

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670616

研究課題名(和文)心筋再生治療薬封入ナノスフェア製剤を用いた心不全治療の開発

研究課題名(英文)Development of the treatment of cardiac failure using a nanosphere (NS) preparation encapsulated with a therapeutic agent for myocardial regeneration

研究代表者

澤 芳樹 (SAWA, Yoshiki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00243220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：オキシム誘導体の新しい疾患特異的なDDS製剤としてナノスフェア(NN)製剤を作製し、低侵襲的で汎用性が高い投与方法による疾患特異的治療法を開発することを目的とした。平均粒子径約100nmのオキシム誘導体NS試作品を作製した(特許出願準備中)。

ラットモノクロタリン誘発肺高血圧症モデル、及びラット冠動脈完全閉塞モデルを用いて、オキシム誘導体NS製剤の週1回間歇静脈内投与、オキシム誘導体の反復経口投与、及びオキシム誘導体の週1回間歇静脈内投与と比較検討した結果、オキシム誘導体NS製剤のDDS効果が確認された。本NS製剤は、疾患特異的な心不全治療薬に成り得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A nanosphere (NS) preparation has been created as a novel and disease-specific DDS preparation of oxime derivatives to develop a disease-specific treatment approach based on a less invasive and more versatile administration technique. A trial product of the NS preparation of oxime derivatives with the average particle size of 100 nm has been produced (in preparation for patent application). In a study, weekly intermittent intravenous administration of the NS preparation of oxime derivatives, repeated oral administration of oxime derivatives, and weekly intermittent intravenous administration of oxime derivatives were comparatively examined in rat models of monocrotaline-induced pulmonary hypertension and coronary total occlusion. As a result, DDS effects of the NS preparation of oxime derivatives have been confirmed. It is suggested that this NS preparation can be a disease-specific therapeutic agent for cardiac failure.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：疾患特異的 ナノスフェア 肺高血圧症 虚血性心筋症 杆状誘導体

1. 研究開始当初の背景

心不全は罹患率が高く、汎用性の高い画期的な治療がないことから、先進国の主要な死亡原因となっている。これに対する細胞移植を含めた再生型治療は、次世代型の心不全治療としての期待が高い。当科においても治療手段が尽くされた末期心不全患者に対して、自己骨格筋芽細胞シートを用いた再生型治療を開発してきた¹⁾が、開発過程で治療効果のメカニズムが、種々のサイトカインや増殖因子を増やすことで微小血流環境の再生など自己修復能を向上させるパラクライン効果であることを見出した²⁾。細胞移植を中心とした再生医療は様々な疾患においてその治療効果が証明され、その開発が加速化されている。しかしながら、細胞移植においては細胞の準備、保存、出荷といったところから汎用性、経済性に懸念があり、細胞を必要としないセルフリー型再生医療が、汎用性の高い次世代型の再生医療として期待されている。

一方で、既に小野薬品工業にて経口抗血栓薬として開発途上であったオキシム誘導体制剤(ONO-1301)が、心筋組織において同様の自己修復因子(HGF、VEGF、SDF-1等)を誘導することを見出し、本薬剤を再生型の心不全治療薬としてドラッグリポジショニングさせるための基礎研究を平行して実施してきた³⁾⁴⁾。

オキシム誘導体(ONO-1301)は、トロンボキサン(TX)₂合成酵素阻害作用を有する選択的プロスタグランジン IP 受容体作動薬であるが、経口投与すると副作用(血管拡張作用、下痢等)と有効性(血小板凝集抑制作用)との乖離が少ないことが問題であった。そこで、4週間徐放可能な徐放性製剤として、平均粒子30 μ mの乳酸・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)を作成し(特許取得済)、心筋に直接投与することで、心筋局所障害部位においてのみONO-1301を高濃度に長期間維持し、問題点を克服することに成功した⁵⁾⁶⁾。しかしながら、この治療方法は開胸手術を要することから単回投与にならざるを得ず、経過の長い心不全を治療する上では、治療の侵襲度が懸念となる。

一方近年、様々な手法で作成した薬剤含有ナノスフィアが、経静脈的投与によって組織障害部位を中心に局所的に集積し治療効果を発揮することが証明され、癌を中心とした病態に対する新たな治療として研究が盛んに行われている⁷⁾。そして、急性心筋梗塞モデルにおいても、薬剤含有ナノスフィアが心筋梗塞部位に集積するという報告が散見されるようになり⁸⁾、薬剤含有ナノスフィアの経静脈あるいは経冠動脈的投与は心疾患に

対する新規DDS(ドラッグデリバリーシステム;薬物輸送システム)製剤として期待されている。本研究は、細胞移植と同様のメカニズムで効果を発揮する新規薬剤ONO-1301を用いたセルフリー型DDS再生治療を開発しようとするものである。

