

Fig. 5. Histopathological analysis of in-stent neointima formation four weeks after stent implantation.

A, Coronary artery cross-sections stained with hematoxylin-eosin from bare metal stent (BMS), FITC-NP-eluting, pitavastatin-NP-eluting, and sirolimus-eluting stent (SES) groups. Bar = 0.5 mm. B, Neointima area (mm²) and % stenosis [$100 \times (\text{area of internal elastic lamia} - \text{neointima area}) / \text{area of internal elastic lamia}$] in bare metal stent ($n = 10$), FITC-NP-eluting stent ($n = 12$), pitavastatin-NP-eluting stent ($n = 12$) stent, and sirolimus-eluting stent ($n = 12$) groups.

in-stent neointima formation; therefore, this NP-eluting stent system may work as an excellent platform for delivering therapeutic agents.

The pleiotropic (non-LDL-related) vasculoprotective effects of statins are mediated through reduced levels of cholesterol biosynthesis intermediates that serve as lipid attachments for posttranslational modifi-

cations (isoprenylation) of proteins, including Rho and Rac⁸). In the present study, pitavastatin was selected as the nanoparticulation compound because this compound elicited (1) the most potent inhibitory effects on human VSMC proliferation (**Table 1**), and (2) the greatest effects on the re-endothelialization response of human endothelial cells and on the inhibition of tis-

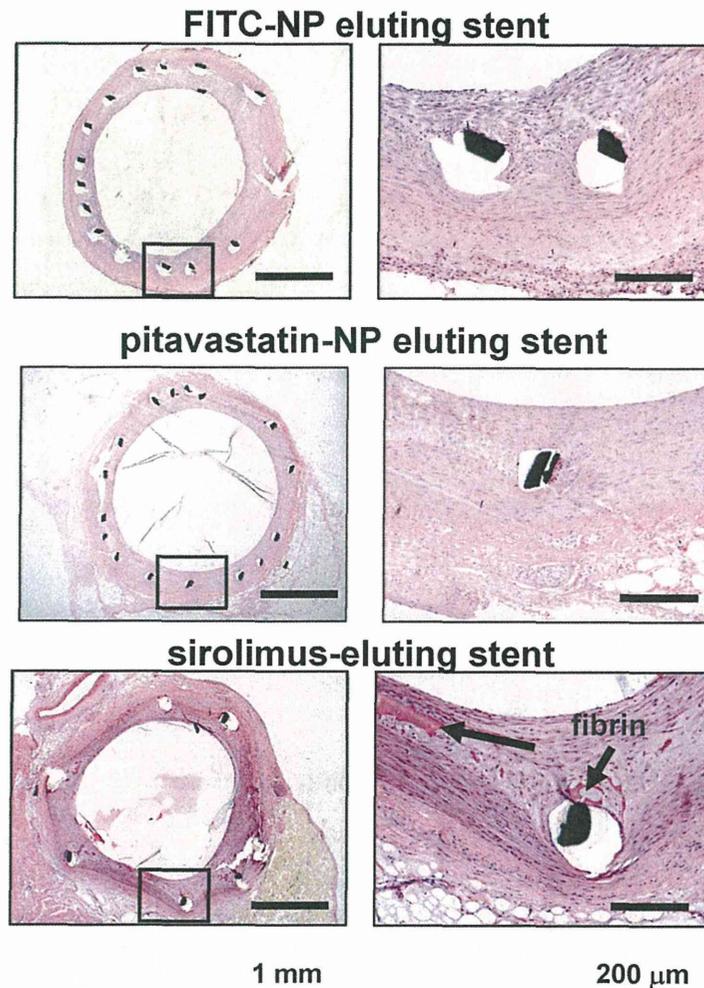


Fig. 6. Representative low- (left panels) and high-magnification (right panels) micrographs of coronary artery cross-sections stained with hematoxylin-eosin after four weeks from FITC-NP-eluting, pitavastatin-NP-eluting, and sirolimus-eluting stent groups.

sue factor expression (Fig. 1 and 2). A possible explanation for the discrepancy in the effect of VSMC proliferation between hydrophilic and lipophilic statins is that, under *in vitro* conditions, hydrophilic statins are hardly incorporated into vascular tissues or vascular smooth muscle cells while lipophilic statins are more widely taken up by vascular tissues and cells via passive diffusion. Pitavastatin normalized sirolimus-induced inhibition of eNOS activity in human endothelial cells (Fig. 3). In addition, pitavastatin-NP was as effective as non-nanoparticulated pitavastatin at an approximately 100-fold lower dose for inhibition of VSMC proliferation (Fig. 4). Collectively, these *in vitro* data suggest that the NP-mediated delivery of

pitavastatin may be more effective than pitavastatin alone in inhibiting VSMC proliferation and tissue factor expression and in promoting re-endothelialization.

We previously reported the central role of monocyte-mediated inflammation in the pathogenesis of in-stent neointima formation²⁸⁻³¹ and the formulation of polymeric gene-eluting stents or nuclear factor kappa-B decoy, inhibiting in-stent stenosis^{28, 32}; however, although advanced polymer technology was used, we were not able to formulate appropriate statin coating on metallic stents (authors' unpublished observation). An important finding of this study is that pitavastatin-NP-eluting stents attenuated in-stent stenosis (neointima formation) as effectively as sirolimus-eluting

Table 3. Re-endothelialization, injury score, inflammation score, and fibrin score 4 weeks after stenting

	BMS (n=10)	FITC-NP stent (n=12)	Pitavastatin -NP stent (n=12)	SES (n=12)	p value
Re-endothelialization score	2.70 ± 0.15	2.83 ± 0.11	2.83 ± 0.11	2.08 ± 0.43	NS
Injury score	1.31 ± 0.03	1.39 ± 0.07	1.36 ± 0.05	1.42 ± 0.11	NS
Inflammation score	1.65 ± 0.14	1.64 ± 0.07	1.08 ± 0.14*	2.38 ± 0.12**	p < 0.0001
Fibrin score	0.30 ± 0.15	0.58 ± 0.19	0.65 ± 0.18	2.00 ± 0.21**	p < 0.0001

Data are the mean ± SEM. *p < 0.05, **p < 0.01 versus control bare metal stent by Kruskal-Wallis test followed with non-parametric Dunn's multiple comparison tests. NS: Not Significant.

The re-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 in 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, non-circumferential inflammatory cell infiltrate surrounding the strut; 2 = localized, moderate to dense cellular aggregate surrounding the strut non-circumferentially; and 3 = circumferential dense inflammatory cell 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).

The intimal fibrin content was graded as 0, no residual fibrin; 1, focal regions of residual fibrin involving any portion of the artery or moderate fibrin deposition adjacent to the strut involving <25% of the circumference of the artery; 2, moderate fibrin involving >25% of the circumference of the artery or heavy deposition involving <25% of the circumference of the artery; or 3, heavy fibrin deposition involving >25% of the circumference of the artery.

Table 4. Effects of intracoronary saline or Pitava-NP on histopathological morphometry and scoring 4 weeks after stenting

	saline (n=5)	Pitavastatin-NP 300 µg (n=6)	Pitavastatin-NP 3000 µg (n=6)	p value
Morphometry at stent sites				
Lumen area	2.88 ± 0.25	2.29 ± 1.01	2.72 ± 0.88	NS
Media area	0.95 ± 0.12	1.25 ± 0.32	0.92 ± 0.13	NS
Neointimal area	1.80 ± 0.14	2.30 ± 0.93	1.92 ± 0.88	NS
Scores at stent sites				
Injury score	1.00 ± 0.0	1.22 ± 0.13	1.04 ± 0.05	NS
Inflammation score	1.33 ± 0.0	1.47 ± 0.46	1.23 ± 0.08	NS
Fibrin score	0.75 ± 0.09	0.74 ± 0.27	0.39 ± 0.16*	p < 0.05
Endothelization score	2.00 ± 0.0	1.80 ± 0.27	1.98 ± 0.03	NS

Data are the mean ± SEM. *p < 0.05 versus control bare metal stent by Kruskal-Wallis test followed with non-parametric Dunn's multiple comparison tests. NS: not significant.

stents in a porcine coronary artery model. It is likely that local mechanisms are involved in the mechanism of the therapeutic effects of pitavastatin-NP eluting stents, because intracoronary administration of pitavastatin-NP at 300 µg (an equivalent dose to that coated on pitavastatin-NP-eluting stent) showed no effects. A prior study reported that oral administration of pitavastatin at 40 mg/body per day for five weeks inhibited in-stent stenosis in a porcine coronary artery model¹². The estimated dose of pitavastatin loaded on our NP-eluting stent was 20 ± 4 µg/stent, which is

much lower than the cumulative systemic dose used in a prior study (40 × 35 days = 1350 mg/body)¹². We measured the local tissue concentrations of pitavastatin with HPLC and found them to be under the limit of detection immediately after the deployment of the pitavastatin-NP-eluting stent; therefore, the local concentration of pitavastatin after deployment of the pitavastatin-NP-eluting stent is unclear, but is less than the limit of detection (2.5 ng/g protein or 1 ng/mL).

