

201015052B

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

平成20～22年度 総合研究報告書

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	
総括研究報告書 岡田秀親	1
分担研究報告 岡田則子	7
岡田則子 業績報告	12
今井優樹	17
前田康博	19
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
III. 研究成果の刊行物・別刷	22

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札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）のアラニンのアセチル化した 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札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、医師主導型トランスレーショナルリサーチでそれを立証するために必要な前臨床安全性試験や実験動物での治療効果の確認を行う。サルでの安全性が確認されたなら、健常人での安全性確認も試みたい。

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
小橋 修	福祉村病院 病院長
奥田研爾	福祉村病院長寿医学研究所 研究所長
戸 莉 創	名市大医・新生児学・教授（理事長）
祖父江和哉	名市大院・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
間瀬光人	名市大医・脳神経外科 准教授
多田豊曠	名市大看護・病理形態学 教授
大塚隆信	名市大医・整形外科学 教授
宮原 亮	京大医・呼吸器外科 助教
今井優樹	名市大院・医学研究科・免疫学 講師
川浪憲一	名市大院・医学研究科・情報管理教育センター 助教
黒野幸久	名市大院・薬学研究科・病院薬剤 教授
前田康博	名市大院・薬学研究科・分析化学 講師
竹山廣光	名市大医・外科学 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、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。さらに慢性毒性試験も実施中である。その結果を基に、各施設のIRB (倫理委員会など) の承認を得たプロ

トコールで医師主導型臨床治療研究を実施を目指す。

B. 研究の方法

- 1) 前臨床安全性試験をスギ生物科学研究所(株)に委託して実施する。急性毒性と慢性毒性のほか、催奇性、発がん性についての解析も実施する。さらに、GLP前臨床安全性試験を新日本科学株式会社に委託して実施する。
- 2) 肺炎などで38℃以上の発熱をした感染患者の血漿を継時的に採取し、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) 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（ゼブシス）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、戸茆創）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およびクラボウバイオメディカル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

