

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)

**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**

総合研究報告書 平成 25 年度～26 年度

研究代表者 宮川 繁

平成 27 (2015) 年 5 月

目次

総合研究報告

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

宮川 繁----- 1

分担研究報告

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)

福嶋 五月、宮川 繁、大門 貴志-----10

2) 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)

今西 悠基子、宮川 繁、大門 貴志-----20

3) 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
ラット 13 週間皮下投与毒性試験
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

齋藤 充弘、宮川 繁、大門 貴志-----28

研究成果の刊行に関する一覧表(別紙4)-----36

研究成果の別刷

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) A₂ 合成酵素阻害作用を併せ持つ、選択的プロスタグランジン (PG) I₂ 受容体 (IP) 作動薬 (Fig 1) として見出され、小野薬品により経口抗血栓剤として臨床試験が実施されたが、副作用 (下痢等) と有効性の乖離が少ないことにより開発が中止されていた。我々は、ONO-1301 の新しい薬理作用として、低用量で線維芽細胞等に作用して各種体内再生因子 (HGF、VEGF、SDF-1、HMGB1 等) を産生誘導することを発見し、新しい適応症を見出した。また、ONO-1301 を生体分解性ポリマーに内封した 4 週間徐放性マイクロスフェア製剤 (YS-1402/ONO-1301MS) を DDS 製剤として新しく開発した (ドラッグリポジショニング)。

本研究は、各種の ONO-1301 製剤の拡張型心筋症 (DCM) への薬効と安全性の確認から、次世代の再生創薬として、体内誘導型再生医療剤の開発を目指す。

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 3 Q 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 1 mg/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。

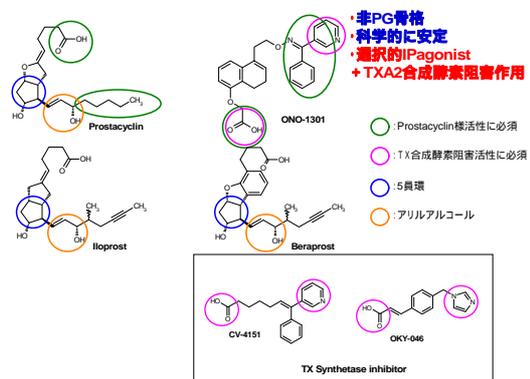


Fig 1 : ONO-1301 の構造的特徴

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）。

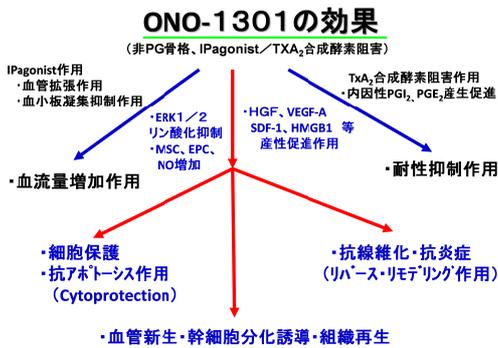


Fig 2 : ONO-1301 の期待される効果

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)。

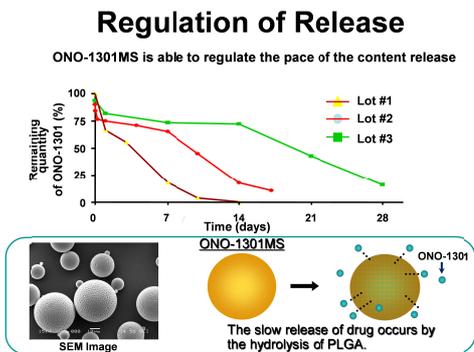


Fig 3 : ONO-1301 の徐放性製剤 (ONO-1301MS)

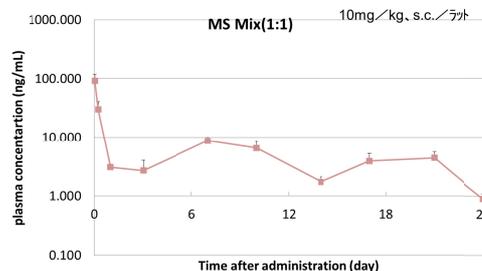


Fig4: ラット皮下に ONO-1301MS 投与における血中動態

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)。

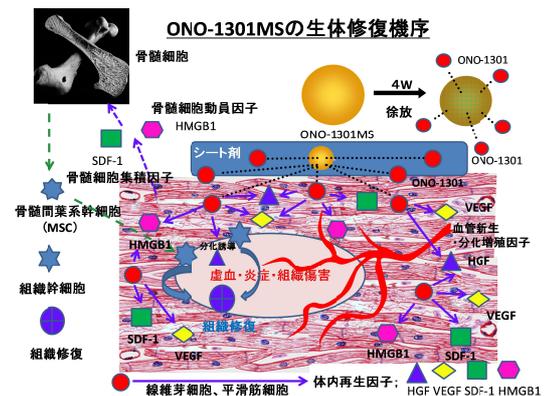


Fig 5 : ONO-1301MS の生体修復機序

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

た治療法を開発を検討した(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:

226~240 beats/min)を行うことにより誘発させた重症拡張型心筋症モデルを用い、高速ペーシング4週間から26週間の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(226~240 beats/min)4週後の心エコー検査により、Control群では左室リモデリング(左室内腔の拡大及び壁厚の減少)、左室収縮機能不全(駆出率及び短縮率の減少)が観察され、投与後13日目に死亡動物が出現し、投与後61日(モデル作製後13週)では全例死亡した(生存数:0/6例)。また、瀕死動物及び死亡動物の剖検時、心拡大、肺うっ血・肺水腫、肝臓腫大及び滲出液(心のう水・胸水・腹水)の貯留が認められ、重度の心不全状態を呈していた。

