

Figure 4. Perspective of nano-DDS-mediated treatment for acute coronary syndrome. Nano-DDS-mediated treatment for cardiovascular disease comprises 1) timely intravenous injection of nano-DDS, 2) nano-DDS-dependent drug delivery to circulating monocytes, atherosclerotic arterial wall and macrophages, and ischemic myocardium, and 3) therapeutic goals including atherosclerotic plaque stabilization, reduced myocardial infarct size, and improvement of patient prognosis.

loaded PLGA nanoparticles in macrophages and neutrophils in the IR heart (Figure 3B). Nano-DDS-dependent delivery to inflammatory cells and ischemic myocardium is a desirable property for the treatment of myocardial IR injury. PLGA nanoparticles and other nano-DDS including liposomes will be tested in clinical trials in the future to test whether they will enhance therapeutic efficacy through targeting specific mechanisms of myocardial IR injury.

Summary and Clinical Perspective

In this review, we summarized the properties of selected nano-DDSs and their preclinical studies in animal models of cardiovascular diseases, namely atherosclerosis and myocardial infarction. Current applications of nano-DDS for cardiovascular disease utilize mainly 2 major mechanisms of drug delivery, enhanced vascular permeability and incorporation by MPS, which underpins enhanced drug delivery for circulating monocytes, atherosclerotic arterial wall and macrophages, and ischemic myocardium. These properties of nano-DDS may be applicable for the treatment of acute coronary syndrome (coronary plaque destabilization and acute myocardial infarction) (Figure 4).

Although preclinical studies have reported nano-DDS have therapeutic effects on atherosclerotic plaque stabilization and myocardial IR injury, there is a wide variety of opportunities to combine nano-DDSs and various therapeutic agents, including chemicals, nucleotides, peptides, and others, which may expand the potential of current pharmacotherapy for several cardiovascular diseases. Possible application of nano-DDS in other cardiovascular diseases may include pulmonary hypertension,^{12,17} vein graft disease,⁵³ and therapeutic neovascularization for clinical limb ischemia^{15,18,54} and coronary stents.^{14,19} We have started a phase I/IIa investigator initiated clinical trial in Kyushu University Hospital to test the efficacy of PLGA nanoparticle-mediated delivery of pitavastatin in patients with critical limb ischemia (UMIN000008011). Future clinical trials conducted in the next decade may prove the safety and efficacy of nano-DDS for cardiovascular diseases.

REFERENCE

1. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J* 2005; 19: 311-30. (Review)
2. Markman JL, Rekechenetskiy A, Holler E, Ljubimova JY. Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65: 1866-79.
3. Mulder WJ, Strijkers GJ, van Tilborg GA, Cormode DP, Fayad ZA, Nicolay K. Nanoparticulate assemblies of amphiphiles and diagnostically active materials for multimodality imaging. *Acc Chem Res* 2009; 42: 904-14.
4. Bitounis D, Fanciullino R, Iliadis A, Ciccolini J. Optimizing Drug-gability through Liposomal Formulations: New Approaches to an Old Concept. *ISRN Pharm* 2012; 2012: 738432.
5. Acharya S, Sahoo SK. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63: 170-83. (Review)
6. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release* 2012; 161: 505-22. (Review)
7. Matsumura Y, Kataoka K. Preclinical and clinical studies of anti-cancer agent-incorporating polymer micelles. *Cancer Sci* 2009; 100: 572-9. (Review)
8. Morgan MT, Carnahan MA, Finkelstein S, *et al.* Dendritic supramolecular assemblies for drug delivery. *Chem Commun(Camb)* 2005: 4309-11.
9. Mody VV, Siwale R, Singh A, Mody HR. Introduction to metallic nanoparticles. *J Pharm Bioallied Sci* 2010; 2: 282-9.
10. Gaucher G, Dufresne M-H, Sant VP, Kang N, Maysinger D, Leroux JC. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J Control Release* 2005; 109: 169-88. (Review)
11. 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: 41-8.
12. Kimura S, Egashira K, Chen L, *et al.* Nanoparticle-mediated delivery of nuclear factor kappaB decoy into lungs ameliorates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Hypertension* 2009; 53: 877-83.
13. Katsuki S, Matoba T, Nakashiro S, *et al.* Nanoparticle-mediated delivery of pitavastatin inhibits atherosclerotic plaque destabilization/rupture in mice by regulating the recruitment of inflammatory monocytes. *Circulation* 2014; 129: 896-906.
14. Tsukie N, Nakano K, Matoba T, *et al.* Pitavastatin-incorporated nanoparticle-eluting stents attenuate in-stent stenosis without delayed endothelial healing effects in a porcine coronary artery model. *J Atheroscler Thromb* 2013; 20: 32-45.
15. Nagahama R, Matoba T, Nakano K, Kim-Mitsuyama S, Sunagawa K, Egashira K. Nanoparticle-mediated delivery of pioglitazone enhances therapeutic neovascularization in a murine model of hind-limb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 2427-34.
16. Masuda S, Nakano K, Funakoshi K, *et al.* Imatinib mesylate-incorporated nanoparticle-eluting stent attenuates in-stent neointimal formation in porcine coronary arteries. *J Atheroscler Thromb* 2011; 18: 1043-53.
17. Chen L, Nakano K, Kimura S, *et al.* Nanoparticle-mediated delivery of pitavastatin into lungs ameliorates the development and induces regression of monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension. *Hypertension* 2011; 57: 343-50.
18. Oda S, Nagahama R, Nakano K, *et al.* 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.
19. Nakano K, Egashira K, Masuda S, *et al.* 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: 277-83.
20. Matoba T, Egashira K. Anti-inflammatory gene therapy for cardio-

