

201216004A

別添1

厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

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

PAI-1 阻害に基づく新規放射線障害治療薬の臨床開発 (H24-被災地域-一般-004)

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 宮田 敏男

平成25(2013)年 5月

別添2

目 次

I. 総括研究報告

PAI-1 阻害に基づく新規放射線障害治療薬の臨床開発 ----- 1

Appendix1 TM5509 錠 実験報告書(1) 配合変化試験

Appendix2 TM5509 錠 実験報告書(2) 処方製造法検討

Appendix3 TM5509 錠 実験報告書(3) 予備安定性試験

Appendix4 ^{14}C -TM5509 の凍結肝細胞を用いた比較代謝試験

Appendix5 ^{14}C -TM-5509 の凍結肝細胞を用いた比較代謝試験における代謝物構造推定試験

Appendix6 カニクイザル伏在動脈血栓モデル(PIT モデル)における TM5509 の有効性評価試験

Appendix7 TM5509 PMDA 戦略相談資料 (抜粋)

Appendix8 治験計画届書

Appendix9 UMIN-CTR 登録用フォーム

(Appendix1~9 は、機密情報を含むため割愛しています)

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 210

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 211

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

PAI-1阻害に基づく新規放射線障害治療薬の臨床開発
研究代表者 宮田 敏男 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨

申請者らは、経口PAI-1阻害薬TM5509（あるいはその後継化合物）が、放射線照射に伴う組織障害の改善薬となる可能性を発見し、現在臨床での有効性確認を目指している。放射線障害は重篤な組織障害をもたらすものであり、震災後の社会的喫緊の課題でもあるが、有効な治療薬は未だ無く、世界的に治療薬の開発が切望されている。本研究では、PAI-1阻害薬の放射線障害治療薬としての有効性を臨床試験で証明する。このアカデミア発の創薬は、震災地域の課題を震災地域のシーズで解決するものであり、「日本再生・被災地復興」のシンボルとなりうる。

申請者らは、PAI-1阻害薬が放射線照射による組織障害を防御、治癒する画期的な医薬品になる可能性を一連の動物試験で実証した。TM5509は、申請者らが開発してきた化合物であり、ヒトPAI-1のX線構造解析を元にデザインした新規合成400化合物から、有効性、安全性、薬物動態で評価選択し、ヒト血漿での作用を確認している。そして、平成24年3月に医薬品戦略相談を行い、試験計画に反映した上で、GLP安全性試験を施行し、GMP合成／錠剤化検討も終了している。

本研究は、平成27,28年度におけるM5509のPOC取得（医師主導臨床試験）を目的として、平成24年度は第I相試験までの準備を計画していた。そして、①試験薬（錠剤）製造検討、②ヒト代謝物の同定とヒトPK試験測定系の確立、③理薬効試験の追加、④験薬概要書と臨床試験プロトコルの作成、⑤PMDA医薬品戦略相談の実施（臨床試験開始前相談）、⑥治験届提出を行い、第I相試験までの準備を完了させ、平成24年度の達成目標は100%達成した。併せて、TM5509の後継化合物であるTM5614の非臨床予備試験を開始した。

研究分担者氏名・所属研究機関名及

び所属研究機関における職名

段 孝 東北大学大学院医学系研究科 准教授
市村 敦彦 東北大学大学院医学系研究科 助教
安藤 潔 東海大学医学部・血液内科学 教授

A. 研究目的

放射線障害は重篤な組織障害をもたらすものであり、震災後の社会的喫緊の課題でもあるが、有効な治療薬は未だ無い。放射線治療における正常組織障害を防止する観点から、そして東日本大震災を契機とした原発事故や防除作業に伴う障害治療や予防の観点から、治療薬の開発が世界的に切望されている。本研究では、PAI-1阻害薬の放射線障害治療薬としての有効性を臨床試験で証明する。このアカデミア発の創薬は、震災地域の課題を震災地域のシーズで解決するものであり、「日本再生・被災地復興」のシンボルとなりうる。

放射線照射に対しては、正常細胞・組織では、造血幹細胞が最も感受性が高く、次に皮膚や粘膜、消化管等の上皮細胞が影響を受けやすい。そこでは酸化スト

レス（ROS）による細胞障害（PAI-1発現）からマクロファージの浸潤を伴う炎症を経て、組織再生できない場合は線維化に進行する。申請者らは、血栓や組織線維化に関わるPAI-1の低分子経口阻害薬TM5509（あるいはその後継化合物）が、①マクロファージ遊走を阻害する、②放射線照射による骨髄抑制後の幹細胞移植で造血再生を促進する、③薬剤誘発ROS依存性の腸炎や肺炎モデルで効果を示す、④虚血に伴う血管修復を促進するなどの知見を見出し、PAI-1阻害薬が放射線照射による組織障害を防御、治癒する画期的な医薬品になる可能性を一連の動物試験で実証した。

TM5509は、申請者らが開発してきた化合物であり、ヒトPAI-1のX線構造解析を元にデザインした新規合成400化合物から、有効性、安全性、薬物動態で評価選択し、ヒト血漿での作用を確認している。そして、平成24年3月に医薬品戦略相談を行い、試験計画に反映した上で、現在GLP安全性試験を施行した。また、GMP合成／錠剤化検討も終了した。

本研究では、H24年度（2012年度）に第I相試験（健康人）の準備を完了し、H25年度（2013年度）には第I相試験での安全性確認を行い、H26年度（2014年

度)にはI/II相で患者にブリッジする。そして、H27、28年度（2015,16年度）には、第II相試験でTM5509の①全身照射前処置幹細胞移植に対する効果と、②頭頸部癌での放射線照射口内炎への効果でPOC（治療効果の証明）を取得する（全て医師主導治験）。

また、PAI-1阻害薬の用途として複数の適応症（難治性疾患等）が考えられ、TM5509の後継化合物であるTM5614は、TM5509のバックアップ化合物としての役割だけではなく、TM5509の臨床開発が成功した暁にも別適応での開発が考えられる。

既に複数の製薬企業がPAI-1阻害薬に興味を示し、POC取得を条件にした導出契約（オプション契約）を締結した企業もある。本研究後には企業に導出し、共同開発で承認までつなげる。

B. 研究方法

平成 24 年度計画の達成目標は、臨床第 I 相試験準備の完了である。そのために以下の検討を進めた。

1. 治験薬（錠剤）製造検討：
2. ヒト代謝物の同定とヒト PK 試験測定系の確立
3. 薬理薬効試験の追加
4. PMDA 医薬品戦略相談実施（臨床試験開始前相談）
5. 治験薬概要書と臨床試験プロトコールの作成
6. 治験届提出
7. 後継化合物 TM5614 の非臨床予備試験

1. 治験薬（錠剤）製造検討：

非臨床成績から、TM5509 のヒトでの薬効量は 10~30 mg と推定され、第 I 相試験の投与量の範囲は 1~300 mg と考えられた。そこで、治験薬錠剤としては、1,10 および 50 mg 錠を製作することが必要と考えられた。対応するプラセボ錠も含めて、治験薬錠剤の条件を確立するために、安定性試験も含めて、以下の製剤化の検討を富士薬品に依頼して実施した。現在、第 I 相試験に向けて必要量の錠剤を委託（富士薬品）にて製造中である。

(1) 配合変化試験

目的：

TM5509 の製剤設計のため、プレフォーミュレーション検討として原薬 の各種添加剤との配合適性について調査し、添加剤のスクリーニングを行う。

方法：

原薬 0.1g に対して添加剤 0.9g（原薬：添加剤

=1:9）または原薬 0.5g に対して添加剤 0.5g（原薬：添加剤=1:1）を乳鉢で 5 分間混合し、配合変化試験サンプルとした（1 分毎に乳鉢への付着を掻き落とした）。なお、原薬及び各添加剤は 60 号（目開き 250 μ m）の篩で篩過したものを使用した。

混合品（原薬：添加剤=1:9）20 mg または混合品（原薬：添加剤=1:1）8 mg を試験管に入れて密閉した後、保存した。また、比較対象として原薬 4mg 及び各添加剤 18 mg（原薬：添加剤=1:9）または 4 mg（原薬：添加剤=1:1）を試験管に秤量し、密閉状態にして各条件下で保存した。ただし、40 $^{\circ}$ C・75%RH（開放）のみ試験管口にキムワイブをかぶせて固定し、検体（開放）とした。なお、混合物の残量、各サンプルの Initial 並びに分析予備検体は 5 $^{\circ}$ Cにて保管した。

保存条件は、25 $^{\circ}$ C・2500lx（密閉）、40 $^{\circ}$ C（密閉）、40 $^{\circ}$ C・75%RH（開放）および 50 $^{\circ}$ C（密閉）とした。

添加剤は、D-マンニトール、結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、セルロース、デンプングリコール酸ナトリウム、乳糖水和物、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、クロスカルメロースナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、軽質無水ケイ酸およびタルクを検討した。

保存後の検体について、性状（色調、固化、凝集等）を肉眼にて確認した。その後、試験管に規定の溶媒を入れ、振とう機にて振とう後、遠心分離し、上澄み液を試料として高速液体クロマトグラフ装置にて分析した。チャートにより分解物ピークの発現等がないか確認した。

試験方法の更なる詳細は、Appendix 1 に示した。

(2) 処方・製造法・包装形態の検討 及び安定性の確認目的：

TM5509 錠（1mg/錠）、TM5509 錠（10mg/錠）及び、TM5509 錠（50mg/錠）の 3 含量の製剤について、PI 治験用製剤の処方ならびに製造方法の検討を実施し、各試作品の安定性試験を実施した。併せて、包装形態の検討も行った。

方法：

PI 用治験薬は、3 規格必要であり、将来的にはプラセボ錠も必要となる。また、服用性を考慮し、可能な限り錠剤を小型化することが望ましい。そこで、1mg/錠と 10mg/錠を直径 6mm の錠剤とし、重量も同一として、今後必要となるプラセボ錠の共通化を計ることとした。また、原薬含量の多い 50mg/錠は直径 8mm として製剤化検討を行うこととした。検

