

3) Synthetic prostacyclin agonist, ONO1301, enhances endogenous myocardial repair in a hamster model of dilated cardiomyopathy: a promising regenerative therapy for the failing heart. Ishimaru K, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Sakai Y, Ueno T, Sawa Y. J Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Dec;146(6):1516-25.

4) 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. Shirasaka T, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Shiozaki M, Kawaguchi N, Matsuura N, Nakatani S, Sakai Y, Daimon T, Okita Y, Sawa Y. J Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Aug;146(2):413-21.

5) Sustained-release delivery of prostacyclin analogue enhances bone marrow-cell recruitment and yields functional benefits for acute myocardial infarction in mice. Imanishi Y, Miyagawa S, Fukushima S, Ishimaru K, Sougawa N, Saito A, Sakai Y, Sawa Y. PLoS One. 2013 Jul 19;8(7):1-8

2. 学会発表

1) 「長時間作用型 Prostacyclin agonist の心臓局所投与法の開発・効果に関する実験的検討」

溝口裕規、宮川 繁、福嶋 五月、齋藤 充弘、酒井 芳紀、今西悠基子、原田希摩、西宏之、吉川泰司、上野 高義、戸田 宏一、澤 芳樹

第44回日本心臓血管外科学会 熊本 (201402)

2) A Novel Therapeutic Technology of Long-Acting Prostacyclin Agonist for Mature Porcine Ischemic Heart Model

Hiroki Mizoguchi ; Shigeru Miyagawa ; Satsuki Fukushima ; Atsuhiko Saito ; Yoshiki Sakai ; Yukiko Imanishi ; Akima Harada ; Takayoshi Ueno ; Koich Toda ; Toru Kuratani ; Yoshiki Sawa.

AHA2013, Dallas.

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 25 年～26 年）

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：自然発症拡張型心筋症 J2N-k ハムスターモデルにおける反復経口投与および
YS-1402/ONO-1301MS 間歇皮下投与での薬効薬理試験（最小有効投与量の検索）、
及び、ONO-1301 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

自然発症拡張型心筋症ハムスター（J2N-k）モデルに、20 週齢（病態発症後）から 28 週齢まで、8 週間被験物質を経口投与して、心機能悪化抑制および改善効果を検討した。

反復経口投与群として、正常（J2N-n）群，病態 Control（J2N-k）群，ONO-1301-3.0mg/kg 群，同-1.0mg/kg 群，同-0.3mg/kg 群，同-0.1mg/kg 群を設定した。また、YS-1402/ONO-1301MS の間歇皮下投与群（ONO-1301 として 10.0mg/kg～0.3mg/kg/4 週）を設定した。その結果、心エコーによる左室機能測定では、心不全の指標とされる LVEF（左室駆出率）値において、ONO-1301 経口投与群では、投与 2 週目から有意に悪化を抑制し、3.0mg/kg 投与群では改善効果が認められた。このことから ONO-1301 経口投与には、早期治療介入により拡張型心筋症から心不全への悪化を抑制する作用があり、最低有効用量は 0.3mg/kg と 1.0mg/kg の間であることが示唆された。一方、間歇皮下投与である ONO-1301MS では、いずれも効果を見出すことはできなかった。

今回の自然発症拡張型心筋症（J2N-k）ハムスターモデルへの反復経口投与試験の結果は、すでに実施された血小板凝集抑制作用の 1/10 以下の投与量で有効性を示しているため、開発の可能性が示唆された。最小有効投与量である 0.3 及び 1mg/kg 経口投与後の Cmax 濃度はいずれも 8.1 及び 30.1ng/mL 以下を示した。ONO-1301 経口投与第 I 相試験における血中濃度結果（軽度な副作用（下痢等）発現 Cmax 血中濃度；108.4ng/mL）から、本最小有効投与量は安全量であることが示唆された。

また、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

・ONO-1301 反復経口投与における J2N-k ハムスター心機能への影響（最小有効投与量の設定）

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、より早期から 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早期治療介入による生命予後改善治療法の開発は重要である。

今回、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。

即ち、自然発症拡張型心筋症（J2N-k）ハムスターモデルを用いて、20 週齢（病態発症）から 28 週齢まで 1 日 2 回 ONO-1301 を 0.1mg/kg～3 mg/kg にて 8 週間反復経口投与し、心機能（LVEF 等）改善における最小有効投与量を設定することを目的として検討した。また、ONO-1301MS（徐放性マイクロスフェア製剤）の間歇皮下投与についても併せ検討した。

一方、ONO-1301 の治療効果は HGF や VEGF 等の産生誘導による血管新生作用であることが、抗 HGF 中和

抗体の実験から示唆されている。よって、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の有無について、ラット肝中期発がん性試験（伊東法）にて検討する。

B. 研究方法

1. 試験材料及び方法

1.1 被験物質および媒体

1) 被験物質 1 (ONO-1301) (小野薬品より入手)

- ・ロット番号：H5001
- ・性状：白色～微黄色の結晶性の粉末

2) 被験物質 2 (YS-1402/ONO-1301MS) (小野薬品より入手)

- ・ロット番号：Lot No. 121009-1(被験物質 1 の含有量；18% (重量比)，平均粒子径；38.7 μm)
- ・性状：白色の凍結乾燥微粒子 (平均粒子径；38.7 μm)

3) 媒体

- ・被験物質 1 (ONO-1301)：0.5 w/v %カルボシキルメチルセルロースナトリウム溶液 (以下，CMC-Na)

原末名：カルボシキルメチルセルロースナトリウム (以下，CMC-Na)

- ・被験物質 2 (YS-1402/ONO-1301MS)：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

原末名：ポリソルベート 80 マンニトール

- ・ロット番号：

CMC-Na : PEE2852
 ポリソルベート 80 : 205359C
 マンニトール : M759903

- ・供給源：

CMC-Na：和光純薬工業株式会社
 ポリソルベート 80：日油株式会社
 マンニトール：Merck Millipore (Merck KGaA)

注射用水：株式会社大塚製薬工場

1.2 投与液の調整方法

1) 被験物質 1 (ONO-1301)：

ONO-1301 は必要量を採取し、メノウ乳鉢にて 0.5 w/v% CMC-Na を少量ずつ加えて懸濁・粉碎し、メスシリンダーを用いてメスアップし、0.6mg/mL 懸濁液を調製した。攪拌しながらその一部を分取して 0.2, 0.06 および 0.02mg/mL 懸濁液を調製した。調製後の混合液は、調製後遮光下冷蔵保存にて 48 時間使用可能とした。

2) 被験物質 2 (YS-1402/ONO-1301MS)：

本 Lot は、ONO-1301 の含有量が 18% である。

YS-1402/ONO-1301MS は ONO-1301 を含量換算して必要量を秤取し、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用いて、ボルテックス処理により十分に懸濁させ ONO-1301 として 2.0mg/mL 溶液を調製した。用事調製した。

1.3 動物種

1) 系統；雄性ハムスター

(1) 自然発症拡張型心筋症 J2N-k ハムスター

(2) 正常 J2N-n ハムスター

2) 供給源；日本エスエルシー株式会社

3) 週齢及び体重範囲

(1) 入荷時：18 週齢

(2) 入荷時体重範囲：88.0～124.5 g

(3) 検疫馴化期間：

検疫：7 日、馴化：7 日以上

2. 実験方法

2.1 群構成

試験群	投与	動物数 (匹)
1 正常 (J2N-n)	被験物質 1 の媒体 (p.o.)	8
2 病態 Control (J2N-k)	被験物質 1 の媒体 (p.o.)	7
3 被験物質 1-3.0mg/kg	被験物質 1-0.6mg/mL×2 回/日 (p.o.)	6
4 被験物質 1-1.0mg/kg	被験物質 1-0.2mg/mL×2 回/日 (p.o.)	7
5 被験物質 1-0.3mg/kg	被験物質 1-0.06mg/mL×2 回/日 (p.o.)	7
6 被験物質 1-0.1mg/kg	被験物質 1-0.02mg/mL×2 回/日 (p.o.)	7
7 被験物質 2-10.0mg/kg	被験物質 2-2.0mg/mL×1 回/4 週 (s.c.)	6
8 被験物質 2-3.0mg/kg	被験物質 2-0.6mg/mL×1 回/4 週 (s.c.)	6
9 被験物質 2-1.0mg/kg	被験物質 2-0.2mg/mL×1 回/4 週 (s.c.)	6
10 被験物質 2-0.3mg/kg	被験物質 2-0.06mg/mL×1 回/4 週 (s.c.)	6

