

201415027A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)

重症拡張型心筋症患者の生命予後改善・人工心臓離脱を目指し
た新規オキシム誘導体徐放性製剤による体内誘導型再生治療法
の開発と実践

平成 26 年度 総括研究報告書

研究代表者 宮川 繁

平成 27 (2015) 年 5 月

目次

I. 総括研究報告

重症拡張型心筋症患者の生命予後改善・人工心臓離脱を目指した新規オキシム誘導体徐放性製剤による体内誘導型再生治療法の開発と実践

宮川 繁-----1

II. 分担研究報告

1. イヌ高速ペーシングモデルにおける ONO-1301 反復経口投与における長期薬効薬理試験（生存率への影響）

福嶋 五月、宮川 繁、大門 貴志-----6

2. ONO-1301 反復経口投与におけるラット肝中期発がん性試験（伊東法）

今西 悠基子、宮川 繁、大門 貴志-----9

3. YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与における追加非臨床試験の実施

①ラット 13 週間歇皮下投与毒性試験、

②ミニブタ単回心臓貼付による 6 週間及び 13 週間毒性試験

齋藤 充弘、宮川 繁、大門 貴志-----11

III. 研究成果の刊行に関する一覧表（別紙 4）-----15

IV. 研究成果の別刷

研究代表者 大阪大学大学院医学系研究科 宮川 繁

研究課題；重症拡張型心筋症患者の生命予後改善・人工心臓離脱を目指した新規オキシム誘導体徐放性製剤による体内誘導型再生治療法の開発と実践

研究要旨

ONO-1301 はトロンボキサン (TX) A2 合成酵素阻害作用を併せ持つ、選択的プロスタグランジン (PG) I2 受容体 (IP) 作動薬 (Fig 1) として見出され、小野薬品により経口抗血栓剤として臨床試験が実施されたが、副作用（下痢等）と有効性の乖離が少ないことにより開発が中止されていた。我々は、ONO-1301 の新しい薬理作用として、低用量で線維芽細胞等に作用して各種体内再生因子（HGF、VEGF、SDF-1、HMGB1 等）を産生誘導することを発見し、新しい適応症を見出した。また、ONO-1301 を生体分解性ポリマーに内封した 4 週間徐放性マイクロスフェア製剤 (YS-1402/ONO-1301MS) を DDS 製剤として新しく開発した（ドラッグリポジショニング）。

本研究は、各種の ONO-1301 製剤の拡張型心筋症 (DCM) への薬効と安全性の確認から、次世代の再生創薬として、体内誘導型再生医療剤の開発を目指す。

昨年度は、目的 1. 重症 DCM 患者の補助人工心臓 (LVAD) 装着時に、YS-1402/ONO-1301MS をシートに浸み込ませて心臓貼付投与することによる、LVAD 離脱 (bridge to recovery) を目的とした治療法の開発として、1) イヌ高速ペーシング (DCM) モデルに対して、YS-1402/ONO-1301MS を心臓貼付投与し、心機能を評価した。また、2) ミニブタ陳旧性心筋梗塞 (ICM) モデルを用いて、同様の投与方法にて心臓貼付した試験、及び 3) 自然発症拡張型心筋症 (J2N-k) ハムスター (20 週齢) に YS-1402/ONO-1301MS を心臓貼付投与した結果を報告した。

本年度は、YS-1402/ONO-1301MS 製剤心臓貼付投与における治験開始のための追加非臨床試験として、①ラット 13 週間皮下投与毒性試験、及び②ミニブタ単回心臓貼付による 6 週間及び 13 週間毒性試験を GLP 基準で実施した。これらの結果から、治験薬概要書、治験実施計画書、及び同意説明文書を作成し、PMDA 対面助言を実施し、IRB を経て、2015 年 3 月に治験届を提出した。2015 年 3Q から、治験 1) 「冠動脈バイパス手術を施行する虚血性心筋症患者に YS-1402 を単回心臓貼付投与した際の安全性、忍容性、及び有効性を検討する並行群間用量漸増試験 (第 I/II a 相)」を実施する。また、治験 1) の P-I 試験により求められた最大安全量を用いて、治験 2) 「重症拡張型心筋症患者の補助人工心臓装着時に YS-1402 を単回心臓貼付した際の安全性及び有効性確認試験 (P-II a)」を実施し、LVAD 離脱の可能性を検証する。

また、昨年度は、目的 2. ONO-1301 反復経口投与による早期治療介入により、DCM の重症化を抑制し、心臓移植・LVAD 装着の回避及び遅延を目指して、汎用性ある心血管・心筋再生療法剤の開発として、J2N-k ハムスターに対して、20 週齢から 28 週齢まで ONO-1301 を反復経口投与を行った。

本年度は、イヌ高速ペーシングモデル長期試験を実施し、経口投与により有意な心機能の改善及び生存率の延長を認めた。

また、ONO-1301 は血管新生作用を有するため、癌に対するプロモーション作用が危惧される。よって、ONO-1301 反復経口投与での癌に対するプロモーション作用およびイニシエーション作用を確認するために、ラット肝中期発がん性試験 (伊東法) を実施した結果、共に陰性であった。

DCM 患者に対する ONO-1301 経口投与における早期治療介入は、DCM の重症化を抑制し、心臓移植・LVAD 装着の回避及び遅延する可能性が示唆された。

研究分担者

大阪大学大学院医学系研究科 助教

福嶋五月

大阪大学大学院医学系研究科 特任准教授
(常勤) 齋藤充弘

大阪大学大学院薬学研究科附属創薬センター
特任助教 今西悠基子

兵庫医科大学 准教授

大門貴志

A. 研究目的

重症虚血性心筋症 (ICM) の 5 年生存率は 60% であり、重症拡張型心筋症 (DCM) の 1 年死亡率は 75% である。これらの根本治療は心臓移植であるが、ドナーの絶対的不足状態は変わらない。心臓移植適応患者には、待機的治疗として補助人工心臓 (LVAD) が施行されるが、合併症 (脳梗塞、感染症等) の危険性も高い。生命予後改善・人工心臓離脱を目指した心臓再生医療の開発は喫緊の課題である。

LVAD、心臓移植、および細胞療法に代わり、治療効果が高く、細胞培養を不要とする再生創薬により、汎用性、経済性および緊急使用可能な心血管・心筋再生療法剤を開発し、治験の施行、ひいては薬事承認され、新しい心不全治療剤として臨床の現場で汎用されることを究極の目的と見据える。

B. 研究方法 (詳細は各分担報告書を参照)

1. YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与 ; 重症 DCM 患者の補助人工心臓 (LVAD) 装着時に、YS-1402/ONO-1301MS をシートの下に浸み込ませて心臓貼付投与することによる、LVAD 離脱 (bridge to recovery) を目的とした治療法の開発。

本年度は、心臓貼付投与での臨床試験開始に必要な追加非臨床試験の項目とその内容について PMDA 対面助言を実施した。その結果、(1) ラット 13 週間皮下投与毒性試験、及び (2) ミニブタ単回心臓貼付による 6 週間及び 13 週間毒性試験を確認し、これらを GLP 基準にて実施した。

薬効薬理試験での最小有効投与量、及び追加毒性試験での無毒性量等の結果から、重症心筋症 (虚血性心筋症及び拡張型心筋症) を対象とした YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与における、治験薬概要書、治験実施計画書、及び同意説明文書を作成した。

2. ONO-1301 経口投与 ; ONO-1301 反復経口投

与による早期治療介入により、DCM の重症化を抑制し、心臓移植・LVAD 装着の回避及び遅延を目指した、汎用性ある心血管・心筋再生療法剤の開発。

軽症・中等症拡張型心筋症患者に早期治療介入として ONO-1301 (原薬) を反復経口投与することにより、心臓移植や人工心臓の装着を遅らせたり、回避することを目的とした生命予後改善治療法の開発を目的として検討した。

本年度は、1) イヌ高速ペーシングモデル長期試験として、高速ペーシング 4 週間後から、ONO-1301 を 6 ヶ月間反復経口投与を行い、心機能の改善効果及び生存率の延長を評価した。また、2) ONO-1301 は血管新生効果を有するため、癌細胞に対してプロモーション作用が危惧される。

発がんに対する ONO-1301 反復経口投与における

プロモーション作用、及びイニシエーション作用を確認するために、ラット肝中期発がん性試験 (伊東法) を実施した。

(倫理面への配慮)

前臨床・非臨床研究においては、各種法令・告示・通知に基づき研究を実施する。加えて、臨床試験の実施に際しては、研究計画書に関して倫理委員会での承認を受け、将来的には治験を行い、最終的には薬事申請を行う。

C. 研究結果

1. 心臓貼付投与

追加非臨床試験として、(1) ラット 13 週間皮下投与毒性試験、及び (2) ミニブタ単回心臓貼付による 6 週間及び 13 週間毒性試験を GLP 基準で実施した。