Delayed endothelial healing effects characterized

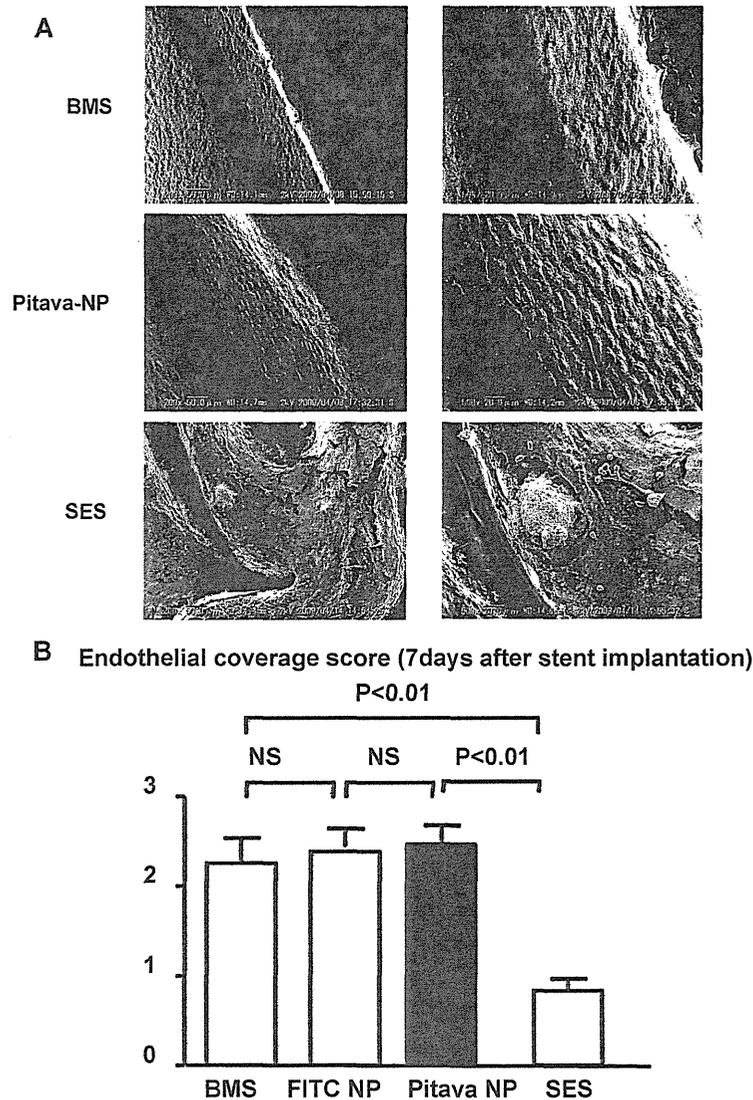


Fig. 7. Endothelial surface coverage analysis by scanning electron microscopy.

A, Representative micrographs of the endothelial surface by scanning electron microscopy one week after stent implantation. B, Endothelial coverage score one week after stent implantation in bare metal stent (BMS), FITC-NP-eluting stent (FITC-NP), pitavastatin-NP-eluting stent (Pitava-NP) stent, and sirolimus-eluting stent (SES) groups ($n = 3$ each).

by impaired re-endothelialization and persistence of fibrin and inflammation are an important histopathological feature in arteries exposed to currently marketed DESs in experimental animals^{33, 34} and in humans⁴⁻⁶. These delayed endothelial healing effects are presumed to result from the effects of drugs coated on DESs (see Introduction). Using human pathological data from autopsy patients in whom death occurred >30 days after drug-eluting stent placement, Finn *et al.*⁶ dem-

onstrated that endothelialization of the stent was the best predictor of late in-stent thrombosis. Heterogeneity of healing is a common finding in cases of late drug-eluting stent thrombosis. In this study, we confirmed the delayed endothelial healing effects of sirolimus-eluting stents in porcine coronary arteries (Fig. 5, 6, and 7) reported by Virmani's group⁵; however, we found that pitavastatin-NP-eluting stents had no such delayed endothelial healing effects in porcine coronary

arteries *in vivo*. The opposing effects of pitavastatin-NP-eluting stents and sirolimus-eluting stents might be explained by our *in vitro* study (Fig. 1 and 2). Collectively, these data on anti-endothelial healing properties suggest that pitavastatin-NP-eluting stents may have an advantage over currently marketed polymeric DES devices. Future studies are needed to prove this point.

A major limitation of this study is that this study was performed in normal pigs without pre-existing atherosclerotic coronary lesions, although this porcine coronary artery model is regarded as an appropriate and standard preclinical study model³⁵. A long-term efficacy study is also needed.

In conclusion, pitavastatin-NP-eluting stents not only attenuated in-stent stenosis as effectively as polymer-coated sirolimus-eluting stents but also elicited endothelial healing effects in a porcine coronary artery model. Delayed endothelial healing is a common feature at atherosclerotic arterial sites deployed with currently marketed DESs, which may lead to an increased risk of late stent thrombosis. Our present technology can be one approach to overcome the adverse effects of current DESs and may provide the optimal anti-healing combination: the inhibition of VSMC proliferation to decrease restenosis and the promotion of re-endothelialization to protect from late stent thrombosis. This NP-eluting stent system may be developed as an innovative platform for the future treatment of atherosclerotic vascular disease.

Acknowledgments

Funding Sources: This study was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (19390216, 19650134) from the Ministry of Education, Science, and Culture, Tokyo, Japan, by Health Science Research Grants (Research on Translational Research and Nanomedicine) from the Ministry of Health Labor and Welfare, Tokyo, Japan, and by a Special Grant from Terumo Life Science Foundation, Tokyo, Japan.

Conflict of Interest

Dr. Egashira holds a patent on the results reported in the present study. The remaining authors report no conflicts.

References

- 1) Laskey WK, Yancy CW, Maisel WH: Thrombosis in coronary drug-eluting stents: Report from the meeting of the circulatory system medical devices advisory panel of the food and drug administration center for devices and radiologic health, december 7-8, 2006. *Circulation*, 2007; 115: 2352-2357
- 2) Serruys PW, Kutryk MJ, Ong AT: Coronary-artery stents. *N Engl J Med*, 2006; 354: 483-495
- 3) Shuchman M: Trading restenosis for thrombosis? New questions about drug-eluting stents. *N Engl J Med*, 2006; 355: 1949-1952
- 4) Luscher TF, Steffel J, Eberli FR, Joner M, Nakazawa G, Tanner FC, Virmani R: Drug-eluting stent and coronary thrombosis: Biological mechanisms and clinical implications. *Circulation*, 2007; 115: 1051-1058
- 5) Finn AV, Nakazawa G, Joner M, Kolodgie FD, Mont EK, Gold HK, Virmani R: Vascular responses to drug eluting stents. Importance of delayed healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007; 27: 1500-1510
- 6) Finn AV, Joner M, Nakazawa G, Kolodgie F, Newell J, John MC, Gold HK, Virmani R: Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: Strut coverage as a marker of endothelialization. *Circulation*, 2007; 115: 2435-2441
- 7) Joner M, Nakazawa G, Finn AV, Quee SC, Coleman L, Acampado E, Wilson PS, Skorija K, Cheng Q, Xu X, Gold HK, Kolodgie FD, Virmani R: Endothelial cell recovery between comparator polymer-based drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol*, 2008; 52: 333-342
- 8) Takemoto M, Liao JK: Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001; 21: 1712-1719
- 9) Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Luscher TF: Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: Role of rho/rho-kinase and akt pathways. *Circulation*, 2002; 105: 1756-1759
- 10) Thyberg J: Re-endothelialization via bone marrow-derived progenitor cells: Still another target of statins in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002; 22: 1509-1511
- 11) Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Bohm M, Dirnagl U, Nickenig G: Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: Effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002; 22: 1567-1572
- 12) Yokoyama T, Miyauchi K, Kurata T, Satoh H, Daida H: Inhibitory efficacy of pitavastatin on the early inflammatory response and neointimal thickening in a porcine coronary after stenting. *Atherosclerosis*, 2004; 174: 253-259
- 13) Indolfi C, Cioppa A, Stabile E, Di Lorenzo E, Esposito G, Pisani A, Leccia A, Cavuto L, Stingone AM, Chieffo A, Capozzolo C, Chiariello M: Effects of hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor simvastatin on smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation in vivo after vascular injury. *J Am Coll Cardiol*, 2000; 35: 214-221
- 14) Scheller B, Schmitt A, Bohm M, Nickenig G: Atorvastatin stent coating does not reduce neointimal proliferation after coronary stenting. *Zeitschrift fur Kardiologie*, 2003; 92: 1025-1028
- 15) Miyauchi K, Kasai T, Yokoyama T, Aihara K, Kurata T, Kajimoto K, Okazaki S, Ishiyama H, Daida H: Effectiveness of statin-eluting stent on early inflammatory response