1) 群分け

入荷時に状態が悪い動物は認められなかったため、入荷ごとの動物を、検疫・馴化終了後に測定した心エコーデータ (LVEF) および最新体重値を基準として、できるだけ均等になるように群分けを行った。その際に、LVEF が 55 以上の 2 例は試験から除外した。1 群 6 匹を各群に振り分け余剰動物は経口投与群に振り分けた。また 1 群 (正常：J2N-n) においては、異常動物はみられず、8 匹全例を使用した。

2) 投与経路

被験物質 1 (ONO-1301)：経口投与

被験物質 2 (YS-1402/ONO-1301MS)：皮下投与

3) 投与回数、投与期間および選択理由

被験物質 1 (ONO-1301)：1 日 2 回、56 日間反復経口投与した。1 日の投与間隔は 8～12 時間とした。剖検日 (57 日) についても 1 回のみ投与を実施した。被験物質 2 (YS-1402/ONO-1301MS)：4 週間に 1 回 (合計 2 回) 皮下投与した。

2.2 心エコー検査

1) 測定時期

投与前 (群分け値)、投与 2, 4, 6 および 8 週後に

実施した。

2) 左室機能の測定

超音波画像診断装置を用いて心エコーを測定した。麻酔下、胸部にリニアプローブ(12MHz)を当てM-modeで左室拡張末期径(LVIDd),左室収縮末期径(LVIDs),拡張末期左室前壁厚(LVAw=IVSTd),拡張末期左室後壁厚(LVPwd),収縮末期左室後壁厚(LVPWs)を測定し,左室拡張末期容積(LVEDV),左室収縮末期容積(LVESV),左室内径短縮率[LVFS=(LVIDd-LVIDs)/LVIDd]および左室駆出率[LVEF=(LVIDd3-LVIDs3)/LVIDd3]を算出した。

2.3 採血、剖検、臓器採取

1) 採血

群分け時(被験物質投与前;20週齢),投与4週間後および8週間後(28週齢)の心エコー終了後にEDTA-2Na処理したシリンジを用いて0.5mL採血(解剖時は全採血)し,血漿を0.2mL以上採取した。得られた血漿は,分注し,測定まで超低温フリーザー(-80°C)で冷凍保存した。

また,血中濃度用として,以下を採血した。

(1) 経口投与群

初回投与1時間後,投与4週後の1回目投与1時間後,最終投与前並びに剖検時(最終投与1時間)にEDTA-2Na処理したシリンジを用いて採血し,血漿を採取した。得られた血漿は,分注し測定まで超低温フリーザー(-80°C)で冷凍保存した。

(2) 皮下投与群

初回投与1時間後,投与4週後の投与1時間後;並びに解剖時にEDTA-2Na処理したシリンジを用いて採血し,血漿を採取した。得られた血漿は,分注し測定まで超低温フリーザー(-80°C)で冷凍保存した。

2) 剖検および臓器採取

(1) 8週間の投与終了後の動物は,体重測定後剖検した。心臓,肺,肝臓,大動脈および腎臓を採取し重量を測定した。

(2) 臓器の処理

・心臓

写真撮影後,横軸方向に,心尖部から約1/3のところまで切断した。切断面より上側は病理検査用として10%中性緩衝ホルマリンに浸漬保存した。心尖側は,縦に3分割し,1片はRT-PCR測定用として保存した。即ち,RNAlater(2mL)に浸漬させ冷蔵で一晩静置して,翌日,RNAlaterを除去した後,直ちに液体窒素で凍結させ超低温フリーザー(-80°C)に保存した。さらに1片は蛋白質測定用にハサミで細切した後,液体窒素で凍結させ同様に凍結保存した。残りの1片は,ONO-1301含有量測定用として,直ちに液体窒素で凍結させ同様に凍結保存した。

・肺,肝臓,大動脈,腎臓

肺の一葉,肝臓の一葉,大動脈および右腎臓を10%

中性緩衝ホルマリンに浸漬固定した。

3. 統計学的処理

1) 処理項目

血圧および心拍数,心エコー(LVEF,LVFS,LVEDV,LVESV,LVIDdおよびLVIDs),体重,臓器重量,生存率。

2) 処理方法

各試験群の代表値は,平均値±標準誤差(mean±S.E.)で表示した。正常群と病態Control群の比較には,F検定を行い,等分散の場合はStudentのt検定を,不等分散であった場合はAspin-Welchのt検定を行った。病態Control群と各投与群の比較には,分散性の検定で等分散であった場合は,Dunnettの多重比較検定を行い,不等分散であった場合は,Steelの多重比較検定を行った。検定は両側検定とし,有意水準は5%とした。

解剖時のLVEF比較にて,2群(病態Control)と経口投与群で検定を行い,各投与群における最小有効投与量を検索した。

動物番号	103	202	301	903
死亡時期	投与42日	投与53日	投与43日	投与56日

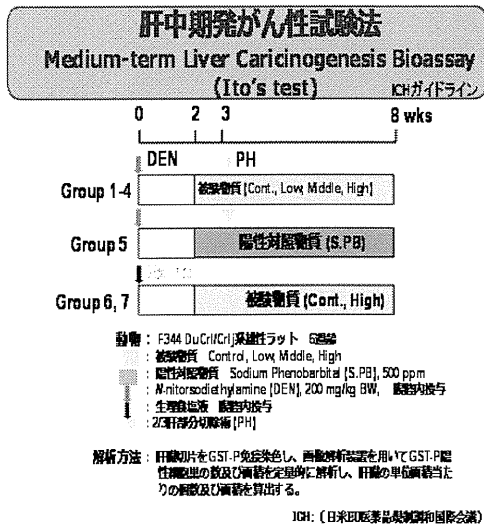
3) 統計解析ソフト

SAS9.1.3(EXSUS Version 7.7.1),SAS Institute Japan株式会社(株式会社シーエーシー)を用いて行った。

・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,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/DuCr1Crlj雄性ラットにDiethylnitrosamine(DEN)を200mg/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10mg/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。



(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. 一般状態

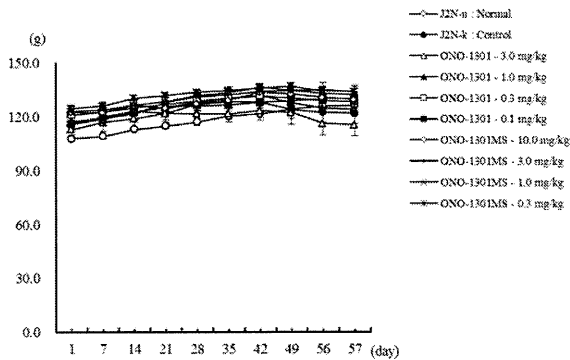
試験期間中に下表の動物が突然死した。前日までの一般状態に異常はみられなかった。

投与開始日を1日として起算

各群に1匹のみ死亡しており、用量相関性もないため、被験物質の影響ではないと判断した。

2. 体重

体重の推移をエラー！参照元が見つかりません。に示した。各群間に有意な差はみられなかった。



3. 心機能検査 (心エコー)

1) LVEF (左室駆出率)

