

201128192A

厚生労働省科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

表皮水疱症に有効な新たな医薬開発に関する研究

平成 23 年度 総括研究報告書

研究代表者 玉井克人

平成 24 (2012) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告書

表皮水疱症に有効な新たな医薬開発に関する研究 玉井 克人	1
添付書類 1 : 開発候補物概要書	9
添付書類 2 : ペプチド製剤 K002 の (GLP) 非臨床安全性試験 実施計画書	17
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
III. 研究成果の刊行物・別冊	25

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

表皮水疱症に有効な新たな医薬開発に関する研究

研究代表者 玉井克人 大阪大学大学院医学系研究科再生誘導医学寄附講座教授

研究分担者 片山一朗 大阪大学大学院医学系研究科皮膚科学講座教授

研究分担者 金田眞理 大阪大学大学院医学系研究科皮膚科学講座講師

研究分担者 室田浩之 大阪大学大学院医学系研究科皮膚科学講座助教

研究分担者 名井 陽 大阪大学医学部附属病院未来医療センター准教授

研究分担者 江副幸子 大阪大学医学部附属病院未来医療センター特任講師

研究要旨 表皮水疱症患者剥離表皮が放出する HMGB1 が末梢循環を介して骨髄間葉系幹細胞を剥離表皮部へ集積させ、表皮再生を誘導しているという我々が見いだした新たな生体内組織再生誘導メカニズム (Tamai et al. PNAS2011) を基盤として、表皮水疱症患者剥離表皮部に骨髄間葉系幹細胞を積極的に集積させて、間葉系幹細胞の持つ抗炎症効果、抗線維化効果により表皮水疱症患者の炎症および癒痕などの皮膚病態を改善し、難治性皮膚潰瘍の再生を促進する新たな医薬開発を目標に研究を進めた。平成 23 年度は、国内企業と共同で GMP 基準を満たす HMGB1 生産を目標に共同研究を進めるとともに、より早い創薬化を実現するために、HMGB1 の骨髄間葉系幹細胞遊走活性ドメインを解明し、その化学合成ペプチド K002 の静脈内投与により皮膚損傷組織の再生促進効果が得られることを明らかにするとともに、K002 ペプチドの GMP 非臨床試験実施計画書を作成した。平成 24 年度には K002 ペプチド GMP 非臨床試験を実施し、平成 25 年度には表皮水疱症に対する K002 ペプチドの医師主導臨床試験を実施する予定である。

A. 研究目的

先天性表皮水疱症は、皮膚基底膜接着分子の遺伝的欠損により日常生活の軽微な外力で表皮が基底膜部位で真皮から剥離し、生直後から一生涯、重傷熱傷様の難治性皮膚潰瘍を形成する遺伝性皮膚難病である。本邦表皮水疱症症例の過半数は VII 型コラーゲン遺伝子異常により基底膜直下で真皮内水疱を形成する栄養障害型で、潰瘍治癒後の著明な癒痕形成を特徴とし、重傷例では手指の棍棒状癒着、食道粘膜剥離に伴う食道癒痕狭窄をきたし、経過とともに癒痕癌を多発して致死性となることも少なくない。

過去 20 年間に渡り、我々は表皮水疱症の病態解明研究、遺伝子診断法確立研究、治療法確立のための研究を進めてきた。その過程で、表皮水疱症患者の剥離表皮が放出する HMGB1 (High mobility group box 1) が骨髄間葉系幹細胞を刺激して血中動員し、さらに水疱部へと集積させて剥離表皮の再生を誘導しているという新たな生体内再生誘導メカニズムの存在を、栄養障害型表皮水疱症モデルマウス (VII 型コラーゲン欠損マウス) を用いた実験により明らかにした (Tamai et al. PNAS2011)。水疱部位に集積した間葉系幹細胞は、局所の炎症を強く抑制する結果、癒

痕形成も抑制され、さらに間葉系幹細胞の持つ再生誘導効果により機能的組織再生が誘導されることが期待される。

平成 23 年度は、HMGB1 の持つ骨髄間葉系幹細胞動員活性を利用した組織再生誘導医薬開発の実現を目的として研究を進めた。

B. 研究方法

HMGB1 医薬開発のための医師主導臨床試験を進めるために、国内企業と大阪大学の共同研究契約下で GMP 基準を満たす HMGB1 の生産系確立を目指して研究を進めた。平成 23 年度の研究で非 GMP レベル HMGB1 生産系の確立を終了し、GMP レベルの生産系確立を目指してさらなる共同研究を進めている。

より早い創薬化を実現するために、HMGB1 の骨髄間葉系幹細胞遊走活性ドメイン探索を進めた。具体的には、HMGB1 を複数の一部オーバーラップするペプチド断片に分離して合成し、それぞれのペプチドを用いて骨髄間葉系幹細胞遊走活性をもつペプチドをボイデンチャンバーを用いた *in vitro* アッセイでスクリーニングした。次に、スクリーニングにより骨髄間葉系幹細胞遊走活性を示したペプチドをマウス尾静脈より投与し、経時的に末梢血単核球を採取して間葉系幹細胞マーカーである血小板増殖因子受容体 α (PDGFR α) 陽性細胞の出現を、flow cytometry にて検討した。これら、*in vitro* および *in vivo* アッセイにて骨髄間葉系幹細胞動員活性を確認したペプチドを用いて、ラット疎血性皮膚潰瘍モデルへの静脈内投与による薬効試験を行った。さらに、表皮水疱症モデルマウス (VII 型コラーゲン欠損マウス) 皮膚を背部皮膚に移植し、移植皮膚が放出する HMGB1 による骨髄間葉系幹細胞の移植皮膚特異的集積に寄与する SDF-1/CXCR4 メカニズムを抑制

