冠動脈疾患に対する ナノ粒子・ドラッグデリバリーシステムの開発

九州大学病院 循環器内科^{*1)}・九州大学 循環器病未来医療研究センター 循環器病先端医療研究開発学部^{*2)}的場哲哉^{*1)}・古賀純一郎^{*2)}・中野 寛^{*2)}・江頭健輔^{*2)}

Nanoparticle-Mediated Drug Delivery System for Coronary Artery Disease

Coronary artery disease including acute myocardial infarction is a significant concern in cardiovascular medicine, because of their high acute mortality and morbidity causing lethal heart failure. Atherosclerotic plaque destabilization and rupture are central pathogenesis of acute myocardial infarction, whereas myocardial ischemia-reperfusion injury is another adverse phenomenon in the heart undergoing early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. There are un-met needs for these pathological conditions to be overcome by the use of nanoparticle-mediated drug delivery system (DDS). We provide overview of the mechanistic background for the use of DDS and the efficacy of nano-medicine in preclinical disease models.

冠動脈疾患、特に急性心筋梗塞は急性期死亡率の高さと慢性期の心不全の原因になることから、その予防および治療の改善はわが国の医学の重要な課題である。急性心筋梗塞で問題となる病態は、冠動脈における動脈硬化性プラークの不安定化と破綻であり、一方、発症した急性心筋梗塞における問題は、早期再灌流療法による心筋梗塞縮小効果を妨げる心筋虚血再灌流傷害である。これらの病態に対する薬物療法は un-met medical needs であり、筆者らはナノ粒子を応用したドラッグデリバリーシステムの応用により、冠動脈疾患を含む心血管病におけるナノ医療の実現を目指している。本稿ではその背景およびモデル動物における前臨床試験の成果を紹介する。

Tetsuya Matoba^{*1)}, Jun-ichiro Koga^{*2)}, Kaku Nakano^{*2)}, Kensuke Egashira^{*2)}

Keywords: Atherosclerotic plaque rupture, Ischemia-reperfusion injury, Inflammation, Monocyte/macrophage

1. イントロダクション

近年、我が国は未曾有の超高齢化社会を迎え、動脈硬化の危険因子となる生活習慣病(糖尿病、脂質異常症、高血圧症等)の有病率は高く、動脈硬化性疾患(冠動脈疾患、および脳梗塞)による死亡は年間15万人にも及ぶ(平成23年、厚生労働省の人口動態統計)。冠動脈疾患、特に急性心筋梗塞は急性期死亡率が高く、急性期の死亡を免れても慢性期に心不全をきたすことが問題である。急性心筋梗塞の一次・二次予防効果が示された薬物療法として、脂

質異常症治療薬HMG-CoA還元酵素阻害剤(スタチン)、降圧薬ACE阻害薬/アンギオテンシン受容体拮抗薬、抗血小板薬などがあげられるが、「至適な」薬物療法下でも冠動脈イベントの発症は観察されることから、さらなる薬物療法の改善が求められている。

ドラッグデリバリーシステム(Drug Delivery System: 以下DDS)の既存薬剤への応用は、新薬の開発と並んで薬物療法の効果を改善する手法である。DDS応用の主目的は薬物動態の改善であり、病的状態に陥った細胞・臓器に対して、選択的に治療因子を送達することによって薬物の有効性を改善する一方、標的外臓器への副作用を軽減する。DDSを合目的的に臨床応用するためには、疾患の病態に基づいて有効な治療因子とDDSの動態との

^{*1)} Department of Cardiovascular Medicine, Kyushu University Hospital
〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1

^{*2)} Department of Cardiovascular Research, Development,
and Translational Medicine,
Kyushu University Center for Cardiovascular Disruptive Innovation

組み合わせをデザインすることが重要である。筆者らは、乳酸・グリコール酸共重合体(co-poly-lactic acid/glycolic acid：以下PLGA)を基剤とした生体吸収性ナノ粒子が、心血管病に有効なDDSとして機能し得ることを見出し、応用開発を進めている¹⁾。本稿では急性心筋梗塞の責任病変である動脈硬化性プラーク破綻、および心筋梗塞急性期医療における心筋虚血再灌流傷害に対する、スタチン封入PLGAナノ医療の開発について最新知見^{2,3)}を含めて概説する。