<p>討に際しては、原薬の供給量に限りがあり、50mg/錠は試作において原薬の使用量が多いことから、10mg/錠の処方検討を中心に、10mg/錠の処方をもとに1mg/錠及び50mg/錠の処方を設計することとした。</p>	<p>2. ヒト代謝物の同定とヒト PK 試験測定系の確立</p>
<p>試験方法の更なる詳細は、Appendix 2 に示した。</p>	<p>(1) ^{14}C-TM5509 の凍結肝細胞を用いた比較代謝試験</p>
<p>(3) 予備安定性検体作製及び評価 目的：10mg/錠候補製剤処方検討をもとに設計した処方において、製造作業性や製剤の品質に問題がないかを確かめるため、1mg/錠、10mg/錠、50mg/錠の検体を作製し、予備安定性試験を行う。</p>	<p>目的： TM5509 の非臨床安全性試験では、ラットとサルを使用した。そこでヒト、サル及びラット肝細胞を用いて ^{14}C 標識された TM5509 (標識位置：カルボキシ基の炭素原子) (以後 ^{14}C-TM5509 と略す) の in vitro 代謝プロファイルを比較し、代謝の種差について検討した。</p>
<p>方法： TM5509、乳糖水和物、結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロースを秤量し、ポリエチレン袋にて1分間混合した。これを、ステンレス篩（目開き：710μm）にて強制篩過を実施して調剤品とした。調剤品をハイスピードミキサーに投入した後、精製水を添加し、2分間攪拌造粒した。得られた造粒物をパウミル（スクリーン：2.0mm ヘルンボーン）にて破碎した。次に、湿式破碎済み品を複合型流動層造粒乾燥機にて乾燥した。10mg/錠と50mg/錠においては排気温度 37$^{\circ}\text{C}$ となった時点で乾燥を終了し、1mg/錠においては排気温度 40$^{\circ}\text{C}$ となった時点で乾燥を終了した。この乾燥物をステンレス篩（目開き：710μm）にて篩過し、篩上残留物はパウミル（スクリーン：0.8mm パンチ）にて破碎したものを製粒品とした。</p>	<p>方法： 肝細胞懸濁液（ヒト、サル及びラット）1×10^6 cells/mL を24穴プレートに入れ自動炭酸ガス細胞培養装置内（37$^{\circ}\text{C}$，5% CO_2 - 95% air）で10分間プレインキュベーションした。被験物質溶液を添加して反応を開始し、自動炭酸ガス細胞培養装置内（37$^{\circ}\text{C}$，5% CO_2 - 95% air）で所定時間（0、4時間）インキュベーションした。所定時間経過後、メタノール0.25 mLを加えて反応を停止し、ポリプロピレン製チューブに全量を回収した。更にプレート内をメタノール0.25 mLで洗いこみ、ポリプロピレン製チューブに回収し、前処理まで氷冷した。</p>
<p>打錠前に製粒品と共に混合する、クロスカルメロースナトリウム、軽質無水ケイ酸、ステアリン酸マグネシウムを秤量した。秤量したクロスカルメロースナトリウム、軽質無水ケイ酸をポリエチレン袋にて30秒間混合した後、ステンレス篩（目開き：500μm）にて篩過し、ポリエチレン袋にて3分間混合した。更に、ステンレス篩（目開き：500μm）にて篩過したステアリン酸マグネシウムを投入し、1分間混合し、仕上混合品とした。</p>	<p>前処理ならびにカラム回収率の確認は所定の方法を用い、各試料中の放射能はLSCを用いて測定した。カラム回収率を除き、ガラスバイアルに採取した試料にはHIONIC-FLUORを10 mL加え、LSCを用いて2分間、放射能 (dpm) の計測を行った。なお、計数効率の補正は外部標準線源法により行った。</p>
<p>その後、仕上混合品をロータリー打錠機にて、1mg/錠と10mg/錠は錠剤重量0mg/錠、50mg/錠は錠剤重量180mg/錠で製錠した。</p>	<p>HPLC-RAD分析において、溶出液中の放射能はRADを用いて測定した。HPLC溶出液にシンチレーターFLO-SCINT II を移動相の3倍の流速で送液しながら混合し、RADを用いて6秒積算で放射能 (cpm) の計測を行った。</p>
<p>製錠した打錠品はポリ塩化ビニル (PVC) または、環状ポリプロピレン (CPP) で PTP 包装（圧着温度：150$^{\circ}\text{C}$ (PVC)、190$^{\circ}\text{C}$ (CPP)、圧着時間：2秒 (PVC, CPP)) を行った。</p>	<p>HPLC-RAD分析において分析時間内に検出されたラジオクロマトグラム全計数値に対する、^{14}C-TM5509あるいは各代謝物の放射能ピークの計数値の割合 (% of peak on radiochromatogram) を求めた。</p>
<p>試験方法の更なる詳細は、Appendix 3 に示した。</p>	<p>試験方法の更なる詳細は、Appendix 4 に示した。</p>
	<p>(2) ^{14}C-TM-5509の凍結肝細胞を用いた比較代謝試験における代謝物構造推定試験</p>
	<p>目的： ^{14}C-TM5509をヒト、サル及びラット凍結遊離肝細胞と反応した後の試料中主要代謝物の構造を、高分解</p>

<p>能LC/MSにより推定した。</p> <p>方法： 上記試験で調製した試料（ヒト、サル及びラット凍結遊離肝細胞と¹⁴C-TM-5509を反応した後の抽出液）を分析に供し、代謝物の構造をLC/MSにより推定した。試験方法の更なる詳細は、Appendix 5 に示した。</p> <p>(3) ヒト血漿及び尿中 TM5509 の濃度測定法バリデーション/予備検討</p> <p>上記の成績をもとに、ヒトの血漿および尿を用いて、TM5509 の濃度測定法バリデーションと予備検討を行った。</p> <p>3. 薬理薬効試験の追加</p> <p>目的： ヒトでの薬効量を推測する目的で、サルでの PIT (photochemically induced thrombosis model) 法を用いた伏在動脈血栓モデルにおける PAI-1 阻害剤の TM5509 の有効性及び最小有効用量を検討し、かつ plasminogen activator inhibitor type-1 活性 (PAI-1 活性)、fibrin/fibrinogen degradation products (FDP)、euglobulin lysis time (ELT) 等が薬効のサロゲートバイオマーカー (PD 項目) になるかどうかを検討した。</p> <p>方法： カニクイザル（雄、20 頭、年齢：4.9-6.0 歳、カンボジア産）を使用した。体重を指標として、以下に示す 5 群に 4 例ずつ振り分けた。2 週間以上の休薬期間を設けた後、同一個体が同じ群にならないように群分けして、2 回の試験を実施した。</p> <p>G1 : 媒体投与群 G2 : TM5509 0.03 mg/kg 投与群 G3 : TM5509 0.1 mg/kg 投与群 G4 : TM5509 0.3 mg/kg 投与群 G5 : TM5509 1.0 mg/kg 投与群</p> <p>薬剤は、小児用経口カテーテルを用いて投与した。投与終了後、カテーテル内の残存液を注射用水 5 mL で wash out した。投与 3 時間 30~37 分後に、ケタミン (10 mg/kg) + 硫酸アトロピン (0.05 mg/kg) を筋肉内投与することにより導入麻酔を実施した。その後、気管挿管した後、イソフルラン（フォーレン吸入麻酔液）の吸入麻酔下で手術台に固定した。臭化ベクロニウム（マスキュラックス注、0.08 mg/kg）の</p>	<p>静脈内投与により、人工呼吸下で維持麻酔した。</p> <p>生化学検査用採血は、投与前と投与 3 時間 35~53 分後に 3.8w/v %クエン酸ナトリウムの 1/10 容量を予め添加したシリンジを用いて上腕静脈から 3.5 mL 採血した。</p> <p>血栓モデルの作製は、伏在動脈の位置を皮膚上から確認し、該当箇所の皮膚を 5 cm 程度切開した。伏在動脈上に、光照射プローブを設置し、プローブと動脈の間を超音波診断用ゲルで満たした。投与 4 時間後にローズベンガル (20 mg/kg) を 6 分間で静脈内投与し、同時に波長 540 nm の緑色光 (900,000 Lux) を 20 分間照射した。</p> <p>抗血栓作用の評価は、13.6 伏在動脈血流測定バルスドップラー血流計 (PDV-20 及び VF-1、Crystal Biotech) プローブを光照射プローブの末梢側に設置し、伏在動脈血流を光照射前から照射開始 3 時間後まで連続的に記録した。血栓モデル作製処置から 3 時間後までの測定記録 (チャート紙) の長さから閉塞時刻及び開通時刻を算出した。光照射開始から血管閉塞までの時間を初回閉塞時間とし、光照射開始から 3 時間後までの血流を記録したチャート紙から累積閉塞時間を算出した。</p> <p>t-PA 活性測定と PAI-1 活性測定は、市販キットを用いて行い、フィブリノーゲン、FDP、D ダイマー、t-PA・PAI-1 複合体、トータル PAI-1、トロンビン・アンチトロンビンⅢ複合体の測定は、三菱化学メディエンス株式会社にて実施した。血漿中 TM5509 は常法により、LC/MS で測定した。</p> <p>ELT の測定は、クエン酸血漿を 10 mM acetate buffer (pH5.2) で 20 倍希釈し、4℃で 1 時間静置した後、得た遠心沈渣 (ユーグロブリン分画) 再溶解させ、使用した。プレートにトロンビンと 37℃に温めた再溶解ユーグロブリン分画、蒸発防止のため流動パラフィンを添加し、プレートリーダーを用いて、37℃下で波長 405 nm の吸光度を 6 分毎に連続的に測定した (20 時間を cut off time とした)。最大吸光度と最小吸光度の中間点を示す時間をユーグロブリン溶解時間 (ELT) とした。</p> <p>試験方法の更なる詳細は、Appendix 6 に示した。</p> <p>4. PMDA 医薬品戦略相談実施 (臨床試験開始前相談)</p> <p>(1) 事前面談</p> <p>「TM5509 の非臨床試験成績の評価及び第 I 相試験計画について」、先の戦略相談 (平成 24 年 3 月 2 日) に基づき実施した第 I 相試験までに必要な非臨床試</p>
---	---