ONO-1301の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 はプロスタグランジン (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

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 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。

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 μ 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撪拌させた。
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

ミニブタ 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（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。

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。

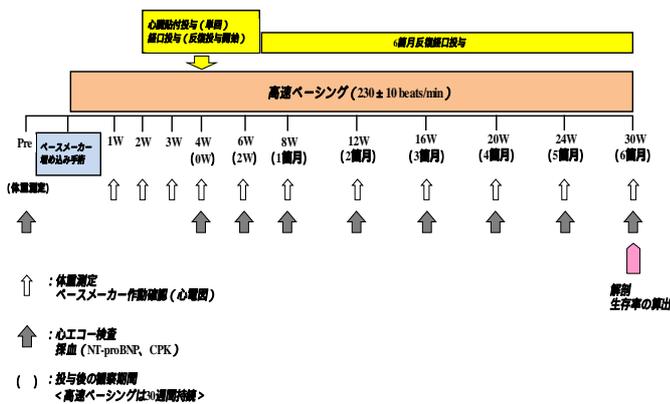
2) ペースメーカー作動状態の確認として、心電図(第誘導)検査として、病態作製期間(4週間)は、週に1回の頻度で測定した。なお、被験物質投与後は心エコー測定時に実施した。また、聴診器の検査を実施した。即ち、毎日、10秒間の拍動数を測定した。聴診器の検査で異常があった場合は、心電図を測定し、ペーシングエラーの有無を確認した。

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。

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

・YS-1402/ONO-1301MS 心臓貼付投与と試験；

1) 観察：いずれの投与群においてもモデル作製後8週まで瀕死状態にまで陥る個体は認められなかった。解剖時には腹水・胸水の貯留、心のう水の貯留、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の所見を示す個体が観察された。

2) 体重の推移：結果を Fig. 1 に示した。

体重は、いずれの投与群においても著明な変動は認められなかった。

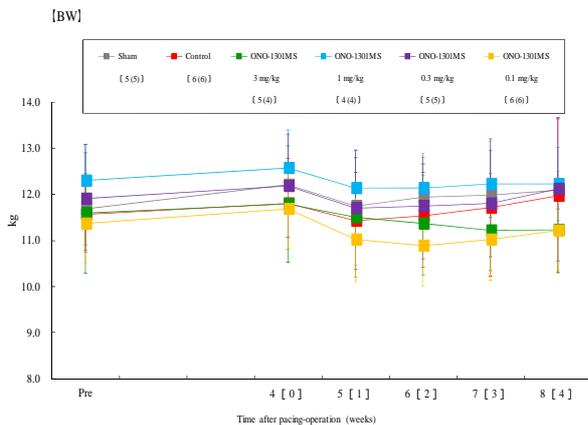


Fig. 1 Effects of ONO-1301MS on body weight (BW) in dogs with pacing-induced heart failure (56 days after the pacing)
[] : time after drug administration (weeks)
Sham: open chest during 20 min
Control: 0.2 w/v% polyorbate-80 + 5 w/v% mannitol
Each column represents the mean ± S.D.
No significant difference from sham (Student's t-test or Aspin-Welch's t-test).
No significant difference from control (vs. ONO-1301MS, Dunnett's test).

2) 心エコー

代表的な心エコー測定結果として、LVEFはFig.2-1~2-3に、%FSは、Fig.3-1~3-3に示した。

1) LVEF (EF)；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EF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。

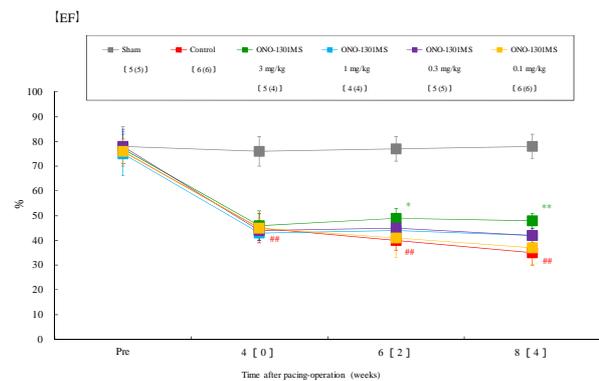


Fig. 2-1 Effects of ONO-1301MS on ejection fraction (EF) in dogs with pacing-induced heart failure (56 days after the pacing)
[] : time after drug administration (weeks)
Sham: open chest during 20 min
Control: 0.2 w/v% polyorbate-80 + 5 w/v% mannitol
Each column represents the mean ± S.D.
#: significant 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).