投与開始前、投与2, 4, 6 および8週のLVEF値は、正常 (J2N-n) 群では 88.2 ± 2.2 , 83.9 ± 1.8 , 84.4 ± 1.6 , 88.4 ± 0.9 および 85.1 ± 1.0 %, 病態 Control (J2N-k) 群では 42.3 ± 2.0 , 32.5 ± 1.3 , 28.7 ± 1.6 , 25.3 ± 1.6 および 26.3 ± 2.7 %, ONO-1301-3.0mg/kg 群では 40.9 ± 2.3 , 48.5 ± 2.3 , 46.4 ± 2.0 , 45.6 ± 1.6 および 45.7 ± 2.9 %, ONO-1301-1.0mg/kg 群では 42.8 ± 2.3 , 45.5 ± 4.1 , 44.6 ± 1.7 , 42.2 ± 2.9 および 42.0 ± 2.6 %, ONO-1301-0.3mg/kg 群では 43.1 ± 2.2 , 39.2 ± 2.4 , 38.3 ± 2.2 , 35.6 ± 2.3 および 32.3 ± 1.0 %, ONO-1301-0.1mg/kg 群では 42.8 ± 2.2 , 36.1 ± 2.7 , 34.8 ± 1.9 , 32.0 ± 2.2 および 30.3 ± 2.5 %, であり、病態 Control (J2N-k) 群の値は正常 (J2N-n) 群と比較して有意な低値を示し、投与期間を通じて悪化していった。ONO-1301-3.0mg/kg 群の2, 4, 6 および8週, 1.0mg/kg 群の2, 4, 6 および8週ならびに0.3mg/kg 群の4 および6週の値は病態 Control (J2N-k) 群と比較して有意な高値を示した (Fig2, 3)。

また、6週後 (Fig4) および8週後 (Fig5) での経口投与と群間でのLVEF比較を図示した。一方、ONO-1301MSは各群で変化は示さなかった。

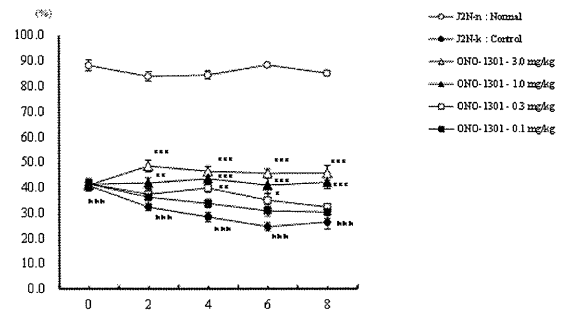


Fig2: 経口投与におけるLVEFの経時変化 (正常群を含む各群比較)

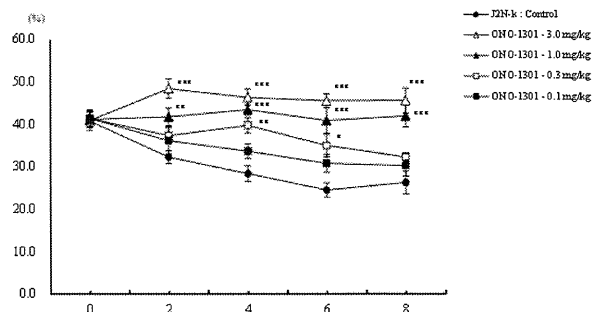


Fig 3 : 経口投与における LVEF の経時変化 (被験物質 1 投与群と対照群比較)

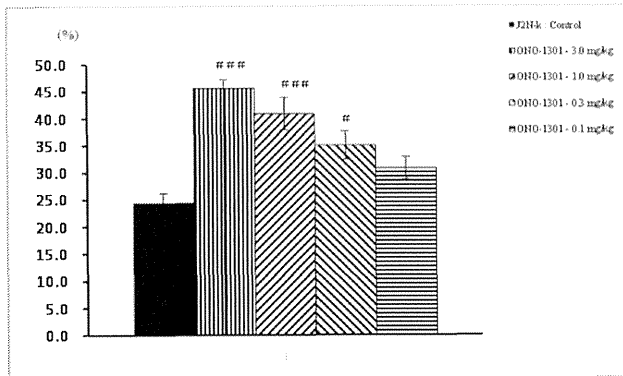


Fig 4 : 投与 6 週後における経口投与群間での LVEF 比較

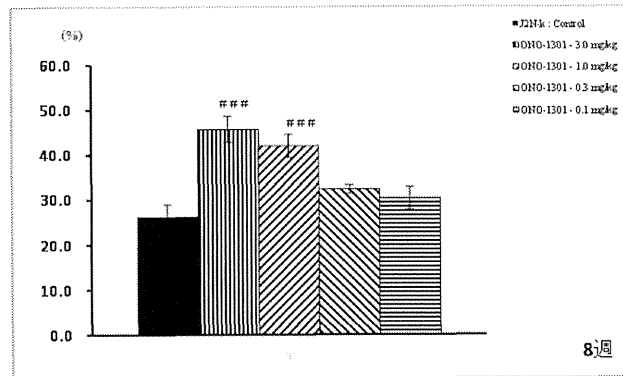


Fig 5 : 投与 8 週後における経口投与群間での LVEF 比較

2) FS (左室内径短縮率)

投与開始前, 投与 2, 4, 6 および 8 週の LVFS 値は, 正常 (J2N-n) 群では 52.2 ± 2.6 , 46.0 ± 2.0 , 47.0 ± 2.0 , 51.9 ± 1.2 および 47.2 ± 1.3 %, 病態 Control (J2N-k) 群では 16.8 ± 1.0 , 12.3 ± 0.6 , 10.7 ± 0.7 , 9.3 ± 0.6 および 9.8 ± 1.1 %, ONO-1301-3.0mg/kg 群では 16.2 ± 1.1 , 19.9 ± 1.2 , 18.8 ± 1.0 , 18.4 ± 0.8 および 18.6 ± 1.5 %, ONO-1301-1.0mg/kg 群では 17.0 ± 1.1 , 18.7 ± 2.3 , 17.9 ± 0.8 , 16.9 ± 1.4 および 16.7 ± 1.2 %, ONO-1301-0.3mg/kg 群では 17.2 ± 1.1 , 15.3 ± 1.1 , 15.0 ± 1.0 , 13.7 ± 1.0 および 12.2 ± 0.4 %, ONO-1301-0.1mg/kg 群では 17.1 ± 1.1 , 14.0 ± 1.2 , 13.3 ± 0.8 , 12.1 ± 0.9 および 11.4 ± 1.1 %, であり, 病態 Control (J2N-k) 群の値は正常 (J2N-n) 群と比較して有意な低値を示し, 投与期間を通じて悪化していった. ONO-1301-3.0mg/kg 群の 2, 4, 6 および 8 週, 1.0mg/kg 群の 2, 4, 6 および 8 週ならびに 0.3mg/kg 群の 4 および 6 週の値は病態 Control (J2N-k) 群と比較して

有意な高値を示した (Fig 6, 7). 一方, ONO-1301MS は各群で変化は示さなかった.

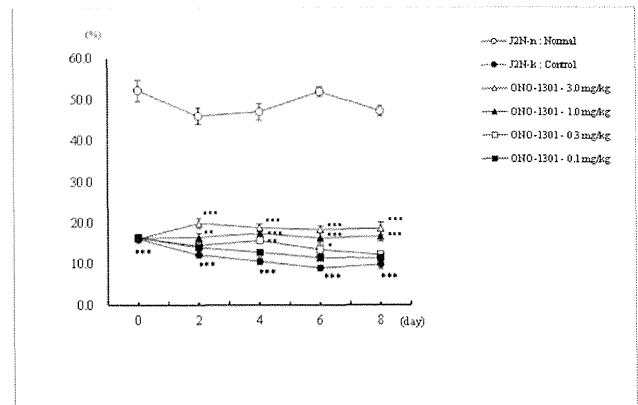


Fig 6 : 経口投与における LVFS の経時変化 (正常群を含む各群比較)

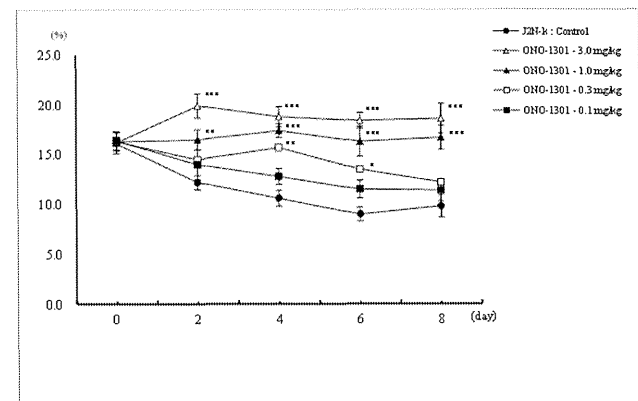


Fig 7 : 経口投与における LVFS の経時変化 (被験物質 1 投与群と対照群比較)

