

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)
総合研究報告書(平成 25 年度～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)₂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。

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。

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、心機能を評価した結果、用量相関的に心機能(LVEF等)が改善し、最小有効投与量は0.3mg/kgであった。一方、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では、最小有効投与量はイヌ高速ペーシングでの有効量と同等であった(報告済)。また、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、心機能の改善及び生存率の有意な延長が認められた(報告済)。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(LVAD)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。

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。

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行う。

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。その結果、用量相関的に心機能が改善し、最小有効投与量は1mg/kgであった。本投与量は、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、副作用との乖離も大きいことが示唆された。

また、イヌ高速ペーシングモデル長期試験でも、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。尚、ラット肝中期発がん性試験（伊東法）は陰性であった。長期毒性試験を実施し、臨床試験開始を目指す。

目的3. ONO-1301の新しいDDS製剤として、ONO-1301 ナノスフェア[®]（NS）製剤を作製し、間歇静脈内投与にて疾患特異的治療法の開発を行う。

ONO-1301NS製剤の間歇反復静脈内投与による重症心不全モデルへの効果の検討では、ONO-1301が疾患局所に集積（DDS）され、より少量投与においても疾患局所特異的に有効性を発揮する可能性が示唆された（特許出願準備中）。ONO-1301NSは汎用性、利便性ある間歇反復静脈内投与が可能で、疾患局所特異的（DDS）であり、経口投与に比し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。

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、治療の施行、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。

本研究は、戦略的薬事相談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。

本研究に使用する低分子合成化合物；オキシム誘導体（ONO-1301）は、非プロスタグランジン（PG）骨格であり、科学的に安定で、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PGI₂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

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。

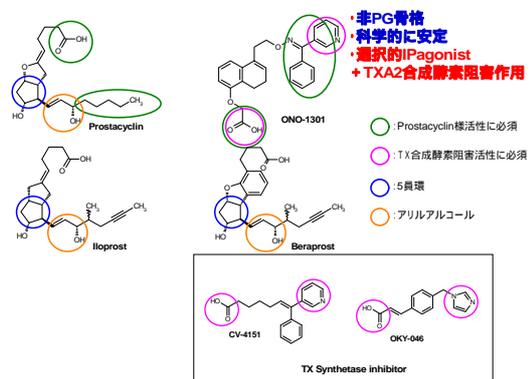


Fig 1 : ONO-1301の構造的特徴

今回、本化合物が血小板凝集抑制作用より1/10以下の低濃度で線維芽細胞等に作用して、多種の体内再生因子（HGF、VEGF、SDF-1、HMGB1等）を産生誘導することを新しく見出し（Fig 2）、これらの作用から抗アポトーシス作用、血管新生作用、幹細胞分化誘導・組織再生作用、及び抗線維化作用等が期待できる。これらの作用から、各種の重症心疾患、呼吸器疾患、腎臓疾患、神経変性疾患、肝臓疾患、膵臓疾患、及び虚血性疾患等に有効であることを各種疾患モデルにて確認している（Bio Clin2013）。

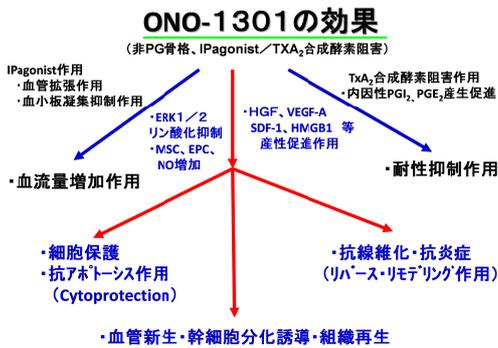


Fig 2 : ONO-1301 の期待される効果

また、新しく疾患局所投与可能な4週間徐放性のONO-1301 乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) マイクロスフェア (MS) 製剤 (YS-1402/ONO-1301MS) を作製した (Fig 3)。4週間徐放性製剤であるYS-1402/ONO-1301MS をラットに皮下投与すると、点滴静注様の血中動態を示した (Fig 4)。