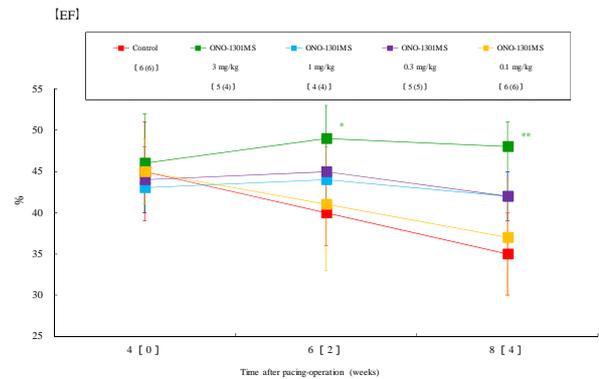


Fig. 2-2 Effects of ONO-1301MS on ejection fraction (EF) in dogs with pacing-induced heart failure (56 days after the pacing)
[] : time after drug administration (weeks)
Control: 0.2 w/v% polyorbate-80 + 5 w/v% mannitol
Each column represents the mean ± S.D.
* and **: significant difference from control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

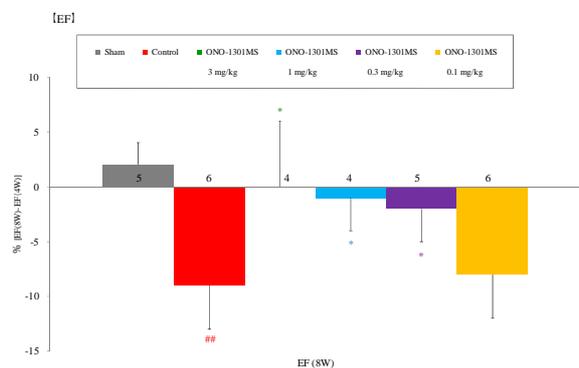


Fig. 2-3 Effects of ONO-1301MS on ejection fraction (EF) in dogs with pacing-induced heart failure (56 days after the pacing)
Sham: open chest during 20 min
Control: 0.2 w/v% polyorbate-80 + 5 w/v% mannitol
Each column represents the mean ± S.D.
#: significant difference from sham P<0.01 (Student's t-test).
*: significant difference from control P<0.05 (vs. ONO-1301MS, Dunnett's test).

(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。

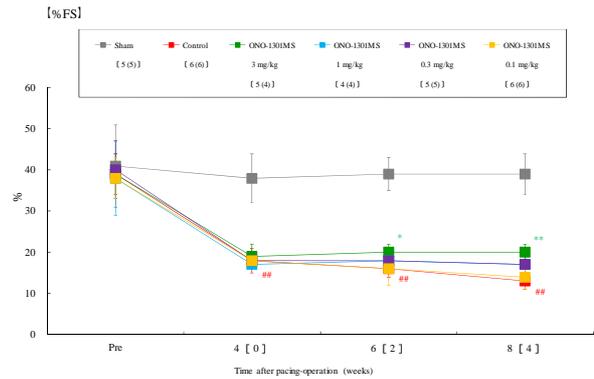


Fig. 3-1 Effects of ONO-1301MS on fractional shortening (% FS) in dogs with pacing-induced heart failure (56 days after the pacing)
[] : time after drug administration (weeks)
Sham: open chest during 20 min
Control: 0.2 w/v% polysorbate-80 + 5 w/v% mannitol
Each column represents the mean \pm S.D.
##: 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).

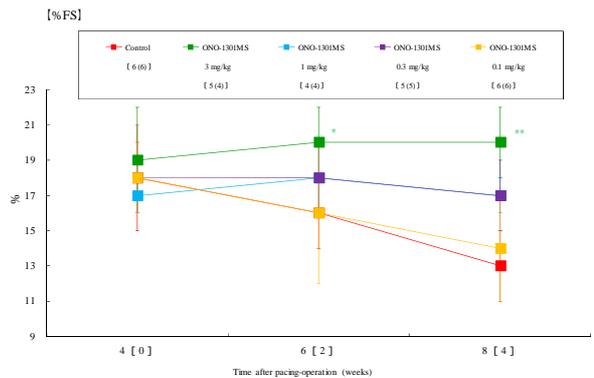


Fig. 3-2 Effects of ONO-1301MS on fractional shortening (% FS) in dogs with pacing-induced heart failure (56 days after the pacing)
[] : time after drug administration (weeks)
Control: 0.2 w/v% polysorbate-80 + 5 w/v% mannitol
Each column represents the mean \pm S.D.
* and **: significant difference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

