

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15507

研究課題名(和文)血管新生薬剤による心臓外科手術後創傷治癒促進効果の検討

研究課題名(英文) Evaluation of accelerating effects of an angiogenic agent on wound healing after cardiac surgery

研究代表者

戸田 宏一 (Toda, Koichi)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40379235

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)：細胞及び動物を用いて、オキシム誘導体(ONO-1301)の血管新生・創傷治癒促進効果と毒性検討を行った。その結果、ONO-1301は細胞レベルで肝細胞増殖因子(HGF)等の各種血管新生・組織再生因子を産生促進し、血管新生を促進した。また、下肢虚血動物にONO-1301の生体分解性高分子に内包した徐放性製剤を筋注投与することにより、虚血部で血管新生を促進し、血流量及び運動能が回復することを確認した。また、同製剤の毒性試験にて安全性を確認した。以上、ONO-1301軟膏剤は創傷部位にて持続的に多種の血管新生・組織再生因子を産生誘導することにより、創傷治癒促進剤になり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Accelerating effects of oxime derivative (ONO-1301) on angiogenesis/wound healing and its toxicity were studied using cells and animals. The study demonstrated that ONO-1301 promoted the production of various angiogenic/tissue regenerative factors, including hepatocellular growth factor (HGF) at cell levels, as well as angiogenesis. Furthermore, it was shown that intramuscular injection of ONO-1301 sustained-release preparations contained in biodegradable polymer to animals with lower limb ischemia accelerated angiogenesis at ischemic sites and restored blood flow and motor ability. Also, the safety of the preparations was confirmed in a toxicity test. As described above, it was suggested that an ONO-1301 ointment can be a wound-healing accelerator by inducing the production of various angiogenic/tissue regenerative factors at wound sites in a sustained manner.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：オキシム誘導体 血管新生促進剤 創傷治癒促進 体内再生因子誘導剤 創傷治癒促進剤 ONO-1301 Y S-1402

## 1. 研究開始当初の背景

重症心疾患に対する外科的治療は発展が続き、多くの疾患において外科的手技が確立しつつあるものの、術後の創傷治癒に関連した合併症については未だ課題が多い。特に、高齢者、糖尿病患者、腎不全患者、免疫能低下患者における創傷治癒遅延、局所難治性感感染などは心臓外科手術成績に大きな影響を与えることが知られている。しかしながら現在、創傷治癒を積極的に促進させる感染予防的薬剤はない。また、局所難治性感染に対しては自己の筋皮弁移植や遊離弁移植等が行われているが、移植片の生着率が課題となっている。そこで、術後の創傷治癒や局所感染と深く関係している創傷部位の微小血流やマクロファージなどの創傷治癒担当細胞を直接的なターゲットとする汎用性の高い治療の開発が期待されている。

当研究室においては、新規心不全治療薬として ONO-1301 を開発中である。この薬剤は、低分子の非プロスタグランジン (PG) 骨格であるため科学的に安定で、トロンボキサン (TX) A<sub>2</sub> 合成酵素阻害作用を併せ持つ選択的 PG<sub>12</sub> 受容体 (IP) 作動薬であるが、局所の HGF、や VEGF 等の体内再生因子の発現を促すことにより心筋の局所血流改善効果を有することが明らかになってきた。同時に、SDF-1、HMGB1 等を発現させることにより骨髄より創傷治癒関連細胞を動員する効果があることも明らかになってきた。本研究では、このような局所血流改善効果と創傷治癒促進効果を有する ONO-1301 の軟膏を作成し、これを皮膚に投与することにより、新規な血管新生作用を有する難治性潰瘍剤と成り得ると考えた。

手術創の創傷治癒遅延と同部位の局所感染は、清潔操作が徹底された現状においては、高齢、糖尿病、腎不全、免疫能低下など、患者因子が主要な原因となっている。これらに

対する既存の治療としては、難治性潰瘍治療剤としてのプロスタンディン® (PGE1) 軟膏剤 (IP 作動薬) が使用されているが、これは皮膚組織等が有する 15-PG デヒドロゲナーゼにより代謝分解され失活する。また、フラストスプレー® (bFGF) は、線維芽細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、表皮細胞等の細胞の遊走や増殖を促進させるが、単一の蛋白製剤であるため障害深部に浸潤することはない。また、自家培養表皮 (ジェイス®) が医療用具として製品化されているが汎用性が課題となっている。

