

長期作用型プロスタサイクリンアゴニストによる 肺高血圧治療の開発

小幡 裕明¹ 酒井 芳紀² 片岡 雅晴¹ 永谷 憲歳¹

要 旨：プロスタサイクリン製剤の登場により肺高血圧症の予後は有意に改善した。しかし、その代謝時間が極めて短いために持続投与が必要となり、合併症の発生や患者のQOL低下につながっている。このような背景から、われわれはトロンボキサン合成酵素阻害作用を併せもつ新たな長期作用型プロスタサイクリンアゴニスト(ONO-1301, ONO-1301MS)を開発した。これらの薬剤はラット肺高血圧モデルの病態を有意に改善させた。(J Jpn Coll Angiol, 2007, 47: 531-536)

Key words: pulmonary hypertension, prostacyclin analog, sustained-release preparation

肺高血圧症と内科的治療の変遷

特発性肺動脈性肺高血圧症(idiopathic pulmonary arterial hypertension: IPAH)は進行性の肺血管抵抗増加から肺動脈圧が上昇し、右心不全を来して死に至る予後不良な疾患である。正常の肺血管内皮細胞はさまざまな血管拡張因子を分泌して肺循環の低圧系を維持しているが、肺高血圧症では肺血管内皮機能障害により血管作動物質のバランスが破綻している。実際に、IPAH症例において血管収縮因子であるトロンボキサンA₂(TXA₂)やエンドセリン-1の産生亢進^{1,2)}、セロトニンの産生増加³⁾や、血管拡張因子であるプロスタサイクリン(PGI₂)の産生低下⁴⁾、内皮型NO合成酵素(eNOS)の発現低下⁵⁾が報告されている。つまり、血管収縮因子の増加と、内因性血管拡張因子の相対的な低下が起こり、この不均衡により引き起こされる肺血管攣縮が、器質的な肺動脈中膜筋層の肥大へつながると考えられている。

これまでの肺高血圧症の内科的治療を振り返ると、血管拡張療法としてのカルシウム拮抗薬大量療法と抗凝固療法から、より選択性が高く、強力な血管拡張薬であるPGI₂(エボプロステノール)持続静注療法への変遷によって、本症の生命予後は有意に改善した⁶⁾。ま

た、血管拡張薬に対して急性拡張反応を示さない例も長期投与により病態が改善したことなどから、PGI₂には血管拡張以外に、細胞増殖抑制効果があるという報告がなされている^{6,7)}。PGI₂は、わが国においても1999年4月より原発性肺高血圧症(現在の分類ではIPAH)に対する治療薬として承認され、2000年4月から携帯型ポンプによる在宅療法が保険適応となった。さらに2004年6月より、その適応が膠原病などによる二次性肺高血圧症を含む肺動脈性肺高血圧症にまで拡大された。一方で近年、エンドセリン受容体拮抗薬、ホスホジエステラーゼ(PDE)5阻害薬や、その併用療法が話題となっているが、やはりエビデンスの蓄積がある治療薬としてPGI₂が治療戦略の中心に位置するものと考えられる。

既存のプロスタサイクリンアゴニスト

既存のプロスタサイクリンアゴニストは、持続静注製剤のエボプロステノール、経口製剤のベラプロスト、吸入製剤のイロプロスト、持続皮下注製剤のトレプロスチニルの4種類があり(Fig. 1)、わが国で市販されているのはエボプロステノールとベラプロストのみである。この2剤の有用性はこれまでの報告で明らかにされているが⁸⁻¹⁵⁾、ベラプロストの長期投与効果については明らかではないとする報告もある¹⁶⁾。それぞ

