

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¹⁹⁾、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²⁰⁾、NO活性の低下により血管平滑筋のCa²⁺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介在すると考えられ、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²¹⁾。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²²⁾。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Ca²⁺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²³⁾。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²⁴⁾、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介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考えられる。

◎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 κ B activation using cis-element 'decoy' of NF κ 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 : angioscopic 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
Kaku Nakano

江頭健輔
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いけ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医学、動脈硬化・ステント内再狭窄発生機序の視点から 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, プ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、更には晩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¹⁾」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

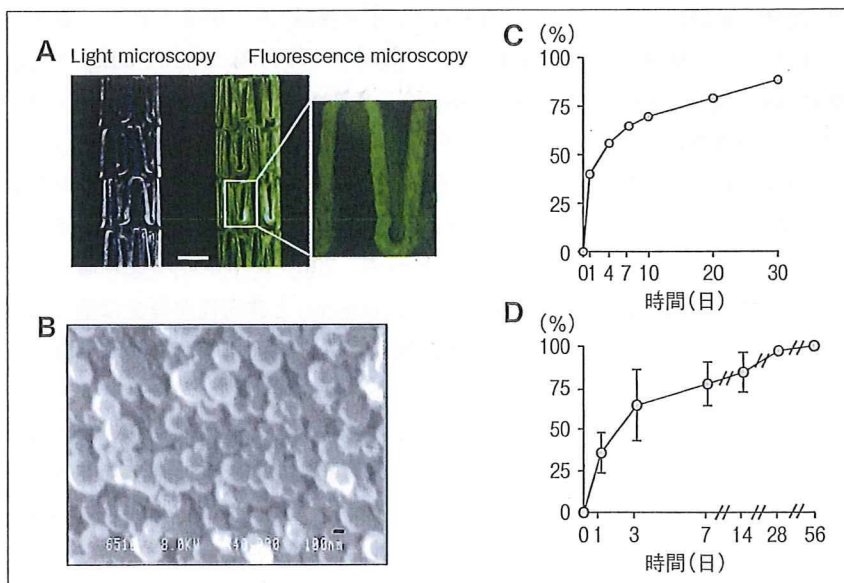


図1. 電着コーティングによる生体吸収性ナノ DDS ステントの創製と DDS 機能

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 μ m)。

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、内膜直下、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²⁾。

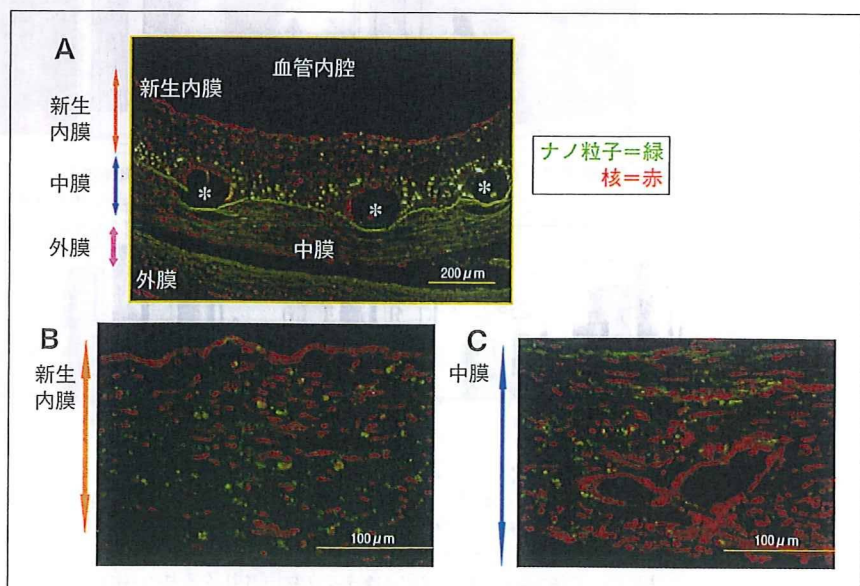
ナノ DDS ステントに搭載する候補となる薬剤としてのスタチン

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癌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 γ 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画期的細胞内 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界だけでなく、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。スケールバーは弱拡大(上段)200 μ m、強拡大(下段)100 μ 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³⁾、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⁴⁾、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⁵⁾、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[®]、BMS およびスタチン封入ナノ粒子溶出ステントをブタ左冠動脈に留置し、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[®] が同程度であったのに対し、Cypher[®] 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