3) LVEDV (左室拡張末期容積)

投与開始前, 投与 2, 4, 6 および 8 週の LVEDV 値は, 正常 (J2N-n) 群では 39.1 ± 3.5 , 77.1 ± 5.9 , 61.8 ± 6.5 , 69.1 ± 4.2 および 81.4 ± 3.5 μ L, 病態 Control (J2N-k) では 221.0 ± 21.1 , 231.0 ± 21.2 , 281.9 ± 29.2 , 316.5 ± 29.7 および 317.3 ± 21.0 μ L, ONO-1301-3.0mg/kg 群では 227.5 ± 32.2 , 139.0 ± 19.9 , 182.8 ± 17.8 , 183.0 ± 23.4 および 233.4 ± 37.1 μ L, ONO-1301-1.0mg/kg 群では 162.9 ± 15.2 , 166.7 ± 21.7 , 154.9 ± 22.0 , 235.7 ± 26.6 および 223.5 ± 43.9 μ L, ONO-1301-0.3mg/kg 群では 205.4 ± 27.0 , 179.4 ± 22.3 , 199.1 ± 14.1 , 242.1 ± 24.6 および 285.4 ± 21.6 μ L, ONO-1301-0.1mg/kg 群では 175.6 ± 18.4 , 191.9 ± 23.3 , 199.0 ± 20.3 , 277.4 ± 22.5 および 301.0 ± 30.3 μ L であり, 病態 Control (J2N-k) 群の値は正常 (J2N-n) 群と比較して有意な高値を示し, 投与期間を通じて拡張していった. ONO-1301-3.0mg/kg

群の 6 週および 1.0mg/kg 群の 4 週の値は病態 Control (J2N-k) 群と比較して有意な低値を示した。

4) LVESV (左室収縮末期容積)

投与開始前, 投与 2, 4, 6 および 8 週の LVESV 値は, 正常 (J2N-n) 群では $5.1 \pm 1.6, 12.6 \pm 1.8, 10.3 \pm 2.3, 8.0 \pm 0.8$ および $12.0 \pm 0.8 \mu\text{L}$, 病態 Control (J2N-k) 群では $128.0 \pm 12.8, 157.0 \pm 16.4, 201.3 \pm 22.9, 237.3 \pm 24.7$ および $236.0 \pm 22.6 \mu\text{L}$, ONO-1301-3.0mg/kg 群では $136.8 \pm 23.8, 73.5 \pm 13.1, 98.5 \pm 11.6, 100.5 \pm 14.5$ および $129.0 \pm 24.8 \mu\text{L}$, ONO-1301-1.0mg/kg 群では $93.0 \pm 9.4, 95.0 \pm 17.5, 86.6 \pm 13.0, 136.6 \pm 16.7$ および $132.0 \pm 27.2 \mu\text{L}$, ONO-1301-0.3mg/kg 群では $119.4 \pm 18.5, 109.9 \pm 15.0, 123.9 \pm 12.1, 158.4 \pm 20.0$ および $193.6 \pm 16.2 \mu\text{L}$, ONO-1301-0.1mg/kg 群では $102.4 \pm 13.6, 124.7 \pm 17.9, 130.3 \pm 15.4, 190.6 \pm 19.1$ および $211.3 \pm 22.7\%$ であり, 病態 Control (J2N-k) 群の値は正常 (J2N-n) 群と比較して有意な高値を示し, 投与期間を通じて拡張していった。ONO-1301-3.0mg/kg 群の 2, 4, 6 および 8 週, 1.0mg/kg 群の 4, 6 および 8 週ならびに 0.3mg/kg 群の 4 および 6 週の値は病態 Control (J2N-k) 群と比較して有意な低値を示した。

5) LVIDd (左室拡張末期径)

投与開始前, 投与 2, 4, 6 および 8 週の LVIDd 値は, 正常 (J2N-n) 群では $3.37 \pm 0.09, 4.24 \pm 0.10, 3.93 \pm 0.12, 4.09 \pm 0.09$ および $4.32 \pm 0.06 \text{ mm}$, 病態 Control (J2N-k) 群では $6.01 \pm 0.19, 6.10 \pm 0.19, 6.51 \pm 0.22, 6.78 \pm 0.22$ および $6.81 \pm 0.15 \text{ mm}$, ONO-1301-3.0mg/kg 群では $6.04 \pm 0.28, 5.12 \pm 0.25, 5.64 \pm 0.20, 5.62 \pm 0.25$ および $6.08 \pm 0.34 \text{ mm}$, ONO-1301-1.0mg/kg 群では $5.43 \pm 0.17, 5.44 \pm 0.24, 5.30 \pm 0.24, 6.11 \pm 0.26$ および $5.94 \pm 0.39 \text{ mm}$, ONO-1301-0.3mg/kg 群では $5.83 \pm 0.26, 5.59 \pm 0.22, 5.82 \pm 0.14, 6.18 \pm 0.23$ および $6.56 \pm 0.17 \text{ mm}$, ONO-1301-0.1mg/kg 群では $5.55 \pm 0.21, 5.71 \pm 0.23, 5.80 \pm 0.20, 6.49 \pm 0.19$ および $6.64 \pm 0.27 \text{ mm}$ であり, 病態 Control (J2N-k) 群の値は正常 (J2N-n) 群と比較して有意な高値を示し, 投与期間を通じて拡張していった。ONO-1301-3.0mg/kg 群の 6 週および 1.0mg/kg 群の 4 週の値は病態 Control (J2N-k) 群と比較して有意な低値を示した。

6) LVIDs (左室収縮末期径)

投与開始前, 投与 2, 4, 6 および 8 週の LVIDd 値は, 正常 (J2N-n) 群では $1.63 \pm 0.14, 2.30 \pm 0.11, 2.10 \pm 0.14, 1.97 \pm 0.07$ および $2.28 \pm 0.05 \text{ mm}$, 病態 Control (J2N-k) 群では $5.00 \pm 0.18, 5.36 \pm 0.19, 5.82 \pm 0.20, 6.15 \pm 0.22$ および $6.15 \pm 0.20 \text{ mm}$, ONO-1301-3.0mg/kg 群では $5.07 \pm 0.28, 4.12 \pm 0.25, 4.59 \pm 0.18, 4.60 \pm 0.23$ および $4.96 \pm 0.33 \text{ mm}$, ONO-1301-1.0mg/kg 群では $4.50 \pm 0.15, 4.45 \pm 0.29,$

$4.36 \pm 0.22, 5.08 \pm 0.24$ および $4.96 \pm 0.36 \text{ mm}$, ONO-1301-0.3mg/kg 群では $4.84 \pm 0.26, 4.73 \pm 0.21, 4.95 \pm 0.16, 5.34 \pm 0.25$ および $5.76 \pm 0.16 \text{ mm}$, ONO-1301-0.1mg/kg 群では $4.61 \pm 0.23, 4.92 \pm 0.25, 5.02 \pm 0.19, 5.71 \pm 0.21$ および $5.89 \pm 0.26 \text{ mm}$, であり, 病態 Control (J2N-k) 群の値は正常 (J2N-n) 群と比較して有意な高値を示し, 投与期間を通じて拡張していった。ONO-1301-3.0mg/kg 群の 2, 4, 6 および 8 週の値, 1.0mg/kg 群の 4, 6 および 8 週の値ならびに 0.3mg/kg 群の 4 週の値は病態 Control (J2N-k) 群と比較して有意な低値を示した。

