

2010/5052A

厚生労働科学研究費補助金
医療技術実用化総合研究事業

アナフィラトキシン阻害ペプチドの実用化推進研究
(H21 - トランス - 一般 - 003) に関する研究
平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 秀親

平成23(2011)年4月

目 次

I. 総括研究報告

アナフィラトキシン阻害ペプチドの実用化推進に関する研究 1

岡田秀親

(資料)

前臨床安全性試験結果報告書

LC/MS/MSによるサル血漿中 AcPepA 中濃度測定法バリデーション 31

AcPepA (MPS-390) の特性確認のためのバリデーション 59

AcPepA (MPS-390) のウサギにおける血管周囲刺激性試験 77

AcPepA (MPS-390) のカンクイザルにおける4週間反復静脈内投与毒性試験及び4週間回復性試験 98

AcPepA (MPS-390) (Lot No. 2K08045) の特性及び安定性試験 151

AcPepA (MPS-390) の特性確認のためのバリデーション 170

AcPepA (MPS-390) の特性及び安定性試験 213

調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度測定法バリデーション試験 229

AcPepA (MPS-390) ラットを用いる小核試験 254

II. 分担研究報告

1. 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 273

岡田則子

2. 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 278

今井優樹

3. AcPepA の安定性及び代謝物に関する研究 280

前田康博

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
（総括）研究報告書

アナフィラトキシン阻害ペプチドの実用化推進に関する研究

研究代表者 岡田 秀親 （医）さわらび会福祉村病院 先端医療担当副院長

研究要旨

C5a アナフィラトキシンは、敗血症や多臓器不全等の重篤な病態の要因のひとつである。C5a に対する抗体が盲腸結核穿孔腹膜炎モデルなどで有効性を発揮することが報告されている。我々は、C5a アナフィラトキシンに対して特異的に強い阻害作用を持つ 17 アミノ酸から成るペプチド PepA を創生した。PepA は分子比 1 : 10 で C5a の活性を抑制した。100% のラットがショック死を起こす動物実験モデルにおいて、PepA の静脈注射で全例を救命できた。PepA のアミノ末端（N 末）のアラニンをアセチル化した AcPepA はさらに強い効果を発揮することが分かった。致死量の LPS（4mg/kg）を投与したカニクイザルに AcPepA を静脈内持続投与する治療で 7 頭のサル全てを救命することができた。また、ブタ新生児の回盲部を結核穿孔して起こした致死的急性腹膜炎モデル（CLP モデル）でも救命効果を認めることができた。サイトカインの動態を解析し、C5a を阻害することにより、HMGB1 の放出を抑えサイトカインストームの悪循環が防がれることが分かった。重篤な敗血症患者の救命に AcPepA が有用であると考え、カニクイザルでの前臨床安全性試験で安全性の確認を行った。しかし、医師主導型トランスレーショナルリサーチで患者での救命効果を確認するためには、GLP 非臨床安全性試験が不可欠である。そこで、平成 22 年度事業としては、GLP 非臨床安全性試験を主要課題として、株式会社新日本科学にカニクイザルに対する 4 週間連続投与などの安全性試験を依頼して実施した。GLP 非臨床安全性試験で安全性の確認を得た段階で、名古屋市立大学病院、浜松医科大学治験センター、藤田保健衛生大学病院などの IRB に治験申請届を提出したい。

研究分担者氏名・所属機関名

岡田秀親	福祉村病院長寿医学研究所 先端医療担当副院長
奥田研爾	福祉村病院長寿医学研究所 研究所長
祖父江和哉	名市大院・医学研究科・危機管理医学 教授
岡田則子	名市大院・医学研究科・免疫学 教授
今井優樹	名市大院・医学研究科・免疫学 講師
太田里永子	名市大院・医学研究科・免疫学 助教
前田康博	名市大院・薬学研究科・分析化学 講師
西田 修	藤田保健衛生大学・医・侵襲制御医学 教授
加藤稲子	名市大院・医学研究科・新生児学 准教授

A. 研究の目的

我々は蛋白質ペプチド鎖内に、相互にアンチセンスペプチドとして対応する配列が常に存在することを発見し、アンチセンスホモロジーボックス (AHB) と命名した (Nature Med. 1: 894, 1995)。AHB部分のペプチド断片で蛋白質の機能を阻害できることも立証した (Peptides, 19:211, 1998; J. Immunol., 157: 4591, 1996; Microbiol. Immunol., 44: 205, 2000)。

その知見を基に任意のペプチド鎖に対する相補性ペプチドを自動設計するプログラムを考案し (特願2003-042731: 特許第4712282号)、それを活用してC5aアナフィラトキシン (特願2003-44850; 特許第4106691号) を特異的に阻害するペプチドを創生できた。

C5aアナフィラトキシンを阻害する相補性ペプチドであるPepAは分子比1:10でもC5aの活性を抑制した。さらに、ラットがショック死を起こす実験モデルにおいて、PepAの静脈注射で全例を救命できた (J. Immunol. 172: 6382, 2004)。PepAのN末アミノ酸をアセチル化したAcPepAはさらに強力な効果を発揮する。致死量のLPS投与でエンドトキシンショック病態のカニクイザルにAcPepAを投与することで救命できることも分かった。したがって、重篤な敗血症患者の救命にAcPepAが有用であると考えて、新たに特許を申請した (特願2008-288523「SIRS患者を救命するためのペプチド組成物」)。このC5a阻害ペプチドの臨床治療研究を行うため、前臨床安全性試験をカニクイザルでも実施し、急性毒性などの副作用のないことを確認した。しかし、治験を実施するためにはGLP非臨床

安全性試験が不可欠であるので、その実施が本年度事業の主要課題であった。その結果を基に、各施設のIRB (倫理委員会・治験審査委員会など)の承認を得たプロトコルで医師主導型臨床治療研究の実施を目指す。

B. 研究の方法

- 1) 前年度にスギ生物科学研究所(株)に委託して実施した前臨床安全性試験はNON-GLP試験であった。本年度は株式会社新日本科学に依頼してGLP前臨床 (非臨床) 安全性試験を実施する。4週間反復投与試験なども行い、急性毒性と慢性毒性のほかに、催奇性、発がん性についての解析も実施する。
- 2) 肺炎などで38℃以上の発熱をした感染患者の血漿を継続的に採取し、血漿中のサイトカイン等の他に、C5a、HMGB1などの推移を測定して、C5aと病態との関連性を解析する。
- 3) GLP前臨床安全性試験で安全性の確証がとれた段階で、正常人での安全性試験を実施するための実験計画を作成し福祉村病院及び名古屋市立大学病院のIRB (臨床試験審査委員会)に臨床研究実施の申請を行う。臨床治験登録 (社団法人日本医師会治験促進センター) はPhase I試験ID「JMA-IIA00027」で登録した (平成21年4月6日登録)。催奇性や発がん性のデータがそろっていない段階では、正常人被験者は50歳以上に限定して実施計画を立てる予定である。投与量の基準としては、カニクイザル及びブタ新生児で救命効果が確認

されている2mg/kg/hr とする。最初は、ボラスの1回投与とし、副作用などの所見を認めないことを確認したうえで、2mg/kg/hr の3時間継続投与試験を行う。