<p>験の成績の概要と第 I 相試験計画の骨子（単回投与 1～100 mg）を提出（平成 24 年 10 月 16 日）して相談した。</p>	<p>の実施機関である浜松医科大学と協力して治験薬概要書と臨床試験プロトコルの作成を行った。</p>
<p>PMDA（医薬品・医療機器総合機構）からは、</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) サルの 4 週間反復経口毒性試験の高用量（300 mg/kg/日）で見られた死亡例について精査が必要である（死因、胆道系の障害との関係）。サルでの試験における用量設定に 2) ついて示し、種差についても考察すること。第 I 相試験の追加等による時間の無駄を避けるために最高用量の設定はあげるべき。 3) 臨床試験における用量設定の根拠を明確にすること。ストップルール等も示すこと。との助言を得て、本相談へと進んだ。 	<p>6. 治験届提出</p> <p>治験計画届書（平成25年3月22日）にPMDAへ提出して、30日間調査を経て、受理された。 治験計画届書をAppendix8に、UMIN-CTR登録用フォームをAppendix9として添付した。</p>
<p>(2) 相談事項の提出</p>	<p>（倫理面への配慮）</p> <p>動物実験は動物福祉の立場からの要請や法的規制に充分従い、個体に最も負担の少ない実験手技を用いた。具体的には、東北大学および東海大学の動物実験専門委員会に本課題にそった申請・承諾を得て、それぞれの「動物実験等に関する規程」に従って施行するので、動物倫理上も問題がない。また、遺伝子組換え実験については、「遺伝子組換え実験申請書」を提出し、承認を得た上で、法・規制に順じた措置を講じて研究を進めた。</p>
<p>以下の 2 項目の相談事項を PMDA へ提出した（平成 24 年 11 月 20 日）。</p>	<p>ICH（日米 EU 医薬品規制調和国際会議）で新薬承認審査の基準を国際的に統一し、医薬品の特性を検討するための非臨床試験・臨床試験の実施方法やルール等が取りまとめられている項目については、そのガイドラインやガイダンスを遵守して実施した。</p>
<ol style="list-style-type: none"> 1. 第 I 相試験実施に向けた非臨床試験成績の評価について サル 4 週間反復経口投与毒性試験において、高用量投与時に死亡例がみられ、また、胆管周辺の病理組織異常が認められた。この死因と胆道系の障害との関係について、肝臓専門医等への意見聴取も含め精査した結果、第 I 相試験を開始することに支障はないと考えている。このことについて、助言をお願いします。 2. 第 I 相試験の用量設定について 第 I 相試験として、別添の内容を計画している（第 I 相試験計画骨子添付）。初回投与量、最高用量（300 mg）及び増量に当たっての判断方法について、助言をお願いします。 なお、更なる詳細は、Appendix 7 の TM5509 PMDA 戦略相談資料（抜粋）に示した。 	<p>GLP 非臨床試験は、「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）と「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の一部を改正する省令による改正後の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の取扱いについて」（薬食発第 0613007 号：平成 20 年 6 月 13 日付厚生労働省医薬食品局長通知）を遵守して実施した。その他、非臨床試験に関して法・規制基準があるものについても遵守した。</p>
<p>(3) 対面助言：</p>	<p>ヒトゲノム・遺伝子研究の実施にあたっては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を、臨床研究の実施にあたっては「臨床研究に関する倫理指針」など関連する指針を遵守し、研究対象者に対する人権擁護を基本とし、インフォームドコンセントに基づいた科学的にも倫理的にも妥当な研究の計画と実施を行った。臨床試験（治験、医師主導臨床試験、臨床研究）は、ヘルシンキ宣言および「臨床研究に関する倫理指針」に則り、「医薬品の臨床試験の実施の基準（GCP）」を遵守あるいは準拠して試験を実施する。治験の実施にあたっては、東北大学病院臨床試験推進</p>
<p>5. 治験薬概要書と臨床試験プロトコルの作成</p> <p>当初計画に従い、臨床第 I 相試験（医師主導治験）</p>	

センター（平成24年4月から旧治験センターと文部科学省 TR 拠点が融合し設立）治験審査委員会の審議承認を得る。また、同大学内に効果安全評価委員会を設置して、安全性を確保する。モニタリング、監査、データマネジメント等は、東北大学病院臨床試験推進センターの支援で行うが、一部外部CRO（受託臨床試験機関）に委託する。浜松医科大学や東海大学で実施するにあたっては、それぞれの治験審査委員会の審議承認を得て行い、モニタリング、監査、データマネジメント等は外部CROに委託する。

C. 研究結果

1. 治験薬（錠剤）製造検討：

(1) 配合変化試験

「原薬のみ」の検体については40℃または50℃の条件で変化が認められなかった。

「原薬＋添加剤混合物」および「添加剤のみ」の40℃・75%RH（開放）・1 箇月検体ではクロスカルメロースナトリウムにて色調にわずかな変化が認められたがほぼ白色であり、40℃・75%RH（開放）・2 箇月検体では微黄色の着色が認められた。ヒドロキシプロピルセルロースについては40℃・75%RH（開放）・2 箇月検体にてわずかな色調の変化が確認された。凝集については、「添加剤のみ」のヒドロキシプロピルセルロースの40℃（密閉）・2 箇月検体で変化が認められ、固化については40℃・75%RH（開放）・1 箇月及び2 箇月検体のD-マンニトール、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプングリコール酸ナトリウムにて確認された。50℃（密閉）・2 週間検体では乳糖水和物、50℃（密閉）・1 箇月検体ではヒドロキシプロピルセルロースが固化していた。

光安定性試験では、「原薬のみ」、「原薬＋添加剤混合物」および「添加剤のみ」の全検体において性状の変化は認められなかった。

高速液体クロマトグラフィーによる分析結果は、40℃の加速試験及び50℃の苛酷試験において「原薬のみ」及び「原薬＋添加剤混合品」の検体では、不純物の増加はほぼ認められなかった。光安定性試験では、ヒドロキシプロピルセルロース及び低置換度ヒドロキシプロピルセルロースをそれぞれ原薬と配合したときに不純物合計量が開始時の値からそれぞれ0.11%、0.05%増加していた。

以上、添加剤10種類（D-マンニトール、結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン

グリコール酸ナトリウム、乳糖水和物、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、クロスカルメロースナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、軽質無水ケイ酸、タルク）を用い、TM5509との配合変化を検討した。性状については、一部の検体で変化が認められたが、それは添加剤自体の性質であり、原薬の影響は認められなかった。類縁物質については、40℃の加速試験及び50℃の苛酷試験では不純物の増加はほぼ認められず、温度及び湿度に対しては比較的安定していると推察される。光安定性試験では、ヒドロキシプロピルセルロース及び低置換度ヒドロキシプロピルセルロースを配合したときに不純物がやや増加していた。しかし、これらの添加剤を製剤化で使用する際の配合量は少量となるため、安定性に問題は無いと推測された。

なお、詳細な結果は、Appendix 1に示した。

(2) 処方・製造法・包装形態の検討及び安定性の確認

PI用治験薬は3規格必要であり、将来的にはプラセボ錠も必要となる。また、服用性を考慮し、可能な限り錠剤を小型化することが望ましい。そこで、1mg/錠と10mg/錠を直径6mmの錠剤とし、重量も同一として、今後必要となるプラセボ錠の共通化を計ることとした。また、原薬含量の多い50mg/錠は直径8mmとして製剤化検討を行うこととした。検討に際しては、10mg/錠の処方検討を中心に、10mg/錠の処方をもとに1mg/錠及び50mg/錠の処方を設計することとした。

D-マンニトール・結晶セルロース系の賦形剤では打錠品にスティッキングが確認された。そこで、乳糖・結晶セルロース系に変換することで打錠障害を回避することができた。また、静電気による流動不良が確認されたことから、軽質無水ケイ酸を配合することで流動不良を解消することができた。溶出性については賦形剤による差は確認されなかった。また崩壊剤としてクロスカルメロースナトリウムを選択することで、崩壊性を損なわずに圧縮成形性を確保できた。

しかし、原薬の粒子径増大によって溶出性が大きく遅延することが確認され、治験薬製造品において原薬を粉砕する必要性が見られた。

安定性試験では、1mg/錠、10mg/錠及び50mg/錠のいずれの検体においても熱、湿度、光に安定であった。溶出性については、規定された試験間において、いずれも熱や湿度の影響を受けなかった。以上より、TM5509錠はPTP包装においても安定であると考えられた。詳細な結果は、Appendix 2に示した。

(3) 予備安定性検体作製及び評価

製剤の品質を確認するために、1mg/錠、10mg/錠及び 50mg/錠の予備安定性検体の作製を行った。製造面での問題点は確認されず、打錠品の物性も問題なかった。ポリ塩化ビニルの PTP 包装にて安定性を確認したところ、40℃・75%RH・1 箇月及び 50℃・75%RH・1 箇月において、類縁物質の増加は確認されなかった。また溶出性も問題ないことが確認された。詳細な結果は、Appendix 3 に示した。



2. ヒト代謝物の同定とヒトPK試験測定系の確立

(1) ¹⁴C-TM5509 の凍結肝細胞を用いた比較代謝試験

まず、ヒト肝細胞懸濁液（最終濃度：1 × 10⁶ cells/mL）に ¹⁴C-TM5509（最終濃度：5 及び 10 μ mol/L）を添加し、反応時間（1, 2, 4 時間）及び前処理条件の確認を行った。

前処理時の放射能回収率は、4 時間においては約 90%となった。また、反応 4 時間の試料の分析時における HPLC からのカラム回収率は 101.6%及び 102.2%であり、HPLC に注入した放射能のほとんどは分析時間内に溶出された。

ヒト肝細胞懸濁液に ¹⁴C-TM5509 を最終濃度 5 及び 10 μ mol/L となるように添加後、1, 2 及び 4 時間反応した試料を HPLC に注入したときの ¹⁴C-TM5509 の減少及び代謝物の生成を評価した。その結果、¹⁴C-TM5509 は 5 μ mol/L では 1 時間で 57.6%、2 時間で 43.2%、4 時間で 21.7%に減少し、10 μ mol/L では 1 時間で 71.5%、2 時間で 55.0%、4 時間で 39.4%に減少し、5 μ mol/L に比べて 10 μ mol/L では代

謝が飽和する傾向を示した。代謝物の生成に関しては、5 μ mol/L では 1 時間で 6 個、2 時間で 6 個、4 時間で 8 個生成し、10 μ mol/L では 1 時間で 5 個、2 時間で 5 個、4 時間で 5 個生成した。主代謝物としては UM8 が生成し、5 μ mol/L では 1 時間で 14.0%、2 時間で 21.2%、4 時間で 25.0%が検出され、10 μ mol/L では 1 時間で 9.1%、2 時間で 17.0%、4 時間で 30.0%が検出された。代謝物の生成割合は 4 時間までに経時的に増加する傾向が認められた。

反応に使用したヒト肝細胞懸濁液中の調製直後における肝細胞生存率は 87%であったことから、試験を実施する上で十分な生存率であった。

以上の結果より本試験として、ヒト、サル及びラット肝細胞懸濁液に ¹⁴C-TM5509（最終濃度：5 μ mol/L）を添加し、4 時間反応したときの代謝の種差を確認した。

各動物種の肝細胞懸濁液に ¹⁴C-TM5509（最終濃度：5 μ mol/L）を添加して 4 時間反応させたとき、¹⁴C-TM5509 の割合はヒトで 30.0%、サルで 84.6%、ラットで 30.0%に減少した。主代謝物としてヒトでは UM5 (21.6%)、UM8 (17.1%) 及び UM4 (12.4%)、サルでは UM3 (4.3%)、ラットでは UM3 (57.4%) が生成した。その他の代謝物は、ヒトで 4 個 (0.6~9.3%)、サルで 4 個 (0.5~3.2%)、ラットで 3 個 (1.2~3.4%) であった。また、動物種による特異的な代謝物としては、ヒトで 4 個 [UM2 (9.3%)、UM6 (1.3%)、UM7 (0.5%) 及び UM9 (0.6%)]、サルで 1 個 [UM10 (0.5%)]、ラットで 1 個 [UM1 (3.4%)] が検出された。

なお、以上の成績より、TM5509 はヒト、ラットで代謝を受けるが、サルでは代謝されにくいことが示唆された。

Peak name	Detection in <i>in vitro</i> metabolism		
	Human	Monkey	Rat
TM-5509	+	+	+
UM1	ND	ND	+
UM2	+	ND	ND
UM3	+	+	+
UM4	+	+	ND
UM5	+	+	+
UM6	+	ND	ND
UM8	+	+	+
UM9	+	ND	ND
UM10	ND	+	ND