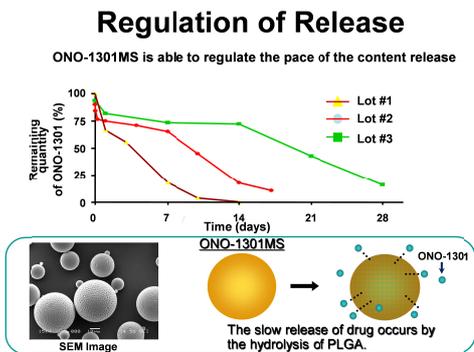


Fig 3 : ONO-1301 の徐放性製剤 (ONO-1301MS)

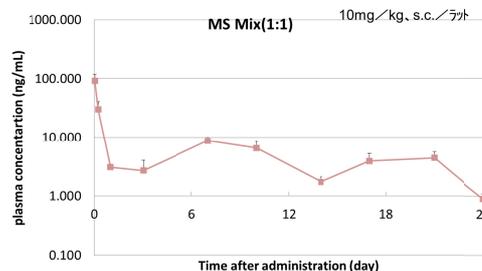


Fig4: ラット皮下に ONO-1301MS 投与における血中動態

イヌ高速ペースング DCM モデル、ミニプタ

陳旧性 (OMI) 心筋梗塞モデル、及び自然発症拡張型心筋症ハムスター (J2N-k) モデルを用いて心臓貼付投与試験を行った結果、心臓組織に ONO-1301MS をゼラチンシートに浸み込ませて貼付することにより、貼付された部位にて ONO-1301 が長時間、高濃度維持が可能 (DDS) となり、持続的な体内再生因子の誘導により、心血管及び心筋が再生され、組織修復されることが示唆された (Fig 5)。

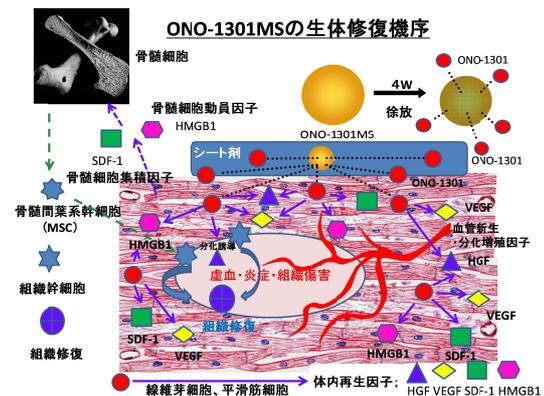


Fig 5 : ONO-1301MS の生体修復機序

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。

1) イヌ高速ペースング (拡張型心筋症) モデルを用いて、高速ペースング4週間後に開胸し、臨床投与法にてYS-1402/ONO-1301MS を各種用量で単回心臓貼付投与した。投与2週間及び4週間後 (ペースング8週後; 解剖) に心エコーによる心機能 (LVEF 等) 評価等を行った。

2) ミニプタ陳旧性心筋梗塞 (ICM) モデルを用いて、アメリドコンストラクター設置4週後に同様の臨床投与法にてYS-1402/ONO-1301MS を心臓貼付し、投与2週間及び4週間後に心機能を評価した試験では、最小有効投与量はイヌ高速ペースングモデルでの有効量と同等であった (学会発表 1 ; AHA2013 発表)。

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、心機能の改善及び生存

率の有意な延長が認められた(論文発表3 ; JTCS2013)。

4) 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。

これらの結果から、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、再生創薬として 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 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。

1) 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 を各種用量にて8週間反復経口投与した。投与2、4、6及び8週間後(解剖)に、心機能(LVEF 等)評価を行った。

2) 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。

3) 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示唆される。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。

3) ONO-1301 の新しい DDS 製剤として、ONO-1301 ナノスフェア- (NS) 製剤を作製し、間歇静脈内投与にて各種心不全に対する疾患特異的治療法を開発を行う。

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) 試作品を作製し、間歇反復静脈内投与により、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(特許出願準備中)。代表的な2種の ONO-1301NS 製剤(A ; 内径122nm、B ; 内径109nm) を作製した。

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モデル(肺高血圧症モデル)を用いて、モデル作製7日後より、ONO-1301 ; 3 mg/kg x 2 回/日反復経口投与および ONO-1301 又は ONO-1301NS 製剤 A 及び B の週1回、(ONO-1301 として) 1 mg/kg 間歇静脈内投与し、42 日までの生存率を比較検討し、NS 剤の DDS 効果を確認した。

