ブタ冠動脈モデルを用いた生体吸収性PLGAナノ粒子 電着コーティングステントの有効性と安全性

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

07126

研究代表者 九州大学大学院医学研究院循環器内科学

准教授 江 頭 健 輔 Kensuke Egashira

共同研究者 九州大学大学院医学研究院循環器内科学

特任講師 中 野 覚 Kaku Nakano

Background: The enthusiastic use of currently marketed drug-eluting stents presents a serious safety issue because of the associated increased risk of potentially fatal late thrombosis. Nanoparticle (NP)-mediated drug delivery systems (DDS) are poised to transform the development of innovative therapeutic devices. Therefore, we hypothesized that a bioabsorbable polymeric NP-eluting stent could provide a more safe and efficient DDS.

Methods and Results: We report the first successful formulation of an NP-eluting stent using a novel cation electrodeposit coating technology. NPs encapsulated with FITC were taken up stably and efficiently by cultured vascular smooth muscle cells. In a porcine coronary artery, FITC was observed in neointimal and medial layers until 4 weeks after implantation. The magnitudes of stent-induced injury, inflammation, endothelial recovery, and neointima formation were comparable between control and NP-eluting stent groups.

Conclusions: Therefore, this NP-eluting stent is an efficient and safe NP-mediated DDS that holds promise as a platform for innovative nano-devices targeting cardiovascular disease.

研究目的

経皮的冠動脈血行再建術は日本国内で年間15万例、世界的に年間150万例以上実施されている。その大部分8-9割はステント留置術である。通常のステント（ベアメタルステント）ではいったん拡張した血管内腔が再び狭くなり狭心症、急性心筋梗塞の再発を来す再狭窄が20-30%に生じることが問題であった。

この再狭窄の問題は免疫抑制剤シロリムスをコーティングした薬剤溶出ステントCypherや抗がん剤パクリタキセルをコーティングしたTaxusの開発成功によりほぼ解決されたかに思われた。実際、Cypherの臨床研究では再狭窄はベアメタルステントに比べ、劇的に改善することが知られている^{1, 2)}。しかし、ステントにコーティングされたこれらの薬剤はともに細胞周期の停止をターゲットとしているため、血管平滑筋細胞

だけでなく内皮細胞にも非特異的な抗増殖作用を有し、再内皮化の遅延、炎症、増殖およびフィブリン沈着の継続といった副作用、とくに晩期のステント内血栓症（Late in-Stent Thrombosis）を生ずることがVirmaniらのグループから報告されている^{3,4)}。また、BASKET-LATE（Basel Stent Cost-effectiveness Trial—Late Thrombotic Events）⁵⁾臨床試験ではCypherステント留置6から18ヶ月後の遠隔期にクロピドグレルの内服を中止した場合、心臓死、致死的心筋梗塞がベアメタルステントに比べて約3-4倍増加することが示された。

さらに、これらの薬剤をステントにコーティングするために用いられているポリマーは生体非適合性、生体非吸収性であり、体内に永久に残存する。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³⁾。また、従来用いられてきたコーティングポリマーは脂溶性であり、脂溶性薬剤であるシロリムス、パクリタキセルなどの薬剤のコーティングには適しているが、水溶性である遺伝子や低分子化合物をコーティングするには適さない。従って、生体適合性かつ生体吸収性の薬物・遺伝子キャリアー、さらにはキャリアーのコーティングテクノロジーの開発が必要である。これらのことから現在市販されている薬剤溶出型ステントは医療機器として未完成の部分を持っている。したがって、まったく新しいテクノロジーを導入した次世代ステントの開発が強く望まれる。

近年、我々は生体吸収性、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（co-poly-lactic acid/glycolic acid；PLGA）を「高分子球形晶析法（6）」によりナノ粒子化するとともに、ペプチドや遺伝子プラスミドなどを封入するカプセル化技術を開発した。PLGAは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リユーブリン（酢酸リユーブ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保障されている。さらに、PLGAナノカプセル粒子は、ドラッグデリバリーシステム（DDS）として、薬物の酵素分解からの保護や薬物の放出制御などの通常の機能に加えて、生体膜付着性による組織滞留性の向上、それに起因する薬物の局所濃度の増大による薬物吸収の促進などの諸機能が既に示されている⁶⁾。

本研究では現行の薬物溶出ステントの臨床的問題、

技術的問題を克服するために以下の2点を目標とした：1）PLGAナノ粒子をステント表面上へ能動的にコーティングする技術の開発、2）ナノ粒子コーティングステントからのナノ粒子の血管組織、細胞へのデリバリー効率の評価。

