

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年度～26年度)

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

表題； 1) イヌ高速ペーシング(拡張型心筋症)モデルにおけるYS-1402/ONO-1301MS製剤の単回心臓貼付投与での薬効薬理試験(最小有効投与量設定試験)、  
及び2) 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；

1) イヌ高速ペーシング拡張型心筋症モデルを用い、YS-1402/ONO-1301MSの単回心臓貼付投与による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、最小有効投与量を設定した。

本試験で作製したイヌ高速ペーシング拡張型心筋症モデルにおいて、ペーシング惹起(220～236 beats/min)4～8週後に心エコー検査により左室リモデリング(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)が観察された。さらに心拡大(心臓重量体重比の増加)、肺うっ血・肺水腫(肺臓重量体重比の増加)、肝臓腫大(肝臓重量体重比の増加)及び腹水貯留が認められ、重度の心不全状態を呈していた。

高速ペーシング4週後に心エコー検査により群分けを行い、ONO-1301MSを心臓貼付投与し、投与2週及び4週(ペーシング8週；解剖)に心機能(心エコー)評価した。その結果、ONO-1301MS投与群(3、1、0.3及び0.1 mg/kg)では、心不全時の左室収縮機能不全に対して0.3 mg/kgの投与用量より有意なLVEF改善効果が認められた。一方血中濃度においては、最小有効投与量である0.3mg/kg貼付における貼付3時間後でのCmaxは2.2ng/mLであり用量相関的に持続的なONO-1301血中濃度維持が確認された。本Cmax値は、ONO-1301経口投与における第1相試験での無影響量であるCmax；15.6ng/mLより低値であった。

以上の結果、ONO-1301MS心臓貼付投与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) 同様に、イヌ高速ペーシング拡張型心筋症モデルを用い、ONO-1301(3mg/kg/2回/日)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。

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

1) 重症拡張型心筋症患者へ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 (徐放性マイクロスフェア) 製剤を心臓貼付投与することを目的とした治療法の開発を検討する。即ち、イヌ高速ペーシング拡張型心筋症モデルを用い、YS-1402/ONO-1301MS の単回心臓貼付投与による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、最小有効投与量を設定することを目的とする。

また、2) 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、同様にイヌ高速ペーシング拡張型心筋症モデルを用いて、長期投与 (6ヶ月) における 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

・YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与試験；

### 1. 試験材料及び方法

#### 1.1 被験物質 (小野薬品より入手)

名称：YS-1402/ONO-1301MS (ONO-AP-500-04)  
Lot No. : Lot No.121009-1 (リリース期間；4週間)  
性状：微粉末 (平均粒子径；38.7  $\mu$ m、ONO-1301含有率；18%)

#### 1.2 その他試薬 (投与資材)

1) 名称：ゼルフォーム (No.12、20  $\times$  60  $\times$  7 mm) (ファイザー (株) より入手)

Lot No. : EU465A  
性状：白色、多孔性のゼラチン無菌製剤

2) 名称：ペリプラス P コンビセット組織接着用 (3 mL) (CSL ベーリング (株) より入手)

Lot No. : 609150A  
構成：フィブリン末、アプロチニン液、トロンビン末、塩化カルシウム液

#### 1.3 媒体

名称：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

試薬：  
D-マンニトール  
(Lot No. PDJ0007、和光純薬工業(株))

ポリソルベート 80 (Lot No. 205359C、

日油(株))

性状：白色の結晶性粉末、液体

### 1.4 被験液の調製

名称：YS-1402/ONO-1301MS  
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  
調製方法：YS-1402/ONO-1301MS は所定投与量を媒体 0.5 mL に懸濁させ、ボルテックス処理により十分に攪拌させた。  
使用期限：用時調製とし、調製後 (水添加後) 9 分以内にゼルフォーム上に添加浸透後、心臓に貼付投与した。

## 2. 試験系

### 2.1 使用動物

種：イヌ  
系統：ビーグル  
微生物学的グレード：コンベンショナル  
性別：雄性  
実験開始時の月齢：8~19 箇月齢 (ペースメーカー埋め込み時)  
実験開始時の体重範囲：10.05~13.80 kg (ペースメーカー埋め込み時)  
供給源：北山ラベス株式会社

### 2.2 投与

#### 2.2.1 投与群

[ ONO-1301 としての投与量 ]

