

Supplementary Table. Re-endothelialization, injury score, and inflammation score 4 weeks after stenting

	Bare metal control stent (n= 8)	NP-eluting stent (n= 8)	Polymer-coated stent (n=3)	P value
Re-endothelialization (%)	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	1.0
Injury score	1.77 ± 0.08	1.81 ± 0.08	1.77 ± 0.08	0.84
Inflammation score	1.60 ± 0.14	1.63 ± 0.07	1.42 ± 0.26	0.58

Data are Mean ± SE.

The degrees of endothelial recovery in the three groups are also shown. The endothelialization score was defined as the extent of the circumference of the arterial lumen covered by endothelial cells and was scored from 1 to 3 (1=25%; 2=25% to 75%; 3=>75%).

The injury score was determined at each strut site, and mean values were calculated for each stented segment. In brief, a numeric value from 0 (no injury) to 3 (most injury) was assigned: 0 = endothelial denudate, internal elastica lamina (IEL) intact; 1 = IEL lacerated, media compressed, not lacerated; 2 = IEL lacerated, media lacerated, external elastica lamina (EEL) compressed, not lacerated; and 3 = media severely lacerated, EEL lacerated, adventitial may contain stent strut. The average injury score for each segment was

calculated by dividing the sum of injury scores by the total number of struts at the examined section.

The inflammation score took into consideration the extent and density of the inflammatory infiltrate in each individual strut. With regard to the inflammatory score for each individual strut, the grading is: 0 = no inflammatory cells surrounding the strut; 1 = light, noncircumferential inflammatory cells infiltrate surrounding the strut; 2 = localized, moderate to dense cellular aggregate surrounding the strut noncircumferentially; and 3 = circumferential dense inflammatory cells infiltration of the strut. The inflammatory score for each cross section was calculated in the same manner as for the injury score (sum of the individual inflammatory scores, divided by the number of struts in the examined section).

#### Reference

Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol.* 1992;19:267-74.

### Online Figure Legends

**Supplementary Figure I.** Schematic illustration of NP and NP size distribution. (A) Preparation of cationic PLGA NP with surface modification with chitosan. We prepared bioabsorbable poly-lactide-glycolide copolymer (PLGA) nanoparticle (NP) by emulsion solvent diffusion method. This NP system included followed advantages.

1. The matrix polymer (PLGA) is bioabsorbable and safe.
  2. NP can incorporate water-soluble drugs/oligonucleotides/DNAs.
  3. NP can cross cell membrane via endocytosis (efficiency of cellular uptake: 90 % or more), and deliver the encapsulated agents into the cytoplasm.
  4. Incorporated drugs are slowly released from NP with hydrolysis of PLGA, which works intracellular DDS after intracellular uptake.
  5. Surface charge can be controlled at cationic state by addition of chitosan on surface.
- (B) Particle size distribution of FITC-incorporated PLGA nanoparticles in water.

**Supplementary Figure II.** Schematic illustration of the electrodeposition coating system (chamber, electrodes, and DC power supply) for a cation nanoparticle coating technology. Three steps of electrodeposition coating procedure are shown.

**Supplementary Figure III.** Amount of coating of NP ( $\Delta$  stent weight) on the surface of stents increased with period of electricity ( $n=4$  each). Weight of stent was measured before and after cationic electrodeposition coating of NP on stents. Data are mean  $\pm$  SEM.

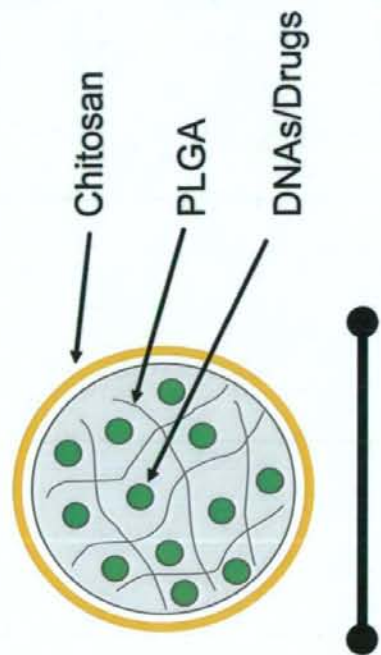
**Supplementary Figure IV.** Fluorescence microscopic pictures of human coronary artery smooth muscle cells 1 hour after the addition of NP eluted from FITC-NP-eluting stent (A) and 1 hour after addition of FITC-PLGA matrix eluted from PLGA polymer-based FITC-eluting stent (B). Cellular positivity was 99-100 % ( $n=6$ ) and 10 % or less in A and B, respectively. Bar = 100  $\mu$ m.

**Supplementary Figure V.** Micrographs of cross section stained with Hematoxylin-Eosin from coronary artery treated with bare metal stent, polymer-coated FITC-eluting stent and FITC-NP-eluting stents.

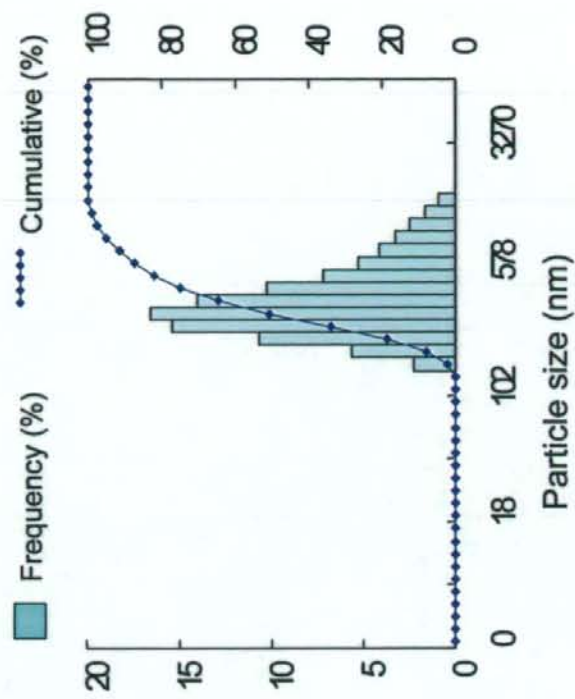
A, High-power photomicrographs around stent strut 2 weeks after stenting in porcine coronary arteries. Bar = 100  $\mu\text{m}$ .

