

# 厚生労働科学研究費補助金

## 基礎研究成果の臨床応用推進 研究事業

動脈硬化病変（再狭窄、不安定プラーク）に対する画期的血管内治療  
システムの創製- 霊長類モデル作製から臨床応用まで -  
(H16-トランス-002)

平成 16 年度～平成 18 年度 総合研究報告書

主任研究者 江頭 健輔

平成 19（2007）年 4 月

# 【目 次】

I.	研究組織	1
II.	総合研究報告書	
1.	研究要旨（概要）	2
2.	研究の必要性ならびに目的	3
3.	期待される効果	4
4.	本研究における国内外の研究状況およびこの研究の独創的な点と特色	4
5.	研究計画の目標	5
6.	平成 16-18 年度の成果	7
7.	評価、考察、結論	16
8.	健康危険情報	19
9.	研究発表	19
10.	知的財産権の出願・登録状況	19
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	20
IV.	研究成果の刊行物・別刷	33

**【研究組織】**

## ※主任研究者：

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

## ※分担研究者：

砂川 賢二 九州大学大学院医学研究院 循環器内科学・教授

米満 吉和 九州大学大学院医学研究院 病理病態学・助教授

市来 俊弘 九州大学大学院医学研究院 循環器内科学・助手

北嶋 隆 (財) 神奈川科学技術アカデミー・研究員

野見山弘章 川澄化学工業(株) 研究開発部・研究員

糺本 芳郎 (有)プライメイト中国研究所・代表取締役

厚生労働科学研究費補助金  
(基礎研究成果の臨床応用推進 研究事業)

## 【総合研究報告書】

「動脈硬化病変（再狭窄、不安定プラーク）に対する画期的血管内治療システムの創製— 霊長類モデル作製から臨床応用まで —」（H16-トランス-002）

主任研究者 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)

### 1. 研究要旨（概要）

研究の必要性と目的：

冠インターベンション後再狭窄患者は国内だけで15万人以上、心筋梗塞の責任病変である不安定プラークを有する患者は100万人以上と推測される。したがって、この再狭窄・動脈硬化に対する Japan オリジナルの画期的次世代治療法の開発が急務である。炎症抑制や血管内皮再生を標的とした遺伝子・薬剤溶出ステントは、これら活性化動脈硬化病変の血管内治療用手段として有望である。本研究の目的は、我々独自の研究成果を踏まえて、再狭窄抑制・プラーク不安定化抑制をもたらす次世代の国産遺伝子・薬剤溶出ステントを創製し、臨床応用を目指して探索的臨床研究を実施することである。遺伝子・薬剤溶出ステント（とくに生体吸収性ステント）をドラッグデリバリーシステムとしてとらえ再狭窄・動脈硬化病変の血管内治療用デバイスを開発する。

具体的目標：

1) 遺伝子・薬剤溶出型ステントの試作（九州大学、テルモ、川澄）、2) 霊長類（サル）などでの有効性試験（九州大学、プライメイト）、3) 毒性・安全性試験（九州大学、プライメイト）、4) 臨床研究の準備。3年目：探索的臨床研究の実施（九州大学）。

特色、独創性ならびに期待される研究成果：再狭窄・動脈硬化に対する画期

的遺伝子・薬剤溶出型ステントを創製し、臨床応用を目指す。これらの動脈硬化性疾患に対する画期的血管内治療法を提供する。目標が達成されれば、患者のQOL改善、医療費の削減、適応拡大などがもたらされ厚生労働科学に対する貢献は極めて大きい。

## 2. 研究の必要性ならびに目的

冠動脈硬化性狭窄を拡張する冠インターベンションの有用性は確立し普及している（全世界で年間150万例、日本で15万例）。しかし、いったん拡張した血管内腔が再び狭くなる「再狭窄」が高率に発生することが医学的かつ医療経済的問題である。冠インターベンションの約8割以上がステント拡張術である。ステント内再狭窄が生じれば、心筋梗塞・狭心症が発症し、再インターベンションが必要となることが多ことから、ステント内再狭窄の予防法の確立が急務である。また、急性心筋梗塞・脳卒中の責任病変である不安定プラークに対する局所血管内治療法の開発も期待されているが、現在有効な血管内治療法は無い。

我々は独自に炎症抑制、血管内皮細胞再生誘導、あるいはその組み合わせが、このような活性化動脈硬化病変の新しい抑制対策になることを明らかにしてきた。血管炎症の主役である単球/マクロファージのケモカインである単球走化性促進因子（monocyte chemoattractant protein-1、MCP-1）の機能を変異型MCP-1（7ND）を用いて抑制することによって再狭窄・動脈硬化が抑制されることを明らかにしてきた（特許公開2002-284698）。また、再狭窄抑制因子にフィブロネクチンを結合させコラーゲン結合活性を有するハイブリッドポリペプチドを作成し、血管再生を強力に誘導できることを明らかにした（特許公開2002-60400）。さらに、生体分解性ステントやナノ粒子を用いた遺伝子・薬剤の局所送達は血管内治療用のドラッグデリバリーシステム（DDS）として有望である。

本研究の目的は、我々独自の研究成果を踏まえて、再狭窄抑制・プラーク不安定化抑制をもたらす次世代の遺伝子・薬剤溶出型ステント（遺伝子・薬剤溶出金属ステント、生体分解性ステント）を創製し、臨床応用を目指すことである。

具体的には以下の3点を目標とする。

- 霊長類（カニクイザル）を用いた再狭窄・動脈硬化モデルの作製
- 再狭窄抑制ならびに動脈硬化プラーク不安定化抑制（安定化促進）をもたらす遺伝子・薬剤溶出ステント、生体吸収性ステントの開発
- 臨床応用を目指した探索的臨床研究（トランスレーショナルリサーチ）

