

LDL受容体KOブタにおける冠動脈不安定プラークの インターベンション後の治療戦略作成

平山篤志^{1)*}, 李 予昕¹⁾, 大西 彰²⁾, 三角浩司²⁾, 梶川 博²⁾,
大滝忠利²⁾, 浅野早苗²⁾, 春田裕典¹⁾, 高山忠輝¹⁾, 羽尾裕之¹⁾

The analysis of vascular response to the various type of stents on the vulnerable plaque of LDL-cholesterol receptor knock out pigs

Atsushi HIRAYAMA¹⁾, Yuxin LI¹⁾, Akira ONISHI²⁾, Koji MISUMI²⁾,
Hiroshi KAJIKAWA²⁾, Tadatoshi OHTAKI²⁾, Sanae ASANO²⁾,
Hironori HARUTA¹⁾, Tadateru TAKAYAMA¹⁾, Hiroyuki HAO¹⁾

要旨

急性心筋梗塞等の虚血性心疾患の治療法として、冠動脈内腔を薬剤溶出性ステント (Drug-Eluting Stent: DES) で拡げる冠動脈インターベンションが標準的な治療法として行われている。しかしながら、慢性期のステント内新規動脈硬化による遅発性ステント血栓症と晩期再狭窄などの合併症が問題となった。このようなDESの重大な副作用があらかじめ見えなかった背景には、動物での適切なモデルがなかったことにある。

我々は低密度リポタンパク (Low density Lipoprotein: LDL) 受容体遺伝子をノックアウト (KO) したLDLR-/-ブタを作製した。LDLR-/-ブタへの高脂肪食負荷により、ヒトと極めて高い類似性を持つ冠動脈不安定プラークが形成された。本研究は不安定プラークを持つLDLR-/-ミニブタを用いて、不安定プラーク病変部位にDESおよび生体吸収性スキャホールドを留置後、留置部位における長期間の経時的血管反応を観察し、冠動脈インターベンションの最善の治療戦略を検討した。

1. はじめに

狭心症や急性心筋梗塞などの虚血性心疾患の治療法として、狭窄あるいは閉塞部の冠動脈内腔を経皮的にバルーン拡張する冠動脈形成術 (Plain Old Balloon Angioplasty: POBA) が1979年に初めてGruentzigにより開始され、瞬く間に広く行われるようになった¹⁾。しかし、初期にはバルーン拡張後に急性冠閉塞が高頻度で起こることがわかり、これに対しては、抗血小板薬であるアスピリンの投与により改善がなされた。また、POBA施行後の3-6ヶ月に40-50%の頻度で再狭窄が起きることが明らかにされた²⁾。血管内超音波 (Intravascular Ultrasound: IVUS) によって再狭窄の機序が、①血管内膜の増殖と②バルーンの拡張による血管径の収縮 (Negative Remodeling) が原因であることが明らかにされ

た³⁾。後者の血管径が収縮する機序に対して最も有用な治療法は、ステント留置であり、これによって再狭窄率は激減した^{4,6)}。しかし、ステント留置後にも急性血栓閉塞がおこることが明らかになり⁷⁾、これに対しては、アスピリンとチエノピリジン系の抗血小板薬の2剤併用療法 (Dual Anti-Platelet Therapy) により改善がなされた⁸⁻¹⁰⁾。しかし、3-6ヶ月後には約20%の患者で再狭窄が起こり、内膜増殖による再狭窄は克服されなかった^{5), 6), 11), 12)}。この内膜増殖機序に対して、細胞増殖を抑制する薬剤であるシロリムスやタキソールなどの薬剤を塗布したDESが開発され、初期成績においては、再狭窄は克服されたかに見えた¹³⁻¹⁹⁾。しかし、2006年、このDESにおいて抗血小板薬の中止に伴う遅発性血栓症が起こることが報告された。BASKET試験の結

1) 日本大学医学部

2) 日本大学生物資源科学部

平山篤志: hirayama.atsushi@nihon-u.ac.jp

果、DESは再狭窄を減少させたが、遅発性血栓症が生じ、これまでの通常のステント（Bare Metal Stent: BMS）と比較して予後改善には至らないことが示され²⁰⁾、DESに対する反省の機運が起こった。遅発性血栓症の原因は、薬剤により平滑筋増殖は抑制されるものの、内皮化が遅延するために血栓源性が常に病変にあること、さらに薬剤を保持するために用いられたポリマーが炎症を惹起することが挙げられた²¹⁻²⁵⁾。このようなDESの重大な副作用が予測できなかった背景には、動物での適切なモデルがなかったことにある。これまで、新たに作製されたステントの評価には正常なブタ冠動脈が用いられていた。これは、ブタ冠動脈が形状と性質からヒト冠動脈とほぼ同一と考えられたからである²⁶⁾。しかし、ブタの正常冠動脈にステントを留置して得られた結果と、ヒトの動脈硬化巣での結果が全く異なっていたことが、初期のBMSやDESでの血栓閉塞、さらにはDESの遅発性血栓症が予測できなかった理由であった²⁷⁾。そこで、新たなステントの評価には、動脈硬化巣が生じたブタ冠動脈での留置が必要と考えられる。

我々は、遺伝子組換え技術と体細胞クローン技術との併用により、LDL受容体ノックアウト（LDLR^{-/-}）ブタを作出し、4ヶ月間の高脂肪食負荷により、ヒトと極めて高い類似性を持つ冠動脈不安定プラークが形成されることを報告した²⁸⁾。同時にスタチンを投与することで、プラークの不安定化が抑制されることを示した。しかし、このブタは、一般の家畜ブタを起源とするため、カテーテル検査が不能な体重に早期に達する問題があった。そのため、ミニブタ系統との交配により、長期間飼育しても体格の変動が小さいLDLR^{-/-}ミニブタを作製した。この品種改良によって、動脈硬化巣におけるステント留置部の変化を長期的に観察することが可能となった。