(1) ONO-1301MS のラット 13 週間皮下投与毒性試験 (投与量: 0, 3, 10, 30 mg/kg/回, 1 回/4 週) では、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査及び器官重量測定において、いずれの投与群でも被験物質投与に起因した変化は認められず、死亡例も認められなかった。剖検では、30 mg/kg の雌雄で投与後 5 週間経過した投与部位に被験物質と推定される白色残留物が認められた。病理組織学的検査では、3 mg/kg 以上の雌雄の投与後 5 週間経過した投与部位に肉芽組織が認められた。また、リンパ球細胞浸潤が 3 mg/kg 以上の雄及び 10 mg/kg 以上の雌で、線

維化が 30 mg/kg の雌雄で認められた。これらの変化は異物（投与物）に対する除去反応と考えられ、被験物質の刺激性を示唆する所見は認められなかった。投与後 9 週経過した投与部位では線維化は認められず、他の変化も軽減していた。また、投与後 13 週経過した投与部位では変化は認められなかった。TK 測定の結果、雌雄共に投与量の増加に伴って Cmax 及び AUC2184h は増加した。初回投与後の血漿中濃度は、投与後 1~4 時間をピークに減少したが、投与後 672 時間（28 日）でも持続的な暴露が確認された。また、2 回目及び 3 回目投与後においても同様の血漿中濃度推移を示し、明らかな性差や反復投与による蓄積性は認められなかった。以上の結果より、無毒性量は雌雄とも 30 mg/kg 以上と判断した。

(2) ONO-1301MS のミニブタ単回心臓貼付投与 6 週間及び 13 週間毒性試験（投与量：0, 1, 3, 10 mg/kg）では死亡及び切迫剖検例は認められなかった。一般状態観察において、対照群を含む雌雄すべての群で投与日に鎮静及び自発運動減少が認められ、自発運動減少は投与後 3 日まで認められたが、その後これらの所見は回復した。体重測定及び摂餌量測定において、対照群を含む雌雄すべての群で投与後に一過性に減少が認められたが、投与後 7 日には回復した。血圧・心電図検査、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査及び器官重量測定において、いずれの投与群でも被験物質投与に起因した変化は認められなかった。剖検では、対照群を含む雌雄すべての 6 週間観察群で、心嚢と心臓壁あるいは胸壁の癒着が認められ、心臓壁と胸壁の癒着、投与検体様物質あるいは心嚢の心臓壁への付着が認められた例もあった。13 週間観察群でも 6 週間観察群と同様の癒着が認められたが、投与検体様物質あるいは心嚢の心臓壁への付着は認められなかった。病理組織学的検査では、対照群を含む雌雄すべての 6 週間観察群で心臓の心膜にごく軽度から軽度の肉芽組織あるいは異物性肉芽腫が認められたが、これらは異物に対する除去反応と考えられた。被験物質の刺激性を示唆する所見は認められず、ONO-1301MS の影響は認められなかった。13 週間観察群でも心臓の心膜に肉芽組織が認められたが、その程度はごく軽度であり、6 週間観察群に比べて軽減した。TK 測定の結果、雄において投与量の増加に伴って Cmax 及び AUC1008h は増加した。全身曝露量及び血漿中濃度推移に明らかな雌雄差は

認められなかった。また、13 週観察群の AUC1008h 及び AUC2184h は同様の値を示した。心臓組織中 ONO-1301 濃度測定の結果、6 週観察群の 1 mg/kg では、すべての例で定量限界（0.0600 ng/g tissue）未満であり、3 mg/kg でもわずかに検出された程度であった。10 mg/kg では、比較的高い濃度で検出された雄 1 例を除き、定量限界未満あるいはわずかに検出された程度であった。13 週観察群の 10 mg/kg では、定量限界未満あるいはわずかに検出された程度であった。以上の結果より、無毒性量は雌雄とも心臓貼付投与可能な最大投与量である 10 mg/kg 以上と判断した。

2. ONO-1301 経口投与

(1) イヌに心臓高速ペーシング（拍動数：226~240 beats/min）を行うことにより誘発させた重症拡張型心筋症モデルを用い、高速ペーシング 4 週間から 26 週間、ONO-1301 の反復経口投与（モデル作製後 30 週）による長期有効性（生存率）に対する効果について検討した。

ペーシング惹起（226~240 beats/min）4 週後の心エコー検査により、Control 群では左室リモデリング（左室内腔の拡大及び壁厚の減少）、左室収縮機能不全（駆出率及び短縮率の減少）が観察され、投与後 13 日目に死亡動物が出現し、投与後 61 日（モデル作製後 13 週）では全例死亡した（生存数：0/6 例）。また、瀕死動物及び死亡動物の剖検時、心拡大、肺うっ血・肺水腫、肝臓腫大及び滲出液（心のう水・胸水・腹水）の貯留が認められ、重度の心不全状態を呈していた。

ONO-1301 の 3 mg/kg×2 回/日反復経口投与群では投与後 44 日で初めて死亡例が認められた。投与後 26 週（モデル作製後 30 週後の最終評価時点）においても 1 例生存（生存数：1/6 例）していた。心不全による死亡時期が Control 群に比べ遅延したことにより、生存率の有意な延長効果が認められた。また、心不全時の左室収縮機能不全に対して、Control 群に比し、投与後 2 週及び 4 週で LVEF の有意な改善効果が認められた。ONO-1301 反復経口投与での早期治療介入は、拡張型心筋症の心機能の重症化を抑制し、生存率を延長させることにより、心不全の悪化を予防する可能性が示唆された。

(2) ONO-1301 のラット中期発がん性試験：

ONO-1301 は線維芽細胞等から HGF、VEGF、SDF-1、HMGB1 等を産生促進することにより、

血管新生促進作用を有することが確認されている。よって、ラット肝中期発がん性試験を用いて、癌に対するプロモーション作用及びイニシエーション作用の有無を検討した。

F344/DuCr1Cr1j 雄性ラットに DEN (Diethylnitrosamine) を 200 mg/kg の用量で 1 回腹腔内投与し、その 2 週間後より被験物質である ONO-1301 を 0 (溶媒)、3 及び 10 mg/kg/day の用量で 6 週間、1 日 1 回強制経口投与した。被験物質投与開始 1 週間には全動物に対し、2/3 肝部分切除術を実施した。実験開始 8 週後に全生存動物を屠殺剖検し、肝臓を免疫組織化学的にポリマー法にて胎盤型 Glutathione S-transferase (GST-P) 染色を実施し、画像解析装置を用いて肝臓の単位面積に対する GST-P 陽性細胞巢の発生個数及び面積を定量的に解析した。

DEN 無処置の 10 mg/kg 群では、GST-P 陽性細胞巢の発生は認められなかった。

陽性対照の S. PB 群では、肝臓重量の有意な高値及び GST-P 陽性細胞巢の単位面積当たりの個数及び面積の有意な高値がみられ、本試験の妥当性が示された。

本試験で用いた被験物質である ONO-1301 はプロスタグランジン I₂ 受容体作動活性を持ち、さらに線維芽細胞等に作用して肝細胞増殖因子 (HGF)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF-A) 及びストローマ細胞由来因子 (SDF-1) などを産生することが報告されている。類似のプロスタサイクリンを主成分とする、Epoprostenol Sodium (PGI₂・Na 塩) は、本試験と同様に肝中期発がん性試験において肝臓に対して発がん修飾作用がなく、また変異原性試験、毒性試験等においても発がん性を示唆する結果は得られていない。また、プロスタサイクリン誘導体である Beraprost sodium も同様にマウス癌原性試験、ラット癌原性試験、及び本試験と類似の中期発がん性試験においても、全て発がん性がないことが報告されている。

以上の結果から、ONO-1301 は最大耐量である 10 mg/kg 反復経口投与における本試験条件下において肝臓の前がん病変発生に対する明らかな修飾作用 (プロモーション作用) は示さなかった。また、本試験で肝臓に対するイニシエーション作用も認められず、遺伝毒性試験の結果は陰性であること、また類似薬での発がん性の報告もないことから、ONO-1301 についても発がん性は示さないものと推察された。また、血中濃度測定結果から、ONO-1301

は用量相関的に経口吸収されていることが確認された。

D. 考察

(1) イヌ高速ペーシング (DCM) モデルを用いて、ペーシング 4 週間後に開胸し、YS-1402/ONO-1301MS (4 週間徐放性製剤) を臨床投与法にて単回心臓貼付投与し、投与 4 週間後 (ペーシング 8 週間) に心機能 (LVEF) 評価した結果、用量相関的に心機能 (LVEF) 改善効果を示した。(2) J2N-k ハムスターに YS-1402/ONO-1301MS を単回心臓貼付することにより、心機能の改善効果を示し、生存率の有意な延長を認めた。

また、(3) ミニブタ陳旧性 (OMI) 心筋梗塞モデルを用いて、梗塞 4 週後に臨床投与法にて ONO-1301MS を心臓貼付し、4 週後に心機能を評価した結果、最小有効投与量は試験

(1) イヌ高速ペーシング (DCM) モデル結果と同じであった。一方、PMDA 対面助言にて、本臨床試験実施に必要な追加非臨床毒性試験項目とその内容 (ラット 13 週間間歇皮下投与毒性試験及びミニブタ単回心臓貼付投与 6 週間及び 13 週間毒性試験) を確認し、実施した。