(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

1) イヌ高速ペーシングモデルへの ONO-1301MS 心臓貼付投与試験

イヌに高速心臓ペーシング(拍動数: 220 ~ 236 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、病態発症後(4週間)に LVEF にて均等に群分けを行い、各種用量にて ONO-1301MS の単回心臓貼付投与を行った。貼付2週間後、及び4週間後(ペーシング8週間後; 解剖)に心機能改善効果及びリモデリング抑制効果について検討した。

今回作製した重症拡張型心筋症モデル(Control 群)における心機能検査では、ペーシング4週間後で左室内腔の拡大(左室拡張末期径及び左室収縮末期径の増大)とともに心室壁の非薄化(心室中隔壁厚及び左室後壁拡張末期厚の減少)が認められた。さらに機能面では左室収縮機能の低下(LVEF 及び%FS の低下等)が観察された。以上の結果から今回作製した重症拡張型心筋症モデルは、ペーシング惹起4週間後で急激に心機能が悪化し、左室リモデリングが形成される拡張型心筋症の病態モデルであり、さらに計8週間に亘る長期のペーシングによってうっ血症状が観察される重症心不全状態を惹起したモデルであると考えられた。

このような病態モデルに対して、ペーシング4週間後における ONO-1301MS 心臓貼付投与(ONO-1301 として3、1、0.3 及び0.1 mg/kg 投与)では、心不全時の左室収縮機能(LVEF)

不全に対して 0.3 mg/kg の投与用量より用量相関的に有意な改善効果が認められた。

以上の結果、ONO-1301MS は左室収縮機能不全に対して改善効果が認められ、最小有効投与量は 0.3 mg/kg であった。

2) ミニブタ陳旧性心筋梗塞 (OMI) モデルへの YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与試験 (最小有効投与量の設定) (学会報告 2; AHA2013 発表済)

ゲッチング系雄性ミニブタの LAD にアメリロイドコンストリクターを装着し、4 週間後に LVEF にて均等に群分けを行った。各種用量の YS-1402/ONO-1301MS 剤、及び ONO-1301 を含まない MS 剤 (対照群) を虚血周辺部の心臓に貼付し、2 週間後、及び 4 週間後に心エコーにて心機能を測定し、4 週後に解剖・評価した。

その結果、心機能 (LVEF) に対する最小有効投与量は、イヌ高速ペーシングモデルでの効果と同じ、0.3mg/kg であった。

3) -筋グリカン欠損自然発症拡張型心筋症 (J2N-k) ハムスターモデルにおける、ONO-1301MS 心臓貼付の検討 (論文発表 3; JTCS2013 報告済)

-筋グリカン欠損自然発症拡張型心筋症モデルである J2N-K ハムスターに、YS-1402/ONO-1301MS をアテロコラーゲン膜に浸透させたシートを心臓に直接貼付投与群、ONO-1301 を含まない MS 剤群、及び正常群にて比較を行った。

その結果、YS-1402/ONO-1301MS 群で有意な生存率の延長、及び心エコー検査により、心機能の有意な改善効果が認められた。また、YS-1402/ONO-1301MS 投与により毛細血管数の増加とコラーゲン蓄積の減少が認められた。また、ONO-1301MS 剤を心臓に貼付することにより、末梢血中濃度に比し 300 倍程度心筋内濃度 (1W 値) が上昇持続することを見出し、副作用 (不整脈等) の発症がなく、重症心不全モデルにて著効を示すことが確認された。

4) 追加非臨床 (毒性) 試験として、ラット 13 週間皮下投与毒性試験、及び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 週間間歇皮下投与毒性試験 (ONO-1301 としての投与量: 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 週間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 週間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 (ONO-1301 としての投与量: 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。10mg/kg 投与量は心臓貼付投与可能な最大投与量である。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週間観察群の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週間観察群の1mg/kgでは、すべての例で定量限界(0.0600ng/g tissue)未満であり、3mg/kgでも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週間観察群の10mg/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10mg/kg以上と判断した。