2. 研究の目的

当科では、重症心不全に対する再生治療への期待は大きく、主に細胞移植による心筋再生治療が開発してきたが、汎用性が問題視されている。一方、血小板凝集抑制剤として開発途上であった選択的プロスタグランジン IP 受容体作動薬であるオキシム誘導体(ONO-1301)が、細胞移植と同様のメカニズムで心筋の自己修復能を向上させることを見出し、本薬剤をドラッグリポジショニングによるセルフリー型心筋再生治療の切り札として研究を行ってきた。また、障害心筋をターゲットとして繰り返し薬剤を投与できるシステムとして、ナノスフィアの経静脈あるいは経冠動脈投与というDDSが注目されている。本研究は、心筋再生能力を有するONO-1301をナノスフィアに含有させたDDS製剤による、新規心不全治療を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

オキシム誘導体(ONO-1301)のナノスフェア(ONO-1301NS)製剤を作製(特許申請準備中)し、(1);ラットモノクロタリン誘発重症心不全モデル、及び(2);ラット冠動脈完全閉塞モデルにONO-1301NS製剤を間歇尾静脈内投与を行うことにより、DDS効果を確認した。

(1)ラットモノクロタリン誘発重症心不全モデル

ラットモノクロタリン(MCT)誘発重症心不全(肺高血圧症)モデルを用いて、ONO-1301原薬と比較し、ONO-1301NS製剤のDDS効果を検証した。即ち、ラットのMCTを単回皮下投与により誘発させた重症心不全モデルを用いて、モデル作製7日後より各種被験物質を投与し、42日までの延命効果を比較検討した。群構成は、1群(対照群;媒体)、2群(ONO-1301原薬;3mg/kg \times 2回/日、反復経口投与)、3群(陽性対照;ボセンタン;50mg/kg \times 2回/日、反復経口投与)、4群(ONO-1301NS;1mg/kg/週、間歇静注投与)、及び5群(ONO-1301原薬;1mg/kg/週、間歇静注投与)で実施した。

(2)ラット冠動脈完全閉塞モデル

ラット冠動脈左前下行枝(LAD)を完全閉塞し、閉塞24時間後に心機能(EF)により群分けを行い、各種被験物質を単回静脈内投与を行った。群構成は、1群;対照群(媒体)

2 群 ; ONO-1301NS : 0.3mg/kg、3 群 ; 同 1 mg/kg、4 群 ; 同 3 mg/kg、及び 5 群 ; ONO-1301 原薬の 3 mg/kg を設定した。心エコーは、群分け時、投与 2 週間後、及び 4 週間後 (解剖前) に測定した。

4 . 研究成果

(1) ; ラットモノクローリン誘発重症心不全モデルでの評価の結果、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症治療薬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⁹⁾が、これらは MCT 投与直後からのボセンタンの反復経口投与である。今回、3 群は、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できなかった。

一方、ONO-1301 の 3 mg/kg の 1 日 2 回反復経口投与 (2 群) 及び ONO-1301NS 剤に 1 mg/kg の週 1 回の間歇静注投与 (4 群) での最終生存率は共に 50% であり、対象群 (1 群) と比較して共に有意な生存率延命効果が確認された。

尚、ONO-1301NS 製剤 (4 群) は、ONO-1301 反復経口投与群 (2 群) に比し、ONO-1301 の総投与量として 1 / 4 2 投与量において、同等な延命効果を示すことにより、ONO-1301NS 製剤での DDS 効果が確認された。

尚、5 群 ; ONO-1301 (1 mg/kg/週) は有意な生存率延命効果は示さなかった。

(2) ; ラット冠動脈 LAD 完全閉塞モデルでの評価の結果、正常動物における EF%値は、 $85.0 \pm 1.9\%$ (n=4) であった。各群の LAD 完全結紮 23 時間後の群分け時の EF%値は、1 群 ; $52.8 \pm 6.8\%$ で、2 群 ; $55.1 \pm 2.4\%$ 、3 群 ; $55.0 \pm 4.1\%$ 、4 群 ; $54.7 \pm 5.2\%$ (n=5)、及び 5 群 ; $56.7 \pm 5.5\%$ であった。

正常動物の EF%値に対する各群の被験物質投与前 EF%値は、全ての群で有意 ($p < 0.01$) な低下を示し、各群間差において、有意差は認められなかった。