これらの結果を用いて、心臓貼付投与における治験 1) として、「冠動脈バイパス手術を施行する虚血性心筋症患者に YS-1402/ONO-1301MS を心臓貼付投与し、安全性・忍容性を確認 (P-I) し、引き続き心機能改善効果を検証する並行群間用量漸増試験 (P-I/IIa)」を開始する。また、治験 1) の P-I 試験で確認された最大安全量を用いて、治験 2) ; 「拡張型心筋症患者への補助人工心臓 (LVAD) 装着時に YS-1402/ONO-1301MS を心臓貼付投与し、LVAD 離脱の可能性を検証する医師主導治験 (P-IIa)」を実施する。これら 2 試験に関する、治験概要書、治験実施計画書、および同意説明文書を作成し、PMDA 対面助言を実施した。現在、治験 1) について、IRB を経て、治験届を PMDA に提出している。

一方、心臓貼付投与は、重症心不全患者に対する侵襲が大きいため、軽症・中等症拡張型心筋症患者に対しては、早期治療介入として ONO-1301 (原薬) を汎用性、経済性、安全性の高い反復経口投与をすることにより、心臓移植や人工心臓の装着を遅らせたり、回避することを目的とした生命予後改善治療法の開発は重要である。本年度は、イヌ高速ペーシングモデルへの反復経口投与試験の結果、

心機能と生存率の有意な改善効果を認めた。

DCM 臨床試験には、6ヶ月以上の長期投与が必要であるため、追加の長期毒性試験（イヌ9ヶ月及びラット6ヵ月反復投与毒性試験）の実施が必要となる。

また、ONO-1301 反復経口投与は、血管新生促進作用を有することから、発がんに対するプロモーション作用が危惧される。ラット肝中期発がん性試験にて発がんに対するプロモーション作用及びイニシエーション作用を確認した所、共に陰性であった。

E. 結論

治験1)として虚血性心筋症と診断され、LVEF が40%以下の冠動脈バイパス術を受ける患者に対して、表題：「冠動脈バイパス手術を施行する虚血性心筋症（ICM）患者にYS-1402/ONO-1301MSを単回心臓貼付投与した際の安全性、忍容性、及び有効性を検討する並行群間用量漸増試験（第I/IIa相）」を実施する。即ち、6週間の血中動態と安全性評価（P-I試験）後、引き続き、有効性（投与26週後の心機能（LVEF）変化量）の確認（P-IIa）を行う。

また、治験1)のICM患者P-I試験により求められた最大安全量にて、治験2)として、拡張型心筋症と診断され、心臓移植への待機治療として補助人工心臓（LVAD）が装着される患者に対して、表題：「重症拡張型心筋症（DCM）患者の補助人工心臓（LVAD）装着時に、YS-1402を単回心臓貼付投与することによる有効性（投与26週後の心機能（LVEF）変化量）の確認（P-IIa）」を行う。同時に、LVAD離脱（Bridge to Recovery）の可能性について検証を行う。

2015年3Qより、治験1)を開始し、引き続き、治験2)を開始する予定である。

また、軽症・中等症拡張型心筋症患者に早期治療介入として、ONO-1301（原薬）を反復経口投与することにより、心臓移植や人工心臓の装着を遅らせたり、回避することが可能であることが示唆された。今後、臨床試験開始に必要な追加非臨床試験を実施する予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) A sustained-release drug-delivery system of synthetic prostacyclin agonist, ONO-1301SR: a new reagent to enhance cardiac tissue salvage and/or regeneration in the damaged heart. Satsuki Fukushima · Shigeru Miyagawa · Yoshiki Sakai · Yoshiki Sawa. Heart Fail Rev DOI 10.1007/s10741-015-9477-8 (2015)

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他（今後の予定）

1) 「新規ナノスフェア製剤」

・出願人：大阪大学 等

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)）
分担研究報告書（平成 26 年度）

研究分担者 大阪大学医学系研究科 福嶋 五月、宮川 繁
兵庫医科大学（統計担当） 大門 貴志

課題名；イヌ高速ペーシングモデルにおける ONO-1301 反復経口投与における長期薬効薬理試験（生存率への影響）

研究要旨；

イヌ高速ペーシング拡張型心筋症モデルを用い、ONO-1301 の 26 週間反復経口投与（モデル作製後 30 週）による長期有効性（生存率）に対する効果について検討した。ペーシング惹起 4 週後の心エコー検査により、2 群に群分けを行った。Control 群では左室リモデリング（左室内腔の拡大及び壁厚の減少）、左室収縮機能不全（駆出率及び短縮率の減少）が観察され、投与後 13 日目に死亡動物が出現し、投与後 61 日（モデル作製後 13 週）では全例死亡した（生存数：0/6 例）。また、瀕死動物及び死亡動物の剖検時、心拡大、肺うっ血・肺水腫、肝臓腫大及び滲出液（心のう水・胸水・腹水）の貯留が認められ、重度の心不全状態を呈していた。

一方、ONO-1301 の 3 mg/kg×2 回/日反復経口投与群では投与後 44 日で初めて死亡例が認められた。投与後 26 週（モデル作製後 30 週後の最終評価時点）においても 1 例生存（生存数：1/6 例）していた。心不全による死亡時期が Control 群に比べ遅延したことにより、生存率の有意な延長効果が認められた。また、心不全時の左室収縮機能不全に対して、Control 群に比し、投与後 2 週及び 4 週で LVEF の有意な改善効果が認められた。ONO-1301 反復経口投与での早期治療介入は、拡張型心筋症の心機能の重症化を抑制し、生存率を延長させることにより、心不全の悪化を予防する可能性が示唆された。

A. 研究目的

軽症・中等症拡張型心筋症患者に早期治療介入として ONO-1301（原薬）を反復経口投与することにより、DCM の重症化を抑制し、心臓移植や人工心臓の装着を遅らせたり、回避することを目的とした汎用性ある心血管・心筋再生療法剤の開発を検討する。即ち、イヌ高速ペーシング拡張型心筋症モデルを用いて、長期間での ONO-1301 反復経口投与による心機能改善効果と生存率延長効果について検討する。

B. 研究方法

・早期治療介入による経口投与試験；

1. 試験方法

1) 高速ペーシング誘発イヌ心不全モデルの作製方法

(1) ペースメーカーの埋め込み手術

麻酔下、動物の右側頸部を切開し、動物用体内式心臓ペースメーカー（以下ペースメーカー、SIP-501、スターメディカル株）を皮下に埋め込み、X 線透視診断装置）で右頸静脈よりリトラクタブルスクリューインリード（TENDRIL™STS 2088TC、58cm 6Fr：セント・ジュード・メディカル株）を挿入し、先端を右心室壁に留置した。Sham 群については偽手術を行った。ペースメーカーを作動させパルスレートに連動

した心臓の拍動が得られることを心電図（第Ⅱ誘導）にて確認後、切開部を縫合した。

(2) イヌに高速ペーシング（拍動数：226～240 beats/min）を行うことにより誘発させた重症拡張型心筋症モデルを用い、高速ペーシング 4 週後に心機能（LVEF）により等しく群分けを行い、ONO-1301（3 mg/kg）の 1 日 2 回、6 ヶ月（26 週）間反復経口投与（モデル作製後 30 週）による長期有効性（生存率）に対する効果について検討した。尚、ONO-1301 は、直近の体重により投与量を設定（1 週間に 1 回）し、ONO-1301 をカプセルに充填し、強制経口投与を行った。

(3) ペースメーカー作動状態の確認として、心電図（第Ⅱ誘導）検査として、病態作製期間（4 週間）は、週に 1 回の頻度で測定した。なお、被験物質投与後は心エコー測定時に実施した。また、聴診器の検査を実施した。即ち、毎日、10 秒間の拍動数を測定した。聴診器の検査で異常があった場合は、心電図を測定し、ペーシングエラーの有無を確認した。

2) 毎日（朝夕投与時の 2 回）、動物の一般状態（死亡の有無、姿勢、活動性、歯茎の色、腹水貯留の有無、便等）及び摂餌量を観察した。生存率の算出は、試験中は、動物の死亡の有無を観察し、各投与群における生存率を算出した。生存率は被験物質投与開始日を起算日とし、1 日 2 回、6 箇月間観察した。なお、瀕死状態は耳介反射、聴覚反射、痛覚反射の検査において 1 項目でも反応しない場合をもって死亡

と判断した。

3) 体重測定：ペースメーカー埋め込み日、ペースメーカー作動日及びそれ以降 1 週間毎に行った。

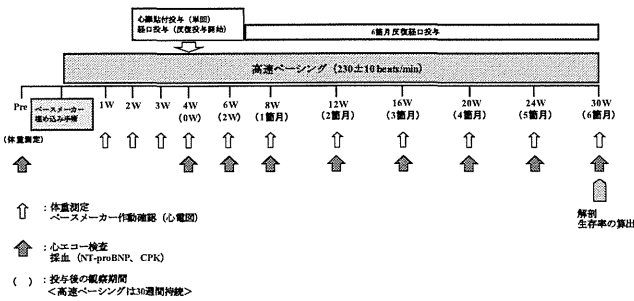
4) 心エコーの測定

心エコーの測定は、測定ポイントとして、モデル作製前 (Pre)、4 週 [群分け時 (被験物質投与前)]、被験物質投与後 2 週、4 週 (1 ヶ月)、2 ヶ月、3 ヶ月、4 ヶ月、5 ヶ月、6 ヶ月 (解剖時) に実施した。

