

Table 3 Blood chemistry

Test substance	Dose (mg/kg)	Animal No.	AST (U/L)						
			pre	1h	2h	4h	8h	20h	24h
AcPepA	2	111	52.8	64.7	69.8	92.5	137.4	119.0	133.0
		112	49.1	58.3	70.9	120.9	218.4	181.4	200.7
		Mean	51.0	61.5	70.4	106.7	177.9	150.2	166.9
	10	121	39.4	50.7	45.3	61.0	67.6	58.8	77.4
		122	65.4	63.5	69.1	97.3	111.2	79.0	100.1
		Mean	52.4	57.1	57.2	79.2	89.4	68.9	88.8
	30	131	35.6	35.4	36.5	45.2	72.7	51.9	57.1
		132	65.1	79.3	93.7	124.5	124.3	82.2	83.2
		Mean	50.4	57.4	65.1	84.9	98.5	67.1	70.2

Test substance	Dose (mg/kg)	Animal No.	ALT (U/L)						
			pre	1h	2h	4h	8h	20h	24h
AcPepA	2	111	62.8	65.3	59.0	66.6	84.0	83.5	85.5
		112	65.4	63.9	63.1	69.5	87.0	92.1	104.4
		Mean	64.1	64.6	61.1	68.1	85.5	87.8	95.0
	10	121	45.5	48.6	46.1	47.3	53.7	53.1	59.8
		122	70.1	69.5	71.0	76.9	80.6	82.4	91.0
		Mean	57.8	59.1	58.6	62.1	67.2	67.8	75.4
	30	131	43.6	42.2	44.8	43.2	51.7	48.9	49.7
		132	53.5	58.5	59.2	66.4	70.2	71.0	72.9
		Mean	48.6	50.4	52.0	54.8	61.0	60.0	61.3

Test substance	Dose (mg/kg)	Animal No.	ALP (U/L)						
			pre	1h	2h	4h	8h	20h	24h
AcPepA	2	111	365.0	373.9	342.9	353.0	398.8	353.4	366.8
		112	1684.1	1656.2	1612.1	1655.1	1691.6	1443.6	1559.7
		Mean	1024.6	1015.1	977.5	1004.1	1045.2	898.5	963.3
	10	121	1661.3	1785.2	1681.2	1676.7	1755.9	1587.3	1646.0
		122	1913.8	1887.6	1879.5	2012.4	1952.2	1812.4	1897.8
		Mean	1787.6	1836.4	1780.4	1844.6	1854.1	1699.9	1771.9
	30	131	1169.6	1159.1	1236.5	1184.5	1172.0	1127.4	1141.3
		132	1562.9	1636.7	1617.6	1742.7	1694.9	1542.5	1555.5
		Mean	1366.3	1397.9	1427.1	1463.6	1433.5	1335.0	1348.4

Test substance	Dose (mg/kg)	Animal No.	LDH (U/L)						
			pre	1h	2h	4h	8h	20h	24h
AcPepA	2	111	364.1	550.5	672.9	782.4	1326.4	930.6	1292.1
		112	407.1	542.0	701.4	1092.2	1421.8	986.8	1073.7
		Mean	385.6	546.3	687.2	937.3	1374.1	958.7	1182.9
	10	121	327.6	402.6	494.1	608.5	665.2	478.5	713.6
		122	515.9	650.8	864.9	1466.8	1723.7	900.6	1261.1
		Mean	421.8	526.7	679.5	1037.7	1194.5	689.6	987.4
	30	131	329.5	323.6	334.9	380.3	448.8	404.8	432.5
		132	432.9	557.8	772.6	1114.9	776.0	489.5	488.8
		Mean	381.2	440.7	553.8	747.6	612.4	447.2	460.7

Table 3 Blood chemistry (continued)

Test substance	Dose (mg/kg)	Animal No.	$\gamma$ -GTP (U/L)						
			pre	1h	2h	4h	8h	20h	24h
AcPepA	2	111	28.8	29.4	27.2	27.2	30.7	30.6	30.6
		112	47.7	44.4	43.1	45.1	45.2	41.9	44.2
		Mean	38.3	36.9	35.2	36.2	38.0	36.3	37.4
	10	121	55.3	58.0	55.7	53.1	56.7	53.4	54.5
		122	67.0	65.8	66.4	68.9	67.7	64.4	67.2
		Mean	61.2	61.9	61.1	61.0	62.2	58.9	60.9
	30	131	67.8	67.0	71.0	66.2	65.2	64.7	65.2
		132	62.1	64.2	62.4	66.2	64.0	62.4	63.5
		Mean	65.0	65.6	66.7	66.2	64.6	63.6	64.4

Test substance	Dose (mg/kg)	Animal No.	CK (U/L)						
			pre	1h	2h	4h	8h	20h	24h
AcPepA	2	111	215.6	571.3	1031.4	2145.9	<u>7769.4</u>	<u>6476.0</u>	<u>8976.4</u>
		112	65.3	611.8	1920.0	<u>6976.8</u>	<u>10095.0</u>	3680.3	3320.1
		Mean	140.5	591.6	1475.7	4561.4	8932.2	5078.2	6148.3
	10	121	77.8	140.4	323.9	927.4	1463.0	482.5	1136.4
		122	340.8	953.6	2076.2	<u>6695.8</u>	<u>7616.8</u>	2250.0	3736.3
		Mean	209.3	547.0	1200.1	3811.6	4539.9	1366.3	2436.4
	30	131	76.5	55.8	49.9	440.2	646.2	120.7	123.6
		132	846.6	1641.9	3173.4	<u>7646.0</u>	4180.3	795.8	663.7
		Mean	461.6	848.9	1611.7	4043.1	2413.3	458.3	393.7

\_: measured by 2-fold dilution.

Test substance	Dose (mg/kg)	Animal No.	Mb (ng/mL)						
			pre	1h	2h	4h	8h	20h	24h
AcPepA	2	111	148	336	439	924	<u>1054</u>	213	433
		112	88	<u>884</u>	<u>1430</u>	<u>1508</u>	<u>946</u>	99	111
		Mean	118	610	935	1216	1000	156	272
	10	121	133	202	360	537	487	159	321
		122	91	185	315	418	264	75	166
		Mean	112	194	338	478	376	117	244
	30	131	50	55	62	491	178	49	72
		132	273	472	<u>932</u>	<u>1012</u>	442	134	139
		Mean	162	264	497	752	310	92	106

\_: measured by 2-fold dilution.