各群の投与後 7 日目および 14 日目の EF%値の変化は、対照群では、投与前 EF%値 $52.8 \pm 6.8\%$ (n=5) に対し、それぞれ $48.9 \pm 4.0\%$ および $39.0 \pm 5.2\%$ と経日的に低下を示し、2 週間後の EF%値では、投与前値と比較して有意な低下を示した。一方、2 群、3 群、4 群では用量相関的に心機能が回復し、4 群群では、投与前 EF%値 $54.7 \pm 5.2\%$ に対し、7 日目 ; $62.4 \pm 8.7\%$ および 14 日目 ; $58.2 \pm 13.2\%$ と、投与前 EF%値と比較して有意な心機能の改善効果が認められた。一方、5 群では、投与前 EF%値 $56.7 \pm 5.5\%$ に対し、それぞれ $54.6 \pm 8.8\%$ および $53.2 \pm 7.1\%$ と対照群の 7 日目および

14 日目と比較した結果、ともに有意差は認められなかった。

また、正常動物における %FS 値は、 $49.4 \pm 2.4\%$ (n=4) であった。各群の LAD 完全結紮後約 23 時間の被験物質投与前 %FS 値は、対照群 (1 群) で $23.9 \pm 3.7\%$ (n=5) で、2 群、3 群、4 群の ONO-1301NS ; 0.3mg/kg、1.0 mg/kg および 3.0mg/kg 投与群では、それぞれ $25.0 \pm 1.7\%$ (n=5)、 $25.8 \pm 2.4\%$ (n=5) および $25.0 \pm 3.0\%$ (n=5) であった。また、5 群 (ONO-1301) の 3mg/kg 投与群は、 $26.5 \pm 3.7\%$ (n=5) であった。

正常動物の %FS 値に対する各群の被験物質投与前 %FS 値は、全ての群で有意 ($p < 0.01$) な低下を示し、各群間差において、有意差は認められなかった。

各群の投与後 7 日目および 14 日目の %FS 値の変化は、対照群では、投与前 %FS 値 $23.9 \pm 3.7\%$ (n=5) に対し、それぞれ $21.8 \pm 2.2\%$ および $16.7 \pm 2.7\%$ と経日的に低下を示し、2 週間後の %FS 値では、EF%値と同様に投与前値と比較して $p < 0.05$ の有意な低下を示した。

一方、2 群 (0.3mg/kg 投与) では、投与前 %FS 値 $25.0 \pm 1.7\%$ (n=5) に対し、それぞれ $22.9 \pm 3.4\%$ および $18.4 \pm 3.2\%$ と、対照群と同程度の変化を示し、14 日目の %FS 値においても対象群と同様、投与前値と比較して有意 ($p < 0.05$) 低下を示した。

3 群 (1.0mg/kg 投与) では、投与前 %FS 値 $25.8 \pm 2.4\%$ (n=5) に対し、それぞれ $24.8 \pm 4.2\%$ および $25.4 \pm 5.0\%$ と、投与前 %FS 値と同程度であった。4 群 (3.0mg/kg 投与) では、投与前 %FS 値 $25.0 \pm 3.0\%$ (n=5) に対し、それぞれ $30.1 \pm 5.4\%$ および $27.9 \pm 8.5\%$ と、投与前 %FS 値と比較して投与後 7 日目をピークとして増加を示した。その被験物質投与後 7 日目および 14 日目の %FS 値は対照群のそれと比較して、ともに $p < 0.05$ の有意な増加を示した。

また、5 群 (ONO-1301) の 3.0mg/kg 投与群では、投与前 %FS 値 $26.5 \pm 3.7\%$ (n=5) に対し、それぞれ $25.4 \pm 5.6\%$ および $24.5 \pm 4.4\%$ と、投与前 %FS 値と比較して、低下傾向を示したが、有意な差は認められなかった。しかしながら、対照群 (1 群) の 7 日目および 14 日目と比較した結果、ともに有意差は認められなかった。

以上のごとく、心機能評価の指標である、EF%値および %FS 値は各群で関連した測定結果が認められ、ONO-1301NS の 1.0mg/kg および 3.0 mg/kg の単回静脈内投与により、心機能の改善効果のある事が認められた。

これらの結果から、ONO-1301NS 製剤は ONO-1301 (原薬) に比し、DDS 効果を示すこ

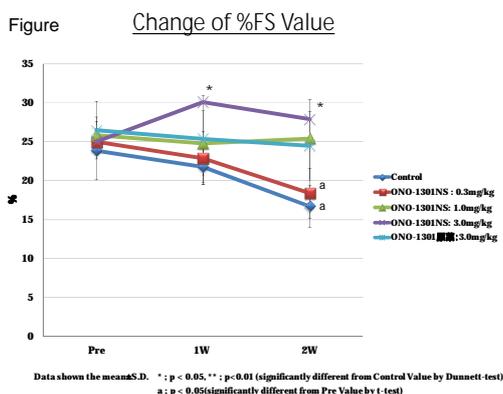
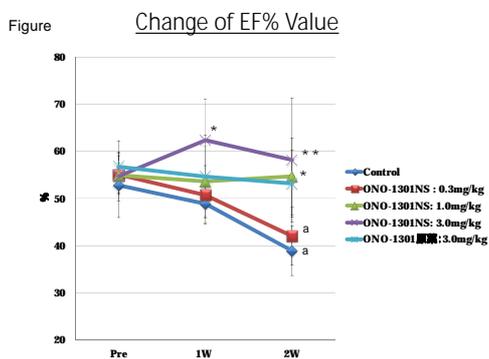
とにより、より少量投与により有意な有効性を示すことが示唆された。