### 3. 期待される効果

- 新たな治療法の確立：ステント内再狭窄だけでなく動脈硬化性疾患（急性心筋梗塞、脳梗塞）に対する画期的次世代治療法が確立される。
- 医学への貢献：再狭窄や動脈硬化性疾患の発生機序における炎症や内皮再生の役割が臨床レベルで解明される。
- 国民・社会への貢献：冠インターベンションに用いられているステントの殆どは外国製である。すなわち、動脈硬化治療に関する先端医療機器は完全に外国製品に依存している。本研究により国産ステントが登場することになれば、この分野で我が国が国際的競争力を発揮できるようになるだけでなく、無駄な医療費の削減・適応拡大、新産業創出、雇用拡大などがもたらされ、厚生労働科学に対する貢献は極めて大きい。

### 4. 本研究における国内外の研究状況およびこの研究の独創的な点と特色

- 薬剤コーティングステントの開発研究の状況：  
冠インターベンションに用いられている通常のベアメタルステントの90%以上は外国製であり、薬剤（ラパマイシン）溶出型ステント（Cypher™ など）は100%が外国製である。すなわち、我が国はこのステント開発分野において欧米から完全に立ち遅れている。
- 研究の独創性（知的財産を含む）：  
国内で事業化を目指して国産遺伝子、国産ステント、国産コーティング技術を組み合わせて開発研究を行っているのは申請者らのグループのみである。したがって、本研究により独自の基本特許を有する画期的国産遺

## 伝子・薬剤溶出ステントの開発が期待できる。

- 研究の特色と波及効果：
  - 本研究の特色は、申請者らの独自の研究成果を基盤にして次世代遺伝子・薬剤溶出ステントの臨床応用を目指す独創的研究であることである。また、ステントやナノ粒子をドラッグデリバリーシステム（DDS）としてとらえ、血管病の局所治療法を創製することを目指すことも特記すべき特色である。
  - 再狭窄・動脈硬化性プラークが抑制できる遺伝子・薬剤溶出ステントが実現すれば、国際競争力を持った画期的次世代治療法が確立されるだけでなく、日本が世界に大幅に遅れている血管内治療開発分野で我々は国際的リーダーシップを発揮できる。
  - 遺伝子・薬剤溶出-生体吸収性ステントの臨床応用が実現すれば、再狭窄だけでなく心筋梗塞・脳卒中の責任病変に対する全く新しい局所血管内治療が実現する。再狭窄の減少によって、関連医療費の削減、患者のQOL改善（入院・外来の減少）、などがもたらされる。また、従来のステントでは治療が困難であった病変あるいは患者（例、小血管径血管の狭窄、びまん性病変、多枝病変、糖尿病患者、左冠動脈主幹部、静脈グラフト狭窄など）に対するインターベンションが可能になり（適応拡大）、より多くの患者が恩恵を受けることになる。

## 5. 研究計画の目標

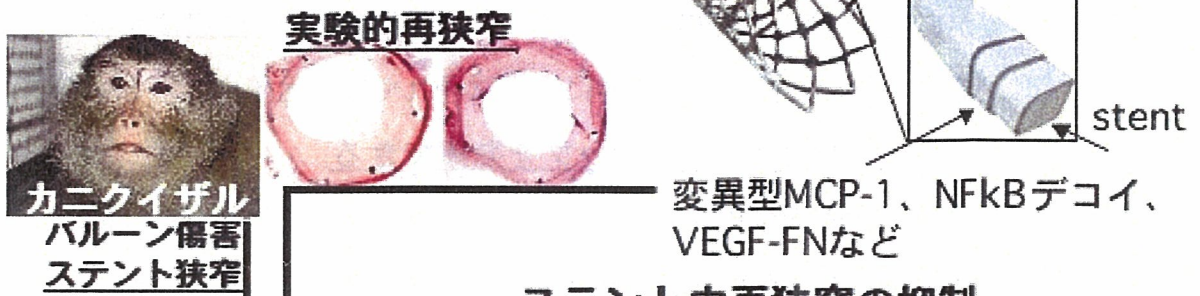
- 1) 遺伝子・薬剤溶出型ステントの試作（平成16-17年度、担当：九州大学、テルモ、川澄）
- 2) 霊長類（サル）などでの有効性試験（平成16-17年度、担当：九州大学、プライメイト）
- 3) 毒性・安全性試験（平成17年度、担当：九州大学、プライメイト）
- 4) 探索的臨床研究の準備と実施（平成18年度以降、担当：九州大学）

次のページに研究の概要図を示す。

# 再狭窄・動脈硬化に対する画期的血管内治療システムの創製 — モデル作製から臨床応用まで —

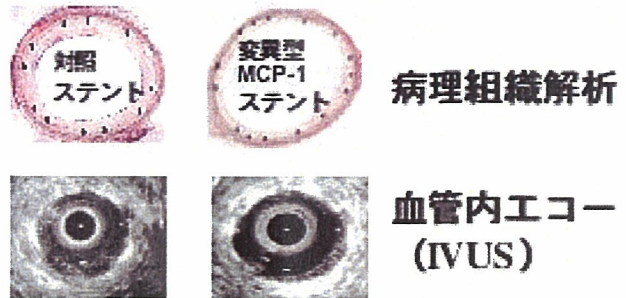
霊長類での再狭窄・動脈硬化モデル実験システムの整備

次世代国産遺伝子・薬剤溶出型ステントの作製

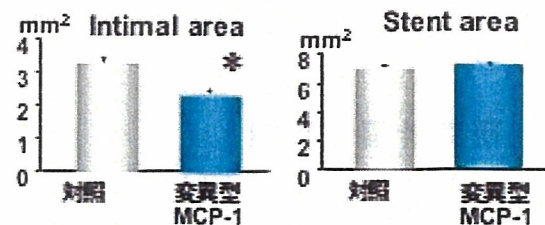


前臨床試験

ステント内再狭窄の抑制



探索的臨床研究  
(再狭窄の抑制)



再狭窄・動脈硬化の次世代治療法の確立

患者のQOL改善、虚血性イベント減少、医療費節約、雇用増、国際的リーダーシップ



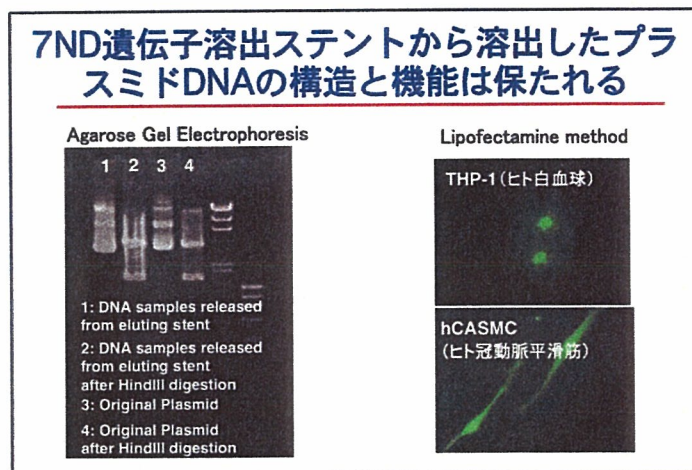
## 6. 平成16-18年度の成果

### 1. 研究体制（役割分担）：

研究代表者（江頭健輔）が研究を統括した。江頭は糀本と協力して動物モデルを作製し、有効性試験と安全性試験を実施した。病理組織学的解析は米満が担当した。江頭は北嶋、野見山と協力して溶出ステントを作製した。江頭は新たに産業技術総合研究所九州センターと協働してマグネシウムステントを、ホソカワ粉体研究所と協働してナノ粒子コーティング技術を、開発した。

### 2. 遺伝子溶出ステントの作製：

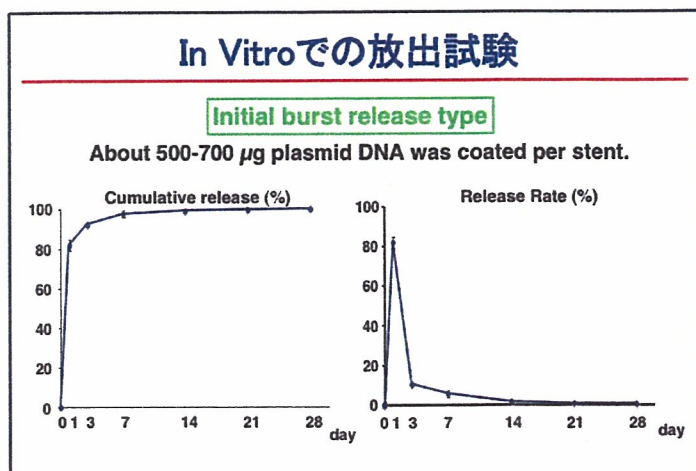
医療用ポリマーに遺伝子プラスミドを溶解し金属ステントにコーティングした。これによって遺伝子プラスミド溶出型ステントを作製した。このステ



ントにコートした遺伝子プラスミドの構造と機能が保たれていることを明らかにした。すなわち、図に示す如くステントから溶出した遺伝子プラスミドの構造が元来のプラスミドと同

じであること、その機能が保たれていること、を確認した。

遺伝子溶出ステントの場合遺伝子が血管壁細胞に導入されたあとから効果が発揮されることから、早期放出パターンとなるようにデザインした。図に



示す如く放出パターンを試験管内で評価し、早期放出されることを確認した。

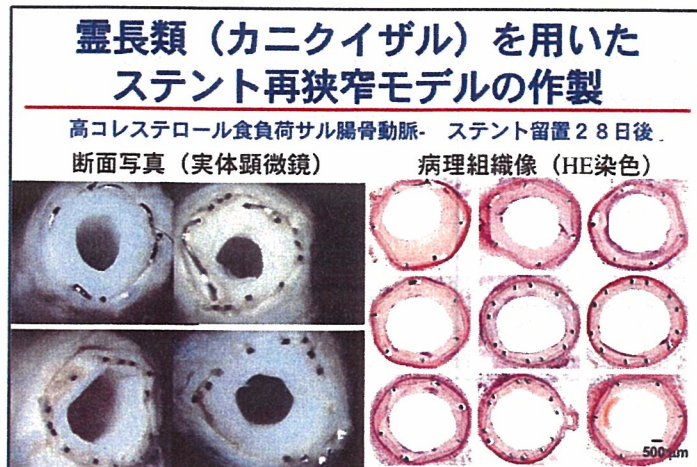
血管内に植え込んだ遺伝子溶出ステントから溶出した遺伝子が実際に血管壁細胞で発現しているかどうかを明らかにするために、マーカー遺伝子である LacZ 遺伝子プラスミド溶出型ステントを作製し in vivo での遺伝子発現を検討した (図)。その結果、ステント留置3日後をピークとして LacZ の発現を確認できた。発現細胞はステントストラット周囲の新生内膜構成細胞



(白血球や平滑筋) であった。一部の中膜平滑筋や外膜細胞にも発現が認められた。この発現は一過性であり、7日後には減弱し14日後には殆ど認められなかった。

### 3. ステント内再狭窄の霊長類モデルの作製

ウサギ大腿動脈モデルやブタ冠動脈モデルがステント内再狭窄の動物モデルとして用いられており、実際に申請者らもこれらのモデルを用いている。しかし、これらのモデルではヒトのステント内再狭窄の病態を反映しない部分があることも指摘されている。そこで申請者らは新たに霊長類モデルをカニクイザルを用いて作製することを試みた。霊長類の中でもカニクイザルは循環器系の有効性試験や一般的な安全性試験に良く用いられている。したがって、本モデルで得られる成果は有効性だけでなく安全性に関する資料に用いることができる。