- vascular disease. *Curr Gene Ther* 2011; 11: 442-6. (Review)
21. Arsawang U, Saengsawang O, Rungrotmongkol T, *et al.* How do carbon nanotubes serve as carriers for gemcitabine transport in a drug delivery system? *J Mol Graph Model* 2011; 29: 591-6.
 22. Mulder WJ, Fayad ZA. Nanomedicine captures cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 801-2.
 23. Leuschner F, Nahrendorf M. Molecular imaging of coronary atherosclerosis and myocardial infarction: considerations for the bench and perspectives for the clinic. *Circ Res* 2011; 108: 593-606. (Review)
 24. Baxter GF. The neutrophil as a mediator of myocardial ischemia-reperfusion injury: time to move on. *Basic Res Cardiol* 2002; 97: 268-75. (Review)
 25. Dauber IM, VanBenthuyzen KM, Mcmurtry IF, *et al.* Functional coronary microvascular injury evident as increased permeability due to brief ischemia and reperfusion. *Circ Res* 1990; 66: 986-98.
 26. Takahama H, Minamino T, Asanuma H, *et al.* Prolonged targeting of ischemic/reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53: 709-17.
 27. Asai T. Nanoparticle-mediated delivery of anticancer agents to tumor angiogenic vessels. *Biol Pharm Bull* 2012; 35: 1855-61. (Review)
 28. Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 64-70.
 29. Gibaud S, Demoy M, Andreux JP, Weingarten C, Gouritin B, Couvreur P. Cells involved in the capture of nanoparticles in hematopoietic organs. *J Pharm Sci* 1996; 85: 944-50.
 30. Lee PY, Wang JX, Parisini E, Dascher CC, Nigrovic PA. Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J Leukoc Biol* 2013; 94: 585-94. (Review)
 31. Leuschner F, Dutta P, Gorbato R, *et al.* Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice. *Nat Biotechnol* 2011; 29: 1005-10.
 32. Allen TM. Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15: 215-20. (Review)
 33. Sudimack J, Lee RJ. Targeted drug delivery via the folate receptor. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 41: 147-62. (Review)
 34. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 145-60. (Review)
 35. Howard MD, Greineder CF, Hood ED, Muzykantov VR. Endothelial targeting of liposomes encapsulating SOD/catalase mimetic EUK-134 alleviates acute pulmonary inflammation. *J Control Release* 2014; 177: 34-41.
 36. Michalska M, Machtoub L, Manthey HD, *et al.* Visualization of vascular inflammation in the atherosclerotic mouse by ultrasmall superparamagnetic iron oxide vascular cell adhesion molecule-1-specific nanoparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 2350-7.
 37. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, *et al.* Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2014; 129: e28-292.
 38. Nabel EG, Braunwald E. A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *N Engl J Med* 2012; 366: 54-63.
 39. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1262-75. (Review)
 40. Finn AV, Nakano M, Narula J, Kolodgie FD, Virmani R. Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 1282-92. (Review)
 41. Motoyama S, Sarai M, Harigaya H, *et al.* Computed tomographic angiography characteristics of atherosclerotic plaques subsequently resulting in acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 49-57.
 42. Hyafil F, Cornily J-C, Feig JE, *et al.* Noninvasive detection of macrophages using a nanoparticulate contrast agent for computed tomography. *Nat Med* 2007; 13: 636-41.
 43. Weissleder R, Nahrendorf M, Pittet MJ. Imaging macrophages with nanoparticles. *Nat Mater* 2014; 13: 125-38. (Review)
 44. Morishige K, Kacher DF, Libby P, *et al.* High-resolution magnetic resonance imaging enhanced with superparamagnetic nanoparticles measures macrophage burden in atherosclerosis. *Circulation* 2010; 122: 1707-15.
 45. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, *et al.* PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* 2013; 19: 557-66. (Review)
 46. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, *et al.* Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 2007; 447: 1116-20.
 47. Holmes DR, Lerman A, Moreno PR, King SB 3rd, Sharma SK. Diagnosis and management of STEMI arising from plaque erosion. *JACC Cardiovasc Imaging* 2013; 6: 290-6.
 48. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007; 357: 1121-35. (Review)
 49. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest* 2013; 123: 92-100. (Review)
 50. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, *et al.* Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005; 434: 652-8.
 51. Piot C, Croisille P, Staat P, *et al.* Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2008; 359: 473-81.
 52. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 2007; 204: 3037-47.
 53. Kimura S, Egashira K, Nakano K, *et al.* Local delivery of imatinib mesylate (STI571)-incorporated nanoparticle *ex vivo* suppresses vein graft neointima formation. *Circulation* 2008; 118: S65-70.
 54. Kubo M, Egashira K, Inoue T, *et al.* Therapeutic neovascularization by nanotechnology-mediated cell-selective delivery of pitavastatin into the vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 796-801.

