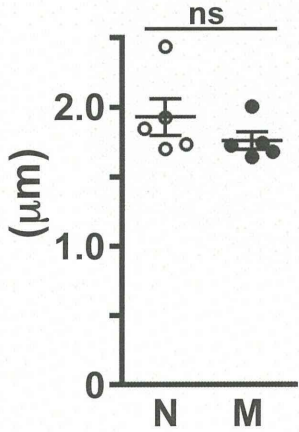
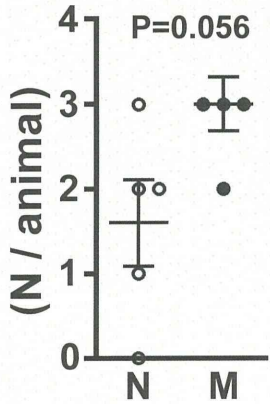
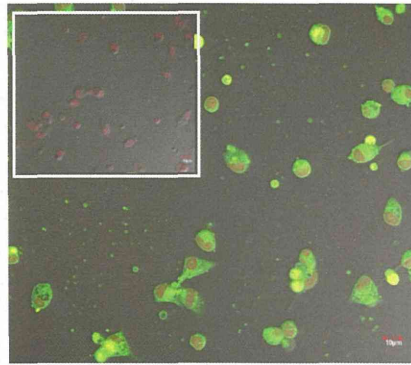