本研究は、治療効果と副作用の乖離が少ないという問題で Phase I が施行されたのみで開発中止となった血小板凝集抑制薬である ONO-1301 のドラッグリポジショニングとして、手術創の創傷治癒遅延と局所感染の治療薬の可能性を検討する。本治療薬の特徴としては、HGF や VEGF の発現促進を介して局所血流を改善し、SDF-1 の発現増強を介して骨髄細胞を動員することにより、直接的に創傷治癒を促進させるという効果が期待される。またその構造上安定であり、障害深部にまで浸潤することが証明されており、既存の治療に比べた優位性が期待される。

## 2. 研究の目的

心臓外科手術後の創傷治癒遅延や局所創部感染は、特にハイリスク患者に関しては大きな課題となっている。本研究は、局所血流改善と骨髄細胞動員による創傷治癒促進という効果を有する新薬であるオキシム誘導体 (ONO-1301) を用いた、心臓外科手術後の創傷治癒遅延治療を開発するための前臨床研究を遂行することを目的とする。具体的には、ONO-1301 及びその徐放性製剤 (YS-1401) の各種血管新生・組織再生因子の産生促進、及び血管新生作用の確認を *in vitro/in vivo* で行った。また、YS-1402 の皮下筋注投与に

おける安全性の確認を行う。

### 3. 研究の方法

プロスタグランジン (PGs) はオータコイドに分類され、必要な部位で、必要な時に、必要な量が生合成され、作用発現後、速やかに局所にて代謝失活する。よって、ホルモン類とは異なり、ほとんど全身循環することはない。PG 類の臨床応用においては、科学的不安定性による短い血中半減期、全身投与においては静注剤では血管拡張作用に伴う降圧作用等、経口剤においては、降圧作用等に加えて下痢誘発作用等が問題となっていた。これらの問題点を回避する目的で、皮下投与、筋注投与、軟膏剤等の非経口投与における疾患局所への投与の可能性を検討した。

(1) 実験 ; PG 関連化合物を用いて、*in vitro* 管腔形成 (血管新生) 促進作用を検討した。即ち、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) およびヒト線維芽細胞 (HDFa) の共培養下での HUVEC の血管新生に対する ONO-1301 および各陽性対照物質 (VEGF) の作用を検証した。HUVEC と HDFa を 1:3.3 の比率で  $2 \times 10^5$  cells/mL/well の濃度になるように播種し、一晚培養後、被験物質を添加した。ONO-1301 及び VEGF の曝露濃度はそれぞれ  $1 \mu\text{mol/L}$  および  $10 \text{ ng/mL}$  とした。被験物質添加液は約 48 時間毎に交換し、共培養開始時を 1 日として 11 日間培養した。11 日間培養後、CD31 抗体を用いて細胞染色を実施し、被験物質および管腔形成率を Array Scan VTI により測定した。管腔形成率の指標は TotalTubeLength および AngiogenicIndex とした。

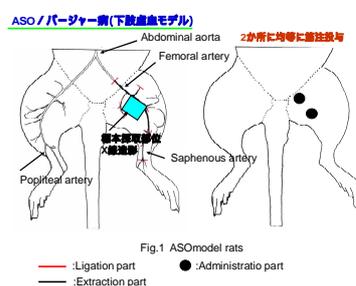
(2) 実験 ; 正常ヒト新生児包皮皮膚線維芽細胞 (Fibrocell NHDF(NB)) に ONO-1301 を  $1 \mu\text{M}$  添加し、72 時間培養後の培養液中体

内再生因子類 (HGF、VEGF、SDF-1、HMGB1 等) 及びプロスタグランジン類を ELISA/EIA にて測定を行った。

(3) 実験 ; ラット下肢虚血 (ASO) モデルに対する ONO-1301 が生体分解性ポリマー (PLGA) に内包されたマイクロスフェア 4 週間徐放性製剤である YS-1402 の虚血部への局所筋注投与での効果を検討した。

群構成 ; 正常 (Sham) 群, Control (PLGA・MS,  $10 \text{ mg/kg}$  相当量) 群, YS-1402 の 1, 3 および  $10 \text{ mg/kg}$  (ONO-1301 として) 群を設定し、虚血モデル作製部位の下肢への局所に 1/2 づつ 2 カ所に単回筋注とした。

#### ラット下肢虚血モデルの概要



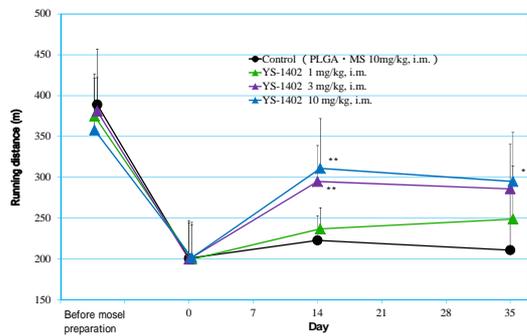
投与後 3 5 日まで、血流画像化装置 (LDI) を用いた左右後肢の血流量の比率の推移を測定した。また、トレッドミルを用いて、各群の動物の運動能を比較検討した。