その他は、「YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与試験」と同様に実施した。

(1) 測定方法：無麻酔下、超音波画像診断装置を用いて心エコーを測定した。胸部にセクタープローブ (10 MHz) を当て M-mode で左室拡張末期径 (LVIDd) 及び左室収縮末期径 (LVIDs)、心室中隔壁厚 (IVSTd)、左室後壁拡張末期厚 (LVPwd) を測定した。また駆出率 $[EF=(LVIDd^3-LVIDs^3)/LVIDd^3]$ 及び左室内径短縮率 $[\%FS=(LVIDd-LVIDs) \times 100/LVIDd]$ を算出した。

(2) 測定スケジュール；



(倫理面への配慮)

前臨床・非臨床研究においては、各種法令・告示・通知に基づき研究を実施した。加えて、臨床試験の実施に際しては、研究計画書に関して倫理委員会での承認を受け、将来的には治験を行い、最終的には薬事申請を行う。

C. 研究結果

1. 試験成績

・早期治療介入による経口投与試験；

1) 生存率

Control 群は、投与後 13 日から死亡例が出現し、投与後 61 日目に全例 (6/6 例) が死亡した。投与後 26 週時点における生存率は 0% (生存数: 0/6 例) であった。一方、ONO-1301 反復経口投与群は、投与後 44 日で初めて死亡例が確認された。その後、92 日までに 4 例の死亡が観察されたが、1 例については、投与後 26 週時点において生存した (生存数: 1/6 例)。

Kaplan-Meier 曲線における ONO-1301 反復経口投与群は、Control 群に比し、有意 (*: P<0.05) な生存率の延長効果を認めた。

生存率曲線 (Control vs. ONO-1301)

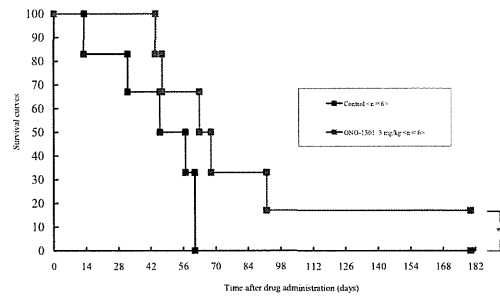


Fig. 1-2 Effects of ONO-1301 on survival curves in dogs with pacing-induced heart failure. Control: non-administration. ONO-1301: oral administration (twice a day for 26 weeks). A significant difference (*, P<0.05) between control and ONO-1301 3 mg/kg (Log-rank test).

2) 体重変化

ONO-1301 投与群は、投与後 6 週及び 8 週で体重増加が Control 群に比し抑制されていた。Control 群における投与後 6 週及び 8 週の体重増加は、腹水貯留によるものと考えられることから、ONO-1301 投与により、腹水貯留が抑制されていることが示唆された。

体重 (Control vs. ONO-1301)

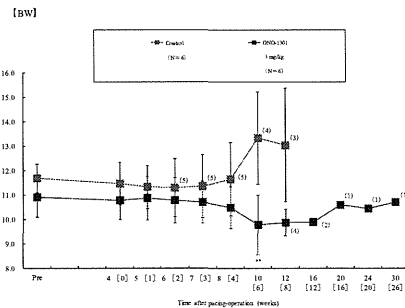


Fig. 2-2 Effects of ONO-1301 on body weight (BW) in dogs with pacing-induced heart failure (20 weeks after the pacing). Pre: before pacemaker operation. 1: 1 week after drug administration (week 1). Control: non-administration. ONO-1301: oral administration (twice a day for 26 weeks). Each value represents the mean ± S.D. Each figure in parentheses represents the number of animals. ** indicates a significant difference (P<0.01) (Student's t-test).

3) 心エコー； LVEF

Control 群は、モデル作製前の EF は 72 ± 5% (N=6) であった。モデル作製後 6 週 (投与後 2 週) の EF は 43 ± 3% (N=5)、モデル作製後 8 週 (投与後 4 週) の EF は 41 ± 5% (N=5) であり、病態による EF 低下が認められた。一方、ONO-1301 投与群はモデル作製後 6 週 (投与後 2 週) 及びモデル作製後 8 週 (投与後 4 週) における EF は、Control 群と比較して EF 変化量 (Δ) に有意な上昇 (いずれも P<0.05 vs. Control 群) が認められた。

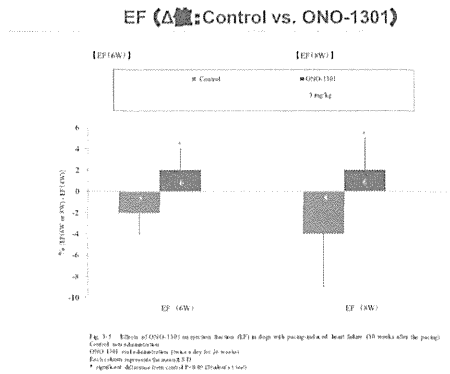


Fig. 3. Effect of ONO-1301 on ejection fraction (EF) in dogs with pacing-induced heart failure 10 weeks after the pacing. Control (white bars), ONO-1301 3mg/kg (grey bars). Error bars represent the standard deviation. * p < 0.05 (Student's t-test).

4) 心拍数

ONO-1301 経口投与での Tmax 時 (経口投与後 1.5～2.5 時間の間) においては、心拍数に影響を与えなかった。このことは、本投与量においては、Tmax (Cmax) においても血管拡張作用に伴う降圧作用は発現しないことが示唆された。

以上、ONO-1301 の 3 mg/kg×2 回/日反復経口投与群では投与後 44 日で初めて死亡例が認められ、投与後 26 週 (モデル作製後 30 週後の最終評価時点) においても 1 例生存 (生存数: 1/6 例) していた。なお、本個体におけるペースメーカーの作動状況に問題はなかった。また、心不全による死亡時期が Control 群に比べ遅延したことにより、生存率の有意な延長効果が認められた。さらに、ONO-1301 反復経口投与では、心不全時の左室収縮機能不全に対して、Control 群に比し、投与後 2 週及び 4 週で LVEF の有意な改善効果が認められた。また、有意ではないが、腹水貯留による体重増加も抑制されていた。

D. 考察

・早期治療介入による経口投与試験；

同様のイヌ高速ペーシングモデルを用いて、拡張型心筋症発症 (高速ペーシング 4 週後) 後から、6 ヶ月間 ONO-1301 を反復経口投与を行った。その結果、Cont 群に比し、心機能の有意な改善効果及び有意な生存率の延長効果を示した。このことは、ONO-1301 経口投与における早期治療介入は有用であることを示唆している。

E. 結論

ONO-1301 の反復経口投与群はイヌ高速ペーシング誘発重症拡張型心筋症長期モデルに対して、Kaplan-Meier 曲線は Control 群に比べ有意な生存率の延長を示すこと及び心不全時の左室収縮機能不全に対して有意な改善効果を示すことが明らかとなった。

ONO-1301 反復経口投与での早期治療介入は、拡張型心筋症の心機能の重症化を抑制し、生存率を延長させることにより、心不全の悪化を予防する可能性

が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 「A sustained-release drug-delivery system of synthetic prostacyclin agonist, ONO-1301SR: a new reagent to enhance cardiac tissue salvage and/or regeneration in the damaged heart」;Satsuki Fukushima, Shigeru Miyagawa, Yoshiki Sakai, Yoshiki Sawa. Heart Fail Rev DOI 10.1007/s10741-015-9477-8(2015)

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし

2. 実用新案登録 該当なし

3. その他 該当なし

研究分担者 大阪大学大学院薬学研究科附属創薬センター 今西 悠基子
大阪大学大学院医学系研究科 宮川 繁
兵庫医科大学（統計担当） 大門 貴志

課題名： ONO-1301 反復経口投与におけるラット肝中期発がん性試験（伊東法）

研究要旨

ONO-1301 は血管新生効果を有するため、癌細胞に対してプロモーション作用を有することが危惧される。ONO-1301 反復経口投与における発がんに対するプロモーション作用、及びイニシエーション作用を確認するために、ラット肝中期発がん性試験（伊東法）を実施した結果、共に陰性であった。

A. 研究目的

心臓貼付投与は、重症心不全患者に対する侵襲が大きいため、軽症・中等症拡張型心筋症患者に対しては、早期治療介入として ONO-1301（原薬）を汎用性、経済性、安全性の高い反復経口投与を行うことにより、心臓移植や人工心臓の装着を遅らせたり、回避することを目的とした生命予後改善治療法の開発は重要である。

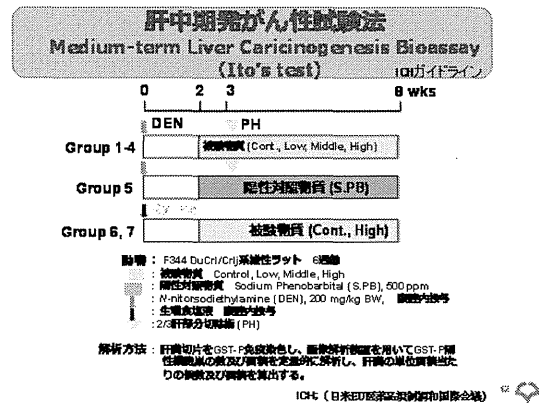
昨年度は、ONO-1301（原薬）を反復経口投与することにより、心臓移植や人工心臓の装着を遅らせたり、回避することを目的とした生命予後改善治療法の開発を目的として検討を行った。