**Disrupted/buried
Fibrous Caps**

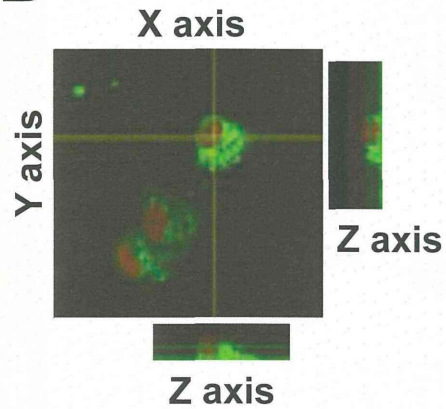
**Fibrous Cap
Thickness**



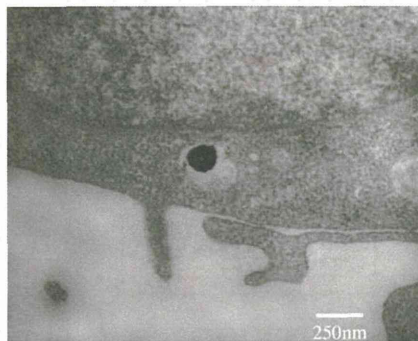
A



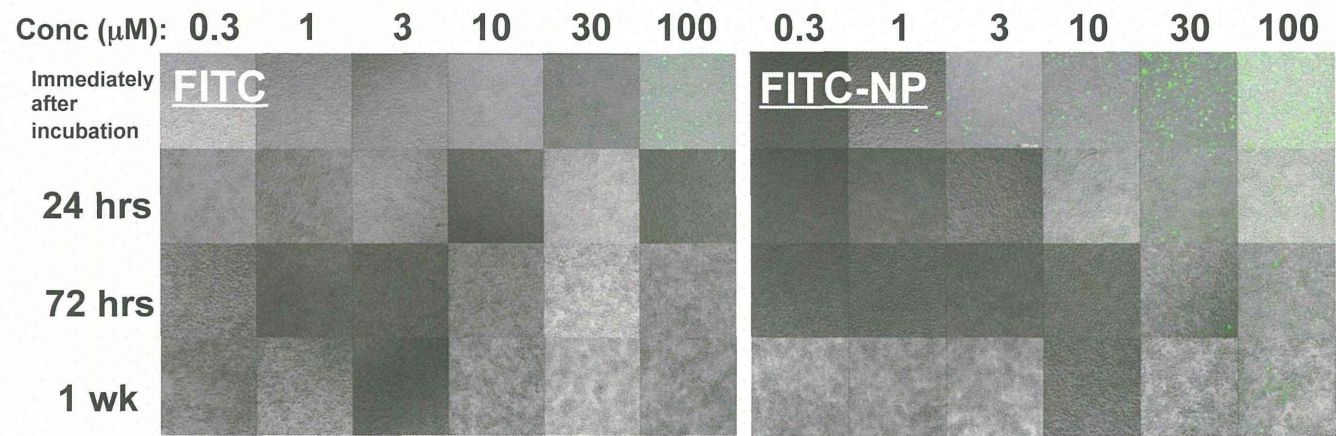
B



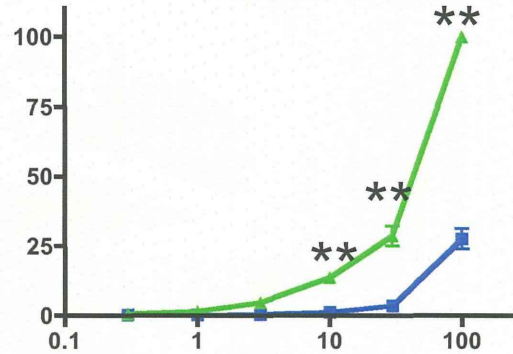
C



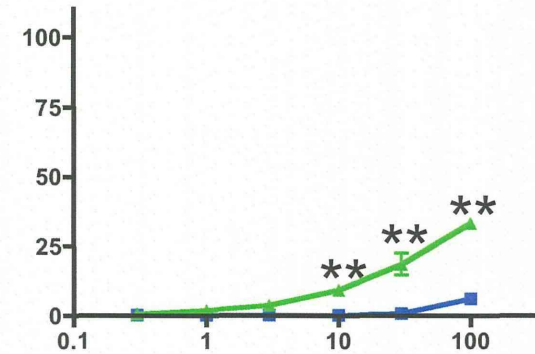
D



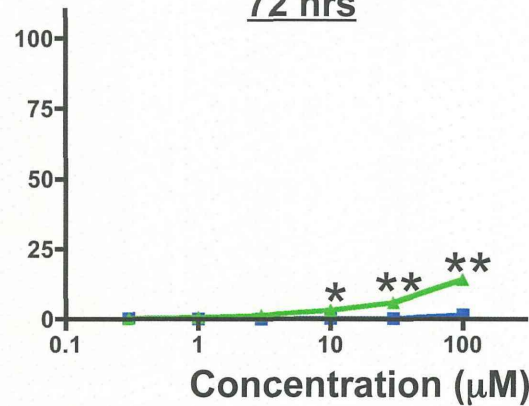
Immediately after incubation



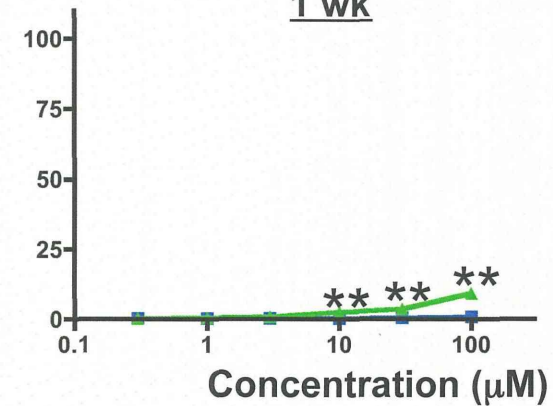
24 hrs

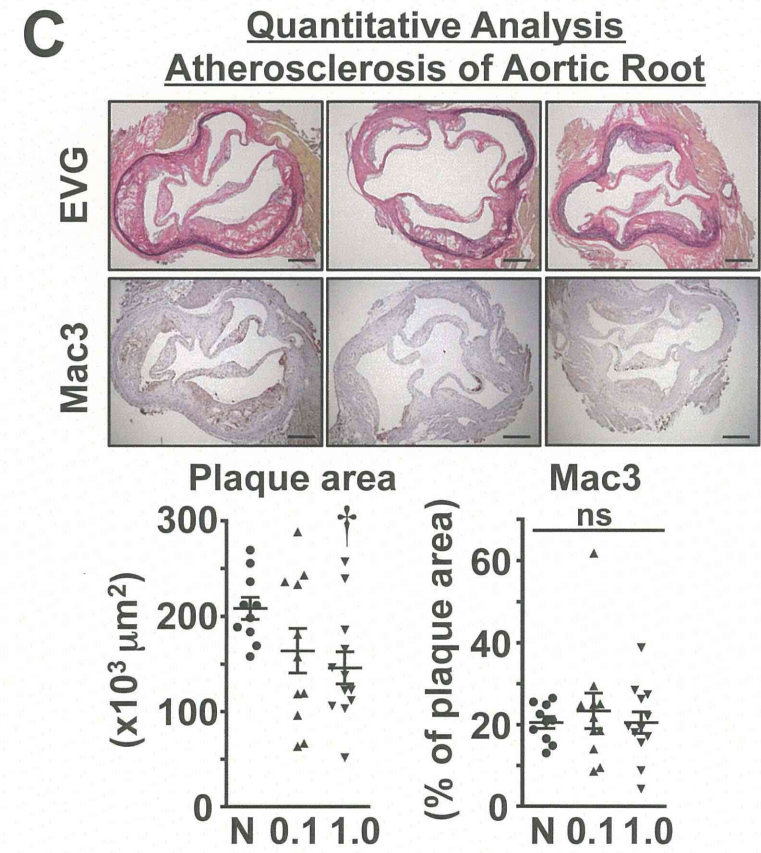
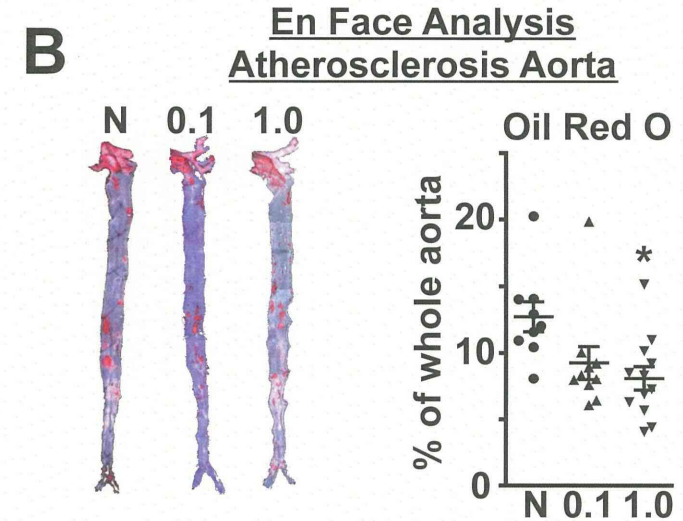
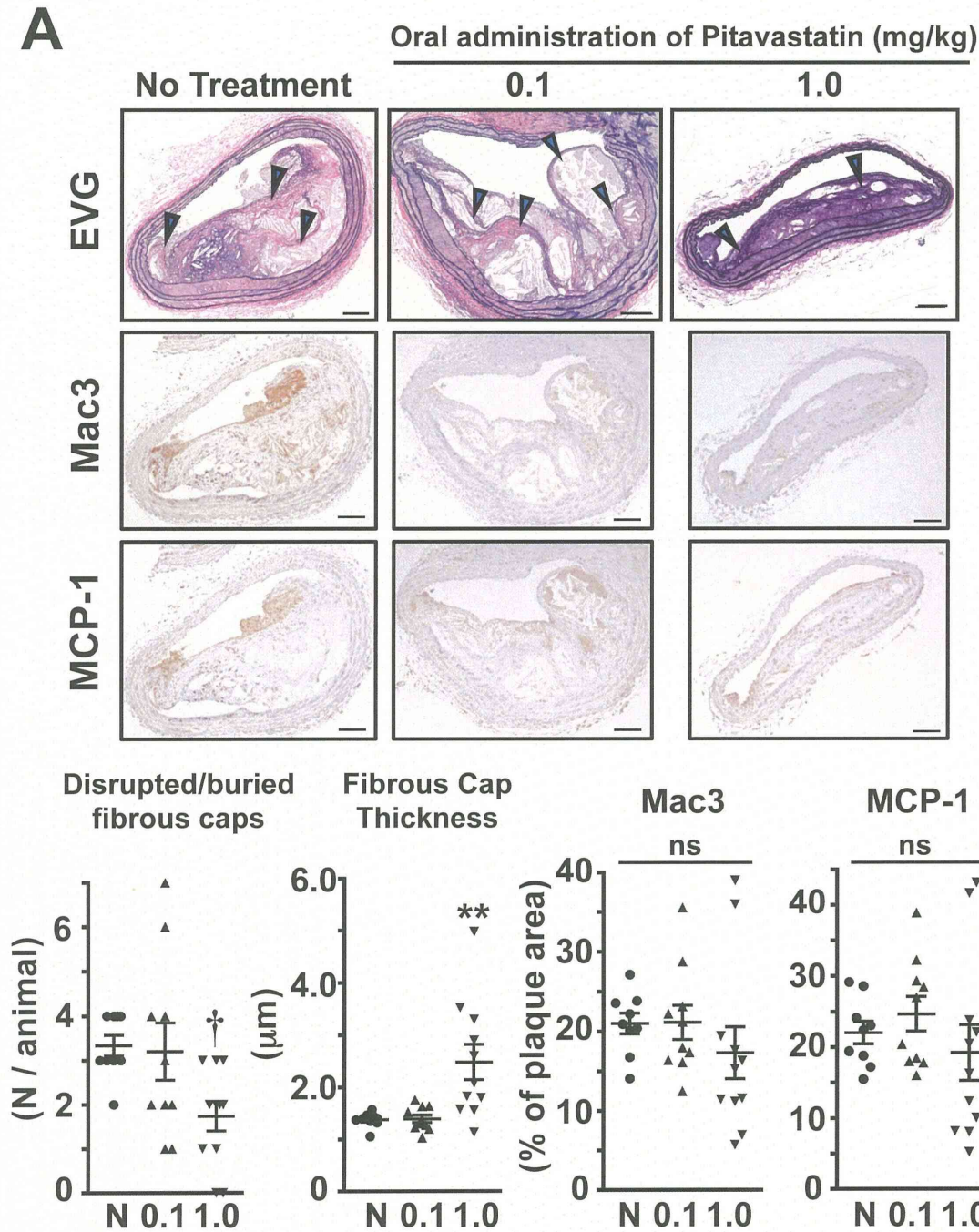


72 hrs



1 wk





「血管内皮細胞選択的ナノDDS技術」を活用した 低侵襲ナノ医療の開発

The development of vascular endothelial cell selective nanotechnology based drug delivery system for less invasive nanotherapy



