

5. 生体内で自己組織の再生を促すセルフリー型再生デバイスによる心筋再生療法に関する研究

分担研究者 宮川 繁 大阪大学大学院医学系研究科 助教

[研究要旨]

重症心不全患者の根本治療は心臓移植であるが、臓器移植法改定においてもドナーの絶対的不足状態は変わらない。現在重症心不全患者には、埋め込み型補助人工心臓（LVAD）が実施されているが、社会復帰には尚、問題点も多い。また、長期培養を有する自己細胞移植療法は、汎用性および緊急使用には問題点も多い。これらに代わり、治療効果が高く、セルフリーな低分子合成化合物の製剤化による心臓移植・LVAD装着の回避、およびLVAD離脱を目指した心臓の再生医療への期待は大きい。

低分子合成化合物徐放性製剤（ONO-1301MS）を心臓に直接投与（心筋内投与および心臓表面に貼付）することにより、ONO-1301が各種内因性修復因子（HGF、VEGF、IGF-1、SDF-1等）を産生促進することによる各種重症心不全（虚血性心筋症および拡張型心筋症）モデルで心機能等の有効性を確認している。今後、臨床予定投与ルート（フィブリン糊で心臓貼付）に従い、ブタ虚血心筋症（OMI）モデルで有効性を確認した後、非臨床試験項目を決定・実施し、First in human試験を行う予定である。早急に、臨床予定ルートを決定し、薬効薬理試験を実施予定。

A. 研究目的

重症心不全（虚血性心筋症および拡張型心筋症）の治療に対し、従来の人工心臓、心臓移植療法や長期培養を有する自己細胞移植療法に代わるような、治療効果が高く、細胞培養を不要（セルフリー）とする低分子合成化合物の製剤化により、汎用性の向上および緊急使用可能な心血管・心筋再生療法剤の開発を目的とする。

B. 研究方法

ONO-1301MS剤心臓局所投与における各種重症心不全モデルで薬効薬理試験を実施し、有効性を確認している。

1) マウス左冠動脈結紮心筋梗塞モデルに対し、梗塞心筋周囲にONO-1301MS（4週間徐放剤）を直接筋注投与し、その効果を検討した。マウスを冠動脈結紮後に、ONO-1301MS（4週間徐放剤）およびONO-1301を含まないMS剤を梗塞周辺部2か所に局所投与した。

2) 開心術によりアメイロイドコンストリクターをブタ心臓左回旋枝（LCx）の根部に埋め込み、4週間後に冠動脈造影（CAG）を施行、LCx完全閉塞を認め

たブタを対象とした。ONO-1301MS剤（4週間徐放剤）およびONO-1301を含まないMS剤を虚血周辺部の心筋内に投与し、2群間比較を行った。

3) ONO-1301MS（3週間徐放剤）を用いて、イヌ高速 β -シグ（拡張型心筋症）モデルで誘発された拡張型心筋症モデルに対する心機能改善効果の検討を行った。心室 β -シグは240ビート/分で、4週間処理を行い、4週後に、ONO-1301を含まないMS群およびONO-1301MS群の2群に分け、左室心筋内に投与を行った。

4) 心筋梗塞マウスへのONO-1301MS（4週間徐放剤）の治療効果に関して、骨髄由来細胞の影響について検討した。

5) δ -筋グリカン欠損自然発症拡張型心筋症モデルであるJ2N-Kハムスターに、ONO-1301MS（3週間徐放剤）をアテロラゲン膜に浸透させたシートを心臓に直接貼付投与群、ONO-1301を含まないMS剤群、および正常群にて比較を行った。

6) 血管新生促進作用および心筋保護作用等を有するONO-1301MSと筋芽細胞シート移植（SMBCT）との併

用効果についてイヌ高速ペースング（拡張型心筋症）モデルを用いて検討した。

（倫理面への配慮）

基礎的研究において、遺伝子改変動物、プラスミド DNA あるいは遺伝子導入ウイルス等を用いる場合は、使用に際して遺伝子組み換え生物などの使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律、カルタヘナ条約等各種法令・告示・通知に基づき研究を実施した。

動物操作に当たっては、本学の動物実験規定に従って行なった。

C. 研究結果

1) 28日後の、生存曲線では、薬物投与群で有意な延長が認められ、心破裂を抑制し、心エコー図でも心機能改善効果が認められた。組織学的評価では、梗塞サイズの縮小、心筋細胞の肥大化、間質の線維化を抑制した。また7日目の免疫組織学的検査では毛細血管密度は薬剤投与群で増加し、HGF および VEGF の mRNA の増加が確認され、これらの作用は、抗 HGF / 抗 VEGF 抗体投与により減弱した（論文1）。