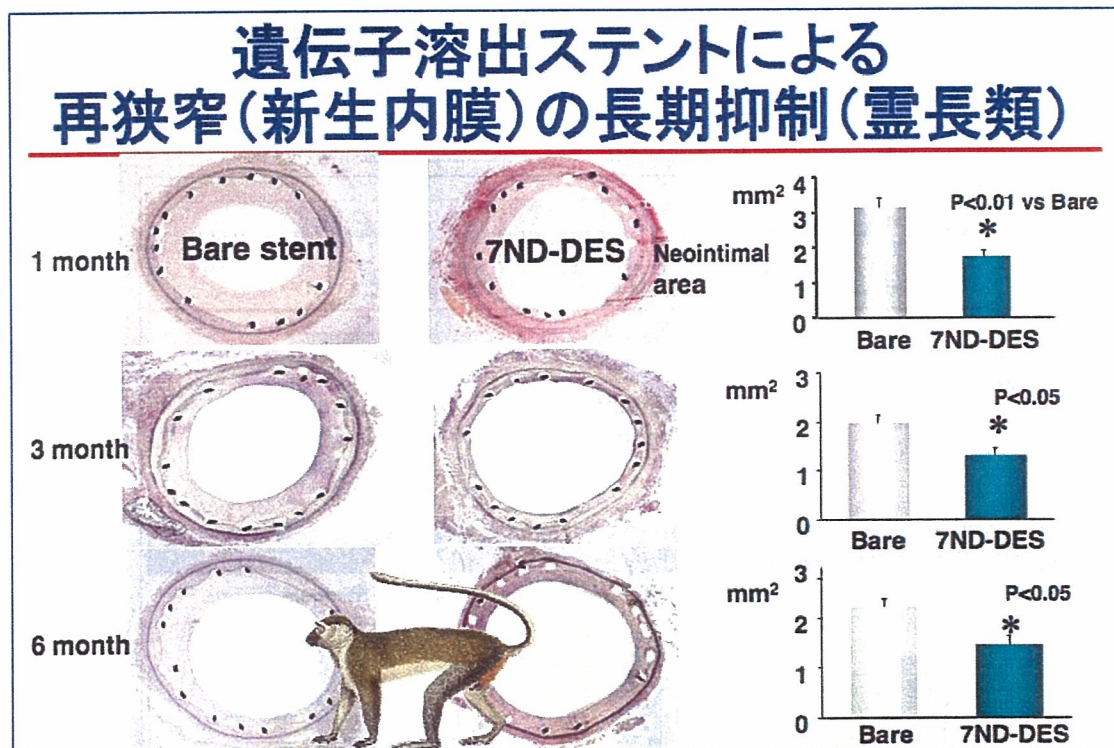


今回図に示すようにカニクイザル大腿動脈にステントを留置し、ステント部位に新生内膜が生じることを病理組織学的解析ならびに

血管内エコーを用いて明らかにした。

#### 4. 遺伝子溶出ステントの有効性試験ならびに安全性試験：

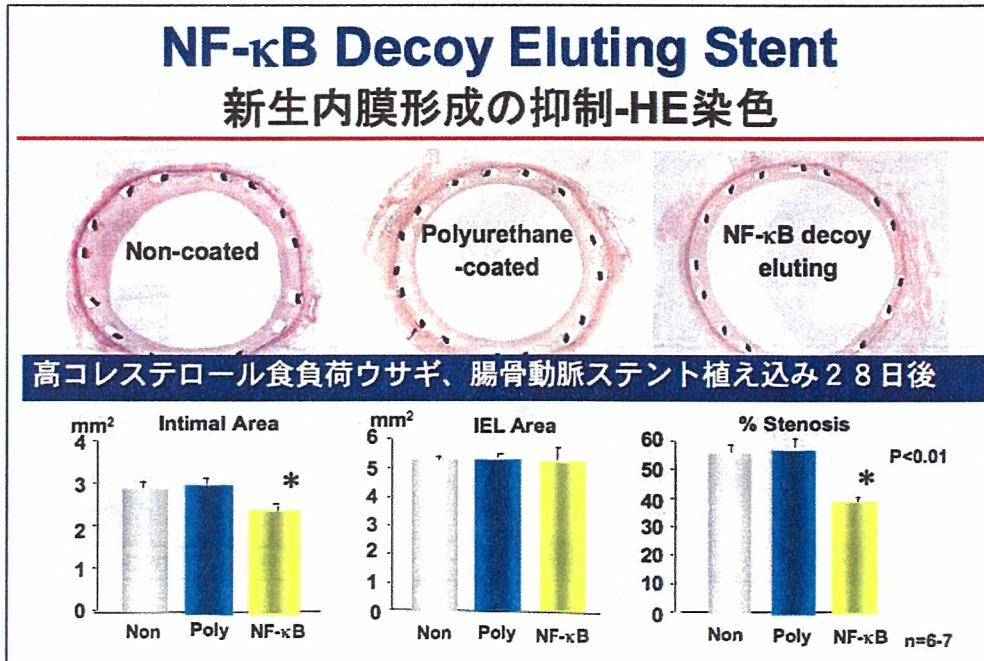
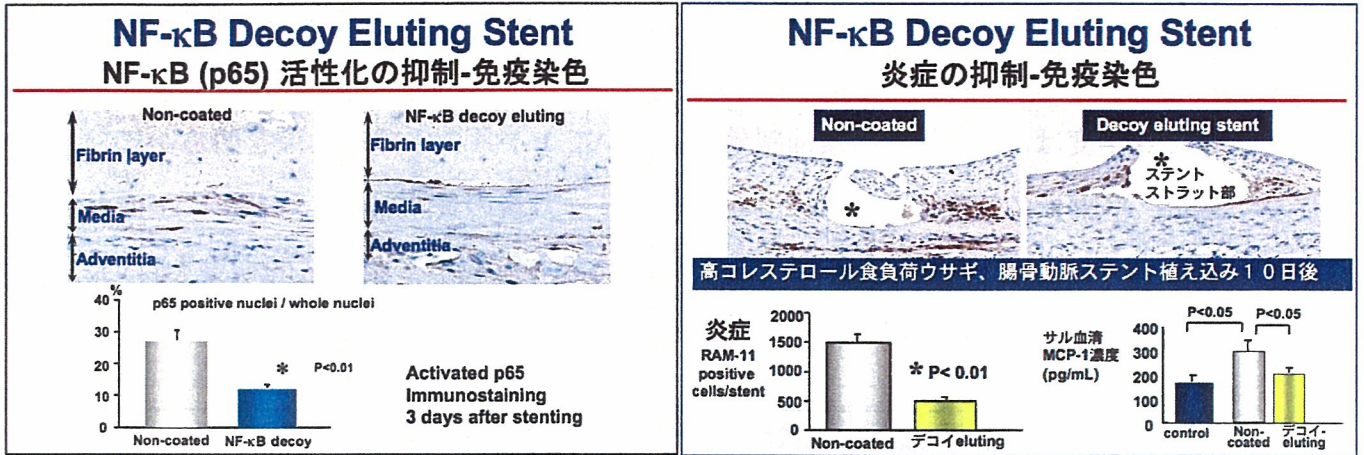
まず、7ND 遺伝子溶出ステントを作製することに成功した。遺伝子の発現は2. で述べたように遺伝子発現はマーカー遺伝子 (LacZ) 溶出ステントを用いて確認した。さらに、7ND 遺伝子溶出ステントの再狭窄抑制作用を検討し、遺伝子溶出ステントでは、対照ステントと比較して、新生内膜形成が抑制されていた。平成16年度は、この新生内膜抑制効果について1か月後の抑制効果を明らかにできた。平成17年度は、さらに3ヶ月後と6ヶ月後の長期効果を確認した(図参照)。また、7ND 遺伝子溶出ステント留置前後で血液学、血清学的検査を行い、遺伝子溶出ステントの安全性が示唆された。