中野 覚^{1)*1} 江頭 健輔^{2)*2}

Kaku Nakano Kensuke Egashira

- 1) 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
Associate Professor, Department of Cardiovascular Research, Development, and Translational Research, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University
- 2) 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 教授
Professor, Department of Cardiovascular Research, Development, and Translational Research, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

1. 開発目標

試験物はピタバスタチン封入PLGAナノ粒子製剤，対象疾患は重症末梢動脈疾患（閉塞性動脈硬化症等）です（Table 1）。最終目標は本製剤を医薬品として市販化，医療として定着させることです（Table 2）。出口は医師主導治験によるPOC（proof of concept）取得です。出口に至る現時点での主なハードルはGLP基準の安全性試験，安定性試験の実施およびGMPでの製造です。現在，

本製剤の安全性試験，薬物動態試験および筋注製剤の製剤設計と安定性試験を実施中です。GMP製造のためのスケールアップには既に成功し，GMP施設への技術移管も完了し，来年度（2011年度）は本格的に治験薬GMPの製造を開始します。

2. 開発スケジュール・知財確保状況

本年度（2010年度）末までに安定性試験および安全性試験の最終報告書が上がってくる予定です（Fig. 1）。治験薬の製造については昨年度（2009

Table 1 「血管内皮細胞選択的ナノDDS技術」を活用した，重症虚血性疾患に対する革新的低侵襲ナノ医療を実現するための探索的橋渡し研究ならびに臨床試験
— 平成22年度成果報告会 —

プロジェクト責任者： 江頭 健輔
（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）
（NEDO橋渡し研究プロジェクトリーダー，スーパー特区分担プロジェクトリーダー）
プロジェクトマネージャー： 中野 覚
連携企業： 興和株式会社

試験物名称：ピタバスタチン封入PLGAナノ粒子製剤
対象疾患：重症末梢動脈疾患（閉塞性動脈硬化症等）

*1 写真と筆頭著者は，発表者。

*2 プロジェクト責任者。

Table 2 開発目標

①開発の最終目標	ピタバスタチン封入PLGAナノ粒子製剤を医薬品として市販化 医療として定着
②当該プロジェクトの「出口」	医師主導治験によるPOC取得
③「出口」へ至る主なハードル	GLP基準の安全性試験と安定性試験の実施およびGMP製造
	1. ピタバスタチン封入PEGAナノ粒子製剤 (以下本ナノ製剤) のGLP基準安全性試験
	2. 本ナノ製剤の筋注製剤の製剤設計と安定性試験
	3. 本ナノ製剤の治験薬GMP製造
④「出口」へ至る現時点での到達点と解決策	
	1. 本製剤の安全性試験, 薬物動態試験, および筋注製剤の製剤設計と安定性試験を実施中. GMP製造施設から治験施設への輸送を鑑み, 冷凍保存 (-20℃) で18ヶ月, 冷蔵保存 (4℃) で12ヶ月, の製剤安定性が確認された.
	2. 本ナノ製剤製造のGMP製造のためのスケールアップに成功 (本橋渡し研究プログラム)
	3. GMP製造施設への技術移管完了, 来年度は治験薬GMP製造開始

年度) より試作を開始しており, 平成23 (2011) 年度中には医師主導治験を開始したいと思っています. 最終的には平成33 (2021) 年度の市販を目指します.

3. 非臨床試験成績

マウス急性モデル, ウサギ慢性下肢虚血モデルにおいて, 本製剤の有効性は既実証し, 国際的なトップジャーナルに既にアクセプトされました (Table 3).

Table 3 マウスおよびウサギ下肢虚血モデルで本製剤の有効性を実証

Integrative Physiology/Experimental Medicine

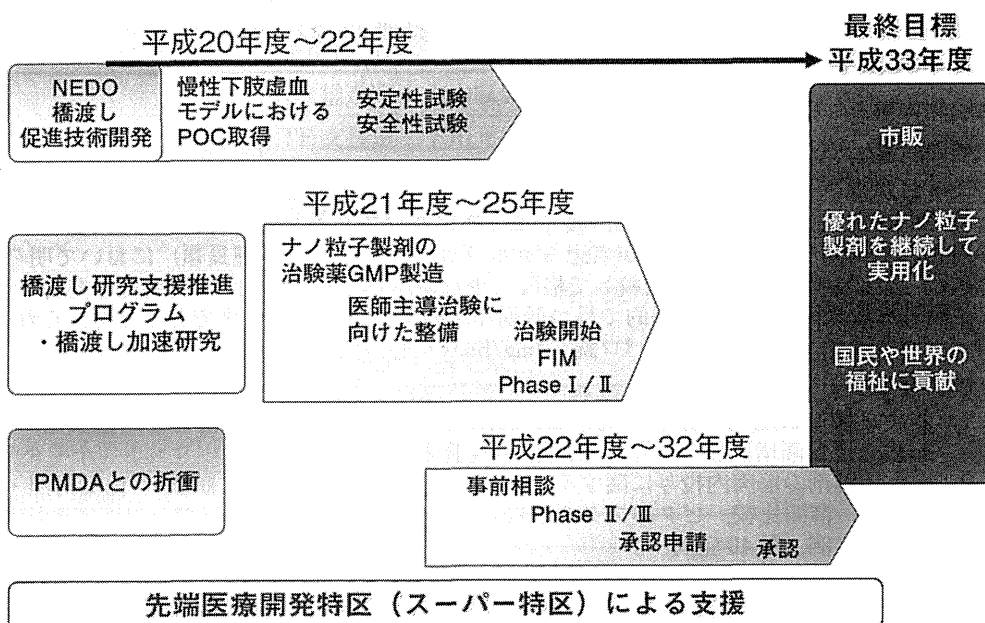
Therapeutic Neovascularization by Nanotechnology-Mediated Cell-Selective Delivery of Pitavastatin Into the Vascular Endothelium

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009 ; 29 : 796-801.

Nanoparticle-mediated endothelial cell-selective delivery of pitavastatin induces functional collateral arteries (therapeutic arteriogenesis) in a rabbit model of chronic hind limb ischemia

J Vasc Surg. 2010 ; 52 : 412-20.

Fig. 1 開発スケジュール (ロードマップ)



また、霊長類であるカニクイザルの重症下肢虚血モデルを用い、単回投与群、3日間連続投与群、6日間連続投与群を設け、CTによる分子イメージングを行い、側副血行路数を測定しました。投与後8週では、溶媒対照群に比べて3日間連続投与群、6日間連続投与群において側副血行路数が有意に増加するという結果が得られました (Fig. 2)。

安定性試験は、本製剤の室温で6ヶ月まで影響がないという結果が得られています。また、GLP下で行った安全性試験では、ラット、イヌの筋肉注射でいずれも重篤な副作用は認められていませ

ん。安全性薬理試験も実施しましたが、特に問題となる副作用は認められませんでした。

4. 治験実施計画の概要・実施体制

医師主導治験で、first-in-manになります (Table 4)。試験デザインはまだ案の段階でfixしていませんが、筋肉内投与に関するPhase I/IIa臨床試験、安全性と用量設定を行うスタディを実施する予定です。単施設、用量漸増試験、現在1用量4症例、4用量として合計16症例を検討しています。

Fig. 2 スタチン封入ナノ粒子3日間および6日間連続投与により側副血行路 (血管新生) が有意に発達 (サル)

