

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

(早期・探索的臨床試験分野)

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 澤 芳 樹

平成25（2013）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研究 澤 芳樹	1
--------------------------------------	---

## II. 分担研究報告

1. 骨髄間葉系幹細胞血中動員因子を用いた末梢循環不全に伴う難治性皮膚潰瘍治療薬開発 玉井 克人	7
2. 血管新生作用を有する新規ペプチドの虚血性潰瘍への応用 中神 啓徳	9
3. 左室補助人工心臓（LVAD）を装着した拡張型心筋症に対する液性免疫異常の解明と アフエレーシス治療の確立 澤 芳樹 ・ 吉岡 大輔	11
4. ドラッグデリバリーシステムを用いた急性心筋梗塞治療薬の開発 南野 哲男 ・ 松崎 高志	13
5. オキシム誘導体徐放性マイクロスフェア（ON0-1301MS）製剤の重症心不全への適応 宮川 繁	25
6. 慢性心不全治療薬としてのHGFプラスミドの開発 澤 芳樹・宮川 繁・森下 竜一	29

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
---------------------	----

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

# 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研究

研究代表者 澤 芳樹 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用いた末梢循環不全に伴う難治性皮膚潰瘍治療薬開発
2. 血管新生作用を有する新規ペプチドの虚血性潰瘍への応用
3. 左室補助人工心臓（LVAS）を装着した拡張型心筋症に対する液性免疫異常の解明とアフエレーシス治療の確立
4. ドラッグデリバリーシステムを用いた急性心筋梗塞治療薬の開発
5. オキシム誘導体徐放性マイクロスフェア（ONO-1301MS）製剤の重症心不全への適応
6. 慢性心不全治療薬としてのHGFプラスミドの開発

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。

### [研究分担者]

松村 泰志	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・千葉大学・福井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・講師
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・ 特任准教授
齋藤充弘	大阪大学医学部附属病院・講師
平 将生	大阪大学医学部附属病院・助教
中谷大作	大阪大学大学院医学系研究科・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用いた末梢循環不全に伴う難治性皮膚潰瘍治療薬開発

損傷組織が放出するhigh mobility group box 1 (HMGB1) 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、HMGB1の骨髄間葉系幹細胞遊走活性ドメインペプチドを用いた末梢循環不全性皮膚潰瘍治療薬開発を進めた。

### 2. 血管新生作用を有する新規ペプチドの虚血性潰瘍への応用

血管新生作用と抗菌活性を併せ持つ新規ペプチド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) の測定が難しいことが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、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 (SRペプチド) を作成した。

### 3. 左室補助人工心臓 (LVAD) を装着した拡張型心筋症に対する液性免疫異常の解明とアフエレーシス治療の確立

拡張型心筋症 (DCM) の原因の一つとして自己免疫性応答異常があげられており、特に抗心筋抗体による心筋障害が報告されている。この抗心筋抗体陽性のDCM症例において、アフエレーシス療法により心筋抗体を透析除去することで、心機能が改善されることが報告されているが、LVAD (Left Ventricular Assist Device/左室補助人工心臓) を必要とするような重症DCMにおいては報告がないのが現状である。

2011年4月に植込型のLVADが保険償還され、LVAD装着症例は急速に増加しつつある。我々は、LVAD装着により循環動態が安定するため、非装着者よりも安全にアフエレーシス治療が可能であると考え、「LVADを装着した患者を対象にアフエレーシス治療による心機能の改善を目指す」初の研究を行う。

### 4. ドラッグデリバリーシステムを用いた急性心筋梗塞治療薬の開発

急性心筋梗塞発症数は過去30年間に3倍に増加し

ている。繰り返して入院加療が必要な梗塞後心不全患者が増加しており、国民医療費増大の一因となっている。そのため、梗塞後心不全進展を抑制する治療法の開発は重要なアンメットニーズである。我々は、分担研究者が代表研究者を務めた、厚生労働科研医療機器開発推進研究事業「ナノサイズリポソームを用いた急性心筋梗塞治療法の開発」で、ナノサイズリポソームが障害心筋へ特異的に集積し、リポソームに封入された心保護薬の薬効増強と副作用軽減することを世界に先駆けて見出した。本技術を用い、ラット心筋梗塞モデルにおいて、低用量リポソーム製剤による心筋梗塞サイズ縮小増強効果を確認した。そこで本研究では、リポソーム製剤を新規心筋梗塞治療薬としてアカデミア創薬することを目指し、平成24年度末までに、薬効薬理試験、薬物動態試験、製剤最適化を終了し、阪大病院薬剤部内でGMPLリポソーム製造装置を稼働した。

### 5. オキシム誘導体徐放性マイクロスフェア (ONO-1301MS) 製剤の重症心不全への適応

重症心不全患者の根本治療は心臓移植であるが、臓器移植法改定後においてもドナーの絶対的不足状態は変わらない。現在重症心不全患者には、埋め込み型補助人工心臓 (LVAD) が実施されているが、社会復帰には尚、問題点が多い。また、長期培養を有する自己細胞移植療法は、汎用性および緊急使用の面で問題点も多い。これらに代わり、治療効果が高く、細胞培養を不要 (セルフリー) とする、低分子合成化合物の製剤化による心臓移植・LVAD装着の回避、およびLVAD離脱を目指した心臓の再生医療への期待は大きい。

### 6. 慢性心不全治療薬としてのHGFプラスミドの開発

大阪大学で発見された HGF\*プラスミド (\*ヒト肝細胞増殖因子/hepatocyte growth factor:HGF) は、各種の心不全モデル動物に対して、抗線維化作用、心筋細胞に対する抗アポトーシス作用、血管新生作用による心機能改善効果が認められている。今回我々は、この HGF プラスミドの臨床での安全性の確認と POC の取得を目標に、拡張型心筋症、拡張相肥大型心筋症、および虚血性心筋症を基礎疾患とする慢性心不全を対象として、開胸下で HGF プラスミドを心筋へ直接注入投与する医師主導治験を計画している。

## (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用いた末梢循環不全に伴う難治性皮膚潰瘍治療薬開発

HMGB1 の骨髄間葉系幹細胞血中動員活性ドメインペプチドのアミノ酸配列を改変し、より血中で安定的に作用して間葉系幹細胞を血中動員するペプチドを得るための最適化作業を進めた。