することにより、骨髄間葉系幹細胞の表皮水疱症皮膚集積による皮膚症状改善効果について検討した。

上記の検討により得られた結果を基にして、早期の医師主導臨床試験を実現する目的で、HMGB1 ペプチドの GLP 非臨床試験のためのプロトコルを作成した。

C. 研究結果

HMGB1 をオーバーラップする複数のペプチド断片として合成し、それぞれのペプチドの骨髄間葉系幹細胞遊走活性を、ボイデンチャンバーを用いてスクリーニングした結果、HMGB1 断片ペプチド K002 に骨髄間葉系幹細胞遊走活性が存在することが明らかとなった (添付書類 1 : 開発候補物概要書図 1、図 2 参照)。次いで、K002 をマウス静脈内に投与し、経時的に末梢血単核球を分離して、生体内骨髄間葉系幹細胞動員活性を PDGFR α 陽性間葉系幹細胞の出現を flow cytometry にて検討した結果、コントロール群 (PBS 投与群) に比較して K002 投与群は優位に PDGFR α 陽性間葉系幹細胞が血中に増加することが明らかとなった (添付書類 1 : 開発候補物概要書図 3 参照)。さらに、K002 静脈内投与による損傷組織再生誘導効果を、ラット皮膚疎血性潰瘍モデルを用いて評価した。具体的には、ラット背部皮膚に種々の長さおよび幅で短冊状の皮弁を形成した後、ドップラー血流計を用いて皮弁末端の疎血状態を経時的に評価し、皮弁形成後 7 日目には確実に疎血性皮膚潰瘍が生じる皮弁の長さおよび幅の条件を決定した。得られた条件を基にして疎血性皮膚潰瘍が確実にできる皮弁を背部に作成した 8 週齢ラットに対し、50 μ g の化学合成 K002 ペプチド (500 μ l) または PBS (500 μ l) を 1 日 1 回、5 日間連日投与し、経時的に皮弁末端の潰瘍形成程度を評価した。その結果、PBS 投

与群に比較して K002 ペプチド投与群は有意に疎血性皮膚潰瘍抑制効果および潰瘍上皮化促進効果を示すことが明らかとなった（添付書類 1：開発候補物概要書図 4、図 5 参照）。

最近我々は、生後数日で死亡する表皮水疱症モデルマウス（VII 型コラーゲン欠損マウス）新生仔皮膚を正常マウス皮膚に移植することにより、移植皮膚が放出する HMGB1 が骨髄より動間葉系幹細胞を動員し、移植皮膚特異的に集積させること、その特異的な集積には移植皮膚片が放出するケモカイン SDF-1 と骨髄間葉系幹細胞表面の受容体 CXCR4 の作用が寄与していることを明らかにした。そこで、CXCR4 特異的阻害剤 AMD3100 持続的投与で表皮水疱症皮膚への骨髄間葉系幹細胞集積を阻害することにより、表皮水疱症皮膚病態に対する骨髄間葉系幹細胞集積作用を検討した。

以上の結果を基にして、K002 ペプチドの表皮水疱症に対する医師主導治験実施を可能にするために、GMP 非臨床試験実施計画書を作成した。具体的内容は、安全性薬理試験、薬物動態試験、反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験、遺伝毒性試験、免疫毒性試験のそれぞれについて GMP 非臨床試験内容を作成した（添付書類 2：GLP 非臨床試験実施計画書参照）。

D. 考察

表皮水疱症は皮膚基底膜接着分子の遺伝子異常を病態とするため、その根治的治療を実現するためには、遺伝子治療や再生医療の方法論を用いて皮膚基底膜領域に欠損している接着分子を補充する新たな方法論の開発が必要であることは言うまでもない。しかし、日常診療で見る表皮水疱症患者の皮膚病態では、皮膚潰瘍部およびその周囲皮膚の慢性炎症に伴う強い掻痒が喚起する

により、水疱形成、皮膚潰瘍形成が著明に悪化しているのが現状である。しかし、抗アレルギー、抗ヒスタミン薬をはじめとする既存の止痒剤は全く効果なく、表皮水疱症の皮膚症状を改善するためには皮膚炎を抑制する新たな治療薬の開発が必要である。

また、表皮水疱症の中でも基底膜分子の完全欠損による最重症型の場合は欠損分子を補充する方法論の開発が必要であることは言うまでもないが、我々の表皮水疱症外来を受診している表皮水疱症患者の両親の少なくとも一方由来の遺伝子はアミノ酸置換型変異を持つ場合が多く、その場合は変異蛋白が産生されている。近年の研究では、例えば変異蛋白であっても、その産生が増加すると基底膜部位の接着機能が向上し、病態が改善することが示唆されている。

一方、骨髄間葉系幹細胞は、炎症性病変部や免疫反応部位に投与することにより、樹状細胞やマクロファージ、リンパ球、NK 細胞の増殖及び機能を強く抑制することにより、炎症反応、免疫反応を抑制的に制御することが明らかにされつつある。実際に、輸血後のステロイド抵抗性 GVHD に他家骨髄間葉系幹細胞を静脈内に移植して病態を改善する臨床試験が進められ、その効果が報告されている。また、臓器移植後の免疫反応抑制やクローン病、肝炎などの治療に間葉系幹細胞の全身性投与を応用する臨床研究が進められている。

また、骨髄間葉系幹細胞は栄養障害型表皮水疱症患者で欠損ないし変異している VII 型コラーゲンを産生し、その移植により病態を改善し得ることが我々の研究や国外の研究者による研究により明らかにされた。

さらに、創傷部皮膚に投与した間葉系幹細胞は、損傷組織における炎症性サイトカイン産生を抑制することにより、組織の線維化・瘢痕治癒

を抑制して癒痕の少ない組織再生を誘導することが知られている。

以上の背景により、HMGB1 あるいはその機能ドメインペプチド K002 を表皮水疱症患者に静脈内投与して本人の骨髄間葉系幹細胞を血中動員し、水疱部皮膚に集積させることにより、間葉系幹細胞の持つ抗炎症作用、抗免疫作用により局所の炎症反応を抑制的に制御し、

爬行動が軽減されれば臨床症状は著明に改善することが期待される。さらに、VII 型コラーゲンの部分変異による中等症、軽症の表皮水疱症患者の場合は皮膚に動員された骨髄由来間葉系幹細胞が変異 VII 型コラーゲンを発現することにより、基底膜部位の接着機能の向上が得られると期待される。さらに、剥離表皮部再生の際に著明な癒痕形成が生じて手指が棍棒状に癒着し、また食道癒痕狭窄により強い嚥下障害が生じる栄養障害型表皮水疱症では、剥離表皮部に集積した間葉系幹細胞が癒痕形成を抑制する結果、手指の癒着や食道狭窄の進行を抑制的に制御できると予想する。

一方、我々は表皮水疱症の剥離表皮部が持つ特殊な皮膚環境内では骨髄から血流を介して直接動員された間葉系幹細胞は線維芽細胞のみならず表皮細胞へと分化し得ることを明らかにしている。水疱部に集積する骨髄間葉系幹細胞は、水疱部表皮の早期上皮化を実現すると期待する。

HMGB1 あるいは K002 の持つ間葉系幹細胞動員メカニズムを利用した表皮水疱症治療は、遺伝子異常を病態の本質とする本症の本質的治療という訳ではもちろん無い。しかし、生直後から生涯続く表皮剥離の結果、難治性皮膚潰瘍、著明な皮膚炎及び強い