次に、18年度はNF- $\kappa$ B デコイ溶出ステントを作製することに成功し、その有効性試験と安全性試験を行った。対照ステントではステント留置早期からNF- $\kappa$ B が活性化され、その結果、MCP-1、TNF  $\alpha$  などのサイトカインが産生され炎症に引き続いて新生内膜形成が誘導された。NF- $\kappa$ B デコイ溶出ステントでは、対照ステントと比較してNF- $\kappa$ B の活性化が有意に抑制された。さらに、

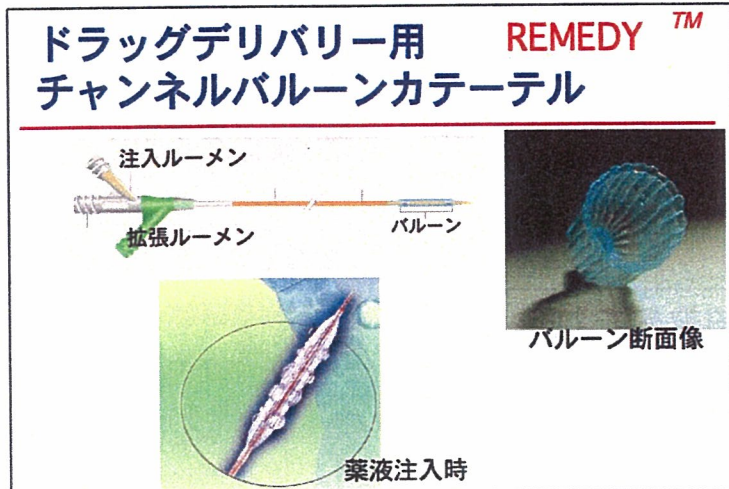
炎症、平滑筋増殖、サイトカイン産生 (MCP-1、TNF  $\alpha$  など)、が抑制され、その結果、新生内膜形成が抑制された。

また、霊長類において NF- $\kappa$ B デコイ溶出ステントの留置前後で血液学、血清学的検査を行った。その結果、異常は認められず遺伝子溶出ステントの安全性が示唆された。