これらはいずれも ONO-1301 経口投与群 (3~6 群) で効果を示したが、ONO-1301MS 皮下投与群 (7~10 群) では効果を示さなかった。

4. 血中濃度および心臓組織濃度

ONO-1301 経口投与における血中動態を Fig 8 に示した。これらはいずれも用量相関的な変化を示し、最小有効投与量である 0.3 及び 1mg/kg 経口投与 1 時間後の Cmax 濃度はいずれも 8.1 及び 30.1ng/ml 以下を示した。また、最終投与前の血中濃度は 0.07 及び 0.2ng/ml であり、蓄積効果は認められなかった。

尚、ONO-1301 経口投与第 I 相試験における血中濃度結果 (軽度な副作用 (下痢等) 発現時の Cmax 血中濃度; 108.4ng/ml、及び無毒性量での Cmax 血中濃度; 23.7ng/ml) から、本最小有効投与量は安全量であることが示唆された。

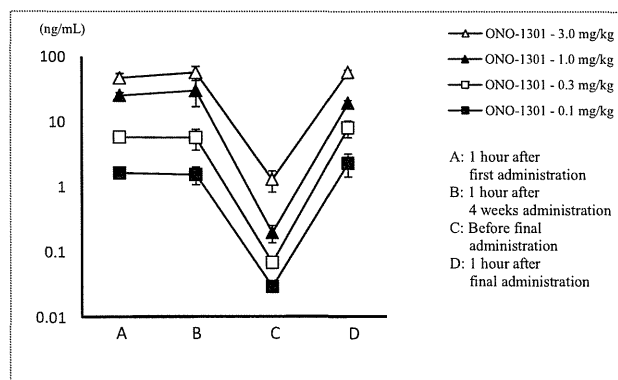


Fig 8 : 経口投与における ONO-1301 血中動態

経口投与群の解剖時における心臓組織中濃度を測定した (Fig 9)。その結果、血中濃度と同様に用量相関的に心臓組織中濃度を認めたが、いずれも 1ng/ml 以下であり、組織蓄積性は認められなかった。

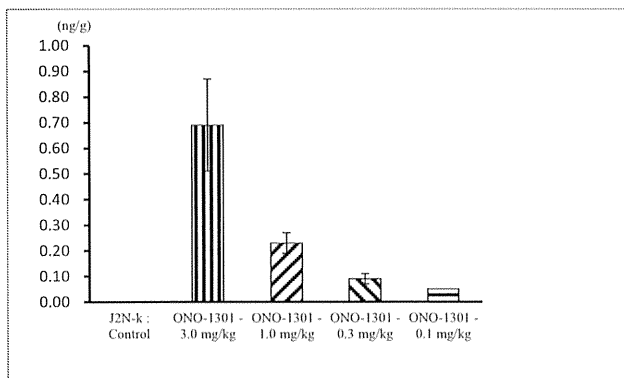


Fig 9 : 経口投与における心臓組織中 ONO-1301 濃度

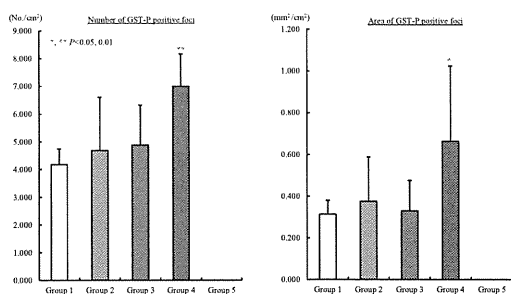
・ ONO-1301 のラット肝中期発がん性試験

F344/DuCr1Crlj 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。

その結果、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。



RAT MEDIUM-TERM LIVER CARCINOGENESIS BIOASSAY OF ONO-1301
QUANTITATIVE DATA FOR GST-P POSITIVE FOCI

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。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

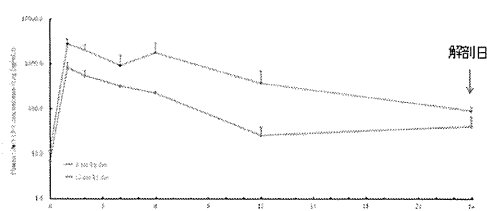


Figure 11 Plasma ONO-1301 and time-dependent parameters after dose and administration route. Each value represents the mean ± S.D. of 6 rats.

最終投与日(解剖前日)に採血

D. 考察

ハムスター(自然発症拡張型心筋症 J2N-k モデル)に 20 週齢から 28 週齢まで、8 週間被験物質を投与して、心機能悪化抑制および改善効果を検討した。

正常 (J2N-n) 群、病態 Control (J2N-k) 群、ONO-1301-3.0mg/kg 群、同-1.0mg/kg 群、同-0.3mg/kg 群、同-0.1mg/kg 群、及び ONO-1301MS-10.0mg/kg 群、同-3.0mg/kg 群、同-1.0mg/kg 群および同-0.3mg/kg 群の 10 群を置いて検討した。

正常 (J2N-n) 群および病態 Control (J2N-k) 群は媒体を、ONO-1301 群はそれぞれ 1 日 2 回 56 日間連続経口投与した。また、ONO-1301MS 各群は ONO-1301MS を 4 週間に 1 回 (合計 2 回) 皮下投与を行った。

その結果、心エコーによる左室機能測定では、心不全の指標とされる LVEF (左室駆出率) 値において、ONO-1301 投与群では、投与 2 週目から有意に悪化を抑制し、3.0mg/kg 投与群では改善作用が認められた。このことから ONO-1301 には、拡張型心筋症から心不全への悪化を抑制する作用があり、最低有効用量は

0.3mg/kg と 1.0mg/kg の間であることが示唆された。

一方、ONO-1301MS 間歇皮下投与では、効果を見出すことはできなかった。自然発症拡張型心筋症 (T0-2) ハムスターモデルに 24 週齢～32 週齢まで 3 週間に 1 回、YS-1402/ONO-1301MS を皮下投与した場合、28 週齢から有意に心機能 (LVEF) の悪化を抑制したが (Biomedicine&Pharmacotherapy 63:781(2009))、J2N-k ハムスターは病態が異なるのかも知れない。

また、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。

E. 結論

軽症・中等症拡張型心筋症患者に 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。

自然発症拡張型心筋症 (J2N-k) ハムスターモデルを用いて、20 週齢 (病態発症) から 28 週齢まで 1 日 2 回 ONO-1301 を 0.1mg/kg～3mg/kg にて 8 週間反復経口投与した結果、心機能 (LVEF 等) 改善における最小有効投与量は 0.3～1mg/kg であった。

ONO-1301 経口投与第 I 相試験結果における血中濃度測定結果から、本最小有効投与量は安全量であることが示唆された。また、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) Sustained-release delivery of prostacyclin analogue enhances bone marrow-cell recruitment and yields functional benefits for acute myocardial infarction in mice. Imanishi Y, Miyagawa S, Fukushima S, Ishimaru K, Sougawa N, Saito A, Sakai Y, Sawa Y.

PLoS One. 2013 Jul 19;8(7):1-8

2. 学会発表

1) 「長時間作用型 Prostacyclin agonist の心臓局所投与法の開発・効果に関する実験的検討」

溝口裕規、宮川 繁、福嶋 五月、齋藤 充弘、酒井 芳紀、今西悠基子、原田希摩、西宏之、吉川泰司、上野 高義、戸田 宏一、澤 芳樹

第 4 4 回日本心臓血管外科学会 熊本 (201402)

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

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 25 年～26 年）

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

課題：ONO-1301 の新規ナノスフェア製剤の作製と有効性の確認及び

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

疾患特異的な DDS ナノスフェア製剤として、新規 ONO-1301 ナノスフェア製剤 (ONO-1301NS) を作製し、間歇静脈内投与により、より安全で汎用性の高い疾患特異的 (DDS) な重症心不全治療剤開発を目的とした治療法の開発を検討した（特許出願準備中）。