¹国立循環器病センター研究所再生医療部

²小野薬品工業株式会社

2007年3月26日受付 2007年10月4日受理

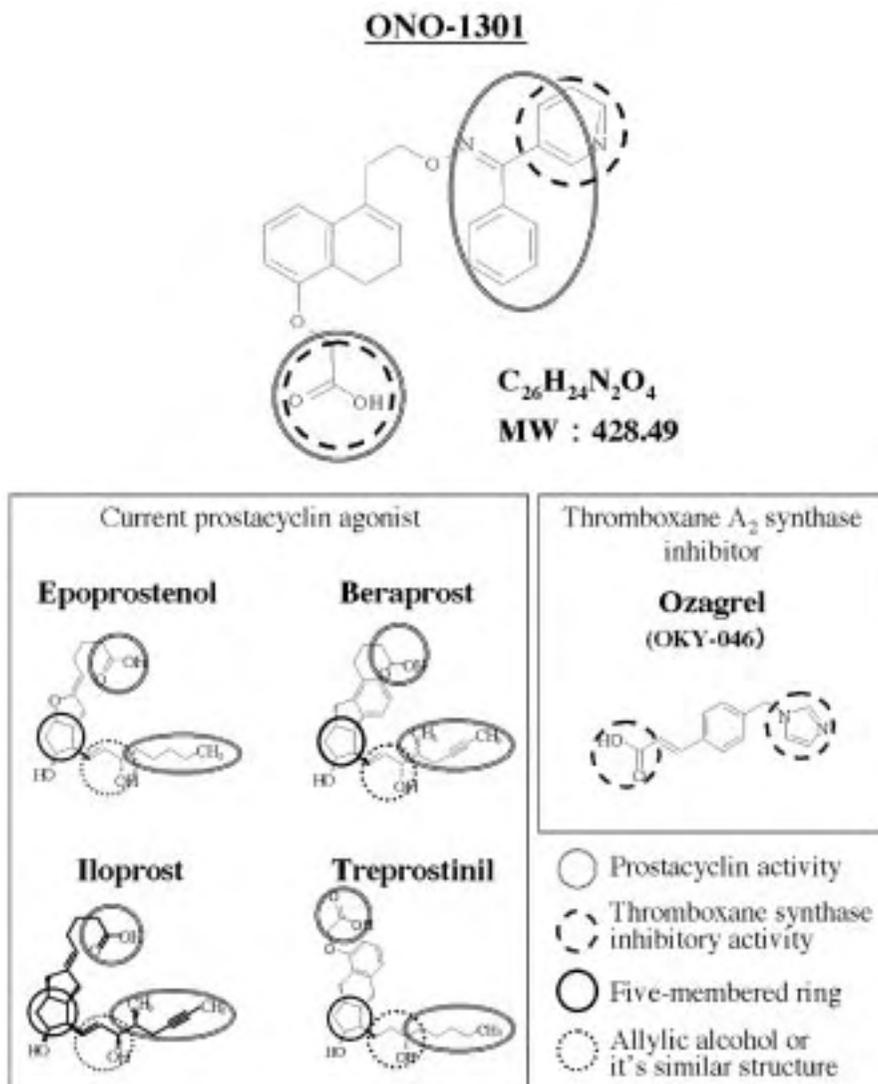


Figure 1 Molecular structures of ONO-1301, conventional prostacyclin agonists, and thromboxane A₂ synthase inhibitor (ozagrel).

れの生体内での半減期は、投与経路が異なるため単純に比較はできないものの、エポプロステノールは6分以内、ベラプロストは1.1時間、イロプロストは20~25分、トレプロスチニルは1~4.6時間と大変短い。このように、既存のプロスタサイクリンアゴニストは代謝時間が極めて短いため、頻回投与や持続投与が必要となる。特にエポプロステノールでは、薬剤持続投与のために植え込み型カテーテルの留置が必要となり、カテーテルに起因した合併症の発生や、煩雑な投与手法が患者のQOL (quality of life) 低下につながっている。こ

の合併症には、カテーテル感染、静脈閉塞などがあるが、これが患者の予後を左右してしまうことも稀ではない。

以上のような背景から、プロスタサイクリンアゴニストの問題を改善するために、より長期作用型の薬剤開発が必要であると考えた。

ONO-1301の開発

われわれは新たなプロスタサイクリンアゴニストとしてONO-1301を開発し、肺高血圧モデルに対する効果

を報告した¹⁷⁾。ONO-1301はプロスタグランジンの構造的特徴である五員環やアリルアルコール部からなるプロスタグランジン骨格を有さず、プロスタサイクリン様活性をもつ (Fig. 1)。プロスタサイクリンは、15-ヒドロキシプロスタグランジンデヒドロゲナーゼによってプロスタノイド骨格が分解されるため、この構造を持たないONO-1301はより安定である。