+: detected on radiochromatogram

ND: not detected

(2) ^{14}C -TM-5509の凍結肝細胞を用いた比較代謝試験における代謝物構造推定試験

^{14}C -TM-5509 (5 $\mu\text{mol/L}$) をヒト、サル及びラット凍結肝細胞と4時間反応した試料を用いて、それらの試料中に含まれる9個の代謝物及びTM-5509の構造を高分解能LC/MSを用いて推定または同定した。ヒト試料中に検出された主代謝物であるUM4、UM5、UM8のうち、UM4はアリール基に酸素原子2個と水素2個が増えた代謝物であることから、TM-5509のジヒドロジオール体であると考えられた。UM5はTM-5509のアリール基が水酸化体され硫酸抱合された代謝物、UM8はアリール基が水酸化された代謝物と推定された。

なお、上記の試験で検出されたUM7は本試験では検出されなかった。UM7のHPLCにおける保持時間とTM-5509の代謝経路を考えると、UM6 (TM-5509の水酸化体のグルクロン酸抱合体) の異性体もしくはUM8 (TM-5509の水酸化体) の異性体の可能性が示唆される。

以上の結果から、TM-5509はヒトにおいて主に酸化及び硫酸抱合され、その他グルクロン酸抱合されると考えられた。

(3) ヒト血漿及び尿中 TM5509 の濃度測定法バリデーション/予備検討

上記の成績をもとに、ヒトの血漿および尿を用いて、TM5509の濃度測定法バリデーションと予備検討を行った。

その結果、検量線範囲（感度）は、血漿、尿ともに1ng/mLで十分に検出できた。なお、検量線範囲を200倍に設定するとLLOQの10%程度キャリーオーバーした。

また、容器への吸着試験では、血漿では吸着しなかったが、尿では、吸着が見られ、エタノール：尿=1：2のブランクマトリックスを用いることにより、吸着が回避できた。そのことから、臨床施設でエタノールを尿に添加しなければならないことが示唆された。

3. 薬理薬効試験の追加

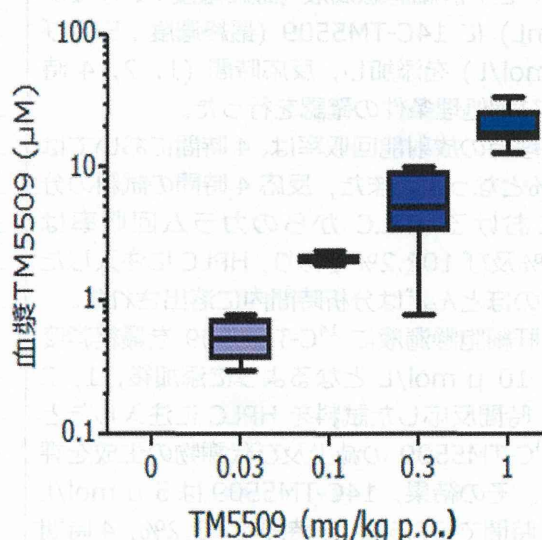
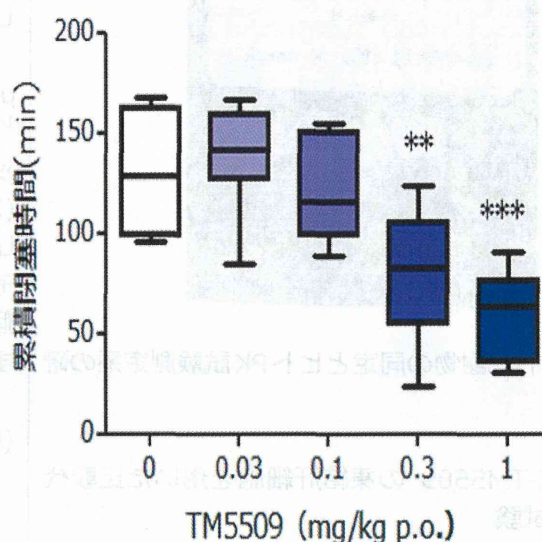
カニクイザル伏在動脈血栓モデル (PITモデル) におけるTM5509の有効性を検討した。

初回閉塞時間は、G1: 11.7 ± 3.9 min, G2: 10.6 ± 2.3 min, G3: 11.7 ± 4.0 min, G4: 11.7 ± 3.1 min, G5: 12.0 ± 3.6 であり、群間に有意な差はなかった。一方、TM5509の投与では、用量に依存した累積閉

塞時間の短縮が見られ、媒体投与群 (G1: 130.2 ± 30.0 min) に比較して、0.03 mg/kg投与群 (G2: 137.5 ± 26.0 min)、0.1 mg/kg投与群 (G3: 121.5 ± 26.4 min) であったが、0.3 mg/kg投与群 (G4: 80.1 ± 32.4) と1.0 mg/kg投与群 (G5: 59.1 ± 22.7 min) で有意な短縮 (それぞれ $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$) が認められた。

また、その抗血栓（線溶活性化）作用は、血漿中TM5509濃度の相関性を示した。

以上から、TM5509の薬効はその血中濃度に依存し、0.3 mg/kgの低用量の経口投与から有意な有効性を示すことが明らかとなった。



<p>一方、全ての群において投与前後で比較した結果、t-PA活性の低下、PAI-1活性の上昇及びELT値の延長が認められた。これについては、各パラメータに日内変動があること、また採血時の状態が異なること（覚醒下と麻酔下）が影響している可能性が考えられた。今回検討した項目が薬効のサロゲートバイオマーカーになるかどうかは判断できなかった。今後、無麻酔の動物にPAI-1阻害剤を投与した場合の各項目の投与前後の比較を行う必要もあると考えられた。</p> <p>しかしながら、薬効のサロゲートバイオマーカーの探索を目的として実施した全ての測定項目（t-PA 活性、PAI-1 活性、ELT、フィブリノーゲン、FDP、D-ダイマー、t-PA・PAI-1 複合体、トータル PAI-1、トロンビン・アンチトロンビンⅢ複合体の 9 項目）については、G1 と被験物質投与群（G2、3、4、5）の間で明らかな変化は認められなかった。</p> <h4>4. PMDA 医薬品戦略相談実施（臨床試験開始前相談）</h4> <h5>(1) 事前面談</h5> <p>「TM5509 の非臨床試験成績の評価及び第 I 相試験計画について」、先の戦略相談（平成 24 年 3 月 2 日）に基づき実施した第 I 相試験までに必要な非臨床試験の成績の概要と第 I 相試験計画の骨子（単回投与 1 ～100 mg）を提出し、相談した。</p> <p>PMDA からは、1）まずサルの死亡例について精査が必要である（死因、胆道系の障害との関係）。サルでの試験における用量設定について示し、種差についても考察すること。</p> <p>2）第 I 相試験の追加等による時間の無駄を避けるために最高用量の設定はあげるべき（例えば、300 mg）。3）臨床試験における用量設定の根拠を明確にすること。ストップングルール等も示すこと。との助言を得て、本相談へと進んだ。</p> <h5>(2) 相談事項の提出</h5> <p>相談事項は、</p> <ol style="list-style-type: none">1. 第 I 相試験実施に向けた非臨床試験成績の評価について2. 第 I 相試験の用量設定について <p>として、初回投与量、最高用量（300 mg）及び増量に当たっての判断方法について、助言をお願いした。</p> <p>それに対して、非臨床関係 8、臨床試験関係 2 の照会事項（Appendix7）があり、「サルを用いた 4 週間反復投与毒性試験において、本薬 20mg/kg 以上の用</p>	<p>量で曝露量の飽和が認められているにも関わらず、300mg/kg 投与群でのみ強い毒性（死亡）が発現した機序を説明してください」との照会があった。</p> <p>本照会に対しては、1）TK試験のAUC_{0-24h}に有意な群間差があり、また有意な線形傾向から、20 mg/kg 以上で飽和しているとは言えない。2）軟便、嘔吐などの毒性変化は投与量に依存して発現している。3）瀕死期剖検/死亡例で、胆道系を主体として変化がみられ、胆管上皮に対する障害及びその反応性病変が示唆された。なお、胆道系の変化は300 mg/kgの生存例にも見られた。3）強い毒性（死亡）の発現機序について、関連領域の権威である帝京大学滝川一教授、金沢大学中沼安二教授にアドバイスを求めた。その結果、①薬物による肝細胞への直接作用や薬剤性アレルギーではない。②胆管への障害の数は多いが限局性で、またステージが異なるものが散在しているので、これが直接の死因とは考えられない。③異常の強い所見は、ヒトでの胆管炎症膿瘍と同様の所見であり、上行性感染が起こり、それが死因と想定された。これは臨床でモニターが可能で、また治療も100%可能である。4）本変化は、薬効量0.3 mg/kgの1000倍という300 mg/kgの高用量でのみ発現しており、ヒトでの推定薬効量（0.1～0.5 mg/kg）の数百倍であることから、ヒトで発現する危険性は極めて低いものと推定されると、回答した。</p> <p>以上に対する「機構意見・助言」は、要約すると、現時点では第I相試験を開始できる段階には至っていないとし、①サルでの死亡が特定されておらず、関連した副作用を回避するためのモニタリングができる検査項目等が設定できない、②用量間の曝露量の違い（曝露量の線形性）を考慮した安全域を推定することが困難である、③代謝物の曝露量が用量に依存して増加していないか、やヒト特異的な代謝物の検討するなど、代謝物の安全性評価が必要である、④以上から、臨床移行できる段階には至っておらず、第 I 相試験における投与量（初回及び最高用量）並びに増量の判断方法の妥当性は判断できない、との意見・助言であった。</p> <p>しかし、用量設定を上げるように指示したのは PMDA であり、またサルの死因についても特定できていたことなどから、合理性や科学性から考えて、納得がいく意見・助言ではなかった。</p> <h5>(3) 対面助言</h5> <p>上記の①に対して、肝臓病理では世界的権威である金沢大学中沼安二教授を再度訪問して、組織標本を詳</p>
--	---

細に検査してもらい、いただいたコメント、「死亡例では胆管炎性膿瘍が多発しており、細菌のコロニーが認められる個体もあり、細菌性ショック・敗血症を起こして死亡した可能性が高い。ヒトではこのような場合、炎症性サイトカインや CRP が上昇し、また白血球増多やエンドトキシン等を測定することで診断が可能と考えられる」を提示し、②サル安全性薬理試験の TK パラメータで無毒性量である 20 mg/kg までは線形性（原点を通る直線性）が得られていることから、線形域のサルの NOAEL 20 mg/kg を用いて安全域の推定が可能であること、③in vitro での肝細胞での代謝試験において、ヒトでの高用量での代謝飽和とサルでは代謝が低いことを示し、高用量で出現する代謝物は考えにくいことを示した。

以上から、「医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンス」に照らして、最も感度の高い動物種サルの無毒性量（NOAEL）が 20 mg/kg、サルのアロメトリック係数 3.1 から HED は 6.45 mg/kg、一般的に用いられる安全係数 10 をとると、ヒト初回投与量（体重 50 kg）は 32.3 mg となること、さらに MABLE アプローチでは、ラットの薬効量 1 mg/kg、その血漿薬物濃度 2.3 μ M (0.81 μ g/ml)、ヒト血漿量 50 ml/kg より初回量は 2.0 mg となることを示し、少なくとも現時点で、④安全域を確保してガイドライン準拠の用量設定が可能であり、第 I 相試験を開始できることを主張した。