特性の異なる代表的な 2 種の ONO-1301NS 製剤を作製し、本製剤を重症心不全（肺高血圧症）モデルに間歇静脈内投与し、ONO-1301 と比較した。即ち、ラットにモノクロタリン 60 mg/kg を単回皮下投与により誘発させた重症心不全（肺高血圧症）モデルを用いて、モデル作製 7 日後より、ONO-1301 ; 3mg/kg x 2 回/日反復経口投与、及び ONO-1301 又は特性の異なる 2 種の ONO-1301NS を週 1 回、(ONO-1301 として) 1 mg/kg 間歇静脈内投与し、4 2 日までの生存率を比較検討し、ONO-1301NS 製剤の DDS 効果を確認した。

その結果、媒体投与群 (Cont) に比し、ONO-1301 反復経口投与群および ONO-1301NS 製剤 (A) の間歇静注投与群は共に 50% の有意な生存率の延長を示した。このことから、ONO-1301 の総投与量は NS 剤にすることにより 1/42 投与量で同等の効果を示すことから、ONO-1301 の NS 製剤化により ONO-1301 が疾患局所に集積 (DDS) され、より少量投与により有効性を発揮する可能性が示唆された。ONO-1301NS 製剤は、安全性、汎用性、利便性、経済性に優れた DDS 製剤になることが示唆された。

また、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) での無毒性量は最大投与量である 10mg/kg 以上であった。

A. 研究目的

・ONO-1301NS 製剤

拡張型心筋症に対する治療法としては、補助人工心臓装着時に人工心臓離脱を目的として、YS-1402/ONO-1301MS シート製剤を心臓貼付投与することを目的として検討している。

一方、軽症・中等症患者に対しては、早期治療介入として ONO-1301 反復経口投与により、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て検討している。

しかし、心臓貼付における開胸手術は患者への侵襲が大きく、汎用性は少ない。一方、経口投与は全

身投与であるため、心臓特異性は低く、安全性との乖離が危惧される。

今回、間歇反復静脈内投与による疾患局所特異的な製剤

として ONO-1301 ナノスフェア (ONO-1301NS) 製剤を作

製し、安全性、汎用性、利便性、経済性を旨とした新規 DDS 製剤の作製とその有用性を検証することを目的とした。

・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医師主導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、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。

B. 研究方法

・ONO-1301NS 製剤

疾患特異的な DDS (Drug Delivery System) ナノスフェア (NS) 製剤として、特性の異なる代表的な2種の新規 ONO-1301 ナノスフェア製剤 (ONO-1301NS 製剤 A 及び B) を作製し、間歇反復静脈内投与により、より安全で汎用性の高い疾患局所特異的 (DDS) な重症心不全治療剤開発を目的とした治療法の検討を行った。

代表的な2種の ONO-1301NS 製剤 (ONO-1301NS 製剤 (A) ; 平均粒子径 122nm 及び ONO-1301NS 製剤 (B) ; 平均粒子径 ; 109nm) を作製した (特許出願準備中のため詳細記載略)。

作製した ONO-1301NS 製剤をラットモノクロタリン (MCT) 誘発重症心不全 (肺高血圧症) モデルに週1回間歇静脈内投与し、ONO-1301 反復経口投与と比較し、有用性を検証した。

1. 被験物質及び媒体

1) ONO-1301

・ Lot No. : H5001 (小野薬品より入手)

2) ONO-1301NS 剤 A

・ Lot No. : D1441

・ 平均粒子径 : 122nm

3) ONO-1301NS 剤 B

・ Lot No. : YT140118

・ 平均粒子径 : 109 nm

4) 陽性対照 (ET-1 拮抗剤) ; ボセンタン

・ Lot No. : 0701012325b

5) 媒体

(1) 0.5 %カルボキシメチルセルロース水溶液 (以下、0.5% CMC-Na 水溶液)

・ Lot No. WAG1264、和光純薬工業㈱

(2) 注射用水

・ Lot No. 3D86N、日本薬局方、㈱大塚製薬

2. 試験系

1) 使用動物

動物種 : ラット

系統 : Slc:Wistar (雄性)

入荷時週齢 : 4 週齢

試験開始時週齢 : 5 週齢

入荷時体重 : 66.4~90.8 g

供給源 : 日本エスエルシー株式会社

3. 試験方法

1) 重症心不全 (肺高血圧) モデル誘発物質

名称 : モノクロタリン (以下、MCT)

Lot No. : SLBG1999V

製造元 : Sigma-Aldrich Corporation

2) 重症心不全モデルの作製 (肺高血圧症モデル作製)

MCT を 60 mg//kg の用量で単回背部皮下投与し、MCT 投与 6 日後に体重層別割付法で群分けした。

3) 群構成

群	投与物質、投与用量、投与回数	投与経路	例数
1	生理食塩液週	静脈内	20
2	ONO-1301 ; 3 mg/kg×2 回/日	経口	10
3	ボセンタン ; 50 mg/kg×2 回/日	経口	10
4	ONO-1301NS 剤 A ; 1 mg/kg/週	静注	10
5	ONO-1301NS 剤 B ; 1 mg/kg/週	静脈内	10
6	ONO-1301 ; 1 mg/kg/週	静脈内	10

* 投与量は ONO-1301 としての用量を示す。

1 群 : MCT 投与 7、14、21、28 および 35 日後 (計 5 回) に 1 週間間隔で生理食塩液を静脈内投与した。

2 群 : MCT 投与後 7~41 日後まで、投与の間隔を 8 時間以上空けて、ONO-1301 の 3 mg/kg を 2 回/日、経口投与した。

3 群 : MCT 投与 7~41 日後まで、投与の間隔を 8 時間以上空けて、ボセンタンの 50 mg/kg を 2 回/日、経口投与した。

4 群 : MCT 投与 7、14、21、28 および 35 日後 (計 5 回) に 1 週間間隔で ONO-1301NS 剤 A の 1 mg/kg を静脈内投与した。

5 群 : MCT 投与 7、14、21、28 および 35 日後 (計 5 回) に 1 週間間隔で ONO-1301NS 剤 B の 1 mg/kg を静脈内投与した。

6 群 : MCT 投与 7、14、21、28 および 35 日後 (計 5 回) に 1 週間間隔で ONO-1301 の 1 mg/kg を静脈内投与した。

4) 評価

(1) 一般状態観察

MCT 投与 7~41 日後までは 8 時間以上間隔を空けて 2 回/日、動物の瀕死状態を確認した。尚、飼育期間中に瀕死状態 (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。

(2) 体重測定

MCT 投与日の投与前、MCT 投与 3 および 6 (群分け日) 日後に測定した。MCT 投与 7、9、12、15、18、21、24、27、30、33、36 および 39 日後は 1 回目の被験物質投与前に測定した。MCT 投与 42 日後は午前中に測定した。

・ 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/NO-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 CrI: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量として投与)
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 CrI: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 を投与可能な最大投与量である 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、媒体群を含めて自発運動の減少、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 : ゲッチングン系ミニブタ(雌雄各3匹/群)
- ▶ 群構成 : ONO-1301MS 1, 3, 10 mg/kg (ONO-1301量として投与)
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	解剖時期	雌	雄
1	0 mg/kg (媒体対照)	6週	3例	3例
2	1 mg/kg	6週	3例	—
3	3 mg/kg	6週	3例	—
4 ^①	10 mg/kg	6週	3例	3例
5 ^②	10 mg/kg	13週	3例	—

① 雌雄1匹ずつの1群毎に解剖検定する1群を2群に分けて検定する。② 雄のみを解剖検定する。

【検査スケジュール】

項目	検査日	検査日													
		1	3	7	14	21	28	35	41	48	55	61	67	74	81
一般状態	0, 1, 14, 21, 28, 35, 41, 48, 55, 61, 67, 74, 81	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
体重	0, 1, 14, 21, 28, 35, 41, 48, 55, 61, 67, 74, 81	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
摂餌量	0, 1, 14, 21, 28, 35, 41, 48, 55, 61, 67, 74, 81	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
眼科学的検査	0, 1, 14, 21, 28, 35, 41, 48, 55, 61, 67, 74, 81	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
血圧・心電図	0, 1, 14, 21, 28, 35, 41, 48, 55, 61, 67, 74, 81	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
尿検査	0, 1, 14, 21, 28, 35, 41, 48, 55, 61, 67, 74, 81	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
血液学的検査	0, 1, 14, 21, 28, 35, 41, 48, 55, 61, 67, 74, 81	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
血液生化学的検査	0, 1, 14, 21, 28, 35, 41, 48, 55, 61, 67, 74, 81	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
TK測定	0, 1, 14, 21, 28, 35, 41, 48, 55, 61, 67, 74, 81	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
心臓組織中濃度測定	0, 1, 14, 21, 28, 35, 41, 48, 55, 61, 67, 74, 81	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
剖検	0, 1, 14, 21, 28, 35, 41, 48, 55, 61, 67, 74, 81	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