4) 健常人での安全性を確認できた段階で、SIRS (ゼプシス) 患者での臨床治療研究計画を福祉村病院および名古屋市立大学病院のIRBに提出し計画の承認を求める。

5) 重篤な感染症患者に対して、患者 (又は家族) が臨床実験治療を書面で了承して希望する場合には、IRB (倫理委員会・臨床試験審査委員会) の承認を得た上でトランスレーショナルリサーチとしてC5a阻害ペプチドであるAcPepAの投与を試みる。患者は50歳以上に限定して実施する。第一段階としては福祉村病院 (小橋修、奥田研爾) および名古屋市立大学病院 (祖父江和哉、戸荻創) において薬剤耐性菌により敗血症病態で重篤な患者に対して家族の書面による了解のもとにAcPepAを点滴静注液に添加して効果と副作用の詳細な解析を行う。AcPepAは従来の治療法に追加する形で点滴静注を行うが、その際、種々のモニターを活用して治療効果の情報を収集しながら患者の救命に当たる。ペプチド剤はcGMPレベルの製剤を(株)バイオロジカ社に委託合成したものを使用する。

(倫理面への配慮)

1) 各研究者が所属する研究機関に設置されている「動物実験委員会」又は「動物

倫理委員会」でのプロトコルの承認を前提とし、あわせて全体計画に対して「医薬基盤研究所・動物実験委員会」の承認を得た後に動物実験を開始する。

2) 個体レベルでの実験プロトコルの作成にあたっては、法律第105号「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守するとともに、「医薬基盤研究所・サル類を用いる実験指針」の精神に則り、苦痛軽減の具体策を詳細に記述する。

3) トランスレーショナルリサーチ (臨床研究) の実施に当たっては、インフォームドコンセントの方法も含めた実験治療計画書を作成し、夫々の実施施設である福祉村病院倫理委員会及び名古屋市立大学大学院医学研究科の倫理委員会でトランスレーショナルリサーチの承認を受ける。

C. 研究結果

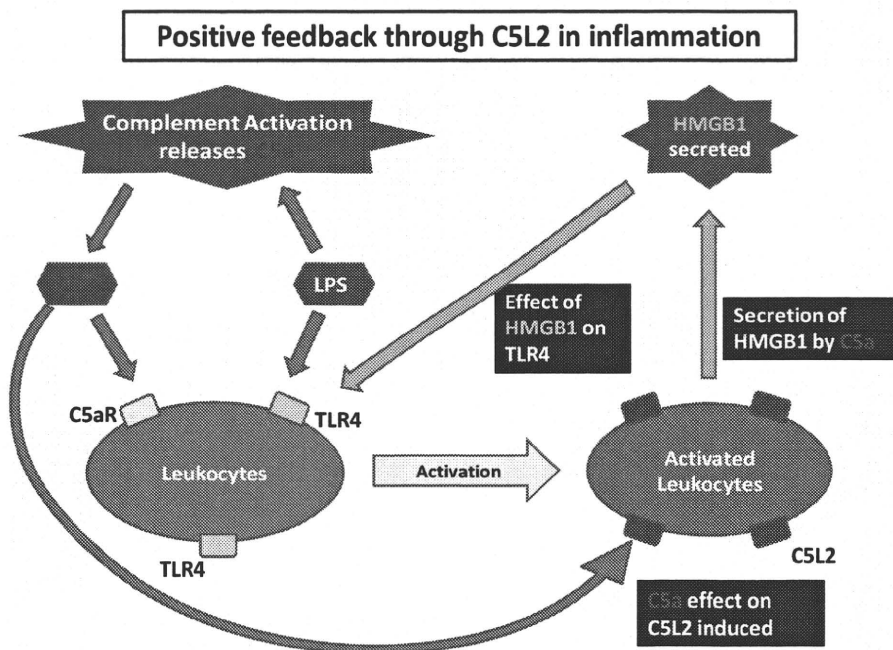
致死量のLPS (4mg/kg) を投与したカニクイザルにAcPepAを静脈内持続投与して治療したカニクイザルの血漿を解析したところ、AcPepAの投与でHMGB1の上昇が抑えられていることが分かった。また、ブタ新生児の回盲部を結紮穿孔して起こした致死的急性腹膜炎モデル (CLPモデル) でも救命効果を認めることができた (9時間で死亡するブタ新生児CLPモデルでcGMP-AcPepAの投与で24時間延命できた) が、この場合にもAcPepAの投与でHMGB1の上昇が抑えられていることが分かった。その他のサイトカインの動態を解析した結果、C5aを阻害することにより、HMGB1の放出を抑えサイトカインストームの悪循環を防ぐことが分かった。このような救命効果は抗酸

化剤、酵素阻害剤、ヘパリン、ステロイド等の現有治療剤では達成することができない。C5a は従来から知られていた C5a receptor (C5aR) の他に新たに発見された C5a 第二レセプターである C5L2 にも反応し、この刺激が炎症細胞に HMGB1 を放出させていると考えられた。

サル及びラットでの前臨床安全性試験で有害事象は検出されなかったため、福祉村病院倫理委員会の承認を得て健常人での安全性試験を実施した。健常人 6 名に付いて、インフォームドコンセントを充分行ったうえで、20 mg/kg AcPepA を生理食塩水に溶解 (120 mg/180 ml) して、

これを 2 時間かけて点滴静注を行った。心電図、血圧計、SpO₂、呼吸数などを継続的にモニターすると共に、採血を時間ごとに行い、生化学的検査及び血球検査等も実施した。LDH の上昇を若干認めた場合もあったが、それ以外には有害事象を認めなかった。詳細に解析したところミオグロビンの上昇を若干認めた場合もあったので、カニクイザルに AcPepA を投与して LDH やミオグロビンなどの解析を行うと共に、病理組織学的解析も実施しなおした。その結果、筋繊維に若干の炎症細胞の反応が認められたので、今後留意すべきポイントと考えられた。

【Fig. 1. C5a阻害ペプチドがサイトカインストームによる SIRS 発症を抑制する機序：白血球が活性化されると C5L2 が発現誘導され、C5a の作用で放出された HMGB1 が、TLR4 を再刺激してサイトカインストームの増悪フィードバック反応を起こす。C5a 阻害がこの反応を遮断する】



D. 考察

C5a アナフィラトキシン阻害ペプチドである AcPepA の投与により、致死的炎

症病態 (ゼプシス) にあるカニクイザルや CLP 処置ブタ新生児敗血症の病態を抑制できるメカニズムには HMGB1 の放出

抑制が重要であることが分かった。当初は、C5aを抑制することにより、C5aが白血球などの炎症細胞を刺激する作用をC5a 阻害ペプチドの AcPepA が抑えることにより過度な炎症を防ぐと考えていたが、TNF-alpha などの放出は殆ど抑制しない点が不可解であった。サイトカインなどの解析の結果、HMGB1 の上昇がAcPepA の投与で抑えられることが、LPS 投与カニクイザルでも CLP 処置ブタ新生児でも認められたので、C5a が C5aR に反応するのを AcPepA が抑制することよりも、C5a 第二レセプターである C5L2 に反応して、HMGB1 を放出させる作用を抑えることが重要であると考えに至った (Fig. 1 参照)。