2. 動脈硬化性プラーク破綻の病態

急性心筋梗塞の原因となる動脈硬化性プラークの形成過程において、血管内皮機能障害(内皮由来弛緩因子の産生/機能障害)とそれに続く血管壁の炎症が、動脈硬化初期の重要な段階であると考えられている⁴⁾。末梢血中の単球が単球走化性因子(Monocyte chemoattractant protein-1：以下MCP-1)により動脈硬化病変に遊走しマクロファージへと分化し、酸化脂質の貪食後に泡沫化する。動脈硬化性プラーク内では、活性化したマクロファージが炎症性サイトカイン、ケモカインおよび活性酸素種を産生し、さらに病期が進展すると、線維性被膜の構成成分であるコラーゲン、エラスチンを分解するMatrix Metalloproteinases(MMP)を産生し、プラーク線維性被膜の菲薄化の原因となる。また、マクロファージのアポトーシスにより壊死性コアが増大し、いわゆる不安定プラークが形成する。不安定プラークの線維性被膜が破綻すると、プラーク内の壊死性コアや組織因子が血管内腔に露出し、凝固系活性化により血栓が形成され、血管内腔の閉塞にいたった場合に、急性心筋梗塞を発症すると考えられている⁵⁾。

筆者らの研究グループも、これまでに白血球のMCP-1のレセプターであるCCR2がアンジオテンシンIIによって誘導される動脈硬化の進展に重要な役割を果たすこと^{6,7)}、MCP-1のN末端変異体である7NDにより動脈硬化の進展が抑制できること^{2,6~8)}を示し、動脈硬化進展における単球/マクロファージ依存性炎症の関与を明らかにしてきた。最

近の検討において、ApoE欠損マウスを用いた動脈硬化性プラーク破綻モデル^{9,10)}において、ドナーマウス由来の脾臓由来Ly6C^{high}炎症性単球および腹腔内マクロファージの養子移植がCCR2依存的に動脈硬化性プラークの不安定化(プラーク線維性被膜の菲薄化、マクロファージ浸潤)およびプラーク破綻を促進することから、Ly6C^{high}CCR2⁺炎症性単球/マクロファージが、プラーク不安定化および破綻に重要な役割を果たすことを示した²⁾。以上の背景から、筆者らは、Ly6C^{high}CCR2⁺炎症性単球におけるMCP-1/CCR2シグナル経路の抑制が、プラーク破綻に対する治療標的になると考えている。

3. 心筋虚血再灌流傷害の病態

一方、急性心筋梗塞が発症早期に認識された場合、標準治療として冠動脈インターベンションによる早期再灌流療法が施行される。早期再灌流療法による心筋虚血再灌流は、冠動脈血流の再開によって心筋梗塞の拡大を抑制する一方、急激なpHの変化、活性酸素種の産生は、ミトコンドリア不全、心臓の炎症など複数の機序を介して虚血再灌流傷害(Ischemia-Reperfusion,IR injury)を惹起し、早期再灌流療法の梗塞サイズ縮小効果を制限する^{11,12)}(図1)。来院から再灌流までの時間(Door-to-Balloon時間)の短縮にともない急性心筋梗塞の急性期死亡率が改善すると考えられてきたが、最近の報告¹³⁾ではDoor-to-Balloon時間の短縮による生命予後の改善には限界がみられており、心筋虚血再灌流傷害に対する治療開発は急務である。

心筋虚血再灌流傷害に対する治療法の開発では、カルシウム過剰負荷抑制、酸化ストレス抑制などによるミトコンドリア不全(ミトコンドリア膜透過性遷移孔の開閉)の抑制、心筋保護のシグナルを伝達するリン酸化酵素群(Reperfusion injury salvage kinase：RISK)¹¹⁾の活性化や炎症の抑制などが、治療標的になりうる可能性が動物モデル実験で示されてきたが、これらの基礎研究成果を基盤とした臨床研究では決定的な効果は得られていない¹²⁾。基礎研究成果と臨床研究結果が解離する原因の1つは、臨床においては虚血再灌流傷害の機序に対して、時間

図1 心筋虚血再灌流傷害の機序

心筋虚血再灌流は、血流再開にともなう急激な pH 変化、心筋細胞内カルシウム過負荷、および活性酸素種の産生が契機となるミトコンドリア不全、炎症、直接の代謝障害による細胞死(ネクローシスおよびアポトーシス)が連続して起こる複雑な病態を示す。