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 (ペリプラスト®P コンビセット接着剤、CSL ベーリング株式会社) 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

・ONO-1301NS 製剤

1. 生存率

重症心不全モデル作製42日後までの生存率の推移を Figure. 1、および Table 1 に示す。

対照群 (1 群) は、MCT の 60 mg/kg 皮下投与により重症心不全モデル作製 15 日後に 1 例の死亡が観察された。その後、42 日までに 17 例の死亡が観察され、最終生存率は 10 % (生存数: 2/20 例) であった。

ONO-1301 の 3 mg/kg の 2 回/日、反復経口投与群 (2 群) は、重症心不全モデル作製 14 日後に 1 例の死亡が観察された。その後、42 日までに 4 例の死亡が観察され、最終生存率は 50 % (生存数: 5/10 例) であり、対照群 (1 群) と比較して有意な延命効果が認められた ($p < 0.05$)。

ボセンタンの 50 mg/kg の 2 回/日、反復経口投与群 (3 群) は、重症心不全モデル作製 20 日後に 1 例の死亡が観察された。その後、42 日までに 6 例の死亡が観察され、最終生存率は 30 % (生存数: 3/10 例) であり、対照群 (1 群) と比較して有意な延命効果は認められなかった。

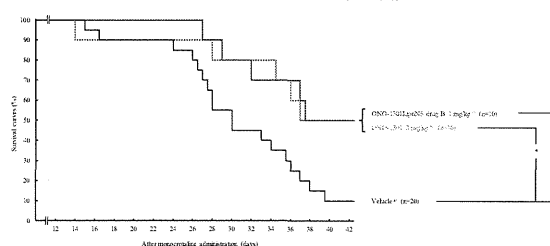
陽性対照として用いた ET-1 拮抗剤であるボセンタンは肺高血圧治療剤として臨床的に使用されており、同ラット MCT 誘発心不全モデルにおいて有効性を確認している (Circ J 2013) が、これらは MCT 投与直後からの反復経口投与である。今回、(3 群) MCT 投与 7 日後からの投与においては、有意な延命効果は確認出来なかった。

ONO-1301NS 剤 A の 1 mg/kg の 1 回/週、間歇静脈内投与群 (4 群) は、重症心不全モデル作製 27 日後に 1 例の死亡が観察された。その後、42 日までに 4 例の死亡が観察され、最終生存率は 50 % (生存数: 5/10 例) であり、対照群 (1 群) と比較して有意な延命効果が認められた ($p < 0.05$)。

ONO-1301NS 剤 B の 1 mg/kg の 1 回/週、間歇静脈内投与群 (5 群) は、重症心不全モデル作製 18 日後に 1 例の死亡が観察された。その後、42 日までに 8 例の死亡が観察され、最終生存率は 10 % (生存数: 1/10 例) であり、対照群 (1 群) と比較して有意な延命効果は認められなかった。

ONO-1301 の 1 mg/kg の 1 回/週、間歇静脈内投与群 (6 群) は、重症心不全モデル作製 28 日後の投与約 30 分後に 2 例の死亡が観察された。その後、42 日までに 6 例の死亡が観察され、最終生存率は 20 % (生存数: 2/10 例) であり、対照群 (1 群) と比較して有意な延命効果は認められなかった。

Figure 1
Effects of ONO-1301 and ONO-1301LipoNS drug B on survival curves in Monocrotaline-induced pulmonary hypertension rats



a) Saline (1 mL/kg i.v.) was administered once a week from 7 days after monocrotaline administration.
b) ONO-1301 (p.o.) was administered twice a day for 35 days from 7 days after monocrotaline administration (3 mg/kg × twice/day × 35 days = 210 mg/kg animal).
c) ONO-1301LipoNS drug B (p.o.) was administered once a week from 7 days after monocrotaline administration (1 mg/kg/week × 5 times = 5 mg/kg animal).
Monocrotaline (60 mg/kg s.c. at 0 day).
Animals were grouped 60 days after monocrotaline administration.
* Significant difference from pulmonary hypertension vehicle at $p < 0.05$ (Log-rank test).

・投与量は ONO-1301 としての用量を示す。* : $P < 0.05$ vs 1 群

Fig 1 : ONO-1301 反復経口投与群と ONO-1301NS 製剤 (A) の間歇静脈内投与における 42 日間の生存曲線

群	投与物質、投与量、投与回数	投与経路	例数	生存率 (%)
1	生理食塩水	静注	20	10
2	ONO-1301; 3mg/kg x 2 回/日	経口	10	50*
3	ボセンタン; 50mg/kg x 2 回/日	経口	10	30
4	ONO-1301NS 剤 A; 1 mg/kg/週	静注	10	50*
5	ONO-1301NS 剤 B; 1 mg/kg/週	静注	10	10
6	ONO-1301; 1mg/kg/週	静注	10	20

Table 1 : 各群 4 2 日後の生存率

2) 体重

MCT の 60 mg/kg 投与時の各群の平均体重は 115.5 ~ 119.1 g を示し、被験物質投与開始時 (MCT 投与 7 日後) の各群の平均体重は 137.4 ~ 139.6 g であった。

対照群 (1 群) は MCT 投与後、平均体重は増加して 21 日後は 188.2 g (18/20 例) であった。その後、体重が減少し 16 例の死亡が認められ 42 日後の平均体重は 146.7 g (2/20 例) であった。

ONO-1301 の 3 mg/kg の 2 回/日、反復経口投与群 (2 群) は MCT 投与後、平均体重は増加して 21 日後は 187.6 g (9/10 例) であった。その後、体重が減少し死亡が認められ 42 日後の平均体重は 165.1 g (5/10 例) であり、対照群 (1 群) と比較して有意な差は認められなかった。

ボセンタンの 50 mg/kg の 2 回/日、反復経口投与群 (3 群) は MCT 投与後、体重は増加して 21 日後の平均体重は 192.9 g (9/10 例) であった。その後、体重が減少し死亡が認められ 42 日後の平均体重は 167.2 g (3/10 例) であり、対照群 (1 群) と比較して有意な差は認められなかった。

ONO-1301NS 剤 A の 1 mg/kg の 1 回/週、間歇静脈内

投与群（4群）はMCT投与後、体重は増加して21日後の平均体重は186.7g（10/10例）であった。その後、体重が減少し死亡が認められ42日後の平均体重は145.4g（5/10例）であり、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

ONO-1301NS 剤Bの1mg/kgの1回/週、間歇静脈内投与群（5群）はMCT投与後、体重は増加して18日後の平均体重は176.5g（9/10例）であった。その後、体重が減少し死亡が認められ42日後の平均体重は113.3g（1/10例）であった。重症心不全モデル作製27および30日後において対照群（1群）と比較して有意な体重減少を示した（ $p < 0.05$ ）。

ONO-1301の1mg/kgの1回/週、間歇静脈内投与群（6群）はMCT投与後、体重は増加して21日後の平均体重は190.0g（10/10例）であった。その後、体重が減少し死亡が認められ42日後の平均体重は192.2g（2/10例）であり、対照群（1群）と比較して有意な差は認められなかった。

3) 総投与量

MCT投与7日後から41日までの35日間に投与された動物あたりの総被験物質量を求めた。

その結果、2群は210 mg/kg/animal（3 mg/kg×2回/日×35日）、3群は3500 mg/kg/animal（50 mg/kg×2回/日×35日）、4群～6群は5 mg/kg/animal（1 mg/kg/週×5回）であった。4群は2群と比較し、5/210（1/42）投与量にて同等の効果を示した。