本年度は ONO-1301 は HGF や VEGF を産生促進することにより血管新生促進作用を有するため、癌細胞に対してプロモーション作用を有することが危惧される。ONO-1301 反復経口投与における発がんに対するプロモーション作用、及びイニシエーション作用を確認するために、ラット肝中期発がん性試験（伊東法）を実施した。

定量的に解析した。

ONO-1301 の 10mg/kg 経口投与は、降圧作用を示す最大耐量であり、3 mg/kg は、ラット 6 ヶ月反復経口投与での無毒性量である。

また、陽性対照群として、Phenobarbital Sodium Salt (S.PB) の 500 ppm 混餌投与を行った。



B. 研究方法

F344/DuCrjCrj 雄性ラットに Diethylnitrosamine (DEN) を 200 mg/kg の用量で 1 回腹腔内投与し、その 2 週間後より被験物質である ONO-1301 を 0（溶媒）、3 及び 10 mg/kg/day の用量で 6 週間、1 日 1 回強制反復経口投与した（プロモーション試験）。また、DEN 無投与群では、ONO-1301 は 10mg/kg/day を反復経口投与した（イニシエーション試験）。

被験物質投与開始 1 週間には全動物に対し、2/3 肝部分切除術を実施した。実験開始 8 週後に全生存動物を屠殺剖検し、肝臓を免疫組織化学的にポリマー法にて胎盤型 Glutathione S-transferase (GST-P) 染色を実施し、画像解析装置を用いて肝臓の単位面積に対する GST-P 陽性細胞巢の発生個数及び面積を

（倫理面への配慮）

前臨床・非臨床研究においては、各種法令・告示・通知に基づき研究を実施した。加えて、臨床試験の実施に際しては、研究計画書に関して倫理委員会での承認を受け、将来的には治験を行い、最終的には薬事申請を行う。

C. 研究結果

・ ONO-1301 のラット肝中期発がん性試験

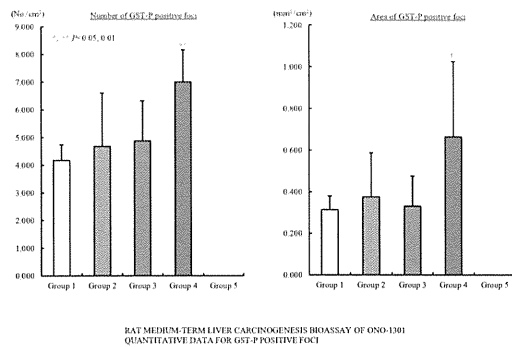
ONO-1301 は線維芽細胞等から HGF、VEGF、SDF-1、HMGB1 等を産生促進することにより、血管新生促進作用を有することが確認されている。よって、ラット肝中期発がん性試験を用いて、ONO-1301 反復経口投

与における癌に対するプロモーション作用及びイニシエーション作用の有無を検討した。

DEN 無処置の 10 mg/kg 群では、GST-P 陽性細胞巢の発生は認められなかった。

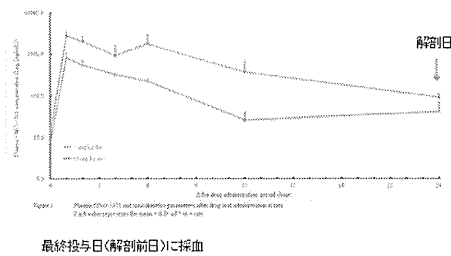
また、ONO-1301 の 10mg/kg、及び 3mg/kg 投与群においても、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積共に有意な増加は認められなかった。

陽性対照群の S. PB 群では、肝臓重量の有意な高値及び GST-P 陽性細胞巢の単位面積当たりの個数及び面積の有意な高値がみられ、本試験の妥当性が示された。



また、血中濃度測定結果から、ONO-1301 は用量相関的に経口吸収されていることが確認された。

ONO-1301経口投与における血中動態



D. 考察

ONO-1301 反復経口投与における発がんプロモーション作用及びイニシエーション作用について、ラット肝中期発がん性試験にて検討した結果、共に陰性を示した。

本試験で用いた被験物質である ONO-1301 はプロスタグランジン I₂ 受容体作動活性を持ち、さらに線維芽細胞等に作用して肝細胞増殖因子(HGF)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF-A) 及びストローマ細胞由来因子(SDF-1)などを産生することが報告されている。類似のプロスタサイクリンを主成分とする、Epoprostenol Sodium (PGI₂・Na 塩) は、本試験と同

様に肝中期発がん性試験において肝臓に対して発がん修飾作用がなく、また変異原性試験、毒性試験等においても発がん性を示唆する結果は得られていない。また、プロスタサイクリン (PGI₂) 誘導体である Beraprost sodium も同様にマウス癌原性試験、ラット癌原性試験、及び本試験と類似の中期発がん性試験においても、全て発がん性がないことが報告されている。

以上の結果から、ONO-1301 は最大耐量である 10 mg/kg 反復経口投与における本試験条件下において肝臓の前がん病変発生に対する明らかな修飾作用(プロモーション作用)は示さなかった。また、本試験で肝臓に対するイニシエーション作用は認められず、遺伝毒性試験の結果は陰性であること、また類似薬での発がん性の報告もないことから、ONO-1301 についても発がん性は示さないものと推察された。

E. 結論

ONO-1301 反復経口投与における発がんプロモーション作用及びイニシエーション作用をラット肝中期発がん性試験にて検討した結果、共に陰性を示した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 「A sustained-release drug-delivery system of synthetic prostacyclin agonist, ONO-1301SR: a new reagent to enhance cardiac tissue salvage and/or regeneration in the damaged heart」

Satsuki Fukushima · Shigeru Miyagawa · Yoshiki

Sakai · Yoshiki Sawa. Heart Fail Rev

DOI: 10.1007/s10741-015-9477-8 (2015)

2. 学会発表

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし

2. 実用新案登録 該当なし

3. その他 該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)）
分担研究報告書(平成 26 年度)

研究分担者 大阪大学医学系研究科 齋藤 充弘、宮川 繁
兵庫医科大学（統計担当） 大門 貴志

課題名：YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与における追加非臨床試験の実施

- ①ラット 13 週間皮下投与毒性試験、
- ②ミニブタ単回心臓貼付による 6 週間及び 13 週間毒性試験

研究要旨

YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与における臨床試験開始における追加非臨床（毒性）試験項目とその内容を PMDA 対面助言にて確認し、以下 2 試験を実施した。

（1）ラット 13 週間皮下投与毒性試験、及び（2）ミニブタ単回心臓貼付による 6 週間及び 13 週間毒性試験。その結果、試験（1）での無毒性量は最大投与量である 30mg/kg 以上、試験（2）での無毒性量は投与可能な最大投与量である 10mg/kg 以上であった。

A. 研究目的

- ・YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与追加非臨床試験
YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与における臨床試験開始における追加非臨床試験項目とその内容を PMDA 対面助言にて確認し、以下 2 試験を実施した。
（1）ラット 13 週間皮下投与毒性試験、
（2）ミニブタ単回心臓貼付による 6 週間及び 13 週間毒性試験。

B. 研究方法

- ・YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与追加非臨床試験
（1）ラット 13 週間皮下投与毒性試験 (GLP)
YS-1402/ONO-1301MS（マイクロスフェア製剤）のラット本試験に先立って実施した予備試験において、YS-1402/ONO-1301MS を Crl:CD (SD) 系ラットに 30 mg/kg (ONO-1301 量として) の投与量で 1 週間に 1 回あるいは 2 週間に 1 回の頻度で 4 週間間歇皮下投与したところ、重度な毒性は認められず、被験物質による皮下刺激性も認められなかった。30 mg/kg (1 回/2 週) 投与時の ONO-1301 の血漿中曝露量は、ミニブタ心臓貼付薬効薬理試験で有効性を示した 0.3 mg/kg に比べて Cmax で約 120 倍、AUC_{672h} で約 30 倍であった。本結果を踏まえて、13 週間間歇投与毒性試験（本試験）を実施した。

ONO-1301MSラット13週間間歇皮下投与毒性試験

【試験デザイン】 本試験

- 試験系：SDラット(6週齢, 雌雄各10匹/群+TK群雌雄各3匹/群)
- 群構成：ONO-1301MS 3, 10, 30 mg/kg (ONO-1301量として)
媒体対照群(0.2 w/v%ポリソルベート80含有5 w/v%マンニトール溶液)
- 投与液：ONO-1301 2, 6.67, 20 mg/mL
- 投与容量：1.5 mL/kg
- 投与期間：13週間(4週間に1回, 計3回)
- 投与方法：4週間に1回皮下投与(1回毎に部位を変えて)
- 評価項目：一般状態, 体重, 摂餌量, 眼科学的検査, 尿検査, 血液学的検査, 血液生化学的検査, 剖検, 病理組織学的検査, TK測定