また、オザグレルのようにカルボン酸に対して、ある一定の距離にピリジンやイミダゾールのような塩基性官能基を有する化合物が、トロンボキサン合成酵素阻害作用を示す。TXA₂はPGI₂と拮抗する作用をもっており、肺動脈収縮因子、かつ平滑筋増殖因子である。ONO-1301は、Fig. 1に示すような位置に、カルボキシル基とピリジン基を分子内に有することで、これまでのプロスタサイクリンアゴニストにはない、トロンボキサン合成酵素阻害作用を有する。

ONO-1301の肺高血圧症に対する効果

動物モデルは雄性Wistar rat(5週齢)に対し monocrotaline(MCT) を皮下注射(60 mg/kg)して作成した。ONO-1301は1日2回の皮下注射(20 mg/kg/日)を3週間行った。被検動物は無作為にsham群、control群(MCT+ vehicle投与)、treated群(MCT+ ONO-1301投与)の3群に分け、MCT投与3週間後に血行動態、病理学的評価を施行した。肺動脈圧を反映する右室収縮期圧を比べると、control群で高値となり、treated群で有意な改善が認められた (Fig. 2A)。また、右心肥大の程度を反映する右心重量/体重比も、control群で高くなり、treated群で有意な改善を認めた (Fig. 2A)。病理学的評価では、肺動脈の中膜肥厚を定量評価したところ、control群で厚くなり、treated群では有意に改善していることが分かった (Fig. 2B)。

また、ONO-1301の生体内での持続性を評価するため、ONO-1301を1回投与(10 mg/kg)し、血中薬物濃度とPGI₂のセカンドメッセンジャーであるcAMPの血漿中濃度を経時的に測定した。血中濃度のピークは4時間後で、半減期は5.6時間であった。これは、前述した既存のどのプロスタサイクリンアゴニストより長いものであった。また、cAMP濃度上昇のピークは6時間後であり、少なくとも8時間後まで上昇を認めた。さらに、ONO-1301のトロンボキサン合成酵素阻害作用を評価するため、その代謝産物である11-デハイドロトロン

ボキサンB₂(11DTXB₂)をMCT投与3週後の各群において測定した。control群で上昇を認めた11DTXB₂は、treated群では有意に抑制されていた。6週間の生存率の評価では、control群と比較して有意な治療効果を認めた。

このように、ONO-1301は肺高血圧ラットの肺血行動態、肺動脈壁肥厚、生存率を改善させることが分かった。しかし、その改善には皮下注射による1日2回の投与が必要であった。そこでわれわれは、ONO-1301のさらなる徐放化に関する研究を現在行っている。次に、その一部を紹介する。

ONO-1301徐放化製剤の開発

われわれはONO-1301をさらに徐放化するために、ポリ乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA)での修飾を試みた (ONO-1301MS: microsphere製剤)。PLGAは生体適合性があり、生体内で完全に分解される。すでに前立腺癌などに対して用いられるLH-RHアナログ徐放性製剤として、リュープロレリンが発売されており、ヒトに対する安全性も確認されている。われわれが作成した製剤例を走査電子顕微鏡で観察すると、球形で表面性状は滑らかであることが分かる (Fig. 3A)。この製剤の粒度分布をコールターカウンター法で解析すると、およそ39 μmであった。PLGA製剤の徐放機構は、ONO-1301MSに体液(水分)が浸入すると、PLGAが乳酸とグリコール酸に加水分解され、結合が疎になる。そこで、濃度勾配に従って薬剤が体液に溶解してリリースされる (Fig. 3B)。また、この製剤の利点は徐放期間を調整できることにある。徐放期間の規定因子はPLGAの平均分子量や、PLGAの乳酸・グリコール酸比、粒子径などによる。これまでの*in vitro*研究では、これらの因子を調節することによって、それぞれ1, 2, 3, 4週間の徐放期間を持つ製剤を作ることができた。