本研究は不安定プラークを持つLDLR^{-/-}ミニブタを用いて、不安定プラーク病変部位に最新の第3世代DESおよび最近開発されたBVS²⁹⁾、³⁰⁾を留置後、留置部位における長期間の経時的血管反応を観察し、冠動脈インターベンションの最善の治療戦略を検討した。

2. 対象及び方法

LDL受容体KOミニブタの作製

家畜ブタより作製したLDLR^{-/-}ブタをミニブタ系統（サクラココキ）と交配（人工授精）し、F2-F4世代のLDLR^{-/-}ミニブタを作製した。また、LDLR^{-/-}ミニブタより採血し、血算、生化学、血中脂質プロファイルを確認した。

遺伝子ノックアウトの確認は、出産直後のLDLR^{-/-}ミニブタの耳刻みから組織小片を採取し、PCR解析により行った（図1）。遺伝子検定後、生後1ヶ月

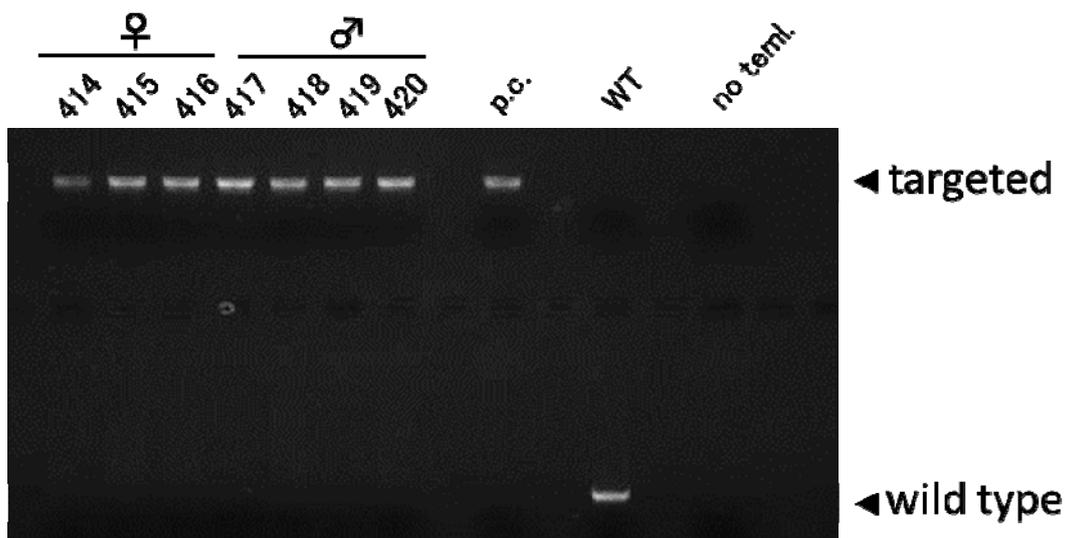


図1 ブタ耳小片から遺伝子解析

ブタ遺伝子解析：ブタの耳小片からDNAを抽出し、PCR法でLDL-C受容体の遺伝子を同定した。Wild Typeに対してLDLR^{-/-}のブタで遺伝子変異が確認された。



図2 通常食と高脂肪食
通常の餌と1.5%コレステロールと15%牛脂を加えた高脂肪餌

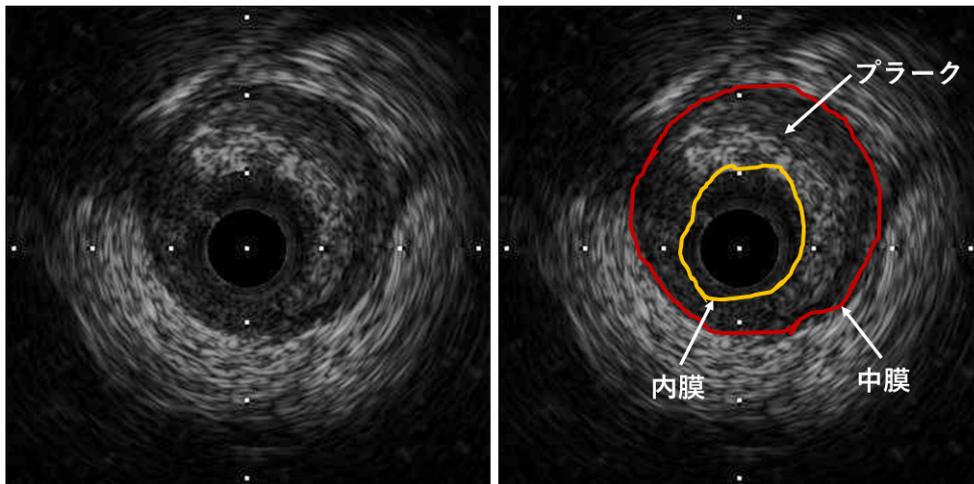


図3 血管内超音波画像 (IVUS)
血管内超音波による血管径とプラークの解析方法。外弾性板の部分を追跡して血管断面積とし、内腔を追跡して内腔断面積とする。血管断面積から内腔断面積を引き算してプラーク断面積とした。

で離乳し、通常の子豚用エサを給餌した。生後2ヶ月に、養豚場から医学部研究支援部門のブタ飼育室に搬入した。静脈から採血検査を行った後、3ヶ月齢から1.5%コレステロールと15%牛脂を含む高脂肪食を1日1kgの量で4ヶ月間給餌した。当初、高脂肪食にアンジオテンシン、糖質、揚げ物などの添加物を混ぜて、酸化ストレスを促進させる予定だったが、予備実験で高コレステロールと高脂肪だけで、十分に動脈硬化プラークが作成できたので、1.5%コレステロールと15%牛脂を含む高脂肪食にした。また、不安定プラークの作成を加速するため、牛脂は電子レンジで20分加熱してから用いた。さらに、冷蔵庫に1ヶ月間保存することにより高脂肪