的、空間的に十分な治療因子の送達が得られていないことである可能性があり、すなわち DDS の応用には蓋然性がある。筆者らは心筋虚血再灌流傷害において治療標的化可能な機序として心臓の炎症に注目しており、DDS を応用した抗炎症治療の効果を検討している。

4. スタチンの抗炎症作用

スタチンは血清コレステロール低下薬として世界的に用いられており、冠動脈疾患の危険因子である LDL コレステロールを低下させるとともに、一次予防、二次予防のいずれにおいても急性心筋梗塞などの冠動脈イベントリスクを低下させることが臨床試験から示されてきた¹⁴⁾。一方、スタチンは LDL コレステロール低下作用に依存しない血管保護作用(多面的作用、pleiotropic effects)として、血管内皮細胞機能の改善、特に内皮型 NO 合成酵素の活性化、血管平滑筋細胞の増殖抑制、白血球の活性化抑制を

介した抗炎症効果などを持つことが基礎研究から示されてきた¹⁵⁾。動脈硬化モデル動物においても、スタチンは血管壁の炎症を抑制し、動脈硬化性プラークの進展を抑制する¹⁶⁾。実際、上述のような冠動脈疾患患者における臨床試験においても、高用量スタチン投与群は標準量投与群と比較して、血清 C 反応性タンパク(以下 CRP)を低下させ、すなわち抗炎症効果を発揮し、さらに CRP 低下が得られた患者群で、冠動脈イベントリスクがより低下することが報告されている¹⁷⁾。したがって、高用量スタチンは LDL 低下作用および抗炎症効果を介して冠動脈プラークの安定化、および心筋虚血再灌流傷害の軽減を得られる治療戦略であるといえるが、一方で高用量スタチンによる肝機能障害、横紋筋融解症など副作用の懸念から投与用量にも限界がある。そこで、筆者らはスタチンをナノ粒子化し、冠動脈疾患における炎症の主体である単球/マクロファージと病変局所へスタチンを送達することで、より効果的な抗炎症治療としての検討を進めている。

5. PLGA ナノ粒子を用いた Drug Delivery System (ナノ DDS)

筆者らは、生体吸収性、適合性に優れた高分子である PLGA を高分子球形晶析法¹⁸⁾によりナノ粒子化するとともに、水溶性/脂溶性薬剤・核酸医薬・ペプチドを封入する技術を開発している(図2)。PLGA は乳酸とグリコール酸のエステル結合によるランダム共重合体であり、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おり、PLGA マイクロ粒子による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。PLGA ナノ粒子は疎水性のポリ乳酸(PLA)と親水性で有機溶媒に不溶であるポリグリコール酸(PGA)の性質をあわせ持ち、生体内の薬物動態の改善に加え、PLGA の分子量に依存して加水分解速度が変化し、内包した薬剤等の放出速度を制御できる点などに特徴がある。心血管病におけるナノ DDS の体内動態に影響する機能として、10nm 以上の粒子が腎排泄を免れ循環時間の延長が得られること、陰性荷電により血中タンパク、血管内皮細胞との会合を防

ぐこと、その間、血管透過性の亢進した血管床、臓器において血管外へ送達される、いわゆる passive targeting があげられる^{1,19)}。

筆者らの研究グループは、スタチンの1つであるピタバスタチンを PLGA ナノ粒子に封入した製剤を作成し^{2,3,20,21)}、蛍光色素 FITC を封入した PLGA ナノ粒子とともに、体内動態の検討と疾患モデル動物における有効性の検討を行っている。

6. スタチン封入ナノ粒子による 動脈硬化性プラーク破綻の予防

FITC 封入ナノ粒子を動脈硬化性マウスに静脈内投与し、24 時間後の大動脈を蛍光顕微鏡で観察すると、動脈硬化性プラークに FITC 蛍光が観察された(図3A)。Flow cytometry 解析では、同マウスの末梢血単球および大動脈組織から抽出した単球/マクロファージにおいて FITC の取り込みが観察された(図3B)。以上の結果から、経静脈投与した PLGA ナノ粒子は末梢血単球に取り込まれ、末梢血単球に対する直接薬剤送達、および動脈硬化巣に送達されたナノ粒子からの薬剤送達が期待される。す