Test substance	Dose (mg/kg)	Animal No.	K (mEq/L)						
			pre	1h	2h	4h	8h	20h	24h
AcPepA	2	111	6.0	5.0	4.2	4.2	5.4	5.0	4.8
		112	4.1	4.3	4.3	4.5	3.7	4.7	3.8
		Mean	5.1	4.7	4.3	4.4	4.6	4.9	4.3
	10	121	5.1	6.6	5.1	6.3	6.7	6.7	6.0
		122	5.4	5.1	6.0	5.8	4.7	5.5	4.7
		Mean	5.3	5.9	5.6	6.1	5.7	6.1	5.4
	30	131	5.0	4.6	5.4	4.7	4.7	5.4	5.1
		132	4.2	4.8	4.8	4.3	4.6	4.5	4.7
		Mean	4.6	4.7	5.1	4.5	4.7	5.0	4.9

Table 4 Blood chemistry - %Change to pre-dosing value

Test substance	Dose (mg/kg)	Animal No.	AST (%Change)						
			pre	1h	2h	4h	8h	20h	24h
AcPepA	2	111	100	123	132	175	260	225	252
		112	100	119	144	246	445	369	409
		Mean	100	121	138	211	353	297	331
	10	121	100	129	115	155	172	149	196
		122	100	97	106	149	170	121	153
		Mean	100	113	111	152	171	135	175
	30	131	100	99	103	127	204	146	160
		132	100	122	144	191	191	126	128
		Mean	100	111	124	159	198	136	144

Test substance	Dose (mg/kg)	Animal No.	ALT (%Change)						
			pre	1h	2h	4h	8h	20h	24h
AcPepA	2	111	100	104	94	106	134	133	136
		112	100	98	96	106	133	141	160
		Mean	100	101	95	106	134	137	148
	10	121	100	107	101	104	118	117	131
		122	100	99	101	110	115	118	130
		Mean	100	103	101	107	117	118	131
	30	131	100	97	103	99	119	112	114
		132	100	109	111	124	131	133	136
		Mean	100	103	107	112	125	123	125

Test substance	Dose (mg/kg)	Animal No.	ALP (%Change)						
			pre	1h	2h	4h	8h	20h	24h
AcPepA	2	111	100	102	94	97	109	97	100
		112	100	98	96	98	100	86	93
		Mean	100	100	95	98	105	92	97
	10	121	100	107	101	101	106	96	99
		122	100	99	98	105	102	95	99
		Mean	100	103	100	103	104	96	99
	30	131	100	99	106	101	100	96	98
		132	100	105	103	112	108	99	100
		Mean	100	102	105	107	104	98	99

Test substance	Dose (mg/kg)	Animal No.	LDH (%Change)						
			pre	1h	2h	4h	8h	20h	24h
AcPepA	2	111	100	151	185	215	364	256	355
		112	100	133	172	268	349	242	264
		Mean	100	142	179	242	357	249	310
	10	121	100	123	151	186	203	146	218
		122	100	126	168	284	334	175	244
		Mean	100	125	160	235	269	161	231
	30	131	100	98	102	115	136	123	131
		132	100	129	178	258	179	113	113
		Mean	100	114	140	187	158	118	122

Table 4 Blood chemistry - %Change to pre-dosing value (continued)

Test substance	Dose (mg/kg)	Animal No.	$\gamma$ -GTP (%Change)						
			pre	1h	2h	4h	8h	20h	24h
AcPepA	2	111	100	102	94	94	107	106	106
		112	100	93	90	95	95	88	93
		Mean	100	98	92	95	101	97	100
	10	121	100	105	101	96	103	97	99
		122	100	98	99	103	101	96	100
		Mean	100	102	100	100	102	97	100
	30	131	100	99	105	98	96	95	96
		132	100	103	100	107	103	100	102
		Mean	100	101	103	103	100	98	99

Test substance	Dose (mg/kg)	Animal No.	CK (%Change)						
			pre	1h	2h	4h	8h	20h	24h
AcPepA	2	111	100	265	478	995	3604	3004	4163
		112	100	937	2940	10684	15459	5636	5084
		Mean	100	601	1709	5840	9532	4320	4624
	10	121	100	180	416	1192	1880	620	1461
		122	100	280	609	1965	2235	660	1096
		Mean	100	230	513	1579	2058	640	1279
	30	131	100	73	65	575	845	158	162
		132	100	194	375	903	494	94	78
		Mean	100	134	220	739	670	126	120

Test substance	Dose (mg/kg)	Animal No.	Mb (%Change)						
			pre	1h	2h	4h	8h	20h	24h
AcPepA	2	111	100	227	297	624	712	144	293
		112	100	1005	1625	1714	1075	113	126
		Mean	100	616	961	1169	894	129	210
	10	121	100	152	271	404	366	120	241
		122	100	203	346	459	290	82	182
		Mean	100	178	309	432	328	101	212
	30	131	100	110	124	982	356	98	144
		132	100	173	341	371	162	49	51
		Mean	100	142	233	677	259	74	98

Test substance	Dose (mg/kg)	Animal No.	K (%Change)						
			pre	1h	2h	4h	8h	20h	24h
AcPepA	2	111	100	83	70	70	90	83	80
		112	100	105	105	110	90	115	93
		Mean	100	94	88	90	90	99	87
	10	121	100	129	100	124	131	131	118
		122	100	94	111	107	87	102	87
		Mean	100	112	106	116	109	117	103
	30	131	100	92	108	94	94	108	102
		132	100	114	114	102	110	107	112
		Mean	100	103	111	98	102	108	107

Table 5 Gross pathological findings

Findings	Test substance		AcPepA				
	Dose (mg/kg)	2	10		30		
	Animal No.	111	112	121	122	131	132
Injection site (subcutaneous)							
Dark red spot		+	+	+	+	+	+

+: Present.