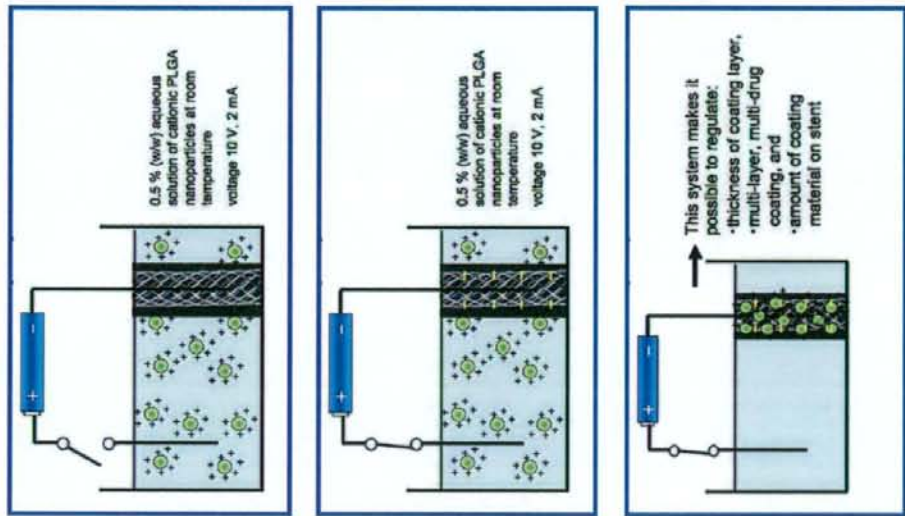
B, High-power photomicrographs around stent strut weeks after stenting in porcine coronary arteries. Bar = 100  $\mu\text{m}$ .

A

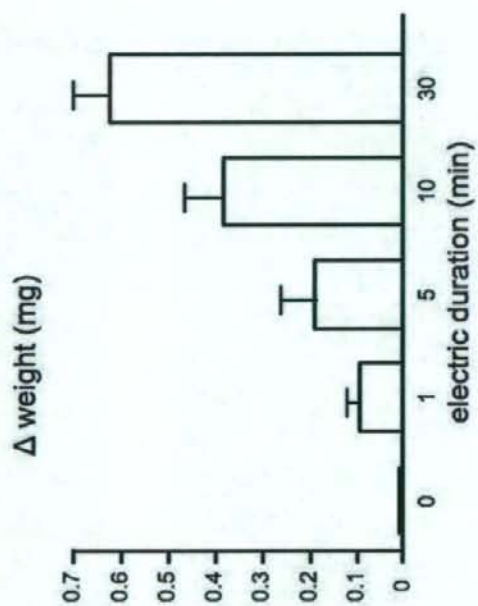


B

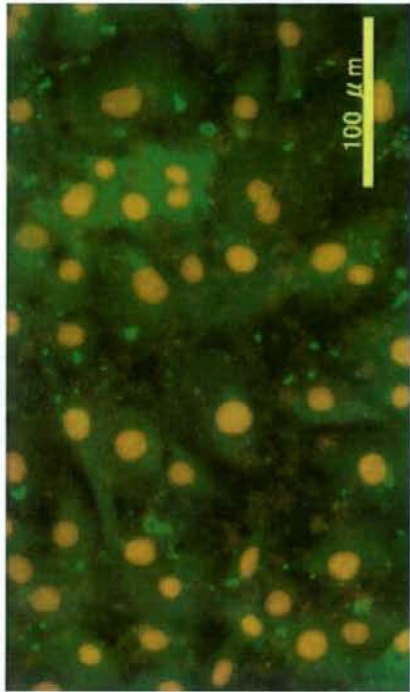








A



B

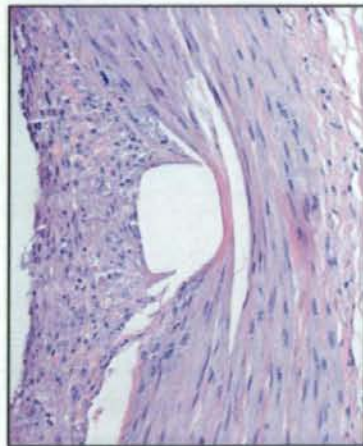




**A**

2 weeks

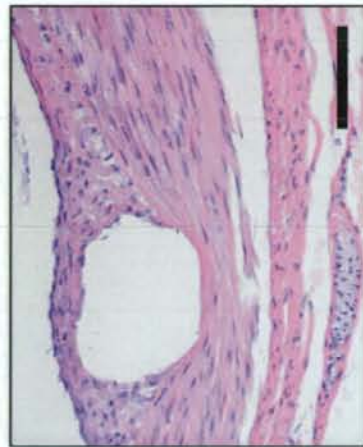
bare metal stent



polymer-coated  
FITC-eluting stent

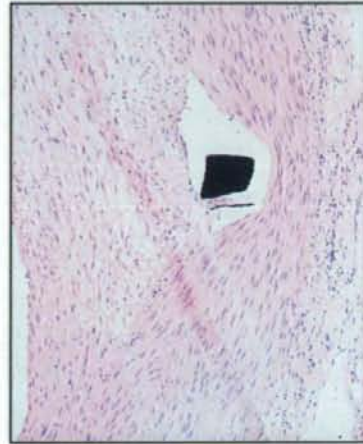
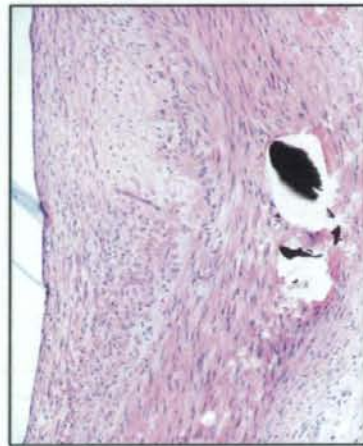


FITC-NP-eluting stent



**B**

4 weeks



# 冠攣縮： DESに関連した冠攣縮の分子細胞学的機序

九州大学大学院医学研究院循環器内科学

的場哲哉      竹本真生      江頭健輔  
Tetsuya Matoba      Masao Takemoto      Kensuke Egashira

## SUMMARY

DES 留置後の臨床上的の問題点の一つとして、冠攣縮が報告されている。SES 留置大動物モデルにおいて冠攣縮の再現が可能であり、培養内皮細胞においてはシロリムスによる Akt および eNOS のリン酸化抑制が観察され、冠攣縮の一機序と考えられた。DES 留置症例で観察される冠攣縮には、急性期の内皮機能障害から派生する平滑筋機能異常などの二次的な機序が介在することが示唆され、DES 留置後の補助薬物療法としてのスタチンの可能性についても論じた。

## はじめに

薬剤溶出ステント (drug eluting stent : DES) (シロリムス溶出ステント : sirolimus eluting stent : SES, Cypher<sup>®</sup> およびパクリタクセル溶出ステント : paclitaxel eluting stent : PES, TAXUS<sup>®</sup>) がステント留置後の再狭窄を抑制する一方で、安定狭心症患者の予後は改善しないことが 2007 年初頭にかけて発表された臨床研究で明らかとなった<sup>1)</sup>。その背景として、McFadden らの報告<sup>2)</sup>に端を発した遅発性ステント血栓症の問題や、本稿のテーマである冠攣縮が予後増悪因子となっている可能性が示唆される。

