

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 1 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 1 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。

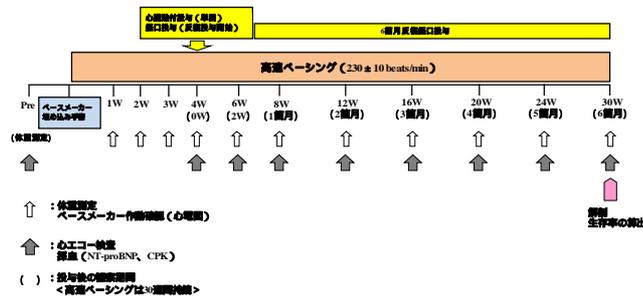
4) 心エコーの測定

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 )

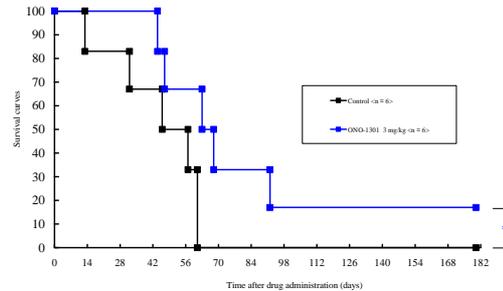


Fig. 1-2 Effects of ONO-1301 on survival curves in dogs with pacing-induced heart failure. Control: non-administration. ONO-1301: oral administration (twice a day for 26 weeks). A significant difference (\*: P<0.05) between control and ONO-1301 3 mg/kg (Log rank test).

### 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 )

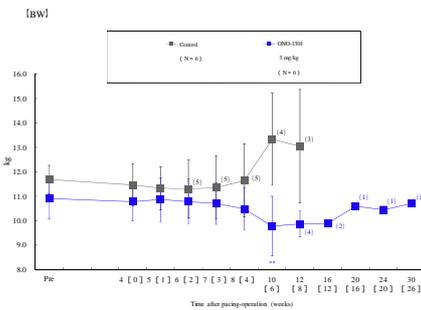


Fig. 2-2 Effects of ONO-1301 on body weight (BW) in dogs with pacing-induced heart failure (30 weeks after the pacing). Pre: before pacing-operation. 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30: time after drug administration (weeks). Control: non-administration. ONO-1301: oral administration (twice a day for 26 weeks). Each circle represents the mean ± SD. Each figure at parenthesis represents the number of animals. \*\* significant difference from control (P<0.01) (Dunnett's 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 ( ) に有意な上昇 ( いずれも P<0.05 vs. Control 群 ) が認められた。

## EF (Δ▲: Control vs. ONO-1301)

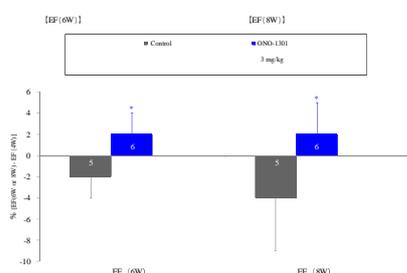


Fig. 3-5 Effects of ONO-1301 on ejection fraction (EF) in dogs with pacing-induced heart failure (30 weeks after the pacing). Control: once administration. ONO-1301: once administration (twice a day for 20 weeks). Each column represents the mean  $\pm$  S.D. \* indicates significant difference from control (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  $\times$  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スティングモデルを用いて、拡張型心筋症発症(高速ペースティング 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スティ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