Table 6 Histopathological findings

Findings	Test substance		AcPepA				
	Dose (mg/kg)	2	10		30		
	Animal No.	111	112	121	122	131	132
Liver							
Increase, neutrophil, sinusoid		0	0	0	0	0	1
Deposition, brown pigments, Kupffer cell		1	0	0	0	1	0
Microgranuloma (mainly macrophages)		0	0	0	0	0	1
Increase, vacuolated cell, sinusoid		0	1	1	0	0	0
Heart							
Cellular infiltration, mononuclear cell, right ventricle, focal		1	0	1	0	0	0
Cellular infiltration, mononuclear cell, left ventricle, focal		1	0	1	0	1	0
Degeneration, myocardium, right ventricle, focal		1	0	0	0	0	0
Degeneration/necrosis, myocardium, left ventricle, focal		1	1	1	1	1	0
Muscle		0	0	0	0	0	0

0: No change, 1: Very slight, 2: Slight, 3: Moderate, 4: Marked.

## アナフィラトキシン C5a 阻害ペプチドの抗炎症機序の解析

分担研究者 岡田則子 名古屋市立大学医学研究科

研究協力者 朝井鈴佳、牧優希、小田中瑞夕

**研究要旨** 我々の開発した相補性ペプチド創出技術を用いて補体 C5a アナフィラトキシンをターゲットとしてその活性を阻害できる相補性ペプチド候補の検討をおこなってきた。その結果、阻害活性ペプチド AcPepA および AmidPep11 を見いだしており、その阻害する生物活性のさらなる検討を進めた。その結果、AcPepA はヒト好中球分画を用いての C5a 刺激による細胞内 Ca 濃度の上昇の阻止活性や、敗血症のリスク因子である炎症性サイトカイン IL-6 や TNF- $\alpha$  の放出の阻害活性があることが確認された。

### A 研究目的

生体内に微生物感染などが生じた場合、それらを異物として認識し、排除するための様々な生体防御反応が生ずる。このうちの1つが、血液中の補体の活性化である。補体が活性化すると中間産物として C5a が産生され、これがマスト細胞からのヒスタミン放出を刺激し、血管透過性を高めたり、好中球やマクロファージを活性化して炎症局所に遊走、集積させ、IL-6 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインを放出させる機能を持つ。これらの機能は、通常の生体防御において重要であるが、重度の感染症やアレルギー反応などが原因で、C5a が過剰産生されるとアナフィラキシーショックや敗血症などを引き起こすと考えられる。そこで、この事態を防ぐ為に C5a 阻害ペプチドの開発を行って来た。それらのうち、PepA および Pep11 は C5a の活性部位のひとつである PL37 部分に対する相補性ペプチドであり、PL37 に結合してその活性を制御することが期待されている。さらに C5a 阻害ペプチド AcPepA は、これまでにサルのエンドトキシンショック死を完全に回避させたり、新生児ブタの CLP ショックを有意

に抑制できることが判明しているので、さらなるアナフィラトキシン C5a 制御の病理生理学的意義を *in vitro* で検討することを目的とした。

### B 研究方法

#### Complementary Peptides

阻害ペプチドとしては、PepA の N 末端をアセチル化した AcPepA および C11 の C 末端をアミド化した AmidC11 を使用した。PepA のアセチル化により阻害活性が上昇する事がモルモットの皮内反応など *in vivo* 解析で確認されている。また、AmidC11 もブタ CLP 実験で効果が認められている。

#### Ca mobilization in Neutrophils

好中球膜上の C5aR に C5a が結合すると、細胞内シグナル伝達を介した小胞体からの Ca 放出や、Ca チャネルを介した Ca 流入が起こり、細胞内 Ca 濃度が上昇する。このことから、C5a や C5a 阻害ペプチドにより、好中球内に見られる Ca 濃度変化を測定した。

<操作方法>

採血後、好中球分離

↓  
 Fura2-AM をロード  
 ↓  
 poly-L-lysine-coated 4well slide glass に  
 400 μ /well で播く  
 ↓  
 4°C, 1h, incubate 後 ARGUS HiSCA  
 Calcium imaging system にて C5a 及び阻害ペ  
 プチドを添加した場合の細胞内 Ca 濃度の変動を  
 測定した。

### Expression of CD11b on Neutrophils

好中球膜上に存在する CD11b はインテグリン  
 $\alpha$  M 鎖として知られ、好中球上では CD18 ととも  
 に Mac-1(CD11b/CD18,CR3)を形成する。C5a  
 や LPS による刺激によってその発現が増強され  
 るとの報告があるので、好中球膜上の CD11b 発  
 現量を測定した。

#### <操作方法>

採血後、サンプルを添加  
 37°C, 30min incubate  
 ↓  
 白血球分離  
 ↓  
 FITC 標識された  $\alpha$ -CD11b 抗体を添加  
 ↓  
 CD11b に結合した抗体の量をフローサイトメ  
 ターにて測定

### Cytokine release from Neutrophils

C5a は好中球に働きかけ炎症性サイトカインの  
 放出を引き起こし、炎症反応を増悪させる。特に、  
 IL-6, TNF- $\alpha$  は好中球から産生されることが分

かっている、これらのサイトカインレベルが  
 AcPepA により抑制されるか検討した。

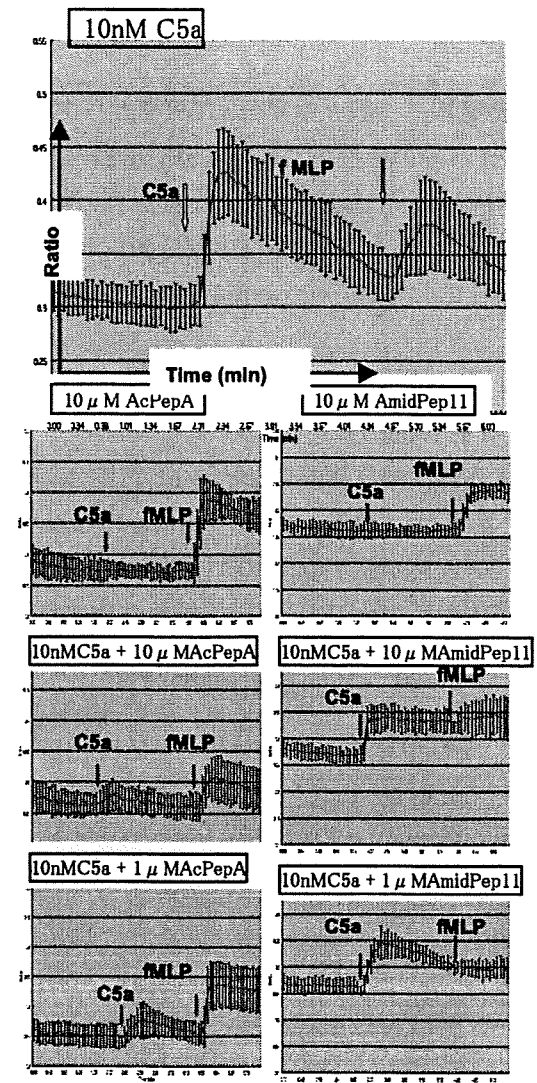
#### <操作方法>

採血後、好中球分離  
 ↓  
 サンプルを添加  
 37°C, 24h incubate  
 ↓  
 上清中のサイトカインレベルを測定

## C 実験結果

### ①

AcPepA は濃度依存性に好中球内 Ca 濃度を抑  
 制することが確認できた。一方、AmidPep11 の抑  
 制効果は AcPepA より軽度であった。