2) ONO-1301MS 投与群では、多数の側副血行路が形成され、さらに NOGA システムによる拡張末期容量 (LVSDV) は、投与群で少なく心筋リモデリングを抑制した。さらに、8週後に採取した心臓内虚血部位の CD31 陽性細胞は、投与群で有意に多数であった。ONO-1301MS は心筋内の血管新生を促進し、心筋リモデリングを抑制した（論文2）。

3) 心エコー検査および心カテーテル検査では ONO-1301MS 投与により有意な縮小作用を示した。また、組織学的検査において、心筋線維化面積および cell diameter は ONO-1301 投与により有意に縮小していた。電顕検査において、ミトコンドリアの変化が ONO-1301 投与により回復していた。これらの結果は、ONO-1301MS により誘導された幾つかの体内再生因子による血管新生・心筋再生効果によることが示唆された（学会発表1）。

4) ONO-1301MS または ONO-1301 を含まない MS 剤をアテロコラーゲン膜に浸透させたシートを心臓表面に貼付することにより、ONO-1301MS 群で4週間後の梗塞周辺部において、SDF-1、HGF、VEGF は上昇していた。

骨髄細胞を GFP 陽性細胞により置換したマウスを用いて、冠動脈完全閉塞心筋梗塞モデルに ONO-1301MS シート貼付し、2ヵ月後に検討した結果、心筋梗塞部に GFP 陽性細胞が存在し、そのいくつかは毛細血管の構成部に存在していた。また、ONO-1301MS 投与群において、LV 壁は肥厚しており、梗塞面積は縮小しており、また生存率の延長も認めた。ONO-1301MS の心筋貼付により、体内再生因子 (SDF-1) を産生促進し、骨髄細胞から梗塞部へ修復細胞を補充することにより、心筋梗塞を治癒することが示唆された（学会発表4）。

5) ONO-1301 群で有意な生存率の延長、及び心エコー検査により、心機能の有意な改善効果が認められた。また、ONO-1301 投与により毛細血管数の増加とコラーゲン蓄積の減少が認められた。ONO-1301MS シートにより、拡張型心筋症発症により障害を受けた心筋を再生することが示唆された（学会発表3）。

6) 心エコー検査においては、全ての項目で、ONO-1301MS 群および SMBCT 群は対照群に比し有意に改善していたが、併用群はさらに改善しており相乗効果が確認された。ONO-1301MS と SMBCT の併用群は、筋芽細胞シート移植 (SMBCT) の生着率を向上させ、重症心不全 (DCM) に対する治療法として効果的であることが示唆された（学会発表2）。

D. 考察

虚血性心筋症および拡張型心筋症モデルを用いた ONO-1301MS 剤の心筋内投与およびアテロコラーゲンシートを用いた ONO-1301MS 剤懸濁の心臓貼付投与における有効性はすでに、マウス、ハムスター、イヌ、ブタモデルにおいて心機能、梗塞面積、線維化面積、生存率などで確認しているが、臨床投与予定ルート（フィブリン糊貼付）における有効性薬理試験はまだ実施していない。今後、虚血性心筋症モデルでこれらについて検討する予定である。

E. 結論

今後、臨床投与予定ルート（フィブリン糊貼付）における虚血性心筋症モデルで最少有効投与量の設定および最大耐量での有効性について検討する予定である。これらの有効性薬理試験結果から、臨床試験開始に必要な非臨床試験項目を決定する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) マウスAMIモデルMS心筋投与 ; Clin Sci 112: 607-616 (2007)
- 2) ブタOMIモデルMS心筋投与 ; Life Science 85: 255-261 (2009)
- 3) ラット完全虚血AMIモデルMS皮下投与 ; Biomedicine & Aging Pathology 1; 90-96 (2011)
- 4) ラット虚血再灌流AMIモデルMS皮下投与 ; European J Pharmacology 674; 352- 358 (2012)
- 5) T0-2/DCMハムスターMS皮下投与 ; Biomedicine & Pharmacotherapy 63: 781-786 (2009)
- 6) マウスMS皮下投与心臓移植慢性拒絶 International Heart J 53 : 64-67 (2012)