活発な議論の結果、結論として①第 I 相単回試験は TM5509 の 30 mg まで可能、②更なる増量や反復投与試験には、サル毒性所見のモニター可能性を明らかにしての通常のリスク評価等が必要、との判断が下された（Appendix7）。

なお、その後も「革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業」の人材交流などを介して、PMDA との協議を続け、更なる増量や反復投与試験に必要な非臨床試験として、1) サル 4 週間毒性試験の追加試験（0, 2, 6, 20, 80, 300 mg/kg）を行い、上記の議論内容と問題となった試験域の両方をカバーし、検査間隔も縮め（2→1 週間隔）、高用量側の毒性発現の経日変化を詳細に観察、AUC の再現性ならびに線形域を明確にする。さらに、2) サルでの胆汁排泄試験で胆汁中 TM5509 および代謝物の種類と量を明らかにすることが必要との示唆を得た。また、TM5509 のバックアップ、後継化合物の開発を進めることも示唆された。

5. 治験薬概要書と臨床試験プロトコルの作成

当初計画に従い、臨床第 I 相試験（医師主導治験）の実施機関である浜松医科大学と協力して治験薬概要書と臨床試験プロトコルの作成を行った。

6. 治験届提出

治験計画届書（平成25年3月22日）にPMDAへ提出して、30日間調査を経て受理された。以上のように、第 I 相試験までの準備を完了させ、平成24年度の達成目標は100%達成した。

また、UMINへの登録も行った（UMIN試験ID：UMIN000010686、試験名：TM5509 第I相試験 - 健康成人男性を対象としたプラセボ対照単回経口投与試験-）。

治験計画届書をAppendix8に、UMIN-CTR登録用フォームをAppendix9として添付した。

7. 後継化合物 TM5614 の非臨床予備試験

TM5509 の後継化合物の 1 つである TM5614 は、化学構造や PAI-1 阻害作用の強さが TM5509 に近いが、TM5509 がヒトの代謝酵素 CYP1A2 と CYP2C9 で代謝されるのに対して、TM5614 は主に CYP3A4 で代謝される。

これまでの検討で、TM5509 に問題があるとすれば、代謝物が関わっているかもしれない肝胆系への副作用であり、TM5614 では異なることが予想される。

TM5614 は、臨床予備検討において、遺伝毒性試験（Ames）および心血管系安全性薬理試験（hERG）で陰性、ならびにラット 2 週間反復経口毒性試験で NOAEL（無毒性量）が 30 mg/kg/日であった（いずれも非 GLP 試験の結果）。

D. 考察

放射線障害は重篤な組織障害をもたらすものであり、震災後の社会的喫緊の課題でもあるが、有効な治療薬は未だ無く、世界的に治療薬の開発が切望されている。高精度放射線治療は線量集中度を向上する物理学的アプローチで治療成績を改善したが、これには限界があり、放射線照射による細胞障害、虚血、炎症、線維化などの障害を改善する生物学的アプローチ（治療薬開発）が喫緊の課題である。本研究により、放射線組織障害の治療薬のみならず、原発事故や除染作業

での被曝に対する画期的な治療薬の誕生が期待できる。本研究は、震災地域の課題を震災地域のシーズで解決するという「日本再生・被災地復興」のシンボルとなるアカデミア発の医薬品開発である。

本研究では、PAI-1 阻害薬の放射線障害治療薬としての有効性を臨床試験で証明する。本研究では、H24年度（2012年度）に第I相試験（健常人）の準備を完了し、H25年度（2013年度）には第I相試験での安全性確認を行い、H26年度（2014年度）にはI/II相で患者にブリッジする。そして、H27,28年度（2015,16年度）には、第II相試験でTM5509の①全身照射前処置幹細胞移植に対する効果と、②頭頸部癌での放射線照射口内炎への効果でPOC（治療効果の証明）を取得する（全て医師主導治験）計画である。

平成24年度達成目標は、臨床第I相試験準備の完了であり、①治験薬（錠剤）製造検討、②ヒト代謝物の同定とヒトPK試験測定系の確立、③PMDA医薬品戦略相談の実施（臨床試験開始前相談）、④治験薬概要書と臨床試験プロトコルの作成を定量目標とした。

そこで、①治験薬（錠剤）製造検討については、当初計画に従い、製剤化検討を富士薬品に委託実施した。非臨床成績から、TM5509のヒトでの薬効量は10~30 mgと推定され、投与量1~100 mgの第I相試験を計画している。そのため、治験薬錠剤としては、1,10および50 mg錠を作製することとした。対応するプラセボ錠も含めて、製剤化の検討を実施し、安定性試験も含めて、治験薬錠剤の条件が確立できた。現在、第I相試験に向けて必要量の錠剤を委託（富士薬品）にて製造中である。

②ヒト代謝物の同定とヒトPK試験測定系の確立は、ラベル化合物を用いて、ヒト、ラットおよびサルの肝細胞で代謝の種差を明らかにし、ヒトでの代謝を明らかにするとともに、血中、尿中のヒト薬物代謝物の測定系（LC/MS/MS）を確立した。

さらに薬理薬効試験の追加試験として、サルでのTM5509の薬効の用量依存性を確認し、0.3 mg/kgの低用量から有意な薬効を示し、血中TM5509濃度と相関することを示した。本試験は、臨床試験での用量設定を行う上で、重要な結果となった。

③PMDA医薬品戦略相談の実施（臨床試験開始前相談）は、当初計画通り実施され、TM5509 30mg 単回までの臨床試験が承認された。その結果に基づいて、④治験薬概要書と臨床試験プロトコルの作成を臨床第I相試験（医師主導治験）の実施機関である浜松医科大学と協力して行った。さらに、治験届提出し

受理されたことから、臨床第I相試験に移行する準備は完了し、平成24年度の達成目標は100%達成できた。

平成25年度は、医師主導の臨床第I相試験（単回30 mgまで）を進めると共に、PMDA戦略相談で必要とされたサル4週間毒性試験の追加試験とサルでの胆汁排泄試験を実施して、更なる単回増量試験や反復投与試験に進めるためにPMDA戦略相談を実施する計画である。

並行してTM5509の生殖毒性試験や後継化合物TM5614の非臨床試験安全性試験の準備を進める予定である。

E. 結論

平成24年度の達成目標である第I相試験までの準備に対して、計画通り、①治験薬（錠剤）製造検討、②ヒト代謝物の同定とヒトPK試験測定系の確立、③治験薬概要書と臨床試験プロトコルの作成、④PMDA医薬品戦略相談の実施（臨床試験開始前相談）を行い、治験届を受理されることで第I相試験までの準備を完了させ、平成24年度の達成目標は100%達成した。併せて、臨床作用予測のための薬効試験を実施し、TM5509の後継化合物であるTM5614の非臨床予備試験を開始した。

F. 健康危険情報

平成24年度は臨床準備段階であり、また臨床研究の実施もないことから、健康危険情報は無い。

G. 研究発表

- 論文発表
 - Tashiro Y, Nishida C, Sato-Kusubata K, Ohki-Koizumi M, Ishihara M, Sato A, Gritli I, Komiyama H, Sato Y, Dan T, Miyata T, Okumura K, Tomiki Y, Sakamoto K, Nakauchi H, Heissig B, Hattori K. Inhibition of PAI-1 induces neutrophil-driven neoangiogenesis and promotes tissue regeneration via production of angiocrine factors in mice. *Blood*. 119:6382-93. 2012
 - Huang WT, Vayalil PK, Miyata T, Hagood J, Liu RM. Therapeutic value of small molecule inhibitor to plasminogen activator inhibitor-1 for lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*.

<p>1) 46: 87-95, 2012</p> <p>2) Ichimura A, Matsumoto S, Suzuki S, Dan T, Yamaki S, Sato Y, Kiyomoto H, Ishii N, Okada K, Matsuo O, Hou FF, Vaughan DE, van Ypersele de Strihou C, Miyata T. A small molecule inhibitor to plasminogen activator inhibitor 1 inhibits macrophage migration. <i>Arterioscler Thromb Vasc Biol.</i> 33:935-42, 2013</p> <p>3) Miyata T, Suzuki N, van Ypersele de Strihou C. Diabetic nephropathy: Are there new and potentially promising therapies targeting oxygen biology? <i>Kidney Int</i> 2013 (in press)</p> <p>4) Yasui H, Suzuki Y, Sano H, Suda T, Chida K, Dan T, Miyata T, Urano T. TM5275 prolongs secreted tissue plasminogen activator retention and enhances fibrinolysis on vascular endothelial cells. <i>Thromb Res.</i> 2013 (in press)</p> <p>5) Remuzzi G, Schieppati A, Schrier RW, Rodriguez-Iturbe B, Liu ZH, Finkelstein F, Tonelli M, Grunfeld JP, Perico N, Miyata T, Lifton RP, Katz I. Renal failure worldwide: what we want to achieve in 10 year time and which barriers to overcome. <i>Lancet</i> 2013 (in press)</p> <p>2. 学会発表</p> <p>なし</p> <p>H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)</p> <p>1. 特許取得</p> <p>なし</p> <p>2. 実用新案登録</p> <p>なし</p> <p>3. その他</p> <p>なし</p>	
--	--

別添4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tashiro Y, Nishida C, Sato-Kusubata K, Ohki-Koizumi M, Ishihara M, Sato A, Gritli I, Komiyama H, Sato Y, Dan T, Miyata T, Okumura K, Tomiki Y, Sakamoto K, Nakauchi H, Heissig B, Hattori K.	Inhibition of PAI-1 induces neutrophil-driven neovascularization and promotes tissue regeneration via production of angiocrine factors in mice.	Blood	119	6382-93	2012
Huang WT, Vayalil PK, Miyata T, Hagood J, Liu RM.	Therapeutic value of small molecule inhibitor to plasminogen activator inhibitor-1 for lung fibrosis.	Am J Respir Cell Mol Biol.	46	87-95	2012
Ichimura A, Matsumoto S, Suzuki S, Dan T, Yamaki S, Sato Y, Kiyomoto H, Ishii N, Okada K, Matsuo O, Hou FF, Vaughan DE, van Ypersele de Strihou C, Miyata T.	A small molecule inhibitor to plasminogen activator inhibitor 1 inhibits macrophage migration.	Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology	33	935-42	2013

Inhibition of PAI-1 induces neutrophil-driven neoangiogenesis and promotes tissue regeneration via production of angiocrine factors in mice

Yoshihiko Tashiro,^{1,2} Chiemi Nishida,¹ Kaori Sato-Kusubata,³ Makiko Ohki-Koizumi,¹ Makoto Ishihara,¹ Aki Sato,¹ Ismael Gritti,¹ Hiromitsu Komiyama,^{1,2} Yayoi Sato,¹ Takashi Dan,⁴ Toshio Miyata,⁴ Ko Okumura,⁵ Yuichi Tomiki,² Kazuhiro Sakamoto,² Hiromitsu Nakauchi,¹ *Beate Heissig,^{1,3,5} and *Koichi Hattori^{1,5}