食を酸化させた(図2)。冠動脈プラークの評価は、冠動脈造影とIVUSにより行った(図3)。

ステント留置術

4ヶ月間の高脂肪食負荷後、LDLR^{-/-}ミニブタをケタミン5mg/Kg筋注にて麻酔鎮静を図り、静脈ルートを確保し、カテーテル台に仰臥位に固定した。その後、気管挿管を行い、1回換気量10-15ml/Kg、20回/分にて呼吸管理をし、酸素50%と鎮静・鎮痛作用を有するセボフルラン1~4%を吸入させ全身麻酔とした。十分な鎮静と鎮痛を確認した後、大腿部または頸部のシース挿入部を剃毛・消毒を行い、局所麻酔(1%リドカイン10mlを皮下投与)下で、シースにて動脈穿刺を行い、動脈ラインを確保

表1 DESとBVSの類似点と相違点

	薬剤の塗布	材料	生体吸収性	留置後合併症
DES	あり	金属	血管内に恒久的に残る	内皮機能障害, ステンント内新規動脈硬化, 血栓症, 再狭窄など
BVS	あり	ポリラクチド	時間とともに分解し生体に再吸収される	まだ不明

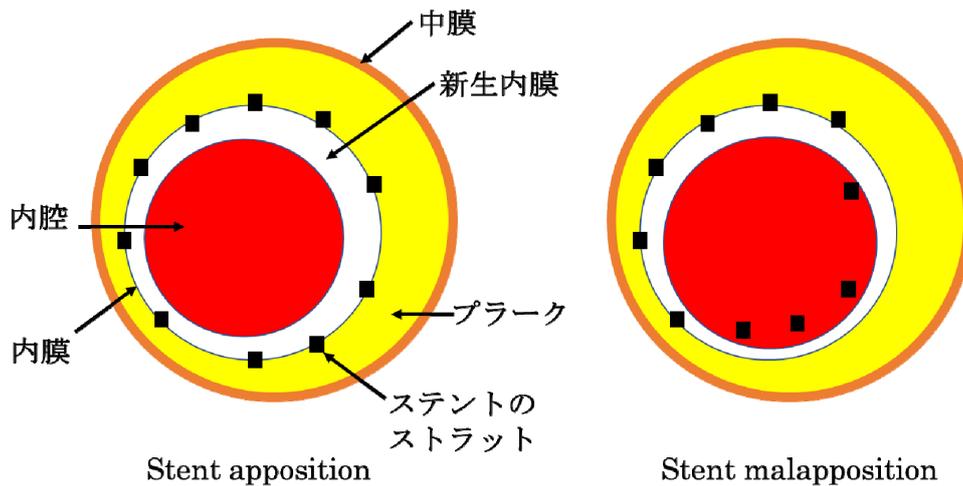


図4 ステンント留置後の観察項目

ステント留置後の観察項目：左：ステントの留置が適切に行われた場合（Apposition）はステントのストラットを囲んだ部分から血管内腔に形成された部分を新生内膜とした。ステントの圧着が不十分な場合（Malapposition）はステントのストラットが内膜に密着せず、血管内腔に浮いている状態である。

した。動脈圧ラインと心電図による血行動態監視下で、シースから挿入したカテーテルと血管内イメージングデバイスにより、冠動脈の観察を行った。

プラーク病変の特徴と部位を確認後、IVUSで病変部の血管内径を測定し、留置ステントのサイズを決めた。その後、ランダムにDESとBVSを選択し、同一個体の異なる冠動脈にDESとBVS両方を留置した。DESはアボット社のXIENCE Alpine, BVSはアボット社のAbsorb GT1 生体吸収性スキャフォールドシステムを用いた。両者の相違を表1に示す。

三枝冠動脈に2種類のデバイスを平均配分するように配し、ステント拡張後の外径と病変部血管内径は1.2:1とした。冠動脈カテーテル操作後、デバイス・シースを抜去し手動的に圧迫、止血を確認した後、麻酔より離脱し終了とした。血栓閉塞を予防するために、留置3日前から実験終了まで抗血小板薬としてアスピリン81mg/日とクロピドグレル75mg/日を経口投与した。デバイス留置手術施行中、活性凝固時間>300秒を達成するためにヘパリンも血管内投

与した。感染予防のため、カテーテル操作中に、点滴に抗生剤セファゾリン1gを入れた。ブタの冠動脈ではスパズムが起こりやすいので、造影上スパズムが起こり、また心電図上STが上がる場合には、即ちニトロールを経カテーテルで冠動脈内投与した。

ステント留置後の計測方法

ステント留置1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、また12ヶ月後、前述のように麻酔後、冠動脈カテーテルおよび血管内のイメージング観察を行った。冠動脈造影は東芝メディカルシステムズ社のX線アンギオグラフィシステムを用いて撮影し、CDに記録した。IVUSはボストン社のIVUSプローブカテーテルを毎秒0.5mmで機械式プルバックシステムを用いて自動的に引き抜いて撮像し、CDに記録した。光干渉断層（Optical Coherence Tomography: OCT）は、セント・ジュード・メディカル社のカテーテルを用いて、造影剤で血管内腔をフラッシュしながら、毎秒1mmの速度で引き抜き、画像をハードディスクに

記録した。OCTとIVUSを用いて、ステント内の血栓、血管内膜変化を定性、また定量的に観察した。DESまたはBVS留置の密着性 (stent apposition / stent malapposition), 内腔面積/体積, 血管面積/体積, ステント面積/体積, 新生内膜またステント内新規動脈硬化面積/体積, 新生内膜またステント内新規動脈硬化の成分を評価した (図4)。