多くの治療困難な病態を持つ表皮水疱症に対し、安全かつ有効な新たな治療薬を提供することは我々研究者

の責務である。

製薬企業と共同で GMP 製剤 HMGB1 の産生確立を目指したが、この 1 年間で生産系を確立することが困難であったため、現時点では GMP 製剤を用いる臨床試験に進むことが出来ない。この問題を克服するため、我々はこの 1 年の研究期間で HMGB1 の骨髄間葉系幹細胞血中動員機能ドメインを解明し、さらにそのドメインからなる合成ペプチド K002 の静脈内投与で骨髄間葉系幹細胞を血中動員し得ること、ラット疎血性皮膚潰瘍モデルに K002 を静脈内投与することにより、治療効果が得られることを確認した（別添資料：開発候補物概要書参照）。さらに、この HMGB1 活性ドメインペプチドを用いた GLP 非臨床試験実施プロトコルを作成すると共に、臨床試験実施、創薬実現のためのマイルストーンを作成した。しかし、最重症型栄養障害型表皮水疱症モデルマウスである VII 型コラーゲン完全欠損マウスは生後数日で死亡してしまうため、K002 ペプチド治療効果を評価することが出来ない。現在我々は、変異 VII 型コラーゲンが発現し、致死率は低いものの難治性皮膚潰瘍、手指の癒着が生じる中等症栄養障害型表皮水疱症モデルマウスを獲て、K002 静脈内投与による有効性を進めている。有効な結果が得られ次第、GMP 製剤 K002 の委託合成を進め、表皮水疱症に対する有効な医薬開発を実現するための GMP 非臨床試験、臨床試験を実施する予定である。

E. 結論

難治性皮膚潰瘍に有効な骨髄間葉系幹細胞血中動員医薬 K002 の開発に成功した。今後表皮水疱症モデル動物への有効性を確認した後に、非臨床試験、臨床試験を実施して創薬化を実現する。

F. 研究発表 (平成 23 年度)
論文発表

玉井克人

1. Kiyohara E, Tamai K, Katayama I, Kaneda Y. The combination of chemotherapy with HVJ-E containing Rad51 siRNA elicited diverse anti-tumor effects and synergistically suppressed melanoma. *Gene Ther.* 2011 Sep 8. doi: 10.1038/gt.2011.123. [Epub ahead of print]
2. Nakagami H, Nishikawa T, Tamura N, Maeda A, Hibino H, Mochizuki M, Shimosato T, Moriya T, Morishita R, Tamai K, Tomono K, Kaneda Y. Modification of a novel angiogenic peptide, AG30, for the development of novel therapeutic agents. *J Cell Mol Med.* 2011 Aug 3. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01406.x. [Epub ahead of print]
3. Tamai K, Yamazaki T, Chino T, Ishii M, Otsuru S, Kikuchi Y, Iinuma S, Saga K, Nimura K, Shimbo T, Umegaki N, Katayama I, Miyazaki J, Takeda J, McGrath JA, Uitto J, Kaneda Y. PDGFRalpha-positive cells in bone marrow are mobilized by high mobility group box 1 (HMGB1) to regenerate injured epithelia. *Proc*

Natl Acad Sci U S A. 2011 Apr 19; 108(16):6609-14. Epub 2011 Apr 4.

片山一朗

1. Hanafusa T, Tamai K, Umegaki N, Yamaguchi Y, Fukuda S, Nishikawa Y, Yaegashi N, Okuyama R, McGrath JA, Katayama I. The course of pregnancy and childbirth in three mothers with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Clin Exp Dermatol.* 2012 Jan;37(1):10-4. doi: 10.1111/j.1365-2230.2011.04179.x. Epub 2011 Oct 18.
2. Arase N, Igawa K, Senda S, Terao M, Murota H, Katayama I. Morphea on the breast after a needle biopsy. *Ann Dermatol.* 2011 Dec;23(Suppl 3):S408-10. Epub 2011 Dec 27.
3. Kotobuki Y, Tanemura A, Yang L, Itoi S, Wataya-Kaneda M, Murota H, Fujimoto M, Serada S, Naka T, Katayama I. Dysregulation of melanocyte function by Th17-related cytokines: significance of Th17 cell infiltration in autoimmune vitiligo vulgaris. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012 Mar;25(2):219-30. doi: 10.1111/j.1755-148X.2011.00945.x. Epub 2012 Feb 10.

4. Kitaba S, Murota H, Terao M, Azukizawa H, Terabe F, Shima Y, Fujimoto M, Tanaka T, Naka T, Kishimoto T, **Katayama I**. Blockade of interleukin-6 receptor alleviates disease in mouse model of scleroderma. *Am J Pathol*. 2012 Jan;180(1):165-76. Epub 2011 Nov 7.

金田眞理

1. **Wataya-Kaneda M**, Tanaka M, Nakamura A, Matsumoto S, **Katayama I**. A novel application of topical rapamycin formulation, an inhibitor of mTOR, for patients with hypomelanotic macules in tuberous sclerosis complex. *Arch Dermatol*. 2012 Jan;148(1):138-9. No abstract available.
2. Kotobuki Y, Tanemura A, Yang L, Itoi S, **Wataya-Kaneda M**, **Murota H**, Fujimoto M, Serada S, Naka T, **Katayama I**. Dysregulation of melanocyte function by Th17-related cytokines: significance of Th17 cell infiltration in autoimmune vitiligo vulgaris. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012 Mar;25(2):219-30. doi: 10.1111/j.1755-148X.2011.00945.x. Epub 2012 Feb 10.
3. Arase N, **Wataya-Kaneda M**, Oiso N, Tanemura A, Kawada A, Suzuki T, **Katayama I** Repigmentation of

leukoderma in a piebald patient associated with a novel c-KIT gene mutation, G592E, of the tyrosine kinase domain. *J Dermatol Sci*. 2011 Nov;64(2):147-9. Epub 2011 Aug 27. No abstract available.

4. Murakami Y, **Wataya-Kaneda M**, Terao M, Azukizawa H, **Murota H**, Nakata Y, **Katayama I**. Peculiar distribution of tumorous xanthomas in an adult case of erdheim-chester disease complicated by atopic dermatitis. *Case Rep Dermatol*. 2011 May;3(2):107-12. Epub 2011 May 17.