### 2. 血管新生作用を有する新規ペプチドの虚血性潰瘍への応用

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。SR ペプチドの薬理薬効試験において創修復作用の促進を認めた。現在、治験に向けた非臨床試験を遂行中である。

### 3. 左室補助人工心臓 (LVAS) を装着した拡張型心筋症に対する液性免疫異常の解明とアフエレーシス治療の確立

国内企業(旭化成クラレメディカル(株))から選択式血漿成分吸着器として AMT-0902-1(製品名:イムソーバ TR)を購入し、LVAD 装着者のうち、DCM 患者に対し FIH を実施し、心抑制性心筋抗体との関連も検討する。

この治療により、LVAD 装着の重症 DCM 患者の心機能の改善、機能維持が図られ、心移植までの待機期間におけるリスクの軽減や、なかには LVAD からの離脱が可能な症例を検討し、及び患者の QOL の向上、医療費の抑制などを図ると共に、データ集積の中で、液性免疫異常の解明も進めつつ、重症心不全治療の新たな選択肢を確立することを目指す。

### 4. ドラッグデリバリーシステムを用いた急性心筋梗塞治療薬の開発

GMP リポソーム製造装置で製造するリポソーム製剤のロット間の均一性試験を行った。また、薬効薬理試験の用量を基に、リポソーム製剤を用いた安全性薬理試験・毒性試験を GLP で実施した。この間に、GCP に準拠した治験計画書類の準備を進め、平成 27 年度に大阪大学 IRB へ提出、同 12 月に PMDA へ治験届けを提出し、医師主導治験の準備完了を目指す。

### 5. オキシム誘導体徐放性マイクロスフェア(ONO-1301MS) 製剤の重症心不全への適応

低分子合成化合物であるオキシム誘導体の徐放性製剤(ONO-1301MS)を、心臓に直接投与(心筋内投与および心臓表面に貼付)することにより、各種内因性修復因子(HGF、VEGF、IGF-1、SDF-1等)が産生促進される。その結果、骨髄細胞から梗塞部へ修復細胞が誘導されることにより、心機能の改善等に有効性があることを、各種重症心不全(虚血性心筋症および拡張型心筋症)モデルにおいて確認した。今後は、臨床予定投与ルート(ゼラチンシートにONO-1301MSを吸収させ心臓梗塞部に貼付)での、ブタ虚血心筋症(OMI)モデルにおける有効性を確認した後、非臨床試験項目を決定・実施し、平成 26 年度秋頃に First in human 試験を開始する予定である。

### 6. 慢性心不全治療薬としての HGF プラスミドの開発

本薬は遺伝子治療用医薬品であり治験の開始に先立って「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について」への適合について厚生労働省への確認申請が必要である。この確認申請用書類の内、臨床部分の概要案は作成を完了、続いて安全性非臨床部分の完成を目指している。これと並行して PMDA 薬事戦略相談の書類準備も行っている。各種書類の準備を進め、臨床試験デザインの詳細について検討をしながら、本事業期間中の平成 26 年 7 月の医師主導治験の開始に向け、体制を整備中である。

## 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用いた末梢循環不全に伴う難治性皮膚潰瘍治療薬開発

幹細胞血中動員ペプチドの最適化を進め、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の虚血性潰瘍への応用

安全性試験を終了し、治験に向けた非臨床試験を実施中である。

### 3. 左室補助人工心臓 (LVAS) を装着した拡張型心筋症に対する液性免疫異常の解明とアフエレーシス治療の確立

DCM患者に対しFIHを実施し、心抑制性心筋抗体との関連も検討する予定である。

### 4. ドラッグデリバリーシステムを用いた急性心筋梗塞治療薬の開発

非臨床のデータ集積を積極的に実施した。平成27年度に、医師主導治験の準備完了を目指す。

### 5. オキシム誘導体徐放性マイクロスフェア (ONO-1301MS) 製剤の重症心不全への適応

非臨床のデータ集積を積極的に実施した。平成26年度にFirst in human試験を開始する予定である。

### 6. 慢性心不全治療薬としてのHGFプラスミドの開発

臨床試験デザインの詳細について検討し、平成26年度の医師主導治験の開始に向け、体制を整備中である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Saga K, Tamai K, Yamazaki T, Kaneda Y. Systemic Administration of a Novel Immune-Stimulatory Pseudovirion Suppresses Lung Metastatic Mmelanoma by Regionally Enhancing IFN- $\gamma$  Production. Clin Cancer Res. 19:668-679,2013
- Kotani M, Kikuta J, Klauschen F, Chino T, Kobayashi Y, Yasuda H, Tamai K, Miyawaki A, Kanagawa O, Tomura M, Ishii M. Systemic Circulation and Bone Recruitment of Osteoclast Precursors Tracked by Using Fluorescent Imaging Techniques. J. Immunol. 190:605-612,2013
- Endo M, Zoltick PW, Radu A, Qiujie J, Matsui C, Marinkovich PM, McGrath J, Tamai K, Uitto J, Flake AW. Early intra-amniotic gene transfer using lentiviral vector improves skin blistering phenotype in a murine model of Herlitz junctional epidermolysis bullosa. Gene Ther. 2012 May;19(5):561-569,2012
- Hayashi H, Nakagami H, Takeichi M, Shimamura M, Koibuchi N, Oiki E, Sato N, Koriyama H, Mori M, Gerardo Araujo R, Maeda A, Morishita R, Tamai K, Kaneda Y. HIG1, a novel regulator of mitochondrial  $\gamma$ -secretase, maintains normal mitochondrial function. FASEB J. 26:2306-2317,2012
- 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 Jul;16(7):1629-1639
- T. Shirasaka, S. Miyagawa, S. Fukushima, A. Saito, M. Shiozaki, N. Kawaguchi, N. Matsuura, S. Nakatani, Y. Saki, T. Daimon, Y. Okita, Y. Sawa A slow-releasing form of prostacyclin agonist(ONO1301SR) enhances endogenous secretion of multiple cardiotherapeutic cytokines and improves cardiac function in a rapid-pacing-induced model of canine heart failure The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery (In press)2013
- Ishii T, Asai T, Oyama D, Agato Y, Yasuda N, Fukuta T, Shimizu K, Minamino T, Oku N. Treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury with PEGylated liposomes encapsulating FK506. FASEB Journal. Vol.27:1362-1370,2013
- Takahama H, Shigematsu H, Asai T, Matsuzaki T, Sanada S, Fu HY, Okuda K, Yamato M, Asanuma H, Asano Y, Asakura M, Oku N, Komuro I, Kitakaze M, Minamino T. Liposomal Amiodarone Augments Anti-arrhythmic Effects and Reduces Hemodynamic Adverse Effects in an Ischemia/Reperfusion Rat Model. Cardiovasc Drugs Ther. Vol.27:125-132,2013