病理組織解析

冠動脈カテーテルおよび血管内のイメージング観察終了後、深麻酔下において脱血を行い安楽死させた。安楽死後は生理食塩水による灌流を行い、10%ホルマリン液による灌流固定を行い、組織を採取 (心臓, 腎臓, 上行～下行大動脈および頸動脈) し、病理組織学的に検討した。心臓は摘出後、冠動脈を剥離し、ステント留置部位以外の冠動脈を0.5cmずつ切り出し、パラフィン切片で組織病理学的に解析した (図5)。DES留置部位は樹脂包埋で組織病理学

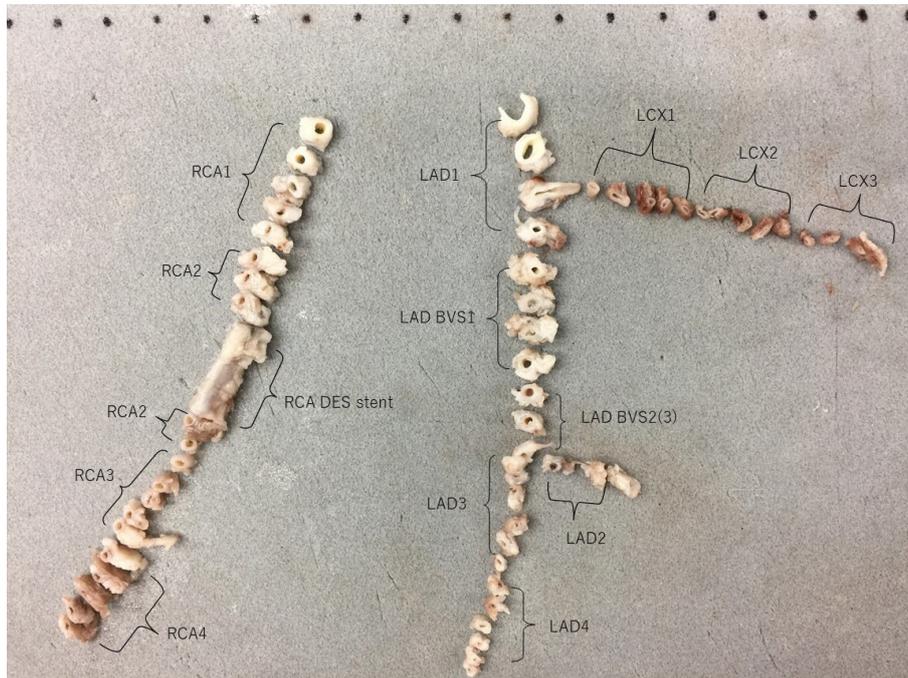


図5 冠動脈の摘出と切り出し
LDLR^{-/-}ブタの冠動脈の解剖所見：三枝にわたって粥腫が形成されている。

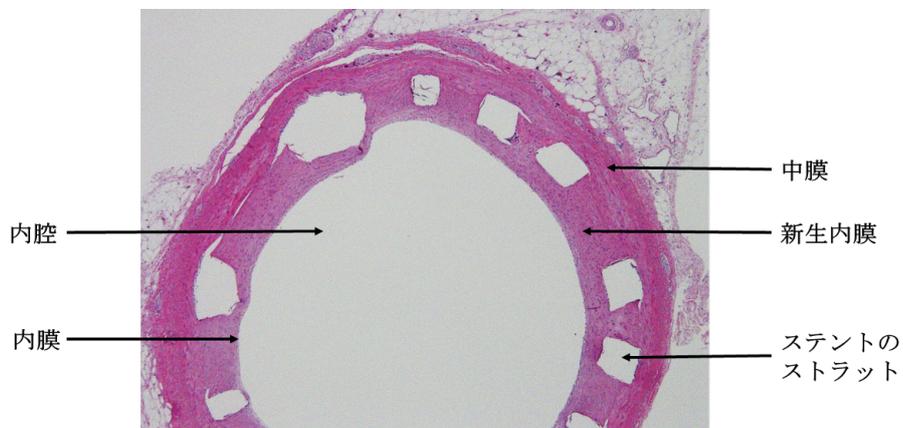


図6 冠動脈組織病理学の評価項目
ステント留置後の冠動脈の病理組織標本 (HE染色) とその観察項目

的に解析した。BVS留置部位の冠動脈はパラフィン切片で組織病理学的に解析した。

組織病理学の評価項目は以下とした。DESまたはBVS留置の密着性、内腔面積、血管面積、ステント面積、新生内膜またステント内新規動脈硬化面積(図6)、ステント内新規動脈硬化の成分、線維被膜の厚さ、血栓量、血管内皮の損傷、平滑筋細胞の遊走及び増殖、ステント留置部位の栄養血管、DESまたはBVSストラットおよび血管内皮の損傷部位への血栓の付着、ステントストラット周囲のフィブリン蓄積、活性化した炎症細胞の浸潤、石灰化、粥種出血、壊死性脂質コア、細胞外基質の蓄積、各種サイトカイン、また、BVSの場合は吸収サイトの組織変化などの解析を行った。

3. 結果

LDL受容体KOミニブタの作製と血中脂質プロフィール

家畜ブタでは、1日1kgの餌で飼育すると、1ヶ月間で体重が15-20kg増加し、生後1年で体重200kgに達するのに対して、LDLR-/-ミニブタでは生後1年で体重100kg以下になり、長期間飼育しても体格の変動が小さいことが明らかになった。LDLR-/-ミニブタはLDLR-/-ブタと同様の血算、生化学、また血中脂質プロフィールを持っていた。通常食の給餌下では、血中トータルコレステロール濃度は