室田浩之

1. Hayashi H, Kohno T, Yasui K, **Murota H**, Kimura T, Duncan GS, Nakashima T, Yamamoto K, **Katayama I**, Ma Y, Chua KJ, Suematsu T, Shimokawa I, Akira S, Kubo Y, Mak TW, Matsuyama T. Characterization of dsRNA-induced pancreatitis model reveals the regulatory role of IFN regulatory factor 2 (Irf2) in trypsinogen5 gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Nov 15;108(46):18766-71. Epub 2011 Oct 31.
2. Terao M, **Murota H**, Kimura A, Kato A, Ishikawa A, Igawa K, Miyoshi E, **Katayama I**. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase-1 is a novel

- regulator of skin homeostasis and a candidate target for promoting tissue repair. *PLoS One*. 2011;6(9):e25039. Epub 2011 Sep 20.
3. Terao M, Ishikawa A, Nakahara S, Kimura A, Kato A, Moriwaki K, Kamada Y, **Murota H**, Taniguchi N, **Katayama I**, Miyoshi E. Enhanced epithelial-mesenchymal transition-like phenotype in N-acetylglucosaminyltransferase V transgenic mouse skin promotes wound healing. *J Biol Chem*. 2011 Aug 12;286(32):28303-11. Epub 2011 Jun 22.
 4. Terao M, Nishida K, **Murota H**, **Katayama I**. Clinical effect of tocotrienate on lichen and macular amyloidosis. *J Dermatol*. 2011 Feb;38(2):179-84. doi: 10.1111/j.1346-8138.2010.00962.x. Epub 2010 Sep 29.
- 名井 陽
1. Ren LM, Arahira T, Todo M, Yoshikawa H, **Myoui A**. Biomechanical evaluation of porous bioactive ceramics after implantation: micro CT-based three-dimensional finite element analysis. *J Mater Sci Mater Med*. 2012 Feb;23(2):463-72. Epub 2011 Nov 23.
 2. Kawato Y, Hirao M, Ebina K, Tamai N, Shi K, Hashimoto J, Yoshikawa H, **Myoui A**. Nkx3.2-induced suppression of Runx2 is a crucial mediator of hypoxia-dependent maintenance of chondrocyte phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Dec 9;416(1-2):205-10. Epub 2011 Nov 10.
 3. Tao H, Okamoto M, Nishikawa M, Yoshikawa H, **Myoui A**. P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, FR167653, inhibits parathyroid hormone related protein-induced osteoclastogenesis and bone resorption. *PLoS One*. 2011;6(8):e23199. Epub 2011 Aug 23.
 4. Yokoi M, Hattori K, Narikawa K, Ohgushi H, Tadokoro M, Hoshi K, Takato T, **Myoui A**, Nanno K, Kato Y, Kanawa M, Sugawara K, Kobo T, Ushida T. Feasibility and limitations of the round robin test for assessment of in vitro chondrogenesis evaluation protocol in a tissue-engineered medical product. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011 Aug 2. doi: 10.1002/term.460. [Epub ahead of print]

江副幸子

1. Shibata M, **Ezoe S**, Oritani K, Matsui K, Tokunaga M, Fujita N, Saito Y, Takahashi T, Hino M, Matsumura I, Kanakura Y. Myeloid neoplasm-related gene abnormalities differentially affect dendritic cell differentiation from murine hematopoietic stem/progenitor cells. Leuk Res. 35(9):1205- 1211. 2011
2. Fujita J, Mizuki M, Otsuka M, **Ezoe S**, Tanaka H, Satoh Y, Fukushima K, Tokunaga M, Matsumura I, Kanakura Y. Myeloid neoplasm-related gene abnormalities differentially affect dendritic cell differentiation from murine hematopoietic stem/progenitor cells. Immunol Lett. ;136(1):61-73, 2011

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 名 称:組織再生を誘導するためのペプチドとその利用、出願番号：特願 2011-98270、出願日：平成 23 年 4 月 26 日
2. 名 称:組織再生を誘導するためのペプチドとその利用、出願番号：特願 2011-219454（国内優先権主張出願）、出願日：平成 23 年 10 月 3 日

添付書類1: 開発候補物概要書

1 起源又は発見の経緯と期待される薬理作用

本開発候補物 K002 は、HMGB1 (High mobility group box 1 : 高移動性グループ 1) タンパク質の生理活性部分ペプチドである。

HMGB1 は、約 30 年前に核内クロマチン構造を制御して遺伝子発現や DNA 修復を制御する非ヒストンクロマチンタンパク質として同定された。HMGB1 タンパク質の構造は主に二つの DNA 結合ドメインから構成され、N 末端側にある DNA 結合ドメインを A-box、C 末端側の DNA 結合ドメインを B-box と呼ぶ。過去の研究により、HMGB1 分子内で TLR と結合して炎症反応を喚起するドメインは B-box 内に存在することが明らかにされている (図 1)。

最近、本申請者らは、皮膚基底膜領域の接着分子遺伝子異常により、生下時より全身皮膚が剥離して全身熱傷様の症状を呈する遺伝性皮膚難病「表皮水疱症」における剥離表皮の再生機序の解明を目的とする研究を進め、剥離表皮から血中に放出される HMGB1 が骨髄中に存在する PDGFR α (platelet-derived growth factor receptor alpha) 陽性細胞を刺激して血中に動員し、剥離表皮部への集積を誘導していること、さらに剥離表皮部に集積した PDGFR α 陽性細胞は線維芽細胞や表皮細胞に分化して損傷皮膚の再生に強く寄与していることを、GFP (green fluorescent protein) トランスジェニック骨髄細胞を移植した表皮水疱症モデルマウスを用いることにより明らかにした。さらに、マウスに皮膚潰瘍や脳梗塞を作成した後に組み換え HMGB1 タンパク質を尾静脈から投与することにより、骨髄より PDGFR α 陽性細胞が血中動員され、さらに皮膚潰瘍部や脳梗塞部に集積して皮膚潰瘍や脳梗塞の再生を強く誘導することを明らかにした。

骨髄内 PDGFR α 陽性細胞は骨、軟骨、脂肪、さらには神経や上皮にも分化可能な間葉系幹細胞であることが既に報告されている。即ち、HMGB1 投与により骨髄内 PDGFR α 陽性間葉系幹細胞を末梢循環に動員し、損傷組織への集積を促進することで組織再生を誘導する画期的な治療薬の開発が期待される。