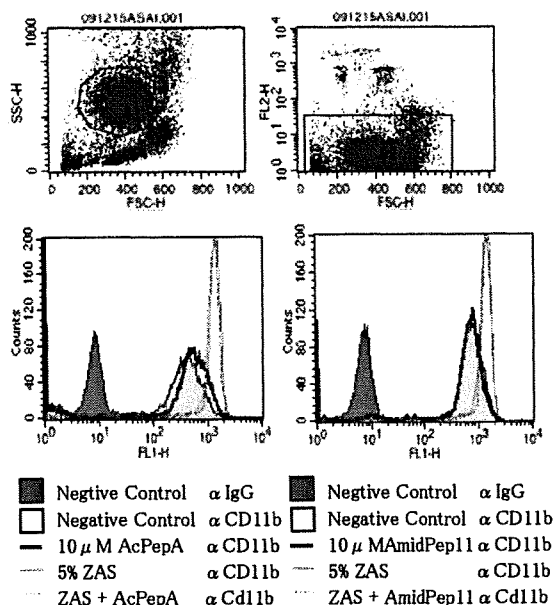


### ②

ヒト末梢血の好中球分画における C5a 刺激によ  
 る CD11b 発現変化に及ぼす阻害ペプチドの影響  
 を FACS 解析にて検討した。その結果、  
 AcPepA, AmidPep11 ともに、C5a 刺激による  
 CD11b 発現の増強を抑制する効果は見られな  
 かった。

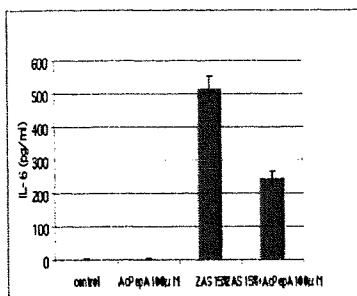


\* ZAS(=Zymosan Activated Serum)を C5a source として用いた。

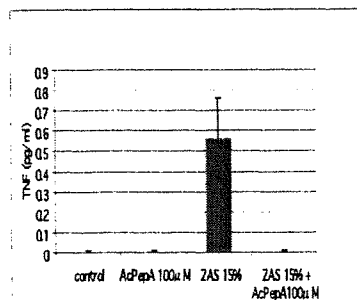


③

**Concentration of IL-6**



**Concentration of TNF-α**



\* X軸: 左から順に control, AcPepA100 μ M, ZAS15%, AcPepA + ZAS。Y軸: 濃度  
AcPepA は好中球から放出される IL-6, TNF-α

の量を抑制した。

#### D 考察

AcPepA は好中球の細胞内 Ca 濃度上昇とサイトカイン放出の実験において、優れた抑制効果が得られた。

抑制効果が見られなかった CD11b 発現量の実験に関しては、C5a と阻害ペプチドの解離、血中の分解酵素による阻害ペプチドの分解が考えられるので、血中でのペプチド濃度を一定に保てる様な添加方法を検討する必要がある。また、AmidPep11 は濃度の再検討が必要である。

#### E 結論

アナフィラトキシン阻害ペプチドは C5a 存在下で好中球より放出される炎症性サイトカインの放出を阻害できることが確認された。これまでに敗血症動物モデルで確認されている炎症性サイトカインの放出には好中球が介在することが示唆されており、今回直接的なエビデンスが得られた。また、C5a のレセプターは2種類存在する事が明らかとなっており、特に HMGB1 放出には第2レセプターの存在が重要であるという報告もあり、これらのレセプターへの阻害ペプチドの関与を明らかにすることが必要と考える。

#### G 研究発表

##### 1 論文発表

- 1 岡田則子 アンチセンスペプチド理論より創出したアナフィラトキシン阻害相補性ペプチド Nagoya Medical Journal 50:101-105(2009)
- 2 Mohamed Hamed Hussein, Shin Kato, Tatenobu Goto, Ghada A. Daoud, Tetsuya, Ineko Kato, Satoshi Suzuki, Hajime Togari, Masaki Imai, Noriko Okada, Hidechika Okada An Acetylated Anti-C5a complementary peptide reduced cytokines and free radicals and prolongs survival time in a neonatal sepsis model. Mol Immunol 46:2825, 2009
- 3 Asai, S., Kimbara, N., Tada, T., Imai, M., Campbell, W., Okada, H., Okada, N. Procarboxypeptidase R deficiency Causes

increased lethality in concanavalin A-induced Hepatitis in female mice. *Bio. Pharm. Bull.* 2010 (in press)

4 Farkas, I., Varju, P., Hrabovszky, E., Okada, N., Okada, H., Liposits, Z. Estrogen enhances expression of the complement C5a receptor and the C5a-agonist evoked calcium influx in hormone secreting neurons of the hypothalamus. *Neurochemistry Int.* 2008, 52: 846-856

5 Ohi, H., Tamano, M., Okada, N. Low CR1 (C3b receptor) level on erythrocytes associates with poor prognosis in hemodialysis patients. *Nephron Clinical Practice* 2008, 108: c23-c27

5 Hau, L., Campbell, W., Okada, H., Calpio, C., A., D., Imai, M., Okada, N. Designing complementary peptides with a genetic algorithm to a 10 amino acid peptide of the c-terminal of C5a anaphylatoxin. *Nagaya Med. J.* 2008, 49: 219-233

6 今井優樹、岡田則子 相補性ペプチドによる炎症の制御 *臨床検査* 52:917-920(2008)