群	被験物質	投与量	動物数
1	Sham	Sham Ope	5
2	Control	媒体 (心臓貼付投与)	6
3	ONO-1301MS	3mg/kg (心臓貼付投与)	4
4	ONO-1301MS	1mg/kg (心臓貼付投与)	4
5	ONO-1301MS	0.3mg/kg (心臓貼付投与)	5
6	ONO-1301MS	0.1mg/kg (心臓貼付投与)	6

Sham 群については投与時、開胸手術 (約 20 分間) のみを行い閉胸した。

#### 2.2.2 投与量設定理由

ミニプタ OMI (陳旧性心筋梗塞) モデルにおける同投与方法での心臓貼付試験での最小有効投与量は 0.3 mg/kg (ONO-1301 として) であった (学会発表 1 ; 2013AHA 発表済)。また、イヌ高速ペーシング同モデルでの心筋内投与においては、1.5 mg/kg 投与 (5 箇所に分割投与の総投与量) で有効性が確認されている (論文発表 2 ; J Thorac Cardiovasc Surg2013;146:413-21)。

### 2.3 被験物質の投与

#### 2.3.1 投与経路：心臓貼付投与

2.3.2 選択理由：臨床投与経路と同じに設定した。

#### 2.3.4 添加浸透量（ゼラチンスポンジ2枚分）：

- ・0.5 mL 懸濁液（0.5 mL の媒体 × 2 回で洗浄、計 1.5 mL）
- ・ゼラチンスポンジ 1 枚分としてはそれぞれ均等に半量を添加浸透した。

#### 2.3.5 投与時期：高速ペーシング惹起 4 週後

#### 2.3.6 投与頻度：単回投与

#### 2.3.7 投与方法：

1) YS-1402/ONO-1301MS は必要量を媒体 0.5 mL に懸濁させ、2 枚の滅菌吸収性ゼラチンスポンジ（ゼルフフォーム No.12、20 × 60 × 7mm）上に添加（0.25 mL × 2 枚）した。再度媒体 0.5 mL × 2 回で洗浄し、全ての ONO-1301MS をゼラチンスポンジ上に添加浸透させた。

2) 動物を麻酔下側臥位に固定し、左胸部を開胸後、心臓を露出した。YS-1402/ONO-1301MS を浸透させたゼラチンスポンジを心臓の左冠状動脈（前下行枝、後下行枝）上及び左冠状動脈から離れた（約 4 cm）左心室上に 1 枚ずつ 2 枚貼付した。貼付後、フィブリン製剤（ベリプラス P コンピセット組織接着用：3 mL）を噴霧し、YS-1402/ONO-1301MS 含有ゼラチンスポンジを封入した。

3) Control 群についても、同様に媒体のみを同量ゼルフフォーム 2 枚に浸透させて、同様に心臓貼付を行い、閉胸した。

#### 2.3.8 観察期間：高速ペーシング惹起 8 週間（投与後 4 週間）

### 3. 試験方法

#### 3.1 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レーンリード（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) ペースメーカー作動状態の確認（ペースメーカー作動開始前）

術後 2 日目（ペースメーカー作動日）に、イヌを固定し、心電図用アンプを介して正常心電図（第 1 誘導）を測定した。その後ペースメーカーを作動させ、心電図用アンプを介して心電図（第 1 誘導）波

形を 1 分間記録し、ペースメーカーが正常に作動することを確認した。術後 2 日目に 220 ~ 236 beats/min でペーシングを開始した。ペースメーカー作動日を作動 1 日目とした。

3) 聴診器の検査：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。

4) 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。

#### 3.2 心エコーの測定

1) 測定ポイント：モデル作製前（Pre）、モデル作製後 4 週（群分け時）、6 週、8 週（解剖前）

2) 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（LV1Dd）及び左室収縮末期径（LV1Ds）、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 [  $EF = (LV1Dd^3 - LV1Ds^3) / LV1Dd^3$  ] 及び左室内径短縮率 [  $\%FS = (LV1Dd - LV1Ds) \times 100 / LV1Dd$  ] を算出した。

#### 3.3 採血（血液生化学検査用及び血中濃度測定用）

1) 血液生化学検査用採血ポイント：モデル作製前（Pre）、モデル作製後 4 週（群分け時）、6 週、8 週（解剖前）に EDTA・2 Na 採血を行い、血漿を凍結（-80）保存した。