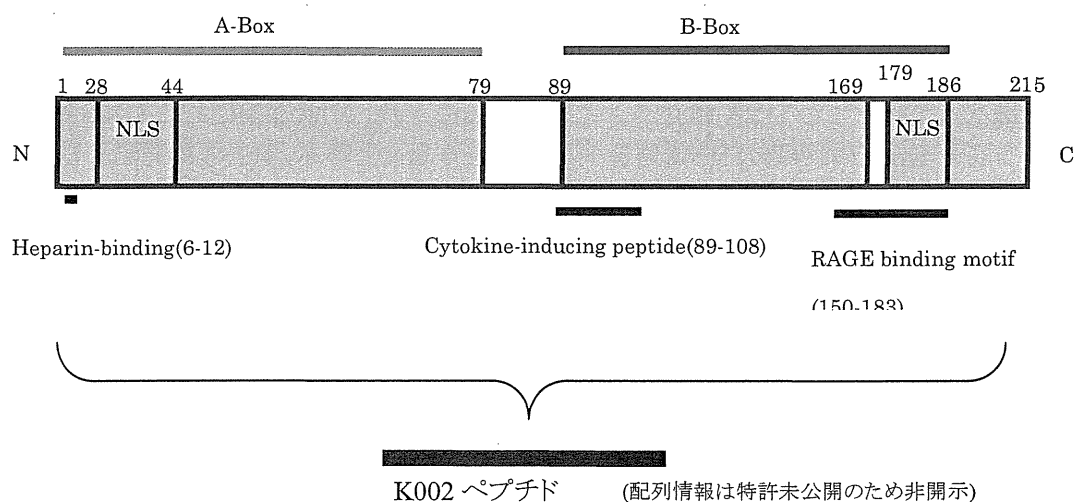
しかしながら、HMGB1 は分子内にエンドトキシンとの結合ドメインを有することから、医薬品として製造するうえで安全性に懸念がある。エンドトキシンは少量の混入でも発熱などをおこし、しばしば重篤な副作用となるため、医薬品への混入は厳しく規制されている。

そこで本申請者らは、HMGB1 の PDGFR α 陽性細胞動員活性部分のみの抽出を行うことによりエンドトキシン結合部分を除くことを企図した。HMGB1 分子内の少しずつオーバーラップするさまざまなペプチド断片を合成し、PDGFR α 陽性骨髄間葉系幹細胞株に対する遊走活性 (マイグレーション活性) の評価を試みた。その結果、本申請者らは、PDGFR α 陽性細胞動員活性を有する複数のペプチド断片の同定に成功し、そのなかから医薬品開発の候補として本開発候補物 K002 を選択した。

K002 は、ペプチド化によってエンドトキシンとの親和性が低下することからエンドトキシンの混入リスクを軽減できると予想され、より安全な医薬品の開発が可能になる。また、全長が約 200 アミノ酸からなる HMGB1 タンパク質に対し、K002 は分子

量が 5 分の 1 程度の PDGFR α 陽性細胞動員活性を維持したペプチド断片であり、化学的合成による製造が可能であるため、医薬品として製造する場面において、精製純度の向上、安定生産、コスト削減が期待されるようになった。

図 1: HMGB1 タンパクの構造と K002 ペプチド



2 予備的薬効試験

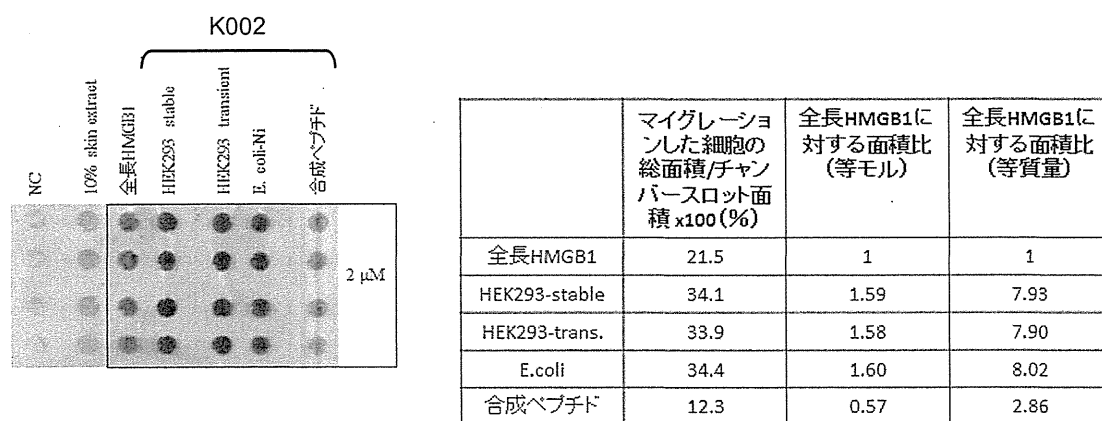
2.1 骨髄間葉系幹細胞に対する遊走活性

【方法】 HMGB1 タンパクおよび K002 ペプチドの骨髄間葉系幹細胞に対する遊走活性の比較をおこなった。HMGB1 タンパクは哺乳類細胞 (HEK293 細胞) により製造した。K002 は、化学合成のほか、哺乳類細胞 (HEK293 細胞) および大腸菌により製造した。

マウス PDGFR α 陽性骨髄間葉系幹細胞株 MSC-1 細胞をディッシュからトリプシンを使用して 4°C、1200rpm、10 分の遠心により回収した。ペレットをほぐし、細胞濃度が $2.0 \sim 3.0 \times 10^6$ 個/ml になるように、10%FBS (Fetal bovine serum) 含 D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) を加え混濁した。HMGB1 タンパクおよび K002 を 10%FBS 含 D-MEM に希釈した。陰性コントロールとしては PBS (Phosphate buffered saline) を使用した。アクリル製ボイデンチャンバーを使用し、上層には、 3×10^6 個/ml に調製されたマウス骨髄間葉系幹細胞株を、下層には希釈した HMGB1 タンパクもしくは K002 を入れた。より詳細には、48 穴ケモタキシスチャンバー (NEURO PROBE 48WELL CHEMOTAXIS CHAMBER) の底板穴に HMGB1 タンパクまたは K002 溶解液を $2 \mu\text{M}$ の濃度で $28 \mu\text{l}$ ずつ入れ、底板の上に $8 \mu\text{m}$ 孔のポリカーボネートメンブレン (Neuro Probe, Inc, Cat: 866-417-0014) を載せて、さらに上板を載せてネジでしっかり止めた。上板穴に細胞濃度調整をすませたマウス PDGFR α 陽性骨髄間葉系幹細胞株を $50 \mu\text{l}$ 入れた。チャンバーは 37°C、5%CO₂ のインキュベーター内で静置した。4 時間後チャンバーのメンブレンを回収し、Diff-Quik (Sysmex, Cat: 16920) を用いて、膜の孔を通り抜け下層に向かってマイグレーションした細胞を染色により検出し、ケモタキシスチャンバーの孔の面積とマイグレーションした細胞の面積を、画像解析ソフトを用いて計測した。