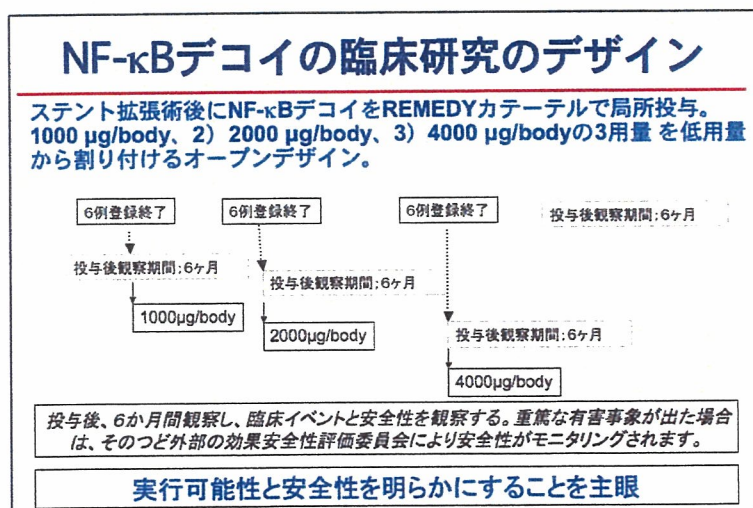


## 5. 探索的臨床研究

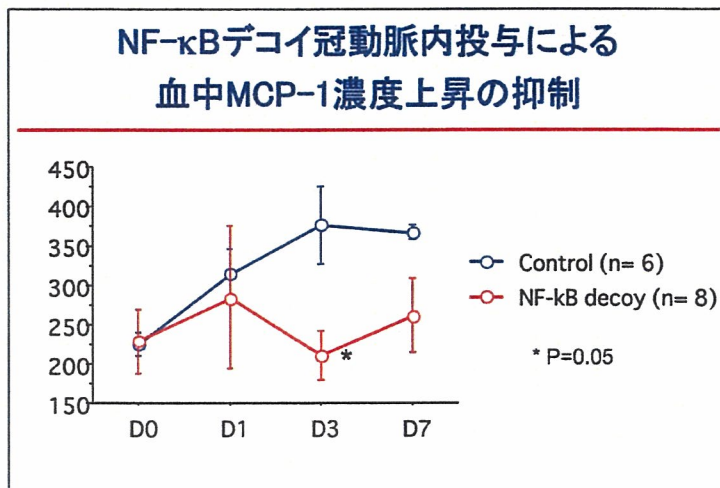
【方法】倫理委員会の承認を得て、探索的臨床研究を実施し終了した。安定労作性狭心症患者を対象として、冠動脈狭窄病変をベアメタルステントで拡張に成功したあと、NF- $\kappa$ B デコイをドラッグデリバリーカテーテル（左図参



照)を用いてステント部位にデリバリーした(18症例、試験デザインは下図参照)。エンドポイントは投与から6か月間の心血管イベント、再狭窄と関連する副作用である。



【結果と考察】NF-κB デコイの投与は予定通り完了し、本研究の方法を用いてNF-κB デコイの投与は実行可能であった。対照群（NF-κB デコイを投与しなかったステント留置症例）では血中 MCP-1 濃度の増加が観察されたが、NF-κB デコイ投与群ではその増加が抑制された（図参照）。また、再狭窄（定量的計測で75%以上の狭窄）は18症例中1症例に観察された（図参照）。文献的には、再狭窄は20-30%に生じるとされているのでNF-κB デコイ投与の効果が有った可能性がある。NF-κB デコイに起因する重大な有害事象はなくその安全性が示唆された。



### 再狭窄率の結果概要

6か月後再狭窄 (> 75 % by QCA)

	症例数	率
再狭窄無し;	17	6 %
再狭窄有り;	1	94 %

**結論**

- ◆REMEDYカテーテルを用いたNF-κBデコイの局所投与は可能であった。重大な有害事象は認めなかった。
- ◆NF-κBデコイの安全性は担保できた。
- ◆再狭窄の抑制作用も有るかもしれない。

## 6. 生体吸収性ステントプラットホームの開発：

現行のステントプラットホームはステンレス製であり、生体内永久植え込み型である。これによるアレルギー・異物反応、画像診断の制限、抗血小板薬（チクロピジン）の長期投与の必要性、等の問題点が指摘されている。これらの問題点を克服するために、我々は製造特許を有する難燃性マグネシウム（Mg）（産業技術総合研究所九州センター）を用いて生体完全吸収性ステントを開発した。動物の骨格筋内に植え込み、生体吸収されることを確認した。現在、ブタ冠動脈に植え込み安全性を検討している。

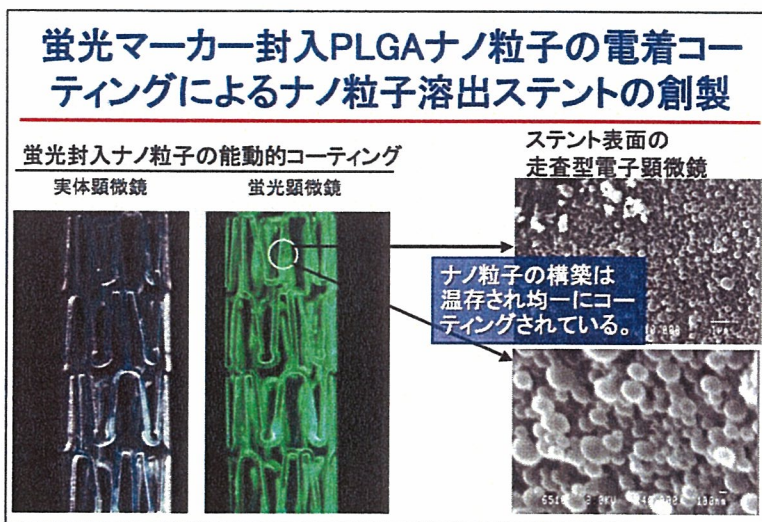
Mg は生体吸収性であり、生体適合性がある。難燃性 Mg は Mg とカルシウム（Ca）によって構成されることから生体完全吸収性 Mg 合金である。また、Ca 含量に応じて生体吸収時間が長くなる特徴がある。さらに、Mg と Ca は生体必須の元素であり安全性が高いことが示唆される。

国内外で市販の Mg 合金を用いた Mg ステントの開発が先行しているが、それらにおいては（1）5-10%の生体安全性が未知の成分が含まれている、（2）生体吸収が比較的早く起こり（4週間以内）狭窄拡張強度が保持できない、（3）市販品であり製造特許が無い、などの問題点が指摘されている。難燃性 Mg はこれらの問題点を克服できる次世代製品であり、「世界標準」の生体吸収性ステントとなる可能性が高い。