白血球に LPS や C5a が作用すると白血球が活性化されて、C5a 第二レセプターの C5L2 を発現するようにさせる。白血球の C5L2 に C5a が反応すると HMGB1 を放出するので、その放出された HMGB1 が別の白血球の TLR4 に作用して白血球は TLR4 に LPS が作用したと同様に活性化され、更に C5L2 の発現を促進することになる。この循環が炎症増悪をもたらすサイトカインストームであるので、AcPepA が C5a を阻害することにより、この増悪循環を断ち切り、ゼプシスの様な過剰炎症反応病態を抑制して治療効果をあげると考えてよい。

健常人への AcPepA 投与では、LDH の若干の上昇を認める所見も見られたが、カニクイザルで AcPepA の大量投与 (15mg/kg) を行って検討したが、組織は間などの所見は認められなかった。今後の検討に於いては、LDH とミオグロビン

などの指標も注意深く解析する必要があると考えられる。

E. 結論

炎症細胞膜上に炎症時に発現誘導される C5L2 (C5a 第二レセプター) に C5a が反応すると HMGB1 の放出を起こさせ、炎症反応の増悪循環が起こる。この C5a の作用を AcPepA が抑制することにより HMGB1 の放出が抑制され、炎症増悪が防がれてゼプシス病態の治療に役立つと考えられる。

F. 健康危険情報

健常人に 180 ml の生理食塩水による点滴静注すると、軽度の LDH 上昇を認めることがあったが、それ以外には注目すべき有害事象は認められなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okada, N., Imai, M., Okada, A., Ono, F., Okada, H. HMGB1 release by C5a anaphylatoxin is an effective target for sepsis treatment. *Nature Precedings*, .5727.1 (2011)
- 2) Okada, H., Imai, M., Ono, F., Okada, A., Tada, T, Mizue, M., Terao, K. and Okada, N. Novel therapeutic agents designed as a complementary peptide to target molecules *Anticancer Res.* in press (2011)
- 3) Tokodai, K., Goto, M., Inagaki, A., Nakanishi, W., Nilsson, B., Okada, N., Okada, H., Satomi, S. Attenuation of the cross-talk between the complement and coagulation cascades by C5a blockade improves early outcomes after intraportal islet transplantation. *Transplantation* in press (2011)
- 4) Hussein, MH, Okada, H. et al. An acetylated anti-C5a complementary peptide reduced cytokines and free radicals and prolonged survival time in a neonatal sepsis model.: *Critical Care Medicine.* Submitted (2011)
- 5) 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, 3425.1 (2009)

- 6) Okada,H., Ono,F., Terao,K., Okada,A., Asai,S., Campbell,W., Mizue,Y., Suzuki,K., Okada,N. C5a anaphylatoxin inhibitor suppresses a lethal cytokine storm in monkeys injected with LPS. **Mol. Immunol.** 45: 4113 (2008)
- 7) Farkas, I., Varju,P., Szabo,E., 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.** 52:846-856 (2008)
- 8) Okada, N., Okada, H., et al. Increased inhibitory capacity of an anti-C5a complementary peptide following acetylation of N-terminal alanine. **Microbiol. Immunol.**, 51, 439-443 (2007)
- 9) Imai M., Baranyi L, Okada N., Okada H. Inhibition of HIV-1 infection by synthetic peptides derived CCR5 fragments. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 353, 851-856 (2007)
- 10) Fujita,E., Okada, H., Okada,N., et al. Inactivation of C5a anaphylatoxin by a peptide which is complementary to a region of C5a. **J. Immunol.** 172: 6382 -6388 (2004)
- 11) Farkas, I., Okada, N., Okada, H. et al. Complement C5a receptor-mediated signalling may be involved in neurodegeneration in Alzheimer's disease. **J. Immunol.** 170: 5764-5771 (2003)

2. 学会発表

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を標的とした補体因子ペプチド AcPepA導入による移植後早期膵島障害の抑制」
第 56 回補体シンポジウム 講演集 46:45-46 (2009)

岡田秀親 「アナフィラトキシン阻害ペプチドに付いての臨床研究と臨床治験」

第 56 回補体シンポジウム 講演集 46:47 (2009)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 「アナフィラトキシン C5a を不活性化するペプチド」発明者：岡田秀親・岡田有武、出願日：2005年3月30日(特願2005-97238)、特許第4362780号(平成21年8月28日登録) 特許権者：(株)蛋白質科学研究所

2) 「トロンボモジュリンを不活性化するペプチド」発明者：岡田秀親、岡田則子、出願日：2003年2月28日、特願2003-10226、出願人：岡田秀親、岡田則子

5) 「HIV-1感染抑制作用を有するアンセンスペプチド」発明者：岡田秀親、岡田則子、今井優樹、出願日：2000年9月13日、特願2000-277747、公開日：2002年3月27日、特開2002-88099、出願人：科学技術振興事業団 特許第3819226号(平成18年6月23日) 特許権者：〈独〉科学技術振興機構、

6) 「エンドセリン活性抑制剤」特許第 3923615(平成19年3月2日) 特許権者：岡田秀親；国際特許 PCT/JP94/01658

7) 「活性ペプチドの評価システムと新規活性ペプチド」特許第 4712282 号(登録日 平成 23 年 4 月 1 日) 特許権者：岡田秀親、岡田有武 発明者：岡田秀親、ウィリアム キャンベル、ラジョス バランニ、ローレンス クライマン 出願日：平成 15 年 2 月 20 日(特願 2003-042731)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究代表者・研究分担者業績：

岡田秀親

- 1) 「アナフィラトキシン C5a を不活性化するペプチド」発明者：岡田秀親、岡田有武 特許第 4362780 号（平成 21 年 8 月 28 日登録）、特許権者：(株)蛋白質科学研究所
- 2) 「アナフィラトキシン C5a を不活性化するペプチド」発明者：岡田秀親・岡田則子、藤田恵美子。特許第 4106691 号。特許権者：、岡田秀親、岡田則子
- 3) 「トロンボモジュリンを不活性化するペプチド」発明者：岡田秀親、岡田則子、下村康代 出願日：2003 年 2 月 28 日、特願 2003-10226、出願人：岡田秀親、岡田則子
- 4) 「HIV-1 感染抑制作用を有するアンセンスペプチド」発明者：岡田秀親、岡田則子、今井優樹、特許 3819226 号（平成 18 年 9 月 6 日）特許権者：(独) 科学技術振興機構、
- 5) 「エンドセリン活性抑制剤」特許第 3923615（平成 19 年 3 月 2 日）特許権者：岡田秀親；国際特許 PCT/JP94/01658
- 1) Okada, N., Imai, M., Okada, A., Ono, F., Okada, H. HMGB1 release by C5a anaphylatoxin is an effective target for sepsis treatment. *Nature Precedings*, 5727.1 (2011)
- 2) Okada, H., Imai, M., Ono, F., Okada, A., Tada, T., Mizue, M., Terao, K. and Okada, N. Novel therapeutic agents designed as a complementary peptide to target molecules *Anticancer Res.* in press (2011)
- 3) Tokodai, K., Goto, M., Inagaki, A., Nakanishi, W., Nilsson, B., Okada, N., Okada, H., Satomi, S. Attenuation of the cross-talk between the complement and coagulation cascades by C5a blockade improves early outcomes after intraportal islet transplantation. *Transplantation*, in press (2011)
- 1) Hussein, MH, Okada, H. et al. An acetylated anti-C5a complementary peptide reduced cytokines and free radicals and prolonged survival time in a neonatal sepsis model.: *Critical Care Medicine*. Submitted (2011)
- 2) 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*, 3425.1 (2009)
- 3) Okada, N., Okada, H., et al. Increased inhibitory capacity of an anti-C5a complementary peptide following acetylation of N-terminal alanine. *Microbiol. Immunol.*, 51, 439-443 (2007)
- 4) Fujita, E., Okada, H., Okada, N., et al. Inactivation of C5a anaphylatoxin by a peptide which is complementary to a region of C5a. *J. Immunol.* 172: 6382-6388 (2004)
- 5) Farkas, I., Okada, N., Okada, H. et al. Complement C5a receptor-mediated signalling may be involved in neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J. Immunol.* 170: 5764-5771 (2003)

