

機関番号：17102
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790732
 研究課題名 (和文) 間欠式パルスインフュージョン DDS カテーテルを用いた低侵襲血管内ナノ医療の創製
 研究課題名 (英文) Development of a Novel Minimally Invasive Therapy Based on Pulse-infusion DDS Catheter for Coronary Arterial Diseases
 研究代表者
 中野 覚 (NAKANO KAKU)
 九州大学・大学院医学研究院・学術研究員
 研究者番号：30420607

研究成果の概要 (和文)：

薬剤送達性を有する生体吸収性ナノ粒子製剤を開発した。さらに、インフュージョンカテーテルシステムを用いて蛍光マーカー封入ナノ粒子をブタ傷害冠動脈内に投与した結果、最大で 28 日間まで停留することを明らかにした。臨床応用を鑑み、ブタ冠動脈内に治療因子を封入したナノ粒子をバルーン傷害部位へ送達させたところ、対照群に比べ有意に新生内膜形成が抑制された。

研究成果の概要 (英文)：

We developed bio-absorbable nanoparticles which has efficacy drug delivery system. Furthermore, fluorescent marker incorporated nanoparticles were administrated into balloon injured rabbit and porcine coronary arteries using an infusion catheter system. Nanoparticles were observed and retentive until up to 28 days. Drug incorporated nanoparticles significantly attenuated neointimal formation as compared with vehicle control group.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子血管病態学、プラーク破綻、マクロファージ、ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームの増加と超高齢化社会の到来により動脈硬化性疾患が増加しており、その克服は国家的課題となっている。動脈硬化性疾患の治療としてバルーンやステントで狭窄・閉塞を拡張する経皮的冠動脈血行再建術 (PCI) が普及している (日本：年間 20 万例、世界：200 万例以上実施)。バルーンやステントによる拡張では再狭窄・再

治療が 20-30%の頻度で生じるという問題があった。その解決策として免疫抑制剤あるいは抗がん剤をコーティングした薬剤溶出ステント (DES) が登場し、再狭窄率は相当減少した。しかし、DES では治療できない病変 (細径、びまん性、分枝部 etc) も多い。さらに、2006 年、DES の重篤な副作用 (遅発性血栓) が指摘され注目されている。その主因は、薬剤あるいはポリマーに起因する内皮再

生遅延による血栓であり (Joner M et al. JACC. 2006;48:193-202)、一旦発症すれば殆どの患者は急性心筋梗塞・死に至ることから、極めて重要な臨床的問題である (Shuchman M. NEJM 2006; 355:1949)。

上記問題の解決のためには、DES とは異なるドラッグデリバリーシステム (DDS) を基盤とする動脈硬化性疾患に対する低侵襲治療法の開発が必要と考えられる。

申請者らは、ナノ医工学を基盤にして生体吸収性高分子ポリマー (PLGA) 製ナノ粒子を製造し、血管内投与によって血管壁に効果的に治療因子を送達できるナノ DDS 技術を開発した (Circulation 2008, JACC 2008:研究業績参照)。このナノ DDS 技術には以下の独創性と特色がある: ①生体吸収性であり、ペプチド・水溶性因子の封入が可能; ②優れた細胞導入効率と細胞内安定性; ③封入した治療因子は細胞内で安定して徐放 (細胞内 DDS)、により高効果・低副作用、④ナノ粒子製造技術と用途特許は出願・公開済み。マウス大腿動脈ワイヤー傷害モデルを用いて蛍光マーカー (FITC) 封入ナノ粒子製剤を血管内腔に 5 分間投与後に FITC の存在を追跡したところ、長期間 (28 日以上) に渡り血管壁に FITC が停留することを明らかにした。上記のナノ DDS 技術を臨床応用するには、ヒト冠動脈と比べて血管壁が薄いマウスモデルを用いた血管結紮実験の成果では不十分であり、中・大型動物を用いた有効性試験が必要である。さらに、ヒト冠動脈内にナノ粒子を低侵襲に送達するシステム (例: DDS カテーテル) の開発が必須である。

そこで、ダブルバルーン DDS カテーテルとパルス発生装置を組み合わせた間欠式パルス・インフュージョンカテーテルシステムを開発した。本システムは、ナノ粒子製剤のナノ DDS とパルスによる機械的 DDS の融合によるダブル DDS として機能する点が特徴である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が研究開発した間欠式パルス・インフュージョン DDS カテーテルシステム (ダブル DDS) の有効性を明らかにし、低侵襲ナノ治療機器の実現を目指した臨床橋渡し研究の基盤とすることである。具体的には、以下の点を明らかにする。