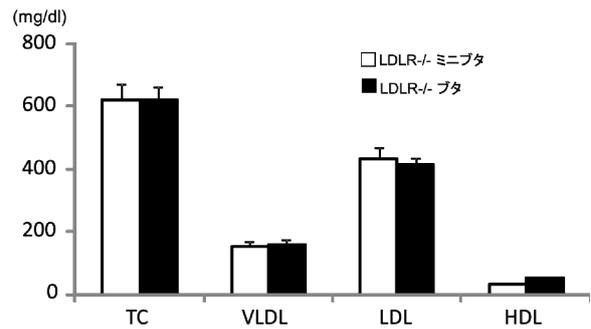


図7 LDLR-/-ブタとLDLR-/-ミニブタの血中脂質プロフィール

図7 LDLR-/-ブタとLDLR-/-ミニブタの血中脂質プロフィール

LDLR-/-ブタとLDLR-/-ミニブタの血中脂質プロフィール：ともに、総コレステロール(TC)とLDLコレステロール(LDL)値が高値である。

620mg/dl, LDLコレステロール濃度は430mg/dl(図7)、15%コレステロールと15%牛脂を含む高脂肪食を1日1kgの量で1ヶ月間食べさせると、血中コレステロール濃度は2倍以上増加した。

冠動脈プラーク形成

3ヶ月齢のLDLR-/-ミニブタに1.5%コレステロールと15%牛脂を含む高脂肪食を1日1kgの量で4ヶ月間食べさせた。4ヶ月後、冠動脈造影の結果、冠動脈に狭窄は見られなかったが、IVUSにより冠動脈プラークの形成が全てのブタで確認できた(図8)。

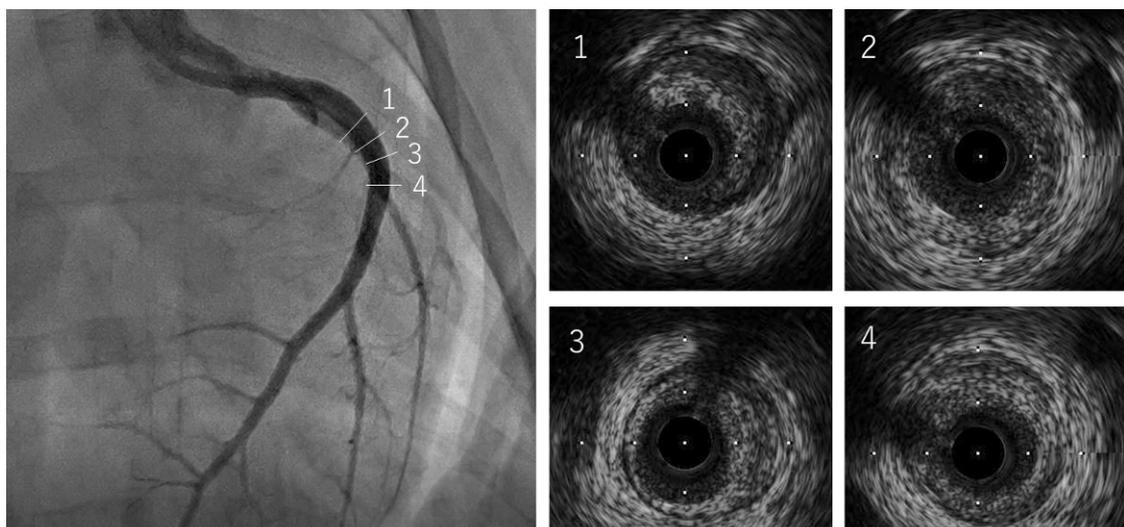


図8 LDLR-/-ミニブタにおける冠動脈造影とIVUSによるプラークの評価

LDLR-/-ミニブタにおける冠動脈造影とIVUSによるプラークの評価：冠動脈左前下枝の1-4の部分には冠動脈造影では狭窄を認めないが、IVUSで有意なプラーク形成を認めている。

冠動脈プラークの確認後、プラーク病変部位にランダムにDESまたはBVSを留置した。ステント拡張後の外径と病変部血管内径は1.2:1とした。ステント留置後、IVUSで拡張後の血管内径とステントと血管壁の密着性などを確認した。DESとBVSともに留置直後、ステントと血管壁は密着し、内腔の表在性血栓は認めなかった(図9)。

ステント留置後の血管反応

3ヶ月後、冠動脈造影では、ステント留置部位に軽度狭窄(25-50%)が認められた。IVUSで観察したところ、DESとBVSともにステントの内側に薄い新生内膜が観察されたが、血栓は認められなかった。新生内膜が薄かったため、成分は解析できなかった。深麻酔下において脱血を行い安楽死させ、還流固定後、心臓を摘出した。心臓の表面に虚血部位を認めなかった。冠動脈を摘出後、心臓を基底部から心尖部まで、0.5cm間隔で輪切りし、心筋を観察したところ、心筋梗塞巣を認めなかった(図10)。

冠動脈を摘出後、BVS留置部位の冠動脈をパラフィン切片、DES留置部位の冠動脈を樹脂包埋切片で染色(HE, EVG, MT染色)し、ステント留置後の血管反応を観察した。DESとBVSともに平滑筋細胞を主成分とした新生内膜が形成された。新生内膜の中に炎症性細胞浸潤、ステントのストラット周囲

のフィブリン蓄積、断片化された石灰化、泡沫状マクロファージなどが観察され、DESとBVS両群の間で新生内膜の成分が類似した。DESとBVS両群ともに、ステント内血栓は認められなかった(図11)。