- and neointimal thickness in a porcine coronary model. *Circ J*, 2008; 72: 832-838
- 16) Serruys PW, Foley DP, Jackson G, Bonnier H, Macaya C, Vrolix M, Branzi A, Shepherd J, Suryapranata H, de Feyter PJ, Melkert R, van Es GA, Pfister PJ: A randomized placebo-controlled trial of fluvastatin for prevention of restenosis after successful coronary balloon angioplasty; final results of the fluvastatin angiographic restenosis (flare) trial. *Eur Heart J*, 1999; 20: 58-69
 - 17) Bertrand ME, McFadden EP, Fruchart JC, Van Belle E, Commeau P, Grollier G, Bassand JP, Machecourt J, Casagnes J, Mossard JM, Vacheron A, Castaigne A, Danchin N, Lablanche JM: Effect of pravastatin on angiographic restenosis after coronary balloon angioplasty. The predict trial investigators. Prevention of restenosis by elisor after transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*, 1997; 30: 863-869
 - 18) Weintraub WS, Boccuzzi SJ, Klein JL, Kosinski AS, King SB, 3rd, Ivanhoe R, Cedarholm JC, Stillabower ME, Talley JD, DeMaio SJ, et al: Lack of effect of lovastatin on restenosis after coronary angioplasty. Lovastatin restenosis trial study group. *N Engl J Med*, 1994; 331: 1331-1337
 - 19) Onaka H, Hirota Y, Kita Y, Tsuji R, Ishii K, Ishimura T, Kawamura K: The effect of pravastatin on prevention of restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Jpn Circ J*, 1994; 58: 100-106
 - 20) Bae JH, Bassenge E, Kim KY, Synn YC, Park KR, Schwemmer M: Effects of low-dose atorvastatin on vascular responses in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2004; 9: 185-192
 - 21) Petronio AS, Amoroso G, Limbruno U, Papini B, De Carlo M, Micheli A, Ciabatti N, Mariani M: Simvastatin does not inhibit intimal hyperplasia and restenosis but promotes plaque regression in normocholesterolemic patients undergoing coronary stenting: A randomized study with intravascular ultrasound. *Am Heart J*, 2005; 149: 520-526
 - 22) Nakano K, Egashira K, Masuda S, Funakoshi K, Zhao G, Kimura S, Matoba T, Sueishi K, Endo Y, Kawashima Y, Hara K, Tsujimoto H, Tominaga R, Sunagawa K: Formulation of nanoparticle-eluting stents by a cationic electro-deposition coating technology efficient nano-drug delivery via bioabsorbable polymeric nanoparticle-eluting stents in porcine coronary arteries. *JACC Cardiovasc Interv*, 2009; 2: 277-283
 - 23) Kimura S, Egashira K, Nakano K, Iwata E, Miyagawa M, Tsujimoto H, Hara K, Kawashima Y, Tominaga R, Sunagawa K: Local delivery of imatinib mesylate (sti571)-incorporated nanoparticle ex vivo suppresses vein graft neointima formation. *Circulation*, 2008; 118: S65-70
 - 24) Masuda S, Nakano K, Funakoshi K, Zhao G, Meng W, Kimura S, Matoba T, Miyagawa M, Iwata E, Sunagawa K, Egashira K: Imatinib mesylate-incorporated nanoparticle-eluting stent attenuates in-stent neointimal formation in porcine coronary arteries. *J Atheroscler Thromb*, 2011; 18: 1043-1053
 - 25) Aoki T, Nishimura H, Nakagawa S, Kojima J, Suzuki H, Tamaki T, Wada Y, Yokoo N, Sato F, Kimata H, Kitahara M, Toyoda K, Sakashita M, Saito Y: Pharmacological profile of a novel synthetic inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase. *Arzneimittel-Forschung*, 1997; 47: 904-909
 - 26) 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
 - 27) Camici GG, Steffel J, Akhmedov A, Schafer N, Baldinger J, Schulz U, Shojaati K, Matter CM, Yang Z, Luscher TF, Tanner FC: Dimethyl sulfoxide inhibits tissue factor expression, thrombus formation, and vascular smooth muscle cell activation: A potential treatment strategy for drug-eluting stents. *Circulation*, 2006; 114: 1512-1521
 - 28) Egashira K, Nakano K, Ohtani K, Funakoshi K, Zhao G, Ihara Y, Koga J, Kimura S, Tominaga R, Sunagawa K: Local delivery of anti-monocyte chemoattractant protein-1 by gene-eluting stents attenuates in-stent stenosis in rabbits and monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007; 27: 2563-2568
 - 29) 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
 - 30) 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
 - 31) Egashira K: Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease: Special reference to monocyte chemoattractant protein-1. *Hypertension*, 2003; 41: 834-841
 - 32) Ohtani K, Egashira K, Nakano K, Zhao G, Funakoshi K, Ihara Y, Kimura S, Tominaga R, Morishita R, Sunagawa K: Stent-based local delivery of nuclear factor-kappab decoy attenuates in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation*, 2006; 114: 2773-2779
 - 33) van der Giessen WJ, Lincoff AM, Schwartz RS, van Beusekom HM, Serruys PW, Holmes DR Jr, Ellis SG, Topol EJ: Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries. *Circulation*, 1996; 94: 1690-1697
 - 34) Lincoff AM, Furst JG, Ellis SG, Tuch RJ, Topol EJ: Sustained local delivery of dexamethasone by a novel intravascular eluting stent to prevent restenosis in the porcine coronary injury model. *J Am Coll Cardiol*, 1997; 29: 808-816
 - 35) Schwartz RS, Edelman ER, Carter A, Chronos N, Rogers C, Robinson KA, Waksman R, Weinberger J, Wilensky RL, Jensen DN, Zuckerman BD, Virmani R: Drug-eluting stents in preclinical studies: Recommended evaluation from a consensus group. *Circulation*, 2002; 106: 1867-1873

4. 新規治療

8) ナノDDSステントを用いた
血管内治療の臨床への応用

中野 覚・江頭健輔

要 旨

現在市販されている薬剤溶出ステントには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）が懸念されている。遅発性血栓症は、炎症反応、フィブリンの沈着、再内皮化の遅延に由来することが示唆されている。われわれはすでに電着コーティング技術を用いたナノDDS機能を有するステントプラットフォームの開発に成功した。本稿ではナノDDS機能を有するステントプラットフォームの概略を述べるとともに、ブタ冠動脈モデルでproof of conceptを獲得したスタチン封入ナノ粒子溶出ステントの成績について概略する。

キーワード 薬剤溶出ステント, 遅発性血栓症, ナノテクノロジー, スタチン, pleiotropic effects, PLGA (ポリ乳酸・グリコール酸共重合体), 高分子球形晶析法, 電着コーティング技術

● はじめに ●

現在、臨床で用いられている第一世代薬剤溶出ステント（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の反面、副作用（遅発性血栓症、冠攣縮など）があることが明らかになった。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ほとん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。したがって、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。

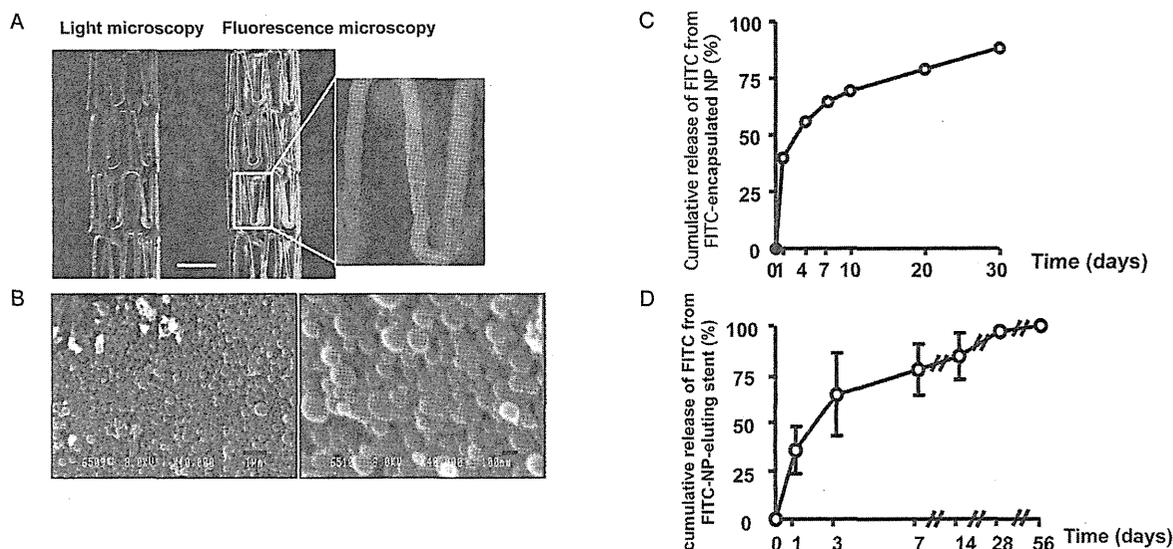
また、第二世代DES、Endeavor（Medtronic社）、XIENCE V（Abbot社）、Nobori（Terumo社）においてもCypherと同様のlimus系薬剤（それぞれzotarolimus、エベロリムス、biolimus A9）が使用されていることから、DES使用後の内皮細胞の再生遅延と遅発性血栓症は継続する問題となる可能性があり、抗血小板薬の長期内服をしなくてよいかどうか、結論は出ていない。

本稿では、われわれの研究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を構成するマテリアル、すなわち薬剤、ポリマーに対して改良・改善し、現在、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する。

I. ステントへの薬剤キャリア：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

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(文献2より改変)



- 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ているのが観察される
- 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。scale bar = 1 μm
- 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. *in vitro*でのステント表面からのナノ粒子の累積放出曲線

(グラビア頁参照)