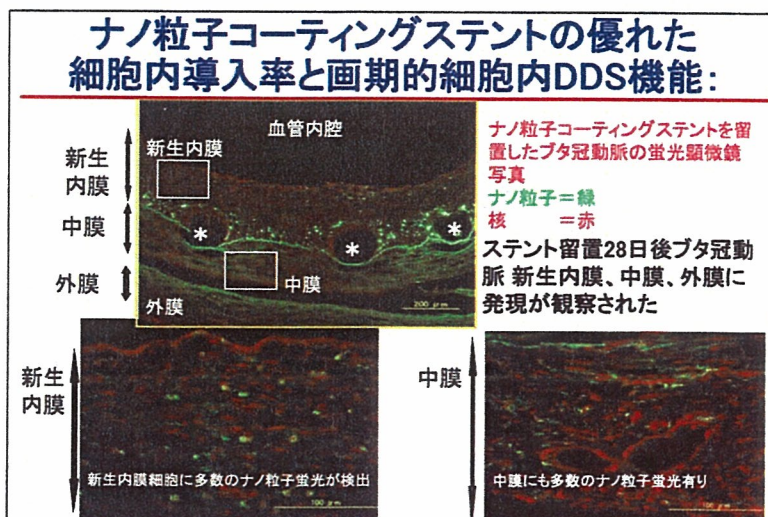
## 7. 生体吸収性ナノ粒子のコーティング技術の開発とナノ DDS ステント創製:

生体吸収性ポリマー（PLGA など）は医療用材料（縫合糸）や DDS 材料として長年医療に使用されてきたことから、安全性の問題は少ない。また、同ポリマーを用いたナノ粒子は細胞内送達性と細胞内 DDS に優れている。申請者らは、ホソカワ粉体技術研究所の辻本所長らの協力を得て、水中エマルジョン溶媒拡散法を用いて生体吸収性高分子ポリマー製ナノ粒子を作製し、そのナノ粒子に治療因子封入する技術を確立した。しかし、従来に技術ではナノ粒子をステント（金属）表面に積極的に積層させることは出来なかった。そこで、申請者らはカチオン性ナノ粒子をステント表面に電着コーティングする技術を確立した（特許出願 2006、図参照）。この技術によって、ナノ粒子をステント表面にフィルム状に積層させることが可能となり、「ナノ DDS ステント」が創製できた（図）。本技術によって、（1）ナノ粒子のコーティン

グ量の通電時間による制御、（2）多剤、多層コーティング、が可能となることから、ステントコーティングの革新的次世代基盤技術になると考えられる。



この電着コーティングステントの生体での機能を明らかにするために、ステ

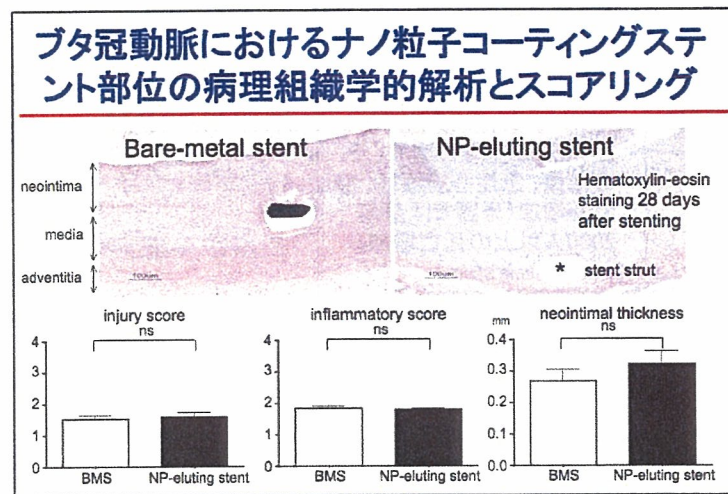


ント内再狭窄の動物モデルとして認められているブタ冠動脈を用いた。その結果、ステントから溶出したナノ粒子が高率に血管壁細胞に導入さ



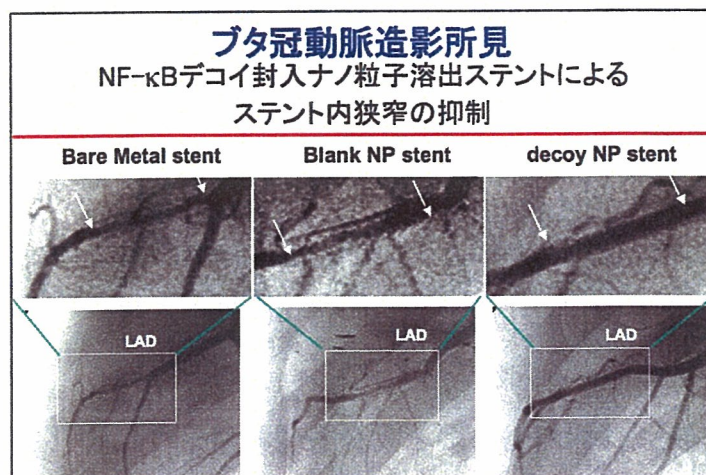
れ、4週間以上血管壁細胞内に滞留することが明らかとなった(図)。すなわち、ナノ粒子キャリアーをステントから溶出させ極めて効果的に遺伝子や薬剤を血管壁細胞内に送達できた(図)。このことは、このシステムを用いることによって目的とする遺伝子、人工核酸、あるいは分子標的薬を長期、且つ効果的に動脈硬化病変細胞内に送達できることを示している。また、分子量の大きいポリマーを用いるとナノ粒子の生体内分解時間が延長することを活用すれば、治療因子の細胞内分解(細胞内 DDS 機能)を調節できることも特徴となる。

次に、ステントから溶出したナノ粒子の冠動脈壁組織への影響を明らかにするために病理組織標本を作製し炎症、傷害、内膜肥厚の程度を評価した。その



の結果、ナノ粒子溶出ステント留置部位の所見は対照ステント部位の所見と同等であった。したがって、ステントから溶出したナノ粒子が組織に悪影響を与えている可能性は少ないことが明らかとなった。