4. 考 察

本研究に使用するLDLR^{-/-}ミニブタは商品化されていないので、共同研究施設からの譲渡により使用した。そのため、安定的にブタを入手することが困難であった。また、本研究は、高脂肪食を4ヶ月間給餌し、ステント留置後は3ヶ月から12ヶ月間の経過観察が必要となり、合わせて7ヶ月間から16ヶ月間の長期間飼育を要した。そのため、十分な飼育スペースが必要となるが、動物飼育施設のブタケージ数の制限もあり、現在の進捗状況は以下となる。3ヶ月間観察群の3頭の内2頭の実験が終了した。12ヶ月間観察群は3頭にステントを留置し、3頭とも2018年9月までに実験観察終了予定である。6ヶ月間観察群の3頭の内2頭は2018年5月にステント留置し、2018年12月までに実験観察終了予定である。本論文は研究の経過中の3ヶ月の時点での結果をまとめたものである。

BVSは、留置後2-3年の経過でステントそのものが消失することから、これまでの金属を用いたステントに比較して血管自体の本来の構造が保持される

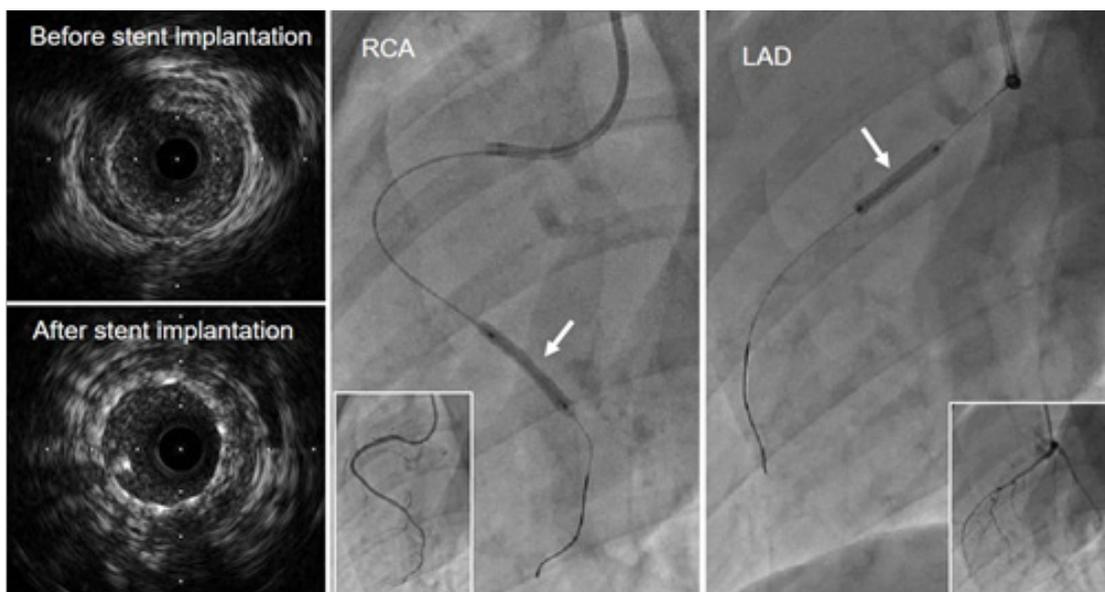


図9 冠動脈へのステント留置

LDLR^{-/-}ミニブタにおけるステント留置の手技：右：左前下行枝(LAD)、中央：右冠動脈(RCA)にステントを留置している。左上はステント留置前の冠動脈のIVUS像、左下はステント留置後のIVUS像である。



図10 心臓と冠動脈摘出
ステント留置3ヶ月後の摘出した冠動脈と心臓

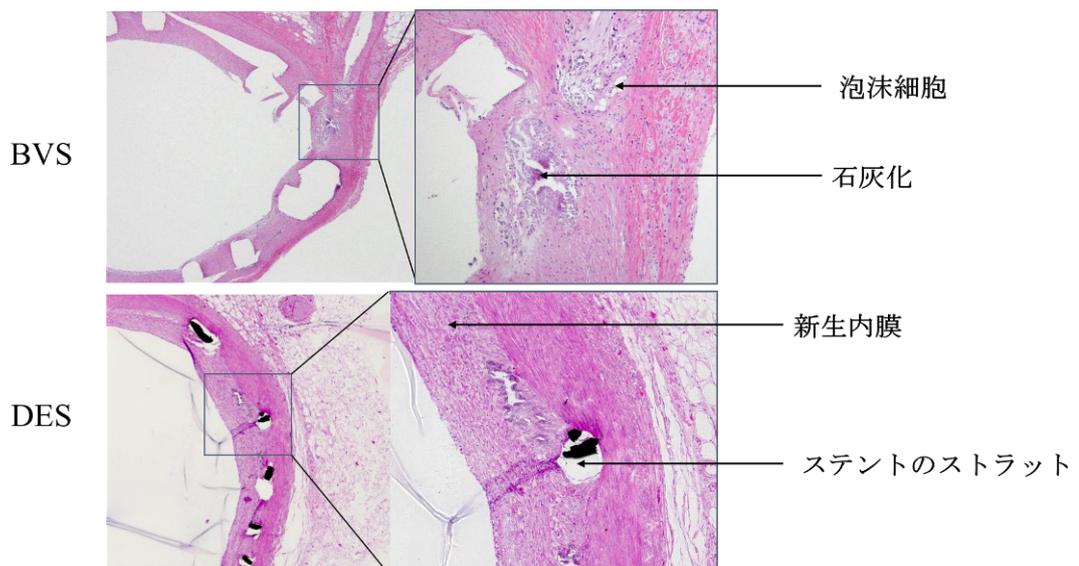


図11 ステント留置後の血管反応
ステント留置3ヶ月後の冠動脈の病理切片：BVS(上)とDES(下)ともに、ステントのストラット周辺にフィブリン蓄積、断片化された石灰化、泡沫状マクロファージなどが観察されている。

