

オキシム誘導体徐放性マイクロスフェア（ONO-1301MS）製剤の重症心不全への適応

分担研究者 宮川 繁 大阪大学大学院医学系研究科 講師
研究協力者 福嶋 五月 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、臓器移植法改定後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、問題点が多い。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の面で問題点も多い。これらに代わり、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。

低分子合成化合物であるオキシム誘導体の徐放性製剤（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、各種内因性修復因子（HGF、VEGF、SDF-1、HMGB1等）が産生促進される。その結果、骨髄細胞から梗塞部へ修復細胞が誘導されることにより、心機能の改善等に有効性があることを、各種重症心不全（虚血性心筋症および拡張型心筋症）モデルにおいて確認した。

臨床予定投与ルート（ゼラチンシートにONO-1301MSを吸収させ心臓梗塞部に貼付）での、ブタ虚血心筋症（OMI）モデルにおける最小有効投与量を確認した後、PMDA 対面助言にて追加非臨床試験項目・内容を決定した。現在追加非臨床試験を実施しており、平成26年3QにPMDA 対面助言にて医師主導治験プロトコルを決定し、年末にFirst in human（FIH）試験を開始する予定である。

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) 開心術によりアメリ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完全閉塞を認められ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、イヌ高速ペーシング（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。心室ペーシングは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）心臓貼付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) -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（4週間徐放剤）をアテロコラー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) ミニブタ陳旧性心筋梗塞(OMI)モデルを用いて、ONO-1301MS(4週間徐放剤)心臓貼付投与での心機能改善効果を示す最小有効投与量を検討した。

(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。

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。

3) 心エコー検査および心カテテル検査では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。(論文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。骨髓細胞を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、梗塞面積は縮小しており、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、骨髓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。(論文2)

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。(論文3)

6) 心エコー検査(LVEF)において、心臓貼付における最小有効投与量は0.3mg/kgであることが確認された。(学会発表1)

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剤懸濁液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、生存率において確認しているが、臨床投与予定ルート(ゼラチンシートにONO-1301MSを吸収させ心臓梗塞部に貼付)におけるブタ虚血性心筋症モデルでの有効性薬理試験では、最小有効投与量は0.3mg/kgであることが確認された。長期的有効性に関しては、現在実施中である。

E. 結論

今後、臨床投与予定ルート(ゼラチンシートにONO-1301MSを吸収させ心臓梗塞部に貼付)における虚血性心筋症モデルにおいて、最小有効投与量は0.3mg/kgであった。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し、PMDA対面助言にて確認後、現在実施中である。これらの結果とFIH試験プロトコル(案)の確認を平成26年3QにPMDA対面助言にて行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Imanishi Y, Miyagawa S, Fukushima S, Ishimaru K, Sougawa N, Saito A, Sakai Y, Sawa Y
Sustained-release delivery of prostacyclin analog

gue enhances bone marrow-cell recruitment and yields functional benefits for acute myocardial infarction in mice. PLoS One. 2013 Jul 19;8(7):1-8

2) T. Shirasaka, S. Miyagawa, S. Fukushima, A. Saito, M. Shiozaki, N. Kawaguchi, N. Matsuura, S. Nakatani, Y. Sakai, T. Daimon, Y. Okita, Y. Sawa

A slow-releasing form of prostacyclin agonist (ONO1301SR) enhances endogenous secretion of multiple cardiotherapeutic cytokines and improves cardiac function in a rapid-pacing-induced model of canine heart failure J Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Aug;146(2):413-421

3) Ishimaru K, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Sakai Y, Ueno T, Sawa Y.

Synthetic prostacyclin agonist, ONO1301, enhances endogenous myocardial repair in a hamster model of dilated cardiomyopathy: a promising regenerative therapy for the failing heart.

J Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Dec;146(6):1516-1525.

4) Kubota Y, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Watabe H, Daimon T, Sakai Y, Akita T, Sawa Y.

Impact of cardiac support device combined with slow-release prostacyclin agonist in a canine ischemic cardiomyopathy model. J Thoracic Cardiovascular Surgery Vol.147 #3 1081-1087

2. 学会発表

1) Hiroki Mizoguchi ; Shigeru Miyagawa ; Satsuki Fukushima ; Atsuhiko Saito ; Yoshiki Sakai ; Yukiko Imanishi ; Akima Harada ; Takayoshi Ueno ; Koich Toda ; Toru Kuratani ; Yoshiki Sawa
A Novel Therapeutic Technology of Long-Acting Prostacyclin Agonist for Mature Porcine Ischemic Heart Model AHA2013(American Heart Association Nov.2013, Dallas)

G . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1) ONO-1301類新規作用機序、適応症、ONO-1301MS製剤特許:「内因性修復因子産生促進剤」

出願日:2003年10月9日

国際出願番号:W02004 / 032965

出願国:日米欧取得:米(US7,547,715B2) 日(特許第4497320号)、欧(EP1563846)

2) ONO-1301MS個別製剤・製法特許:「組織再生治療用徐放性製剤」

出願日:2007年10月18日

国際出願番号:W02008 / 047863

出願国:日米欧;米・欧取得済

3) ONO-1301MS心臓貼付剤・ネット併用:「心筋・血管再生デバイスとしての重症心不全治療材」

出願日:2012年9月13日

特願2012/208799、PCT出願番号:JP2013 / 74948

4) ONO-1301MS静注肺DDS;「肺疾患特異的治療剤」

出願日:2012年10月29日

特願2012/238017、PCT出願番号:JP2013 / 79134

5) ONO-1301MSステントグラフト:「薬剤溶出性ステントグラフト」

出願日:2013年10月15日、

特願2013/215067

雑誌

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Imanishi Y, <u>Miyagawa S</u> , Fukushima S, Ishimaru K, Sougawa N, Saito A, Sakai Y, <u>Sawa Y.</u>	Sustained-release delivery of prostacyclin analogue enhances bone marrow-cell recruitment and yields functional benefits for acute myocardial infarction in mice.	PLoS One.	Vol.8 Issue 7 e69302	1-8	2013
T.Shirasaka , <u>S.Miyagawa</u> , S.Fukushima, <u>A.Saito</u> M.Shiozaki, N.Kawaguchi, N.Matsuura, S.Nakatani, Y.Sakai, T.Daimon, Y.Okita, <u>Y.Sawa</u>	A slow-releasing form of prostacyclin agonist(ONO1301SR) enhances endogenous secretion of multiple cardiotherapeutic cytokines and improves cardiac functuion in a rapid-pacing-induced model of canineheart failure	J Thoracic Cardiovascular Surgery	Vol.146 #2	413-421	2013
Ishimaru K, <u>Miyagawa S</u> , Fukushima S, Saito A, Sakai Y, Ueno T, <u>Sawa Y.</u>	Synthetic prostacyclin agonist, ONO1301, enhances endogenous myocardial repair in a hamster model of dilated cardiomyopathy: a promising regenerative therapy for the failing heart.	J Thoracic Cardiovascular Surgery	Vol.146 #6	1516-1525	2013
Kubota Y, <u>Miyagawa S</u> , Fukushima S, Saito A, Watabe H, Daimon T, Sakai Y, Akita T, <u>Sawa Y.</u>	Impact of cardiac support device combined with slow-release prostacyclin agonist in a canine ischemic cardiomyopathy model.	J Thoracic Cardiovascular Surgery	Vol.147 #3	1081-1087	2014