2) ONO-1301 血中濃度測定用採血ポイント：心臓貼付投与後 0.5、1、3 時間、1 日後、1 週、2 週、3 週及び 4 週（解剖前）に EDTA・2 Na 採血を行い、血漿を凍結（-80）保存した。

#### 4 解剖

1) 臓器摘出：ペーシング惹起 8 週後の心エコー測定終了後、体重測定し、ペントバルビタールナトリウム過剰静脈内投与により安楽死させた。直ちに開胸して心臓、肺臓、大動脈及び開腹して肝臓、腎臓を摘出した。血液を拭った後、心臓重量、肺臓重量、肝臓重量及び腎臓重量を測定した。さらに心肥大評価のため心臓重量体重比、肺うっ血の評価のため肺臓重量体重比を算出した。また、肝臓重量体重比及び腎臓重量体重比を算出した。肺臓（右肺上葉）、肝臓（右葉）、腎臓（右腎）の一部及び大動脈は 10% 中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬させて固定した。Sham 群についても同様の解剖を行った。

2) 標本採取：心臓は臓器重量測定後、心臓切り出し（輪切り切片）から素早く（1 分以内目安）心筋の 2 箇所 [（投与部位直下壁中隔及び反対側の中隔（非投与部位））] を生検トレパン等により各 2 g 程度 × 3 個（計 6 個）採取した。なお、投与部位の採取はゼ

ルフォームが残存している場合はその直下とし、ゼルフォームが消失している場合はゼルフォーム貼付部位と考えられる直下部位とした。採取した心筋は、心外膜に付着している被験物質のコンタミの無いように、心外膜から心筋層約1mmを切除廃棄し、内心筋部表面層を採取した。心筋は素早く液体窒素にて凍結保存(-80℃)した。

採取した組織を用いて、心臓組織内 ONO-1301 濃度測定、RT-RNA 解析、及び 蛋白定量等を行う予定。

3) 病理標本：心臓は短軸方向に3分割し、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。固定標本を用いて、線維化面積、毛細血管数等を測定する予定。

## 5 統計処理方法

### 1) 体重

Sham 群(1群)と Control 群(2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。Control 群(2群)と YS-1402/ONO-1301MS 投与群間の比較には、分散性の検定で等分散であったため、Dunnett の多重比較検定を行った。

### 2) 心エコー

解析方法：実測値及び変化量(差分) < LVEF 及び %FS のみ > で表記した。

統計処理：心エコーの検査項目について、Sham 群(1群)と Control 群(2群)の比較には、F 検定を行い、等分散であったため Student の *t* 検定を行った。Control 群(2群)と YS-1402/ONO-1301MS 投与群間の比較には、分散性の検定で等分散であったため、Dunnett の多重比較検定を行った。また、モデル作製後6週(投与後2週)及び8週(投与後4週)の LVEF 及び %FS については、モデル作製後4週(群分け時)に対する変化量(差分)を算出し、Sham 群(1群)と Control 群(2群)の比較には、F 検定を行い、等分散であったため Student の *t* 検定を行った。Control 群(2群)と YS-1402/ONO-1301MS 投与群間の比較には、分散性の検定で等分散であったため、Dunnett の多重比較検定を行った。さらにモデル作製後8週(解剖時)の LVEF 比較にて、Control 群(2群)と YS-1402/ONO-1301MS 投与群間で検定を行い、投与群における最小有効投与量を検索した。

### 3) 臓器重量(臓器重量体重比)

解析方法：実測値(単位：臓器重量 g、臓器重量体重比 g/kg)で表記した。

統計処理：Sham 群(1群)と Control 群(2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。Control 群(2群)と

YS-1402/ONO-1301MS 投与群間の比較には、分散性の検定で等分散であったため、Dunnett の多重比較検定を行った。いずれの場合も、平均値±標準偏差(S.D.)で表記し、計算は表計算ソフト Excel 2010 SP1(Microsoft)を使用した。群間の有意差検定には SAS9.2 for Microsoft Windows Workstation 32-bit(SAS Institute Inc.)及びその連動システム(EXSUS Ver. 7.7.1、(株)CAC エクシケア)を使用した。検定の有意水準として危険率5%(両側)を採用した。

・ 早期治療介入による経口投与試験；

1) 同様に、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(3mg/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。

2) ペースメーカー作動状態の確認として、心電図(第誘導)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。