¹Center for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Institute of Medical Science at the University of Tokyo, Tokyo, Japan; ²Department of Coloproctological Surgery, Juntendo University Faculty of Medicine, Tokyo, Japan; ³Department of Stem Cell Dynamics, Center for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Institute of Medical Science at the University of Tokyo, Tokyo, Japan; ⁴United Centers for Advanced Research and Translational Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan; and ⁵Atopy (Allergy) Center, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), an endogenous inhibitor of a major fibrinolytic factor, tissue-type plasminogen activator, can both promote and inhibit angiogenesis. However, the physiologic role and the precise mechanisms underlying the angiogenic effects of PAI-1 remain unclear. In the present study, we report that pharmacologic inhibition of PAI-1 promoted angiogenesis and prevented tissue necrosis in a mouse model of hind-limb ischemia. Improved tissue regeneration was due to an expansion

of circulating and tissue-resident granulocyte-1 marker (Gr-1⁺) neutrophils and to increased release of the angiogenic factor VEGF-A, the hematopoietic growth factor kit ligand, and G-CSF. Immunohistochemical analysis indicated increased amounts of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in ischemic gastrocnemius muscle tissues of PAI-1 inhibitor-treated animals. Ab neutralization and genetic knockout studies indicated that both the improved tissue regeneration and the increase in circulating

and ischemic tissue-resident Gr-1⁺ neutrophils depended on the activation of tissue-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-9 and on VEGF-A and FGF-2. These results suggest that pharmacologic PAI-1 inhibition activates the proangiogenic FGF-2 and VEGF-A pathways, which orchestrates neutrophil-driven angiogenesis and induces cell-driven revascularization and is therefore a potential therapy for ischemic diseases. (Blood. 2012;119(26): 6382-6393)

Introduction

Approximately 500 to 1000 people per million per year are diagnosed with critical ischemia of the limb, which in most cases results in serious morbidity and mortality. Therapeutic restoration of blood flow by, for example, the induction of the formation of new capillaries (angiogenesis) is the ultimate goal for critical limb ischemia patients. Growth of new blood vessels in the adult occurs through angiogenesis or arteriogenesis (vessel maturation via recruitment of smooth muscle cells) and vasculogenesis (mobilization of BM-derived cells).^{1,2} In contrast to promising results from animal studies, administration of proangiogenic factors such as fibroblast growth factor 2 (FGF-2, also known as basic FGF) or VEGF-A failed to induce significant improvement in ischemia in several phase 1 clinical trials.³

The plasminogen activation system and matrix metalloproteinases (MMPs), which can cleave growth factors, growth factor receptors, and adhesion molecules and mediate the extracellular matrix degradation that is necessary for cell migration, are widely recognized as being involved in the process of angiogenesis.^{2,4} Although plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is one of the primary regulators of the fibrinolytic system, it also has dramatic effects on cell adhesion, detachment, and migration⁵ and can inhibit cellular migration by affecting cell adhesion.^{6,7} PAI-1-deficient (PAI-1^{-/-}) mice showed improved vascular wound healing in models of perivascular electric or transluminal mechanical injury⁸ due to improved migration of PAI-1^{-/-} smooth muscle cells. The

52-kDa serine protease inhibitor PAI-1 is the major plasma inhibitor of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and tissue-type plasminogen activator (tPA) and inhibits plasmin-mediated fibrinolysis.⁹ Studies in mice have indicated that the PAI-1 mRNA concentration is high in the heart, lung, aorta, and adipose and muscle tissue.¹⁰ Plasma and tissue concentrations of PAI-1 increase under pathologic conditions. This increase is mediated by many factors, including reactive oxygen species. PAI-1 is secreted from endothelial cells after ischemia, such as that which occurs in acute myocardial infarction, atherosclerosis, and restenosis.^{11,12} However, the role of PAI-1 in both promoting and inhibiting vascular remodeling or tissue regeneration and tumor growth or neoangiogenesis is controversial.¹³⁻¹⁵

The proteases plasmin and MMP-3 cleave and inactivate PAI-1.^{16,17} The balance between PAI-1 inhibition of plasmin and other proteases and the cleavage of PAI-1 by these proteases, may play a critical role in the modulation of vascular proliferative responses. However, the exact mechanisms by which PAI-1 affects ischemic tissue regeneration and cell migration are not completely understood. In the present study, we demonstrate that, under ischemic conditions, drug-induced PAI-1 inhibition accelerates neoangiogenesis in a model of hind-limb (HL) ischemia. Moreover, PAI-1 inhibition also increases the proangiogenic factors FGF-2 and VEGF-A, the hematopoietic growth factor kit ligand (KitL), and G-CSF. tPA and MMP-9 deficiency and VEGF-A and FGF-2

Submitted December 21, 2011; accepted May 6, 2012. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, May 9, 2012; DOI 10.1182/blood-2011-12-399659.

*B.H. and K.H. share senior authorship.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2012 by The American Society of Hematology

blockade reversed the PAI-1 inhibitor-mediated improved neovascularization and neutrophil recruitment in the peripheral blood and locally within the ischemic tissue/niche. Remarkably, adoptive transfer of ischemic muscle-derived neutrophils derived from PAI-1 inhibitor-treated mice enhanced revascularization. Pharmacologic PAI-1 blockade under ischemic conditions not only increased the absolute number of granulocyte-1 marker (Gr-1⁺) myeloid cells, but also enhanced their angiogenic performance.

These data provide a fundamental insight into how PAI-1 conditioning of the ischemic niche induces leukocyte influx and controls angiogenesis and suggest that PAI-1 inhibition using small-molecule inhibitors could be a promising cellular target for the treatment of ischemic diseases.

Methods

Animal studies

MMP-9^{+/+} and MMP-9^{-/-} mice and tPA^{+/+} and tPA^{-/-} mice were each used after > 10 back crosses onto a C57BL/6 background. C57BL/6 mice were purchased from SLC. C57BL/6 mice that express GFP under a β -actin promoter were used for transplantation experiments at the age of 6–8 weeks. Animal studies were approved by the animal review board of Juntendo University.

PAI-1 inhibitor

The recently described PAI-1 inhibitor TM5275, 5-chloro-2-((2-(4-(diphenylmethyl) piperazin-1-yl)-2-oxoethoxy acetyl)amino]benzoate, provided by T.M. inhibited PAI-1 activity with a half-maximal inhibition (IC₅₀) value of 6.95 μ M, as measured by assay of tPA-dependent hydrolysis of a peptide substrate. The IC₅₀ values of TM5007 and PAI-749 are 5.60, and 8.37 μ M, respectively.¹⁸ In vitro, TM5275 (up to 100 μ M) does not interfere with other serpin/serine protease systems such as α ₁-antitrypsin/trypsin and α ₂-antiplasmin/plasmin. Therefore, its PAI-1-inhibitory activity appears to be specific. Preincubation of PAI-1 with TM5275 abolishes detection of the covalent PAI-1-tPA complex by SDS-PAGE.¹⁸ Oral administration of 50 mg/kg of TM5275 to mice resulted in a maximum plasma concentration after 1 hour. The highest plasma drug concentration observed was 6.9 mol/L and the terminal phase half-life of the drug was 6.5 hours. No effect of TM5275 on platelet aggregation induced by ADP and collagen was observed 2 hours after oral administration (10 mg/kg).

Study design

The PAI-1 inhibitor was resuspended in 200 μ L of 0.5% carboxymethylcellulose (MP Biomedicals) and administered orally (10 mg/kg body weight) daily to mice with or without induction of HL ischemia from days 0–6. Control mice received vehicle (200 μ L of 0.5% carboxymethylcellulose). Recombinant tPA (Eizai) resuspended in 150 mL of 0.2% BSA (Sigma-Aldrich) was administered (10 mg/kg body weight) to mice by daily IP injections from days 0–2.¹⁹

HL model

Mice were anesthetized with pentobarbital sodium (40 mg/kg body weight) that was given intraperitoneally. Briefly, an incision was made in the skin on the medial aspect of the left thigh. The femoral artery was ligated using 4-0 silk sutures (Ethicon) and cut immediately distal to the inguinal ligament and proximal to the popliteal bifurcation site. Changes in blood flow were recorded at days 0, 1, 4, 7, 14, and 21 after the procedure using a laser Doppler perfusion image analyzer (Moor Instruments). Blood was collected via retroorbital bleeding using heparin-coated and plain capillary tubes and WBCs were counted. Plasma and serum samples were stored at -30°C. Mice were killed 1, 5, 15, and 21 days after resection of the femoral artery.

Isolation of Gr-1 cells from muscle tissue after HL ischemia induction

Muscle-derived Gr-1⁺ cells were isolated from HL-ischemia-induced C57BL/6 mice treated with or without PAI-1 inhibitor on day 5 using MACS. In brief, muscles were excised and cut into small pieces. After excision, tissue pieces were lysed with a buffer containing 20mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 1% collagenase II, 2.4 U/mL of Dispase, 1mM PMSF, and 10 μ M pepstatin for 1.5 hours. Gr-1⁺ and Gr-1⁻ cells were isolated using the anti-Ly-6G Microbead kit (Miltenyi Biotec). Cell morphology was determined on cytopins after Wright-Giemsa staining.

In vivo blocking experiments

HL-ischemic mice treated with or without the PAI-1 inhibitor (days 0–6) were coinjected intraperitoneally with 10 μ g of anti-mouse VEGF-A (AF-493-NA; R&D Systems) or 10 μ g of goat specific anti-human FGF-2 (AF-233-NA; R&D Systems) on day 0. Appropriate isotype Ab controls were included.

Transplantation of PAI-1 inhibitor-mobilized Gr-1⁺ cells

Muscle-derived Gr-1⁺ cells were isolated from HL-ischemia-induced C57BL/6 donor mice treated with or without PAI-1 inhibitor on day 5 by FACS using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). Gr-1⁺ cells (5×10^4 cells/injection/d) were injected daily intramuscularly into C57BL/6 recipient mice on days 0 and 1 after HL ischemia induction.

Flow cytometry

PBMCs were stained with the following Abs: CD45-FITC (1:200, clone 30-F11; BD Pharmingen), CD11b-APC (1:200, clone M1/70; BD Pharmingen), and Gr-1-PE (1:200, clone RB6-8C5; BD Pharmingen). Cells were analyzed by FACS.

Histological assessment

Ischemic adductor or, if indicated, hamstring (posterior thigh) muscle tissue samples were snap-frozen in liquid nitrogen. Transverse cuts of the whole leg were prepared. Sections were stained with H&E.