図2 PLGA ナノ粒子

A: PLGA ナノ粒子の電子顕微鏡像および模式図

本研究で開発した PLGA ナノ粒子の電子顕微鏡像(左)。PLGA ナノ粒子は高分子球形晶析法で水溶性/脂溶性薬剤・核酸医薬・ペプチドを内包したナノサイズの粉体を持つ。

B: PLGA ナノ粒子は生理的溶媒(リン酸バッファ生理食塩水、37°C、pH7.4)において加水分解を受け分解する。

C: PLGA ナノ粒子は内容物を徐々に放出する。

図3 ナノ DDS による動脈硬化性プラーク安定化治療

- A : FITC封入ナノ粒子を動脈硬化性マウスに経静脈投与し、24時間後に FITC シグナルが大動脈動脈硬化巣に観察される。
- B : 末梢血および大動脈から抽出した白血球の flow cytometry 解析では単球/マクロファージ分画に FITC 封入ナノ粒子の取り込みを認める。FITC 単独投与では FITC 蛍光の増加を認めない。
- C : スタチン封入ナノ粒子 (Pitava-NP) 投与により、末梢血単球 (CD115 陽性 CD11b 陽性細胞) 分画中の Ly6C^{high} 炎症性単球数が減少した。
- D : Pitava-NP のプラーク破綻モデルマウス実験期間 4 週から 8 週まで週 1 回静脈内投与により、大動脈基部の動脈硬化プラーク面積の減少が得られた。
- E : D と同様の Pitava-NP 投与により、腕頭動脈のプラーク破綻 (急性プラーク破綻および治癒した破綻プラーク) が有意に抑制された。

なわち、このナノ DDS を用いることにより、不安定動脈硬化性プラークの形成に重要な役割を果たす単球および動脈硬化病変局所へ、より効果的に薬剤を送達することが可能となる。

スタチン封入 PLGA ナノ粒子製剤は平均径約 200nm、ピタバスタチンを質量比で 12% 封入する (以下 Pitava-NP)²⁰⁾。このスタチン封入ナノ粒子は、培養マクロファージにおいて炎症性遺伝子群を制御する転写因子である NF- κ B の活性化を抑制し、また MCP-1 に対する遊走を用量依存性に抑制し、これらの効果はスタチン単独投与と比較して効果が高い^{2, 21)}。

Pitava-NP を ApoE 欠損マウスに尾静脈投与すると、コントロールナノ粒子を投与した群と比較して、末梢血の炎症性単球数 (Ly6C^{high} 単球) が減少し、単球/マクロファージに対する抗炎症効果が示された (図 3C)。動脈硬化性プラーク破綻モデルマウスにコントロールナノ粒子および Pitava-NP (ピタバスタチンとして 0.4mg/kg/week) を週に 1 回計 4 週間、尾静脈投与し、動脈硬化性プラークに対する効果を検討した²⁾。Pitava-NP はコントロールナノ粒子と比較して、大動脈基部におけるプラーク面積を抑制し、総プラーク破綻 (急性プラーク破綻および治癒した破綻プラーク) 数およびプラーク不安定化の指標であるプラーク線維性被膜の菲薄化を有意に抑制した (図 3D、E)。またプラーク破綻が抑制された病変では Mac-3 陽性マクロファージ数の減少、MCP-1 の発現の抑制を認めた。なお 2 群間の血清脂質プロファイル (コレステロール値、トリグリセリド値) に有意な差は認められず、これらの治療効果は脂質低下作用によらないスタチンの多面的作用によるものと考えられた。

7. スタチン封入ナノ粒子による 心筋虚血再灌流傷害治療

また、ナノ DDS は、冠動脈疾患においては虚血再灌流心臓への薬剤送達にも有効であることを見出している。ラット心筋虚血再灌流モデルにおいて、冠動脈駆血後の再灌流時に、FITC 封入 PLGA ナノ粒子を静脈内投与し観察すると、FITC と比し