冠攣縮および冠攣縮性狭心症は、臨床的心筋虚血所見に関わらず冠動脈造影検査の際のアセチルコリンやエルゴノピンに対する過収縮反応および心筋虚血所見に基づき確定診断され、その本体は冠動脈内皮機能障

害および冠動脈平滑筋の過剰収縮であると考えられている。本稿では DES に関連した冠攣縮のメカニズムについて、筆者らの知見を含めて概説する。

## 薬剤溶出ステント(DES)付加薬剤の薬理作用と生体効果

現在、日本で DES に臨床使用されている薬剤はシロリムスとパクリタクセルである。シロリムスはイースター島の土壌で発見されたマクロライド系の抗生物質で、腎移植後の免疫抑制剤としても使用されている。シロリムスは細胞内レセプター FK506 結合タンパクと結合し平滑筋細胞に入った後、網膜芽細胞腫タンパク (retinoblastoma protein) のリン酸化と P27<sup>kip1</sup> のダウンレギュレーションを抑制することにより細胞周期の G1 期での停止作用を発現させる事で細胞増殖抑制作用を発現する<sup>3)</sup>。一方、パクリタクセルは北米大陸北西部に生息する針葉樹である Pacific yew tree から精製された抗癌剤で、乳癌、肺癌、卵巣癌などの治療に既に日本でも使用されている。薬理学的作用はその濃度によって異なる。高用量では微小管の脱重合を阻害し細胞周期の G2-M 期を停止させ<sup>4)</sup>、低用量では p53 と p21 のダウンレギュレーションを阻害する事により細胞周期の G1-S 期を停止させる<sup>5)</sup>。これらの作

## KEY WORDS

- 冠動脈疾患
- 冠動脈ステント
- 冠攣縮
- 血管内皮細胞
- 血管平滑筋細胞



用により、バクリタクセルは細胞増殖抑制作用を発現すると考えられている<sup>6)</sup>。現在臨床使用されているPESは低用量緩徐放成型である。バクリタクセルは癌細胞に比べて平滑筋細胞に対する感受性が高いとされているが、細胞死に至る用量はむしろ高く、血管内皮細胞に対する増殖抑制効果は低いと報告されている<sup>7)</sup>。

これらの薬剤の増殖抑制効果により、DESはベアメタルステント(beremetal stent: BMS)と比較して、動物実験では平滑筋の増殖による血管傷害後の新生内膜形成を有意に抑制し<sup>8)9)</sup>、ヒトでは経皮的冠動脈インターベンション(percutaneous coronary intervention: PCI)後の再狭窄を劇的に抑制した<sup>10)</sup>ことから臨床使用が急速に広がった。その反面、これらの薬剤は細胞毒性を有することが知られている。全身投与ではシロリムスでは消化器症状、白血球減少、肝機能障害などが、バクリタクセルでは白血球減少、ニューロパシー、催不整脈などの副作用が報告されており、その毒性が問題視されていた。DESによる冠動脈病変への局所投与により、これらの全身投与に関連した副作用の問題は回避された一方、投与局所における問題点も報告されている。

ニュージーランド・ホワイトラビットの腸骨動脈にバルーン傷害を加えた後に3mm径のBMSもしくはSES、PESを留置し、1、3ヵ月後の病理所見について検討された動物実験では<sup>9)</sup>、BMS留置部に比べてDES留置部において有意に多くのフィブリンの沈着、好中球・好酸球の血管壁への浸潤、中膜細胞の欠損が認められた。DES留置後患者の剖検例の検討<sup>11)12)</sup>では前述の動物実験の所見とほぼ同じ所見がヒトでも認められ、冠動脈内視鏡検査<sup>13)</sup>や冠動脈内超音波検査<sup>14)</sup>でもDES留置後の治癒およびステント部分の新生内膜被覆の遅延が指摘されて、これら

の変化が遅発性ステント血栓症の最も優れた予測因子となるとされている<sup>11)12)</sup>。

## DESに関連した冠攣縮

一方、DES留置後に冠攣縮が生じた臨床例が報告されている。Hofmaら<sup>15)</sup>は、BMS留置5症例およびSES留置7症例において、留置直後と6ヵ月後の冠動脈内皮機能をアセチルコリンの冠動脈内注入により検討し、SES留置症例ではBMS患者症例では認めない過収縮反応が生じたことを報告している。また、Obataら<sup>16)</sup>の研究では、急性心筋梗塞に対して左前下行枝にBMSまたはSES留置症例で冠動脈反応を観察し、同様にSES症例でアセチルコリンに対する冠動脈収縮および冠血流量低下反応を認めている。Togniらの研究<sup>17)</sup>では、SES留置後の患者で冠動脈造影の際に運動負荷を行い、冠攣縮が誘発されることを報告している。

同様の自験例を図1に示す。6ヵ月前に狭心症に対して左冠動脈前下行枝近位部にSESを留置した症例が労作性狭心症の再発で入院したが、冠動脈造影検査では有意狭窄を認めなかった。アセチルコリン50 $\mu$ gの冠動脈内投与により、自然発作と同様の胸痛とST

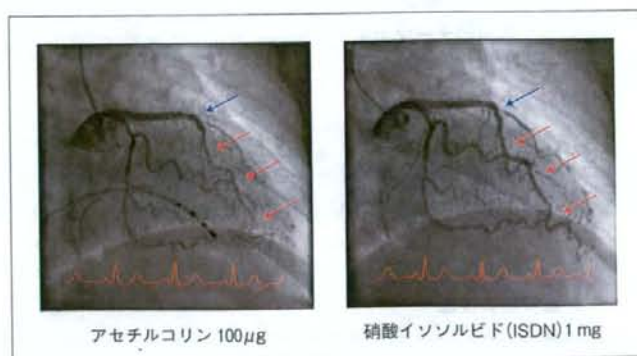
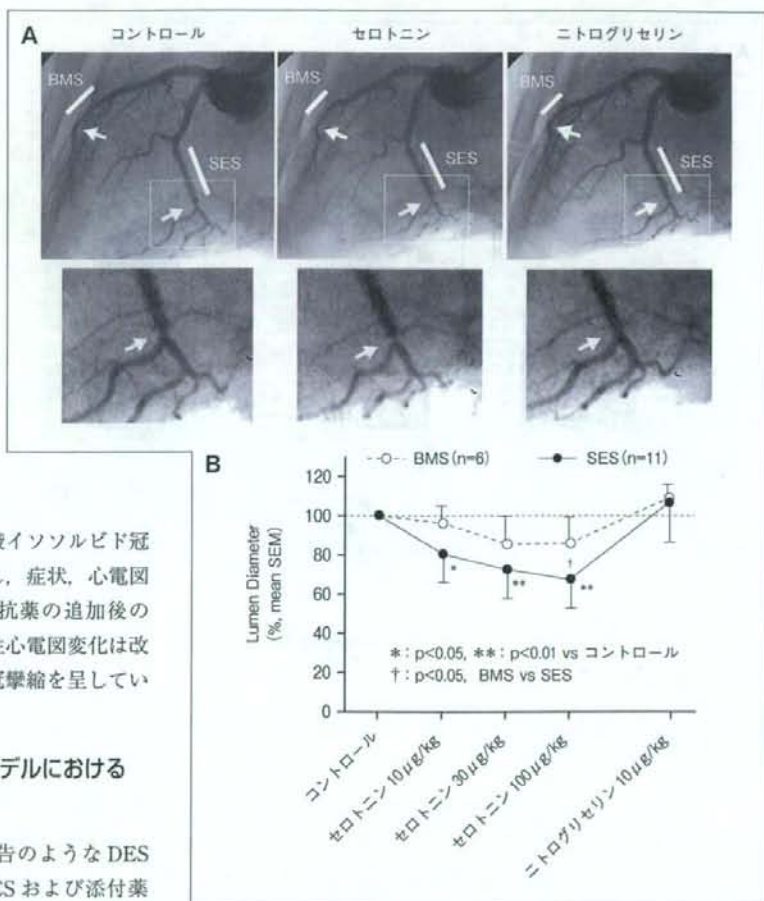