われわれは*in vitro*で徐放期間が3週間であった製剤を使用し、動物実験を行った。まず、*in vitro*での持続性を評価するため、ONO-1301MSを1回皮下投与(100 mg/kg)し、血中薬物濃度とcAMPの血漿中濃度を経時的に測定した。薬物濃度は3週間後まで上昇しており、cAMP濃度もこの変化と平行に少なくとも2週以上の上昇を認め、*in vitro*での持続性を確認できた。次に、肺高血圧モデルに対する効果を検討した。動物モデルの作成や評価の系は、前述したONO-1301の効果を

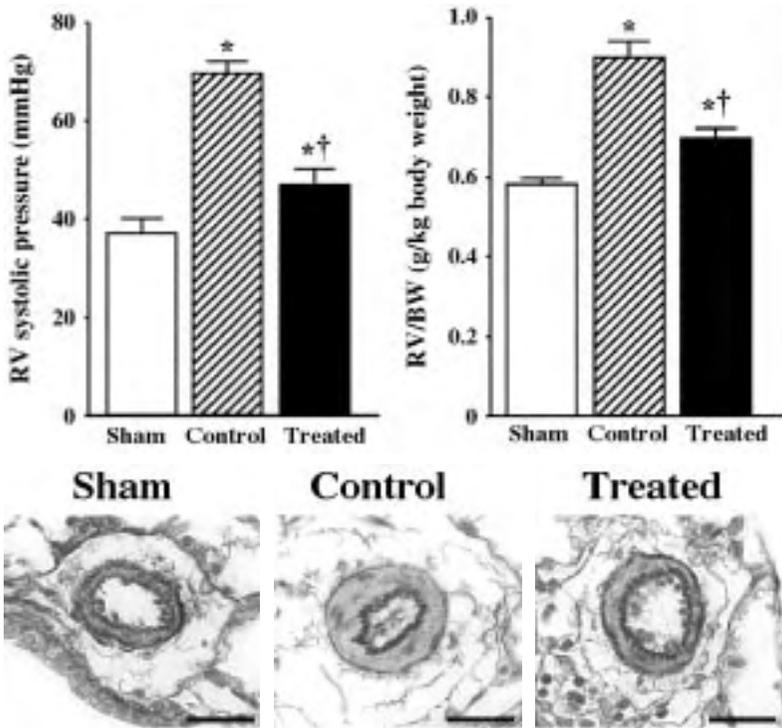


Figure 2 Effects of ONO-1301 on pulmonary hemodynamics and vascular remodeling.
 A: Right ventricular (RV) systolic pressure, and RV weight to body weight (RV/BW).
 B: Representative photomicrographs of peripheral pulmonary arteries 3 weeks after MCT injection. Scale bars: 20 μ m, Sham: sham rats given vehicle, Control: MCT rats given vehicle, Treated: MCT rats treated with ONO-1301, Data are mean \pm SEM, *p < 0.05 versus Sham, †p < 0.05 versus Control

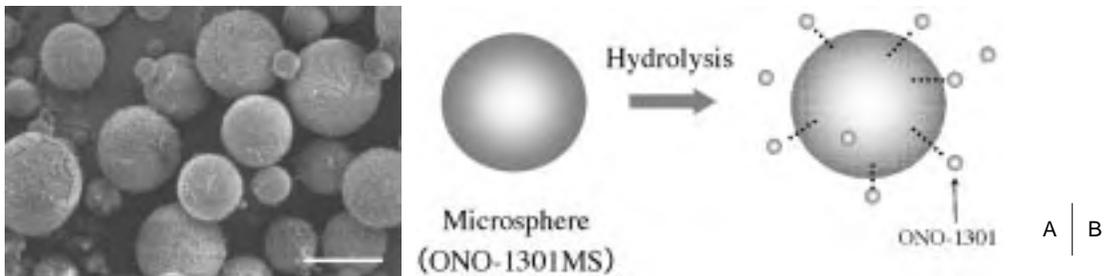


Figure 3 Characteristics of ONO-1301MS.
 A: Morphology of ONO-1301MS studied by scanning electron microscopy. Scale bar: 50 μ m
 B: Schematic illustration of controlled release system of ONO-1301MS. The slow release of ONO-1301 occurs by the hydrolysis of PLGA.