このナノ DDS 機能を有するステント(ナノ DDS ステント)が実際にステント内狭窄を抑制できるかどうかを明らかにするために、現在、7ND タンパク、



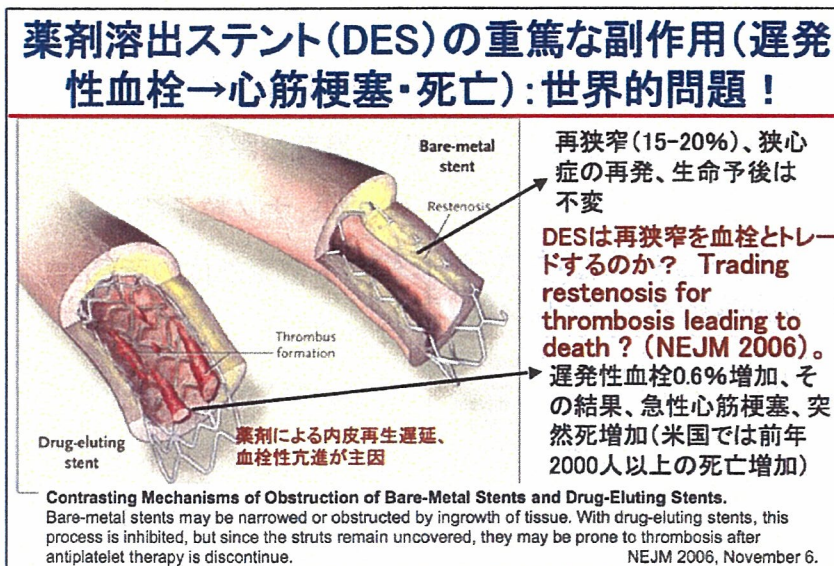
NF-κB デコイ、スタチン、グリベックなどの分子標的因子の効果を検討している。予備成績では、いずれの治療因子もステント狭窄を抑制する可能性が示唆されている。

## 7. 評価、考察、結論

### 1) 達成度と反省点について：

第一の目標である「霊長類を用いた再狭窄・動脈硬化モデルの作製」は達成できた。

第二の目標である「遺伝子・薬剤溶出ステントの開発」もほぼ達成できた。ただし、本研究の採択後に、現行第1世代 DES には内皮細胞再生傷害、遅発性血栓による死亡率増加などの重篤な副作用が発表され（図）、次世代デ



バイスに期待される状況が「より効果的」デバイスから「より安全で副作用の少ない」デバイスへと大きく変わったことから、我々もデバイ

ス開発のコンセプトを根本的に見直し、「生体吸収性ステントプラットフォーム」と「生体吸収性ナノ粒子によるナノ DDS」の開発を達成した。これによって生体完全吸収性ナノ DDS ステント創製の基盤が完成した点は評価できる。

第三の目標である「臨床応用を目指した探索的臨床研究の推進」については、上記の理由（次世代ステントに対する開発コンセプトの変更）で溶出ステントの臨床試験を開始できなかった。ただし、NF-κB デコイの冠動脈内投与臨床試験を実施できた点は評価できる。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

我が国発「世界標準」の生体完全吸収性ナノ DDS ステント創製の基盤が出来たことの意義は大きい。本研究成果が実用化できれば、血管病に対する革新的低侵襲血管ナノ医療が創製され患者の QOL 改善・生命予後向上に貢献だけでなく、国際競争力を有する医療機器開発による我が国産業界への貢献

も極めて大きい。

### 3) 今後の展望について

本研究成果（生体吸収性 Mg ステントとナノ粒子コーティングによる生体完全吸収性ナノ DDS ステント創製）を基盤にして、医工薬ナノ融合と産学連携体制をさらに強化し実用化に向けて研究開発を推進したい。

具体的には、医・工・薬・ナノテクノロジーの先端的技術の融合によるイノベーションによって国際競争力を有する革新的かつ安全安心の低侵襲血管内医療システム（図参照）を開発する。そのために、以下の三位一体の研究開発を推進する。第一に、製造特許を有する国産の難燃性マグネシウム (Mg) を用いて生体完全吸収性の画期的次世代ステントを提案する。第二に、独自に開発したコーティング技術によって、Mg ステントに生体吸収性ナノ粒子をコーティングする。第三に、分子標的医薬を動脈硬化性病変部位（再狭窄、心筋梗塞・脳梗塞責任病変である不安定プラーク）に効果的に局所送達を可能にする高効果・低副作用の医療機器（生体完全吸収性ナノテク DDS ステント、DDS カテーテル）の研究開発を目指す。このナノテク DDS によって低侵襲で血管保護・再生を促進し病変の安定化を実現する血管内治療分野が新たに創出される。



4) 結論

我が国発「世界標準」の生体完全吸収性ナノ DDS ステント創製の基盤が出来た。

## 未来医療を拓く 生体完全吸収性ナノDDSステント

再狭窄抑制からプラーク安定化(心筋梗塞・脳梗塞抑制)へ

**Nanotech-DDS stent  
for vascular protection  
& regeneration**

生体完全吸収性ナノテクDDSステントを  
ドラッグ・デリバリー・システムとして駆  
使し、血管保護・再生を促進し病変の安  
定化を目指す全く新しいコンセプト

**1. ナノテクDDSステントによる  
狭窄・不安定化病変の拡張**

炎症、脂質沈着が  
顕著な悪性病変

**3. 狭窄の解除、内皮再生  
病変の安定化**

血管内皮再生・修復を促進  
し病変を安定化させる

ナノテクDDSステント  
による遺伝子・薬物の送達