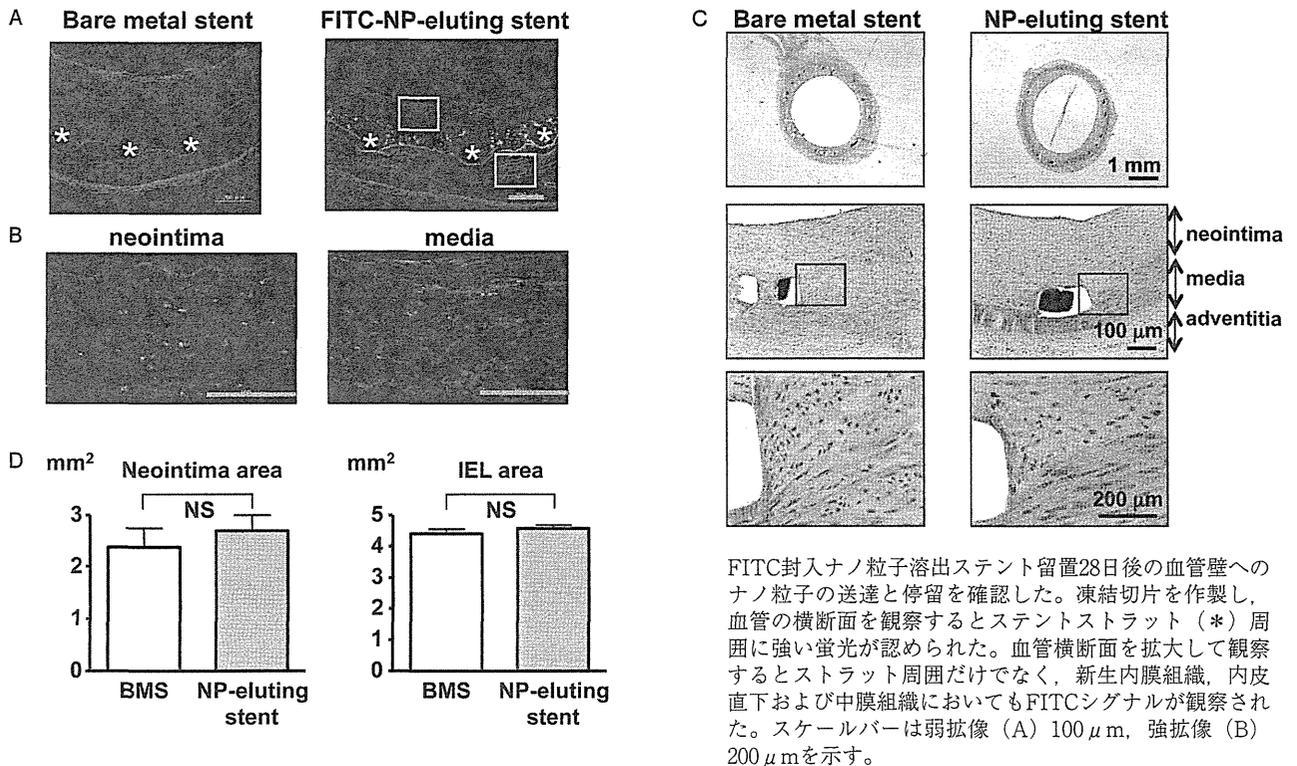
も生体非吸収性であるため血管壁に永久に残存する。ポリマーの残存はフィブリンの沈着、アレルギー反応、炎症の惹起・慢性化さらには晩期ステント内血栓症の発症に寄与すると考えられている。以上のことから、より効果的で安全性の高い生体適合性 (biocompatibility) のあるキャリアマトリクスの開発が必須であり、各企業がしのぎを削っているのが現状である。われわれは単に薬剤を保持するだけのキャリアマトリクス材料としてではなく、drug delivery system (DDS) 機能を兼ね備えたマトリクスの検討を行い、生体吸収性・生体適合性に優れた高分子であるポリ乳酸・グリコール酸共重合体 (co-poly-lactic acid/glycolic acid PLGA) 「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・親和性が高い点、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を変え、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いることや、PLGAマイクロ粒子によ

るリユープリン (酢酸リユープロ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。

II. 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ることができた (図1A, B)。さらに、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放出を擬似体液中で検討したところ、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

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(文献2より改変)



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。血管横断面を拡大して観察するとストラット周囲だけでなく、新生内膜組織、内皮直下および中膜組織においてもFITCシグナルが観察された。スケールバーは弱拡大像(A) 100 μm、強拡大像(B) 200 μmを示す。

(グラビア頁参照)

の後、30日以上にわたり徐放されることが明らかになった(図①C)。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日以上にわたり溶出されることが明らかになった(図①D)。

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、さら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⁾。

Ⅲ. 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

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がん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。そこでわれわれは、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。

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)をも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。スタチンがPI3K

表① 各種スタチンのHMG-CoA還元酵素阻害作用

	HMG-CoA還元酵素阻害活性のIC ₅₀ 値 (nmol/L)	95% Wald信頼区間 (nmol/L)
ピタバスタチン	1.88	1.79~1.98
フルバスタチン	1.89	1.73~2.07
ロスバスタチン	3.09 **	2.73~3.50
アトルバスタチン	3.46 **	3.20~3.74
シンバスタチン	5.12 **	4.79~5.47
プラバスタチン	40.8 **	36.8~45.3

各濃度におけるn=3の平均阻害率を用い、直線回帰式よりIC₅₀値を算出

** P<0.01 対 ピタバスタチン (4変量ロジスティック回帰分析におけるWald検定)

表② 各種スタチンの培養ヒト冠動脈平滑筋細胞増殖抑制作用

	IC ₅₀ 値 (nmol/L)	効力比	95% Wald信頼区間	P値*
ピタバスタチン	193	1	—	—
フルバスタチン	836	0.230	0.119~0.446	<0.001
アトルバスタチン	2512	0.077	0.039~0.150	<0.001
シンバスタチン	3951	0.049	0.023~0.104	<0.001
ロスバスタチン	算出不可	算出不可	算出不可	算出不可
プラバスタチン	算出不可	算出不可	算出不可	算出不可

各濃度におけるn=6の平均阻害率を用い、直線回帰式よりIC₅₀値を算出

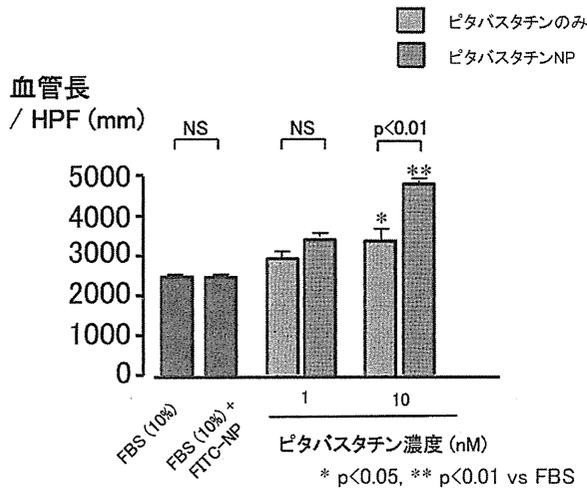
* 対 ピタバスタチン (4変量ロジスティック回帰分析におけるWald検定)

(phosphatidylinositol 3-kinase)-Akt経路を介してeNOSを活性化させること、イン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、われわれ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。

現在市販されている6種類のスタチン、すなわちピタバスタチン、フルバスタチン、ロスバスタチン、アトルバスタチン、シンバスタチンおよびプラバスタチンのHMG-CoA還元酵素阻害作用についてラット肝ミクロソーム画分を用いて検討した。ミクロソームタンパク0.1mgに0.1~1000nMの薬物および0.1mMの[3-¹⁴C]HMG-CoAを添加し、30分後に、生成したメバロン酸をメバロノラクトンに変換後、薄層クロマトグラフィーによりメバロノラクトンを分離し、放射活性を測定した。ピタバスタチン、フルバスタチン、ロスバスタチン、アトルバスタチン、シンバスタチンおよびプラバスタチンはHMG-CoA還元酵素活性を濃度依存的に抑制し、阻害作用のIC₅₀値はそれぞれ1.88, 1.89, 3.09, 3.46, 5.12および40.8nMであった。ピタバスタチンは、シンバスタチン、プラバスタチン、アトルバスタチンおよびロスバスタチンと比較して、強力なHMG-CoA還元酵素阻害作用を示した(P<0.01)(表①)。

次に、培養ヒト冠動脈由来平滑筋細胞を96穴培養プレートに1×10⁴細胞ずつ播種し、10ng/mLのヒトPDGFも

図③ ピタバスタチンナノ粒子製剤の血管内皮細胞増殖促進作用(細胞内DDS効果)