図1. SES留置6ヵ月後に冠攣縮性狭心症を生じた自験例  
冠動脈造影では有意狭窄病変を認めず、Ca拮抗薬内服下であったにもかかわらず、アセチルコリン冠動脈内投与により、左冠動脈前下行枝のSES留置部(青矢印)末梢に症状と心電図変化を伴う冠動脈攣縮が誘発(赤矢印)された。

図2. プタ冠動脈ステント留置モデルにおけるSES留置後の冠塞縮

A: プタ冠動脈左前下行枝にBMS, 左回旋枝にSESを留置後28日目の冠動脈造影. セロトニン(100 $\mu$ g/kg)注入後, SES 抹消側に冠塞縮を生じ, ニトログリセリン注入後に解除された. B: SES 留置冠動脈ではステント末梢側にセロトニンに対する収縮反応を認めたが, BMS 留置冠動脈では認めなかった.



低下を伴う冠塞縮が生じ, 硝酸イソソルビド冠動脈内投与にて冠塞縮は改善し, 症状, 心電図変化も消失した(図1). Ca拮抗薬の追加後の運動負荷心電図において虚血性心電図変化は改善し, 当症例では運動誘発性冠塞縮を呈していたと考えられた.

### プタ冠動脈ステント留置モデルにおける冠塞縮

我々は, 前述の自験例や報告のようなDES留置に関連した冠塞縮が, DESおよび添付薬剤自体によって誘発されるか否かを検証するため, プタ正常冠動脈に対するステント留置モデルにおいてDES留置後の冠塞縮が再現できるか検討した. 家畜プタの左冠動脈前下行枝および回旋枝にSESまたはBMSをステント/血管径比1.2で同等に留置し, 4週間後に冠動脈造影を行った. その際, 血管内皮および血管平滑筋細胞のアゴニストであり, ヒトにおけるアセチルコリンと同様に冠動脈機能を評価できるセロトニン(10~100 $\mu$ g/kg)を冠動脈内投与したところ, SES留置遠位部において冠塞縮を認めた. ニトログリセリンに対する拡張反応はBMSとSES

で同等であった(図2). セロトニンに対する冠塞縮はBMS留置血管では認めず, SESもしくはシロリムス自体の作用であると考えられた. ステント遠位部の冠動脈の組織学的検討を行ったところ, SES留置血管中膜には一部炎症細胞浸潤を認めたが内膜層は保たれており(図3A), SES留置プタ冠動脈の走査電子顕微鏡像では, ステントストラット間の内膜面では内皮細胞の敷石状配列を認め, ストラット上でも内皮細胞による被覆を認めたことから(図3B), 正常プタ冠動脈



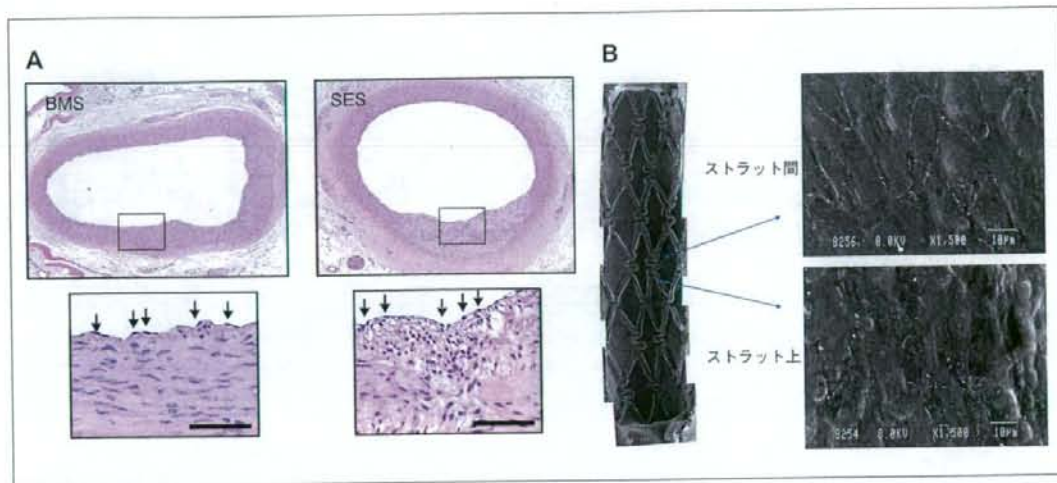


図3. SES留置冠動脈の病理像

A: ブタ冠動脈 BMS または SES 留置 28 日後のステント遠位部の病理像。SES 留置冠動脈では一部に炎症細胞浸潤を認めるが、内膜面は細胞に被覆されている(矢印)。B: SES 留置部の走査電子顕微鏡像では、ストラット間およびストラット上内膜面に内皮細胞様の数石状構造を認めた。

では SES 留置後にステント再内皮化は生じるにも関わらず、冠攣縮を生じることが明らかとなった。

### シロリムスの血管内皮細胞に対する直接作用

ブタステントモデルにおいて認めた冠攣縮部位においては、内皮由来一酸化窒素(nitric oxide: NO)が主要な内因性冠拡張因子である。シロリムスの血管内皮由来 NO 産生に対する直接効果を検討するため、培養ヒト臍帯静脈内皮細胞(human umbilical vein endothelial cell: HUVEC)を用いて検討を行った。ブラジキニンとはヒト血管内皮細胞に作用して、内皮型 NO 合成酵素(endothelial NO synthase: eNOS)のリン酸化を介して NO 産生を惹起することが知られている。ヒトにおける SES (Cypher®)留置後のシロリムス最大血中濃度は 1.05 ng/mL とされている(www.cordis-labeling.com) ことから、シロリムス 10 ng/mL の HUVEC に対する効果を検討したところ、シロリムス投与 24 時間後に eNOS 発現レベルの低下(-39%, n=4, p<0.05)を認め、ベースラインおよびブラジ