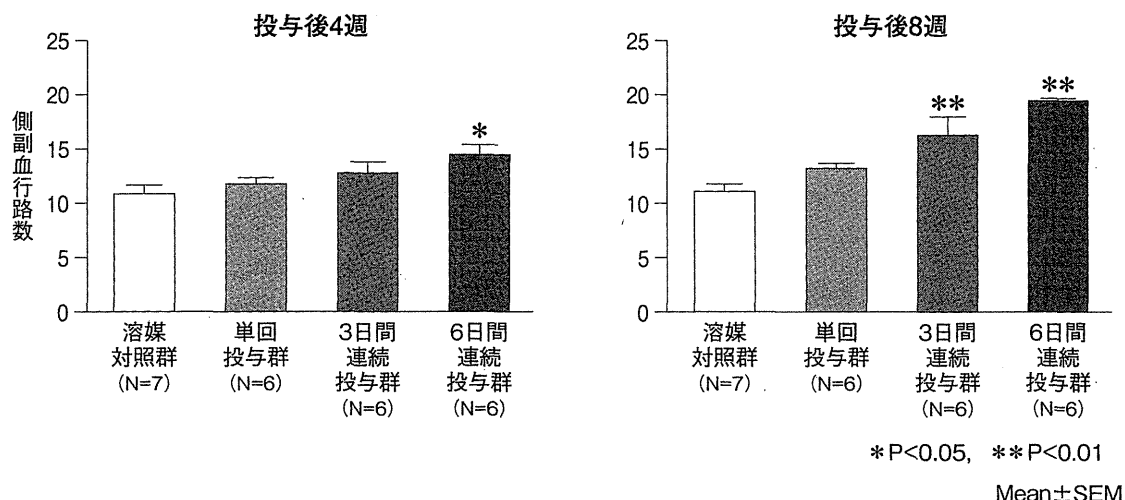


Table 4 臨床試験の概要 (1/2)

①試験の枠組み	医師主導治験
②試験の段階	First-in-man
③プロトコルコンセプト	<p>背景・Rationale：本ナノ製剤筋肉内投与によりピタバスタチンは血管内皮細胞選択的に送達されて薬効を発揮することが疾患モデル (ラット, ウサギ, 霊長類) において明らかになった。全身経口投与と比較して格段に少ない用量 (300分の1) で有効性を発揮した。これらの成果から、より効果的で且つ低副作用のナノ医療を実用化できると考えられる。ピタバスタチン経口製剤 (リバロ錠, 4mg/body/日) のヒトにおける安全性は確立。</p> <p>試験デザイン：</p> <ol style="list-style-type: none"> 本ナノ製剤の筋肉内投与に関するPhase I / II a臨床試験 (安全性と用量設定)：単施設, 用量漸増試験, 1用量4症例, 4用量として計16症例 本ナノ製剤の筋肉内投与に関するPhase II b/ III臨床試験 (POC試験)：偽薬対照・二重盲検・群間比較, ピタバスタチン封入ナノ粒子製剤筋肉内投与群と対照群の比較：1群20症例, 計40症例 <p>適格基準：重度の糖尿病性網膜症患者, 担癌患者, 透析患者を除外</p>

主要／副次エンドポイントは (Table 5), 救肢率, Fontaine分類の変化, Rutherford分類の推移, 血行動態を考えています。治験実施計画書および治験薬概要書第1版が完成, 治験薬GMP基準下での治験薬試作品が完成し, 前臨床試験はすべて終了しています。臨床試験の障害は, 適応基準を満たす患者さんのリクルートだと考えています。これを解決するため, 先ほど内山麻希子先生が報告したシーズ*³を実施した米満吉和先生方の血

管外科チームの協力を得る予定です。

「自ら治験を実施する者」は前原喜彦先生 (九州大学消化器・総合外科学教授) です (Table 6)。以下Table 6に示すようなスタッフで実施を予定しています。

本ナノ粒子製剤について, 興和株式会社と連携し九州大学病院高度先端医療センターの支援のもと治験を実施し, 日本や世界の医療として定着させることを目指しています (Fig. 3)。

Table 5 臨床試験の概要 (2/2)

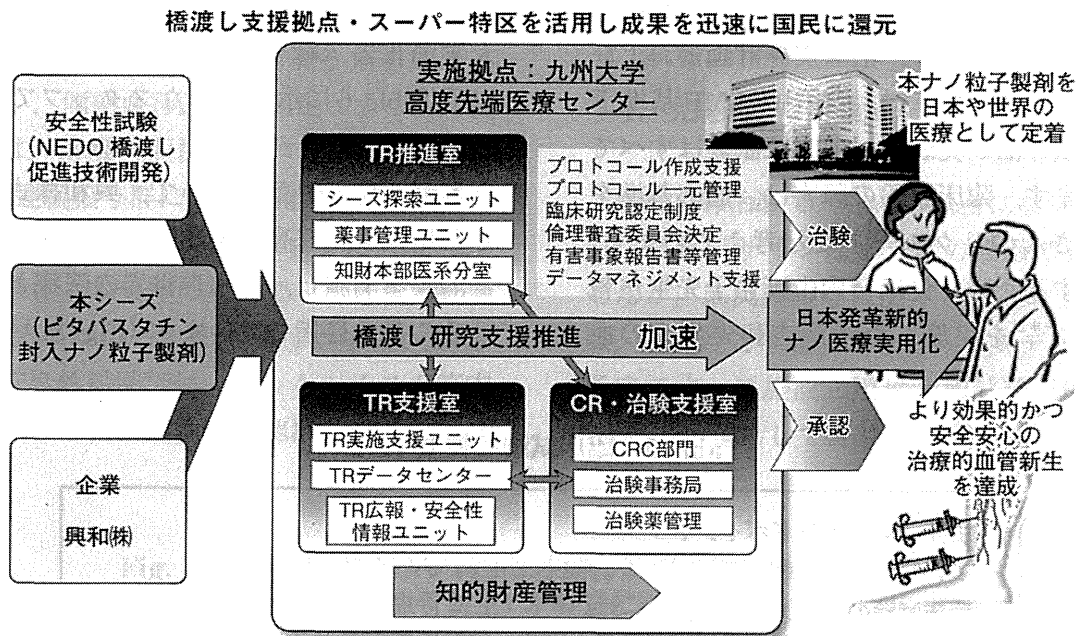
<p>主要／副次エンドポイント： 救肢率, Fontaine分類の変化, Rutherford分類の推移, 血行動態</p> <p>臨床試験の準備／進捗状況 医師主導治験実施計画書ドラフト完成, 治験薬概要書ドラフト完成 治験薬GMP基準下での治験薬試作品完成, 前臨床試験は全て終了</p> <p>臨床試験の障害とその解決策 (費用調達も含む) 障害：臨床試験の適応基準を満たす患者のリクルート 解決策： ①先行するシーズ (TR1：高性能国産新規RNAウイルスベクターによる虚血肢治療剤の開発) を実施した血管外科チームの協力を得る ②循環器内科も患者の動員を支援</p>

Table 6 医師主導治験実施組織編成表 (H22.10.)