【結果と考察】 等モルあたりでは全長の HMGB1 に対して HEK293 で産生した K002 も、大腸菌で産生した K002 も約 1.6 倍高いマイグレーション活性を示した。等質量あたりでは全長の HMGB1 に対して HEK293 で産生した K002 も、大腸菌で産生した K002 も約 8 倍高いマイグレーション活性を示した。化学合成した K002 は、全長の HMGB1 に対し等モルでは 0.57 倍であったが、等質量あたりでは 2.86 倍の高いマイグレーション活性を示した (図 2)。

図 2: K002 のマイグレーション活性



2.2 末梢血中への骨髓間葉系幹細胞動員活性

【方法】 静脈投与された K002 (化学合成) が、マウス骨髓から PDGFR α 陽性間葉系幹細胞を末梢血中に動員する活性を測定した。

C57B16 マウス (8 週齢、雌) の尾静脈から 10 μ g の K002 を 200 ml の PBS に希釈し 30 ゲージ針付きシリンジを用いて投与した。陰性コントロールには同量の PBS を投与した。12 時間後イソフルランによる全身麻酔下で左心室から末梢血液を採血した。3ml の PBS (Nacalai tesque, Cat.14249-95) 加えた後、Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Cat. 17-1440-02) 3ml を重層した。遠心機を用い 400G、25°C で 45 分間遠心を行った。上層の血清を捨てて、中間層の白いバンドとして見える細胞のみを回収した。回収した細胞に PBS 45ml を加えて、遠心機を用いて 800G、25°C で 20 分間遠心を行った。上清すてて PBS 10ml 加え遠心機で 1500rpm の速度、25°C で 10 分間遠心を行った。上清すてて、HLB (溶血用緩衝液) (免疫生物研究所社製) を 1ml 加えピペティングし 5 分間静置する。10ml の PBS 加えて 1500rpm の速度、25°C で 10 分間遠心を行った。沈殿した単核細胞を回収した。回収した単核細胞を丸底 96 well プレートに、 1×10^6 個/100 μ l (2% FBS 含 PBS) で調整した。PE-mouse CD140a (PDGFR α) (BD Bioscience, Cat. 12-1401-81) もしくは FITC-mouse CD44 (BD Bioscience, Cat. 553-133) を、それぞれ単核細胞の入ったウェルに 1 μ l ずつ加え遮光し 20 分間 4°C でインキュベートした。PBS 200 μ l ずつ加え、1500rpm の速度、4°C で 10 分間遠心を行った。上清を捨て再度 PBS 200 μ l ずつ加え、1500rpm の速度、4°C で 10 分間遠心を行った。PBS 100 μ l に細胞を懸濁後、1%パラホルムアルデヒド 300 μ l を加えた。なおイソタイプコントロー

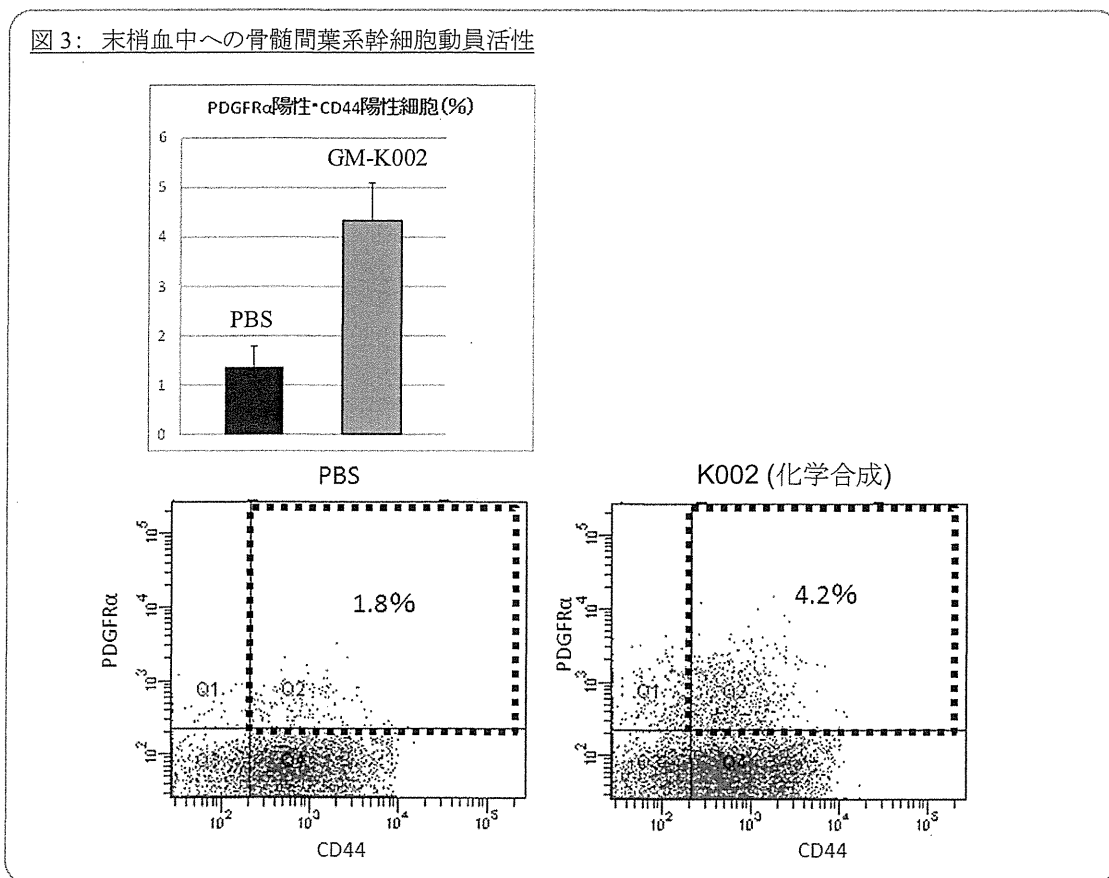
ル用抗体を使用して同様にコントロールを作製した。FACSCantTMII を使用して上記で調整した細胞の解析を行った。

【結果と考察】 陰性コントロール群（PBS 投与群）では、末梢血中の PDGFR α 陽性かつ CD44 陽性細胞の割合は平均 1.33%であったのに対し、K002（化学合成）投与群では平均 4.33%に増えていた（図 3）。

2.1 においては、K002 の *in vitro* における PDGFR α 陽性かつ CD44 陽性である骨髄間葉系幹細胞に対するマイグレーション活性を認めた。本実験では *in vivo* においても末梢血中に PDGFR α 陽性かつ CD44 陽性の細胞を動員することが示された。

PDGFR α 陽性と CD44 陽性はいずれも骨髄間葉系幹細胞のマーカーである。骨髄間葉系幹細胞は再生医療に有効であることが知られており、本開発候補物の静脈内投与が損傷組織の治療に有効であることが期待される。