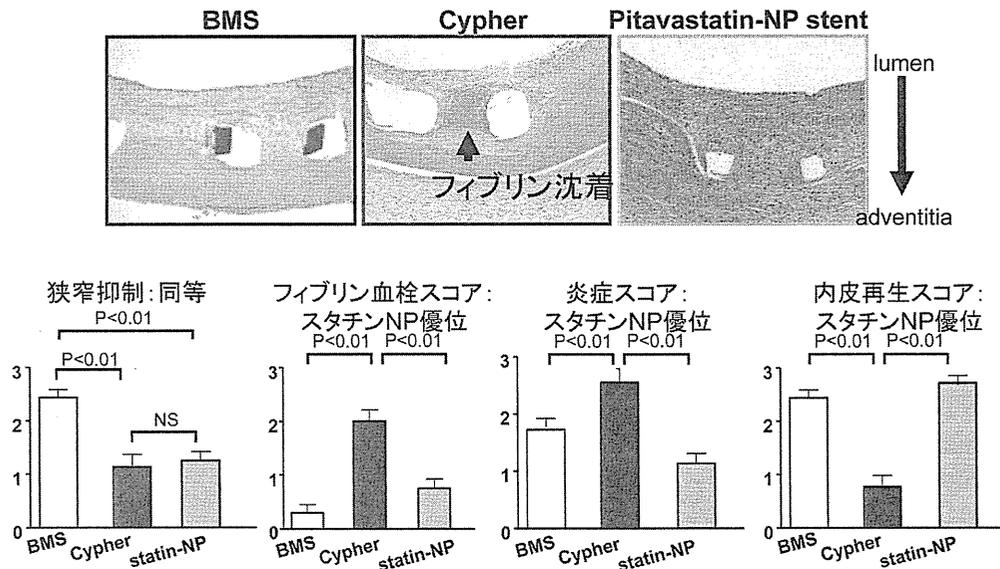


血管内皮細胞 (HUVEC) を培養し、ナノ粒子化の有無によって内皮細胞を用いたチューブフォーメーションアッセイを行った。ナノ粒子化したピタバスタチンはナノ粒子化していないピタバスタチンよりも有意に血管長の伸張が認められた。

しくは10% FBSを添加して、細胞増殖を誘導した。ピタバスタチン、フルバスタチン、ロスバスタチン、アトルバスタチン、シンバスタチンおよびプラバスタチンを添加し、5'-プロモ-2'-デオキシウリジンの取り込みを測定した。ロスバスタチン、プラバスタチンは、培養ヒト冠動脈平滑筋細胞の増殖を抑制しなかった。ピタバスタチンは、フルバスタチン、アトルバスタチンおよびシンバスタチンよりも強力に培養ヒト冠動脈平滑筋細胞の増殖を抑制した ($P < 0.001$) (表②)。

さらに、スタチンは一般に低濃度では血管内皮細胞に対して血管新生促進作用を、高濃度では血管新生抑制作用およびアポトーシス促進作用を発揮することが知られている。ピタバスタチン封入PLGAナノ粒子を用いて、細胞内スタチン濃度が高度に上昇し、血管新生抑制作用およびアポトーシス促進作用が誘発されれば、副作用の懸念が生ずる。そこで、ヒト培養血管内皮細胞の血管新生アッセイ系を用いて、ピタバスタチン封入PLGAナノ粒子の効果をピタバスタチンと比較した。その結果、ピタバスタチン封入PLGAナノ粒子は、ピタバスタチンだけでは血管新生促進作用が生じない10nMという低濃度で再内皮化を誘導することが明らかになった (図③)。

図④ スタチン封入ナノ粒子溶出ステントの有効性と安全性(文献6より改変)



ベアメタルステント (BMS)、スタチン封入ナノ粒子ステント (statin-NP) 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ナノ粒子溶出ステントとCypherで同程度であった。

以上の結果は、ピタバスタチン封入PLGAナノ粒子が再内皮化製剤として優れていることを示す*in vitro*の成績である。ピタバスタチン封入PLGAナノ粒子が細胞内に送達された後、ナノ粒子から再内皮化作用を示す濃度のピタバスタチンが細胞内に徐放（細胞内DDS）されることによって血管新生促進作用が惹起されたものと考えられる。以上の結果から、ナノ粒子溶出ステントの薬剤として、最も効力のあるピタバスタチンを候補化合物として選択した。

IV. 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, ベアメタルステント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、スタチンナノ粒子溶出ステントでは認められなかった(図4)⁶⁾。今後、遠隔期での有効性・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。

● おわりに ●

第一世代DESの有害事象が明らかになり、新規DESには有効性だけではなく、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, VirmaniらからはCirculation Cardiovasc Intervent誌上に『Drug-Eluting Stents in Preclinical Studies-Updated Consensus recommendations for Preclinical Evaluation』⁷⁾が報告された。これらのガイドライン, recommendations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、われわれ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いくには産学官連携体制が必須であり、承認機関（医薬品医療機器総合機構）との連携が望まれる。

参考文献

- 1) Kawashima Y, Yamamoto H, et al : Eur J Pharm Biopharm 45, 41-48, 1998.
- 2) Nakano K, Egashira K, et al : JACC Cardiovasc Interv 2, 277-283, 2009.
- 3) Kitamoto S, Nakano K, et al : Arterioscler Thromb Vasc Biol 24, 1522-1528, 2004.
- 4) Walter DH, Rittig K, et al : Circulation 105, 3017-3024, 2002.
- 5) Walter DH, Schachinger V, et al : Am J Cardiol 85, 962-968, 2000.
- 6) Tsukie N, Nakano K, et al : J Atheroscler Thromb, 2012, in press.
- 7) Schwartz RS, Edelman E, et al : Circ Cardiovasc Interv 1, 143-153, 2008.

参考ホームページ

九州大学大学院医学研究院循環器病先端医療研究開発学
http://www.med.kyushu-u.ac.jp/cardiol/1_sentaniryo/

●中野 覚

1999年 京都工芸繊維大学大学院工芸科学専攻応用生物学修了
(財)食品農医薬品安全性評価センターにおいて各種安全性試験, 薬理薬効試験に従事
2003年 九州大学病院COE学術研究員

2006年 九州大学大学院医学研究院循環器内科学学術研究員(特任助教~特任講師)
2007年 京都工芸繊維大学, 博士(学術)取得
2011年 九州大学大学院医学研究院循環器病先端医療研究開発学准教授

ナノ DDS デバイスを用いた 血管内治療の臨床応用

九州大学大学院医学研究院・循環器病先端医療研究開発学^{*1)} 九州大学大学院医学研究院・循環器内科学^{*2)}中野 覚^{*1)}・由布威雄^{*2)}・江頭健輔^{*1)}

Clinical Application for Intra-coronary NanoDDS Devices

Drug eluting stent on the market at present is feared about serious side effects after use (Acute coronary syndrome caused by delayed thrombosis). It is suggested that delayed thrombosis comes from inflammatory reaction, fibrin deposition, and delayed re-endothelialization. We have already succeeded in the development of stent platform that has the function of Nano DDS using electro-deposition coating technology. In this review, we summarize the results of Pulse-Wave Infusion Catheter and statin nanoparticle eluting stent acquiring Proof of Concept by the porcine coronary-arteries models, with describing the outline of stent platform that has the function of Nano DDS.

現在市販されている薬剤溶出ステントには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）が懸念されている。遅発性血栓症は、炎症反応、フィブリンの沈着、再内皮化の遅延に由来することが示唆されている。我々は既に電着コーティング技術を用いたナノ DDS 機能を有するステントプラットフォームの開発に成功した。本稿ではナノ DDS 機能を有するステントプラットフォームの概略を述べると共に、ブタ冠動脈モデルで Proof of Concept を獲得したスタチンナノ粒子を用いたナノ粒子溶出ステントと複合型医療デバイスの成績について概説した。

Kaku Nakano^{*1)}, Takeo Yufu^{*2)}, Kensuke Egashira^{*1)}

Keywords: Drug Eluting Stent, Delayed in-stent Restenosis, Nanotechnology, Statin, Pleiotropic Effects, Biocompatible Polymer, Poly (lactic-co-glycolic acid), Electrodeposition Coating Technology

はじめに

現在、臨床で用いられている第一世代薬剤溶出ステント (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の反面、安全に関わる副作用（遅発性血栓症）があることが明らかになった^{1,2)}。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ん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、第二世代 DES、Endeavor (Medtronic), XIENCE V (Abbot), Nobori (Terumo) においても Cypher と同様の Limus 系薬剤（それぞれ zotarolimus, everolimus, 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する問題となる可能性があり、抗血小板薬の長期内服をしなくてよいかどうか、結論は出ていない。

本稿では、我々の研究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 を構成するマテリア

^{*1)} Department of Cardiovascular Research, Development and Translational Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

^{*2)} Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

ル、すなわち薬剤、ポリマーに対して改良・改善し、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 ステントならびにナノ粒子製剤と脈派衝撃投与 DDS カテーテルの融合による複合治療デバイスの臨床応用に向けた取り組みを紹介する。

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、慢性化さら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材料ではなく、Drug Delivery System (DDS) 機能を兼ね備えたマトリックスを開発した。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 (Poly (lactic-co-glycolic acid ; PLGA) を「高分子球形晶析法³⁾」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、親和性が高い点、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を変え、それに伴い内包した薬剤等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などの生体親和性材料として 30 年以上臨床で使用されていることや、PLGA マイクロ粒子によるリュープリン (酢酸リュ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