< TR08 >	所属・責任者名	所属・担当者名
自ら治験を実施する者	消化器・総合外科学・前原喜彦	
プロジェクト責任者	循環器内科学・江頭健輔	
プロジェクトマネジメント	循環器内科学・中野 覚	
薬事	TR推進室・内山麻希子	—
データマネジメント	TR支援室・下川元継	—
統計解析	デジタルメディシン・イニシアティブ 岸本淳司	医療情報部・徳永章二
モニタリング	がん先端医療応用学講座・江見泰徳	—
CRC	高度先端医療センター・菊武恵子	高度先端医療センター 田中理子, 中尾雅文
安全性情報管理	医療情報部・徳永章二	TR支援室・北島奈緒子
記録保存／文書管理	高度先端医療センター・中西洋一	—
メディカルライティング	—	—
信頼性保証／監査	呼吸器科・高山浩一	血液・腫瘍内科・馬場英司

*³ 内山麻希子, 米満吉和, 松本拓也, 岡崎 仁, 吉田久美, 中西洋一, 前原喜彦. 高性能国産新規RNAウイルスベクターによる虚血肢治療用バイオ製剤の開発. 臨床評価. 2011; 39(2): 293-9.

Fig. 3 本橋渡し支援拠点における実施体制



<質疑応答>

清水 プロトコルと概要書が既に1版というのはGCP管理上少々問題があるのではと思いますが。

中野 第1版と申しましたが、第0.1版のドラフトです。現在、九州大学学内で米満先生方、専門家の先生方にレビューがようやく回った状況で、1版として確定したものではありません。

清水 多分今後苦労されると思いますが、版管理の状態をしっかりとっておかないと、治験に行くときに監査で、第1版から全部記録があるかという話になってしまうので、0コマ何版というのを導入されることを強くお勧めします。

中野 どうもありがとうございます。

福島 SOPは揃っていてGCPの適格性調査もクリアされているので、私は大丈夫だと思っています。1点確認したいのですが、九州大学でなぜ2つの下肢血管再生を行うのか皆さんひょっとして疑問に思われるといけません、私がお聞きしているのは、適応が違う。つまり先ほどの米満先生の開発されたウイルスベクターによるもの*3は間歇性跛行、より軽症のもので、先生のところはより重症のクリティカルなケースを対象にするというわけですね。

中野 はい、そうです。

福島 そうすることで、皆さんご理解いただければと思います。

* * *

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

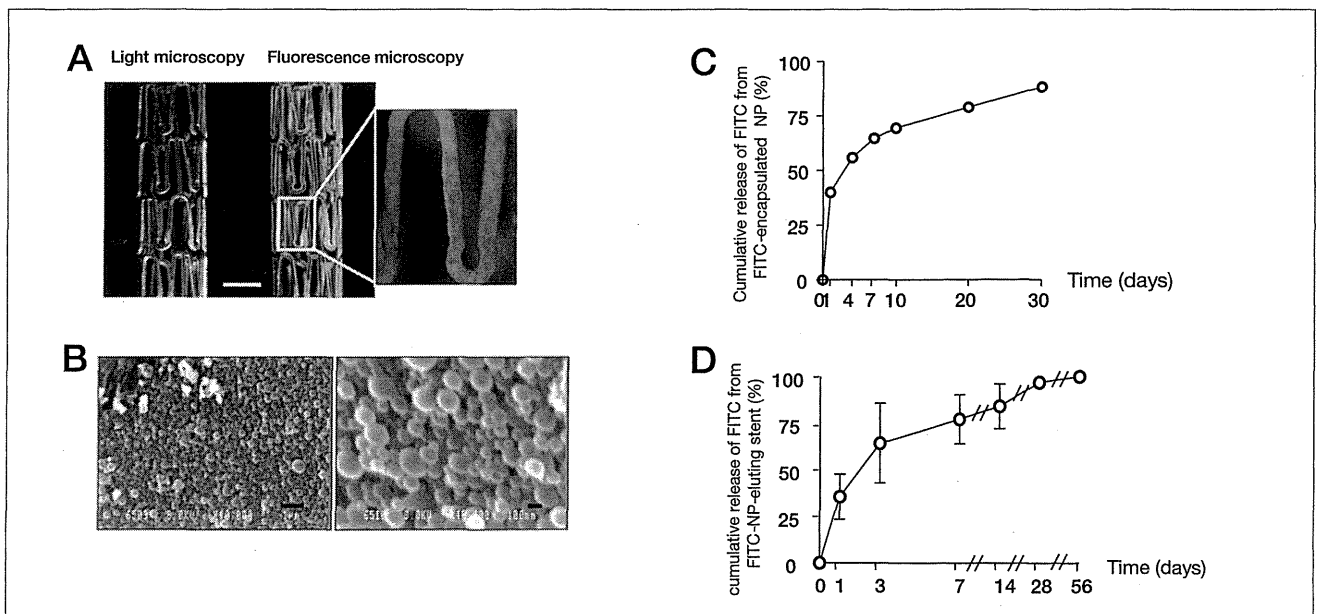


図1 電着コーティングによる生体吸収性ナノ DDS ステントの創製と DDS 機能

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 μm。

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⁾。

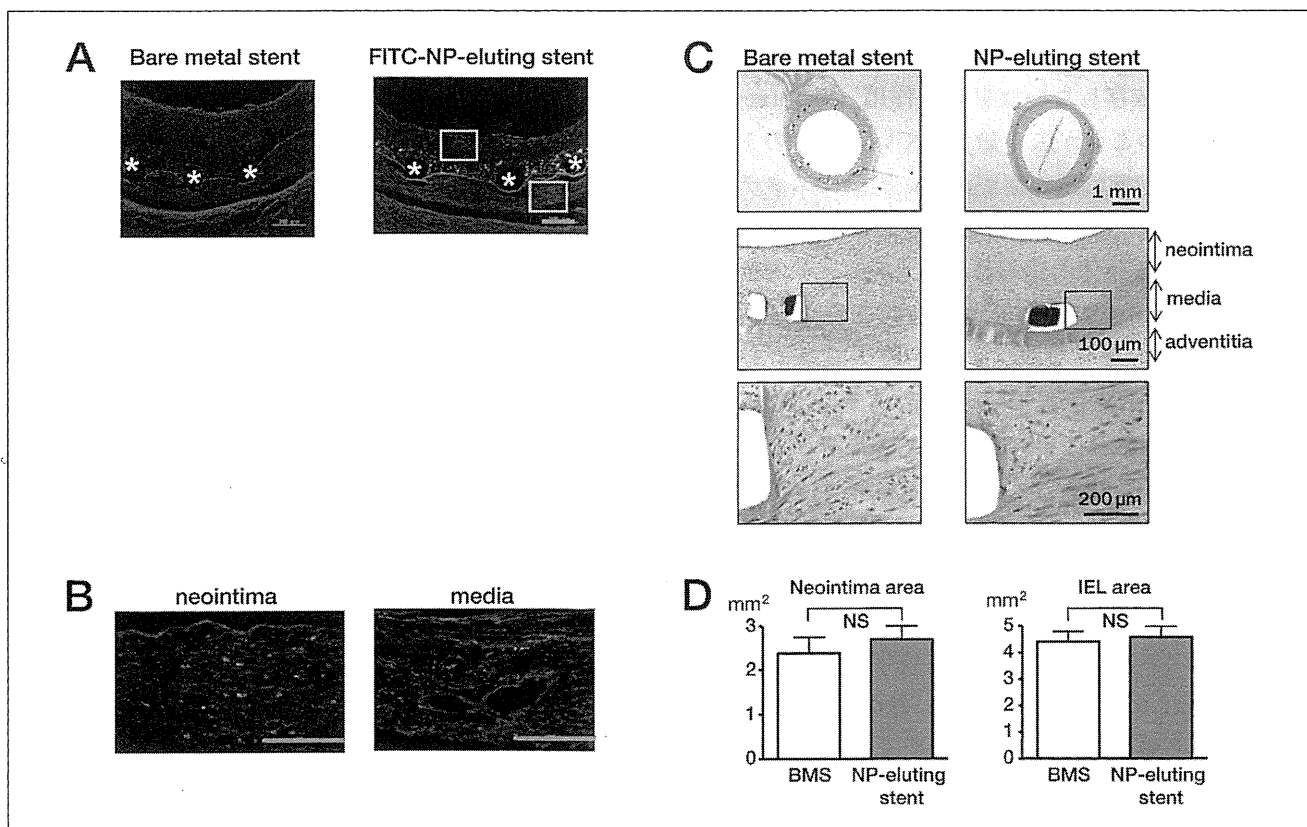


図2 ナノ粒子コーティングステントの優れた細胞内導入率と画期的細胞内 DDS 機能

- 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大(上段)100 μ m、強拡大(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'-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)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