キニン刺激下のリン酸化 eNOS (Ser1177)発現レベルも低下した(図 4 A)。eNOS (Ser1177)のリン酸化酵素として Akt が知られており、Akt の活性化を制御するリン酸化部位についても検討を行ったところ、シロリムスは Akt の発現レベルには影響を与えなかったが、ベースラインおよびブラジキニン刺激下の Ser473 リン酸化レベルを有意に抑制した(図 4 B)。シロリムスの細胞内標的分子として mTOR (mammalian target of rapamycin)が同定されているが、シロリムスは mTOR, Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), Sin1 (SAPK-interacting protein), mLST8 (mammalian lethal with sec-13) からなる複合体 mTORC2 (mTOR complex 2) の Rictor と mTOR を解離させることにより、mTORC2 によって制御される Akt リン酸化を抑制することが既に報告されており<sup>10)</sup>、今回観察されたブラジキニンによる Akt リン酸化の抑制も同様の機序をとっている可能性がある。

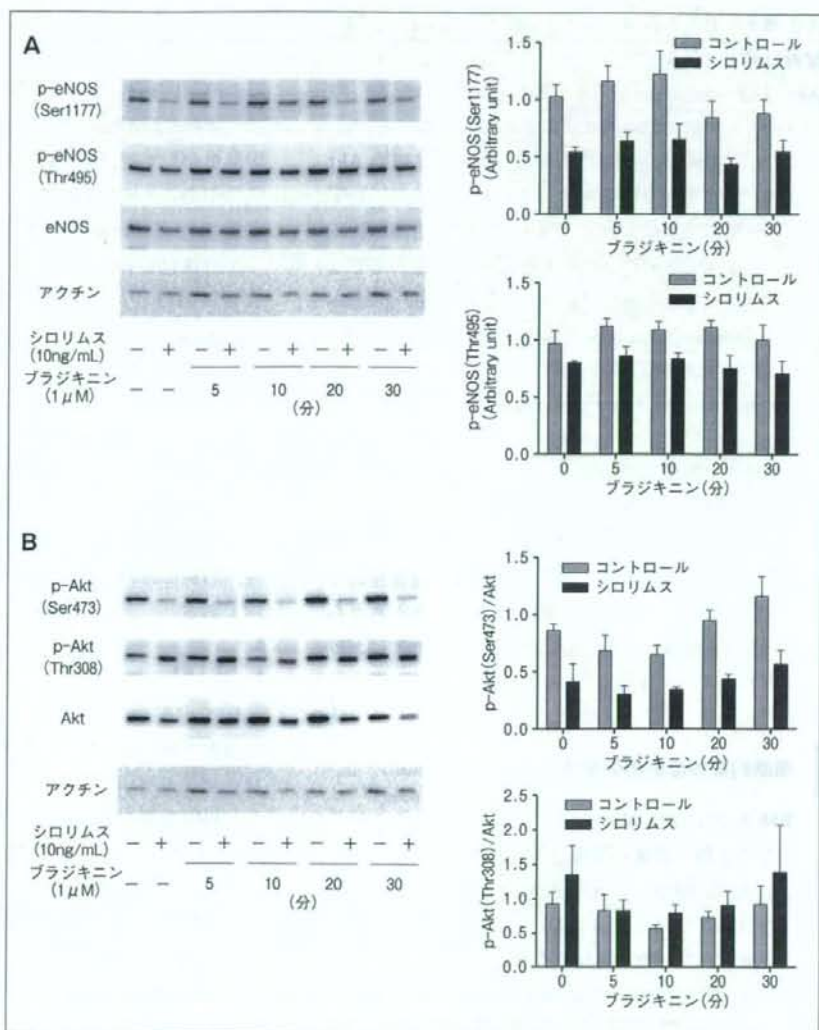


図4. シロリムスの内皮細胞に対する直接作用

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) にシロリムス (10 ng/mL) を24時間前投与し、ブラジキニン刺激下のeNOSリン酸化 (Ser1177およびThr495) (A) およびAktリン酸化 (Ser473, Thr308) (B) をウエスタンブロッティング法で検討した。

## シロリムスの急性効果とSESの慢性効果

これらの血管内皮細胞に対するシロリムスの直接効果は、SES留置冠動脈においてNO活性の低下を介して内皮依存性冠拡張反応を障害し、冠攣縮の原因の

1つとなり得る。しかしながら、Cypher®からのシロリムス放出の半減期は206時間(8.6日)とされている(www.cordislabeling.com)ことから、自験例も含めて前述の臨床研究において冠攣縮が確認された留置6ヵ月後にはステント上のシロリムスはほぼ消失してい



ると考えられる。従って、これら臨床研究における冠攣縮は残存するシロリムスの直接作用とは考えにくい。AktはeNOSの制御のみならず内皮細胞の生存、増殖、遊走に関与し血管保護的に働くことが知られており<sup>30)</sup>、留置急性期のシロリムスによる内皮細胞Akt抑制はヒトで観察されるステントの再内皮化遅延に関与する可能性があり、再内皮化遅延、NO活性抑制による冠動脈壁の炎症などが慢性期に内皮機能異常を惹起している可能性がある。また、NOはcyclic guanosine monophosphate (cGMP)依存性リン酸化酵素を介してRhoAを抑制することが報告されており<sup>30)</sup>、NO活性の低下により血管平滑筋のCa<sup>2+</sup>感受性を制御するRhoキナーゼの活性化を介して血管平滑筋の収縮性が亢進する可能性があり、慢性期の冠攣縮に至る別の機序として検討の余地がある。

以上のように、シロリムスの血管内皮細胞抑制効果と晩期に発生する冠攣縮との間には、再内皮化遅延やNO活性低下による二次的な機序が存在すると考えられ、全体像の解明にはヒト病理や動脈硬化動物におけるステントモデルを用いた検討が必要であると考えられる。

### 補助的薬物療法の可能性

現時点ではDES留置後には遅発性ステント血栓症に対して2種の抗血小板療法(アスピリン+チエノピリジン系)をBMSよりも長期間に継続するという対応がなされているものの、DESに関連した冠攣縮に対する適切な薬物療法は確立されていない。自然発症の冠攣縮性狭心症はCa拮抗薬の有効性が確立している<sup>21)</sup>。一方、器質的冠動脈病変を合併する症例においては、心臓突然死などのイベントが高いことが報告されている<sup>20)</sup>。DES留置に関連した冠攣縮性狭心症の予後は不明であるが、DES留置後の心血管イベントのメカニズムが完全に解明されていない現状においては、DES留置に関連して冠攣縮が生じた場合は何らかの治療介入をすべきであると考えられる。DES留置後に冠攣縮性狭心症が診断された症例に対しては、Ca