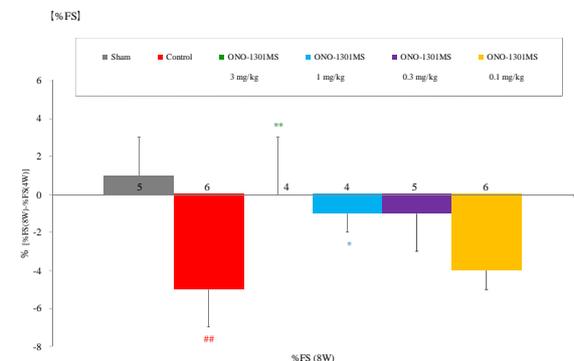


Fig. 3-3 Effects of ONO-1301MS on fractional shortening (% FS) in dogs with pacing-induced heart failure (56 days after the pacing)
Sham: open chest during 20 min
Control: 0.2 w/v% polysorbate-80 + 5 w/v% mannitol
Each column represents the mean \pm S.D.
##: significant difference from sham $P < 0.01$ (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 $38 \pm 9\%$ ~ $41 \pm 10\%$ 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 $17 \pm 1\%$ ~ $19 \pm 3\%$ 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 $8.3 \pm 0.5 \text{ g/kg}$ 、Control 群(2群)で $10.9 \pm 1.0 \text{ g/kg}$ 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 $10.0 \pm 0.6 \text{ g/kg}$ ~ $11.1 \pm 0.6 \text{ g/kg}$ 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 $9.5 \pm 0.7 \text{ g/kg}$ 、Control 群(2群)で $16.0 \pm 5.3 \text{ g/kg}$ 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 $11.4 \pm 1.3 \text{ g/kg}$ ~ $15.5 \pm 2.9 \text{ g/kg}$ 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 $24.7 \pm 2.0 \text{ g/kg}$ 、Control 群(2群)で $37.2 \pm 7.2 \text{ g/kg}$ 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 $34.7 \pm 9.5 \text{ g/kg}$ ~ $39.5 \pm 8.5 \text{ g/kg}$ 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 $4.6 \pm 0.2 \text{ g/kg}$ 、Control 群(2群)で $4.6 \pm 0.6 \text{ g/kg}$ 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 $4.3 \pm 0.6 \text{ g/kg}$ ~ $4.9 \pm 0.2 \text{ g/kg}$ 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。

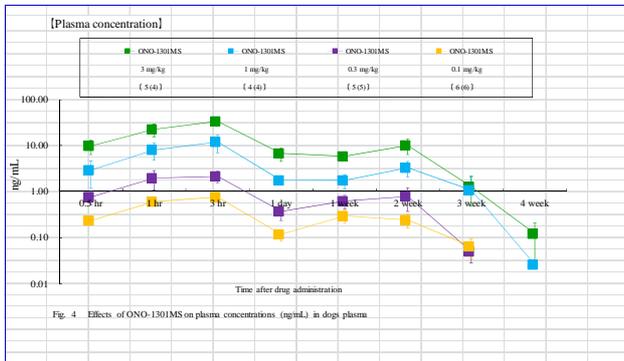


Fig. 4 Effects of ONO-1301MS on plasma concentrations (ng/mL) in dogs plasma

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)。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)

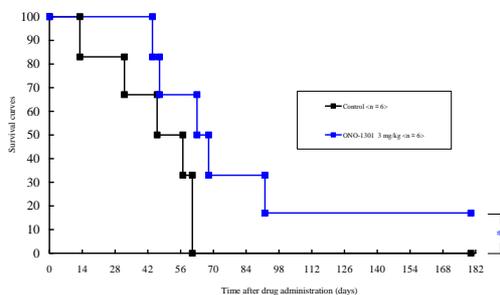


Fig. 1-2 Effects of ONO-1301 on survival curves in dogs with pacing-induced heart failure
Control: non-administration
ONO-1301: oral administration (twice a day for 26 weeks)
A significant difference (** P<0.05) between control and ONO-1301 3 mg/kg (Log rank test).

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)

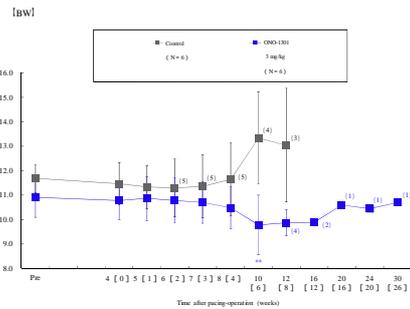


Fig. 2-2 Effects of ONO-1301 on body weight (BW) in dogs with pacing-induced heart failure (26 weeks after the pacing).
Pre: before pacing operation
1: 1 week after drug administration (weeks)
Control: non-administration
ONO-1301: oral administration (twice a day for 26 weeks)
Each value represents the 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)

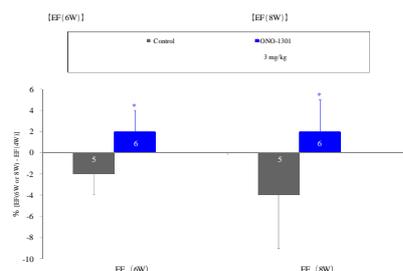


Fig. 3-5 Effects of ONO-1301 on ejection fraction (EF) in dogs with pacing-induced heart failure (26 weeks after the pacing).
Control: non-administration
ONO-1301: oral administration (twice a day for 26 weeks)
Each value represents the mean ± S.D.
** significant difference from control P<0.05 (Student's 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

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 1 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(LVAWd=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) × 100/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)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)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)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)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

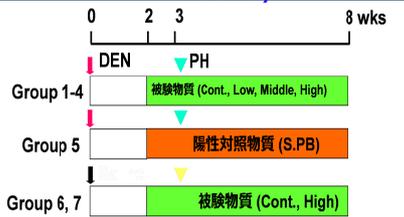
SAS9.1.3 (EXSUS Version 7.7.1), SAS Institute Japan 株式会社(株式会社シーエーシー)を用いて行った。

・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/DuCrI CrIj 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。

肝中期発がん性試験法
Medium-term Liver Carcinogenesis Bioassay
(Ito's test) ICHガイドライン



動物 : F344 DuCrj/Crj 系統性ラット 6週齢
 被験物質 : Control, Low, Middle, High
 陽性対照物質 : Sodium Phenobarbital (S.PB), 500 ppm
 N-nitrosodiethylamine (DEN), 200 mg/kg BW, 腹腔内投与
 生理食塩液 腹腔内投与
 2/3肝部分切除術 (PH)

解析方法 : 肝臓切片をGST-P免疫染色し、画像解析装置を用いてGST-P陽性細胞巢の数及び面積を定量的に解析し、肝臓の単位面積当たりの個数及び面積を算出する。