2. ONO-1301 経口投与

(1) 自然発症拡張型心筋症(J2N-k)ハムスターモデルへのONO-1301反復経口投与試験

ハムスター(自然発症拡張型心筋症J2N-kモデル)に20週齢(病態発症)から28週齢まで、8週間ONO-1301(原薬)を1日2回、反復経口投与し、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(x2回/日)群、同-1.0mg/kg群、同-0.3mg/kg群、同-0.1mg/kg群の6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各群はONO-1301を、それぞれ1日2回56日間反復経口投与を行った。

その結果、心エコーによる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8週目まで用量相関的に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、拡張型心筋症の改善又は心不全への悪化を抑制する作用があり、最小有効投与量は0.3mg/kgと1.0mg/kgの間であった。

(2) イヌに心臓高速ペーシング(拍動数:

226~240beats/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週間のONO-1301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(226~240beats/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3mg/kg x 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。

(3) 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、ONO-1301の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。

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 はプロスタグランディン (PG) 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 (PGI₂) 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。

3. 疾患特異的な DDS ナノスフェア製剤 ;

1) 新規 ONO-1301 ナノスフェア製剤 (ONO-1301NS) の作製 (特許出願準備中) を行った結果、製剤 A (平均粒子径 ; 122nm) 及び製剤 B (平均粒子径 ; 109nm) である 2 種の ONO-1301NS 製剤を得た (特許出願準備中)。

2) ONO-1301NS 製剤間歇静注投与における抗心不全効果の検討

作製した ONO-1301NS 製剤 A および B を用いて、ラットモノクロタリン (MCT) 誘発重症心不全 (肺高血圧症) モデルにて評価した結果、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 の間歇反復静注群は共に 50% の有意な生存率の延長を示した。また ONO-1301 (原薬) および ONO-1301NS 製剤 B の間歇反復静注群では効果は認められなかった。このことから、ONO-1301NS 製剤 A は経口投与に比し、ONO-1301 の総投与量として 1/42 の投与量にて同等の効果を示し、疾患局所特異的 (DDS) であることが示唆された。

D. 考察

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) を単回心臓貼付投与し、投与 4 週間後 (ペーシング 8 週後) に心機能 (LVEF) を評価した。その結果、最小有効投与量は 0.3mg/kg であった。また、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。

別途、我々は、ミニプタ陳旧性 (OMI) 心筋梗塞モデルを用いて、梗塞 4 週後に同様の投与法にて ONO-1301MS を心臓貼付し、4 週後に心機能の評価した結果、最小有効投与量は 0.3mg/kg と、イヌ高速ペーシングモデルでの有効量とほぼ同等であった。

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 ; 虚血性心筋症を対象とした P- / a 試験、及び治験 2 ; 拡張型心筋症を対象とした P- a 試験実施に関する、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、IRB を経て、治験届を PMDA に提出している。2015 年 3Q より医師主導治験開始予定である。

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、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。

ONO-1301 は当初経口抗血栓剤 (血小板凝集抑制剤) として開発されたが、副作用 (下痢

等)と有効性との乖離が少ないとのことで、開発が中止された。しかし、今回の自然発症拡張型心筋症(J2N-k)ハムスターモデル及び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は、血小板凝集抑制作用の投与量以下で有効性を示しているため、副作用と有効性の乖離は十分であると思われた。

DCM 臨床試験には、6ヶ月以上の長期投与毒性試験が必要であるため、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)の実施を計画中である。

また、ONO-1301の疾患局所に集積する新しいDDS製剤としてONO-1301NSを作製し、重症心不全に対する間歇静脈内投与での効果を検討した結果、疾患局所にONO-1301が集積(DDS)されることにより、全身投与(経口投与)に比しより少量投与で有効性を発揮する可能性が示唆された。安全性、経済性、汎用性、利便性に勝っているONO-1301NS製剤の開発はDDS製剤として有用であることが示唆された。

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、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、心臓移植への待機的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討を行う。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。

一方、ONO-1301NSの開発は疾患特異的(DDS)である分、副作用との乖離が可能となり、汎用性、経済性、安全性に優れた再生創薬としての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 D01

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 (American Heart Association)

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