## 2 学会発表

1 Tokodai, K., Goto, M., Inagaki, A., Nakanishi, W., Okada, N., Okada, H., Satomi, S. Interruption of a cross-talk between the complement and coagulation cascade improves early outcomes after intraportal islet transplantation XXIII International Congress of the Transplantation Society Aug 15-19, 2010 Vancouver

2 Tokodai, K., Goto, M., Inagaki, A., Nakanishi, W., Okada, N., Okada, H., Satomi, S. A strong candidate approach to prevent the instant blood-mediated inflammatory reaction in clinical

islet transplantation Joint Meeting on IPITA-XTA 2009 Oct 12-16, 2009 Venice

3 Mohamed Hamed Hussein, Shin Kato, Tatenobu Goto, Ghada A. Daoud, Tetsuya, Ineko Kato, Satoshi Suzuki, Hajime Togari, Masaki Imai, Noriko Okada, Hidechika Okada An Acetylated Anti-C5a complementary peptide reduced cytokines and free radicals and prolongs survival time in a neonatal sepsis model 12<sup>th</sup> European Meeting on Complement in Human Diseases September 5-8, 2009 Visgrad *Mol Immunol* 46:2825, 2009

4 Mizuno, T., Mizuno, M., Morgan, B.P., Okada, N., Noda, Y., Yuzawa, Y., Matsuo, S., Ito, Y.

Specific collaboration between rat membrane complement regulators, Crry and CD59, protects peritoneum from damage by autologous complement activation in peritonealdialysate fluid. 12<sup>th</sup> European Meeting on Complement in Human Diseases September 5-8, 2009 Visgrad *Mol Immunol* 46:2859-2860, 2009

5 今井優樹、Verera JC, Atkinson C, 太田里永子、岡田則子、Rapiserdo M, Tmolinson S 腫瘍細胞上の補体制御因子による T 細胞応答の制御 第46回補体シンポジウム講演集 46:24 (2009)8/21-22福岡

6 戸子台和哲、後藤昌史、稲垣明子、中西渉、岡田則子、岡田秀親、里見進 C5a を標的とした補体阻害ペプチド AcPepA 導入による移植後早期膵島障害の抑制 第46回補体シンポジウム講演集 46:45-46(2009)8/21-22福岡

7 戸子台和哲、後藤昌史、稲垣明子、中西渉、岡田則子、岡田秀親、里見進 C5a を標的とした補体阻害ペプチド AcPepA 導入による移植後早期膵島障害の抑制 第45回に本移植学会抄

録集 45:38(2009)

8 Okada, H., Ono, F., Terao, K., Okada, A., Asai, S., Campbell, W., Mizue, Y., Suzuki, K., and Okada, N. C5a anaphylatoxin inhibitor suppresses a lethal cytokine storm in monkeys injected with LPS. XXII international Complement Workshop Sept.28-Oct.2, 2008 Basel Molecular Immunology 45:4113, 2008

9 Tokodai, K., Goto, M., Imura, T., Kurokawa, Y., Okada, N., Okada, H., Satomi, S. C5a inhibitory peptide AcPepA is a clinically available candidate for preventing rapid loss of intraportally transplanted islets. XXII international Complement Workshop Sept.28-Oct.2, 2008 Basel

10 Okada, N. C5a anaphylatoxin inhibitor suppresses a lethal cytokine storm in monkeys injected with LPS. 12<sup>th</sup> Microbiology and Immunology conference of the Lioning medical association Oct.18-20, 2008 Donjuan 12; 2, 2008

11 岡田則子 アンチセンスペプチド理論の応用により創出したアナフィラトキシン阻害相補性ペプチドの研究 第59回名古屋市立大学医学会総会講演要旨 59:13(2008)12/7 名古屋 特別講演

## H 知的財産権の出願登録状況

### 1 特許取得

『アナフィラトキシン C5a を不活性化するペプチド』特許権者:岡田秀親、岡田則子 特許第4106691号 平成20年4月11日

### 2 実用新案、その他

なし

アナフィラトキシン阻害ペプチドの活性分析に関する研究

研究分担者 今井 優樹 名古屋市立大学医学研究科

研究要旨 補体成分 C5a が過剰産生されるとアナフィラキシーショックや敗血症などを引き起こすため、敗血症治療薬として C5a の相補性阻害ペプチドである AcPepA が開発された。臨床開発にあたり、このペプチドの C5a 阻害ペプチド活性を *in vitro* で簡便に測定する方法を検討した。

A. 研究目的

C5a の相補性阻害ペプチドの開発にあたり、このペプチドによる C5a 機能阻害活性を簡便に測定することは重要な課題である。そこで、好中球の C5a レセプターの下流シグナルを中心に、AcPepA の C5a 阻害活性を検討した。

B. 研究方法

好中球膜上の C5aR に C5a が結合すると、細胞内シグナル伝達を介した小胞体からの Ca 放出や、Ca チャネルを介した Ca 流入が起こり、細胞内 Ca 濃度が上昇する。このことから、C5a や C5a 阻害ペプチドにより、好中球内に見られる Ca 濃度変化を測定した。Ca 指示薬として Fura-2-AM を用いた。採血後、好中球を分離した後、Fura2-AM をロードした。37 度で 30 分インキュベートした後、poly-L-lysine-coated 4well slide glass に 400  $\mu$ /well で播いたのち、ARGUS HiSCA Calcium imaging system で測定を行った。また、単球右傾培養細胞である U937 においても同様に測定を行った。

さらに、C5a は好中球に働きかけ炎症性サイトカインの放出を引き起こし、炎症反応を増悪させる。特に、IL-6, TNF- $\alpha$  は好中球から産

生されることが分かっているので、これらのサイトカインを測定した。採血後、好中球を分離した後、サンプルを添加し、37 度で 24 時間インキュベートし、上清中のサイトカインレベルをそれぞれの ELISA kit で測定した。

C. 研究結果

AcPepA は以前の結果と同様に、濃度依存性に好中球内 Ca 濃度を抑制することが確認できた。次に、同ロットの AcPepA による好中球から放出される炎症性サイトカインを調べたところ、C5a が多く含まれる 15% ザイモザン活性化血清では平均約 520pg/ml の IL-6 が産生されたのに対して、AcPepA 処置群は平均約 250 pg/ml と 50% 以上 IL-6 産生抑制した。同様に TNF- $\alpha$  産生量においても 15% ザイモザン活性化血清処置により平均約 0.5pg/ml が産生されたのに対して、AcPepA 処置群は検出限界以下であった。