検討した時と同様に、sham群、control群 (MCT + vehicle 投与)、treated群 (MCT + ONO-1301MS投与) の3群に分け、MCT投与3週間後に血行動態、病学的評価を行った。ONO-1301MSは、MCT投与後に1度だけ皮下注射 100 mg/kg を行った。血行動態評価では、右室収縮期圧は、control群で高値となり、treated群で有意な改善が認められた。また、右心重量 / 体重比も、control群で高値となり、treated群で有意な改善を認めた。さ

らに病学的評価では、肺動脈の中膜肥厚が、control群で厚くなり、treated群では有意に改善していた。

われわれは現在、この製剤の至適投与間隔や、このPGI₂製剤の増殖シグナルに対する影響を中心に効果発現のメカニズムを検討中である。増殖シグナルへの効果について考察すると、肺高血圧の病的肺血管においては、増殖因子からのシグナルが過剰となっていることが想定される。また増殖因子のレセプターはチロシ

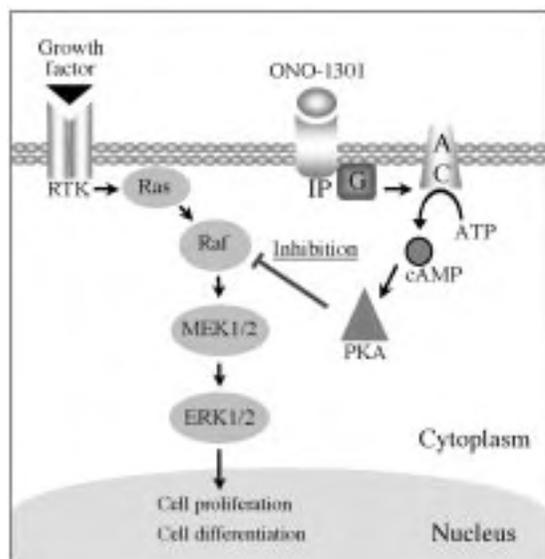


Figure 4 Schematic illustration of the proposed signaling pathways in smooth muscle cell of pulmonary hypertension and effects of ONO-1301.

RTK: receptor tyrosine kinase, Ras: ras protein, Raf: raf protein, MEK: ERK kinase (mitogen-activated protein kinase), ERK: extracellular signal-regulated kinase (mitogen-activated protein kinase), IP: prostacyclin receptor, G: G protein, AC: adenyl cyclase, cAMP: cyclic adenosine monophosphate, PKA: protein kinase A

ンキナーゼ型であり，Ras，Raf，MEK，ERKといった古典的経路へ伝達される(Fig. 4)。一方，プロスタサイクリンは，G蛋白共役型のIPレセプターに結合し，cAMP上昇，プロテインキナーゼAの活性化を介して，血管拡張に働くことが知られている。また，エボプロステノールはcAMPを介したERK1/2のリン酸化を抑制する機序によって，細胞増殖を抑制することが報告されている⁷⁾。さらに，cAMP/PKAの活性化が，Rafのリン酸化を抑制することでRasとERKのカスケードをネガティブに調整していることが示されている¹⁸⁾。これらより，われわれは肺高血圧症の病態によって亢進していたERKのリン酸化が，ONO-1301によるcAMP/PKAの活性化によって抑制された可能性について検討中である。

まとめと展望

肺高血圧症治療における既存のPGI₂製剤の問題点を挙げ，これに対する長期作用型プロスタサイクリンアナログの開発について概説した。これらの研究から，ONO-1301，ONO-1301MSは肺高血圧症に対する新たな

治療薬として有効となる可能性が示された。しかし，既存のPGI₂製剤を含め，細胞増殖をターゲットとした根本的な肺高血圧症に対する治療薬はいまだになく，これからの治療薬開発は，血管拡張剤から細胞増殖抑制薬へと転換されるものと考えられる。前述したように，PGI₂も長期投与によって血管拡張以外に細胞増殖抑制効果があることが示唆されているが，ONO-1301についてもこの増殖抑制効果について詳細な検討を行いたいと考える。