## 2. 学会発表

- 1) 中神 啓徳、「Angiogenic Peptide, AG30, for the Development of Novel Therapeutic Agents」第20回日本血管生物医学会学術集会、2012. 12. 6、徳島＜シンポジウム＞
- 2) Hironori Nakagami 「Modification of a novel angiogenic peptide, AG30, for the development of novel therapeutic agents」The 17th International Vascular Biology Meeting 2012、2012. 6. 4、Wiesbaden, Germany
- 3) イヌOMIモデル；MS心臓貼付とネット併用（AHA2012発表）
- 4) ラットMCT誘発肺高血圧症モデル；MS静注（AHA2012発表）

出願番号：特願2012-238017

- 8) 名称：HGF遺伝子からなる医薬  
出願番号：PCT/JP96/02359  
出願日： 1996年8月22日  
出願人(権利者)：アンジェスMG株式会社
- 9) 名称：心筋症遺伝子治療  
出願番号：PCT/JP/06947  
出願日： 2000年10月5日

## H. 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  
PCT 出願番号：PCT/JP2012/059113  
国際出願日：平成24年4月3日
- 2) 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
- 3) 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）
- 4) 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
- 5) 発明の名称：炎症性疾患治療用医薬組成物  
出願番号：特願2012-117077  
出願日：平成24年5月23日
- 6) 名称：ONO-1301MS心臓貼付法&ネット併用；  
出願番号：特願2012-208799
- 7) 名称：ONO-1301MS肺高血圧症



## Ⅱ. 分担研究報告

## 骨髄間葉系幹細胞血中動員因子を用いた末梢循環不全に伴う難治性皮膚潰瘍治療薬開発

研究分担者 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 high mobility group box 1 (HMGB1) 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、HMGB1 の骨髄間葉系幹細胞遊走活性ドメインペプチドを用いた末梢循環不全性皮膚潰瘍治療薬開発を進めている。平成 24 年度は、HMGB1 の骨髄間葉系幹細胞血中動員活性ドメインペプチドのアミノ酸配列を改変し、より血中で安定的に作用して間葉系幹細胞を血中動員するペプチドを得るための最適化作業を進めた。

### A. 研究目的

我々は、生体内損傷組織から放出される HMGB1 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世界で初めて明らかにした。この活性を利用して HMGB1 を創薬化することにより、損傷組織に間葉系幹細胞を集積させて、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可能になると期待される。

昨年度に我々は HMGB1 の骨髄間葉系幹細胞血中動員活性ドメインを同定し、そのドメインを含む化学合成ペプチドの血中動員活性を評価すると共に、GLP 非臨床試験実施計画書を作成した。平成 24 年度は、臨床試験に用いる最終候補化合物を決定する目的で、で種々のアミノ酸欠失変異体、置換変異体、修飾変異体を作製し、それらの骨髄間葉系幹細胞血中動員活性を比較検討した。

### B. 研究方法

HMGB1 ペプチド医薬の最適化を進める為に、種々の変異体（欠失、置換、修飾）を作製した。それぞれの変異体または野生型ペプチドを PBS 溶解し、C57BL6 マウス（8 週齢雄）の尾静脈より 50  $\mu$ g/100  $\mu$ l 濃度の PBS 溶液 200  $\mu$ l (100  $\mu$ g) 投与し、種々の時間経過で末梢血を採血したのち、間葉系幹細胞マーカーである PDGFR $\alpha$  および CD106 陽性、白血球マーカー CD45 陰性、赤芽球マーカー CD119 陰性を指標にして骨髄間葉系幹細胞の血中動員活性を、フローサイトメトリーを用いて評価した。

一方、糖尿病モデルマウス (db/db マウス) 背部皮膚に潰瘍を作製し、骨髄間葉系幹細胞血中動員活性が確認されたペプチドを尾静脈より 100  $\mu$ g 連日 5 日間投与した後、経時的に潰瘍面積を測定すると共に、ドップラー血流計を用いた血流改善効果、組織学的検討による癒痕抑制効果を検討した。さらに、潰瘍周囲皮膚を採取して RNA を抽出し、間葉系幹細胞が放出することが知られている血管新生促進因子 VEGF 遺伝子発現をリアルタイム PCR により検討した。

### （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

HMGB1 の骨髄間葉系幹細胞血中動員活性ペプチド変異体を用いてマウス静脈内に投与し、末梢血中の間葉系幹細胞 (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>/CD106<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/Ter119<sup>-</sup>) を定量的に評価した。その結果、特定のアミノ酸置換および修飾を持つ HMGB1 ペプチド投与により、血中間葉系幹細胞数の有意な上昇が得られた（特許出願準備中）。

間葉系幹細胞の血中動員活性を確認したペプチドを糖尿病性潰瘍モデルマウスに投与した結果、潰瘍面積についてはコントロール群と有意な差は認められなかったものの、ドップラー血流計によりコントロールに比較して血流改善効果が認められた。また、ペプチド投与マウスの潰瘍周囲皮膚における

VEGF発現がコントロールに比較して上昇することが示された。さらに、組織学的検討により、ペプチド投与群ではコントロール群と比較して創部の癒痕抑制効果が認められた。

#### D. 考察

平成24年度の研究により、HMGB1の骨髄間葉系幹細胞血中動員活性に寄与するドメイン構造の詳細が明らかとなり、この情報を利用したHMGB1ペプチドの医薬としての最適化が可能となった。ドメイン構造内の複数のアミノ酸欠失、置換、修飾を行った結果、特定のアミノ酸変異によりペプチドの血清内における安定性が向上し、マウス静脈内投与時の間葉系幹細胞血中動員活性が向上した。

一方、糖尿病モデルマウスに対する薬効としては、潰瘍縮小促進効果よりもむしろ、血流改善、癒痕抑制といった、機能的再生促進効果が観察された。マウス皮膚潰瘍は上皮化する以前に癒痕拘縮により縮小することが良く知られている。一方骨髄由来間葉系幹細胞は、抗炎症因子や蛋白分解酵素などの放出を介して線維化抑制効果を発揮することが知られており、HMGB1ペプチド投与により潰瘍部に集積した間葉系幹細胞が癒痕形成を抑制的に制御したため、癒痕拘縮が抑制された結果、コントロールと比較して有意な潰瘍面積縮小効果が得られなかった可能性がある。今後、癒痕拘縮の少ないブタなどを用いた薬効試験が必要であると考えられる。