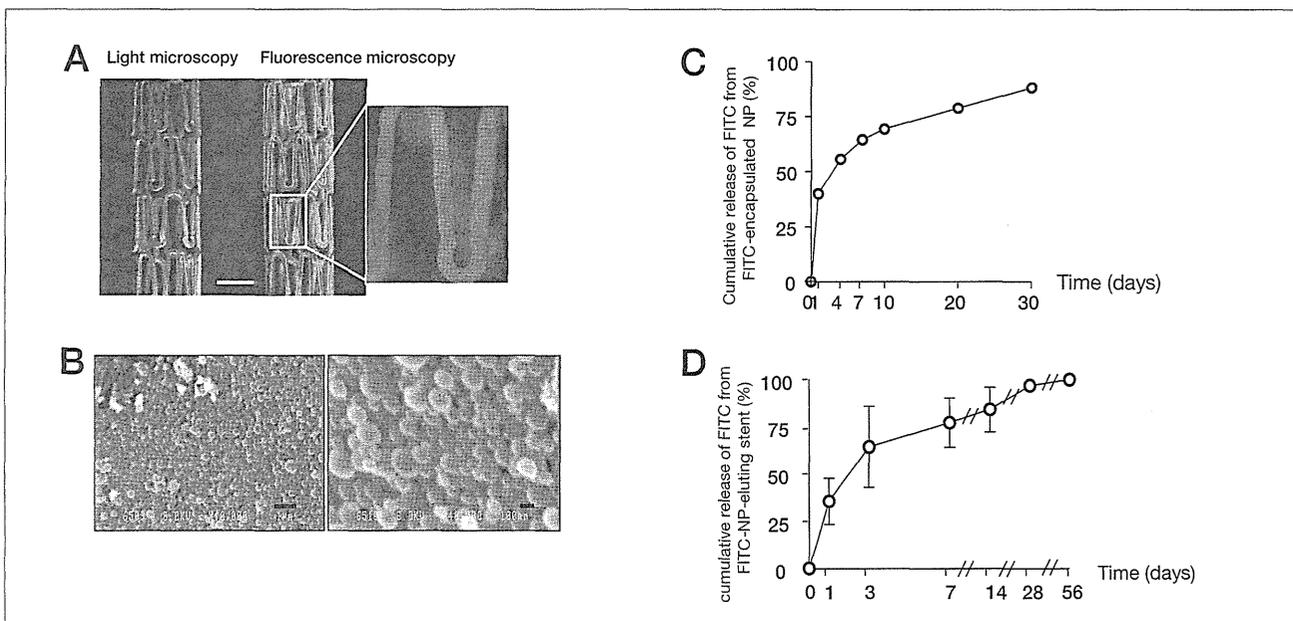


図1 電着コーティングによる生体吸収性ナノ DDS ステントの創製と DDS 機能

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。

B: 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ているのが観察される。ナノ粒子がその形態を保ちコーティングされていた。scale bar = 1 μ m。

C,D: *In vitro* でのナノ粒子からの FITC の累積放出曲線とステント表面からのナノ粒子の累積放出曲線。

JACC: Cardiovascular Intervention 2009 より改変して引用。

コーティング技術を開発し、ステント表面に 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ることに成功した(図 1)。さらに、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 放出を擬似体液中での検討し、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 日以上にわた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、同様に初期バーストが生ずるが、その

後、56 日以上にわたり溶出されることが明らかになった(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、さら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⁴⁾。

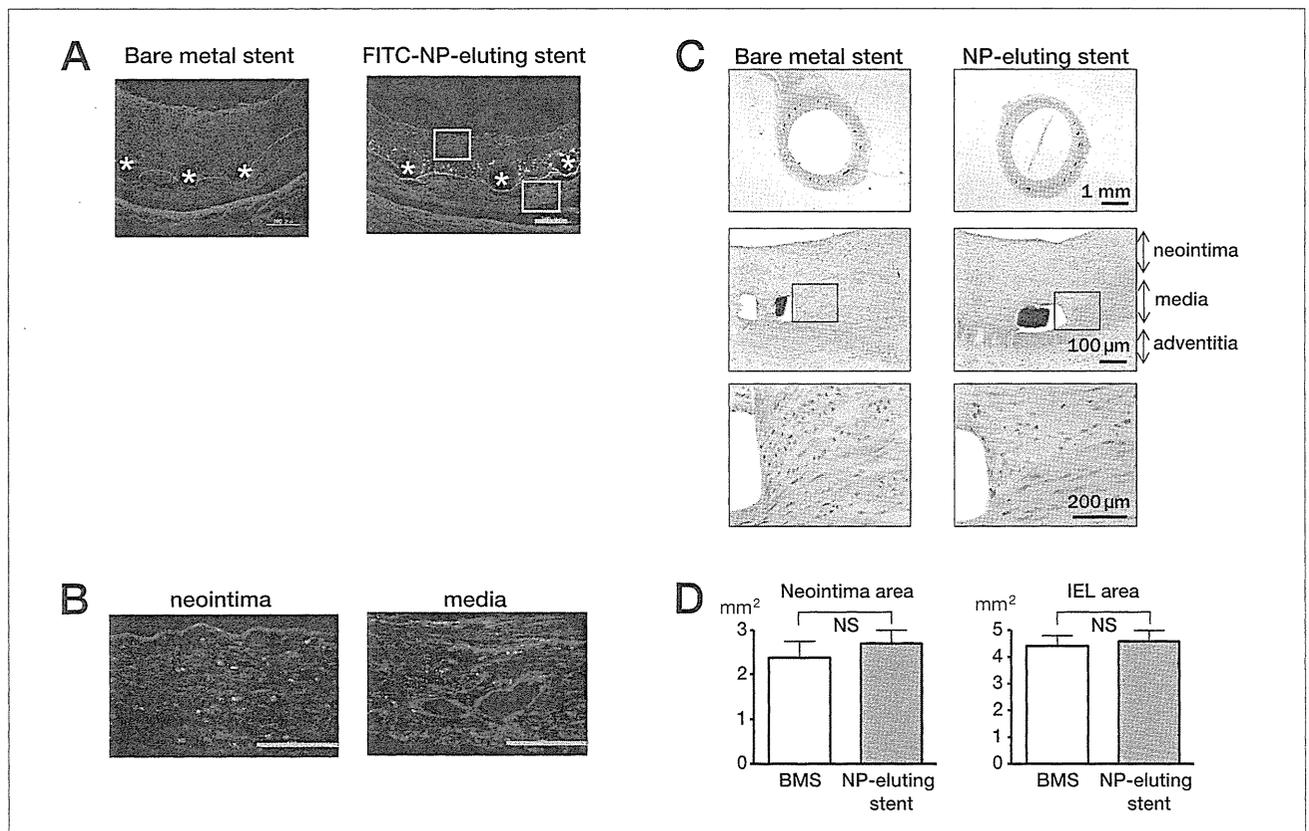


図2 ナノ粒子コーティングステントの優れた細胞内導入率と画期的細胞内 DDS 機能

- A: 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。
- B: 血管横断面を拡大して観察するとストラット周囲だけでなく、新生内膜組織、内皮直下および中膜組織においても FITC シグナルが観察された。スケールバーは弱拡像(上段)100 μ m、強拡像(下段)200 μ m を示す。
- C: ベアメタルステントあるいは FITC 封入ナノ粒子溶出ステント留置 28 日後。病理組織像。上段より弱拡大、中拡、強拡大像。
- D: 新生内膜面積、IEL 面積とも、二群間で差は認められなかった。

JACC: Cardiovascular Intervention 2009 より改変して引用。

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

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がん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。

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⁵⁾、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⁶⁾、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。スタチンが PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) -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 結合蛋白質の活性を抑制し、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の再狭窄は抑制傾向となることされることが知られているが⁷⁾、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。

現在市販されている 6 種類のスタチン、すなわち、ピタバスタチン、フルバスタチン、ロスバスタチン、

アトルバスタチン、シンバスタチンおよびプラバスタチンの HMG-CoA 還元酵素阻害作用についてラット肝ミクロソーム画分を用いて検討した。ミクロソームタンパク 0.1mg に 0.1 ~ 1000nM の薬物および 0.1mM の [3-¹⁴C]HMG-CoA を添加し、30 分後に、生成したメバロン酸をメバロノラクトンに変換後、薄層クロマトグラフィーによりメバロノラクトンを分離し、放射活性を測定した。

ピタバスタチン、フルバスタチン、ロスバスタチン、アトルバスタチン、シンバスタチンおよびプラバスタチンは HMG-CoA 還元酵素活性を濃度依存的に抑制し、阻害作用の IC₅₀ 値はそれぞれ 1.88, 1.89, 3.09, 3.46, 5.12 および 40.8nM であった。ピタバスタチンは、シンバスタチン、プラバスタチン、アトルバスタチンおよびロスバスタチンと比較して、強力な HMG-CoA 還元酵素阻害作用を示した⁸⁾ (P < 0.01) (表 1)。

	HMG-CoA 還元酵素阻害活性の IC ₅₀ 値 (nmol/L)	95% Wald 信頼区間 (nmol/L)
ピタバスタチン	1.88	1.79 - 1.98
フルバスタチン	1.89	1.73 - 2.07
ロスバスタチン	3.09 **	2.73 - 3.50
アトルバスタチン	3.46 **	3.20 - 3.74
シンバスタチン	5.12 **	4.79 - 5.47
プラバスタチン	40.8 **	36.8 - 45.3

**P<0.01 対ピタバスタチン(4 変量ロジスティック回帰分析における Wald 検定)

表 1 各種スタチンの HMG-CoA 還元酵素阻害作用 (各濃度における n=3 の平均阻害率を用い、直線回帰式より IC₅₀ 値を算出)