- 6) Campbell, W., Kleiman, L., Baranyi, L., Li, Z., Khorchid, A, Fujita, E., Okada, N. and Okada, H. A novel genetic algorithm for designing of mimetic peptides that interfere with the function of a target molecule. *Microbiol. Immunol.*, 46: 211-215 (2002)
- 7) Baranyi, L., Campbell, W. and Okada, H. Antisense homology boxes in C5a receptor and C5a anaphylatoxin. A new method for identification of potentially active peptides. *J. Immunol.* 157: 4591-4601 (1996)

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)

奥田研爾

1. Wang HB, Kondo A, Yoshida A, Yoshizaki S, Abe S, Bao LL, Mizuki N, Ichino M, Klinman D, Okuda K, Shimada M. Partial protection against SIV challenge by vaccination of adenovirus and MVA vectors in rhesus monkeys. *Gene Ther.* 2010 ;17(1):4-13.
2. H-B Wang, A Kondo, AYoshida, S Yoshizaki, S Abe, L-L Bao, N Mizuki, M. Ichino, D Klinman, K Okuda and M Shimada Partial protection against SIV challenge by vaccination of adenovirus and MVA vectors in rhesus monkeys *.Gene Ther.*2009;16:218-228.
3. Jounai N., Takeshita F., Kobiyama K., Sawano A., Miyawaki A., Xin KQ., Ishii J.K., Kawai T., Akira S., Sukuki K. and Okuda K: The age5-age12 conjugate associates with innate anti viral immune responses. *Proc.Nat.Acad.Sci.*,2007, 104, 14050-5.
4. Tamura Y., Hamajima K., Matsui K., Yanoma S., Narita M., Tajima N., Xin K.-Q., Klinman D. & Okuda K. The F(ab')₂ fragment of an Ab-specific monoclonal antibody reduces Ab-deposits in the brain. *Neurobiol Dis*, 2005. 20, 541-9
5. Miyagi Y., Yamashita T., Fukaya M., Sonoda T., Okuno T., Yamada K., Watanabe M., Nagashima Y., Aoki I., Okuda K., & Kawamoto S. Delphinin: a novel PDZ and formin homology

domain-containing protein that synaptically colocalizes and interacts with glutamate receptor $\alpha 2$ subunit. *J Neurosci*, 2002, 22, 803-14.

6. Bukawa H., Sekigawa K., Hamajima K., Fukushima J., Yamada Y., Kiyono H. and Okuda K. Neutralization of HIV-1 by secretory IgA induced by oral immunization with a new macromolecular multicomponent peptide vaccine candidate. *Nat Med* 1995, 1, 681-685.
 7. Minami M., Okuda K., Sunday M.E. & Dorf M.E. (1982) H-2K-, H-2I- and H-2D-restricted hybridoma contact sensitivity effector cells. *Nature*, 297, 231-3.
 8. Okuda K., Minami M., Furusawa M. & Dorf M.E. Analysis of T cell hybridomas. II. Comparisons among three distinct types of monoclonal suppressor factors. *J Exp Med*, 1981; 154, 1838-51.
 9. Minami M., Okuda K., Furusawa S., Benacerraf B. & Dorf M.E. (1981) Analysis of T cell hybridomas. I. Characterization of H-2 and Igh- restricted monoclonal suppressor factors. *J Exp Med*, 154, 1390-402.
 10. Okuda K., Minami M., Sherr D.H. & Dorf M.E. (1981) Hapten-specific T cell responses to 4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl. XI. Pseudogenetic restrictions of hybridoma suppressor factors. *J Exp Med*, 154, 468-79.
 11. Okuda K., Minami M., Ju S.T. & Dorf M.E. Functional association of idiotypic and I-J determinants on the antigen receptor of suppressor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981; 78, 4557-61.
 12. Okuda K., Twining S.S., David C.S. & Atassi M.Z. (1979) Genetic control of immune response to sperm whale myoglobin in mice. II. T lymphocyte proliferative response to the synthetic antigenic sites. *J Immunol.*, 123, 182-8.
- Okuda K., David C.S. & Shreffler D.C. (1977) The role of gene products of the I-J subregion in mixed lymphocyte reactions. *J Exp Med*, 146, 1561-73

祖父江和哉

1. 脳浮腫の発生機序の分子的解明

Morishima T, et al.: Lactic acid increases aquaporin 4 expression on the cell

membrane of cultured rat astrocytes. *Neurosci Res* 2008; 61: 18-26.

Arima H, et al.: Hyperosmolar mannitol simulates expression of aquaporins 4 and 9 through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in rat astrocytes. *J Biol Chem* 2003; 278: 44525-34.

2. 集中治療における多臓器障害効果のある栄養剤の開発「アノムの脳虚血への効果」用途特許申請中

3. 敗血症による脳障害の発生機序の解明
Ito H, et al.: Interleukin-1beta induces the expression of aquaporin-4 through a nuclear factor-kappaB pathway in rat astrocytes. *J Neurochem* 2006; 99: 107-18.

4. 臓器障害を早期に予測する因子の網羅的検索

Inagaki, M, et al.: Sensitive immuno- assays for human and rat GMFB and GMFG, tissue distribution and age- related changes. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1670: 208-16.

分担研究者 岡田則子 (研究協力者 朝井鈴佳、牧優希、小田中瑞夕)

1 論文発表

1. Tokodai, K., Goto, M., Inagaki, A., Nakanishi, W., Nilsson, B., Okada, N., Okada, H., Satomi, S. Attenuation of the cross-talk between the complement and coagulation cascades by C5a blockade improves early outcomes after intraportal islet transplantation. *Transplantation* 2011, in press

2. Okada, H., Imai, M., Ono, F., Okada, A., Tada, T, Mizue, M., Terao, K. and Okada, N. Novel therapeutic agents designed as a complementary peptide to target molecules **Anticancer Res.** in press (2011)

3. Mizuno, T., Mizuno, M., Morgan, B.P., Noda, Y., Yamada, K., Okada, N., Yuzawa, Y., Matsuo, S., Ito, Y. Specific collaboration between rat membrane complement regulators Crry and CD59 protects peritoneum from damage by autologous complement activation. *Nephrology Dialysis Transplant.* 2011, in press

4. Okada, N., Imai, M., Okada, A., Ono, F. ,

Okada, H. HMGB1 released by C5a anaphylatoxin is an effective target for sepsis treatment. *Nature Precedings* 2011, 5727.1