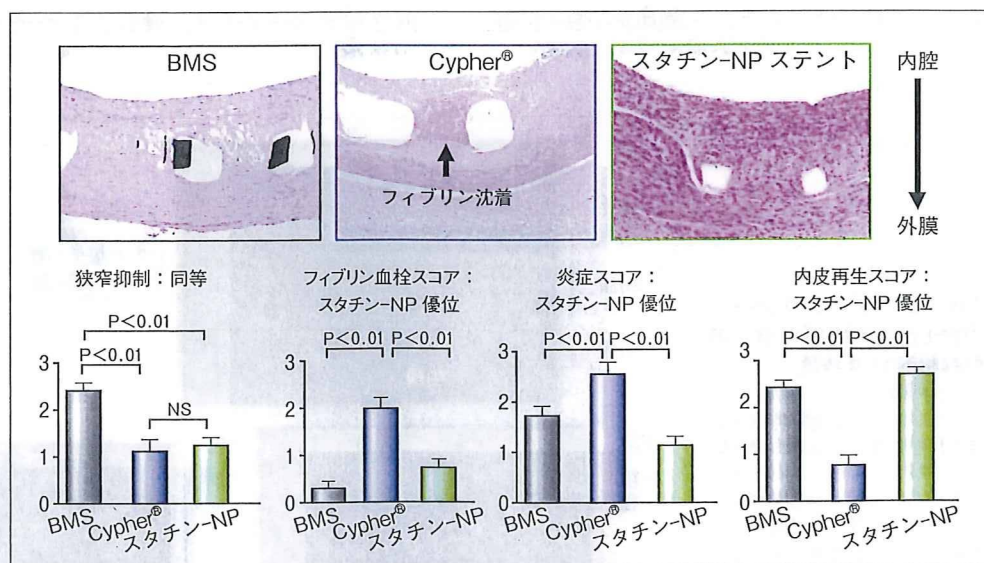


図3. スタチン封入ナノ粒子溶出ステントの有効性と安全性

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[®] 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[®] 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[®] で同程度であった。

での有効性、安全性の評価、薬物の体内動態などのより詳細なデータを集積する必要がある。

生体吸収性難燃性マグネシウムステントプラットフォームの開発

現在、DESのプラットフォームとして用いられているステントは、ステンレス製あるいはコバルトクロム合金といった「永久植込み型」であるため、ステントが永久に異物として体内に残存する。そのため金属アレルギー、MRI撮影時のアーティファクトなど多くの問題を永久に抱えなくてはならない。生体吸収性ステントプラットフォームの開発はBiotronik社が先行している。同社は市販の工業用マグネシウム合金(WE43)を用いてステントを製造し、臨床試験を実施し、その結果がLancetに報告され、再狭窄率47.5%(4ヵ月後)、再治療率45%という結果⁶⁾であり、医療機器として普及するかどうか疑問である。更に本マグネシウム製ステントはイットリウムなど希土類金属が微量ではあるが含まれ、非完全吸収性であり安全性が担保されていない成分を含有し、かつ量産が難しい。我々は製造特許を有する難燃性マグネシウムを用いたステントプラットフォームの開発に取り組んでおり、今後、ナノDDSステントのプラットフォームへの応用の検討を行っている。

おわりに

第一世代DESの有害事象が明らかになり、新規DESには有効性だけでなく、その安全性が十分担保されていなければ臨床への応用は不可能である。FDAから『Guidance for Industry: Coronary Drug-Eluting stents-Nonclinical and Clinical Studies』というDESの開発における詳細かつ厳格な前臨床試験および臨床試験に関するガイドライン(<http://www.fda.gov/cdrh/ode/guidance/6255.html>)が提案され、

またSchwartz RS, Virmani RらからはCirculation: Cardiovasc Intervent誌上に『Drug-eluting stents in preclinical studies: recommended evaluation from a consensus group』が報告された。これらのガイドライン、文献は第一世代のDESの反省点を二度と繰り返さないため高いハードルを設けており、我々が開発しているナノDDSステントを臨床へ橋渡しするためには、クリアしていかななくてはならない課題が多い。国内での開発を進めて行くには産学官連携体制が必須であり、承認機関(独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)との連携が望まれる。

◎文献

- 1) Kawashima Y, Yamamoto H, Takeuchi H, et al: Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods. *Eur J Pharm Biopharm* 45: 41-48, 1998
- 2) Nakano K, Egashira K, Masud S, et al: JACC: Cardiovascular Intervention, 2009 (in press)
- 3) Kitamoto S, Nakano K, Hirouchi Y, et al: Cholesterol-lowering independent regression and stabilization of atherosclerotic lesions by pravastatin and by antimonocyte chemoattractant protein-1 therapy in nonhuman primates. *Arterioscler thromb vasc biol* 24: 1522-1528, 2004
- 4) Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, et al: Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 105: 3017-3024, 2002
- 5) Walter DH, Schachinger V, Elsner M, et al: Effect of statin therapy on restenosis after coronary stent implantation. *Am j cardiol* 85: 962-968, 2000
- 6) Erbel R, Di Mario C, Bartunek J, et al: Temporary scaffolding of coronary arteries with bioabsorbable magnesium stents: a prospective, non-randomised multicentre trial. *Lancet* 369: 1869-1875, 2007