平成25年度には、最適化したHMGB1ペプチドを利用して非臨床試験を実施し、有効性と共に安全性を確認する予定である。

#### E. 結論

骨髄間葉系幹細胞血中動員活性を指標にHMGB1ペプチドの最適化作業をすすめた。同時に、糖尿病性マウス潰瘍モデルを用いて薬効の確認作業を進め、機能的組織再生促進作用を持つことを確認した。

#### F 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Saga K, Tamai K, Yamazaki T, Kaneda Y. Systemic Administration of a Novel Immune-Stimulatory Pseudovirion Suppresses Lung Metastatic Melanoma by Regionally Enhancing IFN- $\gamma$  Production. Clin Cancer Res. 19:668-679,2013
2. Kotani M, Kikuta J, Klauschen F, Chino T, Kobayashi Y, Yasuda H, Tamai K, Miyawaki A,

Kanagawa O, Tomura M, Ishii M. Systemic Circulation and Bone Recruitment of Osteoclast Precursors Tracked by Using Fluorescent Imaging Techniques. J. Immunol. 190:605-612,2013

3. Endo M, Zoltick PW, Radu A, Qiu J, Matsui C, Marinkovich PM, McGrath J, Tamai K, Uitto J, Flake AW. Early intra-amniotic gene transfer using lentiviral vector improves skin blistering phenotype in a murine model of Herlitz junctional epidermolysis bullosa. Gene Ther. 2012 May;19(5):561-569.
4. Hayashi H, Nakagami H, Takeichi M, Shimamura M, Koibuchi N, Oiki E, Sato N, Koriyama H, Mori M, Gerardo Araujo R, Maeda A, Morishita R, Tamai K, Kaneda Y. HIG1, a novel regulator of mitochondrial  $\gamma$ -secretase, maintains normal mitochondrial function. FASEB J. 26:2306-2317,2012

##### 2. 学会発表

特になし。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

##### 1. 名称：

組織再生を誘導するためのペプチドとその利用

PCT 出願番号：PCT/JP2012/059113

国際出願日：平成 24 年 4 月 3 日

## 血管新生作用を有する新規ペプチドの虚血性潰瘍への応用

研究分担者 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・千葉大学・  
福井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、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（SR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。SRペプチドの薬理薬効試験において創修復作用の促進を認めた。現在、治験に向けた非臨床試験を遂行中である。

### 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を用いた難治性皮膚潰瘍治療薬の開発

### B. 研究方法

SRペプチドの非臨床試験として、薬効薬理試験と翌年以降の毒性試験のためのペプチドの分析法・測定系の確立と薬効動態試験を行った。

薬効薬理試験としては、糖尿病ラットの全層皮膚欠損モデルとラット感染創モデルの2つの実験系で評価を行った。

一方、GLP試験を行うために必要なペプチドの分析バリデーション・特性試験・安定性試験を実施した。

薬物動態試験としてLC-MS/MSを用いたMRM（Multiple Reaction Monitoring）でのSRペプチドの測定法を確立した。次に、ラット血漿及び皮下組織中SR-0379の濃度測定法の確立及びSR-0379濃度測定を行った。

また、SRペプチドの作用メカニズムの解析として、ヒト皮膚培養線維芽細胞を用いて細胞内情報伝達系を解析・検討した。

#### （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

SRペプチドは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。さらに、ヒト皮膚培養線維芽細胞の増殖活性を有し、その細胞内情報伝達系の解析ではphosphoinositide 3-kinase/Akt/mTOR経路が活性化されていることを見出した。

薬効薬理試験においては、ストレプトゾトシン投与によるラット糖尿病モデルでの全層皮膚欠損モデルにおいて、SR-0379投与群では全層欠損作製直後に対照群で認められている全層欠損部位の増大は認められず、創面積はSR-0379投与群にて対照群と比較して有意に縮小した。また、ラットに黄色ブドウ球菌を感染させたモデルにおいて対照群と比較して、有意な創面積の縮小効果が確認された。

薬物動態試験では LC/MS/MS を用いたペプチドの測定法を確立し、5 ng/ml からの微量測定可能な検出系を確立した。吸収に関する試験として、ラット（正常皮膚、全層欠損）に SR-0379 を単回経皮投与した際の血漿中濃度は、すべての時点で定量下限値未満（5 ng/mL）であり、SR-0379 の滴下では、循環血中への経皮吸収性は認められなかった。ラット（全層欠損）に SR-0379 を単回経皮投与した際の皮下組織中濃度は、投与後 30 分で 13100 ng/g tissue となり、投与後 24 時間で 254 ng/g tissue であった。ラットに SR-0379 を 200  $\mu$ g/kg の投与量で単回静脈内投与した際、血漿中消失半減期は 4.8 分であった。

次年度以降のGLPでのラットでの毒性試験に向けた分析バリデーション・安定性試験なども終了した。

#### 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ができ、薬物動態試験においても半減期が約5分と概ね予想通りのプロファイルを示した。薬理薬効試験・薬物動態試験を終了し、次年度以降の毒性試験の準備を進めている。

#### 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、SRペプチドを合成

し難治性皮膚潰瘍治療の治験に向けた非臨床試験を進めている。

#### 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 Jul;16(7):1629-1639

##### 2. 学会発表

中神 啓徳、「Angiogenic Peptide, AG30, for the Development of Novel Therapeutic Agents」第20回日本血管生物医学学会学術集会、2012.12.6、徳島<シンポジウム>

Hironori Nakagami 「Modification of a novel angiogenic peptide, AG30, for the development of novel therapeutic agents」The 17th International Vascular Biology Meeting 2012、2012.6.4、Wiesbaden, Germany

#### 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

##### 1. 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

##### 2. 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）

##### 3. 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

## 左室補助人工心臓（LVAD）を装着した拡張型心筋症に対する 液性免疫異常の解明とアフエレーシス治療の確立

研究分担者（研究代表者） 澤 芳樹 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究協力者 吉岡 大輔 大阪大学大学院医学系研究科 寄附講座助教