ICH: (日本EU医薬品規制調和国際会議) 42

(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。

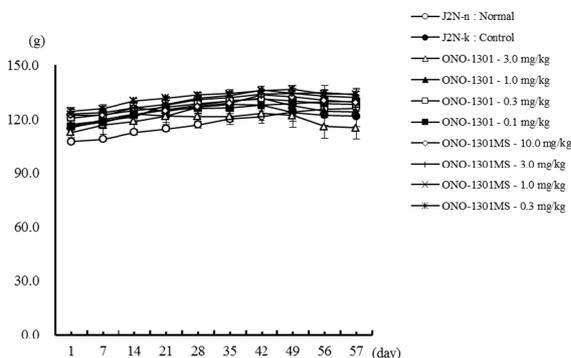


Figure 1 Effect of compound on body weight change in hamster
 Each value represents the mean ± S.E.
 No significant difference from J2N-k : Control group

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 (Fig 2、3)。

また、6週後 (Fig 4) および8週後 (Fig 5) 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。

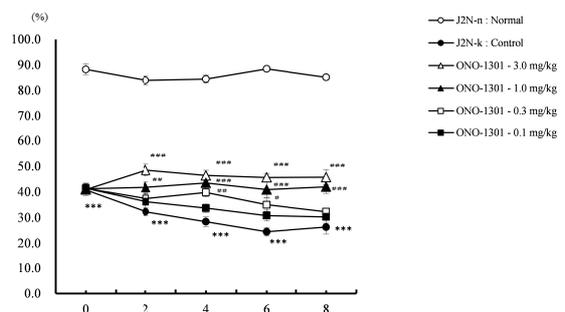


Fig 2 : 経口投与におけるLVEFの経時変化 (正常群を含む各群比較)

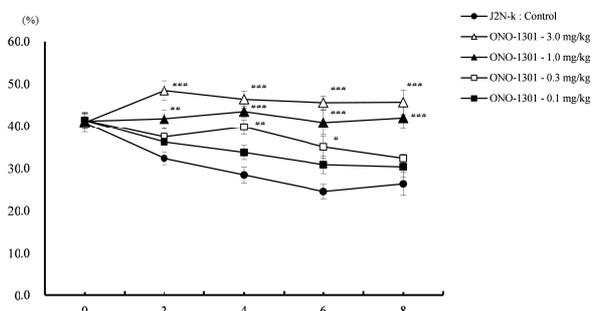


Fig 3 : 経口投与における LVEF の経時変化 (被験物質 1 投与群と対照群比較)

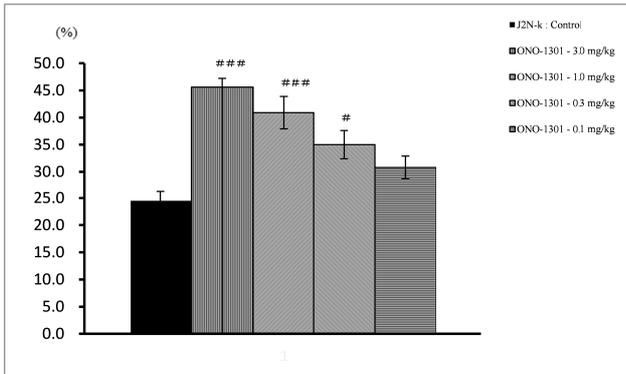


Fig 4 : 投与 6 週後における経口投与群間での LVEF 比較

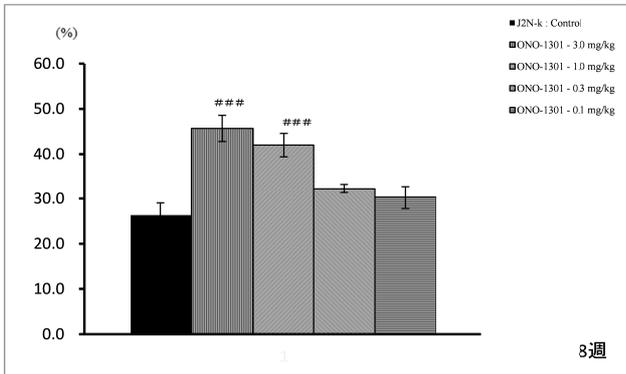


Fig 5 : 投与 8 週後における経口投与群間での LVEF 比較

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 $52.2 \pm 2.6, 46.0 \pm 2.0, 47.0 \pm 2.0, 51.9 \pm 1.2$ および $47.2 \pm 1.3\%$, 病態 Control (J2N-k) 群では $16.8 \pm 1.0, 12.3 \pm 0.6, 10.7 \pm 0.7, 9.3 \pm 0.6$ および $9.8 \pm 1.1\%$, ONO-1301-3.0mg/kg 群では $16.2 \pm 1.1, 19.9 \pm 1.2, 18.8 \pm 1.0, 18.4 \pm 0.8$ および $18.6 \pm 1.5\%$, ONO-1301-1.0mg/kg 群では $17.0 \pm 1.1, 18.7 \pm 2.3, 17.9 \pm 0.8, 16.9 \pm 1.4$ および $16.7 \pm 1.2\%$, ONO-1301-0.3mg/kg 群では $17.2 \pm 1.1, 15.3 \pm 1.1, 15.0 \pm 1.0, 13.7 \pm 1.0$ および $12.2 \pm 0.4\%$, ONO-1301-0.1mg/kg 群では $17.1 \pm 1.1, 14.0 \pm 1.2, 13.3 \pm 0.8, 12.1 \pm 0.9$ および $11.4 \pm 1.1\%$, 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.