拮抗薬の使用は行われるべきであろう。

一方、今回指摘したシロリムスによるAkt-eNOS系の抑制に対する薬物療法は、血管内皮機能を維持して冠攣縮を抑制する可能性があり、同時に再内皮化の促進を介して遅発性ステント血栓症の回避に繋がる可能性がある。この作用点に対してはHMG-CoA還元酵素阻害薬(スタチン)が有望である。スタチンはAkt活性化を介してeNOSリン酸化を来たすことで血管におけるNO活性を改善させる可能性があり、またRhoキナーゼの抑制を介してeNOSの発現自体を亢進させる一方、直接血管平滑筋のCa<sup>2+</sup>感受性を抑制し得ることから、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の双方において冠攣縮に対する有効な治療となる可能性がある<sup>20)</sup>。自然発症の冠攣縮性狭心症に対するスタチンの効果が示されているが<sup>20)</sup>、DESに関連した冠攣縮に対するスタチンの有効性は明らかではなく、現在、当科において臨床試験として検討を進めている段階である。

### 結論

DES留置後の臨床上的問題点の1つとして冠攣縮が報告されている。シロリムスの内皮細胞に対する直接作用としてAktおよびeNOSのリン酸化抑制があり、SES留置動物モデルにおいては冠攣縮の機序となり得る。DES留置症例で観察される冠攣縮には、急性期の内皮機能障害から派生する二次的な機序が存在することが示唆され、全体像は解明されていないが、DES留置後の補助薬物療法としてのスタチンの重要性は検討に値すると思われる。

### ◎文献

- 1) Kastrati A, Mehilli J, Pache J, et al: Analysis of 14 trials comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents. *N Engl J Med* 356: 1030-1039, 2007
- 2) McFadden EP, Stabile E, Regar E, et al: Late thrombosis in drug-eluting coronary stents after discontinuation of antiplatelet therapy. *Lancet* 364: 1519-1521, 2004

- 3) Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, et al : Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation* **99** : 2164-2170, 1999
- 4) Yamasaki K, Asai T, Shimizu M, et al : Inhibition of NF $\kappa$ B activation using cis-element 'decoy' of NF $\kappa$ B binding site reduces neointimal formation in porcine balloon-injured coronary artery model. *Gene Ther* **10** : 356-364, 2003
- 5) Giannakakou P, Robey R, Fojo T, Blagosklonny MV : Low concentrations of paclitaxel induce cell type-dependent p53, p21 and G1/G2 arrest instead of mitotic arrest : molecular determinants of paclitaxel-induced cytotoxicity. *Oncogene* **20** : 3806-3813, 2001
- 6) Drachman DE, Edelman ER, Seifert P, et al : Neointimal thickening after stent delivery of paclitaxel : change in composition and arrest of growth over six months. *J Am Coll Cardiol* **36** : 2325-2332, 2000
- 7) Axel DI, Kunert W, Goggelmann C, et al : Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery. *Circulation* **96** : 636-645, 1997
- 8) Finn AV, Kolodgie FD, Harnek J, et al : Differential response of delayed healing and persistent inflammation at sites of overlapping sirolimus- or paclitaxel-eluting stents. *Circulation* **112** : 270-278, 2005
- 9) Farb A, Heller PF, Shroff S, et al : Pathological analysis of local delivery of paclitaxel via a polymer-coated stent. *Circulation* **104** : 473-479, 2001
- 10) Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, et al : A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med* **346** : 1773-1780, 2002
- 11) Finn AV, Joner M, Nakazawa G, et al : Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis : strut coverage as a marker of endothelialization. *Circulation* **115** : 2435-2441, 2007
- 12) Finn AV, Nakazawa G, Joner M, et al : Vascular responses to drug eluting stents : importance of delayed healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27** : 1500-1510, 2007
- 13) Kotani J, Awata M, Nanto S, et al : Incomplete neointimal coverage of sirolimus-eluting stents : angiographic findings. *J Am Coll Cardiol* **47** : 2108-2111, 2006
- 14) Stabile E, Escolar E, Weigold G, et al : Marked malapposition and aneurysm formation after sirolimus-eluting coronary stent implantation. *Circulation* **110** : e47-e48, 2004
- 15) Hofma SH, van der Giessen WJ, van Dalen BM, et al : Indication of long-term endothelial dysfunction after sirolimus-eluting stent implantation. *Eur Heart J* **27** : 166-170, 2006
- 16) Obata JE, Kitta Y, Takano H, et al : Sirolimus-eluting stent implantation aggravates endothelial vasomotor dysfunction in the infarct-related coronary artery in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **50** : 1305-1309, 2007
- 17) Togni M, Raber L, Cocchia R, et al : Local vascular dysfunction after coronary paclitaxel-eluting stent implantation. *Int J Cardiol* **120** : 212-220, 2007
- 18) Dormond O, Madsen JC, Briscoe DM : The effects of mTOR-Akt interactions on anti-apoptotic signaling in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **282** : 23679-23686, 2007
- 19) Mukai Y, Rikitake Y, Shiojima I, et al : Decreased vascular lesion formation in mice with inducible endothelial-specific expression of protein kinase Akt. *J Clin Invest* **116** : 334-343, 2006
- 20) Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, et al : *J Biol Chem* **275** : 21722-21729, 2000
- 21) Antman E, Muller J, Goldberg S, et al : Nifedipine therapy for coronary-artery spasm. Experience in 127 patients. *N Engl J Med* **302** : 1269-1273, 1980
- 22) Shimokawa H, Nagasawa K, Irie T, et al : Clinical characteristics and long-term prognosis of patients with variant angina. A comparative study between western and Japanese populations. *Int J Cardiol* **18** : 331-349, 1988
- 23) Takemoto M, Liao JK : Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21** : 1712-1719, 2001
- 24) Yasue H, Mizuno Y, Harada E, et al : Effects of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, fluvastatin, on coronary spasm after withdrawal of calcium-channel blockers. *J Am Coll Cardiol* **51** : 1742-1748, 2008



## ナノ DDS ステントの創製と臨床応用

九州大学大学院医学研究院循環器内科学

中野 覚 江頭健輔  
Kaku Nakano Kensuke Egashira

SUMMARY

第一世代 DES (Cypher® および TAXUS®) 使用後の重篤な副作用 (遅発性血栓症による急性冠症候群発症) が明らかになり、その発生機序の解明も進んでいる。しかし、その解決策はいまだに不明である。我々は、第一世代 DES の有する副作用のない安全・安心な生体吸収性ナノ DDS ステントの開発を進めており、本稿では、その概略について述べる。