D. 考察

AcPepA は好中球の細胞内 Ca 濃度上昇だけでなく、炎症性サイトカインの放出においても、強力な抑制活性が認められ、AcPepA を大量合成し

た際の異なるロットにおける活性の違いなどを測定するのに有効であると考えられた。

#### E. 結論

症性サイトカイン IL-6 及び TNF- $\alpha$  の ELISA による測定は、AcPepA の活性分析に有効であることが示唆された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Asai S, Kimbara N, Tada T, Imai M, Campbell W, Okada H, Okada N, Procarboxypeptidase R Deficiency Causes Increased Lethality in Concanavalin A-induced Hepatitis in Female Mice. *Biol Pharm Bull.*, in press
2. Mizutani M, Ito Y, Mizuno M, Nishimura H, Suzuki Y, Hattori R, Matsukawa Y, Imai M, Oliver N, Goldschmeding R, Aten J, Krediet RT, Yuzawa Y, Matsuo S, Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) is increased in peritoneal dialysis patients with high peritoneal solute transport rate. *Am J Physiol Renal Physiol.* 298: F721-733 (2010)
3. Okada N, Tsukamoto Y, Adachi K, Handharyani E, Soejoedono RD, Imai M, Okada A, Okada H, Rescue with an anti-inflammatory peptide of chickens infected H5N1 avian flu. *Nature Precedings*

##### 2. 学会発表

1. Hussein MH, Kato S, Goto T, Daoud GAH, Kato I, Suzuki S, Togari H, Hashimoto T, Imai

M, Okada N, Okada H. An acetylated anti-C5a complementary peptide reduced cytokines and free radicals and prolongs survival time in a neonatal sepsis model. 12th European Meeting on Complement in Human Disease, September 5th - 8th, 2009, Visegrád, Hungary

2. Imai M, Varela JC, Atkinson C, Ohta R, Okada N, Rapisardo M, Tomlinson S, Modulation of protective T cell immunity by complement inhibitor expression on tumor cells. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会記録 p 123, 2009 年 12 月 2-4 日、大阪

3. 太田里永子, 今井優樹, Characterization of CTL downmodulation in patients with Chronic Active EpsteinBarr virus Infection (CAEBV). 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会記録 p 246, 2009: 246. 2009 年 12 月 2-4 日、大阪

4. 今井優樹, Varela JC, Atkinson C, 太田里永子, 岡田則子, Rapisardo M, Tomlinson S, 腫瘍細胞上の補体制御因子による T 細胞応答の制御. 第 46 回補体シンポジウム抄録集 p 24, 2009 年 8 月 21-22 日, 福岡

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

AcPepAの安定性及び代謝物に関する研究

研究分担者 前田康博 名古屋市立大学大学院薬学研究科

研究要旨 C5a アナフィラトキシン阻害相補性ペプチドである AcPepA の EDTA 血漿中での安定性を検討した。また生体中における AcPepA の代謝物を同定した。

A 研究目的

AcPepA は生体中での分解速度が非常に速い（半減期約 2 分）。血漿中 AcPepA の安定性を調べ保存条件の検討を行う。また、代謝物を同定し、AcPepA の体内動態を調べることを目的とする。

B 研究方法

ヒト EDTA 血漿に AcPepA を加え、0, 25, 37 °C で incubate した。これまでに確立した HPLC-MS/MS 法により経時的に定量し、AcPepA の安定性を検討した。

ラットに AcPepA を 5mg/Kg で急速静注後、経時的に採血し、1mM EDTA 水溶液に加え氷冷した。HPLC-MS/MS により代謝物を同定し、AcPepA およびその代謝物の動態を検討した。

C 実験結果

0, 25, 37 °C での EDTA 血漿中 AcPepA の半減期は 3.2 日, 2.8 時間, 1.1 時間であった。

ラットにおける AcPepA の代謝物は MS/MS において  $m/z$  679.78 > 1030.0 及び 1104 > 608.1 が検出された。これらは AcPepA の C 末端からアミノ酸が 2 つ脱離

したペプチド(15AA)または 4 つ脱離した (13AA)であると同定された。これらのペプチドは AcPepA 投与後すぐに生成し始め 50-70 秒で最大濃度となった後、減少した。15AA の半減期は約 1 分, 13AA の半減期は約 6 分であった。これらのペプチドは更に切断され代謝されると考えられる。

D 考察

AcPepA は体内において非常に速く分解がされるが、EDTA 血漿中 0 °C では半減期 3 日程度と比較的安定である。また AcPepA は体内で C 末端のアミノ酸がペプチダーゼの作用によって切断されていくと考えられる。以上から、EDTA が金属イオンをキレートすることでペプチダーゼが阻害され安定に存在したと考えられる。

E 結論

血中 AcPepA 分析を行うには、EDTA 血漿とし-20 °C 以下で保存する。

AcPepA はペプチダーゼにより速やかに代謝される。

Rescue with an anti-inflammatory peptide of chickens infected H5N1 avian flu.

Noriko Okada<sup>1</sup>, Yasuhiro Tsukamoto<sup>2</sup>, Kazuhide Adachi<sup>2</sup>, Ekowati Handharyani<sup>3</sup>, Retno Damajanti Soejoedono<sup>3</sup>, Masaki Imai<sup>1</sup>, Alan Okada<sup>4</sup>, and Hidechika Okada<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya 467-8601, Japan, <sup>2</sup>Kyoto Prefectural University, Laboratory of Animal Hygiene, Graduate School of Biology and Environmental Sciences, Kyoto Prefecture University, Kyoto 606-8522, Japan, <sup>3</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Bogor Agriculture University, Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680 Indonesia, and <sup>4</sup>Institute for Protein Science Co., Nagoya 467-0803, Japan

Chickens suffering from avian flu caused by H5N1 influenza virus are destined to die within 2 days due to a systemic inflammatory response. Since HVJ infection (1,2) and influenza virus infection (3,4) cause infected cells to activate homologous serum complement, the systemic inflammatory response elicited could be attributed to the unlimited generation of C5a anaphylatoxin of the complement system, which is a causative peptide of serious inflammation. In monkeys inoculated with a lethal dose of LPS (4 mg/kg body weight), inhibition of C5a by an inhibitory peptide termed AcPepA (5) rescued these animals from serious septic shock which would have resulted in death within a day (6). Therefore, we tested whether AcPepA could also have a beneficial effect on chickens with bird flu. On another front, enhanced production of endothelin-1 (ET-1) and the activation of mast cells (MCs) have been implicated in granulocyte sequestration (7). An endothelin receptor derived antisense homology box peptide (8) designated ETR-P1/fl was shown to antagonize endothelin A receptor (ET-A receptor) (9) and reduce such inflammatory responses as endotoxin-shock (10) and hemorrhagic shock (11), thereby suppressing histamine release in the circulation (12). Thus, we also administered ETR-P1/fl to bird flu chickens expecting suppression of a systemic inflammatory response.