5. 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* 2010, 33(7):1256-1259

6. Goto, T., Hussein, M.H., Kato, S., Daoud, G.A., Kato, T., Sugiura, T., Kakita, H., Nobata, M., Mizuno, H., Kato, I., Suzuki, S., Imai, M., Okada, N., Togari, H., Okada, H. Endothelin receptor antagonist attenuates inflammatory response and prolongs the survival time in a neonatal sepsis model. *Intensive Care Med.* 2010, 36(12): 2132-9

7. Sato, F., Ito, A., Ishida, T., Mori, F., Takino, H., Inagaki, A., Ri, M., Kusumoto, S., Komatsu, H., Iida, S., Okada, N., Inagaki, H., Ueda, R. A complement-dependent cytotoxicity-enhancing anti-CD20 antibody mediating potent antitumor activity in the humanized NOD/Shi-scid, IL-2Rgamma null mouse lymphoma model. *Cancer Immunol. Immunother.* 2010, 59(12): 1791-800

8. Ohshima, S., Ohashi-Suzuki, M., Miura, Y., Yabu, Y., Okada, N., Ohta, N., Suzuki, T. TbUNCl. al for propagation, motility, and morphogenesis of *Trypanosoma brucei* procyclic form cells. *PLoS One* 2010, 5(12): e15577

9. 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)

10. Hussein, M.H., Kato, S., Goto, T., Daoud, G.A., Kato, I., Suzuki, S., Togari, H., 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. *Mol Immunol* 46:2825, 2009

11. Okada, N., Tsukamoto, Y., Adachi, K., Handharyani, E., Soejoedono, R.D., Imai, M., Okada, A., Okada, H. Rescue with an anti-inflammatory peptide of chickens infected H5N1 avian flu. *Nature Precedings* 2009, 3425.1

12. 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

13. 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

14. Okada, N., Tsukamoto, Y., Adachi, K., Handharyani, E., Soejoedono, R.D., Imai, M., Okada, A., Okada, H. Rescue with an anti-inflammatory peptide of chickens infected H5N1 avian flu. *Nature Precedings*, 3425.1 (2009)

15. Hau, L., Campbell, W., Okada, H., Calpio, C., A., D., Imai, M., Okada, N. Designig 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

16. 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 Asai, S., Imai, M., Kimbara, N., Tada, T., Campbell, W., Okada, H., Okada, N. Procarboxypeptidase R deficiency causes increased lethality in concanavalin A-induced hepatitis in female mice. XXIII International Complement Workshop Aug 1-5, 2010, New York *Mol Immunol* 47, issue 13, p2199, Aug 2010

2 Mizuno, M., Ito, Y., Mizuno, T., Suzuki, Y., Noda, Y., Yamada, K., Harris, C.L., Okada, N., Margan, B.P., Matsuo, S. Membrane complement regulators may protect against encapsular peritoneal inflammation model of zymosan peritonitis in the rat. XXIII International Complement Workshop Aug 1-5, 2010, New York *Mol Immunol* 47, issue 13, p2270, Aug 2010

3 Okada, N., Ono, F., Okada, A., Asai, S., Imai, M., Terao, K., Okada, H. An inhibitory peptide of C5a anaphylatoxin rescues monkeys from lethal endotoxin shock by suppressing HMGB1 release. 14th International Congress of Immunology Aug 23-27, 2010, Kobe *Int Immunol* 22

Sup. 1: ii137, Aug 2010

4 Okada, H., Goto, T., Hussein, M.H., Kato, S., Daoud, G.H., Kato, T., Suguria, Y., Kakita, H., Nobata, M., Mizuno, H., Ito, T., Kato, I., Suzuki, S., Okada, N., Togari, H. Endothelin receptor antagonist attenuates inflammatory response and prolongs the survival time in a neonatal sepsis model. 14th International Congress of Immunology Aug 23-27, 2010, Kobe Int Immunol 22 Sup. 1: iii130, Aug 2010

5 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

6 新型H1N1インフルエンザの重症化における補体アナフィラトキシンの関与 太田里永子、伊藤嘉規、鳥居ゆか、木村宏、岡田則子、今井優樹 第47回補体シンポジウム講演集 47:26-27 (2010) 9/10-11 福島

7 正常ラット腹膜における膜補体制御因子の機能的解析 水野智博、水野正司、伊藤恭彦、鈴木康弘、野田幸裕、山田清文、丸山彰一、岡田則子、BP Morgan、松尾清一 第47回補体シンポジウム講演集 47:44-45 (2010) 9/10-11 福島

8 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

9 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 12th European Meeting on Complement in Human Diseases September 5-8, 2009 Visgrad Mol Immunol 46:2825, 2009

10 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. 12th European Meeting on Complement in Human Diseases September 5-8, 2009 Visgrad Mol Immunol 46:2859-2860, 2009

11 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

12 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

13 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)

14 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

15 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

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

17 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

18 強毒鳥インフル抑制に効果 読売新聞 7月
25日2009年

19 鳥インフル炎症を抑制 中日新聞 7月25
日2009年

H 知的財産権の出願登録状況

1 特許取得

1, 『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4
106691号 平成20年4月11日

2. 『SIRS または強毒性インフルエンザ感染症処置
のための医薬品組成物』 発明者 岡田秀親、岡
田有武、岡田則子 国際特許番号 WO2011/004843
A1 国際公開日2011年1月13日

3. 『HIV-1 感染抑制作用を有するアンセンスペプ
チド』発明者：岡田秀親、岡田則子、今井優
樹、特許3819226号（平成18年9月6日）特
許権者：〈独〉科学技術振興機構、

今井優樹

Imai M, Ohta R, Varela JC, Song H,
Tomlinson S. Enhancement of
Antibody-Dependent Mechanisms of Tumor
Cell Lysis by a Targeted Activator of
Complement. *Cancer Res.*, 67: 9535-9541
(2007)

Imai M, Baranyi L, Okada N, Okada H.
Inhibition of HIV-1 infection by synthetic
peptides derived CCR5 fragments. *Biochem.
Biophys. Res. Commun.*, 353: 851-856 (2007)

Goto T, Hussein MH, Kato S, Daoud GA,
Kato T, Sugiura T, Kakita H, Nobata M,
Mizuno H, Imai M, Ito T, Kato I, Suzuki S,
Okada N, Togari H, Okada H. Endothelin
receptor antagonist attenuates inflammatory
response and prolongs the survival time in a
neonatal sepsis model. *Intens Care Med.*,
36(12):2132-2139 (2010)

Varela JC, Imai M, Atkinson C, Ohta R,
Rapisardo M, Tomlinson S, Modulation of
protective T cell immunity by comple- ment
inhibitor expression on tumor cells. *Cancer
Res.*, 68: 6734-6742 (2008)

太田里永子

1. Ohta R, Torii Y, Imai M, Kimura H, Okada N, Ito Y,
Serum concentrations of complement anaphylatoxins
and proinflammatory mediators in patients with 2009
H1N1 influenza. *Microbiol Immunol.* (2011) 55, 191-8.
2. Kawabe S, Ito Y, Ohta R, Sofue A, Gotoh K,

Morishima T, Kimura H, Comparison of the levels of
human herpesvirus 6 (HHV-6) DNA and cytokines in
the cerebrospinal fluid and serum of children with
HHV-6 encephalopathy. *J Med Virol.* (2010) 82,
1410-5.

