

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：17102
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790863
 研究課題名（和文） 脈波衝撃投与DDSカテーテルとナノDDSの融合による新しい血管内治療の研究開発
 研究課題名（英文） Site Specific Delivery of Pitavastatin Using an Innovative Combination Drug Delivery System Attenuates Neointima Formation after PCI in Porcine Coronary Arteries
 研究代表者
 中野 寛（NAKANO KAKU）
 九州大学・医学研究院・准教授
 研究者番号：30420607

研究成果の概要（和文）：

ステントによる治療適応にならない動脈硬化病変が多く存在する。このような重症病変にナノ粒子を送達するための脈波衝撃投与 DDS カテーテルを開発した。ブタ冠動脈モデルにピタバスタチンナノ粒子を選択的に投与すると新生内膜の形成が抑制された。以上の結果から、ピタバスタチンナノ DDS は経皮的血行再建術後に生ずる新生内膜の形成を抑制することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

There are unmet needs of catheter-based treatment of atherosclerotic complex lesions. We developed a new catheter-based drug delivery system (DDS) called pulse wave infusion catheter. Porcine coronary arteries were injured by balloon catheter and thereafter saline, NP containing FITC or pitavastatin was injected with the pulse wave infusion catheter. Treatment with Pitava-NP attenuated neointima formation than saline group. Intramural delivery of pitavastatin with this innovative DDS inhibited neointima formation after PCI in porcine coronary arteries.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：ナノテク、DDS、低侵襲医療

1. 研究開始当初の背景

我が国は超高齢化社会を迎え、動脈硬化性疾患（再狭窄、心筋梗塞、脳卒中、末梢動脈疾患など）が死因の約 1/3 を占めるに至り、患者の生活の質の低下をもたらしている。動脈硬化性狭窄の治療としてバルーンやステントで狭窄を拡張する経皮的カテーテル治療が普及している（日本：年間 20 万例、世界：200 万例以上実施）。

最近、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、カテーテル治療の未解決の問題（アキレス腱）であった再狭窄は減少した。しかし、2006 年以降、DES 使用後の安全性の問題（遅発性血栓）が注目されている。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)。したがって、DES 使用後には抗血小板薬を長期にわたって服用する必要がある (患者の負担と出血のリスクが増加)。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。

上記問題の解決のためには、DES とは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低侵襲医療の研究開発が必要と考えられる。申請者らは、ナノ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 2009:研究業績参照、国際特許公開済み)。

ウサギ頸動脈バルーン傷害モデルを用いて、外科的に血管を露出させ結紮後に、蛍光マーカー (FITC) 封入ナノ粒子製剤を血管内腔に投与し、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。このナノ DDS 技術を臨床応用するには、外科的血管手術を要しないカテーテルによる血管内アプローチが必要である。さらに、大動物冠動脈モデルにおいて追跡実験と有効性試験を実施することが重要である。これらの課題を解決するアプローチとして申請者らは、血管内にナノ粒子を効果的に送達するシステムを開発した。このシステムは、ダブルバルーン DDS カテーテルと脈波発生装置を組み合わせた脈波衝撃投与 DDS カテーテルシステムである。本システムは、ナノ粒子製剤のナノ DDS と脈波による機械的 DDS の融合によるダブル DDS として機能する点の特徴である。予備実験において、ナノ粒子を血管内に脈波衝撃投与することが、非衝撃投与と比較して、格段に送達効率が高まることを確認した

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が研究開発した脈波衝撃投与 DDS カテーテルシステムによるナノ粒子製剤投与の有効性を明らかにし、低侵襲ナノ医療デバイスの実用化を目指した臨床橋渡し研究の基盤 (Proof of Concept; POC 取得) とすることである。具体的には、以下の2点を明らかにする。

脈波衝撃投与後のナノ粒子の分布と局在：最も効率よくナノ粒子を送達できる脈波速度、間隔、投与量を探索する。

治療因子封入ナノ粒子による有効性試験：血管保護作用を有する HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン) を選択し、本システムの有

効性とメカニズムを培養細胞レベルならびに動物モデル (ブタ冠動脈バルーン傷害後新生内膜形成およびブタ冠動脈ステント内再狭窄モデル) を用いて明らかにする。

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) 脈波衝撃投与後のナノ粒子の分布と局在の追跡

家畜ブタに ketamine (35mg/kg) および xylazine (3mg/kg) の筋肉内投与にて行い、鎮静後、イソフルランによるガス麻酔により深麻酔下にした。その後、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 10 Fr. 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冠動脈をバルーンカテーテルを用いて血管内皮細胞を擦過した。直後に脈波衝撃投与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。

(3) ピタバスタチン封入ナノ粒子製剤の脈波衝撃投与カテーテルを用いた有効性試験

バルーン傷害およびピタバスタチンナノ粒

子製剤投与の3日前よりバファリン 330 mg およびプラビックス 75 mg を経口投与した。深麻酔下、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バルーン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)。その直後にピタバスタチンナノ薬剤を同部位に投与した。ナノ粒子投与後 28 日後に、動物を過麻酔により安楽死させ、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

