

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)）
総括研究報告書（平成 26 年度）

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）ミニプタ陳旧性心筋梗塞（ICM）モデルを用いて、同様の投与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、ラット 13 週間皮下投与毒性試験、及び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 1 / a 相）」を実施する。また、治験 1）の P- 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- 1 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

福島五月

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、待機的治療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) ミニプ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) イヌ高速ペースングモデル長期試験として、高速ペースング 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) ミニプ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 のミニプ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/DuCrIj 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 I_2 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 ($PGI_2 \cdot Na$ 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) ミニプタ陳旧性(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プ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-)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- / a)」を開始する。また、治験 1) の P- 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- a)」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 1 / a相）」を実施する。即ち、6週間の血中動態と安全性評価（P- 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- a）を行う。

また、治験 1)の ICM 患者 P- 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- a）」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