(4) 実験 ; ONO-1301 含有軟膏剤の毒性試験の代替として、生体分解性ポリマー (PLGA) に ONO-1301 が内包されたマイクロスフェア 4 週間徐放性製剤 (YS-1402) を用いて、イヌに単回皮下投与、及び筋注投与し、その安全性を確認した。

### 4. 研究成果

(1) *in vitro* 管腔形成 (血管新生) 促進作用  
各種プロスタグランジン受容体作動薬を用いて、*in vitro* 管腔形成促進作用を検討した。その結果、IP (ONO-1301 を含む)、EP2 及び EP4 受容体が管腔形成促進作用を有することが確認された。

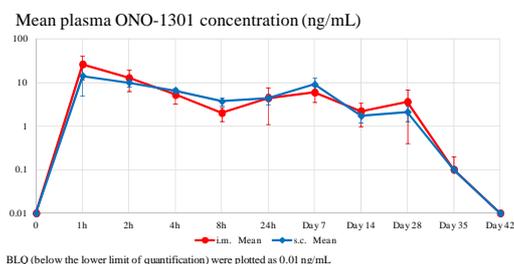




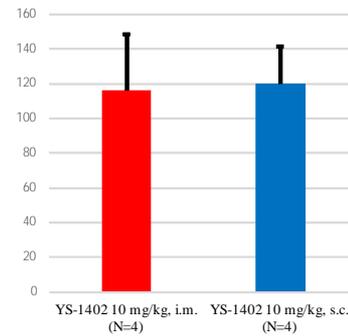
(4) YS-1402 イヌ単回筋注 / 皮下注投与毒性試験；

イヌの下肢又は皮下に YS-1402 を 10 mg/kg (ONO-1301 として) 単回投与し、4 2 日間観察を行った。その結果、死亡例は認められなかった。一般状態観察及び血圧測定において、YS-1402 に起因すると考えられる変化は認められなかった。病理解剖学的検査または病理組織学的検査では、YS-1402 投与による固有の変化は認められなかった。その他、体重推移、摂餌量、心電図、血液及び血液生化学的検査に特記すべき変化は認められなかった。これらの結果から、YS-1402 の筋肉内投与及び皮下投与における無毒性量は 10 mg/kg 以上であると推察された。

イヌ単回筋注 / 皮下注投与による TK 試験では、単回投与後 35 あるいは 42 日目まで血漿中に ONO-1301 が検出され、徐放性製剤としての機能が確認された。筋注群と皮下注群との間に Cmax、Tmax に有意な差はみられず、また、AUC もほぼ同等であったことから、YS-1402 の投与方法に伴う薬物動態に差がないことが確認された。



Mean AUC<sub>0-24h</sub>  
(ng/mL·h)



以上の結果より、創傷治癒改善効果として、ONO-1301 の軟膏剤を創傷部位局所皮膚に塗布することにより、持続的な ONO-1301 の放出が可能となり、新規な血管新生作用を有する安全な難治性潰瘍剤となり得ることが示唆された。

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: S. Fukushima, S. Miyagawa, Y. Sakai, Y. 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 hear  
Heart Fail Rev 401-13  
DOI 10.1007/s10741-015-9477-8 (2015)

〔学会発表〕(計 3 件)

1: 発表演題：新規プロスタサイクリンアゴニストを用いた慢性虚血性心筋症に対する心筋再生療法の開発  
発表者：福嶋 五月  
学会名：第 20 回日本冠動脈外科学会  
2015/7/9-10 ウェスティン都ホテル京都 京都

2: 発表演題：プロスタサイクリ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  
発表者：福嶋 五月  
学会名：第 42 回日本臓器保存生物医学会  
2015/11/13-14 いわて県民情報交流センター 岩手

3: 発表演題：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

発表者：Miyagawa,S. et al

学会名：American Heart Association 国際  
学会 2015/11/7-11/11 ORANGE COUNTRY  
COMVENTION CENTER USA

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

戸田 宏一 (TODA, Koichi)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40379235

##### (2)研究分担者

福嶋 五月 (FUKUSHIMA, Satsuki)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター  
一病院 医長

研究者番号：80596867

削除：平成 28 年 12 月 2 日

秦 広樹 (HATA, Hiroki)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80638198

追加：平成 28 年 12 月 2 日