(1) 治療因子封入ナノ粒子の最適化

異なる処方で作製したナノ粒子の平滑筋増殖抑制を培養細胞レベルで検証する。

(2) パルス・インフュージョン投与後のナノ粒子の分布と局在の追跡

高流量のインフュージョンシステムを用いてナノ粒子を傷害血管壁内に送達し、その局在と時間経過を検討する。疾患モデルとして高脂血症ウサギバルーン傷害モデルを用いた。

(3) 治療因子封入ナノ粒子製剤のパル

ス・インフュージョンシステムを用いた有効性試験

治療因子としてピタバスタチンを選択し、本システムの有効性を培養細胞レベルならびに動物モデル (バルーン傷害後新生内膜形成) を用いて明らかにする。さらに、臨床への橋渡し研究を鑑み、ヒト冠動脈と最も類似しているとされるブタ冠動脈を用いて本システムの治療効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 治療因子封入ナノ粒子の最適化

PLGA をアセトンに溶解した後、エタノールに溶解した FITC あるいはピタバスタチンカルシウムを異なる処方で添加し、ポリマー溶液とした。これを 40°C で 2w t % のポリビニルアルコール水溶液 50 ml を攪拌しつつ、一定速度で滴下した。その後、アセトンとエタノールを留去して得られた PLGA ナノ粒子懸濁液は遠心分離法で PLGA ナノ粒子の沈殿を回収し、精製水中で再懸濁させ、PLGA 表面に吸着しなかった余剰な PVA を除去した。ナノ粒子の平均粒子径の測定は、動的光散乱式粒度分布測定装置 (マイクロトラック UPA150、日機装) を用いて行った。ヒト冠動脈血管平滑筋細胞 (Lonza, Walkersville) を平滑筋細胞用増殖培地 (SmGM-2) (Lonza) に懸濁、5000cells/well になるよう培養プレートに播種し、37°C、5 %CO₂ 下で培養した。24 時間後、平滑筋細胞用基礎培地 (SmBM) にペニシリンストレプトマイシン (PS) と胎児ウシ血清 (FBS) を最終濃度がそれぞれ 1 % および 0.1 % となるように添加した培養液に交換し、さらに 48 時間培養した。その後、1 % PS / 10 % FBS / SmBM にナノ粒子懸濁液を所定の最終濃度になるように添加したものと交換し、培養をさらに 96 時間行った。96 時間後、Diff-Quick (Sysmex, USA) にて細胞を固定、染色した。顕微鏡にて細胞数の計数を行い、細胞増殖抑制を評価した。

(2) パルス・インフュージョン投与後のナノ粒子の分布と局在の追跡

日本白色種ウサギに ketamine (35mg/kg) および xylazine (3mg/kg) の筋肉内投与にて行い、鎮静後、pentobarbital (15mg/kg) を静脈内投与し麻酔した。深麻酔下において、頸部の皮膚を切開し鋭的・鈍的に片側内頸動脈を露出させ、cut-down 法にて 4Fr. シースを挿入した。X線透視下においてガイディングカテーテルを用いてウサギ両側腸骨動脈をフォガティールバルーンカテーテルを用いて血管内皮細胞を擦過した。直後に間欠式パルス・インフュージョンカテーテルを用いて、蛍光マーカーである FITC ナノ粒子を投与し、直後、7 日後、14 日後、21 日後および 28 日後に剖検を行い、投与部位の凍結切片を作製し、FITC のシグナルの検出を蛍光顕微鏡を用

いて行った。

ブタにおいても同様に深麻酔下において、右頸動脈アプローチにてブタの左前下降枝および左回旋枝に artery / balloon ratio が 1.1-1.3 となるように過拡張傷害を計 3 回加えた (1 分 inflation、1 分 deflation)。その直後にナノ薬剤を同部位にパルス・インフュージョンカテーテルを用いて投与し、28 日後に剖検を行い、FITC のシグナルの検出を蛍光顕微鏡を用いて行った。

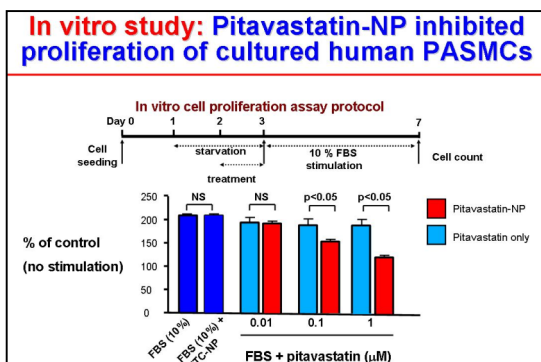
(3) 治療因子封入ナノ粒子製剤のパルス・インフュージョンシステムを用いた有効性試験