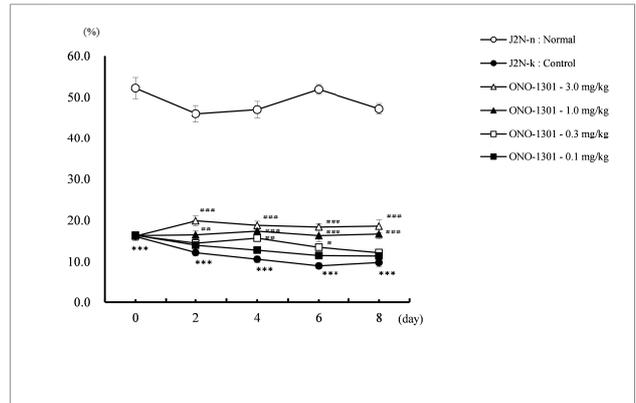


Fig 6 : 経口投与における LVFS の経時変化 (正常群を含む各群比較)

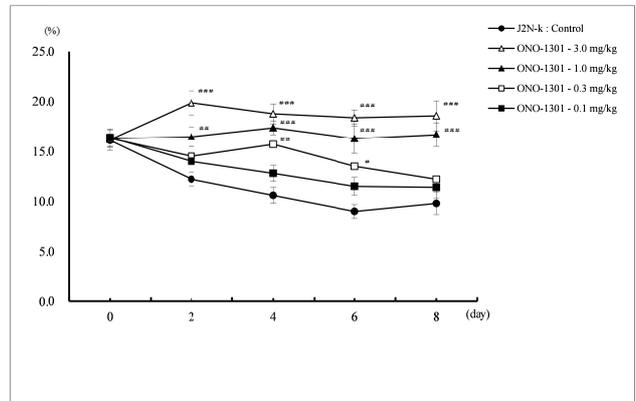


Fig 7 : 経口投与における LVFS の経時変化 (被験物質 1 投与群と対照群比較)

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 $39.1 \pm 3.5, 77.1 \pm 5.9, 61.8 \pm 6.5, 69.1 \pm 4.2$ および $81.4 \pm 3.5 \mu\text{L}$, 病態 Control (J2N-k) 群では $221.0 \pm 21.1, 231.0 \pm 21.2, 281.9 \pm 29.2, 316.5 \pm 29.7$ および $317.3 \pm 21.0 \mu\text{L}$, ONO-1301-3.0mg/kg 群では $227.5 \pm 32.2, 139.0 \pm 19.9, 182.8 \pm 17.8, 183.0 \pm 23.4$ および $233.4 \pm 37.1 \mu\text{L}$, ONO-1301-1.0mg/kg 群では $162.9 \pm 15.2, 166.7 \pm 21.7, 154.9 \pm 22.0, 235.7 \pm 26.6$ および $223.5 \pm 43.9 \mu\text{L}$, ONO-1301-0.3mg/kg 群では $205.4 \pm 27.0, 179.4 \pm 22.3, 199.1 \pm 14.1, 242.1 \pm 24.6$ および $285.4 \pm 21.6 \mu\text{L}$, ONO-1301-0.1mg/kg 群では $175.6 \pm 18.4, 191.9 \pm 23.3, 199.0 \pm 20.3, 277.4 \pm 22.5$ および $301.0 \pm 30.3\%$ 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 ± 1.6 , 12.6 ± 1.8 , 10.3 ± 2.3 , 8.0 ± 0.8 および 12.0 ± 0.8 μL , 病態 Control (J2N-k) 群では 128.0 ± 12.8 , 157.0 ± 16.4 , 201.3 ± 22.9 , 237.3 ± 24.7 および 236.0 ± 22.6 μL , ONO-1301-3.0mg/kg 群では 136.8 ± 23.8 , 73.5 ± 13.1 , 98.5 ± 11.6 , 100.5 ± 14.5 および 129.0 ± 24.8 μL , ONO-1301-1.0mg/kg 群では 93.0 ± 9.4 , 95.0 ± 17.5 , 86.6 ± 13.0 , 136.6 ± 16.7 および 132.0 ± 27.2 μL , ONO-1301-0.3mg/kg 群では 119.4 ± 18.5 , 109.9 ± 15.0 , 123.9 ± 12.1 , 158.4 ± 20.0 および 193.6 ± 16.2 μL , ONO-1301-0.1mg/kg 群では 102.4 ± 13.6 , 124.7 ± 17.9 , 130.3 ± 15.4 , 190.6 ± 19.1 および 211.3 ± 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 ± 0.09 , 4.24 ± 0.10 , 3.93 ± 0.12 , 4.09 ± 0.09 および 4.32 ± 0.06 mm, 病態 Control (J2N-k) 群では 6.01 ± 0.19 , 6.10 ± 0.19 , 6.51 ± 0.22 , 6.78 ± 0.22 および 6.81 ± 0.15 mm, ONO-1301-3.0mg/kg 群では 6.04 ± 0.28 , 5.12 ± 0.25 , 5.64 ± 0.20 , 5.62 ± 0.25 および 6.08 ± 0.34 mm, ONO-1301-1.0mg/kg 群では 5.43 ± 0.17 , 5.44 ± 0.24 , 5.30 ± 0.24 , 6.11 ± 0.26 および 5.94 ± 0.39 mm, ONO-1301-0.3mg/kg 群では 5.83 ± 0.26 , 5.59 ± 0.22 , 5.82 ± 0.14 , 6.18 ± 0.23 および 6.56 ± 0.17 mm, ONO-1301-0.1mg/kg 群では 5.55 ± 0.21 , 5.71 ± 0.23 , 5.80 ± 0.20 , 6.49 ± 0.19 および 6.64 ± 0.27 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 LVIDs 値は, 正常 (J2N-n) 群では 1.63 ± 0.14 , 2.30 ± 0.11 , 2.10 ± 0.14 , 1.97 ± 0.07 および 2.28 ± 0.05 mm, 病態 Control (J2N-k) 群では 5.00 ± 0.18 , 5.36 ± 0.19 , 5.82 ± 0.20 , 6.15 ± 0.22 および 6.15 ± 0.20 mm, ONO-1301-3.0mg/kg 群では 5.07 ± 0.28 , 4.12 ± 0.25 , 4.59 ± 0.18 , 4.60 ± 0.23 および 4.96 ± 0.33 mm, ONO-1301-1.0mg/kg 群では 4.50 ± 0.15 , 4.45 ± 0.29 ,