文 献

- 1) Christman BW, McPherson CD, Newman JH et al: An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 1992, **327**: 70–75.
- 2) Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D et al: Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 1993, **328**: 1732–1739.
- 3) Hervé P, Launay JM, Scrobohaci ML et al: Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med*, 1995, **99**: 249–254.
- 4) Tudor RM, Cool CD, Geraci MW et al: Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, **159**: 1925–1932.
- 5) Giaid A, Saleh D: Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 1995, **333**: 214–221.
- 6) McLaughlin VV, Genthner DE, Panella MM et al: Reduction in pulmonary vascular resistance with long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 1998, **338**: 273–277.
- 7) Li RC, Cindrova-Davies T, Skepper JN et al: Prostacyclin induces apoptosis of vascular smooth muscle cells by a cAMP-mediated inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity and can counteract the mitogenic activity of endothelin-1 or basic fibroblast growth factor. *Circ Res*, 2004, **94**: 759–767.
- 8) Barst RJ, Rubin LJ, Long WA et al: A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med*, 1996, **334**: 296–302.
- 9) Barst RJ, Rubin LJ, McGoon MD et al: Survival in primary pulmonary hypertension with long-term continuous intravenous prostacyclin. *Ann Intern Med*, 1994, **121**: 409–415.

- 10 Shapiro SM, Oudiz RJ, Cao T et al: Primary pulmonary hypertension: improved long-term effects and survival with continuous intravenous epoprostenol infusion. *J Am Coll Cardiol*, 1997, **30**: 343–349.
- 11 McLaughlin VV, Genthner DE, Panella MM et al: Reduction in pulmonary vascular resistance with long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 1998, **338**: 273–277.
- 12 McLaughlin VV, Shillington A, Rich S: Survival in primary pulmonary hypertension: the impact of epoprostenol therapy. *Circulation*, 2002, **106**: 1477–1482.
- 13 Sitbon O, Humbert M, Nunes H et al: Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: prognostic factors and survival. *J Am Coll Cardiol*, 2002, **40**: 780–788.
- 14 Badesch DB, Tapson VF, McGoon MD et al: Continuous intravenous epoprostenol for pulmonary hypertension due to the scleroderma spectrum of disease. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*, 2000, **132**: 425–434.
- 15 Galiè N, Humbert M, Vachiéry JL et al: Effects of beraprost sodium, an oral prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Coll Cardiol*, 2002, **39**: 1496–1502.
- 16 Barst RJ, McGoon M, McLaughlin V et al: Beraprost therapy for pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 2003, **41**: 2119–2125.
- 17 Kataoka M, Nagaya N, Satoh T et al: A long-acting prostacyclin agonist with thromboxane inhibitory activity for pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, **172**: 1575–1580.
- 18 Cook SJ, McCormick F: Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science*, 1993, **262**: 1069–1072.

The Development of Long-acting Prostacyclin Agonists for the Treatment of Pulmonary Hypertension

Hiroaki Obata,¹ Yoshiki Sakai,² Masaharu Kataoka,¹ and Noritoshi Nagaya¹

¹Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering,
National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan

²Ono Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan

Key words: pulmonary hypertension, prostacyclin analog, sustained-release preparation

Although prostacyclin is considered a therapeutic breakthrough for pulmonary hypertension, it needs continuous infusion because of its short action. To overcome these problems, we developed ONO-1301, a novel prostacyclin agonist characterized by a long-lasting prostacyclin activity and an inhibitory effect on thromboxane synthase. Repeated administration of ONO-1301 attenuated monocrotaline (MCT)-induced pulmonary hypertension and improved survival in rats. Although the half-life of plasma ONO-1301 concentration is longer than that of any other prostacyclin analogs, ONO-1301 requires to be administered twice a day subcutaneously to achieve a significant improvement in pulmonary hypertension. Therefore, we further developed ONO-1301MS, a polymerized ONO-1301 with poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres, as a new drug delivery system for prostacyclin. A single administration of ONO-1301MS sustained activity for 3 weeks, and attenuated MCT-induced pulmonary hypertension in rats. Prostacyclin has been shown to inhibit phosphorylation of ERK1/2 through the activation of cAMP. ONO-1301MS may have anti-proliferative effects on pulmonary vascular smooth muscle cell, at least in part, through inhibition of ERK via a cAMP-dependent pathway. These new prostacyclin analogs may be a therapeutic strategy for the treatment of pulmonary arterial hypertension.

(*Jpn Coll Angiol*, 2007, **47**: 531–536)