研究成果の概要

材料と方法

水中エマルション溶媒拡散法によるFITC封入キットサン修飾PLGAナノ粒子の作製

ナノ粒子製造はホソカワミクロン株式会社との共同で行った。PLGA 2 gをアセトン20mLに溶解した後、エタノールに溶解したFITC100mgを10mL添加してポリマー溶液とした。これを40度で2 wt%のポリビニルアルコール（PVA）水溶液50mlを攪拌しつつ、4 mL/minの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（遠心加速度41000G）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。ここに0.02wt%キットサン（片倉チッカリン製）水溶液50mLを添加し、1時間攪拌混合した後、-45度で凍結乾燥してFITC封入キットサン修飾PLGAナノ粒子を粉末化した。

培養ヒト冠動脈血管平滑筋細胞への取り込み

SMGM-2（プレートキットSmGM-2平滑筋細胞用増殖培地）に胎児ウシ血清を最終濃度が10%となるように添加して培養液とした。この培養液にてヒト冠動脈血管平滑筋細胞（ 1×10^5 cells/well）を、37度、5 %CO₂下で培養し、48時間後にFITC封入ナノ粒子懸濁液0.1mg/mL、0.25mg/mLおよび0.5mg/mLあるいはフリーのFITC25mg/mL（Sigma）を各ウェルあたり25uL添加した。添加後5分、15分、30分、60分、6時間および24時間後に倒立蛍光顕微鏡で観察して細胞への取り込み率を観察した。また、3次元観察を行うため、レーザー顕微鏡（オリンパス）を用いて細胞へのナノ粒子の取り込み状態を観察した。

ステントへの電着コーティング

FITC封入キットサン修飾PLGAナノ粒子（0.25wt%）懸濁液を作製し、長さ15mmステンレス製冠動脈ステ

ントをステント加工前の内径1.1mm, 外径1.3mmのパイプに通し, 陰極とした。陽極には炭素棒を配した。炭素棒が陽極, ステンレス製パイプが陰極となるように外部電源発生装置 (DC power supply, Nippon Stabilizer Co) および電流計を直列に接続し, 電流 5 mA定電圧を維持するよう電圧を調整し10分間通電した。得られたコーティングステントの表面を走査型電子顕微鏡で観察した。

溶出試験

ナノ粒子の溶出速度を測定するために試験管内溶出試験を行った。FITC封入キトサン修飾PLGAナノ粒子コーティングステント (N = 3) をTris-EDTA緩衝液に浸漬し放出されたFITC封入キトサン修飾PLGAナノ粒子の蛍光強度を経時的に測定した。

ブタ冠動脈へのFITC封入PLGAナノ粒子コーティングステントの留置

8頭のブタの冠動脈に12本のFITC封入PLGAナノ粒子コーティングステントを留置し, 7日後, 14日後, 28日後に剖検を行い, 組織内ナノ粒子の停留を確認した。全動物に対しステント留置の3日前よりバファリン330mgおよびパナルジン1日200mgを経口投与した。ステントを留置した冠動脈は10%中性緩衝ホルマリンにて固定しステントを横軸方向に分割し, 近位側はさらに縦方向に2分割して片方は新生内膜を外膜側から実体蛍光顕微鏡で観察した。もう片方はステントストラットを眼科用ピンセットで除去した後OCTコンパウンド (Tissue Tek) に包埋し凍結切片を作製した。遠位側はテクノビット8100樹脂に包埋し, 5 μ mの樹脂切片標本作製した。凍結切片はPBSで親水化した後, 水溶性封入剤 (Propidium Iodide (PI) 標識化合物配合Vectorshield) で封入し, 蛍光顕微鏡 (オリンパス) で観察した。樹脂包埋切片は乾燥後, 光学顕微鏡にて観察を行い, 炎症指数, 傷害指数をスコア化した。傷害および炎症指数は過去の報告に従い各ステントストラット毎に算出しその平均を算出した^{7,8)}。

統計解析

データはすべて平均 $\pm$ 標準誤差で示した。各データはPrism software program (GraphPad Software) を用いて解析を行った。傷害指数, 炎症指数の統計解析はノンパラメトリックMann-Whitney検定, 新生内膜

肥厚度はun-paired t検定にて行った。P値が0.05以下を統計学上の有意差とした。

結果

ナノ粒子の培養冠動脈血管平滑筋細胞への導入効率

培養ヒト冠動脈血管平滑筋細胞の蛍光色素封入ナノ粒子の取り込みを観察した。血清を加えた培養液に異なる濃度のPLGAナノ粒子 (0.1mg/mL, 0.25mg/mL および0.5mg/mL) を添加したところPLGAナノ粒子は60分以内に90%以上の細胞に取り込まれることが観察された (Fig.1)。また興味深いことに核周囲に集積している像が観察された。導入効率を経時的に観察したところ低濃度のナノ粒子であっても5分後には60%以上, 高濃度だと90%以上の細胞に取り込まれた (Fig.1)。また, 共焦点レーザー顕微鏡で三次元的に観察したところ確かに細胞内にナノ粒子が取り込まれていることを確認した (Fig.1C)。