2. 学会発表

- 1) イヌ高速ペーシングモデルMS心筋内投与 (ATS2010発表)
- 2) イヌ高速ペーシングモデルMS心筋内投与/筋芽細胞シート併用 (AHA2011発表)
- 3) DCMハムスターアテロコラーゲンシート心臓貼付投与 (AHA2011発表)
- 4) マウス完全虚血AMI ; アテロコラーゲンシート心臓貼付投与 (AHA2011発表)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 物質特許 ; US Patent Number: 5, 480, 998 (1993)
- 2) 新規用途特許 ; WO 2004/032965 (2002)
US7, 547, 715B2 (2009)、特許第
4497320号 (2010)
- 3) ONO-1301MS製剤特許 ; WO 2008/047863 (2006)
- 4) ONO-1301MS心臓貼付法 (出願予定)

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

6 LRG(Leucine-Rich alpha-2 Glycoprotein)蛋白の虚血性心疾患治療への
臨床応用に関する研究

分担研究者 宮川 繁 大阪大学大学院医学系研究科 助教

[研究要旨]

最新のプロテオミクス手法を用いて関節リウマチなどの炎症性疾患の新規活動性血清バイオマーカーとして同定した LRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein) は心不全の予測マーカーとして B-type natriuretic peptide よりも有用性が高いという報告もあり、心疾患との関連が示唆されている。また、前述したように、LRG は強い血管新生能を持つことから、虚血性心疾患時に梗塞巣を広げない、またはバイパス血管の造成などに用いることが出来ると考えられる。本研究では LRG による心血管新生の詳細な機序解明と同時に、LRG タンパク質投与による虚血性心疾患の血流の改善、すなわち治療的血管新生の誘導を目的とした、非臨床試験の準備を進めるとともに、その妥当性に関する基礎研究を進めた。

A. 研究目的

医薬基盤研究所の仲らは、最新のプロテオミクス手法を用いて関節リウマチなどの炎症性疾患の新規活動性血清バイオマーカーとしてLRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein) を同定した (Serada et al, Ann Rheum Dis 2010)。LRGは8つのロイシンリッチリピートドメインを持つ糖タンパク質であり、リンパ球、好中球、肝臓、腸上皮細胞などから分泌される事が知られているがその詳細な機能は不明であった (O'Donnell, LC et al (2002) J Leukoc Biol, Shirai, R et al, (2009) BBRC, Pickert, G et al, (2009) JEM)。LRGが関節リウマチやクローン病の炎症局所においても発現し、その発現はCRPと相関を示すが、CRPとは異なり強い血管新生促進作用を持つことを明らかにしている (特願2009-275254)。また、LRGの受容体も同定しており (特許出願準備中)、その下流でJAK/STAT3シグナル伝達経路を活性化することも明らかにしている。LRGは心不全の予測マーカーとしてB-type natriuretic peptideよりも有用性が高いという報告もあり (Watson et al (2011) Circ Heart Fail)、心疾患との関連が示唆されている。また、前述したように、LRGは強い血管新生能を持つことから、虚血性心疾患時に梗塞巣を広げない、またはバイパス血管の造成などに用いることが出来ると考えられる。本研究ではLRGによる心血管新生の詳細

な機序解明と同時に、LRGタンパク質投与による虚血性心疾患の血流の改善、すなわち治療的血管新生の誘導を目的とした、非臨床試験の準備を進めるとともに、その妥当性に関する基礎研究を進めた。

B. 研究方法

非臨床試験特に、薬理試験として、in vivo血管新生アッセイにより、LRGタンパク質の血管新生誘導能について評価した。

(倫理面への配慮)

基礎的研究において、遺伝子改変動物、プラスミド DNA あるいは遺伝子導入ウイルス等を用いる場合は、使用に際して遺伝子組み換え生物などの使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律、カルタヘナ条約等各種法令・告示・通知に基づき研究を実施した。

動物操作に当たっては、本学の動物実験規定に従って行なった。

C. 研究結果

組換えLRGタンパク質が血管新生を有する事が明らかとなった。

D. 考察

今後、臨床試験を目指し、GMP準拠で作成したヒト

LRGタンパク質を用いて以下の非臨床試験を行う。

・薬理・薬効試験：ラット、ウサギ、イヌに冠動脈左前下行枝結紮を行い、心筋梗塞モデルを作成する。ヒトLRGタンパク質を経静脈的に投与することにより、梗塞範囲や血管新生に改善が見られるかどうかを組織学的に評価する。

・薬物動態試験：「非臨床薬物動態試験ガイドライン」に従って実施する

・毒性試験：「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」に準じて実施する。

E. 結論

組換えLRGタンパク質がin vitroにおいて血管新生を有する事が明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし
2. 学会発表
特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
特になし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
特になし					