### はじめに

本連載『薬剤溶出ステントと遅発性血栓症～DESの陰から光を探る～』を通して、改めて現在、臨床で用いられている第一世代薬剤溶出ステント (drug eluting stent: DES) シロリムス 溶出ステント Cypher® およびパクリタキセル溶出ステント (Taxus®) のステント留置後の劇的な再狭窄抑制効果という光の面と、その陰としての副作用 (遅発性血栓症、冠攣縮など) があることが明らかにされた。その機序には、主として内皮細胞の再生遅延 (anti-healing effects) が関わっている。DES 使用後の遅発性血栓症の頻度は高くないが、いったん発症すれば、殆どの症例が急性冠症候群 (急性心筋梗塞症、心臓死) に至ることから臨床的意義は大きい。また、抗血小板薬投与をいつまで継続しなくてはならないかについても結論が出

ていない。このことは、DES 使用後の遅発性血栓症は単に冠インターベンションに携わる臨床医だけの問題ではなく、その患者の診療を担当するかかりつけ医や患者の外科手術を担当する外科医など、多くの診療科にまたがる問題であることを意味する。従って、この点は DES 使用後の患者の診療に関わる多部門の医療スタッフに知らせるべきであろう。

また、本連載にて三井記念病院の田辺健吾先生 (本誌 2008 年 11 月号掲載) から紹介された、現在治験中 (CE マーク取得済み) の第二世代 DES、Endeavor® (Medtronic)、XIENCE™ V (Abbot)、Nobori® (Terumo) においても Cypher® と同様の Olimus 系薬剤 (それぞれゾタロリムス: zotarolimus, エバロリムス: everolimus、バイオリムス: biolimus A9) が使用されていることから、DES 使用後の内皮細胞の再生遅延 (anti-healing effects) と遅発性血栓症は継続して問題となる可能性がある。抗血小板薬の長期内服をしなくて良いかどうか、結論は出ていない。

本稿では、本連載を纏めるにあたり、我々のグループが長年にわたり蓄積してきた血管生物学、動脈硬化・ステント内再狭窄発症機序の視点から DES を構成する 3 つの素材、すなわち薬剤、ポリマー、ステントプラットフォーム、全てに対して改良・改善し、現

KEY WORDS

- 薬剤溶出型ステント
- 遅発性ステント内血栓症
- ナノテクノロジー
- Drug Delivery System (DDS)

在、ブタ冠動脈モデルでの有効性の実証(proof of concept)が得られた次世代ナノ DDS ステントおよびその臨床応用に向けた取り組みを紹介したい。

### ステントへの薬剤キャリアー： DDS 機能を有する生体吸収性ナノ粒子の開発

第一世代の DES に用いられているポリマーはいずれも生体非吸収性であるため、血管壁に永久に残存する。ポリマーの残存はフィブリンの沈着、アレルギー反応、炎症の惹起、慢性化、更には晚期ステント内血栓症の発症に寄与すると考えられている。以上のことから、より効果的で安全性の高い生体適合性(biocompatibility)のあるキャリアーマトリックスの開発が必須であり、各企業がしのぎを削っているのが現状である。我々は単に薬剤を保持するだけのキャリアーマトリックスとしての材料ではなく、drug delivery system (DDS)機能を兼ね備えたマトリックスの検討を行い、生体吸収性、生体適合性に優れた高分子である乳酸・グリコール酸共重合体(co-poly-lactic acid/glycolic acid; PLGA)を「高分子球形晶析法<sup>1)</sup>」によりナノ粒子(ナノカプセル)化するとともに、水溶性薬

剤・核酸医薬・ペプチド封入技術を開発した。本ナノ粒子の特徴として、マイクロ粒子と比べ標的となる組織への送達性、親和性が高く、また PLGA の分子量を変化させることにより生体内でのポリマーの加水分解速度が変わり、それに伴い内包した薬剤などの徐放速度の制御が可能である点などが挙げられる。また、PLGA は生体吸収性縫合糸の材料として 30 年以上臨床で使用されており、PLGA マイクロ粒子によるリユープリン(酢酸リユープロレリン長期徐放型注射剤)の実績などからも、生体内での安全性は高いことが示されている。

### ナノ粒子のステントへの電着コーティングと ダブル DDS 機能

次に、このナノ粒子をステント表面にコーティングする技術開発を行った。ナノ粒子表面をキトサンで修飾することによりナノ粒子表面電化をプラスにチャージさせ、金属メッキの原理を応用した電着コーティング技術を開発し、ステント表面に蛍光マーカーの FITC 封入ナノ粒子をコーティングした。その結果、薄く均一にナノ粒子をステント表面にコーティングす

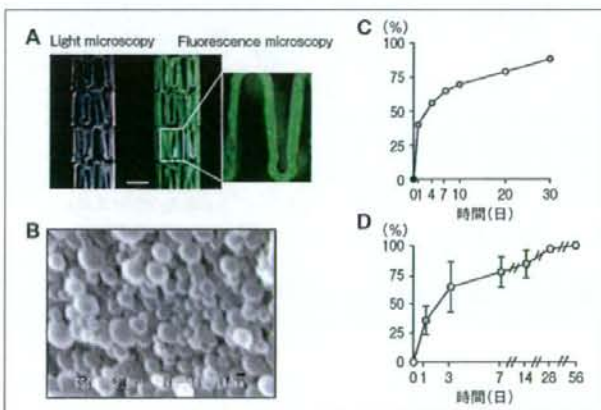


図1. 電着コーティングによる生体吸収性ナノ DDS ステントの創製と DDS 機能  
A: 実体顕微鏡および蛍光実体顕微鏡による FITC 封入ナノ粒子ステント。薄く均一にナノ粒子がステント表面にコーティングされるのが観察される (scale bar = 1 μm)。  
B: 走査型電子顕微鏡像。ナノ粒子がその形態を保ちコーティングされていた。  
C: *In vitro* でのナノ粒子からの FITC ナノ粒子の累積放出曲線。  
D: ステント表面からのナノ粒子の累積放出曲線。  
(JACC: Cardiovascular Intervention 2009 in press より改変)

ることができた(図1)。更に、通電時間を変化させることにより、ステントへのナノ粒子の搭載量を能動的に制御可能であることを見出した。ステントを拡張後、走査型電子顕微鏡で観察したところ、ナノ粒子はその形態を保持したままステント表面にコーティングされていた。FITC封入ナノ粒子からのFITCの擬似体液中での放出を検討したところ、24時間以内におよそ40%のFITCが初期バーストで放出され、その後30日以上に渡り徐放されることが明らかになった。次いで、FITCナノ粒子溶出ステント表面からのナノ粒子の放出を同様に擬似体液中で検討したところ、同様に初期バーストが生ずるが、その後56日以上に渡り溶出されることを明らかにした(図1)。