・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

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/切迫例	観察用なし
一般状態	観察用30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし
体重	観察用30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし
摂餌量	観察用30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし
眼科学的検査	観察用30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし
血液学的検査	観察用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	観察用30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし
器官重量	観察用30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし
剖検	観察用30 mg/kgで投与部位に白色結晶性の被験物質と推定
病理組織学的検査	観察用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 3 mg/kg ^b 10 mg/kg ^b 30 mg/kg ^b
C _{max} (ng/mL)	29.7±6.2 122±13 314±61 48.8±3.9 73.2±11.6 196±6
AUC _{0-24h} (ng·h/mL)	6670±2170 20500±5200 123000±30000 3090±360 16000±3900 65700±5300

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

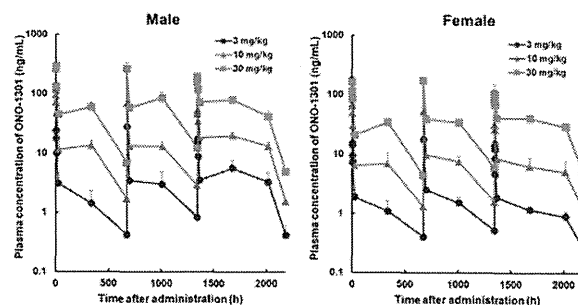
投与量 (mg/kg/回)	雄			雌		
	AUC _{0-24h} (ng·h/mL)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-24h} (ng·h/mL)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)
3	6670	29.7	450	3090	18.8	675
10	28500	122	1.67	14000	73.2	1.67
30	123000	314	225	65700	196	226

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C_{max}及びAUC_{0-24h}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濃度測定の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

		投与量 (mg/kg)	AUC _{1008h} (ng·h/mL)	AUC _{2184h} (ng·h/mL)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)
6週間 観察群	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
	雌	10	27500 ± 3500	N.A.	95.8 ± 22.7	115 ± 192
		10	24500 ± 11200	N.A.	89.5 ± 78.8	224 ± 97
13週間 観察群	雄	10	19900 ± 9600	20300 ± 9700	61.8 ± 18.5	113 ± 95

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C_{max}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)まで持続的な曝露が認められ、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濃度測定の各群の測定結果は、6週間観察群の1mg/kgでは、すべての例で定量限界(0.0600 ng/g tissue)未満であった。3mg/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。10mg/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10mg/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

・ONO-1301NS 製剤

疾患特異的なDDS ナノスフェア製剤として、新規ONO-1301 ナノスフェア製剤(ONO-1301NS)を作製し、間歇静脈内投与により、より汎用性の高い疾患特異的(DDS)な重症心不全治療剤開発を目的とした治療法の開発を検討した。

2種の特性の異なるONO-1301NS製剤を作製し、間歇静脈内投与によりMCT誘発重症心不全モデルでの生存率を比較検討することにより、各種製剤のDDS効果を確認した。

陽性対照物質として用いたET-1拮抗剤であるボセンタンは肺高血圧治療剤として臨床的に使用されており、MCT誘発心不全モデルにおいて有効性を確認しているが、これらはMCT投与直後からの反復経口投与である。今回、MCT投与7日後からの治療投与においては、有意な延命効果が確認出来なかった。一方、ONO-1301の3mg/kg(2群)の1日2回反復投与での最終生存率は50%であり、対照群(1群)と比較して有意な延命効果が確認された。また、ONO-1301NS剤Aの1mg/kg(4群)も週1回の間歇静脈内投与においても、最終生存率は50%であり、ONO-1301と同等の延命効果を示した。

ONO-1301NS剤(A)の1mg/kg/週間歇静脈内投与(4群)はONO-1301の3mg/kgの2回/日、反復経口投与(2群)と比較し、総投与量として1/42投与量において、同等な延命効果を示すことにより、NS製剤でのDDS効果が確認された。

一方、ONO-1301原薬(6群)、及びONO-1301NS剤(B)の1mg/kg/週間歇静脈内投与群(5群)は効果を示さなかった(Table 1)。

以上の結果より、重症心不全モデルに対して心不全発症後(MCT投与7日後)からの投与においてONO-1301反復経口投与およびONO-1301NS剤A間歇静脈内投与は治療的な投与により有意な延命効果を示し、重症心不全(肺高血圧症)に対する治療効果を有する可能性が示唆された。

・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30mg/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10mg/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

・ONO-1301NS 製剤

重症心不全モデルに対して、ONO-1301NS 製剤 (A) の週 1 回間歇静脈内投与は、ONO-1301 の 1 日 2 回反復経口投与と同等の治療効果を示した。ONO-1301 の総投与量は NS 剤にすることにより 1/42 投与量で同等の効果を示すことから、ONO-1301NS 製剤の間歇静脈内投与により ONO-1301 が疾患局所に集積 (DDS) されるため、少量投与により有効性を発揮する可能性が示唆された。

ONO-1301NS 製剤の間歇静脈内投与は、疾患局所特異的 (DDS) であり、安全性、汎用性、経済性、利便性に優れた重症心不全治療剤に成り得ることが示唆された。

・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 以上であった。

これらの結果を用いて、心臓貼付投与における治験概要書、治験実施計画書、および同意説明文書を作成し、PMDA 対面助言にて確認を行った。

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) 「Impact of cardiac support device combined with slow-release prostacyclin agonist in a canine ischemic cardiomyopathy model.」

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

J Thorac Cardiovasc Surg. 2014 Mar;147(3):1081-7.

3) 「Synthetic prostacyclin agonist, ONO1301, enhances endogenous myocardial repair in a

hamster model of dilated cardiomyopathy: a promising regenerative therapy for the failing heart.」

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

J Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Dec;146(6):1516-25.

4) 「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.」

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

J Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Aug;146(2):413-21.

5) 「Sustained-release delivery of prostacyclin analogue enhances bone marrow-cell recruitment and yields functional benefits for acute myocardial infarction in mice.」

Imanishi Y, Miyagawa S, Fukushima S, Ishimaru K, Sougawa N, Saito A, Sakai Y, Sawa Y.

PLoS One. 2013 Jul 19;8(7):1-8

2. 学会発表

1) 「長時間作用型 Prostacyclin agonist の心臓局所投与法の開発・効果に関する実験的検討」

溝口裕規、宮川 繁、福嶋 五月、齋藤 充弘、酒井 芳紀、今西悠基子、原田希摩、西宏之、吉川 泰司、上野 高義、戸田 宏一、澤 芳樹

第 4 4 回日本心臓血管外科学会 熊本 (201402)

2) 「A Novel Therapeutic Technology of Long-Acting Prostacyclin Agonist for Mature Porcine Ischemic Heart Model」

Hiroki Mizoguchi ; Shigeru Miyagawa ; Satsuki Fukushima ; Atsuhiko Saito ; Yoshiki Sakai ; Yukiko Imanishi ; Akima Harada ; Takayoshi Ueno ; Koich Toda ; Toru Kuratani ; Yoshiki Sawa
AHA2013 (American Heart Association) Dallas

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
Kubota Y, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Watabe H, Daimon T, Sakai Y, Akiyama T, Sawa Y.	Impact of cardiac support device combined with slow-release prostacyclin agonist in a canine ischemic cardiomyopathy model.	J Thorac Cardiovasc Surg.	Mar;147(3)	1081-7	2014
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	Dec;146(6)	1516-25	2013
Shirasaka T, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Shiozaki M, Kawaguchi N, Matsuura N, Nakatani S, Sakai Y, Daimon T, Okita Y, Sawa Y.	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	Aug;146(2)	413-21	2013
Imanishi Y, Miyagawa S, Fukushima S, Ishimaru K, Soutogawa N, Saito A, Sakai Y, Sawa Y.	Sustained-release delivery of prostacyclin analogue enhances bone marrow-cell recruitment and yields functional benefits for acute myocardial infarction in mice	PLoS One	Jul 19;8(7)	1-8	2013

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*)-[[α -(3-pyridyl)-benzylidene]aminoxy]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