バルーン傷害および治療因子投与の 3 日前よりバファリン 330 mg およびブラビックス 75 mg を経口投与した。バファリンは剖検日まで、ブラビックスはバルーン傷害後 10 日間投与した。ケタラール 500 mg および硫酸アトロピン 0.5 mg を導入麻酔に用い、さらにペントバルビタール 500 mg を耳介静脈より静注し深麻酔を行った。人工管理下に、右総頸動脈より 10 Fr シースカテーテルを挿入した。続いて 8 Fr ガイディングカテーテルを用いて 0.18 inch ガイドワイヤを冠動脈内に挿入し 4Fr. フォガティカテーテルを用いて左前下降枝および左回旋枝に artery / balloon ratio が 1.1-1.3 となるように過拡張傷害を計 3 回加えた (1 分 inflation、1 分 deflation)。その直後にナノ薬剤を同部位に投与した。ナノ粒子投与後 28 日後に左頸動脈アプローチにて定量的冠動脈造影による評価および 256 列 iCT を使用し、リモデリングインデックスを計測した。次いで、動物を過麻酔により安楽死させ、傷害および治療因子を投与した冠動脈を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定した。

固定後、常法によりパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリンエオシン染色およびエラスチカワングーソン染色を行い、新生内膜の定量を行った。

4. 研究成果

(1) 薬剤封入ナノ粒子の製剤化と最適化
薬剤を封入した生体吸収性 PLGA ナノ粒子を作製し、スクリーニングすることにより最適なナノ粒子製剤を探索研究した。水中エマルジョン溶媒拡散法を用いて生体吸収性高分子ポリマーである PLGA 製ナノ粒子を作製した。その結果、平均粒径 200 nm の PLGA ナノ粒子に蛍光マーカー (FITC)、あるいは、スタチンを封入することに成功した。



ピタバスタチン封入 PLGA ナノ粒子製剤は、ピタバスタチンだけでは平滑筋増殖抑制が生じない低濃度で平滑筋増殖抑制効果を誘導することを明らかにした。この結果は、in vitroにてピタバスタチン封入PLGAナノ粒子製剤は血管保護薬として優れていることを示している (左図: in vitro study)。

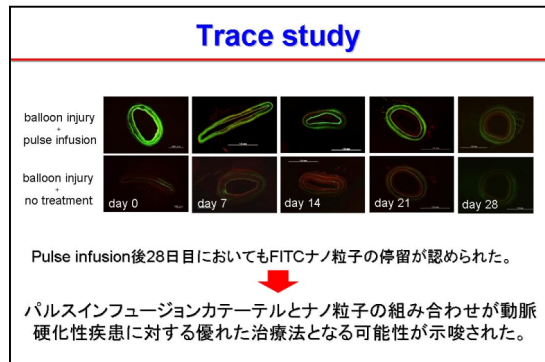
ピタバスタチン封入 PLGA ナノ粒子製剤が細胞内に送達された後、ナノ粒子からピタバスタチンが細胞内に徐放 (細胞内 DDS) されることによって血管保護作用が惹起されたものと考えられる。

(2) パルス・インフュージョン投与後のナノ粒子の分布と局在の追跡

耐圧性に優れた高流量のインフュージョン装置の開発は完了している。本システムを用いてナノ粒子を傷害血管壁内に送達し、その局在と時間経過を明らかにした。疾患モデルとして、まず、高脂血症ウサギバルーン傷害モデルを用いた。間欠式パルスインフュージョンカテーテルシステムを用いて FITC 封入ナノ粒子をウサギ頸動脈に投与するとナノ粒子が血管壁、特に、中膜に効率的に送達され、最大で 28 日間停留ことを明らかにした (下図: Trace study)。同様に、ブタ冠動脈でもパルスインフュージョン後 28 日まで、中膜に送達、停留する事を明らかにした。

(3) 治療因子封入ナノ粒子製剤のパルス・インフュージョンシステムを用いた有効性試験

臨床への橋渡し研究を鑑み、本ダブル DDS を



用いてブタ冠動脈内に治療因子 (ピタバスタチン) を封入したナノ粒子をバルーン傷害部位へ送達させたところ、対照群に比べ有意に新生内膜形成が抑制効果されることが明らかになった。

本研究の結果から、本ナノダブル DDS デバイスは、病変局所へ高濃度・低用量の薬剤を送達するシステムであり、他の疾患への応用が可能であることが見出された。例えば、虚血性疾患 (心臓・脳・下肢) へ、血管保護因子封入ナノ粒子を送達する事により、虚血を改善する事が可能である。また、腫瘍に対して