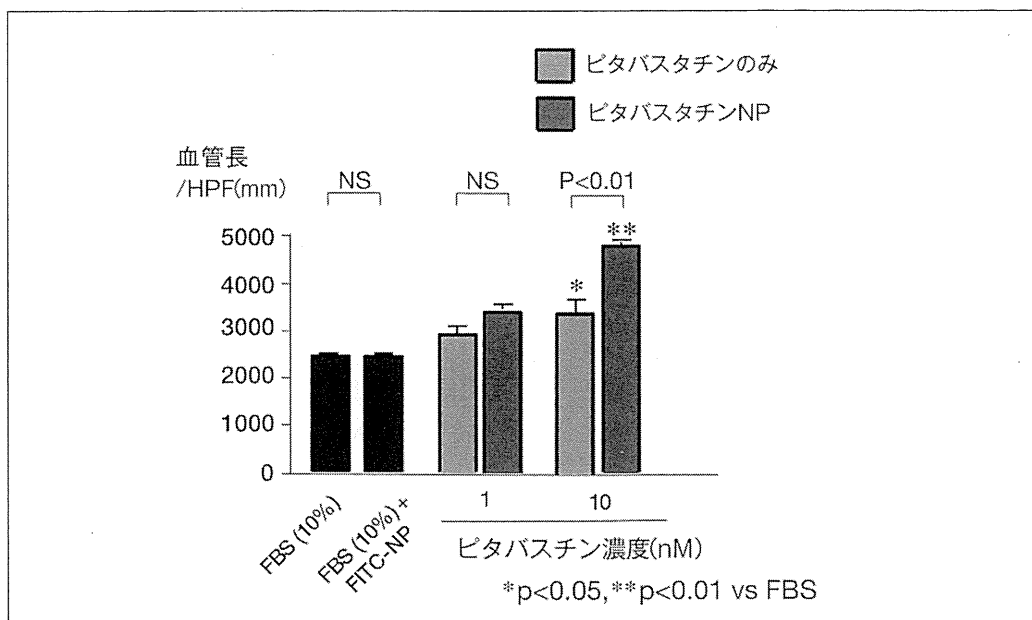


図3 ピタバスタチンナノ粒子製剤の血管内皮細胞増殖促進作用(細胞内DDS効果)
血管内皮細胞(HUVEC)を培養し、ナノ粒子化の有無によって内皮細胞を用いたチューブフォーメーションアッセイを行った。ナノ粒子化したピタバスタチンはナノ粒子化していないピタバスタチンよりも有意に血管長の伸張が認められた。

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

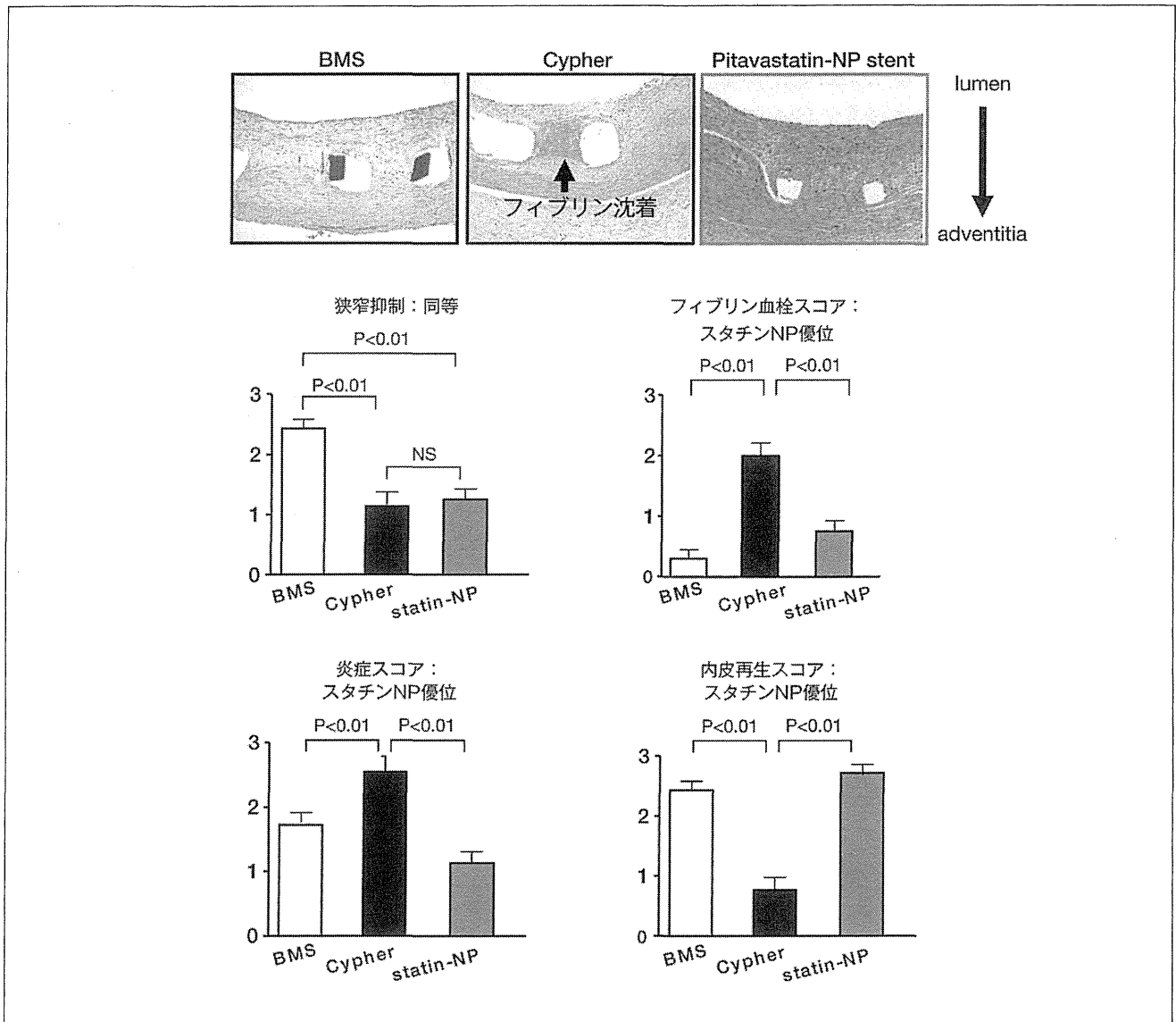


図4 スタチン封入ナノ粒子溶出ステントの有効性と安全性

ベアメタルステント、スタチン封入ナノ粒子溶出ステントおよび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

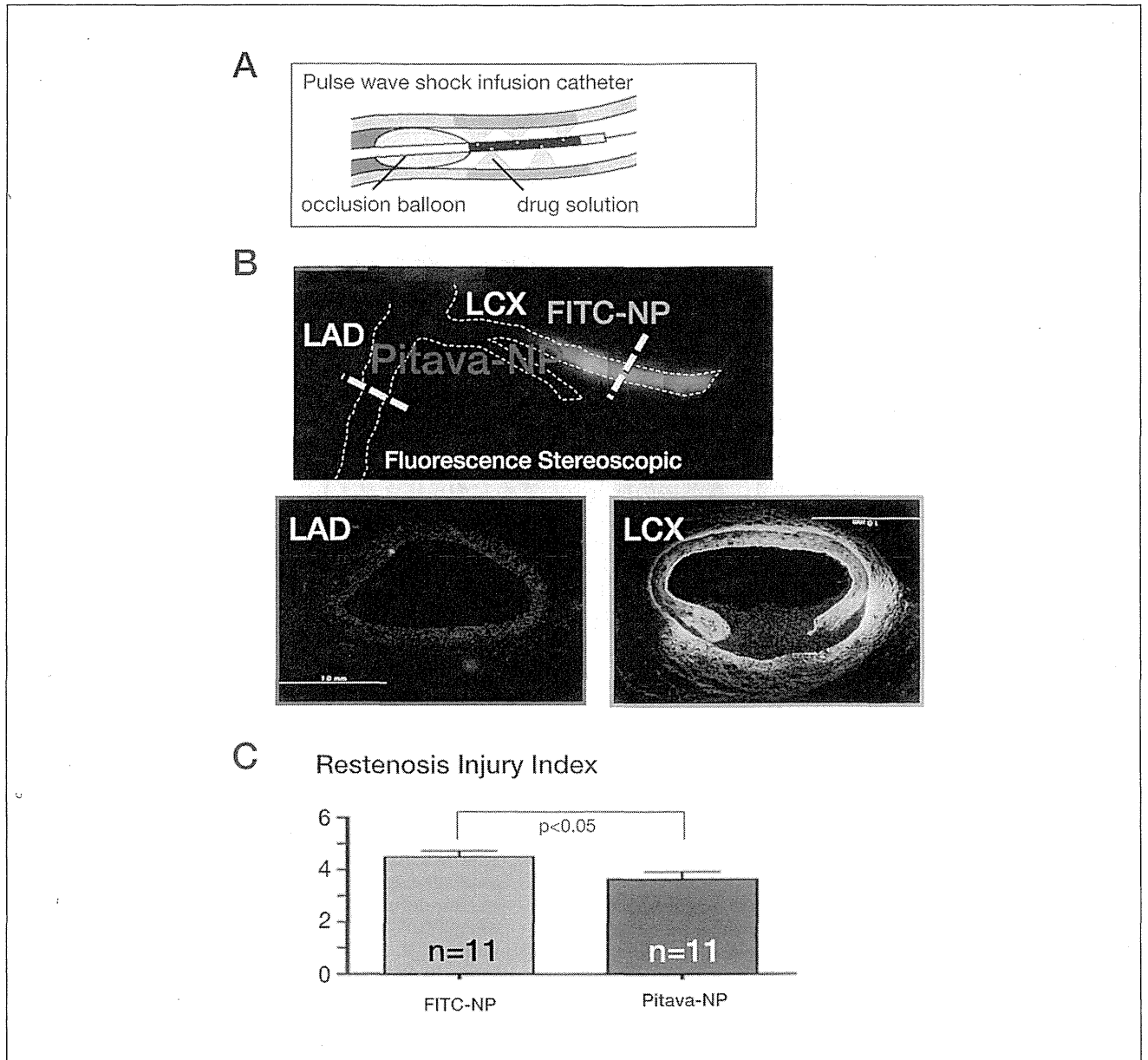


図 5 脈派衝撃投与 DDS カテーテルを用いた血管内医療

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

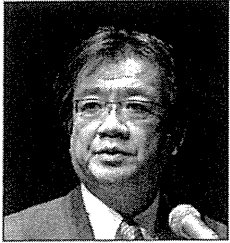
- 1) Pfisterer M. Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stent: an observation study of drug-eluting versus bare metal stents. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48:2584-2591.
- 2) Nordmann AJ, Briel M, Bucher HC. Mortality in randomized 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

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。

- 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.

急性心筋梗塞症治療用ナノ粒子製剤の実用化のための橋渡し研究

Nanomedicine-based translational research for Acute Myocardial Infarction



江頭 健輔^{1)*} 中野 覚²⁾
Kensuke Egashira Kaku Nakano

- 1) 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 教授
Professor, Department of Cardiovascular Research, Development, and Translational Medicine, Kyushu University
- 2) 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
Associate Professor, Department of Cardiovascular Research, Development, and Translational Medicine, Kyushu University

1. 開発の目的・作用メカニズム

試験物はピタバスタチン封入PLGAナノ粒子（ピタバNP）製剤、対象疾患は急性心筋梗塞症（AMI：Acute Myocardial Infarction）です。

AMIは患者の生命予後を脅かす最も重篤な心臓疾患です。世界で年間700万人がAMIを含む冠動脈疾患で死亡し、人類死因の第一位です。最近、医療レベルの向上によって急性期の生命予後は改善しましたが、AMI患者の長期死亡率は依然として高いままです。

AMIの最も重要な予後規定因子は梗塞サイズであることから、唯一の最適治療は早期再灌流療法による梗塞サイズの縮小です。一方、再灌流療法による血流回復そのものが不可逆的な心筋細胞壊死を促進し、再灌流療法の梗塞縮小効果を減少させる（再灌流傷害）ことが知られています。動物実験では、再灌流傷害によって再灌流療法の梗塞縮小効果が50%程度キャンセルされます。この未解決の問題（unmet needs）を解決し、AMI患者の生活の質と生命予後を改善するには、再灌流傷害に対する革新的治療法の開発と実用化が緊急の課題です（Fig. 1）。

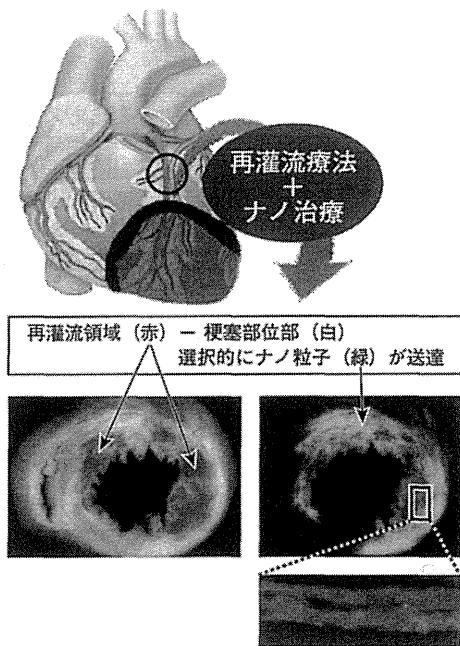
我々はナノ医療の開発と実用化を目指してきました。平成24（2012）年8月から慢性重症虚血肢患者を対象とした筋肉内投与によるピタバスタチン封入PLGAナノ粒子（ピタバNP）製剤の医師主導治験を実施しています。その研究開発の過程において、ナノ粒子製剤が臓器の虚血-再灌流部位に選択的に送達されることを発見しました。この虚血-再灌流部位選択的ナノDDS（Drug Delivery System）を活用して新しい心筋梗塞の治療、虚血再灌流傷害の治療にしようと考えました（Fig. 2）。ラット心筋虚血-再灌流モデルにおいて、ピタバNPの再灌流時静脈内投与によって梗塞サイズが50%縮小することを明らかにしました（小動物での有効性を確認）。