4.36 ± 0.22 , 5.08 ± 0.24 および 4.96 ± 0.36 mm, ONO-1301-0.3mg/kg 群では 4.84 ± 0.26 , 4.73 ± 0.21 , 4.95 ± 0.16 , 5.34 ± 0.25 および 5.76 ± 0.16 mm, ONO-1301-0.1mg/kg 群では 4.61 ± 0.23 , 4.92 ± 0.25 , 5.02 ± 0.19 , 5.71 ± 0.21 および 5.89 ± 0.26 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 C_{max} 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 1 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 C_{max} 血中濃度; 108.4ng/ml、及び無毒性量での C_{max} 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。

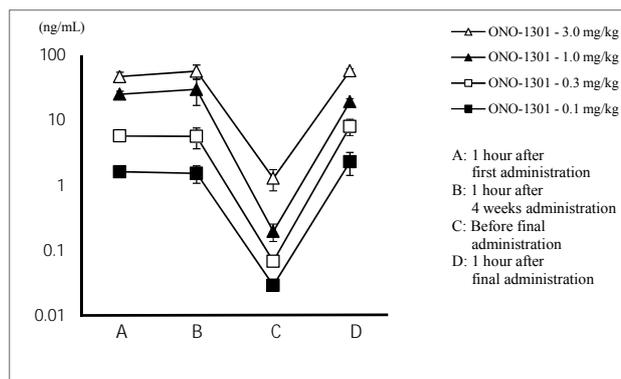


Fig 8 : 経口投与における ONO-1301 血中動態

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。

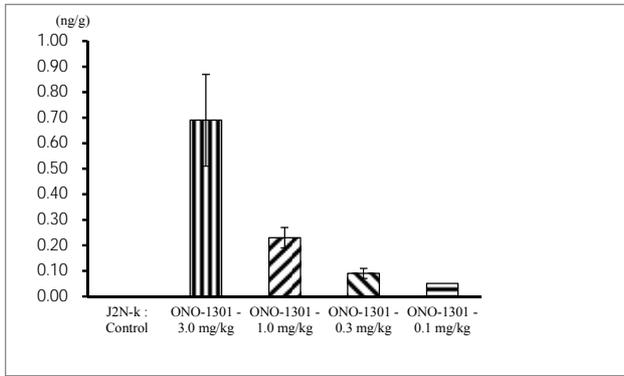


Fig 9 : 経口投与における心臓組織中 ONO-1301 濃度

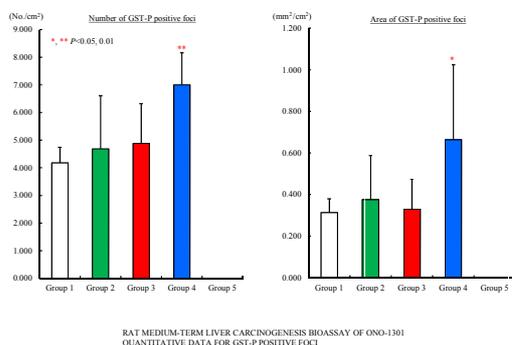
・ ONO-1301 のラット肝中期発がん性試験

F344/DuCrIcrlj 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 3 mg/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。



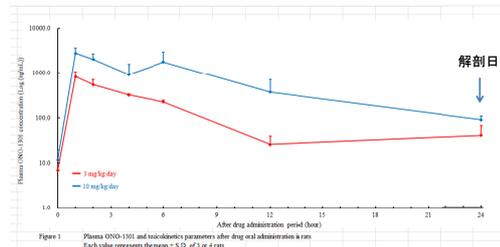
RAT MEDIUM-TERM LIVER CARCINOGENESIS BIOASSAY OF ONO-1301
QUANTITATIVE DATA FOR GST-P POSITIVE FOCI

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



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 ~ 3 mg/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 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) 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

ラット 13 週間皮下投与毒性試験

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

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；3 mg/kg × 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）ミニプ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、経済性を目指した新規 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）

ミニプ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(株)