も、カテーテルを用いて腫瘍組織局所へ、血管新生阻害因子あるいは抗がん剤封入ナノ粒子を送達させることにより、腫瘍組織選択的に、低侵襲・低副作用な治療に発展させる事が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ①. Oda S, Nagahama R, Nakano K, Matoba T, Kubo M, Sunagawa K, Tominaga R, Egashira K: Nanoparticle-Mediated Endothelial Cell-Selective Delivery of Pitavastatin Induces Functional Collateral Arteries (Therapeutic Arteriogenesis) in a Rabbit Model of Chronic Hindlimb Ischemia. *J Vasc Surg*. 2010; 52(2): 412-420.
- ②. Chen L, Nakano K, Kimura S, Matoba T, Iwata E, Miyagawa M, Tsujimoto H, Nagaoka K, Kishimoto J, Sunagawa K, Egashira K: Nanoparticle-Mediated Delivery of Pitavastatin Into Lungs Ameliorates the Development and Induces Regression of Monocrotaline-Induced Pulmonary Artery Hypertension. *Hypertension*. 2011; 57(2): 343-350.
- ③. Kimura S, Egashira K, Chen L, Nakano K, Iwata E, Miyagawa M, Tsujimoto H, Hara K, Morishita R, Sueishi K, Tominaga R, Sunagawa K: Nanoparticle-Mediated Delivery of Nuclear Factor κ B Decoy Into Lungs Ameliorates Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension. *Hypertension*. 2009; 53(5): 877-883.
- 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 electrodeposit coating technology: Efficient and safe nano-drug delivery via bioabsorbable polymeric nanoparticle-eluting stents in porcine coronary arteries. *J Am Coll Cardiol: Cardiovascular Intervention*. 2009; 2(4): 277-283.
- ⑤. Kubo M, Egashira K, Inoue T, Koga J, Oda S, Chen L, Nakano K, Matoba T, Kawashima Y, Hara K, Tsujimoto H, Sueishi K,

Tominaga R, Sunagawa K: Therapeutic Neovascularization by Nanotechnology-Mediated Cell-Selective Delivery of Pitavastatin into the Vascular Endothelium. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29: 796-801.

- ⑥. 中野 覚、江頭健輔：総説 ナノテクノロジーの循環器疾患への応用. 呼吸と循環 医学書院 2010 ; 58(5) : 495-501

[学会発表] (計6件)

- ①. Ling Chen, Kaku Nakano, Tetsuya Matoba, Kenji Sunagawa, Kensuke Egashira : Pitavastatin-incorporated Nanoparticle-eluting Stents Attenuate in-stent Stenosis without Delayed Endothelial Healing Effects of Sirolimus-eluting Stent Sites in a Porcine Coronary Artery Model、第19回 International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society (2010年9月26日、福岡)
- ②. Kaku Nakano, Tetsuya Matoba, Kenji Sunagawa, Kensuke Egashira : Pitavastatin incorporated nanoparticle-eluting stents attenuate in-stent stenosis without anti-healing effects induced by sirolimus-eluting stents (Cypher) in porcine coronary artery model、第74回日本循環器学会総会・学術集会 (2010年3月7日、京都)
- ③. Kaku Nakano, Kensuke Egashira : Pitavastatin Incorporated Nanoparticle-Eluting Stent Attenuates In-Stent Stenosis, and Prevents Adverse Effects of Sirolimus-Eluting Cypher Stent in Porcine Coronary Artery Model、第41回日本動脈硬化学会 (2009年7月17日、山口)
- ④. Kaku Nakano, Kensuke Egashira : Pitavastatin has most Potent Pro-healing Effects on Endothelial Cells and Inhibitory Effects on Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells -A Potential Treatment Strategy for Drug-Eluting Stents、第41回日本動脈硬化学会 (2009年7月17日、山口)
- ⑤. 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 electrodeposit coating technology: Efficient and safe nano-drug delivery via bioabsorbable polymeric nanoparticle-eluting stents in porcine coronary arteries、第41回日本動脈硬化学会(2009年7月17日、山口)

- ⑥. 中野覚、月江教昭、江頭健輔：スタチン封入ナノ粒子溶出ステントは血管修復を促進しステント内狭窄を抑制する—シロリムス溶出ステントとの比較試験—、第17回日本血管生物医学学会学術集会(2009年10月8日、東京)

[図書](計2件)

- ①. 中野覚、江頭健輔：薬剤溶出ステントと遅発性血管症—DESの陰から光を探る—。：ナノDDSステントの創製と臨床応用 血管医学 メディカルレビュー社 2009；10(2)：71(179)-75(183)
- ②. 中野覚、江頭健輔：次世代型冠動脈ステント開発の現状と展望. Medical View Point 株式会社医事出版社 2009；30(6)：3

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://www.med.kyushu-u.ac.jp/cardiol/1_sentaniry/staff/index2.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 覚 (NAKANO KAKU)

九州大学・大学院医学研究院・学術研究員

研究者番号：30420607

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：