Tissue sections were washed, serum blocked, and stained with the first Ab overnight at 4°C. Muscle sections were stained with the anti-CD31 Ab (clone T-2001; BMA Biomedicals) followed by biotin-conjugated goat anti-rat IgG (Vector Laboratories) and FITC-conjugated streptavidin (Alexa Fluor 488; Molecular Probes). In addition, tissues were stained with the primary anti-mouse FGF-2 (clone D0611; Santa Cruz Biotechnology) and FGF-R1 (clone 755639; Abcam) and VEGF-A Abs, followed by a goat anti-rabbit IgG Ab conjugated with Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). Muscle sections were also stained with anti-mouse VWF Ab (Dako), followed by Cy3-conjugated streptavidin (Alexa Fluor 594; Molecular Probes) using the M.O.M kit (Vector Laboratories) according to the manufacturer's instructions. Neutrophils were identified using the Gr-1 Ab (clone RB6-8C5; R&D Systems), followed by biotin-conjugated goat anti-rat IgG (Vector Laboratories) and Cy3-conjugated streptavidin (Alexa Fluor 594; Molecular Probes) Abs. Macrophages were identified using the F4/80 Ab (clone A3-1; AbD Serotec), followed by biotin-conjugated goat anti-rat IgG (Vector Laboratories) and Cy3-conjugated streptavidin (Alexa Fluor 594; Molecular Probes) Abs. In addition, tissues were stained with the primary anti-mouse VEGF-A Ab (clone A-20; Santa Cruz Biotechnology), followed by the goat anti-rabbit IgG Ab conjugated with Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). Nuclei were counterstained with DAPI (Molecular Probes).

RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from the gastrocnemius muscle of HL-ischemic or untreated mice using RNA TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's directions. Briefly, 25 mg of muscle was immediately immersed in 1 mL of TRIzol reagent. The muscle was homogenized on ice using a homogenizer. The aqueous and organic phases were separated using 200 μ L

of chloroform. Total RNA was precipitated using 500 μ L of isopropyl alcohol, washed 3 times with 75% ethanol, and redissolved in 24 μ L of DEPC-treated H₂O. The concentration and purity of the RNA was determined using a UV spectrophotometer by measuring the absorbance at 260 and 280 nm. cDNA was amplified by PCR using the following specific forward and reverse primer pairs: for *uPA*: (5'-GTCTCTCTGCAACA-GAGTC-3') and (5'-CTGTGTCTGAGGGTAATGCT-3'); for *tPA*: (5'-GTACTGCTTTGTGGACT-3') and (5'-TGCTGTGGTAAGTTGTCTG-3'); for *PAI-1*: (5'-AAAGGACTCTATGGGGAGAA-3') and (5'-TAGGGAG-GAGGGAGTTAGAC-3'); and for the *b-actin* control: (5'-TGACAGGATG-CAGAAGGAGA-3') and (5'-GCTGGAAGGTGGACAGTGAG-3').

ELISA

Plasma and serum samples from PAI-1 inhibitor-treated and untreated mice with HL-ischemia induction were assayed for murine VEGF-A, MMP-9, KitL, G-CSF, PAI-1, and tPA using ELISA kits (R&D Systems, Cell Sciences, and Molecular Innovations).

Western blotting

Muscle tissue extracts were prepared for Western blotting. Briefly, gastrocnemial muscle tissues were lysed in a buffer containing 20mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 1% Triton X-100, 1mM PMSF, and 10 μ M pepstatin after mashing between 2 glass slides. Whole-muscle lysates were subjected to SDS-PAGE (8%), followed by electroblotting onto a PVDF membrane. Membranes were blocked in 20mM PBS and 0.05% Tween-20 (vol/vol) containing 5% (wt/vol) skim milk powder at room temperature, followed by overnight incubation with the anti-PAI-1 Ab (1:1000; Abcam), and an HRP-conjugated secondary Ab (1:20; Nichirei Biosciences) for 1 hour. Membranes were developed using the ECL Plus system (Amersham Life Sciences).

Reverse fibrin zymography

Reverse fibrin zymography, although similar to fibrin zymography, uses agar gels that contain uPA in addition to fibrinogen and plasminogen to determine unbound/free PAI-1. Protein extracts (50 μ g) from normal and ischemic muscle tissues were loaded on an 8% acrylamide gel, and, after SDS-PAGE, the SDS was removed by washing the acrylamide gels with distilled water followed by incubation for 2 hours with a buffer containing 2.5% Triton X-100, 0.05 M/L of Tris-HCl (pH 7.5), and 0.1 M/L of NaCl to renature the enzymes. The gels were then incubated for 12-24 hours at 37°C in buffer containing 0.05 M/L of Tris-HCl (pH 7.5) and 0.01 M/L of CaCl₂. After this incubation, the gels were stained for 1 hour with Coomassie blue diluted with 50% methanol and 10% acetic acid and decolorized with buffer containing 25% methanol and 8% acetic acid. No fibrinolysis occurs in the area of the gel where the PAI-1 protein is located, resulting in a visible band. Gels were then photographed.

Fibrin plate assay

Plasma fibrinolytic activity was measured using the modified fibrin plate method. Briefly, blood samples were collected in plain tubes containing 3.2% sodium citrate, mixed at a ratio of 9:1, and centrifuged at 3000g for 20 minutes at 4°C. The euglobulin fraction was prepared by acidification of 1:10 diluted plasma to pH 5.9 with 0.25% (vol/vol) glacial acetic acid at 4°C, which was then centrifuged at 500g at 4°C for 10 minutes. The supernatant was discarded. The euglobulin precipitate was resuspended in an EDTA-gelatin-barbital buffer (pH 7.8), and 30 mL of each sample were placed in identical depressions in a fibrin-agarose plate. Next, 10 mL of a 1.5 mg/mL bovine fibrinogen solution in Barbital buffer (50mM sodium barbital, 90mM NaCl, 1.7mM CaCl₂, and 0.7mM MgCl₂, pH 7.75) and 10 mL of a 1% agarose solution were brought to 45°C in a water bath, and 10 NIH units of thrombin (250 NIH units/mL) were then added into the agarose solution. The fibrinogen and agarose solutions were mixed in a 140-mm Petri dish and kept at room temperature for 2 hours to form fibrin clots. Enzymes were dissolved and diluted to the appropriate concentration in Barbital buffer. Each enzyme solution (10 mL) was dropped into a hole preformed on the fibrin plate. The plate was incubated at 37°C for 18 hours.

The zone of lysis on the fibrin plate (fibrinolytic activity) was measured using Area Manager (Ruka International).

Statistical analyses

All data are presented as means \pm SEM. Student *t* tests were performed. *P* < .05 was considered significant.

Results

Ischemia is associated with increased expression of PAI-1 in ischemic muscle tissue

Because oxygen deprivation, such as that which occurs during tissue ischemia, can tip the natural anticoagulant/procoagulant balance,²⁰ in the present study, we investigated whether the fibrinolytic factors are present within ischemic gastrocnemius muscle tissues. An increase in *PAI-1*, *uPA*, and *tPA* mRNA expression, as determined using quantitative PCR (Figure 1A-C), and an increase in PAI-1 protein and activity, as determined by Western blotting and reverse fibrin zymography, respectively (Figure 1D-E), were detected in ischemic muscle tissues from HL ischemia-induced mice compared with nonischemic controls. These results demonstrated that ischemia increased ischemic muscle PAI-1 activity and simultaneously augmented local fibrinolytic activity.

We next evaluated the effects of administration of the PAI-1 inhibitor TM5275 on fibrinolytic factor release into the circulation. The PAI-1 inhibitor TM5275 (hereafter referred to as the PAI-1 inhibitor) is an effective novel oral drug that inhibits PAI-1 by preventing binding of PAI-1 to tPA.¹⁸ Both active and latent forms of PAI-1 can circulate.²⁰ PAI-1 inhibits tPA and uPA and PAI-1 is usually present in excess over tPA in plasma. In the present study, PAI-1 inhibitor treatment administered daily from days 0-6 blocked the systemic increase in active PAI-1 in plasma (Figure 1F) and augmented plasma tPA (Figure 1G) and plasmin levels during HL-ischemic recovery (Figure 1H). When the PAI inhibitor treatment was suspended, plasma tPA and plasmin levels returned gradually to baseline levels in 14-21 days. These data indicate that PAI inhibition during ischemic recovery creates a fibrinolytic state.

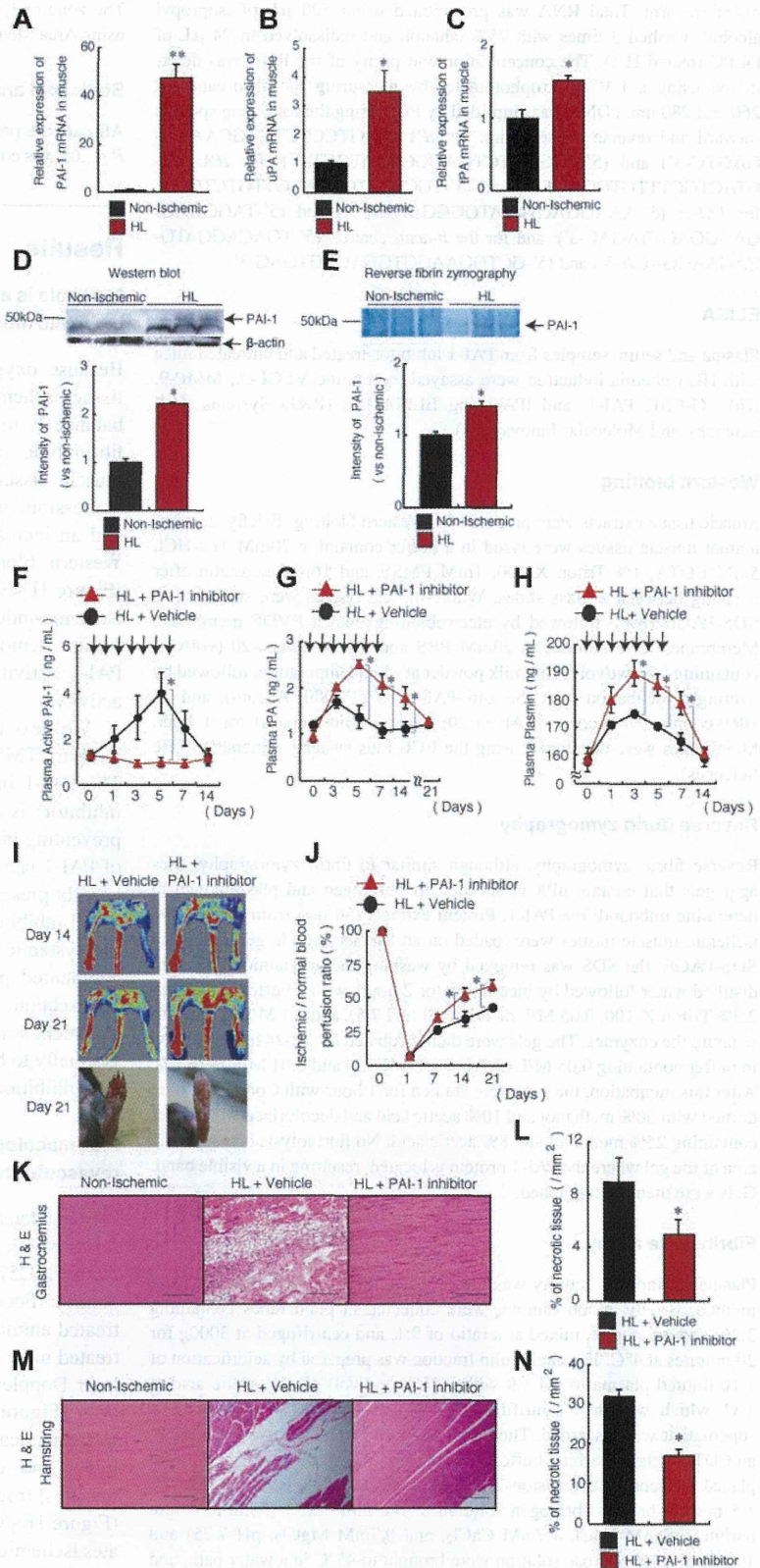
Pharmacologic targeting of PAI-1 promotes ischemic revascularization and tissue regeneration.