YS-1402/ONO-1301MS を Crl:CD (SD) 系ラット (6 週齢、雌雄各 10 匹/群) の背部に、3、10 及び 30 mg/kg (ONO-1301 量として) の投与量で 4 週間に 1 回 (計 3 回) の頻度で 13 週間間歇皮下投与した。対照群には媒体 (0.2 w/v%ポリソルベート 80 含有 5 w/v%マンニトール溶液) を投与した。投与容量は 1.5 mL/kg とした。背部の 3 領域を投与部位として設定し、投与日毎に異なる投与部位に投与した。また、本薬による曝露量を評価するために、雌雄各 3 匹/群のサテライト群を TK 測定群として設け、血漿中 ONO-1301 濃度を測定した。

（2）ミニブタ単回心臓貼付による 6 週間及び 13 週間毒性試験。

本試験に先立って実施した予備試験において、YS-1402/ONO-1301MS を 10 mg/kg の投与量でミニ

ブタの心臓に単回貼付投与することにより、対照群共に自発運動の減少、摂餌量及び体重の減少が認められたが、重篤な毒性は認められなかった。よって、本試験における最高用量は、心臓貼付投与可能な最大投与量であり、有効投与量 (0.3mg/kg) の約 30 倍である 10 mg/kg が妥当と考えた。雌での検討については、最高用量である 10 mg/kg のみを設定した。評価時期については、最も第 I/II a 相試験の最高用量に近い 1 mg/kg を投与したときに原薬が心臓組織中から認められなくなることが想定される時期として 6 週間を設定し、長期毒性評価として 13 週間も設定した。

ONO-1301MSミニブタ単回心臓貼付投与6週間及び13週間毒性試験

【試験デザイン】 本試験

- 試験系 : ゲッチンゲン系ミニブタ(雌雄各3匹/群)
- 群構成 : ONO-1301MS 1, 3, 10 mg/kg (ONO-1301量として表記)
媒体対照群(0.2 w/v%ポリソルベート80含有5 w/v%マンニトール溶液)
- 投与液 : ONO-1301 10, 30, 100 mg/mL
- 投与容量: 0.1 mL/kg
- 投与期間: 6週間及び13週間(雌は6週間のみ)
- 投与方法: 単回心臓貼付投与
- 評価項目: 一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、血圧・心電図検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、病理組織学的検査、TK測定、心臓組織中濃度測定(別試験にて測定)

ONO-1301MSミニブタ単回心臓貼付投与6週間及び13週間毒性試験

【群構成の詳細】

群	投与量	観察時期	雄	雌
1	0 mg/kg(媒体対照)	6週	3匹	3匹
2	1 mg/kg	6週	3匹	—
3	3 mg/kg	6週	3匹	—
4	10 mg/kg	6週	3匹	3匹
5	10 mg/kg	13週	3匹	—

① 原薬(1 mg/kg)は1回投与後に心臓に染み込ませる必要のある期間(6週間) ② 染み込ませる必要のある期間(13週間)
③ 媒体対照群(0.2 w/v%ポリソルベート80含有5 w/v%マンニトール溶液) ④ 投与液(0.1 mL/kg)

【検査スケジュール】

項目	検日	性別(匹)													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
一般状態	投与後	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
体重	投与後	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
摂餌量	投与後	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
眼科学的検査	投与後	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
血液学的検査	投与後	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
血液生化学的検査	投与後	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
心電図検査	投与後	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
尿検査	投与後	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
剖検	投与後	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
病理組織学的検査	投与後	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

イソフルラン麻酔を施したGöttingen系ミニブタ(9~10カ月齢、各3匹/群)を開胸後、心嚢膜を切開して心臓を露出させ、左心室壁にゼラチンスポンジ(ゼルフォーム®、ファイザー株式会社)を貼付した。そこにYS-1402/ONO-1301MSを1, 3, 10 mg/kg(ONO-1301量として)の投与量で染み込ませるように投与した。対照群には媒体(0.2 w/v%ポリソルベート80含有5 w/v%マンニトール溶液)を投与した。投与容量は0.1 mL/kgとした。投与後、ゼラチンスポンジ及びその周辺部位に生理的組織接着剤(ベリプラスト®P コンビセット接着用、CSLベーリンガー株式会社)を噴霧し、閉胸した。6週間観察群として対照群

(雌雄)、1及び3 mg/kg群(雄)、10 mg/kg群(雌雄)を設定し、13週間観察群として10 mg/kg群(雄)を設定した。また、本薬による曝露量を評価するために、血漿中ONO-1301濃度を測定した。加えて、各動物の器官重量測定後に心筋の一部を3カ所(左心室壁の投与部位、右心室壁、中隔)から採取し、心臓組織中ONO-1301濃度も測定した。

(倫理面への配慮)

前臨床・非臨床研究においては、各種法令・告示・通知に基づき研究を実施する。加えて、臨床試験の実施に際しては、研究計画書に関して倫理委員会での承認を受け、将来的には治験を行い、最終的には薬事申請を行う。

C. 研究結果

・YS-1402/ONO-1301MS心臓貼付投与追加非臨床試験
(1) ラット13週間皮下投与毒性試験

一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査及び器官重量測定において、いずれの投与群でも被験物質投与に起因した変化は認められず、死亡例も認められなかった。

剖検では、30 mg/kgの雌雄で投与後5週間経過した投与部位(3回目投与)に被験物質と推定される白色残留物が認められた。

病理組織学的検査では、3 mg/kg以上の雌雄の投与後5週間経過した投与部位(3回目投与)に肉芽組織が認められた。また、リンパ球細胞浸潤が3 mg/kg以上の雄及び10 mg/kg以上の雌で、線維化が30 mg/kgの雌雄で認められた。これらの変化は異物(投与物)に対する除去反応と考えられ、被験物質の刺激性を示唆する所見は認められなかった。投与後9週間経過した投与部位(2回目投与)では線維化は認められず、他の変化も軽減していた。また、投与後13週間経過した投与部位(初回投与)では変化は認められなかった。その他の毒性変化は認められなかった。

ONO-1301MSラット13週間間歇皮下投与毒性試験

【試験結果】

項目	結果
死亡・処置例	観察中なし。
一般状態	試験中に30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし。
体重	試験中に30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし。
摂餌量	試験中に30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし。
眼科学的検査	試験中に30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし。
血液学的検査	試験中に30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし。
血液生化学的検査	試験中に30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし。
器官重量	試験中に30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし。
剖検	試験中に30 mg/kgで投与部位に白色残留物(被験物質と推定)。
病理組織学的検査	試験中に30 mg/kgまで、被験物質に起因する毒性変化なし。 (投与部位における異物除去反応のみ)
TK測定	3 mg/kg ^a 10 mg/kg ^a 30 mg/kg ^a 5 mg/kg ^b 10 mg/kg ^b 30 mg/kg ^b
Cmax (ng/mL)	29.7 ± 6.5 122 ± 13 314 ± 81 118.8 ± 2.9 73.2 ± 11.0 150 ± 6
AUC(0-12h) (ng·h/mL)	157.0 ± 21.0 265.6 ± 26.0 12,453.0 ± 101.0 109.0 ± 3.0 140.0 ± 10.0 64,700 ± 450.0

血漿中 ONO-1301 濃度の各群における薬物動態パラメータを表に示した。

表ラットに ONO-1301MS を 13 週間反復経口投与した時の薬物動態パラメータ

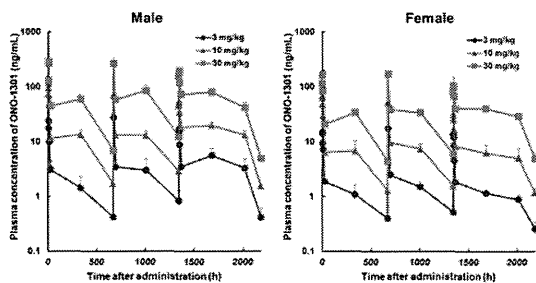
投与量 (mg/kg/回)	雄			雌		
	AUC _{2184h} (ng·h/mL)	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)	AUC _{218h} (ng·h/mL)	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)
3	6670	29.7	450	3090	18.8	675
10	28500	122	1.67	14000	73.2	1.67
30	123000	314	225	65700	196	226

データは 3 例の平均値として表した。

雌雄共に投与量の増加に伴って Cmax 及び AUC_{2184h} は増加した。初回投与後の血漿中濃度は、投与後 1~4 時間をピークに減少したが、投与後 672 時間 (28 日) でも持続的な暴露が確認された。また、2 回目及び 3 回目投与後においても同様の血漿中濃度推移を示し、明らかな性差や反復投与による蓄積性は認められなかった。

ONO-1301MSラット13週間間歇皮下投与毒性試験

【血漿中濃度推移】



(2) ミニブタ単回心臓貼付による 6 週間及び 13 週間毒性試験。

死亡及び切迫剖検例は認められなかった。一般状態観察において、対照群を含む雌雄すべての群で投与日に鎮静及び自発運動減少が認められ、自発運動減少は投与後 3 日まで認められたが、その後これらの所見は回復した。体重測定及び摂餌量測定において、対照群を含む雌雄すべての群で投与後に一過性に減少が認められたが、投与後 7 日には回復した。