### 〔研究要旨〕

拡張型心筋症（DCM）の原因の一つとして自己免疫性応答異常があげられており、特に抗心筋抗体による心筋障害が報告されている。この抗心筋抗体陽性の DCM 症例において、アフエレーシス療法により心筋抗体を透析除去することで、心機能が改善されることが報告されているが、LVAD（Left Ventricular Assist Device/左室補助人工心臓）を必要とするような重症 DCM においては報告がないのが現状である。

2011 年 4 月に植込型の LVAD が保険償還され、LVAD 装着症例は急速に増加しつつある。我々は、LVAD 装着により循環動態が安定するため、非装着者よりも安全にアフエレーシス治療が可能であると考え、「LVAD を装着した患者を対象にアフエレーシス治療による心機能の改善を目指す」初の研究を行う。具体的には国内企業（旭化成クラレメディカル（株））から選択式血漿成分吸着器として AMT-0902-1（製品名：イムソーバ TR）を購入し、LVAD 装着者のうち、DCM 患者に対し FIIH を実施し、心抑制性心筋抗体との関連も検討する。

この治療により、LVAD 装着の重症 DCM 患者の心機能の改善、機能維持が図られ、心移植までの待機期間におけるリスクの軽減や、なかには LVAD からの離脱が可能な症例を検討し、及び患者の QOL の向上、医療費の抑制などを図ると共に、データ集積の中で、液性免疫異常の解明も進めつつ、重症心不全治療の新たな選択肢を確立することを目的としている。

### A. 研究目的

拡張型心筋症（DCM）は慢性進行性であることが多く、予後が良くないことから、安定時でも定期的観察、また再び不全症状が出現すると入院及びその後の長期間安静臥床、運動制限などが必要となり、患者及び医療費の負担が大きい。最終的には心移植が必要となる事も多いが、臓器移植改正法案施行後も我が国の移植待機期間は短縮されることなく、その中で 2011 年 4 月に植込型の LVAD（Left Ventricular Assist Device/左室補助人工心臓）が保険償還され、LVAD 装着症例が急速に増加しつつある。この LVAD を装着した患者を対象に、アフエレーシス治療によって心機能の改善を目指す初めての研究である。

重症心不全治療の新たな選択肢としてトリプトファンをリガンドとするアフエレーシス治療が確立され、心移植までの待機期間のリスク軽減、患者の QOL（Quality of Life/生活の質）の向上を図ることを目的とする。

### B. 研究方法

当研究スタート当初は、試験機器である選択式血漿成分吸着器「AMT-0902-1（製品名：イムソーバ TR）」の供与先である国内企業（旭化成クラレメディカル（株））の企業治験を目指していたが、企業の方針が変更となり「LVAD 非装着者を対象に独自に開発をし、承認申請する」こととなり独自の企業治験を開始したため、我々は症例が増えつつある LVAD 装着者のみに対象をしばって臨床研究を行い、データを測定・集積し、上記企業が平成 25 年度後期に予定している当該医療機器の一部変更申請に追加参考資料としてデータを企業に提供する。

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に対して、日本及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。

(対象者選択基準)

- ・特発性拡張型心筋症
- ・心筋抗体を測定している。
- ・NYHA4度以上
- ・標準的心不全治療を3ヶ月以上継続している。
- ・20歳以上

(対象患者除外基準)

- ・二次性心筋症
- ・心移植をうけた者
- ・その他医師が不相当と認めた者

(パイロット臨床研究デザイン)

- ・単群非ランダム化オープン試験
- ・2013年3月以降
- ・被験者数：3名
- ・安全性評価を行う。

(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。

臨床研究において、「臨床研究に関する倫理指針」(厚生労働省)を厳守し、さらに被験者保護を最優先に実施する。

## C. 研究結果

24年度は臨床研究のための実施計画書、同意書の作成や臨床研究開始に向けての体制整備を行った。

平成25年1月7日には学内の「治験外臨床研究医学系研究科医学倫理委員会」の承認を得て、3例の集積を目標に25年3月から治験開始の予定で準備完了していたが、24年度末において対象患者の病態が不安定であるため、開始待ちの状況となっている。

## 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)の多施設共同企業治験では、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。上記は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、LVADが装着された、か

つ心抑制性抗心筋自己抗体の陽性の症例を対象とし、臨床試験開始の準備が整い、患者の組み入れも行っており、対象者の病態安定を待つて開始待ちの状況である。

## E. 結論

LVAD装着のDCM患者10人の血清から、心抑制性心筋自己抗体陽性を示す症例が確認され、選択式血漿成分吸着器「AMT-0902-1(製品名:イムソーバTR)」によるアフエレーシス治療の臨床研究開始を予定している。

## 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

## ドラッグデリバリーシステムを用いた急性心筋梗塞治療薬の開発

研究分担者 南野 哲男 大阪大学大学院医学系研究科 講師  
研究協力者 松崎 高志 大阪大学大学院医学系研究科 特任助教

### [研究要旨]

急性心筋梗塞発症数は過去 30 年間に 3 倍に増加している。繰り返して入院加療が必要な梗塞後心不全患者が増加しており、国民医療費増大の一因となっている。そのため、梗塞後心不全進展を抑制する治療法の開発は重要なアンメットニーズである。我々は、分担研究者が代表研究者を務めた、厚生労働科研医療機器開発推進研究事業「ナノサイズリポソームを用いた急性心筋梗塞治療法の開発」で、ナノサイズリポソームが障害心筋へ特異的に集積し、リポソームに封入された心保護薬の薬効増強と副作用軽減することを世界に先駆けて見出した。本技術を用い、ラット心筋梗塞モデルにおいて、低用量リポソーム製剤による心筋梗塞サイズ縮小増強効果を確認した。そこで本研究では、リポソーム製剤を新規心筋梗塞治療薬としてアカデミア創薬することを目指し、平成 24 年度末までに、薬効薬理試験、薬物動態試験、製剤最適化を終了し、阪大病院薬剤部内で GMP リポソーム製造装置を稼働する。

平成 25 年度は、早期・探索的臨床試験拠点事業で整備した GMP リポソーム製造装置で製造するリポソーム製剤のロット間の均一性試験を行う。また、薬効薬理試験の用量を基に、リポソーム製剤を用いた安全性薬理試験・毒性試験を GLP で実施する。この間に、GCP に準拠した治験計画書類の準備を進め、平成 27 年度に大阪大学 IRB へ提出、同 12 月に PMDA へ治験届けを提出し、医師主導治験の準備完了を目指す。