て FITC ナノ粒子が優位に、また、非虚血領域に比して虚血領域に選択的に、FITC ナノ粒子が送達される (図 4A、B)。Evans blue 色素はアルブミンと結合し、血管透過性の亢進した臓器に漏出することが知られているが、Evans blue の分布と FITC ナノ粒子の分布の一致から、PLGA ナノ粒子の虚血再灌流心臓への送達は、冠動脈血管透過性の亢進に依存することが示唆される (図 4C)。また、ラットに FITC 封入ナノ粒子を静脈内投与した後に、心臓から抽出した白血球の flow cytometry 解析を行うと、CD11b+ 白血球分画 (単球/マクロファージおよび好中球) にナノ粒子の取り込みを認める (図 4D)。すなわち、PLGA ナノ粒子は早期再灌流療法を受ける急性心筋梗塞患者において、心筋保護治療薬、あるいは抗炎症効果のある薬剤を送達することにより、新規の心筋保護療法を構築し得る。

筆者らは、ラット心筋虚血再灌流モデルにおいて、動脈硬化モデルで良好な抗炎症効果を示した Pitava-NP の再灌流時静脈内投与が、再灌流 24 時間後の心筋梗塞サイズを縮小できるか検討した。Pitava-NP は、心筋梗塞サイズを約 40% 減少させ、同量から 10 倍量までのピタバスタチン単独投与では、治療効果は認めなかった (図 5A、B) また、虚血再灌流心臓の組織解析では、虚血心筋における MCP-1 の発現、ED1 陽性単球/マクロファージの動員が Pitava-NP によって抑制され、並行して TUNEL 陽性の心筋細胞死が抑制された。

8. ナノ DDS を応用したナノ医療開発の展望

本稿では、冠動脈疾患のなかでも、致死的な経過をとり得る急性心筋梗塞の原因病態である、動脈硬化性プラークの不安定化/破綻と心筋虚血再灌流傷害の機序と、単球/マクロファージを介した炎症の役割について概説し、マウス動脈硬化性プラーク破綻モデルおよびラット心筋虚血再灌流モデルにおける、スタチン封入ナノ粒子の治療効果を紹介した。ナノ DDS は薬剤送達の改善によりスタチンの多面的作用を強化し、単球/マクロファージを介した炎症の抑制を介して、プラークを安定化し、心筋虚血再灌流傷害を軽減した。冠動脈イベントのハイリス

クであるいわゆる vulnerable patient の同定と、急性心筋梗塞における迅速な治療介入が、冠動脈疾患治療の課題となっており、その場面においてナノDDS を用いた「ナノ医療」は新規治療法として貢献

し得る。

筆者らの研究グループでは、重症虚血肢あるいは肺高血圧症などの重症心血管病に対するナノ医療の開発を先行させており、ピタバスタチン封

図4 PLGA ナノ粒子の虚血再灌流心臓への送達

- A: ラット左冠動脈の30分虚血再灌流モデルにおいて、再灌流時にFITC封入PLGAナノ粒子を静脈内投与し観察した。虚血領域にFITCシグナルを認めた。非虚血心臓には集積しない。
- B: 非虚血領域、虚血領域心臓におけるFITCナノ粒子の取り込みを定量化した。
- C: モデルラットにFITC封入ナノ粒子およびEvans blue色素を静脈内投与し虚血再灌流心臓における局在の相関を検討した。
- E: モデルラットにFITC封入ナノ粒子を静脈内投与し末梢血白血球および心臓から抽出した白血球のflow cytometry解析において、CD11b白血球にPLGAナノ粒子の取り込みを認めた。

図5 ナノ DDS による心筋虚血再灌流傷害治療

A : Pitava-NP (1 mg/kg) の再灌流時投与は心筋梗塞サイズを減少した。ピタバスタチン単独(1 mg/kg) は心筋梗塞サイズを縮小しなかった。

B : Pitava-NP はピタバスタチン単独投与と比して10倍以上の有効性を示した。

C : Pitava-NP は虚血心臓組織における MCP-1 発現を減少させ、ED1 陽性単球/マクロファージの浸潤を抑制し、TUNEL 陽性の心筋細胞死を抑制した。

図6 冠動脈疾患に対するナノ医療の展望

1. ナノ医療の対象(不安定プラークを有するハイリスク患者 'vulnerable patient'、および急性心筋梗塞患者に対するナノ医薬品の投与)
2. ナノDDS による薬剤送達(末梢血単球、動脈硬化巣のマクロファージ、虚血再灌流心臓組織)
3. ナノ医療による治療効果(動脈硬化性プラークの安定化、急性心筋梗塞の予防、心筋梗塞サイズの縮小、患者の予後改善)