眼科学的検査、尿検査、血圧・心電図検査、血液学的検査、血液生化学的検査及び器官重量測定において、いずれの投与群でも被験物質投与に起因した変化は認められなかった。剖検では、対照群を含む雌雄すべての 6 週間観察群で、心嚢と心臓壁あるいは胸壁の癒着が認められ、心臓壁と胸壁の癒着、投与検体様物質あるいは心嚢の心臓壁への付着が認められた例もあった。13 週間観察群でも 6 週間観察群と同様の癒着が認められたが、投与検体様物質あるいは心嚢の心臓壁への付着は認められなかった。

病理組織学的検査では、対照群を含む雌雄すべての 6 週間観察群で心臓の心膜にごく軽度から軽度の肉芽組織あるいは異物性肉芽腫が認められたが、これらはゼラチンスポンジや生理的組織接着剤あるいは心臓貼付投与のために切開した心嚢膜が心臓と癒着する過程で異物に対する除去反応として形成されたものと考えられた。また、被験物質の刺激性を示唆する所見は認められず、ONO-1301MS の影響は認められなかった。

血漿中 ONO-1301 濃度測定 of 各群における薬物動態パラメータを表に示した。

表ミニブタに ONO-1301MS を単回心臓貼付投与した時の薬物動態パラメータ

観察群	性別	投与量 (mg/kg)	AUC _{1008h}	AUC _{2184h}	Cmax	Tmax
			(ng·h/mL)	(ng·h/mL)	(ng/mL)	(h)
6 週間	雄	1	2580 ± 300	N.A.	9.02 ± 2.51	115 ± 92
		3	6660 ± 1330	N.A.	21.1 ± 7.0	5.33 ± 2.31
		10	27500 ± 3500	N.A.	95.8 ± 22.7	115 ± 192
6 週間	雌	10	24500 ± 11200	N.A.	89.5 ± 78.8	224 ± 97
	13 週間	雄	10	19900 ± 9600	20300 ± 9700	61.8 ± 18.5

データは 3 例の平均値±標準偏差として表した。N.A.: 適用なし

雄において投与量の増加に伴って Cmax 及び AUC_{1008h} は増加した。いずれの投与群においても、概ね投与後 336 時間 (14 日) まで持続的な暴露が認められ、その後減少し、投与後 1008 時間 (42 日) にはわずかに検出された程度であった。全身曝露量及び血漿中濃度推移に明らかな雌雄差は認められなかった。また、13 週間観察群の AUC_{1008h} 及び AUC_{2184h} は同様の値を示していたことから、ONO-1301 の放出は 6 週間までに概ね完了しているものと推察された。

心臓組織中 ONO-1301 濃度測定 of 各群の測定結果は、6 週間観察群の 1 mg/kg では、すべての例で定量限界 (0.0600 ng/g tissue) 未満であった。3 mg/kg では、1 例で定量限界未満であり、他の 2 例でも中隔及び右心室にわずかに検出された程度であった。10 mg/kg では、比較的高い濃度 (7.23~89.5 ng/g tissue) が検出された雄 1 例を除き、雌雄各 2 例で定量限界未満であり、他の雌 1 例もわずかに検出された程度であった。13 週間観察群の 10 mg/kg では、2 例で定量限界未満であり、他の 1 例も左心室にわずかに検出された程度であった。

D. 考察

・YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与追加非臨床試験

(1) ラット 13 週間間歇皮下投与毒性試験では、無毒性量は雌雄とも最大投与量である 30 mg/kg 以上であった。

また、(2) ミニブタ単回心臓貼付による 6 週間及び 13 週間毒性試験では、無毒性量は雌雄とも投与可能な最大量である 10 mg/kg 以上であり、被験物質

(ONO-1301)に伴う局所刺激性及び全身での副作用(降圧作用等)は認められなかった。

E. 結論

・YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与追加非臨床試験
(1)ラット13週間皮下投与毒性試験では、無毒性量は雌雄とも最大投与量である30 mg/kg以上であり、(2)ミニプタ単回心臓貼付による6週間及び13週間毒性試験では、無毒性量は雌雄とも投与可能な最大量である10 mg/kg以上であった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1)「A sustained-release drug-delivery system of synthetic prostacyclin agonist, ONO-1301SR: a new reagent to enhance cardiac tissue salvage and/or regeneration in the damaged heart」

Satsuki Fukushima · Shigeru Miyagawa · Yoshiki

Sakai · Yoshiki Sawa. Heart Fail Rev

DOI:10.1007/s10741-015-9477-8(2015)

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他(今後の予定)

1)「新規ナノスフェア製剤」

・出願人:大阪大学 等

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Satsuki Fukushima , Shigeru Miyagawa , Yoshiki Sakai , Yoshiki Sawa	A sustained-release drug-delivery system of synthetic prostacyclin agonist, ONO-1301SR: a new reagent to enhance cardiac tissue salvage and/or regeneration in the damaged heart	Heart Fail Rev	Feb	1-13	2015

A sustained-release drug-delivery system of synthetic prostacyclin agonist, ONO-1301SR: a new reagent to enhance cardiac tissue salvage and/or regeneration in the damaged heart

Satsuki Fukushima · Shigeru Miyagawa ·
Yoshiki Sakai · Yoshiki Sawa

© The Author(s) 2015. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Cardiac failure is a major cause of mortality and morbidity worldwide, since the standard treatment for cardiac failure in the clinical practice is chiefly to focus on removal of insults against the heart or minimisation of additional factors to exacerbate cardiac failure, but not on regeneration of the damaged cardiac tissue. A synthetic prostacyclin agonist, ONO-1301, has been developed as a long-acting drug for acute and chronic pathologies related to regional ischaemia, inflammation and/or interstitial fibrosis by pre-clinical studies. In addition, poly-lactic *co*-glycolic acid-polymerised form of ONO-1301, ONO-1301SR, was generated to achieve a further sustained release of this drug into the targeted region. This unique reagent has been shown to act on fibroblasts, vascular smooth muscle cells and endothelial cells in the tissue via the prostaglandin IP receptor to exert paracrine release of multiple protective factors, such as hepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor or stromal cell-derived factor-1, into the adjacent damaged tissue, which is salvaged and/or regenerated as a result. Our laboratory developed a new surgical approach to treat acute and chronic cardiac failure using a variety of animal models, in which ONO-1301SR is directly placed over the cardiac surface to maximise the therapeutic effects and minimise the systemic complications. This review summarises basic and pre-clinical information of ONO-1301 and ONO-1301SR as a new reagent to enhance tissue salvage and/or regeneration, with a particular focus on

the therapeutic effects on acute and chronic cardiac failure and underlying mechanisms, to explore a potential in launching the clinical study.

Keywords Prostacyclin agonist · Surgical regeneration therapy · Drug delivery system · Translational research · Preclinical studies

Abbreviations

ANP	Atrial natriuretic peptide
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BM	Bone marrow
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
GLP	Good laboratory practice
HGF	Hepatocyte growth factor
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
LV	Left ventricle
MI	Myocardial infarction
NHDF	Normal human dermal fibroblast
PAH	Pulmonary arterial hypertension
PLGA	Poly-lactic <i>co</i> -glycolic acid
SDF	Stromal cell-derived factor
TGF	Transforming growth factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Introduction

Cardiac failure is the major cause of mortality and morbidity worldwide [1]. Since cardiac tissue has a limited regenerative capacity, any insults against the heart cause an irreversible myocardial damage dependent upon nature and magnitude of the insult, consequently inducing acute and/or chronic cardiac failure. Current standard to treat cardiac

S. Fukushima · S. Miyagawa · Y. Sakai · Y. Sawa (✉)
Department of Cardiovascular Surgery, Osaka University
Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita,
Osaka 565-0871, Japan
e-mail: sawa-p@surg1.med.osaka-u.ac.jp

S. Fukushima
e-mail: fukushima.satsuki@hotmail.co.jp

failure is therefore to focus on removal of the insult itself, such as reperfusion of the ischaemic tissue or structural/physiological correction by catheter and/or surgical interventions [2], or minimisation of the additional factors to exacerbate the myocardial damage, such as inhibition of renin–angiotensin–aldosterone system [3, 4] or sympathetic nerve activities [5, 6]. Nonetheless, treatment of cardiac failure is not fully established [7], indicating that it may be therapeutically effective to target on different mechanisms underlying development of cardiac failure, such as enhancement of cardiac tissue salvage and/or regeneration [5].