試験管内溶出試験

実体顕微鏡および蛍光実体顕微鏡で観察したところFITC封入キトサン修飾ナノ粒子はステント表面に均一にコーティングされているのが認められた (Fig.2A)。さらに走査型電子顕微鏡によりナノ粒子コーティング後のステント表面を観察したところ, ステント表面にナノ粒子が均一にコーティングされており, 粒子の形態的異常は認められなかった (Fig.2B)。試験管内ナノ粒子溶出試験の結果, 約45%のナノ粒子が早期 (24時間以内) に放出されたがその後, 一定量が長期 (28日間) にわたり溶出されることが明らかとなった (Fig.2C)。また, 溶出したナノ粒子を含むTris-EDTA緩衝液を培養液中に加えたところ, ほとんどの細胞に短時間で取り込まれることが確認された (Data not shown)。

FITC封入ナノ粒子コーティングステントのブタ冠動脈留置後のナノ粒子の血管壁への導入評価

実体顕微鏡を用いて新生内膜を外膜側から実体蛍光顕微鏡で観察したところステント周囲に強い蛍光が認められた。一方, ステント留置部位末梢には蛍光はまったく認められなかった (Fig.3A)。7日目にはステントストラット周囲に集積したフィブリンおよび中膜に蛍光が認められ, 14日後, 28日後の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

Fig.1 培養平滑筋細胞へのナノ粒子の取り込み
FITC封入ナノ粒子0.1mg/mL, 0.25mg/mLおよび0.5mg/mLあるいはフリーのFITC25mg/mL (Sigma) を各ウェルあたり25μL添加した。**A)** 6時間後の細胞への取り込みを観察したところ、90%以上の細胞にナノ粒子が取り込まれているのが認められた。また、ナノ粒子は核周囲に局在しているのが観察された。Bar = 200 μm。緑：FITC, 赤：PIで標識された核。**B)** 経時的に取り込み率を確認したところきわめて短時間5分以内に60%から90%の細胞にナノ粒子が取り込まれた。**C)** レーザー共焦点顕微鏡で三次元的に観察したところナノ粒子は細胞表面ではなく細胞内に取り込まれているのが認められた。Bar = 200 μm。緑：FITC, 赤：PIで標識された核。

膜にもナノ粒子に起因する蛍光が認められた (**Fig.3B**)。28日後の炎症指数はベアメタルステント、ナノ粒子コーティングステントでそれぞれ 1.53 ± 0.09 , 1.58 ± 0.16 であり、傷害指数は 1.84 ± 0.06 , 1.81 ± 0.03 でありいずれも2群間に差は認められなかった。また、新生内膜の肥厚度はベアメタルステント、FITC封入PLGAナノ粒子コーティングステントでそれぞれ 0.27 ± 0.10 , 0.32 ± 0.08 mm であり同程度であった (**Fig.4**)。

Fig.2 ナノ粒子のステントへのコーティングと試験管内リリース試験。

A) 実体顕微鏡像および走査型電子顕微鏡像。実体顕微鏡で観察するとステント全体に均一にFITC封入ナノ粒子がステント全体に均一にコーティングされている。電子顕微鏡で観察するとナノ粒子が形態を保ってステント表面にコーティングされているのが認められる。左：明視野像，中央：蛍光像，右：電子顕微鏡像。

B) コーティング後のステント表面の走査型電子顕微鏡像。ナノ粒子が形態を保ってステント表面にコーティングされている。

C) 溶出試験の結果。ナノ粒子は初期バースト後、ゆっくりと均一な速度で溶出する。

考察

我々はFITC封入PLGAナノ粒子を作製し、このナノ粒子を均一にステント表面にカチオン電着コーティングする技術を開発した。ステントコーティングのプロセスにおいてナノ粒子の形態と機能は温存されていた。培養ヒト冠動脈平滑筋細胞およびブタ冠動脈モデルを用いて、ステント表面から放出されたナノ粒子が極めて高率に血管壁細胞に導入され、しかも長時間停留することを明らかにした。今後、血管保護作用を有する薬剤封入ナノ粒子コーティングステントの効果を

