Hunziker P, Mueller C, et al. Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting versus bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 2584-91.
- 3) FDA Public Health Web Notification: Information for Physicians on Sub-acute Thrombosis (SAT) and Hypersensitivity Reactions with Use of the Cordis CYPHER Coronary Stent. Issuing Date: October 28, 2003. Available at: <http://www.fda.gov/cdrh/safety/cypher.html>
- 4) Karvouni E, Korovesis S, Katritsis DG. Very late thrombosis after implantation of sirolimus eluting stent. *Heart* 2005; 91: e45.
- 5) Eisenberg MJ. Drug-eluting stents: some bare facts. *Lancet* 2004; 364: 1466-7.
- 6) McFadden EP, Stabile E, Regar E, Cheneau E, Ong AT, Kinnaird T, et al. Late thrombosis in drug-eluting coronary stents after discontinuation of antiplatelet therapy. *Lancet* 2004; 364: 1519-21.
- 7) Ong AT, McFadden EP, Regar E, de Jaegere PP, van Domburg RT, Serruys PW. Late angiographic stent thrombosis (LAST) events with drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 2088-92.
- 8) Finn AV, Kolodgie FD, Harnek J, Guerrero LJ, Acampado E, Tefera K, et al. Differential response of delayed healing



- and persistent inflammation at sites of overlapping sirolimus- or paclitaxel-eluting stents. *Circulation* 2005; 112: 270-8.
- 9) Joner M, Finn AV, Farb A, Mont EK, Kolodgie FD, Ladich E, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 193-202.
- 10) World Congress of Cardiology 2006., September 2-6, 2006. Available at: [http://www.escardio.org/congresses/World\\_Congress\\_Cardiology\\_2006/](http://www.escardio.org/congresses/World_Congress_Cardiology_2006/)
- 11) Nordmann AJ, Briel M, Bucher HC. Mortality in randomized controlled trials comparing drug-eluting vs. bare metal stents in coronary artery disease: a meta-analysis. *Eur Heart J* 2006; 27: 2784-814.
- 12) TCT2006, October 22-27. Available at: <http://www.tct2006.com>
- 13) FDA Circulatory System Devices Panel: FDA Clinical Overview for Panel Packet/ DES Thrombosis Panel, December 7-8, 2006. Available at: [http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/06/briefing/2006-4253b1\\_01.pdf](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/06/briefing/2006-4253b1_01.pdf)
- 14) Komatsu R, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Becker AE. Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses. *Circulation* 1998; 98: 224-33.
- 15) Rogers C, Edelman ER. Endovascular stent design dictates experimental restenosis and thrombosis. *Circulation* 1995; 91: 2995-3001.
- 16) Danenberg HD, Golomb G, Groothuis A, Gao J, Epstein H, Swaminathan RV, et al. Liposomal alendronate inhibits systemic innate immunity and reduces in-stent neointimal hyperplasia in rabbits. *Circulation* 2003; 108: 2798-804.
- 17) Fukuda D, Shimada K, Tanaka A, Kawarabayashi T, Yoshiyama M, Yoshikawa J. Circulating monocytes and in-stent neointima after coronary stent implantation. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 18-23.
- 18) Moreno PR, Bernardi VH, Lopez-Cuellar J, Newell JB, McMellon C, Gold HK, et al. Macrophage infiltration predicts restenosis after coronary intervention in patients with unstable angina. *Circulation* 1996; 94: 3098-102.
- 19) Farb A, Weber DK, Kolodgie FD, Burke AP, Virmani R. Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulation* 2002; 105: 2974-80.
- 20) Egashira K. Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease: special reference to monocyte chemoattractant protein-1. *Hypertension* 2003; 41: 834-41.
- 21) Zhang Y, Rollins BJ. A dominant negative inhibitor indicates that monocyte chemoattractant protein 1 functions as a dimer. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 4851-5.
- 22) Egashira K, Zhao Q, Kataoka C, Ohtani K, Usui M, Takeshita A, et al. Importance of monocyte chemoattractant protein-1 pathway in neointimal hyperplasia after periarterial injury in mice and monkeys. *Circ Res* 2002; 90: 1167-72.
- 23) Ohtani K, Usui M, Nakano K, Kohjimoto Y, Kitajima S, Egashira K, et al. Antimonocyte chemoattractant protein-1 gene therapy reduces experimental in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits and monkeys. *Gene Ther* 2004; 11: 1273-82.
- 24) Nakano K, Egashira K, Ohtani K, Zhao G, Funakoshi K, Ihara Y, et al. Catheter-based adenovirus-mediated anti-monocyte chemoattractant gene therapy attenuates in-stent neointima formation in cynomolgus monkeys. *Atherosclerosis* 2006; in press.
- 25) Ohtani K, Egashira K, Nakano K, Zhao G, Funakoshi K, Ihara Y, et al. Stent-based local delivery of nuclear factor-kappaB decoy attenuates in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* 2006; 114: 2773-9.
- 26) Kawashima Y, Aoki S, Takenaka H, Miyake Y. Preparation of spherically agglomerated crystals of aminophylline. *J Pharm Sci* 1984; 73: 1407-10.
- 27) Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J* 2004; 377: 159-69.
- 28) Fukuda D, Sata M, Tanaka K, Nagai R. Potent inhibitory effect of sirolimus on circulating vascular progenitor cells. *Circulation* 2005; 111: 926-31.