It has been shown that cardiac-targeted gene transduction of pro-angiogenic/anti-inflammatory factors, such as hepatocyte growth factor (HGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) or stromal cell-derived factor (SDF)-1, enhances up-regulation of these factors in the myocardium to contribute to tissue salvage and/or regeneration, consequently inducing functional recovery in an array of the animal models of cardiac failure [8]. Moreover, transplantation of somatic tissue-derived stem/progenitor cells into the heart, such as bone marrow or skeletal muscle-derived cells, persistently induces up-regulation of the pro-angiogenic/anti-inflammatory factors in the myocardium, contributing to functional recovery [9, 10]. It was thus warranted that any treatments targeting intramyocardial up-regulation of pro-angiogenic/anti-inflammatory factors would be promising to enhance myocardial salvage and/or regeneration. In clinical studies, feasibility, safety and therapeutic efficacy of the somatic tissue-derived cell transplantation therapy was established for cardiac failure; however, this treatment has failed to gain a status as the standard in the clinical practice to date for a variety of potential reasons [9, 11]. Firstly, reported magnitude of therapeutic effects is modest, potentially related to limited retention/survival of the transplanted cells and/or limited regeneration capacity of the targeted cardiac tissue [10, 12]. Secondly, additional processes to prepare the cells are required in the routine clinical practice, which would not outweigh the therapeutic benefits expected by the cell transplantation therapy. It is therefore theorised that “the shelf-stored drug” which has similar therapeutic effects to the cell transplantation therapy would be more widely used, potentially accepted as the standard, regeneration-based therapy for cardiac disease in the clinical practice [13].

Prostaglandins and their derivatives are endogenous autacoids produced by cyclooxygenase-related arachidonic acid cascade, contributing to vasodilatation [14], inhibition of platelet aggregation or anti-inflammation [15] in response against local tissue damage. Of a variety of synthetic agonists or antagonists of this cascade that were developed as a drug, ONO-1301 (7,8-dihydro-5-[(*E*)-[[a-(3-pyridyl)-benzylidene]aminooxy]ethyl]-1-naphthylloxy]acetic acid) was

synthesised as a small molecular weight compound having prostacyclin IP receptor agonistic and thromboxane A2 synthase inhibitory activities (Fig. 1) [16–19]. ONO-1301 was initially developed as an anti-platelet drug; however, a number of the basic studies including those from our laboratory documented that a very small dose of ONO-1301 activates endothelial cells, vascular smooth muscle cells and fibroblasts to release multiple pro-angiogenic/anti-inflammatory factors from their cytoplasm [16, 20–23]. In addition, ONO-1301 has several theoretical advantages as a drug over other synthetic prostaglandin agonists, such as beraprost, epoprostenol, iloprost or treprostinil, since ONO-1301 has been shown to exert long-lasting prostacyclin activities [16, 24, 25]. Moreover, poly-lactic *co*-glycolic acid (PLGA)-polymerised form of ONO-1301, ONO-1301SR, was developed to achieve a sustained-release ONO-1301-delivery-system [16, 25]. This review summarises information and knowledge regarding to ONO-1301 and ONO-1301SR as a tissue regeneration-based drug for cardiac disease and proposes prospect of ONO-1301 for new drug in chronic pathologies.

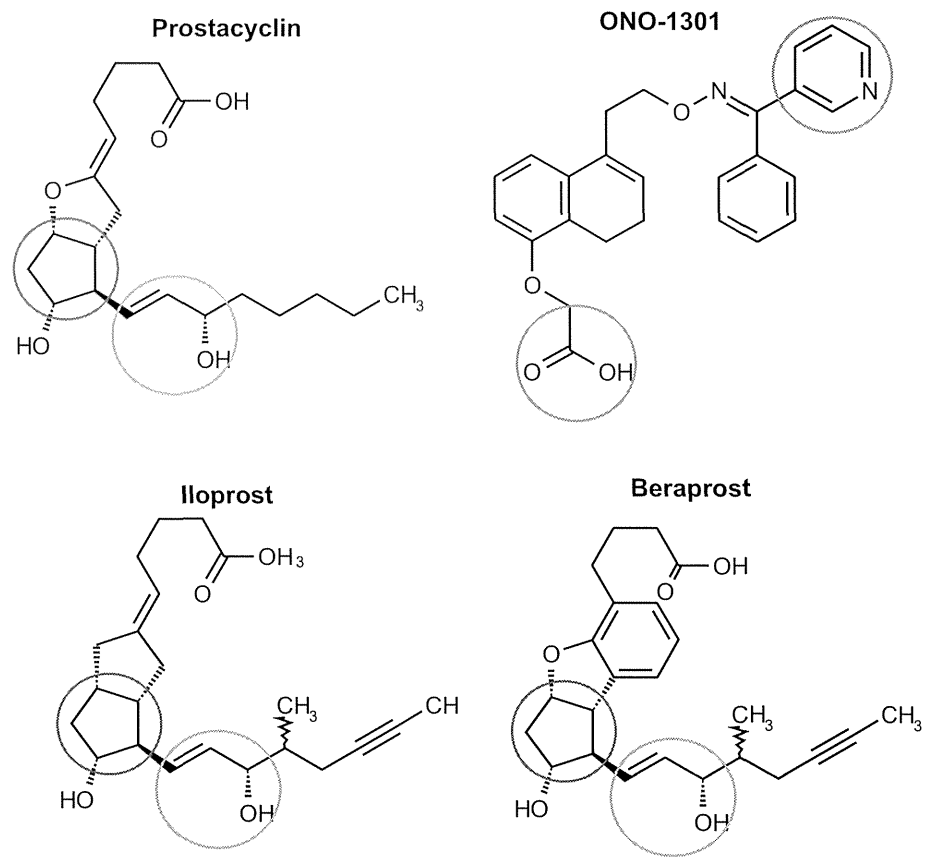
Pharmacological activity of ONO-1301 and development of ONO-1301SR

ONO-1301 is prostacyclin IP receptor agonist with a thromboxane A2 synthase inhibitory activity. ONO-1301SR is a PLGA-polymerised ONO-1301 to achieve a sustained-release system [25]. These products have been shown to have therapeutic effects on a variety of cardiac pathologies via cytokines-induced salvage and/or regeneration of damaged cardiac tissue. This section documents characteristics and pharmacological activity of ONO-1301 and ONO-1301SR *in vitro*. In addition, other prostaglandin agonists under development are discussed in comparison with ONO-1301.

Characteristics of ONO-1301

ONO-1301 is a synthetic prostacyclin IP receptor agonist lacking the typical prostanoid structures, including a five-membered ring and allylic alcohol, which are rapidly metabolised by 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase *in vivo* (Fig. 1) [16]. It is thus indicated that ONO-1301 is a chemically stable structured prostacyclin agonist. In addition, ONO-1301 has a 3-pyridine radical to exert a thromboxane A2 synthase inhibitory activity, which induces an intrinsic prostaglandin I2 synthesis-promoting effect to augment the IP receptor agonistic activity [16]. Therefore, this unique structure of ONO-1301 has been shown to produce a long-lasting prostacyclin activity with little drug resistance compared to other prostacyclin agonists used in the

Fig. 1 Prostacyclin has the prostanoid structure including a five-membered ring (indicated as *blue circle*) and an allylic alcohol (indicated as *orange circle*), which are rapidly metabolised *in vivo*. In contrast, a synthetic selective agonist of prostacyclin, ONO-1301, lacks the prostanoid structure, while this reagent has the structure having a thromboxane A₂ inhibitory activity (indicated as *purple circle*). Other selective prostacyclin agonists, such as iloprost or beraprost, have the prostanoid structure (indicated as *blue and orange circles*) without thromboxane A₂ inhibitory activity



clinical settings [24], proposing the advantage of this new drug for acute and chronic pathologies that are related to ischaemia, inflammation and/or fibrosis. In addition, it was reported that ONO-1301 is inactivated by oxidation in the liver within 3–4 h [24], indicating a wide utility of this product as a drug in the clinical settings.

Pharmacological activity of ONO-1301

It has been shown that ONO-1301 agonises the IP receptor expressed in a variety of the cells, such as fibroblast, vascular smooth muscle cell or endothelial cell, to up-regulate expression of multiple factors, such as VEGF, HGF or SDF-1, *in vitro* [16]. The effects of ONO-1301 as a cytokine inducer were shown to be mediated at least in part by elevation of intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) [16, 26]. In addition, extracellularly released factors by ONO-1301 have been shown to enhance a tube-like formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) co-cultured with normal human dermal fibroblasts (NHDF) *in vitro* [27], indicating a pro-angiogenic property of ONO-1301. In addition, it was reported that NHDF stimulated by ONO-1301 enhanced migration of bone marrow (BM)-derived cells mediated by extracellularly released SDF-1, *in vitro* [20], suggesting that ONO-

1301 may have an effect to enhance migration of circulating BM cells into the targeted territory contributing to BM cell-mediated tissue salvage and/or regeneration.

Development of ONO-1301SR to establish a sustained-release drug-delivery system

While ONO-1301 has been shown to have a long-lasting prostacyclin agonistic effect compared to the other prostacyclin agonists, it would be further useful and beneficial to develop a sustained-release drug-delivery system of ONO-1301 to achieve a further prolonged prostacyclin agonistic effects on the targeted territory of acute and chronic pathologies. For this purpose, ONO-1301 was polymerised with PLGA microspheres that are proven to be biocompatible and biodegradable, used as controlled delivery system for proteins or drugs in clinical settings [16, 25]. As a result, this ONO-1301SR product was shown to be hydrolysed at the site of administration to linearly release ONO-1301 into the adjacent tissue with a modest initial burst (Fig. 2). In addition, duration of ONO-1301 release can be adjusted by modifying the molecular weight of PLGA, the lactic/glycolic acids ratio or the particle size to achieve optimum effects, depending upon the targeted pathology or drug delivery mode [25].