We next determined the consequences of PAI-1 inhibition for tissue regeneration after HL ischemia induction by treating ischemia-induced C57BL6/C mice with the PAI-1 inhibitor or vehicle control. Foot digit necrosis was prevented in PAI-1 inhibitor-treated animals (Figure 1I). The ischemic limb of PAI-1 inhibitor-treated mice displayed faster perfusion recovery, as determined by laser Doppler perfusion image analysis, than vehicle-treated controls (Figure 1I-J). Smaller areas of necrosis were detected in histochemically stained ischemic muscle tissue sections of the lower and upper limb (ie, the gastrocnemius and hamstring muscles) from PAI-inhibitor treated than from vehicle-treated mice (Figure 1K-N). These data demonstrate that PAI inhibition accelerates ischemic tissue recovery.

Endogenous tPA and MMP-9 are required for the tissue-regenerative effects observed after PAI inhibition

We reported previously that the fibrinolytic factor tPA promotes angiogenesis and tissue regeneration in HL-ischemic tissue, which

Figure 1. PAI-1 inhibition improves HL-ischemic tissue regeneration. (A-E) C57BL/6 mice were HL treated and gastrocnemius muscles were analyzed on day 1. (A-C) Quantitative RT-PCR analysis of the mRNA expression of *PAI-1* (A), *tPA* (B), and *tPA* (C) in nonischemic and HL-ischemic muscle tissue using β -actin as an internal control ($n = 3$ /group for all experiments). (D-E) Homogenates of ischemic and nonischemic tissues that were harvested on day 1 after HL-ischemia induction in 3 different C57BL/6 mice were assayed for murine PAI-1 protein by Western blot analysis (D) or for PAI activity by reverse fibrin zymography (E). Densitometric analysis is shown (bottom). (F-N) HL ischemia was induced in C57BL/6 mice, followed by oral administration of the PAI-1 inhibitor or vehicle given daily from days 0-6. Arrows indicate when the PAI inhibitor was administered. Plasma levels of active PAI-1 (F), tPA (G), and plasmin (H) were assayed in PAI-1- or vehicle-treated HL-ischemic mice by ELISA ($n = 7$ /group for PAI-1 and tPA; $n = 6$ /group for plasmin). (I-J) Representative macroscopic images (I) and the limb perfusion ratio (ischemic/nonischemic; J) of ischemic limbs after HL-ischemia induction. Macroscopic evaluation of the limbs on day 21 (I, bottom) shows foot-digit necrosis only in HL + vehicle-treated animals ($n = 5$ /group). (K-N) Muscle sections of a nonischemic limb and of gastrocnemius (K-L) and hamstring muscles (M-N) of the ischemic limbs from treated mice were stained with H&E (after 21 days; scale bars, 200 μ m; K,M) and necrotic areas were evaluated ($n = 4$ for vehicle group; $n = 3$ for PAI-1 inhibitor group; L,N). Data represent means \pm SEM. * $P < .05$; ** $P < .001$.



requires the up-regulation of MMP-9.¹⁹ In the present study, we found that PAI-1 inhibitor treatment during ischemic recovery augmented fibrinolytic activity in blood samples from tPA^{+/+} mice, but not from tPA^{-/-} mice (Figure 2A), and augmented MMP-9

plasma levels during HL-ischemic recovery in tPA^{+/+} mice compared with vehicle-treated tPA^{+/+} mice, suggesting that increased tPA and MMP-9 may mediate the observed effects of PAI-1 (Figure 2B). No change in MMP-9 plasma levels was observed in

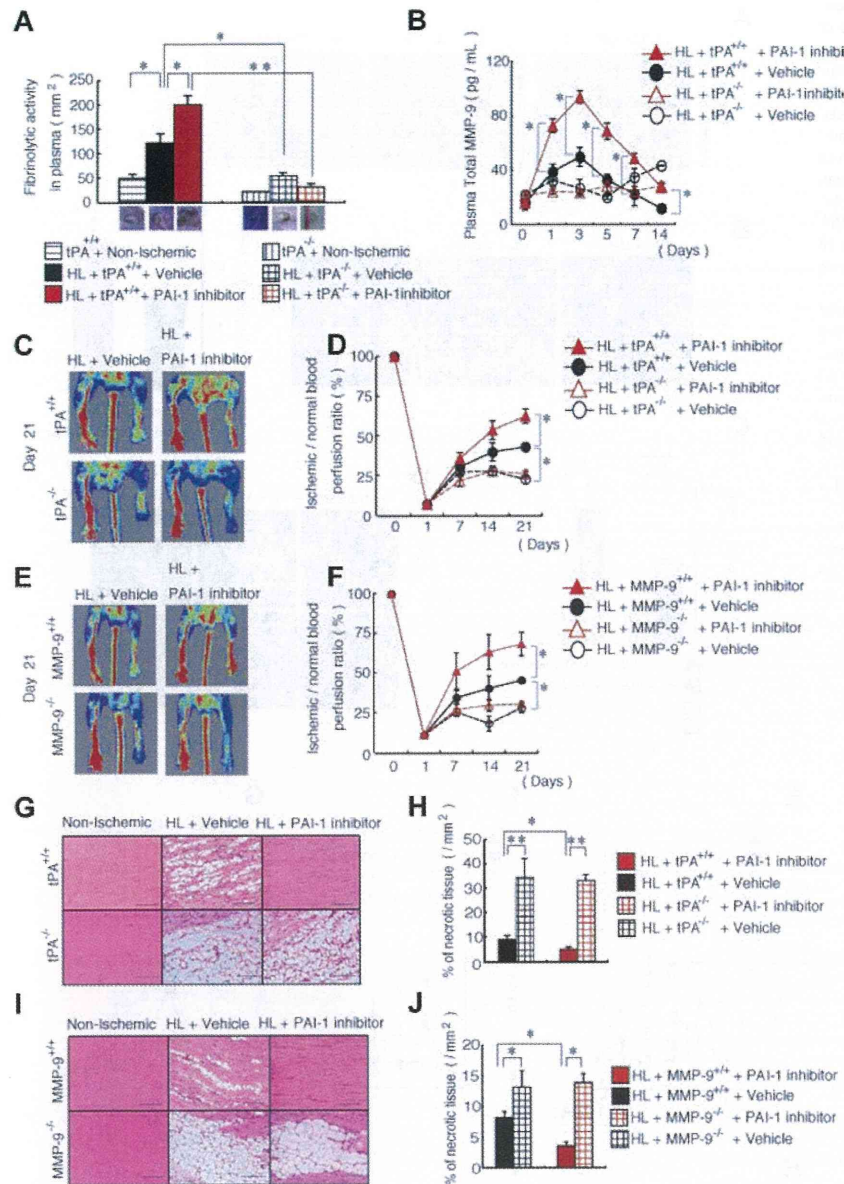


Figure 2. Improved ischemic tissue regeneration after PAI-1 inhibitor treatment depends on tPA and MMP-9. (A–J) HL ischemia was induced in tPA^{+/+}, tPA^{-/-}, MMP-9^{+/+}, and MMP-9^{-/-} mice and the mice were then treated with or without PAI-1 inhibitor daily from days 0–6. (A) Fibrinolytic activity in plasma samples of HL-ischemia-induced tPA^{+/+} and tPA^{-/-} mice was analyzed on day 1 using a fibrin plate assay (n = 3/group). (B) MMP-9 plasma levels were determined in tPA^{+/+} and tPA^{-/-} mice treated with the PAI-1 inhibitor or with vehicle by ELISA (n = 9 for tPA^{+/+} mice; n = 3 for tPA^{-/-} mice). (C,E) Representative images of limb perfusion analyzed using a laser Doppler. (D,F) The limb perfusion ratio (ischemic/nonischemic) over time of tPA^{+/+} and tPA^{-/-} mice (D) and MMP-9^{+/+} and MMP-9^{-/-} mice (F) treated with the PAI-1 inhibitor or with vehicle (n = 3/group). (G–J) Necrotic areas in sections of H&E-stained muscle sections (G,I) from untreated and PAI-1 inhibitor-treated ischemic limbs (scale bars, 200 μm). (H,J) Necrotic areas in ischemic muscle tissue sections were evaluated after 21 days (n = 3/group). Data represent means ± SEM. *P < .05; **P < .01.

HL-ischemia-induced tPA^{-/-} mice treated with vehicle or with the PAI-1 inhibitor (Figure 2B).

We next determined whether endogenous tPA and MMP-9 mediate the improved tissue regeneration that is observed after PAI-1 inhibitor treatment. Indeed, PAI-1 inhibitor treatment resulted in faster blood flow recovery in the ischemic limbs of wild-type mice compared with vehicle-treated wild-type mice, but such enhancement was not observed in tPA^{-/-} mice or MMP-9^{-/-} mice (Figure 2C–F). Ischemic tissue sections from PAI-1 inhibitor-treated tPA^{-/-} and MMP-9^{-/-} mice showed vast areas of necrotic tissue compared with PAI-1 inhibitor-treated tPA^{+/+} and MMP-9^{+/+} mice (Figure 2G–J). These data indicate that endogenous tPA and MMP-9 are required for the tissue-regeneration-promoting effects of PAI-1 inhibition.

PAI-1 inhibition improves tPA-dependent ischemic revascularization

PAI-1 inhibitor treatment resulted in faster collateral vessel growth, which was observed macroscopically (Figure 3A) and

microscopically after VWF staining in the ischemic limb of C57BL/6 mice (Figure 3B) and in the ischemic limb of tPA^{+/+} mice compared with vehicle-treated mice (Figure 3C–D), but did not show such enhancement in the ischemic limb of tPA^{-/-} mice. We have shown previously that tPA treatment increases VEGF-A plasma levels and that tPA administration can promote myeloid-cell expansion by MMP-9-mediated release of KitL from stromal/niche cells.¹⁹ Indeed, augmented plasma levels of VEGF-A (Figure 3E) and KitL (Figure 3F) were found in PAI-1 inhibitor-treated HL-ischemic tPA^{+/+} mice, but not in PAI-1 inhibitor-treated tPA^{-/-} mice. Furthermore, G-CSF, a cytokine known to stimulate BM granulopoiesis, was also increased after PAI-1 inhibitor treatment in HL-ischemic mice in a MMP-9- and tPA-dependent manner (Figure 3G–H). In addition, recombinant tPA administration augmented G-CSF serum levels in normoxic C57BL/6 mice (Figure 3I). These data indicate that PAI-1 inhibition during ischemic recovery augments both angiogenic and hematopoietic factors.