次に、培養ヒト冠動脈由来平滑筋細胞を 96 穴培養プレートに 1 × 10⁴ 細胞ずつ播種し、10ng/mL のヒト PDGF もしくは 10% FBS を添加して、細胞増殖を誘導した。ピタバスタチン、フルバスタチン、ロスバスタチン、アトルバスタチン、シンバスタチンおよびプラバスタチンを添加し、5'-ブromo-2'-デオキシウリジンの取り込みを測定した。ロスバスタチン、プラバスタチンは、培養ヒト冠動脈平滑筋細胞の増殖を抑制しなかった。ピタバスタチンは、フルバスタチン、アトルバスタチンおよびシンバスタチンよりも強力に培養ヒト冠動脈平滑筋細胞の増殖を抑制した(P < 0.001)⁸⁾ (表 2)。

	IC ₅₀ 値 (nmol/L)	効力比	95% Wald 信頼区間	P 値 ¹⁾
ピタバスタチン	193	1	-	-
フルバスタチン	836	0.230	0.119- 0.446	< 0.001
アトルバスタチン	2512	0.077	0.039- 0.150	< 0.001
シンバスタチン	3951	0.049	0.023- 0.104	< 0.001
ロスバスタチン	算出不可	算出不可	算出不可	算出不可
プラバスタチン	算出不可	算出不可	算出不可	算出不可

¹⁾ 対ピタバスタチン(4変量ロジスティック回帰分析におけるWald検定)

表2 各種スタチンの培養ヒト冠動脈平滑筋細胞増殖抑制作用
(各濃度におけるn=6の平均阻害率を用い、直線回帰式よりIC₅₀値を算出)

さらに、スタチンは一般に低濃度では血管内皮細胞に対して血管新生促進作用を、高濃度では血管新生抑制作用およびアポトーシス促進作用を発揮することが知られている。ピタバスタチン封入PLGAナノ粒子を用いて細胞内スタチン濃度が高度に上昇し、血管新生抑制作用およびアポトーシス促進作用が誘発されれば副作用の懸念が生ずる。そこで、ヒト培養血管内皮細胞の血管新生アッセイ系を用いて、ピタバスタチン封入PLGAナノ粒子の効果をピタバスタチンと比較した。その結果、ピタバスタチン封入PLGAナノ粒子は、ピタバスタチンだけでは血管新生促進作用が生じない10nMという低濃

度で再内皮化を誘導することが明らかになった⁸⁾(図3)。

以上の結果は、ピタバスタチン封入PLGAナノ粒子が再内皮化製剤として優れていることを示す*in vitro*の成績である。ピタバスタチン封入PLGAナノ粒子が細胞内に送達された後、ナノ粒子から再内皮化作用を示す濃度のピタバスタチンが細胞内に徐放(細胞内DDS)されることによって血管新生促進作用が惹起されたものと考えられる。

以上の結果から、ナノ粒子溶出ステントの薬剤として、最も効力のあるピタバスタチンを候補化合物として選択した。

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、ベアメタルステント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

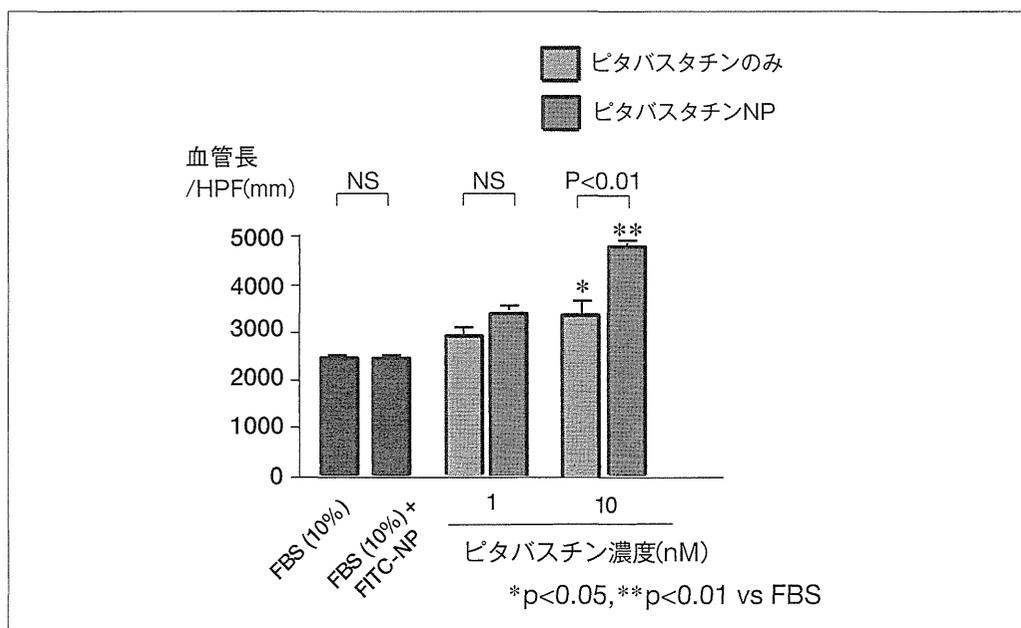


図3 ピタバスタチンナノ粒子製剤の血管内皮細胞増殖促進作用(細胞内DDS効果)

血管内皮細胞(HUVEC)を培養し、ナノ粒子化の有無によって内皮細胞を用いたチューブフォーメーションアッセイを行った。ナノ粒子化したピタバスタチンはナノ粒子化していないピタバスタチンよりも有意に血管長の伸張が認められた。

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重大な副作用が、スタチンナノ粒子溶出ステントでは認められなかった⁸⁾(図4)。今後、遠隔期での有効性、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。

一方、動脈硬化性狭窄にはDESの治療適応とならない、より重症病変(細径、びまん性、分枝部 etc)も多い。このような重症病変の治療は、DESを含む現行のカテーテル治療の改良では困難である。この問題の解決のためには、我々はDESとは

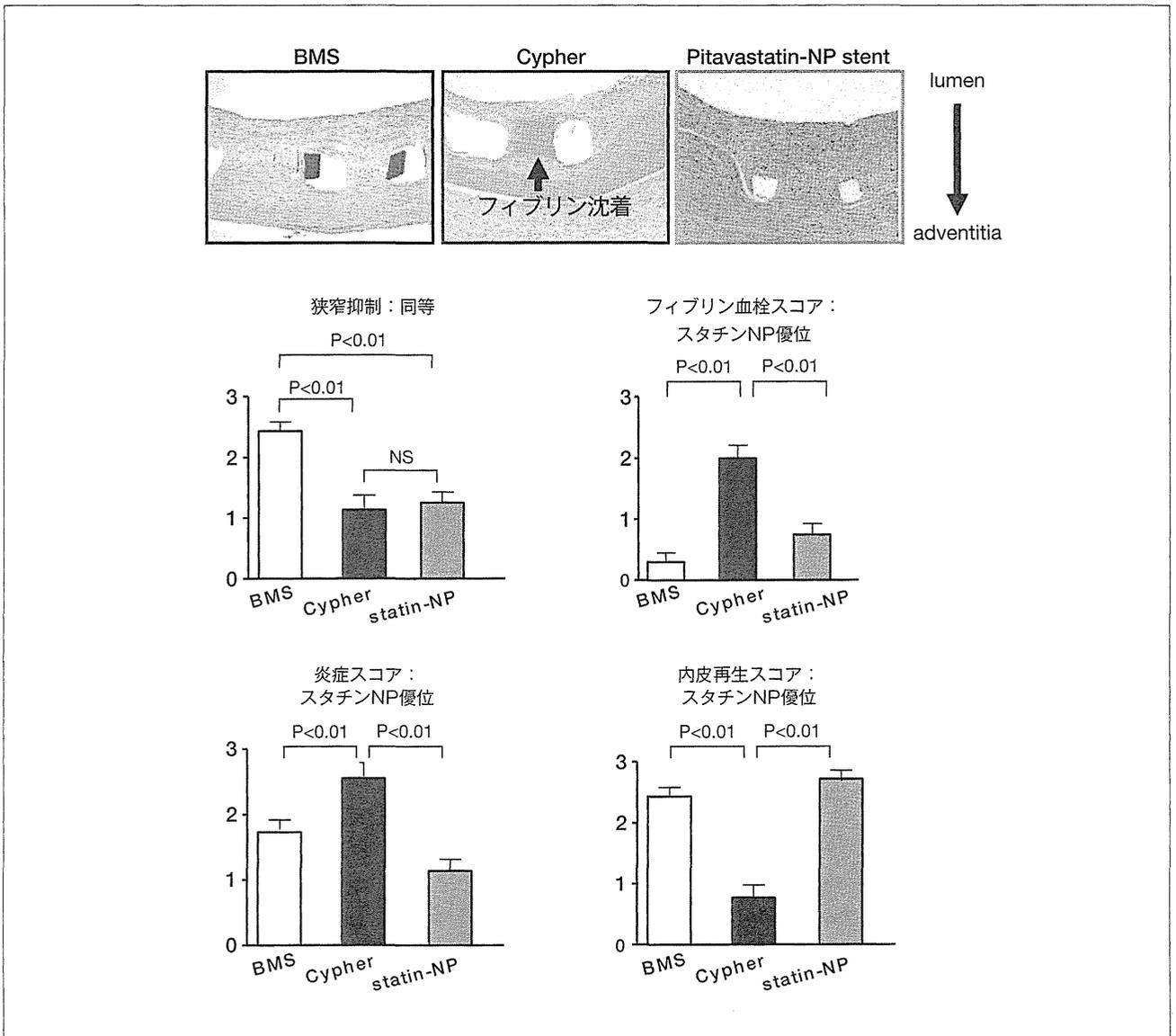


図4 スタチン封入ナノ粒子溶出ステントの有効性と安全性

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ナノ粒子溶出ステントとCypherで同程度であった。JAT 2012 in press より改変して引用。