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。

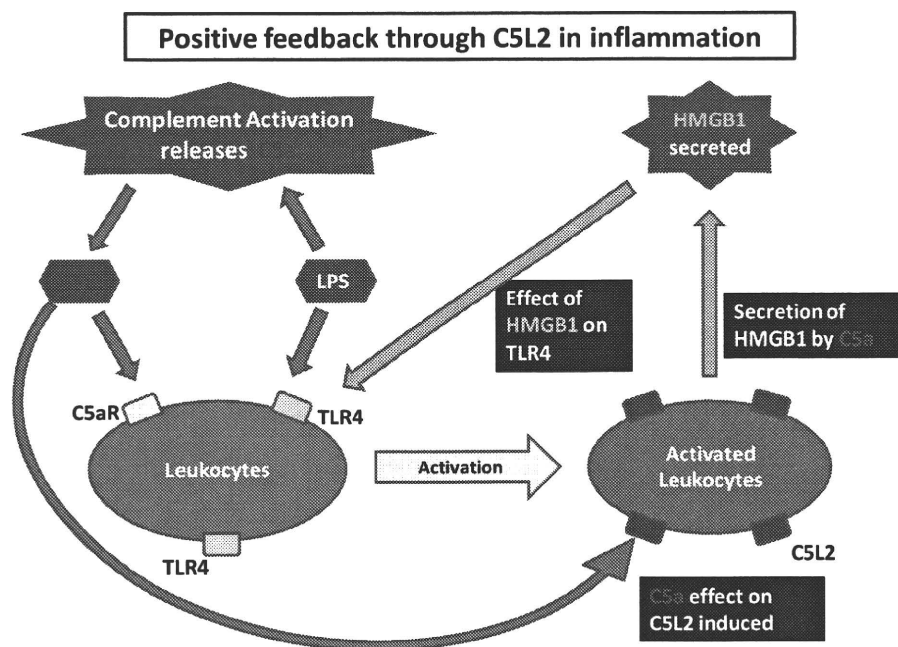
C. 研究結果

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遮断することが分かった。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、2 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（ゼブシス）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、炎症増悪反応が遮断さ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かいした 120 mg AcPepA を 2 時間かけて点滴静注すると、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, 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)
- 2) Okada, N., Imai, M., Okada, A., Ono, F., Okada, H. HMGB1 release by C5a anaphyl- toxin is an effective target for sepsis treatment. **Nature Precedings**, .5727.1 (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) Goto, T., Hussein, MH., Kato, S., Danoud, SA., Kato, T., Kakita, H., Mizuno, H., Imai, M., Ito, T., Kato, I., Suzuki, S., Okada, H., Togari, H. and Okada, N. Endothelin receptor antagonist attenuates inflammatory response and prolong the survival time in a neonatal sepsis.

Intensive Care Med. 36(12): 2132-2139 (2010)

- 6) Okada, N., Tsukamoto, Y., Adachi, K., Handharyani, E., Soejoedono, R.D., Imail, M., Okada, A., Okada, H. Rescue with an anti-inflammatory peptide of chickens infected H5N1 avian flu. **Nature Precedings**, 3425.1 (2009)
- 7) 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)
- 8) 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)

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脾臓障害の抑制」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、出願人：(株)蛋白科学研究所
- 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 号(平成18年9月6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**

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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- α 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- α 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ため、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
 α 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 α-CD11b 抗体を添加
 ↓
 CD11b に結合した抗体の量をフローサイトメー
 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-α 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。