3) 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。

4) 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箇月)、2箇月、3箇月、4箇月、5箇月、6箇月(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)Pre 時(モデル作製前):各投与群(1群~6群) EF は  $75 \pm 9\% \sim 78 \pm 8\%$  を示した。

(2)群分け時 0W(モデル作製後 4 週); Sham 群(1群) で  $76 \pm 6\%$ 、Control 群(2群)で  $45 \pm 6\%$  であり、Control 群(2群)での病態の進行に伴い EF の有意な低下 ( $P < 0.01$  vs. Sham 群、1群)に比べて 41%の低下)が観察された。いずれの被験物質投与群(3群~6群)においても EF は  $43 \pm 3\% \sim 46 \pm 6\%$  を示し、Control 群(2群)と比較して群間に差は認められなかった。

(3)投与後 2 週(モデル作製後 6 週): Sham 群(1群) で  $77 \pm 5\%$  を示したのに対し、Control 群(2群)では  $40 \pm 4\%$  (変化量  $-5 \pm 4\%$ ) であり、Control 群(2群)での病態の進行に伴い EF の有意な低下(実測値:  $P < 0.01$  vs. Sham 群、1群)に比べて 48%の低下/変化量:  $P < 0.05$  vs. Sham 群)が観察された。YS-1402/ONO-1301MS の 3 mg/kg 投与群(3群)の EF は  $49 \pm 4\%$  (変化量  $3 \pm 3\%$ ) を示し、Control 群(2群)と比較して EF に有意な増加(実測値:  $P < 0.05$  vs. Control 群、2群)に比べて 23%の増加/変化量:  $P < 0.05$  vs. Control 群)が認められた。なお、その他の被験物質投与群(4群~6群)において EF は  $41 \pm 8\% \sim 45 \pm 4\%$  を示し、Control 群(2群)と比較して有意な差は認められなかった (Fig2-2)。

(4)投与後 4 週(モデル作製後 8 週): Sham 群(1群) で  $78 \pm 5\%$  を示したのに対し、Control 群(2群)では  $35 \pm 5\%$  (変化量  $-9 \pm 4\%$ ) であり、Control 群(2群)での病態の進行に伴い EF の有意な低下(実測値:  $P < 0.01$  vs. Sham 群、1群)に比べて 55%の低下/変化量:  $P < 0.01$  vs. Sham 群)が観察された。YS-1402/ONO-1301MS の 3 mg/kg 投与群(3群)の EF は  $48 \pm 3\%$  (変化量  $0 \pm 6\%$ ) を示し、Control 群(2群)と比較して EF に有意な増加(実測値:  $P < 0.01$  vs. Control 群、2群)に比べて 37%の増加/変化量:  $P < 0.05$  vs. Control 群)が認められた。また、YS-1402/ONO-1301MS の 1 mg/kg 投与群(4群)の EF は  $42 \pm 3\%$  (変化量  $-1 \pm 3\%$ ) を示し、Control 群(2群)と比較して EF に有意な増加(実測値: 有意ではないものの 2群)に比べて 20%の増加/変化量:  $P < 0.05$  vs. Control 群)が認められた。さらに低用量である YS-1402/ONO-1301MS の 0.3 mg/kg 投与群(5群)においても、EF は  $42 \pm 3\%$  (変化量  $-2 \pm 3\%$ ) を示し、Control 群(2群)と比較して EF に有意な増加(実測値: 有意ではないものの 2群)に比べて 20%の増加/変化量:  $P < 0.05$  vs. Control 群)が認められた。一方、YS-1402/ONO-1301MS の 0.1 mg/kg 投与群(6群)の EF は  $37 \pm 7\%$  (変化量  $-8 \pm 4\%$ ) を示し、Control 群(2群)と比較して群間に差は認められなかった (Fig2-2)。

一方、投与後 4 週(解剖前)の EF 変化においては用量相関性が認められ、最小有効投与量は変化量(差

分)で有意差が認められた 0.3 mg/kg 投与群(5群)であった (Fig2-3)。

## 2) %FS

投与後 2 週(モデル作製後 6 週)及び投与後 4 週(モデル作製後 8 週)の %FS については、実測値とそれぞれ群分け時(モデル作製後 4 週)に対する変化量(差分)を示した。