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

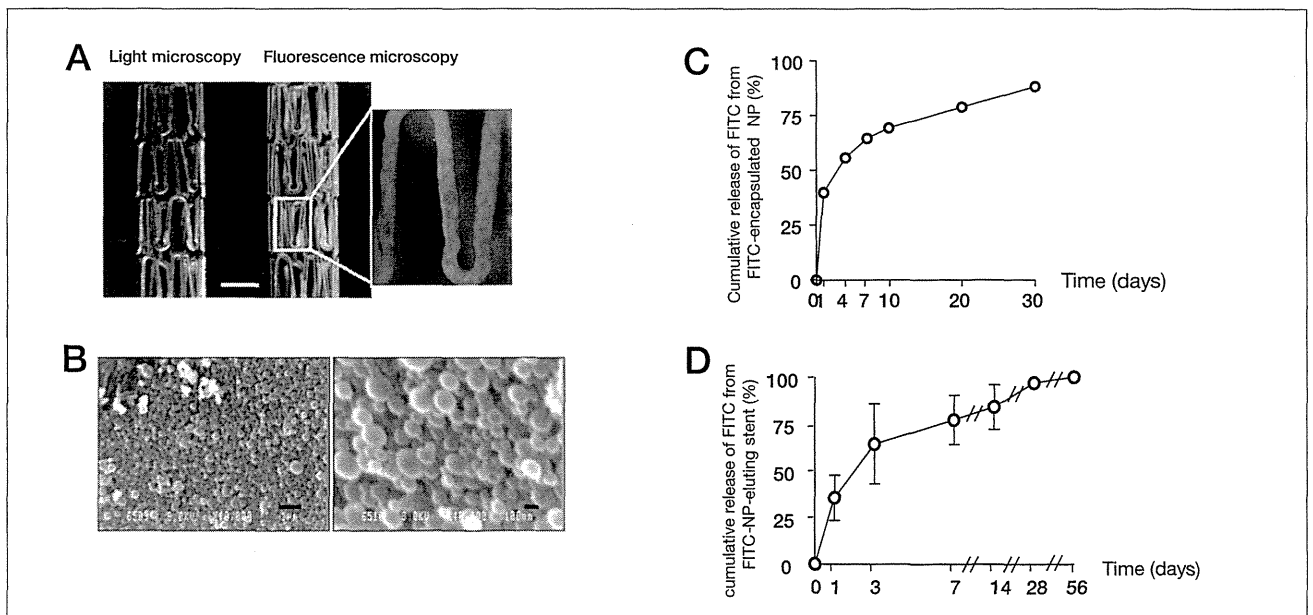


図1 電着コーティングによる生体吸収性ナノ DDS ステントの創製と DDS 機能

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⁾。

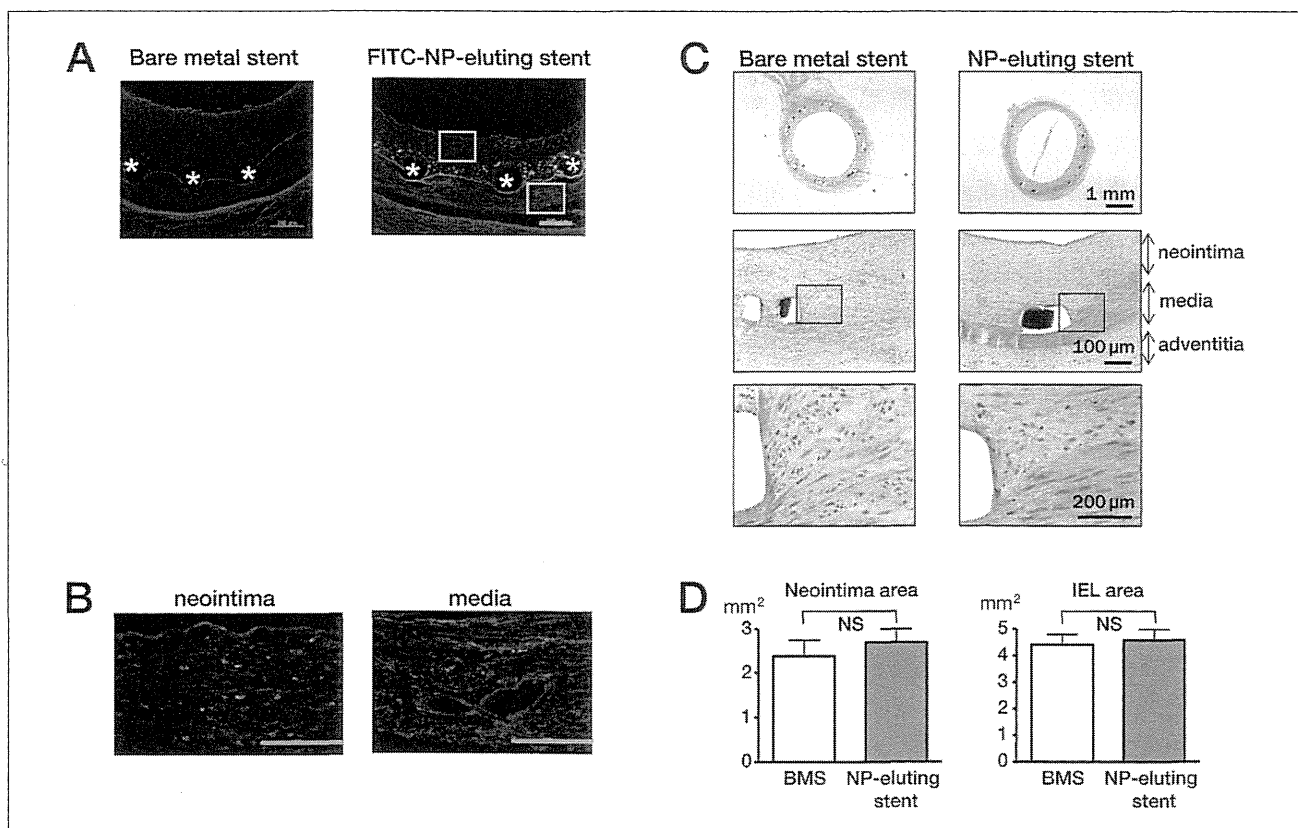


図2 ナノ粒子コーティングステントの優れた細胞内導入率と画期的細胞内 DDS 機能

- 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大像(上段)100 μ m、強拡大像(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

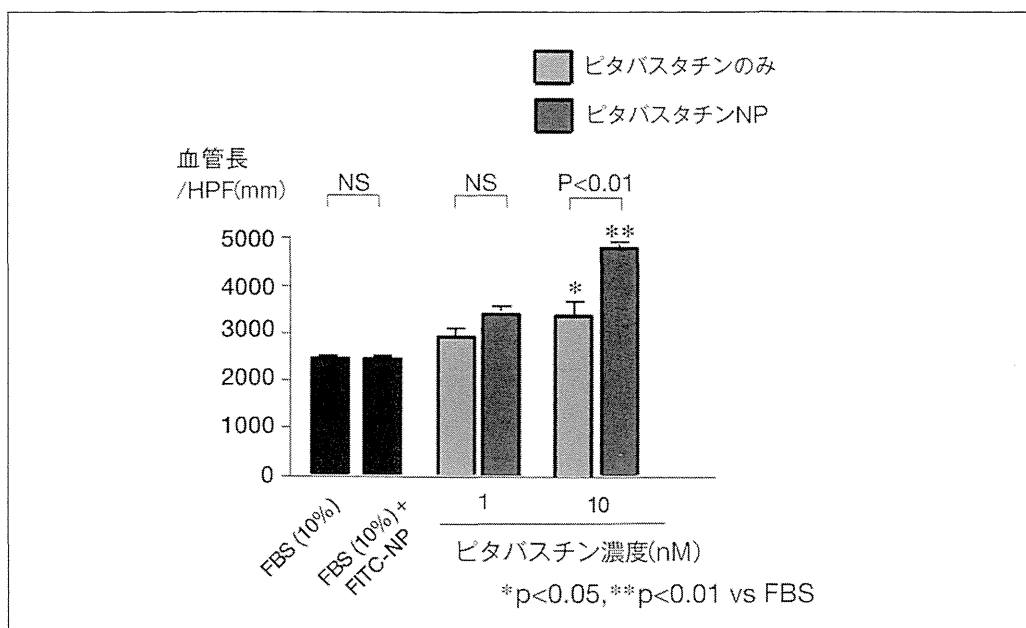


図3 ピタバスタチンナノ粒子製剤の血管内皮細胞増殖促進作用(細胞内 DDS 効果)