(2) 注射用水

・Lot No. 3D86N、日本薬局方、(株)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 x 2 回/日	経口	10
3	ボセンタン; 50 mg/kg x 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 Crl: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、ミニプ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 週間間歇投与と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量として表記)
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 Crl: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) ミニプ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 の投与量でミニプ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 1 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ミニプ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 : ゲッチェンゲン系ミニプタ(雌雄各3匹/群)
- 群構成 : ONO-1301MS 1, 3, 10 mg/kg (ONO-1301量として表記)
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(別相試験にて測定)

ONO-1301MSミニプ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 ¹⁾	雄	雌
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 ²⁾	10 mg/kg	6週	3例	3例
5 ²⁾	10 mg/kg	13週	3例	—

¹⁾ 高量(10 mg/kg)から臓器組織から原薬を消失すると想定される期間:6週間 消失すると想定される期間:13週間
²⁾ 全群での検定
³⁾ 長期毒性の検定

【検査スケジュール】

項目	検日	投与後(日)																
		1	3	7	14	21	28	35	41	42	49	56	63	70	77	84	91	
一般状態	投前, 1, 4, 8日																	
体重	投前	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
摂餌量	投前	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
眼科学的検査	投前	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
血圧・心電図	投前, 1, 4, 8日	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
尿検査	投前	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
血液学的検査	投前	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
血液生化学的検査	投前	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
TK測定	投前, 1, 4, 8日	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
心臓組織中濃度測定(別相試験にて測定)	投前	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
剖検	投前	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

イソフルラン麻酔を施したGöttingen系ミニプタ(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 (ゼルフフォーム®、ファザ-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 コンビセット接着用、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。

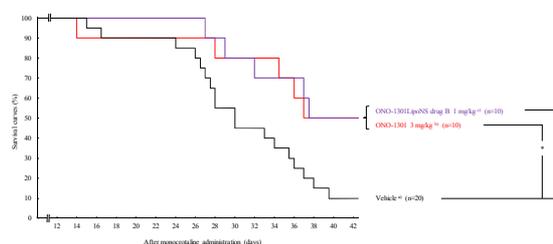
陽性対照として用いた ET-1 拮抗剤であるボセンタンは肺高血圧治療剤として臨床的に使用されており、同ラット MCT 誘発心不全モデルにおいて有効性を確認している（Circ J 2013）が、これらは MCT 投与直後からの反復経口投与である。今回、（3群）MCT 投与7日後からの投与においては、有意な延命効果は確認出来なかった。

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-1301NS drug B on survival curves in Monocrotaline-induced pulmonary hypertension rats



a) Saline (5 mL/kg, i.v.) was administered once a week from 7 days after monocrotaline administration
 b) ONO-1301 (3mg/kg) was administered twice a day for 21 days from 7 days after monocrotaline administration (3 mg/kg × twice/day × 21 days = 210 mg/kg/animal)
 c) ONO-1301NS drug B (1 mg/kg) 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. (0 day)
 Animals were grouped 6 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 × 2 回/日	経口	10	50*
3	ボセンタン; 50mg/kg × 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 42 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	雌雄共になし					
一般状態	雌雄共に30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし					
体重	雌雄共に30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし					
摂餌量	雌雄共に30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし					
眼科学的検査	雌雄共に30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし					
血液学的検査	雌雄共に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	雌雄共に30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし					
器官重量	雌雄共に30 mg/kgまで、被験物質に起因する変化なし					
剖検	雌雄共に30 mg/kgで投与部位（白色残留物）被験物質と推定					
病理組織学的検査	雌雄共に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処理反応のみ）					
TK測定	3 mg/kg [♂]	10 mg/kg [♂]	30 mg/kg [♂]	3 mg/kg [♀]	10 mg/kg [♀]	30 mg/kg [♀]
C _{max} (ng/mL)	23.7 ± 6.2	122 ± 13	314 ± 91	18.8 ± 3.9	73.2 ± 11.8	196 ± 6
AUC _{2184h} (ng·h/mL)	6670 ± 2170	28500 ± 5200	123000 ± 20000	3090 ± 380	14000 ± 3800	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

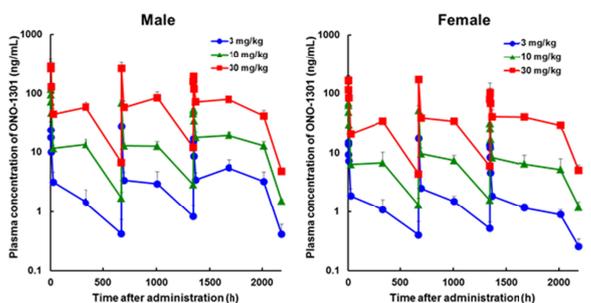
投与量 (mg/kg/回)	雄			雌		
	AUC _{2184h} (ng·h/mL)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{24h} (ng·h/mL)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)
3	6670	29.7	450	3090	18.8	675
10	28500	122	1.67	14000	73.2	1.67
30	123000	314	225	65700	196	226

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_{2184h} 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
		10	27500 ± 3500	N.A.	95.8 ± 22.7	115 ± 192
13週間 観察群	雌	10	24500 ± 11200	N.A.	89.5 ± 78.8	224 ± 97
	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 1 mg/kg では、すべての例で定量限界 (0.0600 ng/g tissue) 未満であった。3 mg/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。10 mg/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 10 mg/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 3 mg/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 1 mg/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 1 mg/kg/週間歇静脈内投与 (4 群) は ONO-1301 の 3 mg/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 1 mg/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 週間歇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 10 mg/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 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 cardioprotective 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, Soga 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