Although AcPepA treatment of bird flu chickens had no beneficial effect, ETR-P1/fl administration rescued all chickens from the lethal inflammatory response (Table 1). ET-1 release is involved in histamine liberation and subsequent secondary granulocyte accumulation through tissue-specific activation of ET-A receptors. The direct effect of ET-1 induction is mainly pulmonary neutrophil activation, although MC-associated secondary changes are important in intestinal granulocyte recruitment (13). Therefore, ET-1-induced inflammation was lethal to the bird flu chickens but suppression of the ET-1 response by ETR-P1/fl rescued the infected birds from inevitable death.

Although AcPepA is a complementary peptide generated to target a portion of human C5a (aa 37-53) inhibiting its function, it might not be reactive to chicken C5a, and could fail to inhibit a cytokine storm in the virus-infected chickens. Therefore, the ineffectiveness of AcPepA on H5N1 influenza virus does not suggest that C5a inhibition could not be used as a therapeutic strategy for virus-infected patients.

On the other hand, another anti-inflammatory peptide, ETR-P1/fl, inhibited the induction of lethal symptoms following infection with H5N1 influenza virus. ETR-P1/fl could interfere with chicken endothelin activity, indicating that inhibition of the endothelin effect could be a promising therapy for treatment of patients suffering from bird flu infection resulting in serious pneumonia. Not only ETR-P1/fl, but other inhibitory agents of endothelin as well could become candidates for the therapeutic treatment of H5N1 influenza virus infection.

#### References

- 1) Okada, N., Shibuta, H. and Okada, H. Activation of the alternative pathway of guinea pig complement by Sendai virus treated cells. *Microbiol. Immunol.* 23: 689-692 (1979)
- 2) Okada, H. and Okada, N. Sendai virus infected cells are readily cytolysed by guinea pig complement without antibody. *Immunology* 43: 337-344 (1981)
- 3) Okada, N., Yoshida, Y., Furuya, Y., Ohtani, T. and Okada, H. Induction by influenza virus infection and reduction by Rubella virus infection of nonspecific complement activating ability of cell. *Proc. Japanese Immunology Congress* 9: 301-302 (1979)
- 4) Yoshida, Y., Furuya, Y., Okada, N. and Okada, H. Nonspecific complement activation by influenza virus infected cells. *Proc. Japanese Virology Congress*, 27:164 (1979)
- 5) Okada, N., Asai, S., Hotta, A., Miura, N., Ohno, N., Farkas, I., Hau, L. and Okada, H. Increased inhibitory capacity of an anti-C5a complementary peptide following acetylation of N-terminal alanine. *Microbiol. Immunol.* 51, 439-443. (2007)
- 6) Okada, H., Ono, F., Terao, K., Okada, A., Asai, S., Campbell, W., Mizue, Y., Suzuki, K. and Okada, N. C5a anaphylatoxin inhibitor suppresses a lethal cytokine storm in monkeys injected with LPS. *Mol. Immunol.* 45; 4113 (2008)
- 7) Wu, X., Richards N.T., Johns, E.J., Kohsaka, T., Nakamura, A. and Okada, H. Influence of ETR-p1/fl antisense peptide on endothelin-induced constriction in rat renal arcuate arteries. *Br. J. Pharmacol.* 122:316-320, (1997)
- 8) Baranyi, L., Campbell, W., Ohshima, K., Fujimoto, S., Boros, M. and Okada, H. The antisense homology box: a new motif within proteins that encodes biologically active peptides. *Nature Med.* 1: 894-901 (1995)



- 9) Baranyi, L., Campbell, W., Ohshima, K., Fujimoto, S., Boros, M., Kaszaki, J. and Okada, H. Antisense homology box derived peptides represent a new class of endothelin receptor inhibitors. *Peptides*, 19: 211-223 (1998)
- 10) Battistini B, Forget M-A, Laight D. Potential roles for endothelins in systemic inflammatory response syndrome with particular relationship to cytokines. *Shock* 5: 167-83 (1996)
- 11) Szalay L, Kaszaki J, Nagy S, Boros M. The role of endothelin-1 in circulatory changes during hypodynamic sepsis in the rat. *Shock* 10: 123-8 (1998)
- 12) Kaszaki, J., Czobel, M., Szalay, L., Nagy, S. and Boros, M. Endothelin-1 induces organ-specific histamine liberation and neutrophil granulocyte accumulation in the rat. *Inflamm. Res.* 57: 396-402 (2008)
- 13) Boros, M., Massberg, S., Baranyi, L., Okada, H. and Messmer, K. Endothelin 1 induces leukocyte adhesion in submucosal venules of the rat small intestine. *Gastroenterology*, 114: 103-114 (1998)

**Table 1**

Treatment	Number of animals	Number of survivors		
		on day 1	on day 2	on day 3
H5N1 IV* only	5	5	0	0
H5N1 IV + AcPepA (2mg/kg) <sup>§</sup>	5	5	0	0
H5N1 IV + ETR-P1/fl (0.2mg/kg) <sup>#</sup>	5	5	5	5 <sup>#</sup>

\* H5N1 influenza virus (H5N1 IV) preparation at  $10^{5.3}$  TCID<sub>50</sub> consisted of a culture supernatant of infected MDCK cells in GIT medium. Male chickens weighing 80 g (10 days of age) were intranasally inoculated with 0.2 ml of the H5N1 IV preparation on day 0.

<sup>§</sup>Following the virus inoculation, 0.08 ml of AcPepA (2 mg/ml in saline) were injected intramuscularly into the femoral region at a concentration of 2 mg/kg body weight. The same dose of AcPepA was injected on day 1 and day 2 as well.