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

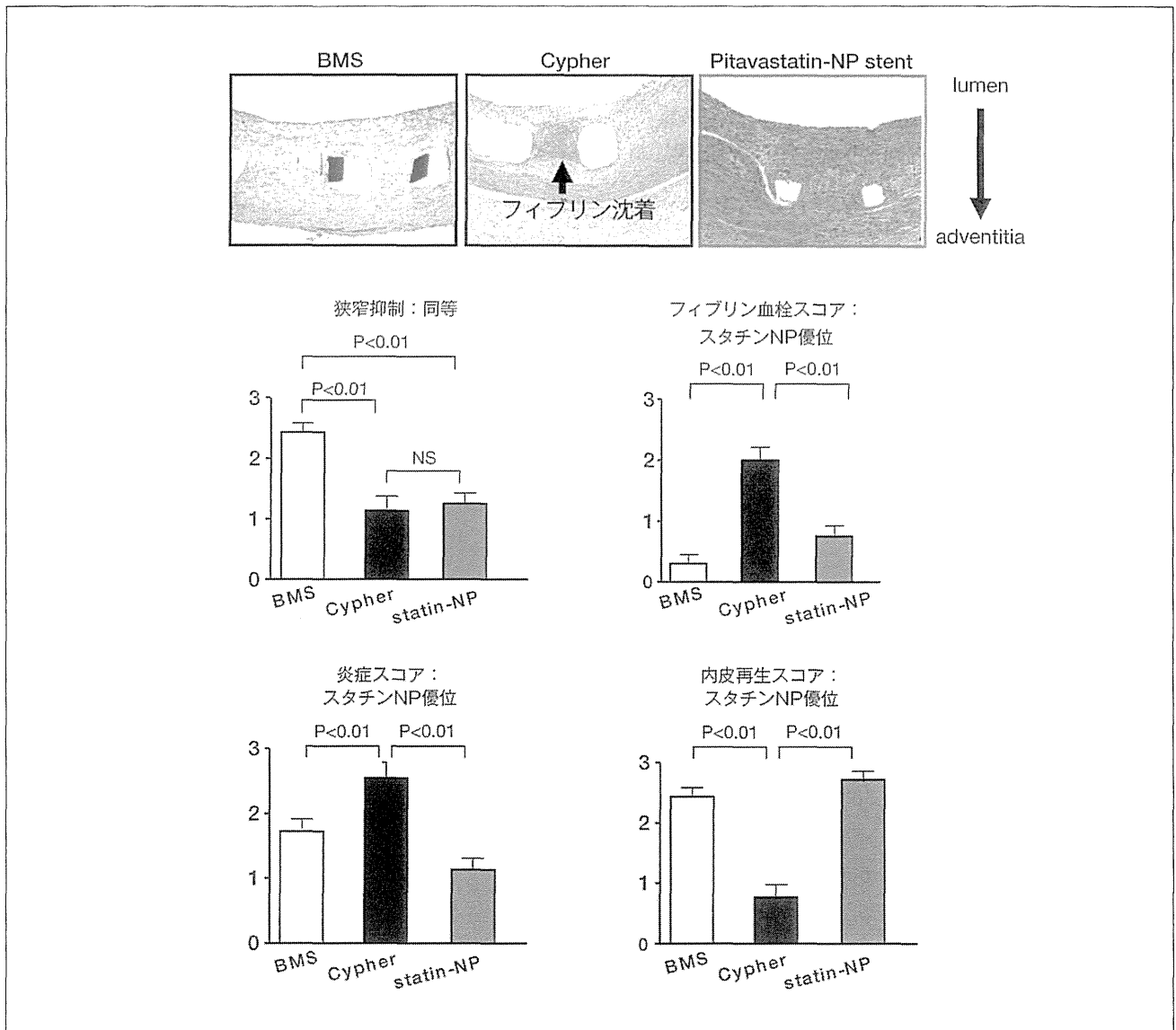


図4 スタチン封入ナノ粒子溶出ステントの有効性と安全性

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、「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

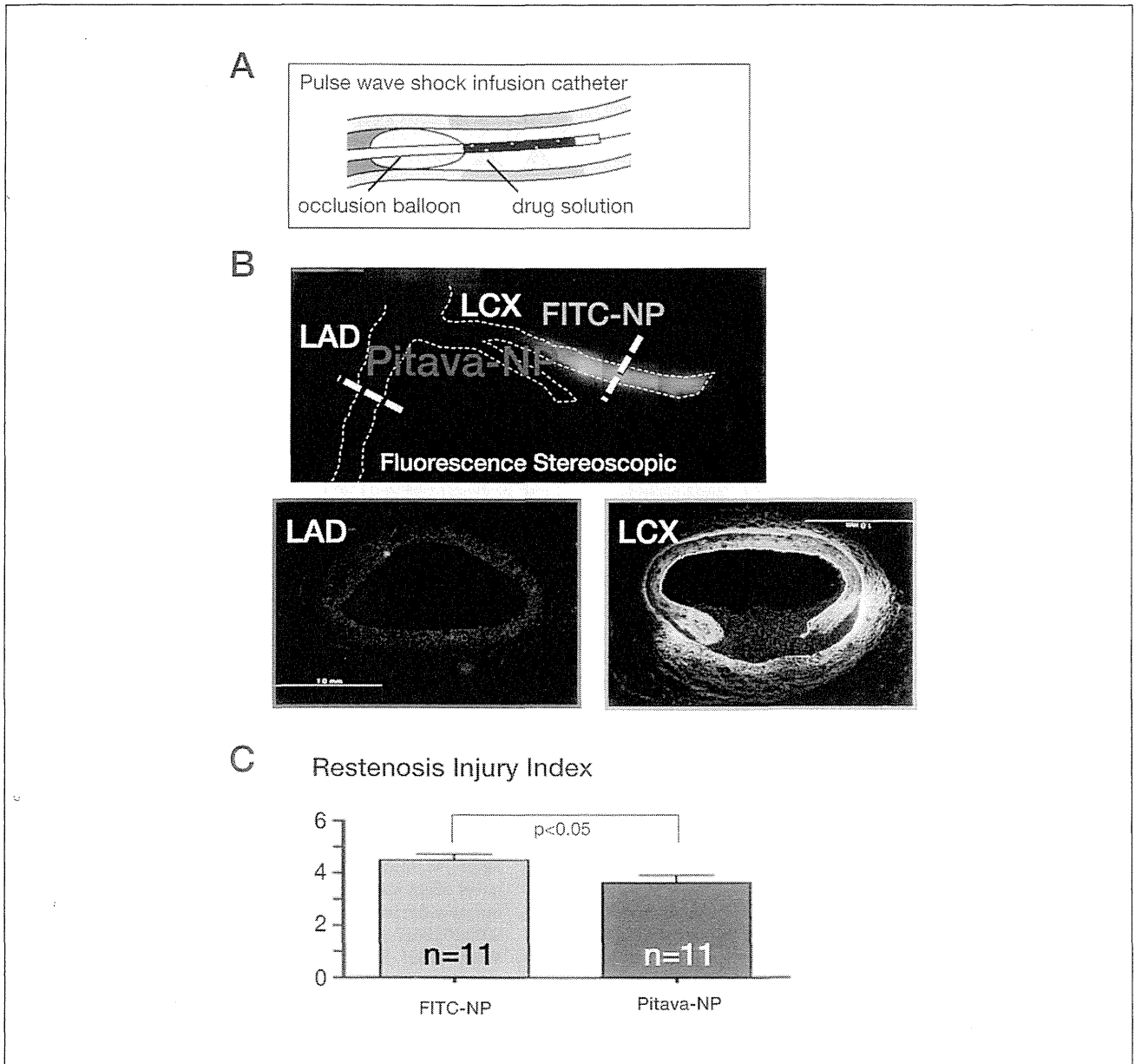


図 5 脈派衝撃投与 DDS カテーテルを用いた血管内医療

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

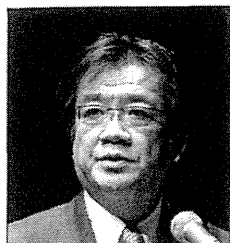
おわりに

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。

- 6) lesions by pravastatin and by antimonocyte chemoattractant protein-1 therapy in nonhuman primates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1522-1528
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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.
- 10) 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)。