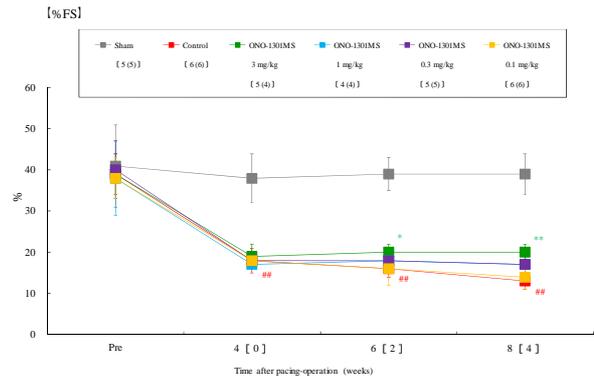


Fig. 3-1 Effects of ONO-1301MS on fractional shortening (% FS) in dogs with pacing-induced heart failure (56 days after the pacing)  
[ ] : time after drug administration (weeks)  
Sham: open chest during 20 min  
Control: 0.2 w/v% polysorbate-80 + 5 w/v% mannitol  
Each column represents the mean  $\pm$  S.D.  
##: significant difference from sham  $P < 0.01$  (Student's *t*-test).  
\* and \*\*: significant difference from control  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively (vs. ONO-1301MS, Dunnett's test).

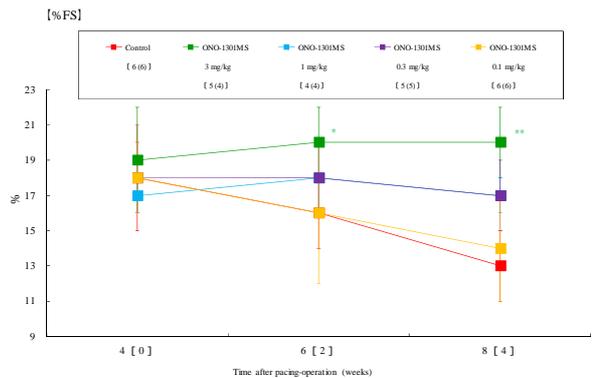


Fig. 3-2 Effects of ONO-1301MS on fractional shortening (% FS) in dogs with pacing-induced heart failure (56 days after the pacing)  
[ ] : time after drug administration (weeks)  
Control: 0.2 w/v% polysorbate-80 + 5 w/v% mannitol  
Each column represents the mean  $\pm$  S.D.  
\* and \*\*: significant difference from control  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively (vs. ONO-1301MS, Dunnett's test).

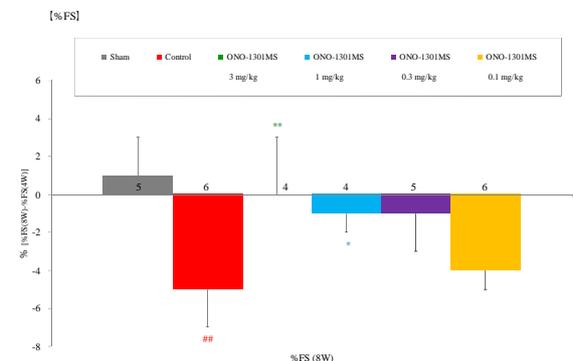


Fig. 3-3 Effects of ONO-1301MS on fractional shortening (% FS) in dogs with pacing-induced heart failure (56 days after the pacing)  
Sham: open chest during 20 min  
Control: 0.2 w/v% polysorbate-80 + 5 w/v% mannitol  
Each column represents the mean  $\pm$  S.D.  
##: significant difference from sham  $P < 0.01$  (Student's *t*-test).  
\* and \*\*: significant difference from control  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively (vs. ONO-1301MS, Dunnett's test).

(1)Pre 時(モデル作製前):各投与群(1群~6群) %FS は  $38 \pm 9\% \sim 41 \pm 10\%$  を示した。

(2)群分け時0W(モデル作製後4週):Sham 群(1群) で  $38 \pm 6\%$ 、Control 群(2群)で  $18 \pm 3\%$  であり、Control 群(2群)での病態の進行に伴い %FS の有意な低下 ( $P < 0.01$  vs. Sham 群、1群に比べて 53%の低下) が観察された。いずれの被験物質投与群(3群~6群)においても %FS は  $17 \pm 1\% \sim 19 \pm 3\%$  を示し、Control 群(2群)と比較して群間に差は認められなかった。