3. Gotoh K, Ito Y, Ohta R, Iwata S, Nishiyama Y,
Nakamura T, Kaneko K, Kiuchi T, Ando H, Kimura H.
Immunologic and virologic analyses in pediatric liver
transplant recipients with chronic high Epstein-Barr
virus loads. *J Infect Dis.* (2010) 202, 461-9.

4. Varela JC, Imai M, Atkinson C, Ohta R, Rapisardo M,
Tomlinson S, Modulation of protective T cell immunity
by complement inhibitor expression on tumor cells.
Cancer Res. (2008) 68, 6734-6742

5. Imai M, Ohta R, Varela JC, Song H, Tomlinson S,
Enhancement of Antibody-Dependent Mechanisms of
Tumor Cell Lysis by a Targeted Activator of
Complement. *Cancer Res.* (2007) 67, 9535-9541.

6. Ito Y, Demachi-Okamura A, Ohta R, Akatsuka Y,
Nishida K, Tsujimura K, Morishima Y, Takahashi T and
Kuzushima K, Full-length EBNA1-mRNA-transduced
dendritic cells stimulate CTLs recognizing a novel
HLA-Cw*0303 and Cw*0304-restricted epitope on
EBNA1-expressing cells. *J Gen Virol.* (2007) 88,
770-780.

7. Ohta R, Kondor N, Dohi N, Tomlinson S, Imai M,
Holers VM, Okada H and Okada N, Mouse
complement receptor-related gene y/p65-neutralized
tumor vaccine induces antitumor activity in vivo. *J
Immunol.* (2004) 173, 205-213.

8. Imai M, Ohta R, Okada N and Tomlinson S,
Inhibition of a complement regulator in vivo enhances
antibody therapy in a model of mammary
adenocarcinoma. *Int J Cancer.* (2004) 110, 875-881.

9. Ohta R, Imai M, Fukuoka Y, Miwa T, Okada N and
Okada H, Characterization of mouse DAF on
transfectant cells using monoclonal antibodies which
recognize different epitopes. *Microbiol Immunol.*
(1999) 43, 1045-1056

前田康博

Yoko Nakajima, Tetsuya Ito, Yasuhiro
Maeda, Sayaka Ichiki, Naruji Sugiyama,
Mihoko Mizuno, Yasuko Makino, Tokio
Sugiura, Yukihiisa Kurono and Hajime

Togari

Detection of Pivaloylcarnitine in Pediatric
Patients with Hypocarnitinemia after
Long-Term Administration of
Pivalate-Containing Antibiotics

Tohoku J. Exp. Med., 221, 309-313. (2010)

Yuji Hotta, Mayuko Hattori, Tomoya Kataoka, Risa Ohno, Mayumi Mikumo, Yasuhiro Maeda, and Kazunori Kimura
 Chronic Vardenafil Treatment Improves Erectile Function via Structural Maintenance of Penile Corpora Cavernosa in Rats with Acute Arteriogenic Erectile Dysfunction
J. Sex. Med. **8**, 705-711. (2011)

Yoko Nakajima, Tetsuya Ito, Yasuhiro Maeda, Sayaka Ichiki, Satoru Kobayashi, Naoki Ando, Mohamed Hamed Hussein, Yukihisa Kuro, Naruji Sugiyama, Hajime Togari
 Evaluation of valproate effects on acylcarnitine in epileptic children by LC-MS/MS
Brain Dev. in press. (2011)

西田 修

1. Nishida O, Nakamura T, Kuriyama N, et al: Sustained high-efficiency daily diafiltration using a mediator-adsorbing membrane (SHEDD-fA) in the treatment of patients with severe sepsis. *Contrib Nephrol*, 2011, inpress
2. Yumoto M, Nishida O, Moriyama K, et al: *In Vitro* Evaluation of High Mobility Group Box 1 Protein Removal with Various Membranes for Continuous Hemofiltration. *Ther Apher Dial*, 2011, in press
3. Nishida O, Nakamura T, Kuriyama N, et al: Sustained high-efficiency daily diafiltration using a cytokine-adsorbing membrane in the treatment of patients with severe sepsis. *Crit Care* 2011; 15(Suppl 1): (doi: 10.1186/cc9535)
4. Yumoto M, Nishida O, Moriyama K, et al: In vitro evaluation of HMGB1 removal with various membranes for continuous hemofiltration: *Critical Care* 2011, 15(Suppl 1): (doi:10.1186/cc9534)
5. Iida Y, Yamada S, Nishida O, et al: Body mass index is negatively correlated with respiratory muscle weakness and interleukin-6 production after coronary artery

bypass grafting. *J Crit Care* 25: 172.e1-172.e8, 2010

6. Yumoto M, Nishida O, Nakamura F, et al: Propofol attenuates oxidant-induced acute lung injury in an isolated perfused rabbit-lung model. *J Anesth* 19:287-294, 2005
7. Fujita Y, Nishida O, Sobue K, et al: Nitric oxide inhalation is useful in the management of right ventricular failure caused by myocardial infarction. *Crit Care Med* 30:1379-1381, 2002
8. Nishida O, Arellano R, Cheng DCH, DeMajo W, Kavanagh BP: Gas exchange and hemodynamics in experimental pleural effusion. *Crit Care Med* 27:583-587, 1999

加藤 稲子

1. Kato I, Scaillet S, Groswasser J, Montemiro E, Togari H, Lin JS, Kahn A, Franco P. Spontaneous arousability in prone and supine position in healthy infants. *Sleep*. 2006;29(6):785-790
 2. Montemiro E, Franco P, Scaillet S, Kato I, Groswasser J, Villa MP, Kahn A, Sastre JP, Ecochard R, Thiriez G, Lin JS. Maturation of spontaneous arousals in healthy infants. *Sleep*. 2008; 31(1):47-54.
 3. Kato S, Hussein MH, Kakita H, Goto T, Daoud GA, Kato T, Sugiyama T, Nobata M, Nakajima Y, Endo T, Mizuno K, Ito T, Kato I, Suzuki S, Togari H. Edaravone, a novel free radical scavenger, reduces high-mobility group box 1 and prolongs survival in a neonatal sepsis model. *Shock*. 2009;32(6):586-92.
 4. Hussein MH, Daoud GA, Kakita H, Kato S, Goto T, Kamei M, Goto K, Ozaki Y, Ito T, Fukuda S, Kato I, Suzuki S, Hashimoto T, Togari H. Effect of polymyxin B-immobilized fiber hemoperfusion on respiratory impairment, hepatocellular dysfunction, and leucopenia in a neonatal sepsis model. *Pediatr Surg Int*. 2010 ; 26(2):187-93.
- Hussein MH, Daoud GA, Kakita H, Kato S, Goto T, Kamei M, Goto K, Nobata M, Ozaki Y, Ito T, Fukuda S, Kato I, Suzuki S, Sobajima H, Hara F, Hashimoto T, Togari H. High cerebrospinal fluid antioxidants and interleukin 8 are protective of hypoxic brain damage in newborns. *Free Radic Res*. 2010; 44(4):422-9.