異なるコンセプトのドラッグデリバリーシステム (DDS) を基盤とした動脈硬化性狭窄に対する血管内医療の研究開発が必要と考えた。そこで、我々は、カテーテルによる薬剤送達デバイスとして、脈波投

与デバイスと閉塞バルーンを組み合わせた、「脈派衝撃投与 DDS カテーテル」 (Pulse Wave Infusion Catheter) (図 5) を開発した。さらに、ブタ冠動脈バルーン傷害モデルを用いて上述のピタバスタ

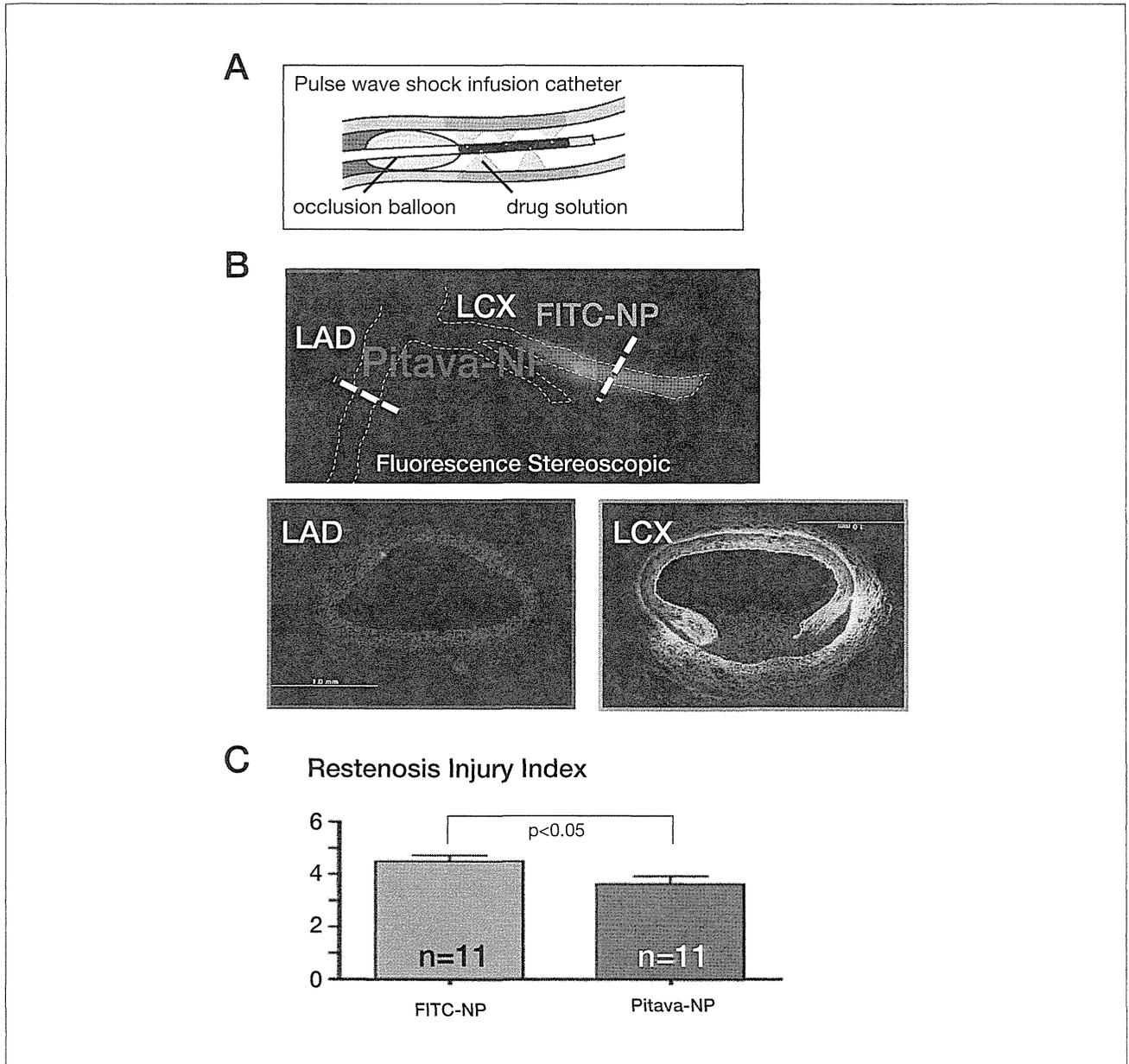


図 5 脈派衝撃投与 DDS カテーテルを用いた血管内医療

A: 脈派衝撃投与 DDS カテーテルの模式図。冠動脈遠位部を occlusion balloon を用いて血流を遮断し、pulse の物理的作用により血管壁にナノ粒子を送達することが可能である。

B: LCX (左回旋枝)には FITC-NP(FITC 封入 PLGA ナノ粒子)を、LAD (左前下降枝)にピタバスタチン封入 PLGA ナノ粒子を投与し、4 週間後に評価を行った。LCX には FITC シグナルが強く認められた。

C: 4 週間後に Restenosis Injury Index を評価したところピタバスタチン封入 PLGA ナノ粒子群(Pitava-NP) で有意に抑制効果が認められた。

チン封入ナノ粒子 (Pitava-NP) による DDS と上記 DDS カテーテルを融合させた革新的複合型治療デバイスを考案した。ブタ冠動脈にバルーンカテーテルにより過拡張傷害を加え (balloon to artery ratio = 1.2)、同部位に FITC を 1.3mg あるいはピタバスタチンを 4.0mg 含むナノ粒子を脈派衝撃投与 DDS カテーテルを用いて投与した。バルーン傷害 4 週間後の評価では、FITC の蛍光シグナルを FITC-NP 投与血管、とりわけ、VSMCs を多く含む中膜内に認めた。さらに、Pitava-NP 治療群では FITC-NP 群と比べ、有意に新生内膜形成が抑制された (modified restenosis injury index: 3.64 ± 0.27 vs 4.49 ± 0.23 , $p < 0.05$)。

以上の結果から、ナノ DDS とカテーテル DDS を組み合わせた融合薬剤送達システムによるピタバスタチンの血管内送達により、ブタ冠動脈バルーン傷害後の新生内膜形成が抑制されることを明らかにした。この新たな薬剤送達システムにより、薬剤の副作用を低減させることが可能となり、薬剤溶出性ステントを使用しない、再狭窄抑制のための新たな血管内ナノ医療として期待できる。

文献

- 1) Pfisterer M. Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stent: an observation study of drug-eluting versus bare metal stents. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48:2584-2591.
- 2) 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(23):2784-2814.
- 3) Kawashima Y, Yamamoto H, Takeuchi H, Hino T, Niwa T. Properties of a peptide containing dl-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods. *Eur J Pharm Biopharm*. 1998;45:41-48.
- 4) Nakano K, Egashira K, Masuda S, Funakoshi K, Zhao G, Kimura S, Matoba T, Sueishi K, Endo Y, Kawashima Y, Hara K, Tsujimoto H, Tominaga R, Sunagawa K. Formulation of nanoparticle-eluting stents by a cationic electrodeposition coating technology: Efficient nano-drug delivery via bioabsorbable polymeric nanoparticle-eluting stents in porcine coronary arteries. *JACC Cardiovasc Interv*. 2009;2:277-283.
- 5) Kitamoto S, Nakano K, Hirouchi Y, Kohjimoto Y, Kitajima S, Usui M, Inoue S, Egashira K. Cholesterol-lowering independent regression and stabilization of atherosclerotic

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、Drs. Schwartz RS, Virmani R からは *Circulation: Cardiovasc Intervent* 誌上に『Drug-Eluting Stents in Preclinical Studies-Updated Consensus Recommendations for Preclinical Evaluation』⁹⁾ が報告された。これらのガイドライン、Recommendations は第一世代の DES の反省点を繰り返さないため、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ゆくには産学官連携体制が必須であり、さらに、承認機関 (医薬品医療機器総合機構) との早期からの薬事戦略相談が必要である。

lesions by pravastatin and by antimonocyte chemoattractant protein-1 therapy in nonhuman primates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1522-1528

- 6) Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. Statin therapy accelerates reendothelialization: A novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2002;105:3017-3024.
- 7) Walter DH, Schächinger V, Elsner M, Mach S, Auch-Schwelk W, Zeiher AM. Effect of statin therapy on restenosis after coronary stent implantation. *The American journal of cardiology*. 2000;85:962-968.
- 8) Tsukie N, Nakano K, Matoba T, Masuda S, Iwata E, Miyagawa M, Zhao G, Meng W, Kishimoto J, Sunagawa K, Egashira K. Pitavastatin-incorporated nanoparticle-eluting stents attenuate in-stent stenosis without delayed endothelial healing effects in a porcine coronary artery model. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2012 in press.
- 9) Schwartz RS, Edelman E, Virmani R, Carter A, Granada JF, Kaluza GL, Chronos NA, Robinson KA, Waksman R, Weinberger J, Wilson GJ, Wilensky RL. Drug-eluting stents in preclinical studies: updated consensus recommendations for preclinical evaluation. *Circ Cardiovasc Interv*. 2008 Oct;1(2):143-53.