### (3)投与後2週(モデル作製後6週)

Sham 群(1群)で  $39 \pm 4\%$  を示したのに対し、Control 群(2群)では  $16 \pm 2\%$  (変化量  $-2 \pm 2\%$ ) であり、Control 群(2群)での病態の進行に伴い %FS の有意な低下 (実測値:  $P < 0.01$  vs. Sham 群、1群に比べて 59%の低下 / 変化量:  $P < 0.05$  vs. Sham 群) が観察された。YS-1402/ONO-1301MS の 3 mg/kg 投与群(3群)の %FS は  $20 \pm 1\%$  (変化量  $1 \pm 1\%$ ) を示し、Control 群(2群)と比較して %FS に有意な増加 (実測値:  $P < 0.05$  vs. Control 群、2群に比べて 25%の増加 / 変化量:  $P < 0.05$  vs. Control 群) が認められた。また、YS-1402/ONO-1301MS の 1 mg/kg 投与群(4群)の %FS は  $18 \pm 2\%$  (変化量  $1 \pm 1\%$ ) を示し、Control 群(2群)と比較して %FS に有意な増加 (実測値: 有意ではないものの 2群に比べて 13%の増加 / 変化量:  $P < 0.05$  vs. Control 群) が認められた。さらに低用量である YS-1402/ONO-1301MS の 0.3 mg/kg 投与群(5群)においても、%FS は  $18 \pm 2\%$  (変化量  $0 \pm 2\%$ ) を示し、Control 群(2群)と比較して %FS に有意な増加 (実測値: 有意ではないものの 2群に比べて 13%の増加 / 変化量:  $P < 0.05$  vs. Control 群) が認められた。一方、YS-1402/ONO-1301MS の 0.1 mg/kg 投与群(6群)の %FS は  $16 \pm 4\%$  (変化量  $-2 \pm 2\%$ ) を示し、Control 群(2群)と比較して群間に差は認められなかった (Fig3-2)。

(4)投与後4週(モデル作製後8週):Sham 群(1群) で  $39 \pm 5\%$  を示したのに対し、Control 群(2群)では  $13 \pm 2\%$  (変化量  $-5 \pm 2\%$ ) であり、Control 群(2群)での病態の進行に伴い %FS の有意な低下 (実測値:  $P < 0.01$  vs. Sham 群、1群に比べて 67%の低下 / 変化量:  $P < 0.01$  vs. Sham 群) が観察された。YS-1402/ONO-1301MS の 3 mg/kg 投与群(3群)の %FS は  $20 \pm 2\%$  (変化量  $0 \pm 3\%$ ) を示し、Control 群(2群)と比較して %FS に有意な増加 (実測値:  $P < 0.01$  vs. Control 群、2群に比べて 54%の増加 / 変化量:  $P < 0.01$  vs. Control 群) が認められた。また、YS-1402/ONO-1301MS の 1 mg/kg 投与群(4群)の %FS は  $17 \pm 1\%$  (変化量  $-1 \pm 1\%$ ) を示し、Control 群(2群)と比較して %FS に有意な増加 (実測値: 有意ではないものの 2群に比べて 31%の増加 / 変化量:  $P < 0.05$

vs. Control 群) が認められた。一方、YS-1402/ONO-1301MS の 0.3 mg/kg 投与群(5群)及び 0.1 mg/kg 投与群(6群)の %FS はそれぞれ  $17 \pm 2\%$  (変化量  $-1 \pm 2\%$ ) 及び  $14 \pm 3\%$  (変化量  $-4 \pm 1\%$ ) を示し、Control 群(2群)と比較して群間に差は認められなかった (Fig3-2)。

一方、投与後4週(解剖前)の %FS 変化においては用量相関性が認められ、最小有効投与量は変化量(差分)で有意差が認められた 1 mg/kg 投与(4群)であった (Fig3-3)。