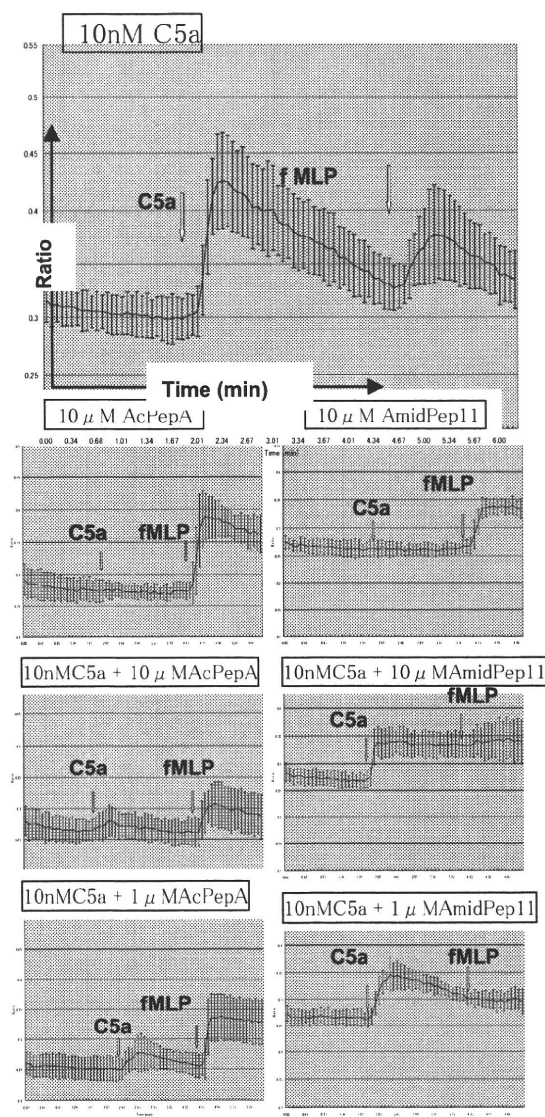
<操作方法>

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

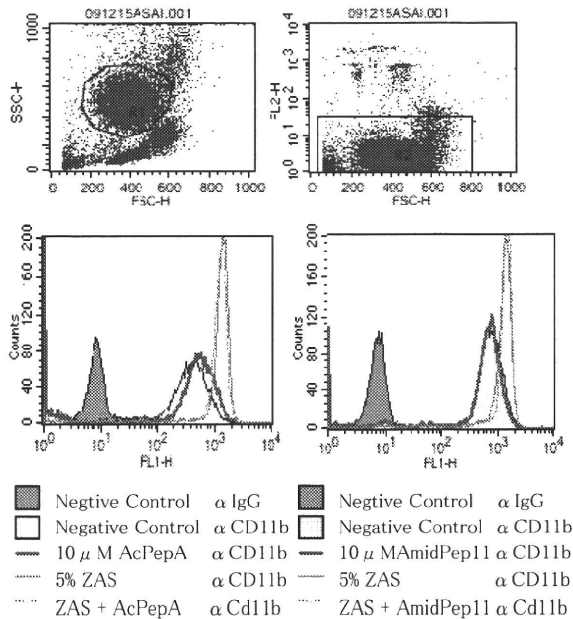
AcPepA は濃度依存性に好中球内 Ca 濃度を抑
 制することが確認できた。一方、AmidPep11 の抑
 制効果は AcPepA より軽度であった。



②

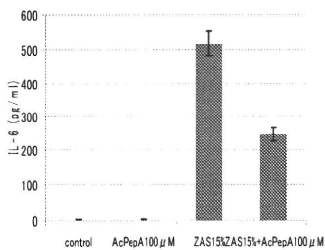
ヒト末梢血の好中球分画における C5a 刺激によ
 る CD11b 発現変化に及ぼす阻害ペプチドの影響を
 FACS 解析にて検討した。その結果、AcPepA, Am
 idPep11 とともに、C5a 刺激による CD11b 発現
 の増強を抑制する効果は見られなかった。

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

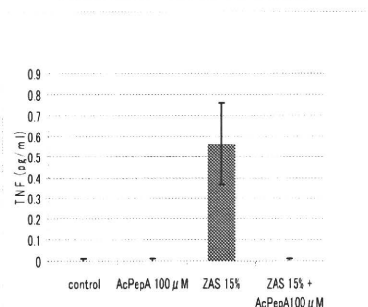


③

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

- 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
- Okada, N., Imai, M., Okada, A., Ono, F., Okada, H. HMGB1 release by C5a anaphylatoxin is an effective target for sepsis treatment. **Nature Precedings**, 727.1 (2011)
- 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)
- 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)
- Hussein, MH, Daoud, G.A-H, Goto, T., kato, S., Nobata, M., Kakita, H., Mizuno, H., Ito, T., Kato, I., Suzuki, S.,

- Okada, N., Hashimoto, T., Okada, H., Togari, H. 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)
6. Goto, T., Hussein, M.H., Kato, S., Danoud, S.A., Kato, T., Kakita, H., Mizuno, H., Imai, M., Ito, T., Kato, I., Suzuki, S., Okada, H., Togari, H. and Okada, N. Endothelin receptor antagonist attenuates inflammatory response and prolong the survival time in a neonatal sepsis. **Intensive Care Med.** 36(12): 2132-2139 (2010)
 7. 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)
 8. 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)
 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. **Mol Immunol** 46:2825, 2009
 10. 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)
 11. 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
 12. 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
 13. 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
 14. 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 12th 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. 12th 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臓器障害の抑制 第45回に本移植学会抄録集 45:38(2009) なし
- 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. 12th 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

H21-23 年度 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)
(分担) 研究報告書

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

研究発表

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 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

3 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

4 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

5 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

6 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

7 Ohshima, S., Ohashi-Suzuki, M., Miura, Y., Yabu, Y., Okada, N., Ohta, N., Suzuki, T. TbUNC119 and its binding protein complex are essential for propagation, motility, and morphogenesis of *Trypanosoma brucei* procyclic form cells. *PLoS One* 2010, 5(12): e15577

8 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)

9 Hussein, MM., 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* 46:2825, 2009

10 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* 2009, 3425.1

11 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

12 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

13 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

14 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, CL., Okada, N., Margan, BP., 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, MH., Kato, S., Daoud, GH., 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

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

『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

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 W02011/004843 A1 国際公開日 2011年1月13日

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 μ /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- α は好中球から産

生されることが分かっているため、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- α 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- α 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