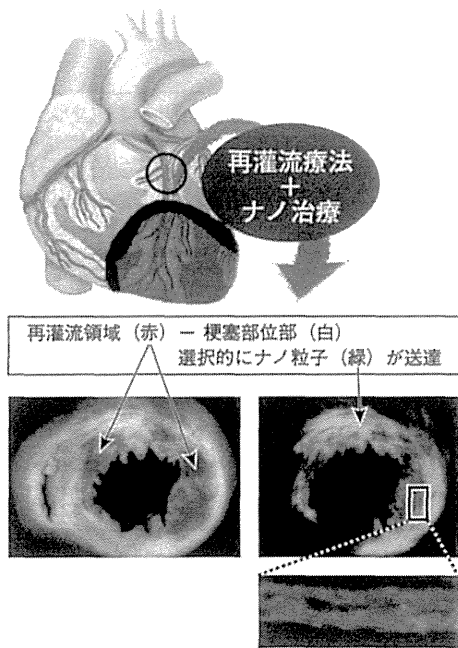
我々はナノ医療の開発と実用化を目指してきました。平成24(2012)年8月から慢性重症虚血肢患者を対象とした筋肉内投与によるピタバスタチン封入PLGAナノ粒子(ピタバNP)製剤の医師主導治験を実施しています。その研究開発の過程において, ナノ粒子製剤が臓器の虚血-再灌流部位に選択的に送達されることを発見しました。この虚血-再灌流部位選択的ナノDDS(Drug Delivery System)を活用して新しい心筋梗塞の治療, 虚血再灌流傷害の治療にしようと考えました(Fig. 2)。ラット心筋虚血-再灌流モデルにおいて, ピタバNPの再灌流時静脈内投与によって梗塞サイズが50%縮小することを明ら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

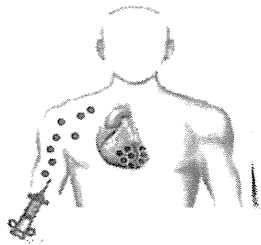
【これまでの実績】

- 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）

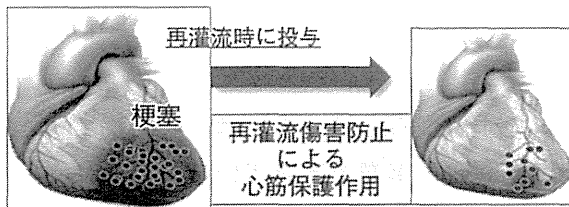
【問題解決のためのアプローチ】

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。

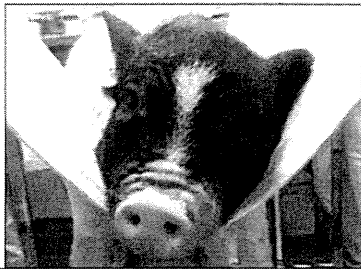
本シーズの今年度（2012年度）の研究の進捗です。まず，画期的な無麻酔—覚醒のミニブタ虚血—再灌流モデルの作製に成功しました。また，こ

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

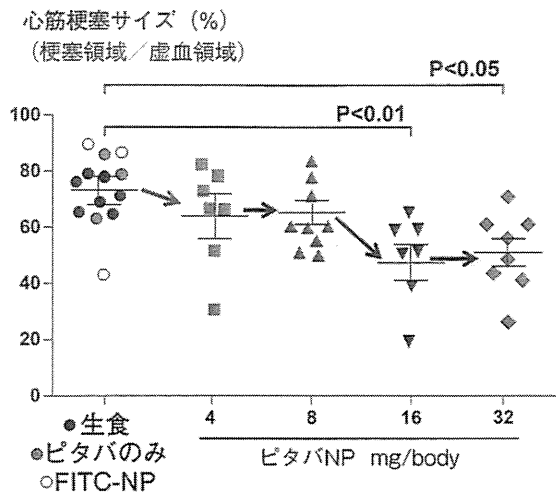
Fig. 3 ピタバNP 静脈内投与 (再灌流10分前) による梗塞サイズの縮小

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ひます。

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

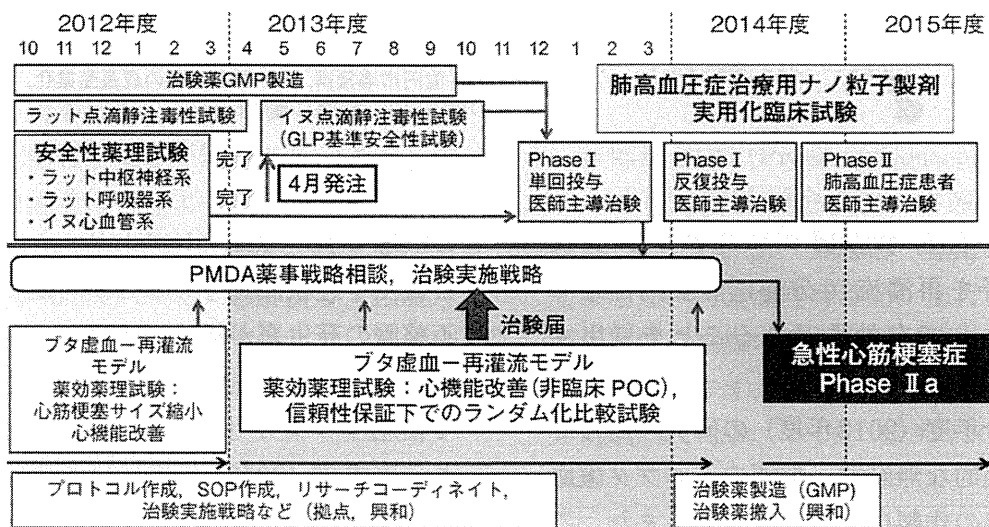


Table 1 知的財産権の確保, 導出状況, 製品化イメージ

| | 発 明 の 名 称 | 出願番号 | 公開番号 | 審査 状況 | 外国/対象国 | 審査 状況 |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------|-----------------------|----------|
| ピタバスタチン封入PLGAナノ粒子関連 | | | | | | |
| 1 | スタチン封入ナノ粒子含有 医薬組成物 | PCT/JP2007/ 066926 | WO2008/ 026702 A1 | 登録 | US, EP, CN, IN, KR | CN 登録 |
| 侵害特許は無い | | | | | | |

●特許の権利マネジメント

- －特許の権利：九州大学20%，興和(株)40%，(株)先端医療開発40%
- －九州大学の上記特許の権利を連携企業である興和(株)ならびに(株)先端医療開発に譲渡し、企業の本格的参入による実用化の加速を推進する