本事業終了後、早期・探索的臨床試験拠点事業のインフラを利用して、I/II 相試験を開始する予定である。さらに、分担研究者らは、心筋梗塞患者を対象として、先進医療 B を活用した無作為プラセボ対照二重盲検多施設臨床試験（全国 24 施設）を実施中であるが、この GCP に準拠したグローバル治験に対応可能なネットワークを利用して III 相試験を実施する。

本研究の成果は、梗塞後心不全の発症・重症度の軽減につながり、患者 QOL の改善や心不全治療に関する医療費軽減が多いに期待できる。

### A. 研究目的

高齢化や糖尿病・脂質代謝異常患者の増加により、急性心筋梗塞発症数は過去 30 年間に 3 倍に増加している (Takii T, et al. Circ J 2010)。再灌流療法の普及により、急性期死亡率は低下する一方、繰り返し入院が必要な梗塞後心不全患者が著明に増加しており、医療費増大の一因になっている。そのため、慢性期心不全発症を抑制する治療法の開発は重要なアンメットニーズである。梗塞後心不全発症を抑制する方法として、心筋梗塞急性期における薬物補充療法による心筋虚血再灌流障害抑制が期待されるが、未だ確立された治療法はない。

一方、がんや炎症部位では血管透過性が亢進し、ナノサイズの粒子が血管より流出し、集積する。薬剤をナノリポソームに内包し、炎症部位特

異的に薬剤を特異的に送達することにより、薬効の増強と副作用の軽減が期待できる。心筋梗塞部位では激的な炎症が生じるため、同部位での血管透過性亢進を利用したりポソーム製剤の高い有効性が期待できる。申請者は研究代表者として、厚生労働科研医療機器開発推進研究事業〈ナノサイズリポソームを用いた急性心筋梗塞治療法の開発〉を実施し、ナノリポソームの心筋梗塞部位へ高い集積による、心保護薬の作用増強と副作用軽減を示した (Takahama H, et al. J Am Coll Cardiol. 2009; 特願:PCT/JP2008/00652)。本技術を用い、既にラット心筋梗塞モデルにおいて、低用量リポソーム製剤の心筋梗塞サイズ縮小増強効果を確認した (特願 2012-117077)。

そこで、本研究では、リポソーム製剤をアカデミア創薬として開発を進める。平成 24 年度末まで



に、薬効薬理試験、薬物動態試験、製剤最適化を終了し、阪大病院薬剤部で GMP リポソーム製造装置を稼働する。平成 25 年以降、安全性薬理試験、毒性試験が開始可能であり、本事業終了時には速やかに治験に移行する。心筋梗塞部位での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ィアは画期的であり、特許戦略にも基づいている。

## B. 研究方法

### (1) 基礎的実験

#### 1) 心筋虚血再灌流モデルの作製

ラットをメデトミジン（ドミツール、日本全薬工業 0.15 mg/kg）、ミタゾラム（ドルミカム、アステラス製薬（株）2 mg/kg）及びブトルファノール（ベトルファール、明治製菓（株）2.5 mg/kg）三種混合麻酔剤の腹腔内投与で麻酔後、背位に固定し、気道に気管チューブを経口的に挿入し、小動物用人工呼吸器（Model SIN-480-7、シナノ製作所）により人工呼吸（Tidal volume：1.5～2.0 mL/stroke、呼吸回数：80 strokes/min）を施し、胸部側壁を開胸して心臓を露出した。糸付縫合針（ELP、エルプ糸付縫合針：M10-50B2）を用いて左冠動脈前下行枝（LAD）を 30 分間閉塞した。この時、TRANSDUCER Control unit（Millar 社 Model TCB-500）を用いて心電図（第Ⅱ誘導）を測定し、閉塞の有無を ST 電位の変化及び心筋色で確認する。閉塞 30 分後に血流を 90 分再灌流させることにより心筋虚血再灌流モデルを作製する。但し、実験実施中心室頻拍（VT）や心室細動（VF）が起こる時、リングピンセットによる心臓マッサージを行う。

#### 2) シクロスポリン封入リポソーム（Lipo-CsA） 製剤の心筋梗塞モデルへの薬効薬理試験

##### ①Lipo-CsA の調製

シクロスポリンA封入リポソームは、モル比がHSPC/DSPEmPEG2K/シクロスポリンA=14.7/1.4/1、総脂質濃度が13.3 mMとなるように調製した。シクロスポリンA/脂質溶解液に20 mLのマルトース混合液（10%マルトース、0.5Mリン酸ナトリウム pH6.5、50%グルコースの混合液）を混合後、80℃の熱を加えて溶解し、リポソーム原液を調製した。ペリスタリックポンプ（KrosFlo KR2i、スペクトラム）を用いて、リポソーム原液をリポソ-

ム合成装置（Lipo-TB：東レエンジニアリング）へ送液し、装置内の細流路で加熱（80℃）、フィルター濾過滅菌、一次冷却（20℃）、二次冷却（20℃）の反応工程を加え、リポソーム溶液を調整した。リポソーム溶液を中空糸膜モジュール（mPES 500kDa、スペクトラム）へ送液し、透析液（10%マルトース、0.5Mリン酸ナトリウム pH6.5の混合液）を用いた向流透析により、リポソーム溶液中のイソプロパノールを除去した。

##### ②Lipo-CsA の物性評価

Lipo-CsA 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 CsA 量は、HPLC を用いて算出した。Lipo-CsA 溶液とメタノールを混合し、HPLC 用サンプルとした。HPLC の測定条件（カラム：Vydac C18 4.6 x 250 mm、移動相：0.01M TFA/CH<sub>3</sub>CN = 30/70、流速：1.0 mL/min、カラム温度：60℃、検出波長：215nm、測定時間：20min）により CsA 量を定量し、CsA のリポソーム内包率を算出した。

##### ③動物実験プロトコール

大腿静脈内に挿入したカテーテル（INTRAMEDIC Polyethylene Tubing PE50、CLAY ADAMS）よりシリンジポンプ（NIHON KODEN syringe Pump、CV-3200）を用いて再灌流前 3 分（虚血後 27 分）から再灌流後 3 分の計 6 分間静脈内持続投与する。左冠動脈前下行枝を閉塞 30 分後に血流を 90 分再灌流させ、心筋梗塞サイズを評価する。