Fig.3 スtentにコーティングしたナノ粒子は血管壁に長期間にわたり取り込まれる

FITC封入ナノ粒子コーティングstent留置後14日の血管壁へのナノ粒子の取り込み。A) 実体顕微鏡で観察するとstent留置血管は再内皮化されており、うっすらとstentが組織を通じて観察される(左パネル)。蛍光を当てるとstentストラット周囲に強い蛍光が認められるのに対しstent留置していない血管にはまったく認められない(矢印、右パネル)。B) 凍結切片を作製し血管の横断面を観察するとstentストラット(*)周囲に強い蛍光が認められた(左パネル)。一方、ベアメタルstentを留置した血管では自家蛍光である弾性板以外蛍光は認められなかった(右)。Bar = 200 μ m。緑; FITC, 赤; PIで標識された核。C) 血管横断面の強拡大像。内皮直下(左), 中膜組織(右パネル)にもナノ粒子が観察された。Bar = 50 μ m。緑; FITC, 赤; PIで標識された核。NI; 新生内皮, M; 中膜, A; 外膜。

明らかにし、さらに、再狭窄治療のみならず急性心筋梗塞や脳卒中を引き起こす不安定化プラークに対する有効性を評価していく予定である。

stent留置後に生ずる新生内皮の平滑筋細胞の遊走・増殖は留置後7-14日後より始まることが知られており、従来のコーティング技術では治療標的の発現に一致した治療因子の局所送達は困難と考えられてきた。本研究により、stent留置後28日においてもコーティングstentを介してFITCを新生内皮および

Fig.4 A) stent留置28日後のHE染色像。ベアメタルstent (左), ナノ粒子コーティングstent (右)。Bar = 100 μ m。B) 傷害指数, 炎症指数および新生内皮肥厚度。各値は平均 $\pm$ 標準誤差。いずれも二群間で差は認められなかった。BMS; ベアメタルstent, NP-ES; ナノ粒子溶出stent。NI; 新生内皮, M; 中膜, A; 外膜。

中膜平滑筋細胞内へ送達できることが明らかになった。この革新的なコーティング技術によってナノ粒子の細胞内分解時間の制御, 多層・多剤コーティングなどの可能性があり、本成果の臨床的意義はきわめて大きい。

本基礎研究の成果を臨床応用へと推進していくにはまだいくつもの壁を乗り越えていく必要がある。第一に製造管理及び品質管理規則 (GMP) を遵守しナノ粒子の製造, コーティング, 最終的に使用されるデバイスを製造していく必要がある。第二にGLPに沿った前臨床試験を行い安全性, 有効性の確認のみならず, 物理学的特性, 化学的特性を明らかにしていく必要がある。さらには少数の患者による臨床試験など莫大な労力と研究開発費が必要である。それらの障壁を乗り越えるため、産・官・学が一体となり、日本国発のナノテックドラッグデリバリーシステム (DDS) stentの開発を進めていく必要があるだろう。

本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただいた財団法人ホソカワ粉体工学振興財団に深謝申し上げます。

〔参考文献〕

- 1) Babapulle MN, Eisenberg MJ. Coated stents for the prevention of restenosis: Part I. Circulation 2002; 106: 2734-40.
- 2) Babapulle MN, Eisenberg MJ. Coated stents for the prevention of restenosis: Part II. Circulation 2002; 106: 2859-66.
- 3) Virmani R, Guagliumi G, Farb A, et al. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? Circulation 2004; 109: 701-5.
- 4) Joner M, Finn AV, Farb A, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. J Am Coll Cardiol 2006; 48: 193-202.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, et al. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. J Am Coll Cardiol 1992; 19: 267-74.
- 8) Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to

neointimal hyperplasia. J Am Coll Cardiol 1998; 31: 224-30.

原著論文

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.

国内学会発表

第40回日本動脈硬化学会総会・学術集会（平成20年7月10日，茨城）江頭健輔：生体吸収性ナノDDSステントによる革新的血管内ナノ医療の創製（Featured Session）.
第10回NTT西日本産業保健研究会（平成20年7月17日，福岡）江頭健輔：未来を拓く心血管ナノ医療 生体吸収性ナノDDSステントによる革新的低侵襲血管内ナノ医療の創製など（特別講演）.

国際学会発表等

The 2nd Oriental Congress of Cardiology (May 30, 2008, Shanghai) Egashira K: Drug-eluting stents: where are we and where we are going? (Special lecture)
The Annual Scientific Meeting of Taiwan Society of Lipids and Atherosclerosis 2008 and The 8th Taipei International Vascular Molecular Biology Symposium (Sep 20, 2008, Taipei) Egashira K: Impact of Nanotechnology on Innovation of Cardiovascular Medicine (Special Lecture).