HMGB1 release by C5a anaphylatoxin is an effective target for sepsis treatment (Nature Precedings Feb. 25, 2011)

Noriko Okada*, Masaki Imai*, Alan Okada[&], Fumiko Ono[#] and Hidechika Okada^{*,&}

*Department of Immunology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya 467-8601, [&]Choju Medical Institute, Fukushima Hospital, Toyohashi 411-8124, and [#]Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, Tsukuba 305-0843, Japan

Address correspondence and reprint request to Dr. Hidechika Okada, Choju Medical Institute, Fukushima Hospital, Noyori-cho, Yamanaka 19-14, Toyohashi 441-8124, Japan E-mail: hiokada@med.nagoya-cu.ac.jp

Key words: complement; C5a; anaphylatoxin; inflammation; sepsis; peptide; endotoxin-shock; C5a receptor; C5L2; HMGB1; cytokine storm.

Antibodies to C5a have proven to be effective in treating experimental septic primate models^{1,2}. A 17 amino acid peptide (ASGAPAPGPAGPLRPMF) named PepA binds to C5a and prevents complement-mediated lethal shock in rats³. AcPepA harboring an acetyl group at the N-terminal alanine showed increased inhibitory activity against C5a⁴. Cynomolgus monkeys destined to expire from a lethal dose of bacterial endotoxin (4mg/kg) were rescued by intravenous administration of AcPepA. AcPepA could have interfered with the ability of C5a to stimulate C5L2^{5,6} which is responsible for HMGB1 release and stimulation of TLR4⁷⁻⁹ as an endogenous ligand with LPS behavior. The suppression of HMGB1 release by AcPepA administration to LPS-shock monkeys is likely responsible for rescuing the animals.

Sepsis is a systemic inflammatory response syndrome (SIRS) that causes disseminated intravascular coagulation (DIC) and multiple organ failure (MOF). Antibodies to C5a have proven to be effective in treating experimental septic primate models^{1,2}. We generated an inhibitory peptide of C5a composed of an amino acid sequence ASGAPAPGPAGPLRPMF named PepA³. Acetylation at the N-terminal alanine of PepA improved the C5a inhibitory capacity and was named AcPepA⁴.

Under anesthesia with sodium pentobarbital, 10 cynomolgus monkeys (weighing about 5 kg) were intravenously administered 4 mg/kg LPS within 30 min. Three monkeys for the control group were infused with 15 ml saline during 3 hrs after the LPS

injection. Seven experimental group monkeys were infused intravenously with 15 ml of 2 mg/ml AcPepA starting at 30 min after LPS injection for 3 hrs (2 mg/kg/hr for 3 hrs). Six hrs after LPS administration, anesthesia was terminated when the blood samples showed leukocytosis and increased CPK in all monkeys. Monkeys were observed for their status. All of the 7 AcPepA treated monkeys returned to a healthy condition by the following day, while the 3 control monkeys died within two days.

Despite the increased TNF α and other cytokine levels, high mobility group box 1 (HMGB1)^{5,6} which is an endogenous stimulator of TLR4⁷⁻⁹ did not increase in the AcPepA infused animals (Fig. 1).

Furthermore, AcPepA could suppress pathophysiological events and prolonged survival time of sepsis piglets induced by cecal ligation and perforation (CLP)¹⁰. Survival times were longer in the AcPepA treated group than in the CLP alone group (19.3hrs \pm 2.7hrs vs. 9.9 hrs \pm 0.7 hrs, P<0.005). In this case, AcPepA also delayed the HMGB-1 surge.

These above results indicate that suppression of C5 anaphylatoxin interferes with the induction of a cytokine storm. Since C5a has the capacity to cause release of HMGB1 following stimulation of the second C5a receptor termed C5L2 generated on activated monocytes¹¹⁻¹³, inhibition of C5a successfully interferes with the above release which has the capacity to generate inflammatory cytokines stimulating TLR4 as an endogenous ligand (Fig. 2).

Recently, thrombomodulin (TM) administration has been shown to rescue septic shock animals¹⁴. The enhanced activity of thrombin when complexed with TM should have caused activation of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) which then inactivates C5a anaphylatoxin by removing the C-terminal arginine^{15,16} resulting in suppression of HMGB1 release. Therefore, the therapeutic effect of TM on sepsis should also be due to inactivation of C5a anaphylatoxin which initiates a cytokine storm through HMGB1 release.

This work was supported in part by a Research Grant from the Japanese Ministry of Health, Welfare and Labor (08062893).

References

1. Czermak, B.J., V. Sarma, C. L. Pierson, R. L. Warner, M. Huber-Lang, N. M. Bless, H. Schmal, H. P. Friedl, and P. A. Ward, 1999. Protective effects of C5a blockade in sepsis. *Nature.Med.* **5**: 788-792.

2. Stevens, J.H., P. O'Hanley, J.M. Shapiro, F.G. Mihm, P.S. Satoh, J.A. Collins, and T.A. Raffin. 1986. Effects of anti-C5a antibodies on the adult respiratory distress syndrome in septic primates. *J. Clin. Invest.* **77**: 1812-1816.
3. Fujita, E., I. Farkas, W. Campbell, L. Baranyi, H. Okada, and N. Okada. 2004. Inactivation of C5a anaphylatoxin by a peptide that is complementary to a region of C5a. *J. Immunol.* **172**: 6382-6387.
4. Okada, N., S. Asai, A. Hotta, N. Miura, N. Ohno, I. Farkas, L. Hau, and H. Okada. 2007. Increased inhibitory capacity of an anti-C5a complementary peptide following acetylation of N-terminal alanine. *Microbiol. Immunol.* **51**: 439-443.
5. Wang, H., O. Bloom, M. Zhang, J.M. Vishnubhakat, M. Ombrellino, J. Che, A. ., Frazier, H. Yang, S. Ivanova, L. Borovikova, K.R. Manogue, E. Faist, E. Abraham, J. Andersson, U. Andersson, P.E. Molina, N.N. Abumrad, A. Sama, and K.J. Tracey. 1999. HMGB-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* **285**: 248-251.
6. Riedemann NC, R-F. Guo RF, and P.A. Ward. 2003. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nature. Med.* **9**: 517-524.
7. Yu, M., H. Wang, A. Ding, D.T. Golenbock, E. Latz, C.J. Czura, M.J. Fenton, K.J. Tracey, H. Yang. 2006. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock* **26**: 174-179.
8. Yang, H., M. Ochani, J. Li, X. Qiang, M. Tanovic, H. Harris, S.M. Susaria, M.P. Ulloa, H. Wang, R. DiRimo, C.J. Czura, H.Wang, J. Roth, H.S. Warren, H.S., M.P. Fink, M.J. Fenton, U. Andersson, and K.J. Tracey. 2004. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 296-301.
9. Park, J.S., F. Gamboni-Robertson, Q. He, D. Svetkauskaite, J.Y. Kim, D. Strassheim, J.W. Sohn, S. Yamada, I. Maruyama, A. Banerjee, A. Ishizaka, and E. Abraham, E. 2006. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **290**: C917-924.
10. Hussein, MH., Kato, S., Goto, T., Daoud, GA., Kato, I., Suzuki, S., Togari, H., 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 **Mol Immunol** 2009, 46:2825