以上、ONO-1301NS 製剤の間歇静注投与は、DDS 効果により、より少量投与にて有効であることが確認され、疾患局所特異的に ONO-1301 が集積し、効果を発揮することが示唆された。

Table. 各被験物質における EF%値および%FS 値の経日的変化

Drugs	N	EF%			%FS		
		Pre	1W	2W	Pre	1W	2W
Control	5	62.8±6.8	48.9±4.0	39.0±5.2*	23.9±3.7	21.8±2.2	16.7±2.7*
ONO-1301NS:0.3mg/kg	5	55.1±2.4	50.7±6.2	42.0±6.2*	25.0±1.7	22.9±3.4	18.4±3.2*
ONO-1301NS:1.0mg/kg	5	55.0±4.1	53.6±7.5	54.7±8.2*	25.8±2.4	24.8±4.2	25.4±5.0
ONO-1301NS:3.0mg/kg	5	54.7±5.2	62.4±8.7*	58.2±13.2**	25.0±3.0	30.1±5.4*	27.9±5.5*
ONO-1301:3.0mg/kg	5	56.7±5.5	54.6±8.8	53.2±7.1	26.5±3.7	25.4±5.6	24.5±4.4

Data shown the mean±S.D. *: p < 0.05, **: p < 0.01 (significantly different from Control Value by Dunnett-test)
a : p < 0.05 (significantly different from Pre Value by t-test)



引用文献

- 1) Sawa Y, et al. Surg Today 42(2):181-4 (2012)
- 2) Miyagawa S, et al. Ann Thorac Surg 91(1):320-9 (2011)
- 3) Shirasaka T, et al. J Thorac

- Cardiovasc Surg. 146(2):413-21 (2013)
- 4) Imanishi Y, et al. PLoS One 19;8(7):1-8 (2013)
- 5) Kubota Y, et al. J Thorac Cardiovasc Surg. 147(3):1081-7(2014).
- 6) Ishimaru K, et al. J Thorac Cardiovasc Surg 146(6):1516-25 (2013)
- 7) Alexander-Bryant et al. Adv Cancer Res 118:1-59 (2013)
- 8) Somasuntharam I et al. Biomaterials 34(31):7790-8 (2013)
- 9) Nakamura A, et al. Circ J 77(8):2127-33 (2013)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- 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 Fukushima S, Miyagawa S, Sakai Y, Sawa Y Heart Fail Rev 20:401-13(2105) DOI(10.1007/s10714-015-9477-8)

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) 新規プロスタサイクリンアゴニストを用いた慢性虚血心筋に対する心筋再生療法の開発 福嶋五月 ウェスティン都ホテル京都 第 20 回日本冠動脈外科学会 (2015 年 7 月 9 日)
- 2) プロスタグランジンアゴニストを用いた Cell-Free 型再生医療の重症心不全への応用 福嶋五月 第 42 回日本臓器保存生物医学学会 (2015 年 11 月 13 日) いわて県民情報交流センター
- 3) Oral administration of synthetic prostacyclin agonist ONO-1301 prevents deterioration of cardiac performance by preserving cardiac structural proteins in the delta-sarcoglycan-deficient hamster: promising treatment for patients with DCM Miyagawa S, Fukushima et al. AHA (American Heart Association, Scientific Sessions) ORANGE COUNTRY CONVENTION CENTER USA (2015 年 11 月 7 日 ~ 11 日)

- 4) Impact of enhancing fetal lung vascular and alveolar development by slow-release novel synthetic prostacyclin agonist for

treatment of fetal lung hypoplasia
Umeda S, Fukushima et al.
AHA (American Heart Association,
Scientific Sessions) ORANGE COUNTRY
CONVENTION CENTER USA (2015年11月7日～
11日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤 芳樹 (SAWA, Yoshiki)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00243220

(2) 研究分担者

福島 五月 (FUKUSHIMA, Satsuki)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80596867

研究分担者

寒川 延子 (SOGAWA, Nagako)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員
研究者番号：30432579

研究分担者

今西 悠基子 (IMANISHI, Yukiko)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員
研究者番号：10707582