### 3)臓器重量体重比

心臓重量体重比 (HW/BW) は Sham 群(1群)で  $8.3 \pm 0.5$  g/kg、Control 群(2群)で  $10.9 \pm 1.0$  g/kg であり、Control 群(2群)での病態に伴う心臓重量体重比の有意な増加 ( $P < 0.01$  vs. Sham 群、1群に比べて 31%の増加) が観察された。被験物質の各投与群(3群~6群)において心臓重量体重比は  $10.0 \pm 0.6$  g/kg ~  $11.1 \pm 0.6$  g/kg を示し、Control 群(2群)と比較して有意な差は認められなかった。肺臓重量体重比 (LUW/BW) は Sham 群(1群)で  $9.5 \pm 0.7$  g/kg、Control 群(2群)で  $16.0 \pm 5.3$  g/kg であり、Control 群(2群)での病態に伴う肺臓重量体重比の有意な増加 ( $P < 0.05$  vs. Sham 群、1群に比べて 68%の増加) が観察された。被験物質の各投与群(3群~6群)において肺臓重量体重比は  $11.4 \pm 1.3$  g/kg ~  $15.5 \pm 2.9$  g/kg を示し、Control 群(2群)と比較して有意な差は認められなかった。肝臓重量体重比 (LW/BW) は Sham 群(1群)で  $24.7 \pm 2.0$  g/kg、Control 群(2群)で  $37.2 \pm 7.2$  g/kg であり、Control 群(2群)での病態に伴う肝臓重量体重比の有意な増加 ( $P < 0.01$  vs. Sham 群、1群に比べて 51%の増加) が観察された。被験物質の各投与群(3群~6群)において肝臓重量体重比は  $34.7 \pm 9.5$  g/kg ~  $39.5 \pm 8.5$  g/kg を示し、Control 群(2群)と比較して有意な差は認められなかった。

一方、腎臓重量体重比 (KW/BW) においては Sham 群(1群)で  $4.6 \pm 0.2$  g/kg、Control 群(2群)で  $4.6 \pm 0.6$  g/kg であり、Control 群(2群)での病態に伴う腎臓重量体重比に変化は認められなかった。被験物質の各投与群(3群~6群)において腎臓重量体重比は  $4.3 \pm 0.6$  g/kg ~  $4.9 \pm 0.2$  g/kg を示し、Control 群(2群)と比較してほぼ同様の重量比であった。

### 4)血中濃度測定

血中濃度変化を Fig 4 に示した。

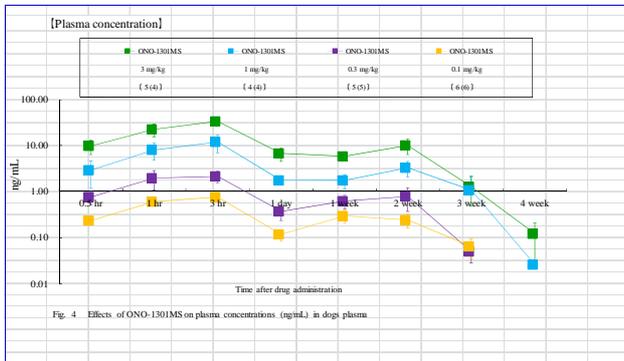


Fig. 4 Effects of ONO-1301MS on plasma concentrations (ng/mL) in dogs plasma

ONO-1301MS 剤の単回心臓貼付において、3 ~ 4 週間まで用量相関的に持続的な血中動態を示した。3mg/kg 貼付における貼付 3 時間後での Cmax は 33.4ng / mL であり、最小有効投与量である 0.3mg/kg 貼付における Cmax は 2.2ng / mL であった。

尚、ONO-1301 経口投与における P- 試験にて、副作用発現 ( 4 mg ) 量での Cmax は 108.4ng/ml であり、無毒性量 ( 2 mg ) での Cmax は、23.7ng/mL、無影響量 ( 1 mg ) での Cmax は、15.6ng/ml であった。

これらの結果から、イヌ高速ペーシングモデルにおける心臓貼付投与での有効投与量である 0.3mg/kg ~ 1mg/kg は、P- 経口投与における Cmax の無毒性量以下の血中濃度であることが確認された。

・ 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 ( 3mg/kg x 2 回 / 日 ) 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 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 )。ONO-1301 反復経口投与群は、Kaplan-Meier 曲線で 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)

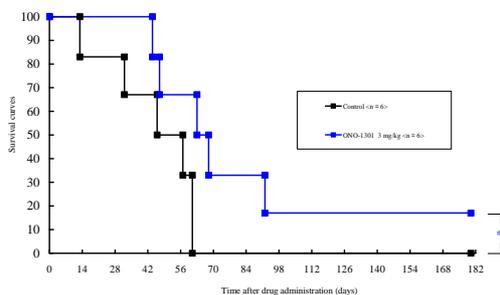


Fig. 1-2 Effects of ONO-1301 on survival curves in dogs with pacing-induced heart failure  
Control: non-administration  
ONO-1301: oral administration (twice a day for 26 weeks)  
A significant difference (\*\* P<0.05) between control and ONO-1301 3 mg/kg (Log rank test).