図 3: 末梢血中への骨髄間葉系幹細胞動員活性



2.3 皮膚阻血性壊死モデルに対する治療効果

【方法】 HMGB1 タンパクおよび K002（化学合成）について、皮膚の阻血性壊死組織に対する治療効果を測定した。HMGB1 タンパクは哺乳類細胞（HEK293 細胞）により製造した。K002 は化学合成により製造した。

実験動物はSDラット（雄、8週齢）を使用した。イソフルランによる吸入麻酔によって十分な麻酔を施行した後、背部に横3cm縦7cmの短冊状の皮膚切開を作製した。ただし、頭側の一辺は切除せず、皮膚は皮下の組織から十分に遊離した。切開した3辺を周囲の皮膚と4号絹糸を用いて縫合し、テガダーム（3M社製）を使用して保護し細菌感染を予防した。

ラットにHMGB1タンパク（100 μ g/回/日）、K002（50 μ g/回/日）を、手術後6時間を初回として以後24時間ごとに計5回、薬剤をリン酸緩衝液で200 μ lに希釈し尾静脈から投与した。陰性コントロールにはリン酸緩衝生理的食塩水を投与した。

1週間後、テガダームを除去し1週ごとに創傷部位を観察した。壊死部分、潰瘍形成部分の面積を測定した。

【結果と考察】 手術1週後に陰性コントロール群では5匹中4匹に皮膚壊死が発生した。全長HMGB1投与群では5匹中3匹で皮膚壊死が発生した。K002投与群では5匹中1匹で皮膚壊死が発生した。手術7週間後には陰性コントロール群では5匹中4匹において皮膚の強い拘縮が起きているのに対し、全長HMGB1投与群では5匹中3匹で、K002投与群では5匹中2匹で拘縮が認められた。（図5）

HMGB1投与群およびK002投与群で1週間後の壊死組織の縮小効果を認め、K002投与群ではより顕著な縮小効果が認められた。1週間後、2週間後、3週間後では創傷面積がいずれもネガティブコントロール群の半分の面積に縮小していた。3週間後以降はK002投与群が他の2群に比較してさらに創傷面積が縮小していた。7週間の治癒過程においても、K002投与群の方がより創傷面積が小さい傾向にあった。7週間後の創傷部分の拘縮においてもK002投与群がもっとも拘縮が軽度であった（図4）。

骨髄間葉系幹細胞は低酸素状態における皮膚細胞の増殖を促進することが知られており、HMGB1やK002によって動員された骨髄間葉系幹細胞が皮弁作製によって生じた低栄養、低酸素による皮膚壊死の拡大を抑制し、創傷治癒を促進したと予想された。この結果から、臨床では皮膚の疎血、外傷、手術による損傷の拡大などを抑制するK002の薬理効果が期待される。

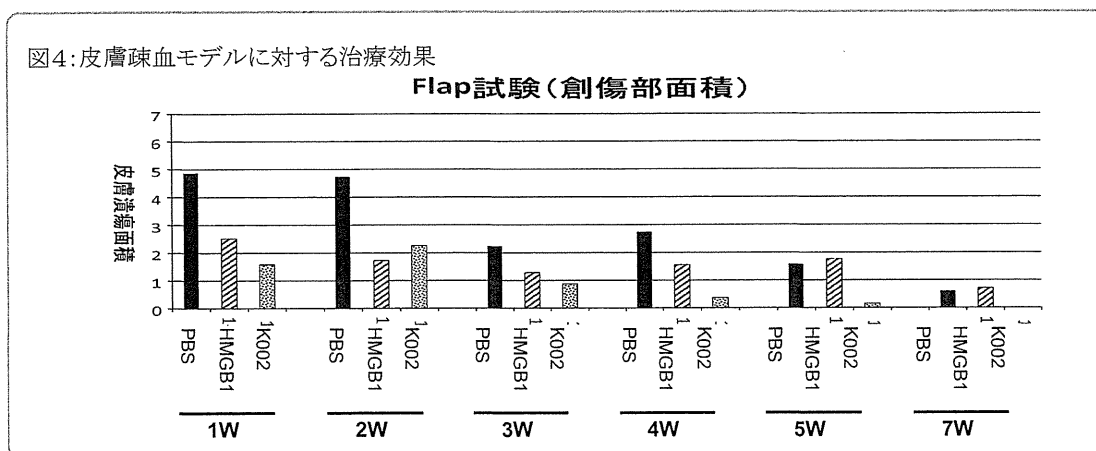
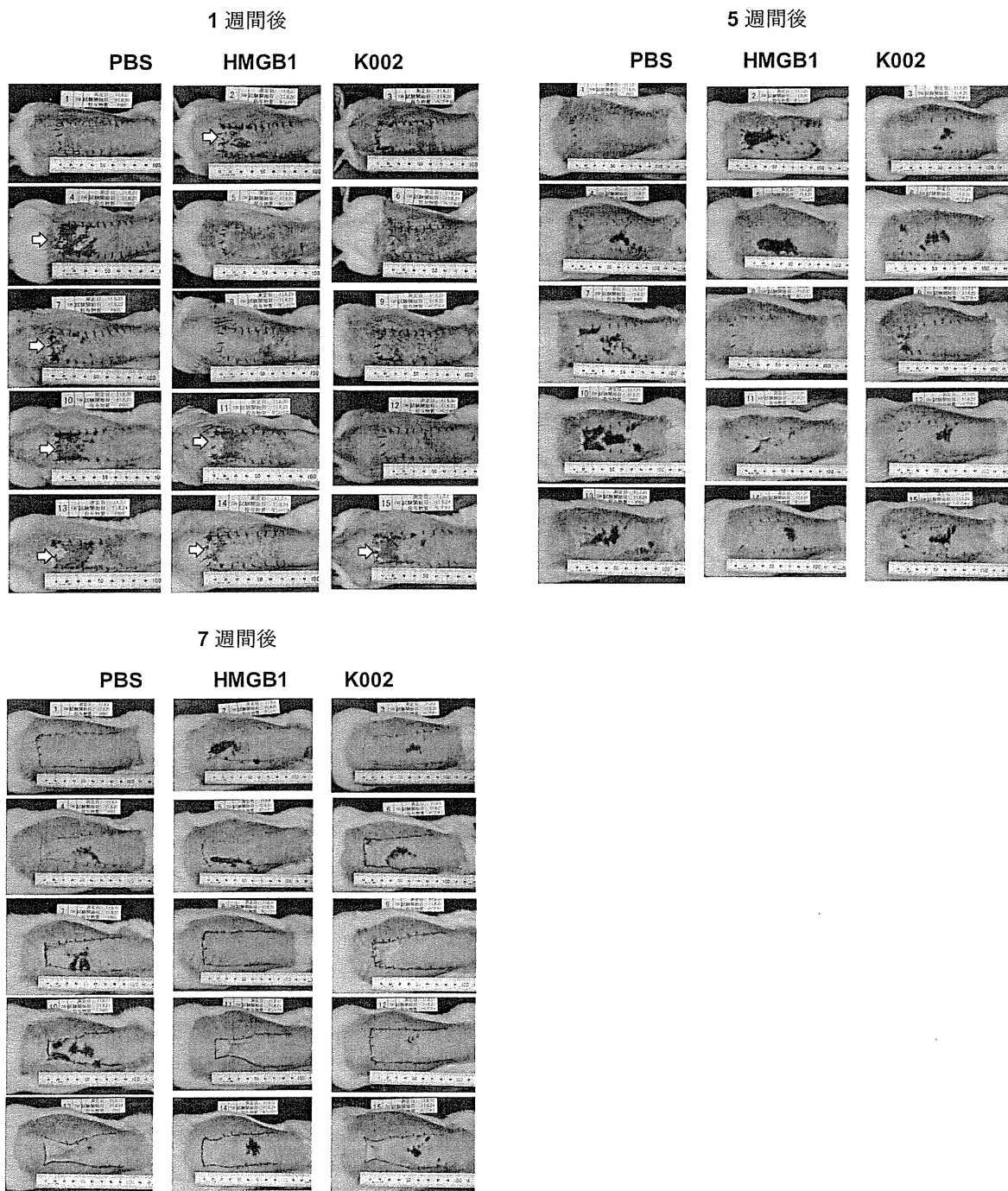