こと、再度のインターベンションにも適応可能であることなどの利点から開発されたものである。短期的な局所の改善だけでなく長期的な予後改善を目指したステントであった。しかし、最近、留置後2-3年までにDESに比べて高頻度に血栓症が発症することが明らかになった。この原因としては、対象となったDESに比較してステントストラッドが厚かったために血流のタービュランスが起り、血流うっ滞はステント周囲に生じたことが挙げられる。また同時に、ステントの材質である α -ポリリジン(PLL)が分解される過程で、血栓源となり、血栓が生じやすくなるともいわれている。ステントストラッドが消失するまでに起こる高頻度の血栓症がコントロールできなかったため、BVSは現在では臨床的に使用できない状態にある。BVSの臨床上的の問題が明らかになるかどうかとも本研究の重要なテーマである。

留置3ヶ月後に比較した結果では、BVSのDESに対する非劣性が示された。また、ステント留置3ヶ月間の短期間内に、新生内膜に泡沫状マクロファージ、石灰化などのステント内新規動脈硬化所見が観察された。この時点では、BVSは分解されておらず、まだステントの構造も保持されている。さらに、血栓症を発症する1年以降の検討が必要となるであろう。しかし、このような短期間において、BVSおよびDESの両者の留置部に、経皮的冠動脈形成術(Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty: PCI)と同様の遅発性血管反応に相当する病変が認められた。このことは、冠動脈ステント内新生動脈硬化の大動物モデルが新たに作製できたことを意味し、新生内膜動脈硬化発症の機序を明らかにする点で大きな進歩となる。また、今後のステントの素材や薬剤を考慮する意味でも応用可能なモデルと考えられる。今後、このモデルを用いて6ヶ月と12ヶ月の観察結果を解析し、各種ステント留置後合併症の制御機構を解明する予定である。

5. 結 語

LDLR-/-ミニプタへの高脂肪食負荷で冠動脈不安定プラークモデルを作製後、不安定プラーク病変部位にDESおよびBVSを留置し、留置部位における長期間の経時的血管反応を検討した。留置3ヶ月後では、BVSとDESには有意な反応の相違は認められ

なかったが、両者ともステント留置部に新生動脈硬化病変の出現を認めた。これは、ヒトPCI後の特徴的な変化とされることから、ステント関連病変の解析を可能にするモデルが新たに開発されたと考えられる。今後、ステント留置後合併症の制御機構、留置後慢性合併症の予防治療法を検討予定である。

謝辞

本研究は、日本大学学術研究助成金によって行われたものである。ここに、研究者一同、謝辞を表す。LDLR-/-ミニプタの提供に対して分譲機関の国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、茨城県畜産センター、埼玉県農林総合研究センターに謝意を表すものである。本研究に甚大な協力をいただいた、研究推進室室長石井敬基教授、医学研究支援部門藤田順一様、谷口由樹様、高橋理恵様、本田元巳様、廣田成美様、細胞再生・移植医学分野松本太郎教授、人体病理学分野山田清香様、向山敏夫様、循環器内科奥村恭男教授、北野大輔先生、右田卓先生、内科学系先端心血管画像解析分野廣高史准教授、田代恵美様、総合内科佐野太一先生に改めて謝意を表すものである。

文 献

- 1) Gruentzig A. Results from coronary angioplasty and implications for the future. *Am Heart J.* 1982;103:779-83.
- 2) Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H, Mioka S, Ueno K, Yokoi H, Hamasaki N, Horiuchi H and Ohishi H. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol.* 1988;12:616-23.
- 3) Nissen SE and Yock P. Intravascular ultrasound: novel pathophysiological insights and current clinical applications. *Circulation.* 2001;103:604-16.
- 4) Betriu A, Masotti M, Serra A, Alonso J, Fernandez-Aviles F, Gimeno F, Colman T, Zueco J, Delcan JL, Garcia E and Calabuig J. Randomized comparison of coronary stent implantation and balloon angioplasty in the treatment of de novo coronary artery lesions (START) : a four-year follow-up. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:1498-506.
- 5) Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, Nobuyoshi M and et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med.* 1994;331:496-501.
- 6) Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P and et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med.* 1994;331:489-95.
- 7) Serruys PW, Strauss BH, Beatt KJ, Bertrand ME, Puel J, Rickards AF, Meier B, Goy JJ, Vogt P, Kappenberger L and et al. Angiographic follow-up after