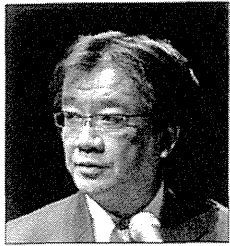
●製品化イメージ

- －競合品は無い。急性心筋梗塞症の革新的治療薬(ブロックバスター)の可能性。
- －他臓器の虚血再灌流傷害，心臓手術中心筋保護，心肺停止患者

* * *

虚血肢治療用低侵襲ナノ粒子製剤の実用化

Innovative less invasive nanomedicine for Critical Limb Ischemia



江頭 健輔^{1)*1} 中野 覚^{2)*2} 松本 拓也³⁾ 前原 喜彦⁴⁾
Kensuke Egashira Kaku Nakano Takuya Matsumoto Yoshihiko Maehara

- 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
- 3) 九州大学大学院医学研究院消化器・総合外科 講師
Lecturer, Department of Surgery and Science, Graduate of Medical Sciences, Kyushu University
- 4) 九州大学大学院医学研究院消化器・総合外科 教授
Professor, Department of Surgery and Science, Graduate of Medical Sciences, Kyushu University

1. 標的疾患と治療法開発の現状

虚血肢治療用低侵襲ナノ粒子製剤ですが、試験物はピタバスタチン封入PLGAナノ粒子製剤です。対象疾患は重症虚血肢です。重症虚血肢は下肢動脈の閉塞によって生ずる重症な虚血性疾患です。生活の質が著しく障害されるだけでなく、生命予後も悪い疾患です。外科的手術や血行再建術を実施しても、虚血が残存し症状が回復しない患者では下肢の切断や心筋梗塞や脳卒中などの合併症の頻度が高く、その結果、予後はさらに悪くなることが知られています。重症虚血肢患者に有効な内科的治療法は開発されていないのが現状です。

その解決策として治療的血管新生療法が登場しました (Fig. 1)。血管新生因子や細胞を局所に投与することによって虚血臓器に新しい血管を新生させ虚血を改善させる治療法です。しかし、2000年以降行われた治療的血管新生療法の臨床試験では有効性が示されていません。あるいは効果があっても、それが不十分なため、一般医療と

して普及していないのが現状です。

2. 治療戦略

私たちは、血管新生のプロセスにおいて血管内皮細胞が責任細胞、最も重要な細胞であることから、血管新生促進因子をナノDDS (Drug Delivery System) により血管内皮細胞に選択的に送達させることで、より効果的で副作用の少ない治療的血管新生療法を達成出来るのではないかと考えました (Fig. 2)。

3. 開発製品の概要

従来の治療的血管新生療法では血管新生因子を虚血臓器 (下肢) に投与しますが、側副血行路の発達が不十分であり、治療因子を増量すれば有効性が向上するというわけでもありません。私たちの血管内皮細胞選択的ナノDDS技術を用いてピタバスタチンを投与すると、虚血臓器においてターゲット細胞である内皮細胞に選択的に送達され、有効性が認められました。また、ピタバスタ

*1 研究代表者兼発表者 (写真)。

*2 プロジェクトマネージャー。

Fig. 1 治療的血管新生療法

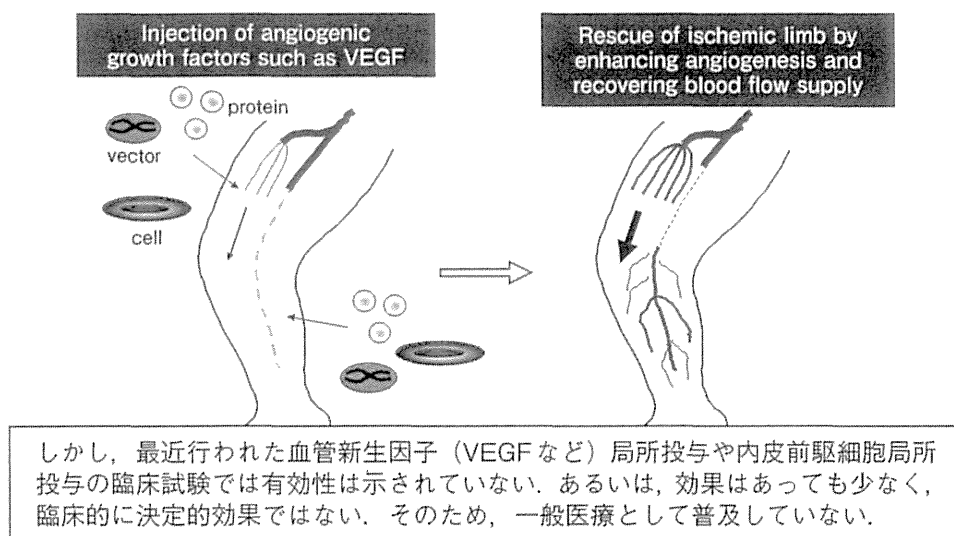


Fig. 2 血管内皮細胞選択的ナノ DDS 技術

より効果的かつ安全安心の治療的血管新生を達成

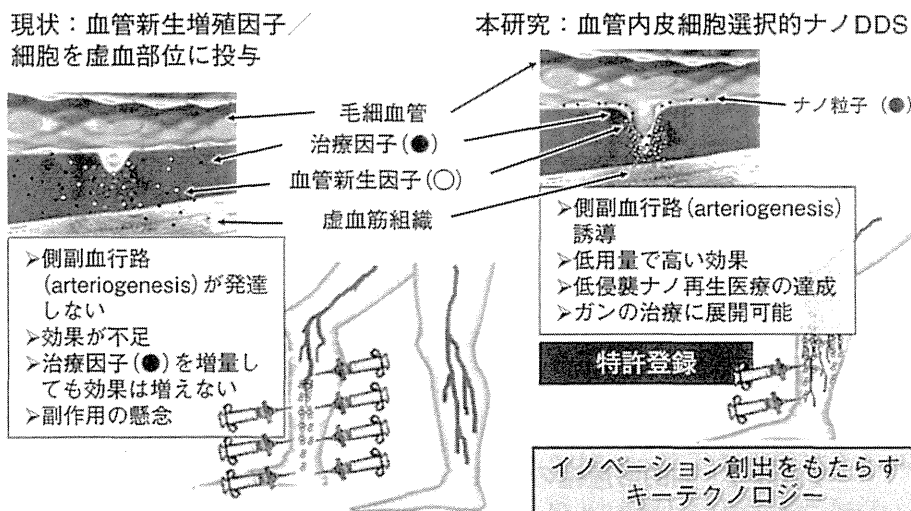
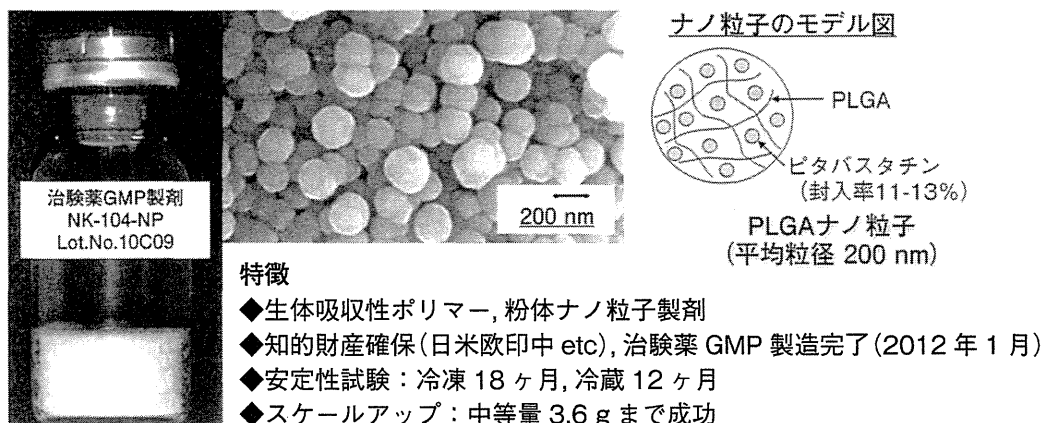