図 5: ラット皮膚疎血性壊死モデルへの HMGB1 および K002 ペプチド静脈内投与効果の実際



3 特許状況

本開発候補物について、下記の特許を出願済みである。

- (1) 名称 : 組織再生を誘導するためのペプチドとその利用
出願番号 : 特願 2011-98270
出願日 : 平成 23 年 4 月 26 日
- (2) 名称 : 組織再生を誘導するためのペプチドとその利用
出願番号 : 特願 2011-219454 (国内優先権主張出願)
出願日 : 平成 23 年 10 月 3 日

4 製造工程および製剤規格

本開発候補物 K002 は化学合成法により製造する。GLP 非臨床試験および臨床試験に用いるペプチド製剤は、今後、海外の受託製造企業にて生産する予定である。

現時点で予備的薬効試験に用いているペプチドは、(株)医学生物学研究所に製造委託した研究用試薬グレードの合成ペプチドである。本品の品質規格については、別添「K002 合成ペプチド分析結果」をご参照。製造法及び工程は以下の通り。

<合成作業>

PerSeptive Biosystems 社の Pioneer Peptide Synthesis System を使用し、Fmoc 法で合成した。尚、Resin は Applied Biosystems 社、伸長時に使用した各種アミノ酸は Merck あるいは渡辺化学のものを使用した。

↓
合成したペプチド+レジンを回収し、TFA 法により樹脂からペプチドを切り離した。

↓
レジンから切り離したペプチドはエーテル沈殿を行い、粗精製品として回収した。

<精製作業>

粗精製のペプチドを溶解し、HPLC で精製した。精製に用いたカラムは YMC-Pack ODS-A (250mm×20mm I.D.、粒子径 5 μm、細孔径 12nm) を使用、送液・検出の機器は Shimadzu 社の LC10Ai、SPD-10Ai を使用した。

<検定作業>

精製ペプチドの検定作業は検定書に記載の条件で実施した。純度検定は精製作業に用いたものと同様の機器を使用した。カラムのみ分析用(150×4.6 mm I.D.)を使用した。TOF-MS は Applied Biosystems 社の Voyager system を使用して実施した。

(株)医学生物学研究所
伊那研究所 技術研究部

5 物理化学的性質

本開発候補物の化学構造（ペプチド配列情報等）は非開示とする。物理化学的性質および安定性については、今後、各評価試験を実施予定である。

6 薬物動態および安全性試験

別添資料2「HMGB1 ペプチド製剤の（GLP）非臨床安全性試験実施計画書」に従い、今後、非臨床試験を実施する予定である。

以上

添付書類2：ペプチド製剤 K002 の（GLP）非臨床安全性試験実施計画書

本実施計画書は、ICH日米EU医薬品規制調和国際会議で定められた「安全性 非臨床に関するガイドライン」、及び薬食審査発0219第4号（平成22年2月19日）「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」に従い作成した。

また HMGB1 ペプチド製剤 K002（被験物質）の動物モデルにおける薬効薬理試験の結果から、推定臨床用法/用量を一日一回 10 mg、5 日間連続静脈内投与とし、これを基本に非臨床安全性試験の実施計画を立てた。なお、以下の非臨床安全性試験は GLP 基準に基づいて実施する予定である。

1. 安全性薬理試験

目的：主要な器官（循環器系、呼吸器系、中枢神経系）の生理的機能に及ぼす被験物質の影響を明らかにする。

方法：

- (1) 被験物質（200 μ g \sim 10mg/kg）をイヌに単回静脈内投与し、循環器系（血圧、心拍数、心電図）、及び呼吸器系（呼吸数、他の呼吸機能（一回換気量等））に及ぼす影響を検討する。
- (2) 被験物質（200 μ g \sim 10mg/kg）をラットに単回静脈内投与し、中枢神経系（運動量、行動変化、協調性、感覚/運動反射反応、及び体温）に及ぼす影響を検討する。
- (3) 心室再分極に及ぼす影響（再分極遅延、QT 間隔延長）を検討する。in vitro での HERG 試験とイヌ静脈内投与（1. 安全性薬理試験（1）と 3. 反復投与毒性試験での心電図の精査）による in vivo 試験で検討する。

2. 薬物動態試験

目的：In vitro 試験および in vivo 試験により被験物質のトキシコキネティクスおよび薬物動態を検討する。

方法：

- (1) in vitro 実験で被験物質の血漿タンパクとの結合性をヒト、イヌ、ラット、マウスなどについて比較検討する。被験物質がヒトおよび実験動物の血清、培養肝細胞中でどの程度加水分解されるかを検討する。被験物質の濃度は 2-20 \cdot g/ml、測定法にはエンザイム・イムノアッセイを予定している。
- (2) in vivo で、被験物質（200 μ g \sim 1mg/kg）をラット及びイヌに単回及び 5 日間反復静脈投与し、経時的に血漿中の被験物質の濃度を測定し、最高濃度（C_{max}）、消失半減期（T_{1/2}）、濃度時間曲線化面積（AUC）を検討す