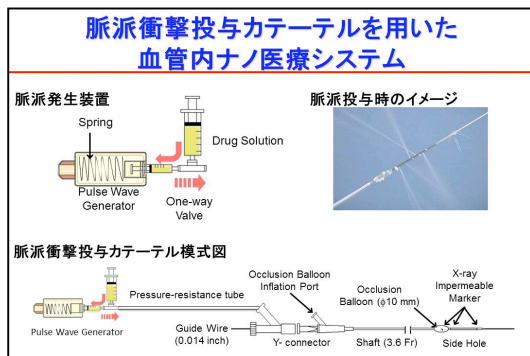
(1) 治療因子封入ナノ粒子の最適化

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。

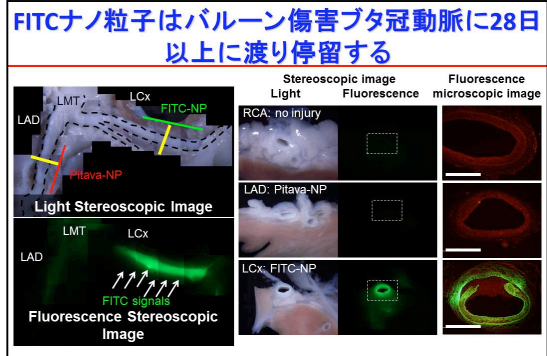
ピタバスタチン封入 PLGA ナノ粒子製剤が細胞内に送達された後、ナノ粒子からピタバスタチンが細胞内に徐放 (細胞内 DDS) されることによって血管保護作用が惹起されたものと考えられる。

(2) 脈派衝撃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脈派衝撃投与カテ



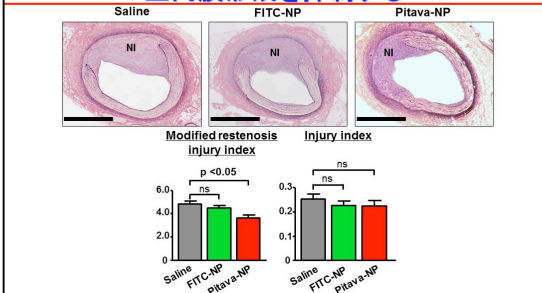
ーテルの開発は完了した (図)。本システムを用いてナノ粒子を傷害血管壁内に送達し、その局在と時間経過を明らかにした。疾患モデルとして、ブタ冠動脈バルーン傷害モデルを用いた。脈派衝撃投与カテーテルシステムを用いて FITC 封入ナノ粒子をバルーン傷害後の冠動脈に投与するとナノ粒子が血管壁、特に、中膜に効率的に送達され、最大で 28 日間停留ことを明らかにした。



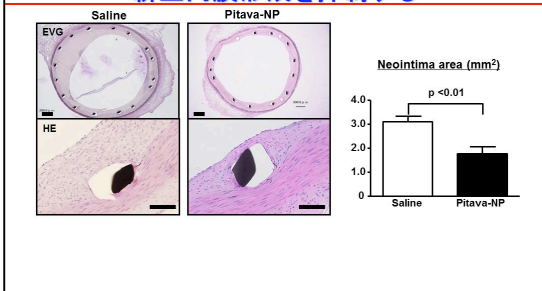
(3) ピタバスタチン封入ナノ粒子製剤の脈派衝撃投与カテーテルを用いた有効性試験

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およびステント留置部位へ送達させたところ、いずれのモデルにおいても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。そのメカニズムにピタバスタチンの血管平滑筋細胞の過剰な増殖抑制が大きく寄与していることを明らかにした。

ピタバスタチンナノ粒子はバルーン傷害後の新生内膜形成を抑制する



ピタバスタチンナノ粒子はステント留置後の新生内膜形成を抑制する



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 3 件)

- ① Tsukie N, Nakano K (2 番目), 他 9 名 : 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(1): 32-45.
DOI : 10.5551/jat.13862
- ② 中野覚、由布威雄、江頭健輔 : ナノ DDS デバイスを用いた血管内治療の臨床応用. Drug Delivery System 日本 DDS 学会 2012; 27(4): 275-282
- ③ Masuda S, Nakano K (2 番目), 他 9 名 : Imatinib Mesylate-Incorporated Nanoparticle-Eluting Stent Attenuates In-Stent Neointimal Formation in Porcine Coronary Arteries. *J Atheroscler Thromb.* 2011; 18(12): 1043-1053
DOI : 10.5551/jat.8730

[学会発表] (計 2 件)

- ① Yufu T, Matoba T, Antoku Y, Nakano K (4 番目), 他 4 名 : A Novel Multi-Targeting Approach for Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury: Nanoparticle-Mediated Delivery of Irbesartan Reduces Ischemia/Reperfusion Injury in Mice, Scientific Sessions 2012 of the American Heart Association (2012 年 11 月 7 日、Los Angeles Convention Center、アメリカ)
- ② 中野覚、江頭健輔 : 医療機器開発の現状

と問題」ピタバスタチン封入ナノ粒子 (ピタバ NP) 溶出ステントの開発と課題 (教育講演)、第 1 回医療機器臨床評価研究会 (2012 年 9 月 22 日、マホロバマインズ三浦)

[図書] (計 2 件)

- ① 中野覚、江頭健輔 : 第 2 章 徐放技術の医療応用 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. ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線 古くて新しいドラッグデリバリーシステム (DDS) メディカル ドゥ 2013 ; 240-245

[その他]

ホームページ等

http://www.med.kyushu-u.ac.jp/cardiol/1_sentaniryoy/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・准教授

研究者番号 : 3 0 4 2 0 6 0 7

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :