

201140002A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

脳／心血管領域におけるアンメットニーズに

対応する創薬研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小室 一成

平成24（2012）年 5月

# 目 次

## I. 総括研究報告

脳／心血管領域におけるアンメットニーズに対応する創薬に関する研究 小室 一成	1
-------------------------------------------	---

## II. 分担研究報告

1. 骨髄間葉系幹細胞血中動員因子を利用した脳・心血管疾患治療に関する研究 玉井 克人	5
2. 血管新生作用を有する新規ペプチド（AG30）の虚血性潰瘍への応用に関する研究 中神 啓徳	7
3. 重症心不全に対するアフレーシス治療およびバイオマーカーの探索に関する研究 澤 芳樹	9
4. 不全心臓選択的ターゲティングによる抗HB-EGF抗体／ナノリポソームを用いた新規心不全治療薬の開発に関する研究 南野 哲男	11
5. 生体内で自己組織の再生を促すセルフリー型再生デバイスによる心筋再生療法に関する研究 宮川 繁	17
6. LRG(Leucine-Rich alpha-2 Glycoprotein)蛋白の虚血性心疾患治療への臨床応用に関する研究 宮川 繁	20

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	22
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	22
-----------------	----

# I. 総括研究報告

脳／心血管領域におけるアンメットニーズに対応する創薬に関する研究

研究代表者 小室 一成 大阪大学大学院医学系研究科 教授

**[研究要旨]**

大阪大学は、早期・探索的臨床試験拠点整備事業においては世界的にも急務とされる脳・心血管領域におけるアンメットニーズに対応するため、総合大学として薬学系/工学系等の研究科はもとより、(独)医薬基盤研究所や北里大学等他大学、製薬メーカー各社との連携により、シーズ探索から臨床応用への共同開発や橋渡し研究を行う創薬基盤を形成することを目的としている。本研究事業は、拠点整備事業の基盤を元に下記6つの重点シーズについて早期の臨床試験実施を目指す。

1. 骨髄間葉系幹細胞血中動員因子を利用した脳・心血管疾患治療
2. 血管新生作用を有する新規ペプチド（AG30）の虚血性潰瘍への応用
3. 重症心不全に対するアフエレーシス治療およびバイオマーカーの探索
4. 不全心臓選択的ターゲティングによる抗 HB-EGF 抗体／ナノリポソームを用いた新規心不全治療薬の開発
5. 生体内で自己組織の再生を促すセルフリー型再生デバイスによる心筋再生療法
6. LRG(Leucine-Rich alpha-2 Glycoprotein)蛋白の虚血性心疾患治療への臨床応用

本研究事業のシーズは、いずれもアカデミア発のシーズをアカデミア主導で臨床試験まで目指すものであり、基礎的研究成果の社会還元にもつれた一層の加速ならびに国際競争力の強化に資するものである。

**[研究分担者]**

澤 芳樹	大阪大学大学院医学系研究科・ 教授
名井 陽	大阪大学医学部附属病院・ 准教授
玉井克人	大阪大学大学院医学系研究科・ 寄附講座教授
中神啓徳	大阪大学大学院 大阪大学・金沢大学・浜松医科大学連合小児発達学研究所・ 寄附講座教授
宮川 繁	大阪大学大学院医学系研究科・ 助教
南野哲男	大阪大学大学院医学系研究科・ 講師
平田雅之	大阪大学大学院医学系研究科・ 特任准教授
前田和久	大阪大学大学院医学系研究科・ 寄附講座准教授
大藪恵一	大阪大学大学院医学系研究科・ 教授
高倉伸幸	大阪大学微生物病研究所・ 教授
山下俊英	大阪大学大学院医学系研究科・ 教授
齋藤洋一	大阪大学産学連携本部・ 特任教授
梅垣昌士	大阪大学臨床医工学融合研究教育センター・ 特任准教授

赤澤 宏	大阪大学大学院医学系研究科・ 特任講師
齋藤充弘	大阪大学医学部附属病院・ 助教
平 将生	大阪大学医学部附属病院・ 特任助教
中谷大作	大阪大学医学部附属病院・ 特任講師

**A. 研究目的**

大阪大学は、早期・探索的臨床試験拠点整備事業においては世界的にも急務とされる脳・心血管領域におけるアンメットニーズに対応するため、総合大学として薬学系/工学系等の研究科はもとより、(独) 医薬基盤研究所や北里大学等他大学、製薬メーカー各社との連携により、シーズ探索から臨床応用への共同開発や橋渡し研究を行う創薬基盤を形成することを目的としている。本研究事業は、拠点整備事業の基盤を元に下記6つの重点シーズについて早期の臨床試験実施を目指す。

## B. 研究方法

### 1. 骨髄間葉系幹細胞血中動員因子を利用した脳・心血管疾患治療

骨髄間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) の生体内損傷組織再生における役割解明研究の過程で、生体内の重度損傷組織からMSC血中動員因子が血中に大量放出され、一定の血中濃度に達すると骨髄内MSCを刺激して末梢血中に動員すること、血中動員されたMSCはさらに損傷組織が放出するMSC血中動員因子により損傷部位に集積することを見出した。さらに、MSC血中動員因子の骨髄MSC動員活性ドメインを探索し、そのドメインペプチド断片でも同様のMSC動員活性を持つことを明らかにした。さらに、HEK 293細胞を用いた組み換えMSC血中動員因子の大量生産系の確立に成功した。この因子の生体内MSC動員による組織再生誘導薬としてMSC血中動員因子医薬開発を進めた。

### 2. 血管新生作用を有する新規ペプチド (AG30) の虚血性潰瘍への応用

血管新生作用を有する分子のスクリーニングから同定した新規ペプチドAG (Angiogenic peptide) -30はカチオニックなアミノ酸を配しヘリックス構造を呈する構造的な特徴を有する。この新規ペプチドは強力な血管新生作用も有するとともに緑膿菌・黄色ブドウ球菌などに対する広い抗菌活性を有するユニークなペプチドである。また薬剤耐性緑膿菌やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌にも抗菌活性を有する。この血管新生と抗菌活性の両方の特性を活かしながら外用薬として製剤化し、虚血が主たる原因である難治性潰瘍に対する創薬開発を進めた。

### 3. 重症心不全に対するアフエレーシス治療およびバイオマーカーの探索

心不全を呈する拡張型心筋症患者に対してアフエレーシス治療を行うことにより、本治療法の安全性、QOLの改善、生命予後を観察すると同時に、副次的項目として心機能改善効果の検討を目標とする。また、基礎的研究にて探索された重症心不全に対するバイオマーカーの臨床的意義を検討すると同時に、新しい心不全のバイオマーカーを探索した。

### 4. 劇症型心筋炎選択的ターゲティングによる抗HB-EGF抗体/ナノリポソームを用いた心不全治療薬

高血圧性心不全モデルならびに劇症型心筋炎モデルを用いた解析から、これらの不全心臓で血管透過性が有意に亢進していることを見出した。この画期的な知見より、血中のナノサイズ粒子が不全心臓の血管透過性亢進を利用し、同部位に受動的に集積化することが期待でき、ドラッグデリバリーシステム (DDS) が慢性心不全の有効な治療法となる可能性を示している。実際、劇症型心筋炎モデルでは、免疫抑制剤FK506を内包したナノサイズリポソームはFK506単独投与を上回る心機能改善効果を示すことを見出した。この知見をもとに、新規心不全治療薬の開発を進めた。

### 5. 生体内で自己組織の再生を促すセルフリー型再生デバイスによる心筋再生療法

オキシム誘導体マイクロスフィア製剤を含有した心臓矯正ネットは、心不全の持つ幹細胞ニッチへ幹細胞を誘導する因子、ならびに幹細胞を心筋細胞、血管構成細胞への分化を促進する因子が塗布されたデバイスであり、本デバイスで心臓をまるごと包み込んで、幹細胞の誘導・心筋細胞への分化を同時に行うと同時に、心不全にて拡大した心臓を縫縮させる画期的な自己組織再生型心血管デバイスに成りうる。本技術による新規の虚血性心筋症や拡張型心筋症に対するデバイス開発を進めた。

### 6. LRG (Leucine-Rich alpha-2 Glycoprotein) 蛋白の虚血性心疾患治療への臨床応用

最新のプロテオミクス手法を用いて関節リウマチなどの炎症性疾患の新規活動性血清バイオマーカーとしてLRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein) を同定した。LRGが関節リウマチやクローン病の炎症局所においても発現し、その発現はCRPと相関を示すが、CRPとは異なり強い血管新生促進作用を持つことを明らかにしている (特願2009-275254)。本研究ではLRGによる心血管新生の詳細な機序解明と同時に、LRGタンパク質投与による虚血性心疾患の血流の改善、すなわち新規治療的血管新生薬剤の開発を進めた。

#### (倫理面への配慮)

基礎的研究において、遺伝子改変動物、プラスミドDNAあるいは遺伝子導入ウイルス等を用いる場合は、使用に際して遺伝子組み換え生物などの使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律、カルタヘナ条約等各種法令・告示・通知に基づき研究を実施した。

動物操作に当たっては、本学の動物実験規定に従

って行なった。

### C. 研究結果

#### 1. 骨髄間葉系幹細胞血中動員因子を利用した脳・心血管疾患治療

損傷組織が放出する因子が、末梢循環を介して骨髄間葉系幹細胞を損傷組織に集積させて組織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を基盤として、骨髄間葉系幹細胞遊走活性ドメインペプチドを用い、末梢循環不全に伴う皮膚潰瘍治療薬開発を目指した非臨床試験の準備を進めるとともに、その妥当性に関する基礎研究を進めた。

#### 2. 血管新生作用を有する新規ペプチド (AG30) の虚血性潰瘍への応用

ペプチド研究所への委託研究で、GMP での大量合成に適した液相法での合成方法をすでに確立しており、平成23年度に GMP での臨床用ペプチドの製造を行う予定である。ペプチド研究所で出荷試験を行い、大阪大学附属病院薬剤部で臨床研究のための製剤化を行う。

#### 3. 重症心不全に対するアフエレーシス治療およびバイオマーカーの探索

基礎研究 (非臨床研究) としては、心抑制性抗心筋自己抗体の簡易測定システムの開発を行い、日本および米国に対して特許を申請している。さらに、心不全患者の血液よりプロテオミックス技術を用いて、新規のバイオマーカーを抽出、同定し、同バイオマーカーの生理活性の検討を行った。

#### 4. 劇症型心筋炎選択的ターゲッティングによる抗 HB-EGF 抗体/ナノリポソームを用いた心不全治療薬

抗 HB-EGF 抗体は、非臨床試験レベルでは自己作製、臨床試験では企業に依頼を予定している。なお、共同研究者 (大阪大学 目加田英輔氏) は、抗 HB-EGF 抗体によるがん治療を開始した (企業治験、第一相試験)。抗 HB-EGF 抗体を用いた薬物/核酸製剤送達に関する特許はすでに申請中である (HB-EGF 結合性タンパク質複合体:PCT/ JP2010/051515)。

#### 5. 生体内で自己組織の再生を促すセルフリー型再生デバイスによる心筋再生療法

オキシム誘導体マイクロスフィア製剤の薬物動態試験、薬効薬理試験および一般薬理試験、オキシム誘導体マイクロスフィア製剤の心不全モデル (拡張型心筋症ハムスター、急性期心筋梗塞、拡張型心筋症イヌ) における治療効果の検討、心臓矯正

ネット (オキシム誘導体マイクロスフィア製剤含有無) の心不全モデル (拡張型心筋症豚、虚血性心筋症イヌ) への治療効果の検討を実施した。さらに、非臨床試験として、GMP オキシム誘導体マイクロスフィア製剤製造、薬物動態試験 (本試験) および一般薬理試験 (本試験) の追加試験、安全性試験 (GLP)、オキシム誘導体マイクロスフィア製剤を含有した心臓矯正ネットの臨床効果の検討を実施予定である。

### D. 考察

本研究事業のシーズは、いずれもアカデミア発のシーズをアカデミア主導で臨床試験まで目指すものであり、基礎的研究成果の社会還元に向けた一層の加速ならびに国際競争力の強化に資するものである。

### E. 結論

#### 1. 骨髄間葉系幹細胞血中動員因子を利用した脳・心血管疾患治療

非臨床のデータ集積を積極的に実施した。

#### 2. 血管新生作用を有する新規ペプチド (AG30) の虚血性潰瘍への応用

安全性試験を終了し、臨床研究のプロトコール作成に関するワーキンググループを立ち上げた積極的に実施した。

#### 3. 重症心不全に対するアフエレーシス治療およびバイオマーカーの探索

非臨床のデータ集積を積極的に実施するとともに、臨床研究の準備を行なった。

#### 4. 劇症型心筋炎選択的ターゲッティングによる抗HB-EGF抗体/ナノリポソームを用いた心不全治療薬

非臨床のデータ集積を積極的に実施した。

#### 5. 生体内で自己組織の再生を促すセルフリー型再生デバイスによる心筋再生療法

非臨床のデータ集積を積極的に実施した。

#### 6. LRG (Leucine-Rich alpha-2 Glycoprotein) 蛋白の虚血性心疾患治療への臨床応用

非臨床のデータ集積を積極的に実施した。

### F. 健康危険情報

特になし



## G. 研究発表

### 1. 論文発表

各分担研究報告書参照

### 2. 学会発表

各分担研究報告書参照

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

各分担研究報告書参照

### 2. 実用新案登録

各分担研究報告書参照

## Ⅱ. 分担研究報告



1 骨髄間葉系幹細胞血中動員因子を利用した脳・心血管疾患治療に関する研究

分担研究者 玉井 克人 大阪大学大学院医学系研究科 寄附講座教授

**[研究要旨]**

損傷組織が放出する因子(創薬コード K001)が、末梢循環を介して骨髄間葉系幹細胞を損傷組織に集積させて組織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を基盤として、K001の骨髄間葉系幹細胞遊走活性ドメインペプチドを用い、末梢循環不全に伴う皮膚潰瘍治療薬開発を目指した非臨床試験の準備を進めるとともに、その妥当性に関する基礎研究を進めた。

**A. 研究目的**

我々は、生体内損傷組織から放出される K001 が骨髄間葉系幹細胞を刺激して血中動員し、損傷部位に集積させて組織再生を誘導していることを初めて明らかにした。損傷組織に集積した間葉系幹細胞は、局所の炎症・癒痕形成を抑制し、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を誘導することが期待される。

平成 23 年度は、K001 の骨髄間葉系幹細胞動員活性ドメインを探索し、そのアミノ酸配列を基にして化学合成したペプチド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**

K001 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 K001 の生産系確立を目指して研究を進めた。平成 23 年度は非 GMP レベル K001 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。

一方、より早期の創薬化を実現するために K001 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、K001 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 *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が証明され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  $\alpha$  (PDGFR  $\alpha$ ) 陽性細胞の末梢血中への出現を 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。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、K001 ペプチドの GLP 非臨床試験実施計画書を作成した。

**(倫理面への配慮)**

施行した動物実験は、大阪大学の動物実験に関する倫理委員会より承認を得て、その倫理規定に基づいて施行した。

**C. 研究結果**

オーバーラップする複数の K001 ペプチド断片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、K001 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。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  $\alpha$  陽性間葉系幹細胞の血中出現を指標に flow cytometry により検討した結果、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  $\alpha$  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。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 µgの化学合成K002ペプチド(500 µl)またはPBS(500 µl)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。

以上の結果を基にして、K002ペプチドの末梢循環不全に伴う皮膚潰瘍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。

#### D. 考察

損傷組織に移植した間葉系幹細胞は、損傷部位での炎症性サイトカイン産生抑制を介して損傷組織の線維化・癒痕形成を抑制することが報告されている。K001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、難治性組織損傷部位に血流を介して骨髄間葉系幹細胞を集積させることが可能になれば、難治性皮膚潰瘍の上皮化促進、非癒痕性機能的組織再生誘導が可能になると期待する。

我々は平成23年度の研究でK001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。さらに、このK001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ー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。

今後、末梢循環不全性皮膚潰瘍動物モデルを用いてK002静脈内投与の安全性および有効性に関するデータを蓄積し、良好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。複数の動物モデルを有いて有効性、安全性を確認した後に、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

##### 1. 論文発表

1. 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. PDGFR $\alpha$ -positive cells in bone marrow are mobilized by HMGB1 to regenerate injured epithelia. Proc Natl Acad Sci USA. 2011 108(16):6609-14.
2. Koga H, Hamada T, Ishii N, Fukuda S, Sakaguchi S, Nakano H, Tamai K, Sawamura D, Hashimoto T. Exon 87 skipping of the COL7A1 gene in dominant dystrophic epidermolysis bullosa. J Dermatol. 2011 38(5):489-92.
3. 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. 2011 Oct 18. doi: 10.1111/j.1365-2230.2011.04179.x. [Epub ahead of print]
4. Fujita H, Tamai K, Kawachi M, Saga K, Shimbo T, Yamazaki T, Kaneda Y. Methyl-beta cyclodextrin alters the production and infectivity of Sendai virus. Arch Virol. 2011 156(6):995-1005. 2011
5. Umegaki N, Nakano H, Tamai K, Mitsuhashi Y, Akasaka E, Sawamura D, Katayama I. Vörner type palmoplantar keratoderma: novel KRT9 mutation associated with knuckle pad-like lesion and recurrent mutation causing digital mutilation. Br J Dermatol. 2011 165(1):199-201. 2011. Mar 17. [Epub ahead of print]
6. 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]
7. 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]

8.

##### 2. 学会発表

特になし。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

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

2 血管新生作用を有する新規ペプチド（AG30）の虚血性潰瘍への応用に関する研究

分担研究者 中神 啓徳

大阪大学大学院 大阪大学・金沢大学・浜松医科大学連合小児発達学研究所  
寄附講座教授

**[研究要旨]**

血管新生作用と抗菌活性を併せ持つ新規ペプチド（AG30）を用いた難治性皮膚潰瘍治療薬の開発を行う。抗菌ペプチドは血中で迅速に分解されるため半減期は数分以下と予想される。今後治験に向かって開発を進める上で、投与薬（AG30/5C）の測定が難しく開発を進める上での問題点とされてきた。そこで、AG30/5Cを血清で処理させたのちの分解産物をMALDI-TOF/MSを用いて測定した結果、30個のアミノ酸から22個、20個、18個、17個のアミノ酸へと分解されていくパターンを見出し、この分解産物の中の20個のアミノ酸の一部のアミノ酸をD体で置換した新規ペプチドを作成した。得られた新規治療用ペプチドは20個のアミノ酸からなるが、構造上はアルファヘリックス構造を呈し、緑膿菌・黄色ブドウ球菌・真菌に対する抗菌活性を有し、血管内皮培養細胞での管腔構造形成を促進する作用を有しており、その活性の強さは培養細胞では概ね同等であった。今後の治験に向けた開発はこの新規ペプチドを軸にした計画を予定している。

**A. 研究目的**

血管新生作用と抗菌活性を併せ持つ新規ペプチド（AG30）を用いた難治性皮膚潰瘍治療薬の開発

**B. 研究方法**

抗菌ペプチドを臨床開発する上での問題点として、血中で迅速に分解されるため半減期は数分以下と予想され、その臨床的作用時間が極めて短いことが挙げられる。我々はAG30/5Cを外用剤として開発を行うことで、これまで創部に直接局所投与することにより、マウスの皮膚損傷モデル・感染モデルなどでの評価を行い、ヒト難治性皮膚潰瘍の治療薬としての開発を進めてきた。このAG30/5Cの開発は早期探索型臨床試験のガイドラインに則り、非臨床試験を実施し臨床研究としての準備を進めている。今後治験に向かって開発を進める上で、治療薬の薬物動態試験は必要となるが、投与薬（AG30/5C）の測定が難しく開発を進める上での問題点とされてきた。

そこで、本年度はAG30/5Cの分解産物を再度検証することから、今後の臨床治験に向けてより安定な治療用ペプチドを開発・作成していく。

**（倫理面への配慮）**

1) 本研究のすべての動物実験は下記の国のガ

イドライン・法律などを遵守し、実施した。

- ・「動物の愛護および管理に関する法律」（昭和48年法律第105号）
- ・「研究機関などにおける動物実験等の実施に関する基本指針」（平成18年度厚生労働省告示第71号）

また本研究の動物実験は、その動物実験プロトコールが大阪大学大学院医学系研究科で承認後に施行されている。

2) 臨床研究計画は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令（厚生省令第21号、平成9年3月26日、一部改正 厚生労働省令第114号 平成20年6月13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ドライン平成10年11月13日医薬審第1019号医薬安全局審査管理課長通知（改正平成22年2月19日 0219号第4号）を順守して進める。

**C. 研究結果**

AG30/5Cを試験管内でヒト血清と反応させると、4時間で半減し、6時間で20%程度まで減少する。これは生体内に存在する他のペプチドを同じ条件で反応させたときの変化（アンジオテンシンIおよびLL-37は8時間で80%残存）と比較しても

極めて分解が早いことから、血清内のペプチダーゼにより迅速に分解されるペプチドであると類推される。そこで、AG30/5Cを血清で処理させたのちの分解産物をMALDI-TOF/MSを用いて測定・同定して、どの長さ・部位のアミノ酸が残存しているかを調べることで分解されやすいアミノ酸部位の特定を試みた。結果として、30個のアミノ酸から22個のアミノ酸、そこからさらに、20個、18個、17個のアミノ酸へと分解されていくパターンが多いことが分かった。この分解産物の中から20個のアミノ酸を合成したところ、AG30/5Cと同じように血管新生作用と抗菌活性を有していることが分かった。さらに、このペプチドの代謝安定性を向上させるために、一部のアミノ酸をD体で置換してペプチダーゼによる分解を防ぐ工夫をした。

このようにして得られた新規治療用ペプチド（仮称 SRペプチド）は20個のアミノ酸からなるが、構造上はアルファヘリックス構造を呈し（CDスペクトル解析）、緑膿菌・黄色ブドウ球菌・真菌に対する抗菌活性を有し（クリーンベンチを利用した細菌培養実験）、血管内皮培養細胞での管腔構造形成を促進する作用を有しており、その活性の強さは培養細胞では概ね同等であった。これらの一連の評価系は遠心分離機器による試薬の調整などを必要とした。

#### D. 考察

今回作成した新規治療用ペプチド（仮称 SRペプチド）は培養細胞実験においてAG30/5Cとほぼ同等の活性を有している。一部D体で置換したことから推測すると、今後の薬効試験においてもAG30/5Cと同様あるいはそれ以上の活性が期待できる。また、臨床開発に向けてのメリットとして、10個短いペプチドであるためにその合成費用が安く抑えられること、代謝安定性の向上により薬物動態試験としての血中濃度測定の成功確率が

上がることなどが予想される。従って、今後はこのペプチドを軸にして治験に向けた研究開発を進めていきたいと考える。

#### E. 結論

治験に向けた治療用ペプチドとして20個のアミノ酸からなる新規ペプチドを合成した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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. 2012 (in press).

##### 2. 学会発表

特になし。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

新規知財特になし。

すでに取得済の特許

- 名称：血管新生誘導剤及びそれに用いられるポリペプチド  
出願番号：特願 2007-29945  
出願日：平成19年2月9日 PCT JP2008/052022  
発明者：中神啓徳、西川智之、金田安史、森下竜一、前田明人、田村奈緒
- 名称：新規ポリペプチドおよびそれを有効成分として含有する抗菌剤  
出願番号：特願 2007-29920  
出願日：平成19年2月9日 PCT JP2008/052020  
発明者：中神啓徳、西川智之、金田安史、朝野和典、前田明人、田村奈緒  
出願人：大阪大学およびジェノメディア（株）
- 名称：血管内皮細胞増殖促進遺伝子  
出願番号：特願2004-081688  
出願日：平成16年3月19日、PCT/JP2005/004832  
発明者：西川智之、中神啓徳、金田安史

### 3 重症心不全に対するアフェレーシス治療およびバイオマーカーの探索に関する研究

分担研究者 澤 芳樹 大阪大学大学院医学系研究科 教授

#### 【研究要旨】

心不全を呈する拡張型心筋症患者に対してアフェレーシス治療を行うことにより、本治療法の安全性、QOLの改善、生命予後を観察すると同時に、副次的項目として心機能改善効果の検討を目標とする。また、基礎的研究にて探索された重症心不全に対するバイオマーカーの臨床的意義を検討すると同時に、新しい心不全のバイオマーカーを探索する。

#### A. 研究目的

人工心臓の代替医療機器として確立し、世界規模の治療とする。本治療機序は、心抑制性抗心筋自己抗体の完全除去だと想定されている。発症早期例（NYHA2～3度、LVEF30～40%）、進行中の治験対象例（NYHA3～4度、LVEF30%以下）ならびに最重症例（補助人工心臓装着中で心臓移植待機中の症例）の3群すべてにおいて包括的に研究を進めることで、アフェレーシスを新たな心不全治療として確立する。

#### B. 研究方法

心不全を呈する拡張型心筋症患者に対してアフェレーシス治療を行うことにより、本治療法の安全性、QOLの改善、生命予後を観察すると同時に、副次的項目として心機能改善効果の検討を目標とする。

具体的には、NYHA2～4度、LVEF40%以下の対象において、右図のとおり、1クールあたり3回と5回との比較、治療有効期間の測定（上記2試験から3～6ヶ月と想定される）を行う目的で実施。本試験では治療奏功例と予想される「心抑制性抗心筋自己抗体」陽性者のみを対象とする。また、基礎的研究にて探索された重症心不全に対するバイオマーカーの臨床的意義を検討すると同時に、新しい心不全のバイオマーカーを探索した。

#### （倫理面への配慮）

基礎的研究において、遺伝子改変動物、プラスミドDNAあるいは遺伝子導入ウイルス等を用いる場合は、使用に際して遺伝子組み換え生物などの使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律、カルタヘナ条約等各種法令・告示・通知に基づき研究を実施した。

動物操作に当たっては、本学の動物実験規定に従って行なった。臨床試験において、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」（GCP省令）に厳守し、さらに被験者保護を最優先に実施する。

#### C. 研究結果

補助心臓装着拡張型心筋症の被験者10人の血清から、心抑制性抗心筋自己抗体の検査を行なった結果、陽性を示す被験者が複数人確認された。引き続き、被験者の血清から抗体検査を実施し、陽性の被験者に対して臨床研究を実施する予定である。

#### D. 考察

AMT-0902-1（イムソーバTR）をもちいた旭化成クラレメディカル（株）の多施設共同治験では、被験者40名に実施した。対象はNYHA3～4度、LVEF30%以下で、治療回数は一律5回/1クール、プラセボ（入院のみ行う）を50%で設定して1クールか2クールかの自己比較を行っている。期間1年間で再増悪時の追加治療なし。心抑制性抗心筋自己抗体の陰性例も対象としている。本研究開発では、上記臨床研究に沿って、補助人工心臓が装着された症例に対するPOC試験を開始予定である。

#### E. 結論

補助心臓装着拡張型心筋症の被験者から、心抑制性抗心筋自己抗体陽性を示す被験者が確認され、トリプトファンカラムによるアフェレーシス治療の開始を予定している。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
特になし
2. 学会発表  
特になし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

4 不全心臓選択的ターゲティングによる抗HB-EGF抗体／ナノリポソームを用いた新規心不全治療薬の開発に関する研究

分担研究者 南野 哲男 大阪大学大学院医学系研究科 講師

**[研究要旨]**

急性心不全の原因疾患の一つとして、血行動態の破綻を急激に來たし、致死的経過をとる劇症型心筋炎が挙げられる。劇症型心筋炎をしばしば呈する巨細胞性心筋炎の平均生存期間は4-12カ月であり、極めて予後不良である。その治療法としては、免疫抑制療法が実施されているが、その有効性は未だ確立されていない。私達は、自己免疫性心筋炎動物モデルにおいて、心臓での炎症に伴い同部位での血管透過性が著明に更新し、高分子や微粒子が血管より流出しやすい状況であることを見出した。そこで心筋炎モデル動物に、免疫抑制剤FK506を封入したナノサイズリポソーム（粒子径100nm）を静脈内投与したところ、FK506単独投与と比較して、著明に心機能改善が認められた。免疫抑制剤のリポソーム化により、薬効の増強ならびに副作用の軽減が期待でき、有効な治療法がない劇症型心筋炎に対するアカデミア創薬（リポソーム化FK506）に向けた取り組みを開始した。基礎的検討では、リポソーム化FK506の用量設定、FK506濃度測定の実験系構築をおこなった。また、リポソーム化FK506のGMP院内製造に向け、1）GMP基準受け入れ態勢の構築と手順書の作成、2）阪大病院薬剤部にGMP基準対応リポソーム製造機を設置するための仕様決定、設計をおこなった。（平成24年秋設置予定）GMP基準対応リポソーム製造機では、低分子化合物、ペプチド、核酸製剤も封入可能なため、アカデミアシーズの早期探索臨床試験へのトランスレーショナルを著しく促進することが期待できる。また、平成26年度マイクロドーズ試験実施のため、GMP基準FK506のPETラベル化の技術的検討をおこなっている。リポソーム化FK506の開発は、劇症型心筋炎に対する治療法の確立というアンメットニーズに応えるアカデミア創薬につながることを期待できる。

**A. 研究目的**

急性心不全の原因疾患の一つとして、血行動態の破綻を急激に來たし、致死的経過をとる劇症型心筋炎が挙げられる。その治療法としては、免疫抑制療法が実施されているが、その有効性は確立されていない。人工心肺装置装着の劇症型心筋炎患者の実に40.4%（21/52）が入院死亡したとの報告もあり極めて予後不良である。以上より、臨床現場では劇症型心筋炎に対する画期的診断法・治療法が開発が待たれている。

本研究の目的は、心筋炎における血管透過性亢進を利用した新規治療方法の開発である。免疫抑制剤の劇症型心筋炎に対する効果は一定ではないが、根治療法が存在しない現状では、難治例での使用は承認されているのが現状である。また、免疫抑制剤使用による重症感染症などの副作用も報告されている。

そこで、本研究では、リポソーム化免疫抑制剤FK506を新たに開発することにより、作用の増強・副作用の軽減が期待でき、劇症型心筋炎に対する新たな治療が提供できる。心筋炎における血管透過性亢進に着目し、ナノサイズリポソームを治療に応用するアイデアは斬新で、画期的である。

本研究では、アカデミアシーズを創薬につなげるため、基礎的検討を実施するとともにGMP院内製造部門の整備、マイクロドーズ試験実施のための準備を並行して進めていく。

**B. 研究方法**

**(1) 基礎的実験**

**① 実験的自己免疫性心筋炎モデルの心臓における血管透過性亢進に関する実験**

9週齢の雄性ルイスラットにブタ心室筋ミオシン



を抗原として感作を行った。すなわち、ブタ心室筋ミオシンと完全フロイドアジュバント (Mycobacterium tuberculosis : 20 mg/mL) を等用量混ぜて最終ミオシン濃度 5 mg/mL の懸濁液を調整し、ラットの両足底にその懸濁液を 0.1 mL ずつ皮下注射し、自己免疫性心筋炎モデルを作製した。蛍光実体顕微鏡を用いて摘出心臓を観察した結果、自己免疫性心筋炎群では、蛍光色素ビーズ (100 ならびに 1000 nm) が強く集積する部分があるものの、ほぼ全周にわたって蛍光色素ビーズの集積増加が明らかに認められた。以上より劇症型心筋炎を呈するヒト巨細胞性心筋炎のモデルである実験的自己免疫性心筋炎では、炎症にともない血管透過性が亢進していることが明らかになった。早期診断の可能性を検討するため、ミオシン感作後早期 (感作後 3, 7, 12, 15 日) にビーズ集積の有無を検討する。さらに微量の生体適合性封入ナノサイズリポソームの開発を行い、心臓超音波検査による心筋炎診断の確立をめざした。

## ②免疫抑制剤封入リポソーム製剤の心筋炎モデルへの効果検討

### 1) FK506 封入リポソームの調製

DPPC/DSPE-mPEG2K/FK506=100/5/2 (モル比)、総脂質濃度が 10mM となるようにクロロホルム/メタノール=4/1 溶液で調製した。マイクロシリンジを用いて脂質溶液と FK506 溶液をナス型フラスコに量り取り、ターシャリーブタノール (tert-butyl alcohol) を適量加えた。ロータリーエバポレーターを用いて残留クロロホルムを除去後、液体窒素を用いて凍結させた。凍結乾燥を一晩行い、溶媒を除去した。凍結乾燥粉末にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS-) を加え、50℃にて水和を行い、FK506 封入リポソーム溶液を調製した。

### 2) FK506 封入リポソームの粒子径の調製

FK506 封入リポソームの粒子径を調整するため、液体窒素を用いた凍結融解を 3 回繰り返した後、エクストルーダーを用いて孔径 100nm のポリカーボネートメンブレンフィルターを通過させた。このエクストルージョン法による粒子径調整操作は、50℃条件下で 5 回以上繰り返し、最終的に FK506 封入リポソームの粒子径を約 100nm に調整した。

リポソームに保持されていない FK506 を除くため、FK506 封入リポソーム溶液を希釈した後、超遠心 (453,000 g, 15min, 4℃) を行った。上清を除去し、沈殿した FK506 封入リポソームを PBS を用いて再懸濁した。この精製後の FK506 封入リポソームを以後の実験に用いた。

### 3) FK506 封入リポソームの物性評価

FK506 封入リポソームの粒子径と電位は、ZetaSizer Nano-ZS を用いて測定した。リポソームに保持された FK506 量は、HPLC を用いて算出した。リポソーム可 FK506 溶液とテトラヒドロフラン (THF) を混合し、HPLC 用サンプルとした。HPLC (TSK gel ODS-80TM、移動相 : CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O=60/40、流速 : 1.0mL/min、カラム温度 : 60℃、検出波長 : 214nm、測定時間 : 20min) により FK506 量を定量し、内包率を算出した。

### 4) 動物実験プロトコール

実験的自己免疫性心筋炎モデルでは、心機能は感作後 14 日から悪化し、21 日にピークになることを確認している。リポソーム化 FK506 投与群 (0.01, 0.02, 0.05 mg/dL)、FK506 単独 (同量) 投与群、リポソーム投与群、生理食塩水投与群を作成する。第 14 日と 17 日に、尾静脈より合計 2 回投与する。

### 5) 評価方法

感作後第 21 日にラットをペントバルビタールで麻酔し、右大腿動脈にカテーテルを挿入して平均血圧を測定する。心機能指標 (左室内圧、左室拡張末期圧、dP/dt max、dP/dt min) はトランスデューサー付カテーテルを右総頸動脈から左室に挿入して測定する。

## (2) GMP リポソームの院内製造への取り組み

### ①GMP リポソーム製造装置の規格の策定

GMP リポソーム製造装置一式は、原料送液部 2 式、リポソーム製造装置 2 式、透析装置 2 式及び付属装置 1 式により構成され、それぞれ以下の要件を満たすこと。

1) 原料送液部 2 式は、1 式あたり以下の要件を満たすこと。

1-1 送液は、ペリスタルティック方式であること。

1-2 流量の調節範囲は、0.1~1000mL/時間以上であること。

1-3 最大吐出圧は、200kPa 以上であること。

1-4 ローラーは、4 チャンネル 12 ローラーであること。

1-5 3 ストップチューブ及び延長チューブを有すること。

1-6 送液のスタート及びストップ用フットスイッチを有すること。

2) リポソーム製造装置 2 式は、無菌対応リポソーム製造装置 1 式及びリポソーム製造装置 (一般装置) 1 式により構成され、それぞれ以下の要件を満たす

こと。

2-1 無菌対応リポソーム製造装置 1 式は、以下の要件を満たすこと。

2-1-1 無菌対応リポソーム製造装置 1 式は、初期設定を行った洗浄不要のシングルユース（使い捨て）装置 8 台以上で構成されること。

2-1-2 納入機器毎に、滅菌した製造部であることの滅菌証明書を有すること。

2-1-3 直径 100nm～1000nm 以上の無菌リポソームを連続的に製造する機能を有すること。なお、無菌的にリポソームを製造する方法として、完成したリポソーム製剤を無菌フィルターでろ過する方法は不可とする。

2-1-4 作成されたリポソーム粒子の PDI（多分散指数）値は 1.0 以下であること。

2-1-5 最大流量は、2mL/秒以上であること。

2-1-6 運転条件により生成リポソームの粒子径を変更する機能を有すること。

2-1-7 製造部の外寸は、200mm×200mm×700mm（H）以下であること。

2-1-8 リポソームの製造方法及び製造条件を開示すること。

2-1-9 製造プロセスのリポソーム製造に係る重要ファクターとなる点を開示し、それを記録する記録装置を有すること。また、記録装置は、21CFR Part 11 条文（米国連邦規則 21 条 11 章条文）に対応していること。

2-2 リポソーム製造装置（一般装置）1 式は、以下の要件を満たすこと。

2-2-1 直径 100nm～1000nm 以上のリポソームを連続的に製造する機能を有すること。

2-2-2 作成されたリポソーム粒子の PDI（多分散指数）値は 1.0 以下であること。

2-2-3 最大流量は、2mL/秒以上であること。

2-2-4 運転条件により生成リポソームの粒子径を変更する機能を有すること。

2-2-5 製造部の外寸は、200mm×200mm×700mm（H）以下であること。

2-2-6 リポソームの製造方法及び製造条件を開示すること。

2-2-7 装置は、分解可能な構造であること。

2-2-8 製造プロセスのリポソーム製造に係る重要ファクターとなる点を開示し、それを記録する記録装置を有すること。

3) 透析装置 2 式は、3-1～3-5 の要件を満たす無菌対応装置 1 式及び 3-1～3-3 の要件を満たす一般装

置 1 式とすること。

3-1 4 方向取付け対応のチューブポンプを有すること。

3-2 チューブポンプの最高送液速度は、内径 1/4 インチチューブ使用時において 1.5L/秒以上であること。

3-3 異常圧警報値を 3 点以上設定できるデジタル圧力モニターを有すること。

3-4 無菌的に製造できることを証明する資料を有すること。

3-5 無菌製造用としてのフローパスセットは、10 セット以上であること。

4) 付属装置 1 式は、電子天秤 2 式、リポソーム原料調整用装置 2 式、凍結乾燥機用ドライチャンバー 1 式、凍結乾燥機 1 式、真空ポンプ 1 式及びクリーンベンチ 1 式により構成され、それぞれ以下の要件を満たすこと。

4-1 リポソーム原料を計量する電子天秤 2 式は、1 式あたり以下の要件を満たすこと。

4-1-1 計量範囲は、0.01mg～250g 以上であること。

4-1-2 ひょう量の切換機能を有すること。

4-1-3 再現性は、0.1mg/0.03mg 以下であること。

4-1-4 ひょう量室は、180mm（W）×160mm（D）×250mm 以上であること。

4-2 リポソーム原料調整用装置 2 式は、1 式あたり以下の要件を満たすこと。

4-2-1 温度調節範囲は、室温+5℃～200℃以上であること。

4-2-2 温度設定の最小桁は、1℃以下であること。

4-2-3 ブロック設置数は、2 ブロック以上であること。

4-2-4 外寸は、250mm（W）×300mm（D）×150mm（H）以内であること。

4-3 凍結乾燥機用ドライチャンバー 1 式は、以下の要件を満たすこと。

4-3-1 2 次冷媒循環方式により、棚温度を-40℃～30℃以上に調節する機能を有すること。

4-3-2 バイアル瓶を密栓する機能を有すること。

4-3-3 水位低下、センサー異常、オーバーヒート及び停電警報に対する自己診断機能を有すること。

4-3-4 庫内寸法は、300mm×300mm×350mm（H）以上であること。

4-3-5 不活性ガスに置換する機能を有すること。

4-3-6 過酸化水素による滅菌機能を有すること。

4-3-7 無菌的に凍結乾燥できること。

4-3-8 本院既存のクリーンベンチ（三洋電機株製

MCV-B161F) との接続機能を有すること。または、凍結乾燥機用のクリーンベンチを提供すること。

4-3-9 排気用バキュームポンプを有すること。

4-3-10 過酸化水素分解装置を有すること。

4-3-11 記録装置を有すること。

4-4 凍結乾燥機 1 式は、以下の要件を満たすこと。

4-4-1 トラップ冷却温度は、 $-40^{\circ}\text{C}$  以下であること。

4-4-2 1 回の除湿量は、3L 以上であること。

4-4-3 真空ポンプ自動運転機能及び真空度監視機能を有すること。

4-4-4 トラップ寸法は、内径 200mm×高さ 300mm 以上であること。

4-5 真空ポンプ 1 式は、以下の要件を満たすこと。

4-5-1 排気速度は、160L/min 以上であること。

4-5-2 到達真空度は、1.0 Pa 以上であること。

4-6 クリーンベンチ 1 式は、以下の要件を満たすこと。

4-6-1 外寸は、1700mm (W) × 900mm (D) × 2000mm (H) のそれぞれ  $\pm 50\text{mm}$  以内であること。

4-6-2 清浄度は、ISO クラス 5 以上であること。

4-6-3 集塵効率は、 $0.3\mu\text{m}$  粒子にて 99.99% 以上であること。

4-6-4 作業面の材質は、SUS304 であること。

(性能、機能以外に関する要件)

## ②設置条件等

### 1) 設置場所

本装置は、大阪大学医学部附属病院 L 階薬剤部に設置すること。

### 2) 設置要件

本装置に必要な一次側設備については、本学が用意する。それ以外に必要な設備があれば、落札者において用意すること。

### 3) 搬入、据付、配線及び調整

本装置の搬入、据付、配線及び調整については、本院の診療業務に支障をきたさないよう本院の職員と協議の上その指示に従うこと。また、搬入の際には落札者が必ず立会い、本学の施設に損傷を与えないよう十分な注意を払うように務め、必要があれば搬入経路に養生等を施すこと。万一、本学の建物、設備等に損傷を与えた場合は、落札者の責任において原状に復すること。

## ③保守体制等

### 1) 保守体制

本装置の円滑な運用を実現するため、点検、調整及び技術サポートを行える体制であること。

### 2) 障害支援体制

障害発生時には、平日の 9 時から 17 時までは電話による対応できる体制であり、復旧の為の通報を受けてから 4 8 時間以内に現場対応出来る体制であること。(ただし、土、日、祝日は除く)

### 3) 保証期間

納入検査確認後 1 年間は、通常の使用により故障又は障害が発生した場合の無償修理に応じること。

## ④その他

1) 操作マニュアルは、各装置について日本語版又は英語版 3 部を提供すること。

2) リポソーム製剤の作成にあたり、その製造ノウハウを開示すること。また、FK-506 (タクロリムス) をリポソーム製剤化した実績を有し、その方法についても開示すること。プロセスノウハウについて、本学内で自由に活用できること。

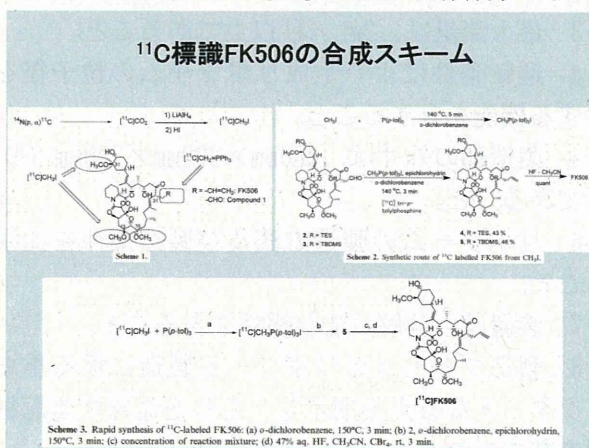
3) リポソーム製剤化にあたり、プロセスについてのサポートを行えること。

4) 取扱説明に関する教育訓練は、本院が指定する日時、場所で行うこと。また、納入検査確認後 1 年間は、随時、電話又は技術員の派遣により無償で対応すること。

## (3) PET マイクロドーズ試験実施への取り組み

### ①FK506 の PET 核種標識

FK506 の PET 核種標識については、Murakami et al. *Tetrahedron Letter* 2003 に則り、FK506 の C21 側鎖を利用した二段階標識を検討した。即ち、FK506 C21 アリル側鎖を Johnson-Lemieux oxidation によってアルデヒド化した前駆体 (A) を作成する。次に、 $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$  より  $[^{11}\text{C}]\text{tri-}p\text{-tolylphosphine}$  試薬を合成し、C24, C32 側鎖の二つの水酸基を保護した前駆体 (A) と反応させた後、脱保護剤を作用させて保護基を外すことにより、 $[^{11}\text{C}]\text{-FK506}$  を作成する。







低分子化合物、ペプチド、核酸製剤も封入可能なため、アカデミアシーズの早期探索臨床試験へのトランスレーショナルを著しく促進することが期待できる。また、平成 26 年度マイクロドーズ試験実施のため、GMP 基準 FK506 の PET ラベル化の技術的検討をおこなっている。

平成 24 年度では GMP 院内製造開始、マイクロドーズ試験実施のための非臨床試験、FK506 の PET ラベリングを実施していく。

#### E. 結論

本年度は、リポソーム化FK506の基礎的検討と、阪大病院薬剤部無菌製剤室に設置するGMP基準対応無菌リポソーム製造装置の規格策定、FK506のPET標識体の合成検討を中心に行った。

本研究は、当初の実験計画に基づき順調に推移しており、来年度以降に実施予定の、GMPリポソームの製造とその評価に向けて万全の体制が整ったと考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ishii T, Asai T, Oyama D, Fukuta T, Yasuda N, Shimizu K, Minamino T, Oku N.: Amelioration of cerebral ischemia-reperfusion injury based on liposomal drug delivery system with asialo-erythropoietin. *J Control Release*. [Epub ahead of print] 2012
- 2) Nishikawa K, Asai T, Shigematsu H, Shimizu K, Kato H, Asano Y, Takashima S, Mekada E, Oku N, Minamino T: Development of anti-HB-EGF immunoliposomes for the treatment of breast cancer. *J Control Release*. 2011 Oct 14. [Epub ahead of print]

##### 2. 学会発表

特になし

#### G 知的財産権の出願・登録状況

「免疫抑制剤封入りポソームを有効成分として含有することを特徴とする炎症性疾患治療用医薬組成物」に関する発明について、平成 24 年 5 月末までに特許出願の予定である。