2. 非臨床POCの取得

非臨床POC（Proof of Concept）取得のため、ミニブタ冠動脈60分虚血-再灌流モデルを作製しました（Fig. 3）。無麻酔-覚醒モデルの状態で心筋虚血-再灌流を行うと、血行動態が安定しかつ致死性不整脈の発生が低い安定した疾患モデルが作製できます。コントロール群では梗塞サイズが約70%でした。一方、ピタバスタチンを4, 8,

* 研究代表者兼発表者（写真）。

Fig. 1 急性心筋梗塞症 (AMI) 治療の未解決課題 (unmet needs) と解決策



AMIの長期予後は依然として悪い

- AMI+CAD：世界の死亡数700万人（第一位）
- AMI後心不全の増加：600万人-USA, 200万人-日本
- AMI患者の長期予後は不変：
心不全の予後は極めて悪い（癌と同等）
- 梗塞サイズを縮小する革新的治療法の開発が必須

急性期治療の未解決の課題（再灌流傷害）

- 現行の再灌流療法だけでは梗塞サイズの縮小が不十分（再灌流傷害によって再灌流療法の梗塞縮小効果が半減）
- 再灌流傷害に対する有効な治療法が無い

解決策

再灌流部位選択的ナノDDS（左図）による再灌流傷害の予防，梗塞サイズの縮小

Fig. 2 急性心筋梗塞症治療用ナノ粒子製剤の実用化のための橋渡し研究

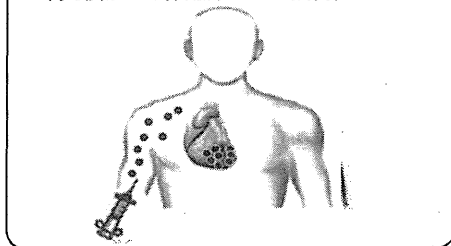
【これまでの実績】

- ピタバスタチン封入PLGAナノ粒子製剤の有効性，治験薬GMP製造完了，特許登録
- 医師主導治験開始（2012年8月，対象疾患：重症虚血肢）

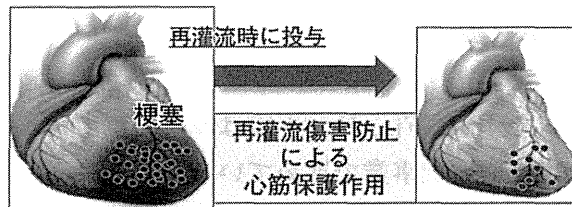
【問題解決のためのアプローチ】

再灌流部位選択的ナノDDS技術

- ナノ粒子製剤は静脈内投与後，心血管病巣（虚血，再灌流，炎症）に送達
- 再灌流傷害を抑制し梗塞サイズを縮小（小動物にて非臨床 POC 獲得）



虚血—再灌流部位選択的ナノDDSによる梗塞サイズの縮小とリモデリング抑制



波及効果

- 急性心筋梗塞症患者：梗塞サイズ縮小，心不全発症減少，致死性不整脈減少，生命予後延長
- 競合品は無い（ブロックバスターの可能性），他臓器の再灌流傷害治療にも応用可能
- 3,000億円市場獲得，ナノ医療産業の成長産業化，日本の経済再生・成長に貢献

16, 32 mg/body含有するピタバスタチン封入PLGAナノ粒子を再灌流10分前に静脈内投与すると，16 mg/bodyで有効性があることを見出すことが出来ました。

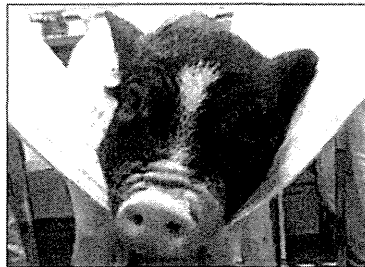
本シーズの今年度（2012年度）の研究の進捗です。まず，画期的な無麻酔—覚醒のミニブタ虚血—再灌流モデルの作製に成功しました。また，こ

の疾患モデルではテレメトリーシステムで心電図と血圧を連続記録することが可能であり，致死性不整脈の発生率が極めて少ないのが特徴です。さらに，ピタバスタチン封入PLGAナノ粒子によって梗塞サイズが小さくなることを確認出来ました。平成25（2013）年度には心機能の改善効果をMRIを用いて定量評価して，かつ，薬効薬理試

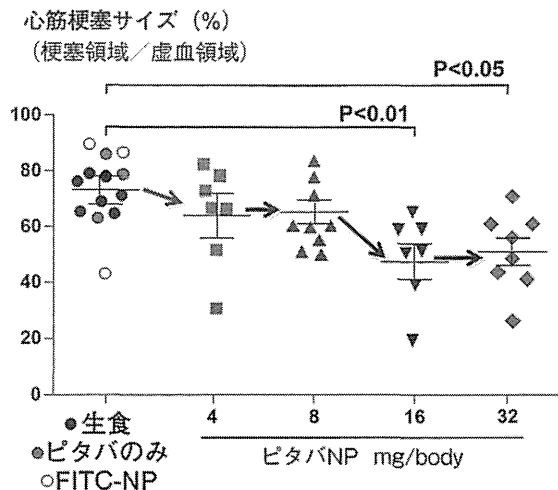
Fig. 3 ピタバNP 静脈内投与 (再灌流10分前) による梗塞サイズの縮小

ミニブタ冠動脈60分虚血-再灌流モデル：非臨床POC取得中

無麻酔-覚醒ミニブタモデル



- ・覚醒安静下に冠動脈カフオクルーダ (事前留置) を用いて冠動脈閉塞
- ・テレメトリーシステムによる心電図と血圧の連続記録
- ・麻酔・開胸モデルと比較して、麻酔や開胸手術での影響が無く、血行動態が安定、致死的不整脈が少なく、その結果、梗塞サイズが安定



験を信頼性保証下で実施し、非臨床POCを取得し、その後、PMDA (独立行政法人医薬品医療機器総合機構) と薬事戦略相談をしたいと思います。

3. 開発スキーム

開発スキームですが (Fig. 4), 上段は厚生労働省の難治性疾患克服研究事業で進めている肺高血圧症治療用ナノ粒子製剤実用化臨床試験で、平成25 (2013) 年度に第 I 相試験を実施する予定です。

その結果をもってPMDAに薬事戦略相談を行い、急性心筋梗塞に対する第 II 相試験を平成26 (2014) 年度に開始する予定です。特許は (Table 1), スタチン封入ナノ粒子製剤で国内登録、国外でも登録が済んでいます。製品化イメージですが、急性心筋梗塞症に対する革新的治療薬としてブロッックバスターに発展する可能性があります。私たちのナノ治療の特徴は、急性心筋梗塞だけでなく他臓器 (腎、脳など) の虚血再灌流傷害療法にも応用出来るのではと考えています。

Fig. 4 ピタバNP 製剤点滴静注による急性心筋梗塞症治療薬の開発スキーム