Fig. 3 ピタバスタチン封入生体吸収性ポリマー (PLGA) ナノ粒子製剤の GMP 製造完了



チン封入PLGAナノ粒子製剤の治験薬GMP製造が完了しました (Fig. 3)。本治験薬は粉体であり、生体吸収性のポリマーであるPLGAを用いています。

4. 開発の進捗状況

知的財産権は既に確保され、治験届を提出し、慢性重症虚血肢に対するナノ粒子製剤の5日間筋肉内反復投与の用量漸増による医師主導治験を昨年 (2012年) 8月から開始しました (Fig. 4)。現在、

第1症例の投与が終わり、今後、用量を漸増し、早い段階で次相に進めればと考えています。

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、重症虚血肢の革新的治療薬の可能性がります。競合品はFGF-2 (塩基性線維芽細胞増殖因子)、HGF (hepatocyte growth factor) の遺伝子治療です。私たちのナノ治療の特徴は、虚血肢だけでなく心臓等の他の臓器の血管新生の療法にも応用出来るのではと考えています。

Fig. 4 慢性重症虚血肢に対するNK-104-NPの5日間筋肉内反復投与の用量漸増による医師主導治験のデザイン

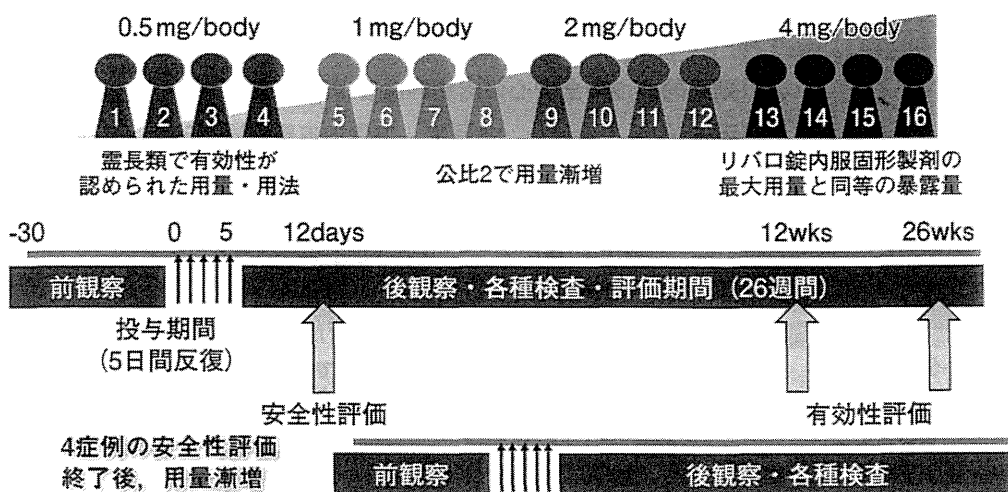


Table 1 知的財産権の確保、導出状況、製品化イメージ

| 発明の名称 | 出願番号 | 公開番号 | 審査状況 | 外国/対象国 | 審査状況 |
|---------------------|-------------------|------------------|------|--------------------|------|
| ピタバスタチン封入PLGAナノ粒子関連 | | | | | |
| 1 スタチン封入ナノ粒子含有医薬組成物 | PCT/JP2007/066926 | WO2008/026702 A1 | 登録 | US, EP, CN, IN, KR | CN登録 |
| 侵害特許は無い | | | | | |

●特許の権利マネジメント

- 特許の権利：九州大学 20%，興和(株) 40%，(株)先端医療開発 40%
- 九州大学の上記特許の権利を連携企業である興和(株)ならびに(株)先端医療開発に譲渡し、企業の本格的参入による実用化の加速を推進する

●製品化イメージ

- 重症虚血肢の革新的治療薬の可能性。競合品：センダイ FGF-2 遺伝子治療, HGF 遺伝子治療, など。
- 心臓など他臓器の治療的血管新生療法に適用可能

重症肺高血圧症用ナノ粒子製剤の実用化と臨床試験

医学研究院循環器病先端医療研究開発学教授 江頭 健輔(昭56卒)

同准教授 中野 覚

はじめに

重症肺高血圧症は生活の質（QOL）の悪化をもたらす生命予後不良の希少難治性疾患であり、かつ、効果的治療法が無い疾患です。ホスホジエステラーゼV阻害薬、エンドセリン受容体拮抗薬などの血管拡張薬が新しい治療法として導入されていますが、その効果は限定的（5年生存率<50%）です。従って、肺小動脈病変の進行を阻止し、さらには、治療に導く事の出来る、効果的かつ安心安全の医薬品の実用化が期待されています。

スタチン封入PLGAナノ粒子製剤の開発

重症肺高血圧症に対する新規治療法開発のために、生体吸収性高分子ポリマー（PLGA）製ナノ粒子を用いたドラッグデリバリーシステム（DDS）を開発しました。このナノDDSによって、治療薬を肺動脈病変（肺動静脈平滑筋細胞、炎症性細胞など）へ安定送達させる事が出来ます。私たちは、LDL-コレステロール低下薬として世界で広く用いられているスタチン（HMG-CoA還元酵素阻害薬）の血管保護作用に注目しました。スタチンには、LDL-コレステロール低下作用とは独立した多面的作用として血管内皮細胞機能改善作用、血管平滑筋細胞増殖抑制作用、抗炎症作用を有しています。

基礎研究の結果、（1）ピタバスタチンがもっとも強力な血管保護作用を有すること、（2）培養ヒト肺動脈平滑筋細胞においてピタバスタチン封入ナノ粒子製剤はピタバスタチン単独と比較して、より優れた細胞増殖抑制作用を示すこと、（3）本製剤の静脈内投与によって肺高血圧症モデルの病態が著明に改善すること、を明らかにしました（図1）。