<sup>#</sup> The two chickens used for ETR-P1/fl (0.2 mg/ml in saline) treatment were injected with 0.08 ml of the agent only on day 0, and the other 3 chickens were injected on day 1 and day 2 as well. All the ETR-P1/fl-treated chickens survived beyond 3 days.

## DESIGNING COMPLEMENTARY PEPTIDES WITH A GENETIC ALGORITHM TO A 10 AMINO ACID PEPTIDE OF THE C-TERMINAL OF C5A ANAPHYLATOXIN.

LEWIS HAU<sup>1,3</sup>, WILLIAM CARMPELL<sup>2</sup>, HIDECHIKA OKADA<sup>3</sup>, CARLOS ADLIEL DEL CARPIO<sup>3</sup>, MASAKI IMAI<sup>1</sup> and NORIKO OKADA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Immunology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya 467-8601, Japan.*

<sup>2</sup>*Biomime Solutions Inc., 4600 Westwater Drive Unit 421, Richmond B.C., Canada V7E6S2.*

<sup>3</sup>*Institute for Protein Science Co., Nagoya 467-0803, Japan.*

*(Accepted for publication January 29, 2008)*

---

### SUMMARY

Using a novel genetic algorithm, a computer program (COMPEP) has been designed to create peptides able to interact with a peptide target 10 amino acids in length. A computer learning methodology was used to select and inter-correlate a number of physicochemical parameters in order to evaluate the affinity of a pair of peptides, then this function was used as the "fitness function" in the genetic algorithm (GA) to select the best complementary amino acid sequences to a particular target sequence. A fragment of the C-terminal of C5a anaphyla-

---

ルイス ハウ, ウィリアム キャンベル, 岡田秀親, カルロス アドリアル デル カプリオ, 今井優樹, 岡田則子

Hidechika Okada, Institute for Protein Science, Co., Nakayama-cho 2-18, Mizuho-ku, Nagoya 467-0803, Japan

Phone: (+81) 52841-8921 Fax: (+81) 52853-5112

Mobile Phone: (+81) 706581-6837

E-mail: hideokada@chojuken.net

Abbreviations: c-peptide, complementary peptide; C5a, C5a anaphylatoxin; C5a decapeptide, C5a C-terminal 10 amino acids long fragment, Fmoc, Fluorenylmethyloxycarbonyl; HOBT, N-hydroxybenzotriazole; DIC, N,NV-diisopropylcarbodiimide; DMF, N,NV-dimethylformamide; Pbf, 2, 2, 4, 6, 7-pentamethylidihydrobenzofuran-5-sulfonyl; BOC, t-butoxycarbonyl group; OtBU, t-butoxy; HRP, horse radish peroxidase. GA, genetic algorithm; PA, peptide affinity.

toxin (C5a-decapeptide) was chosen as the target sequence. Millions of potential complementary peptides (C-peptides) generated with the genetic algorithm were ranked according to physicochemical parameters during the evolutionary process. The parameters were altered for several runs. Peptides with the highest scores were selected and then synthesized by solid-phase peptide synthesis on a peptide array. Five hundred peptides were synthesized, and their ability to bind with the C5a-decapeptide was determined. Sixty nine of the peptides showed significant binding.

Keywords: C5a; complementary peptide; genetic algorithm; hydropathy

---

## INTRODUCTION

We previously generated a computer program, MIMETIC (7), which successfully generated complementary peptides (c-peptides) to HIV-1 reverse transcriptase (7), thrombomodulin (26) as well as a region of C5a (13). The complementary peptide to C5a named PepA efficiently blocked C5a activity, rescuing rats from lethal shock induced by a mAb to Crry (13), and acetylation of the N-terminal alanine of PepA increased inhibitory effect so as to inhibit skin inflammation by C5a (24). However, MIMETIC requires a target peptide sequence of at least 15 amino acids in length and preferably longer. Therefore we created a computer program COMPEP, which is able to work with target peptides of 10 amino acids or less in length. Using the genetic algorithm, COMPEP generated potential c-peptides in 10000 iterations and evaluated their physicochemical parameters. Scores were assigned to the peptides based on goodness of fit to the target. Since the relative importance (weight) of parameters considered in protein-protein interaction is not yet well established, several combinations of parameter scoring were tried (Table 1).

The fitness function in the genetic algorithm (GA) embedded in COMPEP has the form of the following expression:

$$PA = \sum_{j=1}^N (w_1 \Phi_1^{(j)} + w_2 \Phi_2^{(j)} + \dots + w_m \Phi_m^{(j)})$$

where PA is the peptide affinity,  $\Phi_i^{(j)}$  the difference in values of a particular physicochemical parameter between the generated amino acid sequence and the respective amino acid in the target sequence at position j;  $w_i$  the weight for the  $i^{\text{th}}$  physicochemical parameter, N the number of

TABLE 1. Combinations of weighting (W) of each parameter for different scoring systems used.

Combination of parameters weighting	Hydropathy (W <sub>h</sub> )	Charge (W <sub>c</sub> )	Bulkiness (W <sub>b</sub> )
1	100	0	0
2	100	10	10
3	100	20	10
4	100	30	10
5	100	40	10
6	100	50	10
7	100	60	10
8	90	10	10
9	90	20	10
10	90	30	10
11	90	40	10
12	90	50	10
13	90	60	10
14	80	10	10
15	80	20	10
16	80	30	10
17	80	40	10
18	80	50	10
19	80	60	10
20	70	10	10
21	70	20	10
22	70	30	10
23	70	40	10
24	70	50	10
25	70	60	10

amino acids in the target sequence and *m* the number of physicochemical parameters taken into account to compute the PA. Consequently, high values of PA mean high affinity of that peptide for the target peptide.

In this way, millions of potential c-peptide candidates generated by the genetic algorithm were ranked. Peptides with the best scores were selected and synthesized by solid-phase peptide synthesis (3) to determine if any of them could interact with the target peptide.

In this study we generated peptides able to interact with human complement anaphylatoxin C5a. C5a is a 74-aa peptide cleaved from complement factor 5 (C5) during complement activation (10, 14). C5a is a potent anaphylatoxin and induces a highly effective inflammatory response even at a concentration as low as  $10^{-11}$ M (15). Hyper-generation of C5a can lead to harmful inflammatory effects such as sepsis, psoriasis, asthma, rheumatoid arthritis and other debilitating conditions (2). C5a interacts with its receptor, C5aR (CD 88), at the middle