入ナノ粒子は、重症虚血肢を対象とした筋肉注射の Phase I/IIa 医師主導治験(UMIN CTR ID: UMIN000008011)、健常成人男性を対象とした静脈内投与の Phase I 医師主導治験(UMIN CTR ID: UMIN000014940)を2014年12月時点で実施中で

あり、PLGA ナノ粒子の DDS プラットフォームとしての実績も得られつつある。冠動脈疾患に対するナノ医療の実現に向けての開発(図6)も進むことが期待される。

文献

- 1) Matoba T. & Egashira K., Nanoparticle-mediated drug delivery system for cardiovascular disease, *Int Heart J*, 55, 281–286 (2014).
- 2) Katsuki S., Katsuki S., Matoba T., et al., Nanoparticle-mediated delivery of pitavastatin inhibits atherosclerotic plaque destabilization/rupture in mice by regulating the recruitment of inflammatory monocytes, *Circulation*, 129, 896–906 (2014).
- 3) Nagaoka K., Matoba T., Mao Y., et al., A New Therapeutic Modality for Acute Myocardial Infarction: Nanoparticle-Mediated Delivery of Pitavastatin Induces Cardioprotection from Ischemia-Reperfusion Injury via Activation of PI3K/Akt Pathway and Anti-Inflammation in a Rat Model, *PLoS ONE*, 10, e0132451 (2015).
- 4) Nabel E. G. & Braunwald E., A tale of coronary artery disease and myocardial infarction, *N Engl J Med*, 366, 54–63 (2012).
- 5) Hansson G. K., Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease, *N Engl J Med*, 352, 1685–1695 (2005).
- 6) Ishibashi M., Egashira K., Zhao Q., et al., Bone marrow-derived monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is critical in angiotensin II-induced acceleration of atherosclerosis and aneurysm formation in hypercholesterolemic mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, e174–8 (2004).
- 7) Ni W., Egashira K., Kitamoto S., et al., New anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice, *Circulation*, 103, 2096–2101 (2001).
- 8) Matoba T. & Egashira K., Anti-inflammatory gene therapy for cardiovascular disease, *Curr Gene Ther*, 11, 442–446 (2011).
- 9) Matoba T., Sato K. & Egashira K., Mouse models of plaque rupture, *Curr Opin Lipidol*, 24, 419–425 (2013).
- 10) Sato K., Nakano K., Katsuki S., et al., Dietary cholesterol oxidation products accelerate plaque destabilization and rupture associated with monocyte infiltration/activation via the MCP-1-CCR2 pathway in mouse brachiocephalic arteries: therapeutic effects of ezetimibe, *J Atheroscler Thromb*, 19, 986–998 (2012).
- 11) Prasad A., Stone G. W., Holmes D. R., et al., Reperfusion injury, microvascular dysfunction, and cardioprotection: the 'dark side' of reperfusion, *Circulation*, 120, 2105–2112 (2009).
- 12) Hausenloy D. J. & Yellon D. M., Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target, *J Clin Invest*, 123, 92–100 (2013).
- 13) Menees D. S., Peterson E. D., Wang Y., et al., Door-to-balloon time and mortality among patients undergoing primary PCI, *N Engl J Med*, 369, 901–909 (2013).
- 14) Matoba T. & Egashira K., [Statins in the management of acute coronary syndrome], *Nippon Rinsho*, 68, 692–698 (2010).
- 15) Takemoto M. & Liao J. K., Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 1712–1719 (2001).
- 16) Ni W., Egashira K., Kataoka C., et al., Antiinflammatory and antiarteriosclerotic actions of HMG-CoA reductase inhibitors in a rat model of chronic inhibition of nitric oxide synthesis, *Circ Res*, 89, 415–421 (2001).
- 17) Ridker P. M., Cannon C. P., Morrow D., et al., C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy, *N Engl J Med*, 352, 20–28 (2005).
- 18) Kawashima Y., Yamamoto H., Takeuchi H., et al., Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods, *Eur J Pharm Biopharm*, 45, 41–48 (1998).
- 19) Acharya S. & Sahoo S. K., PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect, *Adv Drug Deliv Rev*, 63, 170–183 (2011).
- 20) 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*, 29, 796–801 (2009).
- 21) 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*, 57, 343–350 (2011).