臨床への橋渡し研究

ピタバスタチン封入PLGAナノ粒子製剤を臨床応用するために、GLP（Good Laboratory Practice）準拠での各種安全性試験、安定性試験、治験薬のGMP（Good Manufacturing Practice）準拠での製造等を行ってきました。その結果、治験薬としての安全性に大きな問題はないことを明らかにしました。規制当局である独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）との2回にわたる対面助言を行い、現状の非臨床試験の成果をもとにして、医師主導治験（健常成人男性を対象とした第I相試験）を実施する事に科学的、倫理的に問題はないことを合意いたしました。本治験は、健康成人男性日本人志願者を対象として、本製剤の安全性および薬物動態を検討することを目的としています。九州大学病院ARO次世代医療センターの支援を受けて治験の準備を進めています。平成26年度中には医師主導治験が終了し、その安全性を明らかにする予定です。医薬品として承認申請を得て、実用化に結びつくまでの道のりは未だ長く、少なくとも5年以上を要すると思われます。

本剤が実用化されれば、重症肺高血圧症に対する革新的低侵襲治療法となり、患者のQOL・生命予後の改善や早期社会復帰を可能とする高効果・低副作用の低侵襲医療が達成できるでしょう。日

本発の革新的低侵襲ナノ治療が創出される点で臨床的意義は大きいと期待されます。

また、本剤は肺高血圧症以外の難治性肺疾患（特発性間質性肺炎・肺線維症、びまん性汎細気管支炎）や閉塞性肺疾患、肺ガンの治療にも応用できることから、重要性が高いとされています。

スタチン封入ナノ粒子製剤の臨床開発

世界特許取得、治験薬GMP製造、第I相医師主導治験開始（平成26年度）

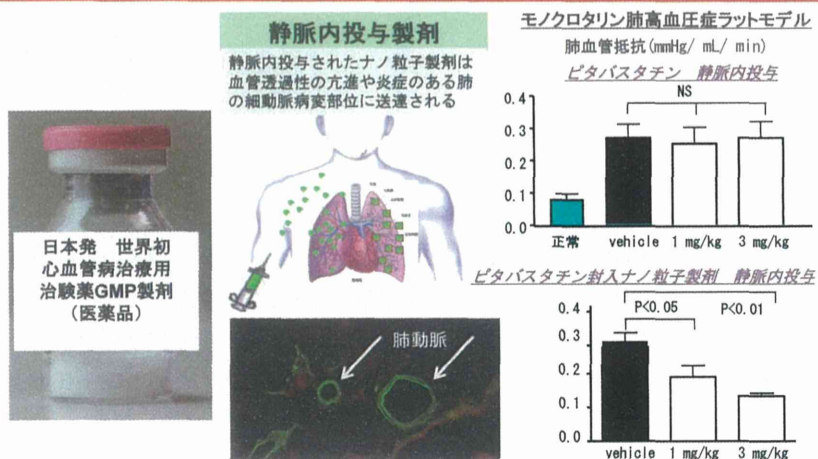


図1

本研究は革新的技術の開発を阻害している要因を克服するため、研究資金の特例や規制を担当する部局との並行協議などを試行的に行う「先端医療開発特区」、いわゆる「スーパー特区」の研究課題の一環として行われていることから、政府からもその進捗状況、研究開発内容について注目されています。

平成25年 5月19日、安倍晋三内閣総理大臣が九州大学病院と医学研究院を視察のため訪れました。有川総長、久保病院長、片野医学研究院院長等の挨拶を受けた後、本研究概要説明をいたしました。安倍総理自ら実験装置の前に立ち、日本発世界で最初のナノ粒子製剤を手に取り、ご確認されました。また、日本の国策として難病の先端医療研究の重要性について、活発な意見交換を行いました。

さいごに重症肺高血圧症という難病で希少疾病に対する新規医薬品を臨床開発し、実用化するまでにはいくつもの大きなハードルをクリアしていく必要がありますが、一刻も早く本疾患で苦しんでいる患者様やそのご家族様に本製剤を還元し、生命予後改善、QOL向上をめざして、一心に取り組みたいと思っております。



江頭健輔教授による説明

インフォメーション

[2013.05.21]

安倍晋三内閣総理大臣が 九州大学を視察

平成25年 5月19日(日)、安倍晋三総理大臣が九州大学病院と医学研究院を視察のため訪れました。

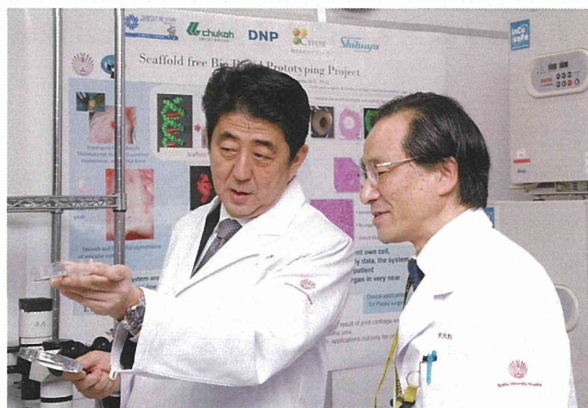
安倍総理は首相就任後18日、初めて九州入りし、大分県、佐賀県で各種施設を見学した後、19日午後、先端医療の現場視察として、九州大学病院を訪問。

有川総長、久保病院長、片野医学研究院長等の挨拶を受けた後、病院外来診療棟 5階会議室で石橋達朗眼科学教授、江頭健輔循環器病先端医療研究開発学教授、田口智章小児外科学教授のプレゼンテーションによる研究概要説明を受けました。

眼科領域の難病に対する遺伝子治療の日本で初めての臨床応用となった、石橋教授の「網膜色素変性症に対する遺伝子治療の臨床研究」についての説明後、江頭教授の「重症肺高血圧症治療用ナノ粒子製剤の実用化と臨床試験」の発表では、安倍総理自ら実験装置の前に立ち、日本発で世界で初めての心血管病治療用ナノ粒子製剤を手に取り確認しました。また田口教授は、腸が機能しない難病であるヒルシュスプルング病類縁疾患に対して、幹細胞を用いた新しい治療法の開発について紹介しました。

プレゼンテーション後は安倍総理と有川総長、久保病院長、3人の研究発表者らは先端医療の研究現場の状況や、日本の社会と経済における難病の先端医療研究の重要性について、活発な意見交換を行いました。

首相は視察後の記者団に対するコメントの中で、大学の研究施設や医療現場などを見て、



共同実験室で田口教授の幹細胞の基礎実験を見学する安倍総理



視察を終えて記者団の質問に答える安倍総理