11. Chen, N-J., Mirtsos, C., Suh, D., Lu, Y-C., Lin, W-J., McKerlie, C., Lee, T., Baribault, H., Tian, H. and Yeh, W-C. 2007. C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a. *Nature* 446: 203-207.
12. Klune, J.R., Dhupar, R., Cardinal, J., Billiar, T.R. and Tsung, A. 2008. HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol. Med.* 14:476-484.
13. Rittirsch, D., Flierl, M.A., Nadeau, B.A., Day, D.E., Huber-Lang, M., Mackay, C.R., Zetoune, F.S., Gerard, N.P., Cianflone, K., Koehl, J., Gerard, C., Sarma, J.V. and Ward, P.A. 2008. Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nature Med.* 14: 551-557.
14. Nagato M, Okamoto K, Abe Y, Higure A, Yamaguchi K. 2009. Recombinant human soluble thrombomodulin decreases the plasma high-mobility group box-1 protein levels, whereas improving the acute liver injury and survival rates in experimental endotoxemia. *Crit Care Med.* 37::2181-2186.
15. Campbell, W., N. Okada, and H. Okada. 2001. Carboxypeptidase R (CPR) is an inactivator of complement derived inflammatory peptides and an inhibitor of fibrinolysis. *Immunol. Rev.* 180: 162-167.
16. Campbell, W., E. Lazoura, N. Okada, and H. Okada. 2002. Inactivation of C3a and C5a octapeptides by carboxypeptidase R and carboxypeptidase N. *Microbiol. Immunol.* 46:131-134.

(Fig. 1)

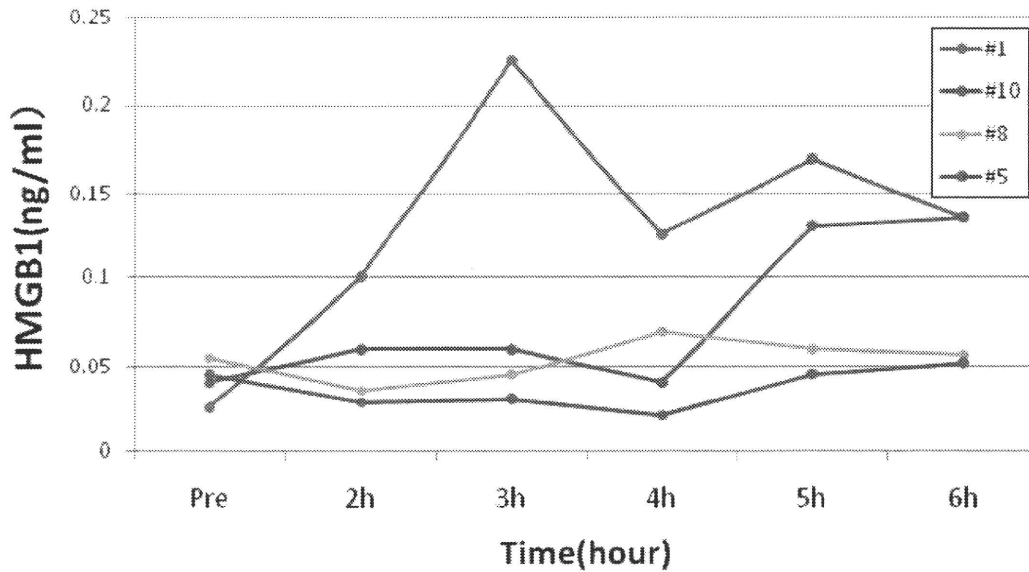


Figure 1. Increase in HMGB1 in plasma of LPS- injected monkeys.

Six cynomolgus monkeys intravenously infused with a lethal dose of bacterial LPS (4mg/kg) destined to death were treated with intravenous administration of 2 mg/kg/h of AcPepA for 3h starting 30 min after the lethal LPS injection (#5 and #8).. Control monkeys (#1 and #10) were infused only saline in stead of AcPepA following LPS injection. Despite the increased TNF α and other cytokine levels, high mobility group box 1 (HMGB1) which is an endogenous stimulator of TLR4⁷ did not increase in the AcPepA infused animals (#5 and #8).

(Fig. 2)

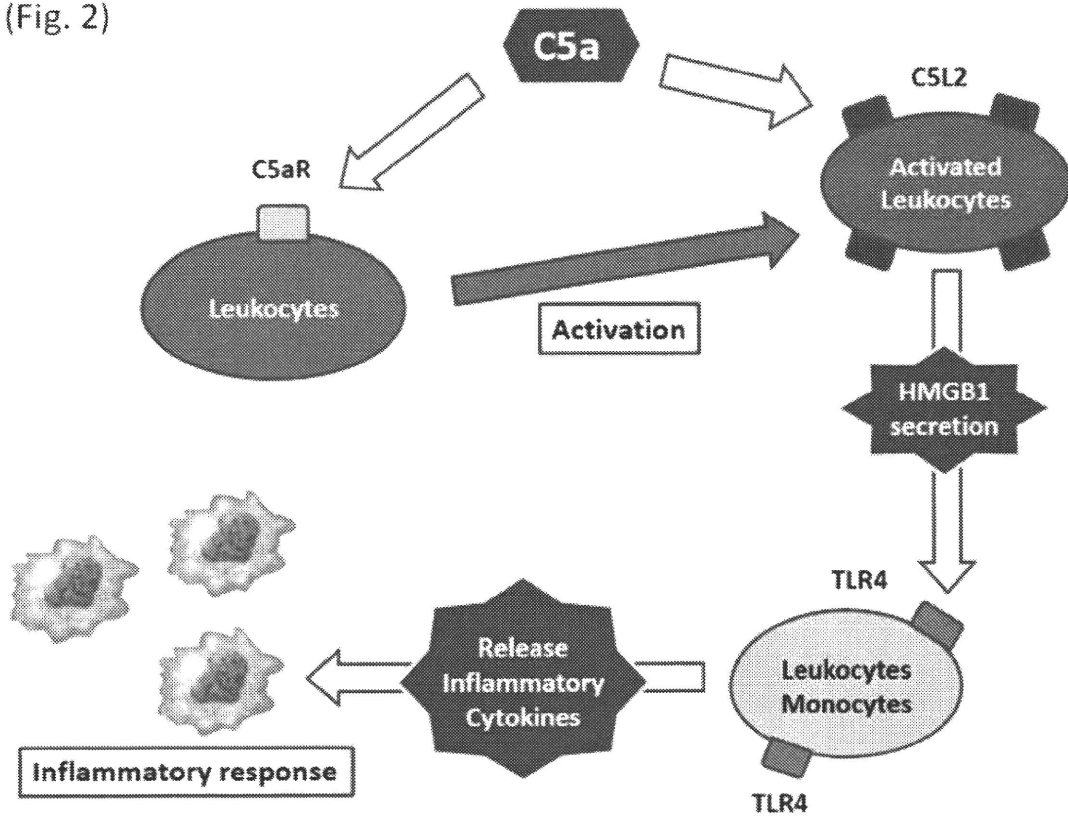


Figure 2. Possible role for C5a in a positive feedback inflammatory circuit.

Following bacterial infection, LPS stimulates TLR4, and C5a generated during complement activation stimulates C5aR resulting in expression of C5L2 on leukocyte membranes. Stimulation of C5L2 by C5a on activated leukocytes induces release of HMGB1 which then reacts with TLR-4 on other leukocytes, as did LPS, resulting in further recruitment of activated leukocytes that express C5L2. These reactions create an inflammatory amplification circuit.