実際にブタ冠動脈に蛍光マーカーとしてFITCを封入したPLGAナノ粒子コーティングステントを留置し、28日後に剖検し、組織内ナノ粒子の停留および病理学的な解析を行った。蛍光顕微鏡で観察すると、ステントストラット周囲に強い蛍光が認められたほか、内腔直下、中膜にもナノ粒子に起因する蛍光が認められた(図2)。これらのことから、ステント表面にコーティングしたナノ粒子は、ステント表面から徐々に溶

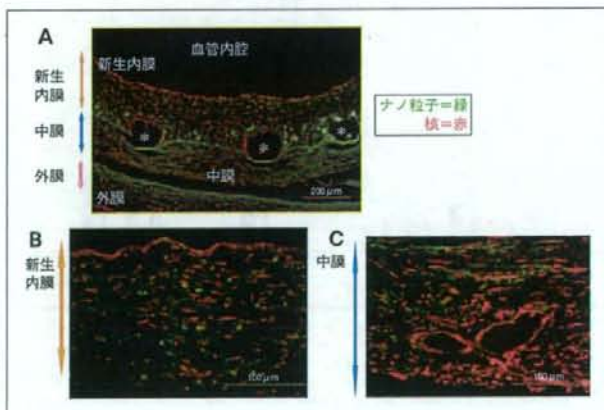
出され血管壁に送達、更には組織内に停留したナノ粒子からの薬剤の徐放という二重の徐放性機能(ダブルDDS)を有することが示唆された<sup>2)</sup>。

### ナノ DDS ステントに搭載する候補となる薬剤としてのスタチン

本連載のOverview(本誌2007年8月号掲載)でも紹介されたように、第一世代のDESには平滑筋細胞増殖抑制作用を有する免疫抑制剤シロリムスあるいは抗腫瘍剤パクリタキセルが用いられている。これらの薬剤にはステント留置後の過剰な平滑筋増殖の抑制作用を有する反面、内皮細胞の再生遅延、骨髄由来の内皮前駆細胞の分化抑制、組織因子(TF)の発現亢進に起因する遅発性血栓症という副作用を有することが明らかになった。そこで我々は、血管平滑筋増殖抑制作用を有し、かつ内皮再生を促進する血管に優しい薬剤をナノ製剤化し、*in vitro*でのスクリーニングを行い、ナノ DDS ステントに搭載する治療薬を検討した。いくつかの候補化合物(スタチン、PPAR $\gamma$ アゴニスト、ホスホジエステラーゼⅢ(PDE-3)阻害薬、抗炎症作用を有するペプチド、遺伝子など)を得ているが、本

図2. ナノ粒子コーティングステントの優れた細胞内導入率と局所的細胞内DDS機能

FITC封入ナノ粒子溶出ステント留置28日後の血管壁へのナノ粒子の送達と停留を確認した。凍結切片を作製し、血管の横断面を観察するとステントストラット(\*)周囲に強い蛍光が認められた(A)。血管横断面を拡大して観察するとストラット有意だけでなく、新生内膜組織(B)、内皮直下および中膜組織(C)においてもFITCナノ粒子が観察された。スケールバーは図拡張像(上段)200 $\mu$ m、強拡張像(下段)100 $\mu$ mを示す。(JACC: Cardiovascular Intervention 2009 in press より改変)





稿ではスタチン封入ナノ粒子をナノ DDS ステントに搭載する薬剤の候補として、*in vivo* での有効性の検証を行った成果を紹介する。

HMG-CoA 還元酵素阻害剤(スタチン)は、血清コレステロールの低下薬として世界的に用いられている薬剤である。スタチンは、このコレステロール低下作用には依存しない血管保護作用(pleiotropic effects)を持つことが広く知られている。その1つに血管平滑筋増殖抑制作用があり、実際にスタチンの全身投与によって動脈硬化の発生抑制、いったん生じた動脈硬化の退縮作用<sup>2)</sup>、ステント内狭窄抑制作用、末梢血中の血管内皮前駆細胞の増加<sup>3)</sup>、傷害血管の再内皮化促進、などが臨床試験や動物実験で数多く報告されている。その作用機序としては、スタチンがphosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt 経路を介してeNOSを活性化させること、イソプレノイド生成を阻害することにより、低分子量GTP結合タンパク質の活性を抑制し、eNOS発現量を増加させることなどの作用機序が知ら

れている。スタチン高用量の内服により、ベアメタルステント(bare metal stent; BMS)の再狭窄は抑制されることが知られているが<sup>4)</sup>、反面、全身投与による副作用も懸念される。より安全・効果的に、動脈硬化病変を有する冠動脈へ局所的に送達・停留・徐放させるため、我々はナノテクノロジーを基盤とした革新的局所送達法(ナノ DDS)の開発を行った。

### スタチン封入ナノ粒子溶出ステントの有効性と安全性

次にCypher<sup>®</sup>、BMSおよびスタチン封入ナノ粒子溶出ステントをブタ冠動脈に留置し、28日後に常法に従い、病理学的な評価を行った。その結果、ステント内再狭窄の抑制効果はスタチンナノ粒子溶出ステントとCypher<sup>®</sup>が同程度であったのに対し、Cypher<sup>®</sup>で認められた炎症、再内皮化の遅延およびフィブリンの沈着といった副作用が、スタチン封入ナノ粒子溶出ステントでは認められなかった(図3)。今後、遠隔期

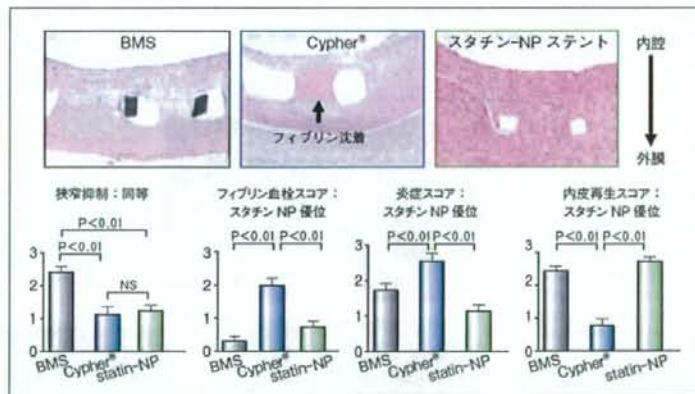


図3. スタチン封入ナノ粒子溶出ステントの有効性と安全性

ベアメタルステント、スタチン封入ナノ粒子(スタチン-NP)ステントおよびCypher<sup>®</sup>をブタ冠動脈に留置し、28日後における病理学的な評価を行った。Cypher<sup>®</sup>においては強度の炎症、フィブリン沈着および再内皮化の遅延が認められたが、それら副作用はスタチン封入ナノ粒子溶出(スタチン-NP)ステントでは認められなかった。狭窄抑制効果においてはスタチン封入ナノ粒子溶出(スタチン-NP)ステントとCypher<sup>®</sup>と同程度であった。