- placement of a self-expanding coronary-artery stent. *N Engl J Med.* 1991;324:13-7.
- 8) Cutlip DE, Leon MB, Ho KK, Gordon PC, Giambartolomei A, Diver DJ, Lasorda DM, Williams DO, Fitzpatrick MM, Desjardin A, Popma JJ, Kuntz RE and Baim DS. Acute and nine-month clinical outcomes after "suboptimal" coronary stenting: results from the STent Anti-thrombotic Regimen Study (STARS) registry. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:698-706.
 - 9) Colombo A, Hall P, Nakamura S, Almagor Y, Maiello L, Martini G, Gaglione A, Goldberg SL and Tobis JM. Intracoronary stenting without anticoagulation accomplished with intravascular ultrasound guidance. *Circulation.* 1995;91:1676-88.
 - 10) Schomig A, Neumann FJ, Kastrati A, Schuhlen H, Blasini R, Hadamitzky M, Walter H, Zitzmann-Roth EM, Richardt G, Alt E, Schmitt C and Ulm K. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N Engl J Med.* 1996;334:1084-9.
 - 11) Gordon PC, Gibson CM, Cohen DJ, Carrozza JP, Kuntz RE and Baim DS. Mechanisms of restenosis and redilation within coronary stents—quantitative angiographic assessment. *J Am Coll Cardiol.* 1993;21:1166-74.
 - 12) Hoffmann R, Mintz GS, Dussaillant GR, Popma JJ, Pichard AD, Satler LF, Kent KM, Griffin J and Leon MB. Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. A serial intravascular ultrasound study. *Circulation.* 1996;94:1247-54.
 - 13) Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnar F, Falotico R and Lesions RSGRSwtS-CBVB-ESitToPwNNCA. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med.* 2002;346:1773-80.
 - 14) Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Abizaid AS, Feres F, Pinto IM, Seixas AC, Staico R, Mattos LA, Sousa AG, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ and Serruys PW. Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: a quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. *Circulation.* 2001;103:192-5.
 - 15) Sousa JE, Costa MA, Abizaid AC, Rensing BJ, Abizaid AS, Tanajura LF, Kozuma K, Van Langenhove G, Sousa AG, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ and Serruys PW. Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up. *Circulation.* 2001;104:2007-11.
 - 16) Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O' Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS, Jaeger JL, Kuntz RE and Investigators S. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med.* 2003;349:1315-23.
 - 17) Spaulding C, Henry P, Teiger E, Beatt K, Bramucci E, Carrie D, Slama MS, Merkely B, Erglis A, Margheri M, Varenne O, Cebrian A, Stoll HP, Snead DB, Bode C and Investigators T. Sirolimus-eluting versus uncoated stents in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355:1093-104.
 - 18) Grube E, Silber S, Hauptmann KE, Mueller R, Buellesfeld L, Gerckens U and Russell ME. TAXUS I: six- and twelve-month results from a randomized, double-blind trial on a slow-release paclitaxel-eluting stent for de novo coronary lesions. *Circulation.* 2003;107:38-42.
 - 19) Silber S, Colombo A, Banning AP, Hauptmann K, Drzewiecki J, Grube E, Dudek D and Baim DS. Final 5-year results of the TAXUS II trial: a randomized study to assess the effectiveness of slow- and moderate-release polymer-based paclitaxel-eluting stents for de novo coronary artery lesions. *Circulation.* 2009;120:1498-504.
 - 20) Pfisterer M, Brunner-La Rocca HP, Buser PT, Rickenbacher P, Hunziker P, Mueller C, Jeger R, Bader F, Osswald S, Kaiser C and Investigators B-L. Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting versus bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:2584-91.
 - 21) Nakazawa G, Finn AV, Joner M, Ladich E, Kutys R, Mont EK, Gold HK, Burke AP, Kolodgie FD and Virmani R. Delayed arterial healing and increased late stent thrombosis at culprit sites after drug-eluting stent placement for acute myocardial infarction patients: an autopsy study. *Circulation.* 2008;118:1138-45.
 - 22) Virmani R, Guagliumi G, Farb A, Musumeci G, Grieco N, Motta T, Mihalec L, Tespili M, Valsecchi O and Kolodgie FD. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? *Circulation.* 2004;109:701-5.
 - 23) Inoue K. Drug-eluting stents are not indicated for patients with acute coronary syndrome - should drug-eluting stents be indicated for patients with acute coronary syndrome? (Con) . *Circ J.* 2010;74:2232-8.
 - 24) Kotani J, Awata M, Nanto S, Uematsu M, Oshima F, Minamiguchi H, Mintz GS and Nagata S. Incomplete neointimal coverage of sirolimus-eluting stents: angioscopic findings. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:2108-11.
 - 25) Awata M, Kotani J, Uematsu M, Morozumi T, Watanabe T, Onishi T, Iida O, Sera F, Nanto S, Hori M and Nagata S. Serial angioscopic evidence of incomplete neointimal coverage after sirolimus-eluting stent implantation: comparison with bare-metal stents. *Circulation.* 2007;116:910-6.
 - 26) Sahni D, Kaur GD, Jit H and Jit I. Anatomy & distribution of coronary arteries in pig in comparison with man. *Indian J Med Res.* 2008;127:564-70.
 - 27) Tellez A, Krueger CG, Seifert P, Winsor-Hines D, Piedrahita C, Cheng Y, Milewski K, Aboodi MS, Yi G, McGregor JC, Crenshaw T, Reed JD, Huibregtse B, Kaluza GL and Granada JF. Coronary bare metal stent implantation in homozygous LDL receptor deficient swine induces a neointimal formation pattern

- similar to humans. *Atherosclerosis*. 2010;213:518-24.
- 28) Li Y, Fuchimoto D, Sudo M, Haruta H, Lin QF, Takayama T, Morita S, Nochi T, Suzuki S, Sembon S, Nakai M, Kojima M, Iwamoto M, Hashimoto M, Yoda S, Kunimoto S, Hiro T, Matsumoto T, Mitsumata M, Sugitani M, Saito S, Hirayama A and Onishi A. Development of Human-Like Advanced Coronary Plaques in Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Pigs and Justification for Statin Treatment Before Formation of Atherosclerotic Plaques. *J Am Heart Assoc*. 2016;5:e002779.
- 29) Moriyama N, Shishido K, Tanaka Y, Yokota S, Hayashi T, Miyashita H, Koike T, Yokoyama H, Takada T, Nishimoto T, Ochiai T, Tobita K, Yamanaka F, Mizuno S, Murakami M, Takahashi S and Saito S. Neoatherosclerosis 5 Years After Bioresorbable Vascular Scaffold Implantation. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71:1882-1893.
- 30) Gogas BD, Benham JJ, Hsu S, Sheehy A, Lefer DJ, Goodchild TT, Polhemus DJ, Bouchi YH, Hung OY, Yoo SY, Joshi U, Giddens DP, Veneziani A, Quyyumi A, Rapoza R, King SB, 3rd and Samady H. Vasomotor Function Comparative Assessment at 1 and 2 Years Following Implantation of the Absorb Everolimus-Eluting Bioresorbable Vascular Scaffold and the Xience V Everolimus-Eluting Metallic Stent in Porcine Coronary Arteries: Insights From In Vivo Angiography, Ex Vivo Assessment, and Gene Analysis at the Stented/Scaffolded Segments and the Proximal and Distal Edges. *JACC Cardiovasc Interv*. 2016;9:728-41.