再灌流 90 分後にラット心臓の閉塞部位を再結紮し、大腿静脈より 5% Evans Blue 液（ナカライテスク株、生理食塩液にて溶解）を 1 mL 注入することにより非虚血領域を着色させる。三種混合麻酔剤の過剰麻酔により安楽死させ、心臓を摘出し、直ちに生理食塩液（液温：37℃）にひたして洗浄する。冠動脈閉塞直下から心尖部にかけて短軸方向に均等に 4 切片の輪切りにし、心筋梗塞領域（MI area）の特定のため、1% TTC（2,3,5-triphenyltetrazolium hydrochloride、Sigma Chemical Co.）液 [pH 7.4 リン酸緩衝液（和光純薬工業株）に溶解] で染色（液温：37℃、時間：5 分間）する。染色後、右心室を切り離し、実体顕微鏡（OLYMPUS SZX12）により標本の写真撮影を行う。写真を画像解析装置（汎用画像処理ソフト ImageJ 1.42q）を介して、1 例あたり 4 切片（心尖部 1 横断面、他 3 切片上下 2 横断面ずつ、計 7 横断面）を計測し、左心室に占める虚血領域率（risk area/LV area [Risk/LV]：%）、心筋梗塞サ

イズ (MI area/risk area [MI/Risk] 及び MI area/LV area [MI/LV] : %) を算出した。

### 3) 3H 標識シクロスポリン封入リポソーム (Lipo-[3H] CsA) 製剤を用いた体内動態試験

#### 1. 試験表題

ラットにおけるリポソーム化シクロスポリン製剤を単回静脈内投与した時の吸収及び分布

#### 2. 試験番号

14-399

#### 3. 目的

本試験は、ラットにリポソーム化した [3H] Cyclosporin A を単回静脈内投与して放射能の血液及び血漿中濃度ならびに組織内分布を調べることで、リポソーム化シクロスポリン製剤の体内動態を明らかにすることを目的とする。

#### 4. 概括

##### 4.1 試験の実施基準

本試験は平成 10 年 6 月 26 日医薬審第 496 号 厚生省医薬安全局審査管理課長通知「非臨床薬物動態試験ガイドライン」に準拠して実施する。また、本試験は薬事法施行規則第 43 条「申請資料の信頼性の基準」に従い実施する。

##### 4.2 試験委託者

名称： 大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学  
所在地： 大阪府吹田市山田丘 2-2  
委託責任者： 松崎 高志  
委託担当者： 松崎 高志

##### 4.3 試験実施施設

名称： 株式会社ネモト・サイエンス つくば研究所  
所在地： 茨城県常総市大生郷町 6136 番 4  
運営管理者： 富澤 宏樹  
試験責任者： 白井 伸明

##### 4.4 試験期間

試験開始日 (計画書作成日)： 2013 年 2 月 16 日  
実験開始日： 2013 年 3 月 5 日  
実験終了予定日： 2013 年 4 月 25 日

最終報告書作成予定日： 2013 年 5 月 27 日  
試験終了日 (最終報告書作成日)： 2013 年 6 月 24 日

#### 5. 材料

##### 5.1 被験物質

###### 5.1.1 標識化合物

名称： [3H] Cyclosporin A 含有リポソーム製剤 A

入手先： 試験委託者

ロット番号： 001

濃度： 1.3 mg/mL (Cyclosporin A として 1.3 mg/mL, 10%マルトース/リン酸ナトリウム溶液)

比放射能： 0.1 MBq/mg (Cyclosporin A として 0.1 MBq/mg)

保存条件： 冷蔵庫 (管理温度：2 ~ 8° C)

残余の取り扱い： 一連の試験が終了した後、残余を委託者に返却する。

名称： [3H] Cyclosporin A 含有リポソーム製剤 B

入手先： 試験委託者

ロット番号： 001

濃度： 1.3 mg/mL (Cyclosporin A として 1.3 mg/mL, 10%マルトース/リン酸ナトリウム溶液)

比放射能： 0.1 MBq/mg (Cyclosporin A として 0.1 MBq/mg)

保存条件： 冷蔵庫 (管理温度：2 ~ 8° C)

残余の取り扱い： 一連の試験が終了した後、残余を委託者に返却する。

名称： [3H] Cyclosporin A

入手先： 試験委託者

ロット番号： 654342

放射化学的純度： 95%以上

比放射能： 12.9 Ci/mmol (477.3 GBq/mmol)

分子量： 1202.61

放射能濃度： 1.0 mCi/mL (エタノール溶液)

保存条件： 冷凍庫 (管理温度：- 90 ~ - 70° C)

残余の取り扱い： 一連の試験が終了した後、残余を委託者に返却する。

##### 5.2 標準物質

名称： Cyclosporin A  
入手先： 試験委託者  
ロット番号： 001  
化学的純度： 99.9% (分析日：2013年\*月\*\*日)  
分子量： 1202.61  
保存条件： 気密, 遮光, 冷蔵庫 (管理温度：2~8°C)  
残余の取り扱い： 一連の試験が終了した後, 残余を委託者に返却する。

### 5.3 供試動物

#### 5.3.1 動物

種： ラット  
系統： Crl:CD (SD)  
性： 雄性  
生産者： 日本チャールス・リバー株式会社  
生産者所在地： 茨城県石岡市上林 955  
週齢： 投与時 8 週齢  
体重： 投与時 250 ~ 350 g  
購入予定数： 23 匹  
使用予定数： 19 匹

#### 5.3.2 動物実験倫理委員会の承認

本試験は株式会社ネモト・サイエンス つくば研究所 動物実験倫理委員会により承認された。

動物実験許可番号： 動医 20-136-3 号

#### 5.3.3 飼育管理

検収及び馴化： 馴化は入荷検収後 7 日間以上とする。動物は検収日に無作為に選び個体番号を付し、疾病及び異常の有無を確認した後に正常な個体を馴化に用いる。馴化期間中の体重の測定は 1 週間に少なくとも 2 回、一般状態の観察は毎日実施する。実験期間中の体重の測定及び一般状態の観察は毎日実施する。

馴化期間中に疾病又は異常が認められた動物の取り扱い：

馴化期間中に疾病または異常が認められた動物は、試験に使用せず、二酸化炭素の過剰吸入により安楽死させる。また、異常動物以外の個体数が使用予定数に満たない場合には、追加で動物の購入を行う。