### 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)

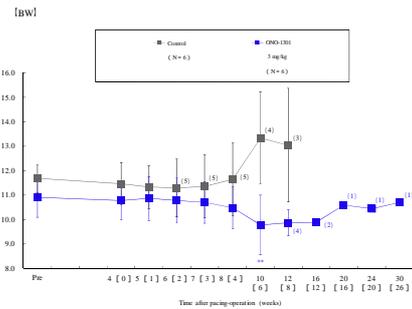


Fig. 2-2 Effects of ONO-1301 on body weight (BW) in dogs with pacing-induced heart failure (10 weeks after the pacing)  
Pre: before pacing-operation  
1: 1 week after drug administration (weeks)  
Control: non-administration  
ONO-1301: oral administration (twice a day for 26 weeks)  
Each value represents the mean ± S.D.  
Each figure in parentheses represents the number of animals.  
\*\* significant difference from control P<0.05 (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 の低下が認められた。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値:Control vs. ONO-1301)

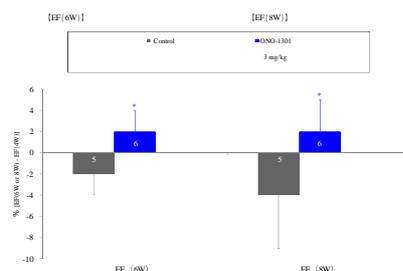


Fig. 3-5 Effects of ONO-1301 on ejection fraction (EF) in dogs with pacing-induced heart failure (10 weeks after the pacing)  
Control: non-administration  
ONO-1301: oral administration (twice a day for 26 weeks)  
Each value represents the mean ± S.D.  
Each figure in parentheses represents the number of animals.  
\*\* 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、心エコー測定における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 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、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

・YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与試験；

本試験では、イヌに高速心臓ペースング(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 週後)におけるYS-1402/ONO-1301MSの単回心臓貼付投与による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)において心エコー検査では、ペースング 4 週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、心臓形態に関して球状を呈した。さらに機能面では左室収縮機能の低下(EF 及び%FS の低下)が観察された。剖検により腹水・胸水の貯留、心拡大、肺うっ血・肺水腫、肝臓腫大(暗褐色)、脾臓の委縮及び気管内に泡沫状の流出所見が散見された。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、ペースング惹起 4 週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 8 週間に亘る長期のペース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、ONO-1301MS 投与群(3、1、0.3 及び 0.1 mg/kg)における左室収縮機能(LVEF)の変化量に対しては、0.3 mg/kg の投与用量より有意な改善効果が認められた。

一方血中濃度においては、最小有効投与量である 0.3mg/kg 貼付における貼付 3 時間後での Cmax は 2.2ng/mL であった。本 Cmax 値は、ONO-1301 経口投与における第 1 相試験での無影響量である Cmax；15.6ng/mL より低値であった。

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 であり、本投与量における血中濃度測定結果から、ヒトでの安全量であることが示唆された。

・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ングモデルを用いて、拡張型心筋症発症(高速ペースング 4 週後)後から、6 ヶ月間 ONO-1301 を 3mg/kg × 2 回/日にて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。

尚、イヌ 3 ヶ月反復経口投与毒性試験での無毒性量は 3mg/kg である。

#### E . 結論

重症拡張型心筋症患者へ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(徐放性マイクロスフェア)製剤を心臓貼付投与することを目的とした治療法の開発を検討した。イヌ高速ペースングモデルを用いて、ペースング 4 週間後に開胸し、YS-1402/ONO-1301MS(4 週間徐放性製剤)を 0.1mg/kg~3 mg/kg にて単回心臓貼付投与した。投与 4 週間後(ペースング 8 週後)に心機能(LVEF 等)評価した結果、最小有効投与量は 0.3mg/kg であった。

本最小有効投与量は、別途同様の投与方法で実施したミニプタ陳旧性(OMI)心筋梗塞モデルにおける最小有効投与量と同じであった。

また、ONO-1301 の 3mg/kg × 2 回/日、反復経口投与群はイヌ高速ペース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 SawaHeart 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 の心臓局所投与方法の開発・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

2. 実用新案登録

3. その他

該当なし