群分け： 投与当日、入荷検収時に付した個体番号の小さい順に動物番号を付し、実験群に割り付ける。いずれも一般状態に異常の認められない

個体を供試する。

個体識別： 馴化期間中は検収時の体毛への着色位置及びケージカードに表示の個体番号で、群分け後は尾に記載した動物番号で識別する。

余剰動物の取り扱い：

余剰動物は、投与終了後、二酸化炭素の過剰吸入により安楽死させる。

ケージ： 馴化期間中は金網床金属製ケージに 3 ~ 5 匹を収容する。ケージには試験番号及び個体番号を表示する。

実験期間中は金属製ケージ (ステンレスワイヤー) に個別に収容する。各ケージには試験番号、群番号及び動物番号を表示する。

給餌： 固型飼料 (CR-LPF, オリエンタル酵母工業株式会社) を給餌器より自由に摂取させる。飼料の分析結果を動物管理記録として保管する。

給水： 給水瓶より自由に摂取させる。飲水は 3 ヶ月に 1 回分析し、水質検査結果を施設管理記録として保管する。

飼育環境： 温度： 20 ~ 26°C

相対湿度： 40% ~ 70%

換気回数： 10 回以上/時間 (オールフレッシュ方式)

照明： 午前 7 時点灯, 午後 7 時消灯

### 5.4 機器及び装置

電子天秤： AE160, AE163, AE240, AT250, AG285, AG204DR, AB265-S/F-31, PM-4600, PM-2000 (Mettler), LA-4200 (Sartorius), HF-2000, HF-3000, FY-3000 または GF-3000 (A&D)

冷蔵庫： FKG-370F3 (日本フリーザー), TRG-390 (テイオン) または RC-ME15 (日立)

冷凍庫： MDF-235 (サンヨー), GS-5203AF3 (日本フリーザー), TF-300, TF-510V, TF-130V, LDF-C35 または LDF-C9 (テイオン)

遠心分離機： CF16RXII (Hitachi) または MR-150 (Tomy)

HPLC システム

(システム 1)

システムコントローラ： SCL-10Avp (Shimadzu)

ポンプ： LC-10ADvp (Shimadzu)

オートサンプラ： SIL-10ADvp (Shimadzu)

カラムオープン： CTO-10ACvp (Shimadzu)

UV 検出器： SPD-10Avp (Shimadzu)

データ解析： Class-VP Ver. 6.14 SP2

(Shimadzu)  
(システム 2)  
システムコントローラ: SCL-10Avp  
(Shimadzu)  
ポンプ: LC-10ADvp (Shimadzu)  
オートサンプラ: SIL-10ADvp (Shimadzu)  
カラムオープン: CTO-10Avp (Shimadzu)  
UV 検出器: SPD-10Avp (Shimadzu)  
データ解析: LC solution Ver. 1.11 SP1  
(Shimadzu)

ラジオアイソトープディテクタ:  
625TR (PerkinElmer)  
データ解析: Flo-One, Ver. 3.65  
(PerkinElmer)  
イメージアナライザ: Typhoon FLA 7000  
(GEヘルスケア)  
液体シンチレーションカウンタ:  
Tri-Carb 2900TR (PerkinElmer), Tri-Carb  
2100TR (Packard), LS 6000IC, LS 6500 (Beckman),  
LSC-5100 又は LSC-6100 (Aloka)  
クライオミクロトーム: CM3600 (Leica  
Microsystems)  
全自動試料燃焼装置: A0307, A30701  
(Packard) または A030701 (PerkinElmer)  
吸入麻醉器: NARCOBIT-E (夏目製作所)

## 5.5 器具

P.P. 製チューブ: (Eppendorf, SARSTEDT 又は旭テクノガラス)  
イメージングプレート: BAS-IP TR 2040E (富士写真フイルム)  
シールドボックス: BAS-SHB2040 (富士写真フイルム)  
静脈内投与用注射針: テルモ注射針 (27 ゲージ, テルモ)  
血液採取用注射針: テルモ注射針 (26 ゲージ, テルモ)  
静脈内投与及び血液採取用注射筒:  
テルモシリンジ (ツベルクリン用, 1 mL, テルモ)  
分析カラム: Vydac C18 (4.6×250 mm)  
オートサンプラバイアル: Screw-top vial 300 µL/pre-slit (Waters)  
ケージ (馴化期間): 金網床金属製ケージ (420W × 240D × 150H mm)

ケージ (実験期間): ステンレスワイヤー製ケージ (239W × 200D × 185H mm)  
粘着テープ: スコッチテープ, 810 (住友スリーエム)  
分注器: 4780, 4910, 4981, Research V (Eppendorf), Pipetman 又は Microman (Gilson)  
放射能測定容器: Zinsser Analytic Polyvial, 20 mL (Zinsser Analytic)  
ゲル濾過カラム: PD-10 (GE Healthcare)  
放射能標準: Micro-scales, RPA510 (Higher Activity Range 51.3~1252.0 Bq/mg, 校正 2000 年 6 月, Amersham Life Science)

## 5.6 試薬

CMC-Na: 化学用 (和光純薬工業)  
イソフルラン: 日本薬局方 (マイラン製薬)  
液体シンチレータ: Hionic-Fluor, Monophase S 又は Ultima-Flo AP (PerkinElmer)  
メタノール: HPLC 用 (純正化学)  
蒸留水: HPLC 用 (純正化学)  
蒸留水: グレードなし (和光純薬工業)  
ヘキサン: 一級 (和光純薬工業)

## 6. 方法

### 6.1 溶液の調製

調製量は必要に応じて変更する。

#### 6.1.1 移動相の調製

6.1.1.1 移動相 A: 0.01% TFA  
移動相中に 30%

6.1.1.2 移動相 B: CH<sub>3</sub>CN  
移動相中に 70%

#### 6.1.2 2%CMC-Na 溶液

20 g の CMC-Na を秤量して蒸留水 (和光純薬工業製) 980 mL を加えて溶解し, 2%CMC-Na 溶液を調製する. 2%CMC-Na 溶液は使用するまで冷蔵庫 (管理温度: 2~8°C) で保存する. 使用期限は, 1ヶ月以内とする.

#### 6.1.3 10%CMC-Na 溶液

100 g の CMC-Na を秤量して蒸留水 (和光純薬工業製) 900 mL を加えて溶解し, 10%CMC-Na 溶液を調製する. 10%CMC-Na 溶液は使用するまで冷蔵庫 (管理温度: 2~8°C) で保存する. 使用期限は,