

201324/36A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

抗菌活性・創修復作用を有する新規ペプチドを用いた
遺伝的早老症患者の難治性潰瘍治療薬の開発

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中神 啓徳

平成26(2014)年 5月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中神 啓徳
平成26（2014）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

抗菌活性・創修復作用を有する新規ペプチドを用いた遺伝的早老症患者の難治性潰瘍治療薬の開発 中神 啓徳	1
---	---

II. 分担研究報告

1. 医師主導臨床治験に向けた非臨床試験および治験薬製造の予備検討 富岡 英樹・中神 啓徳	4
2. 医師主導治験に向けた書類整備（手順書・実施計画書の作成） 楽木 宏実・上坂 浩之・横手 幸太郎・三木 哲郎	7

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	10
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷

抗菌活性・創修復作用を有する新規ペプチドを用いた遺伝的早老症患者の難治性潰瘍治療薬の開発

研究代表者 中神 啓徳 大阪大学大学院連合小児発達学研究所 寄附講座教授

【研究要旨】

新規ペプチドSR-0379は難治性皮膚潰瘍治療を目指した外用薬開発を目指す薬剤である。SR-0379は血管新生促進作用等による創傷治癒効果と膜透過性変化による抗菌作用を併せ持ち、ラット創傷モデルでフィブラスプレーと同等あるいはそれ以上の創修復効果を認めている。ウエルナー症候群に多く合併する慢性皮膚潰瘍への適応が目標とし、将来的には糖尿病性潰瘍・褥瘡などへの適応の拡大を視野に入れる。今年度は、早期探索臨床試験拠点のサポートも受けながら非臨床試験を遂行した。ラットでの薬物動態試験において静脈内投与では半減期4.8分で消失、皮下投与においても投与後30分後には血中濃度はほぼ感度以下となったことから、局所投与薬であり全身性作用は乏しいことが分かった。ウサギの眼刺激性試験、皮膚刺激性試験においては刺激性を認めなかった。モルモット感作性試験においては、アジュバントと同時に皮下投与した群において弱い感作性を認めた。ラット4週毒性試験では最大容量まで無毒性であり、呼吸器・中枢性の安全性薬理試験でも以上を認めなかった。PMDAに対面助言において、心血管系の安全性薬理試験追加で予定している臨床試験に対する非臨床試験は充足していることが確認された。平成26年度からのヒト臨床試験に向けて、治験薬GMPでの原薬・製剤検討の予備試験を行ない、医師主導治験での製剤規格・容器などを決定した。

分担研究者

楽木 宏実	大阪大学大学院医学系研究科・教授
上坂 浩之	大阪大学臨床医工学融合研究教育センター・特任研究員
富岡 英樹	アンジェスMG・研究員 (兼 大阪大学大学院医学系研究科・大学院生)
横手幸太郎	千葉大学大学院医学研究科・教授
三木 哲郎	愛媛大学大学院医学系研究科・教授

での見極めが難しい。特にウエルナー患者での皮膚潰瘍は圧のかかる部位に好発するため創傷被覆材が用いられることが多い。難治性潰瘍患者では特にQOLの改善から新しい治療法が求められている。

我々が同定した新規抗菌性ペプチドAG30を用いた難治性皮膚潰瘍治療薬の開発は、早期探索型臨床試験拠点のシーズとし選定されたことを契機に、医師主導型治験あるいは将来的な企業への導出を念頭におき改変体を作成し、AG30/5Cペプチドが血清によって分解される代謝産物の機能解析から、20残基のアミノ酸で一部D体にアミノ酸を置換した低コストで活性のあるペプチドの作成に成功した（SRペプチド）。このペプチドを用いた同疾患への医師主導型治験を計画している。

A. 研究目的

創に対する治療法として、創傷治癒を促進するための湿潤環境を作る湿潤療法が提唱されている。他方、創部では皮膚のバリア機構が破綻しているために種々の細菌が繁殖することが多く、創の治りに関与しない汚染あるいは繁殖（コロニゼーション）の状態か、又は創の治癒を遅延させる感染の状態かを正確に見極めて、適切な治療を行うことが重要とされる。

難治性皮膚潰瘍では局所感染兆候（発熱・発赤・腫脹・疼痛）の判定が困難なことが多く、その感染に至る前段階（クリティカルコロニゼーション）

B. 研究方法

医師主導治験に向けた非臨床試験を進める。すでに終了した試験として、ラット全層欠損モデルでの創傷治癒促進作用、各種細菌に対する抗菌活性、CMC（原薬の分析・安定性）、薬物動態試験（LC/MS）、ウサギ皮膚一次刺激性試験、遺伝毒性試験（非GLP）、ラット2週間反復毒性試験（非

GLP)がある。平成25年度(すべてGLP)で、毒性試験(ラット4週間反復毒性試験)、安全性薬理試験(中枢神経・呼吸)、刺激性・感作性試験(ウサギ皮膚累積刺激性試験、モルモット皮膚感作性試験)、CMC(治験薬GMPでの原薬・製剤の予備検討)を行なった。また、SR-0379の作用メカニズムの検討として細胞内情報伝達系の解析も行なった。

平成26年度にCMC(治験薬GMPでの原薬・製剤製造)、安全性薬理試験(心血管系)、健常人を用いたパッチテストを進める予定としている。臨床試験に向けた書類整備(手順書・治験薬概要書・実施計画書・症例報告書・患者説明文書)を進める。

(倫理面への配慮)

すべての基礎研究は事前に動物実験プロトコールなどが大阪大学大学院医学系研究科で承認された上で遂行した。

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、実施する。

- ・「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)

非臨床試験は、非臨床試験は薬事法の「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」に則りGLP基準で遂行する。

医師主導治験は、「医薬品の臨床試験の実施に関する基準(Good Clinical Practice: GCP)」に準拠し、適切な説明に基づく被験者の同意の確保、及び被験者の人権保護に配慮することにより実施される。また、実施医療機関の治験審査委員会の審査、承認を経て、自ら治験を実施しようとする者から厚生労働大臣宛てに治験計画届書が提出される。

C. 研究結果

医師主導型治験に向けてPMDAとの薬事戦略事前面談を2013年6月5日(水)、非臨床試験項目の充足性を関する対面助言を10月3日(木)に行い、その方針に従って研究を遂行した。薬効薬理試験・薬物動態試験に加えて、GLP試験での、ウサギ皮膚刺激性試験、モルモット皮膚感作性試験、ラット反復毒性試験、安全性薬理試験(呼吸系系・中枢性)を行い、感作性試験以外は特筆する所見を認めなかった。今後の臨床試験では投与局所所見に注意しながら進める予定である。一方、CMC(原薬・製剤化)に関しては、ペプチド合成をAmerica

n Peptide社(ILSの子会社)で予備検討を行ない規格値の設定を行なった。製剤化に関しては、ナガセ医薬品で予備検討を行ない、容器の選定(スプレー製剤)およその機能評価をし、安定性試験を行なった。治験薬GMPでの書類整備として手順書・製品標準書の作成、体制整備・品質管理に関する教育訓練受講などの準備を行い、平成26年度からの治験薬製造の準備を行なった。また、SR-0379の細胞内情報伝達系の解析も並行して行い、インテグリンシグナルのFAKあるいはその下流のPI-3kinaseがヒト線維芽細胞で活性化され、細胞増殖・遊走を促すことが分かり、SR-0379の創修復作用のメカニズムが明らかとなった。

臨床試験に向けた準備としては、医師主導治験の手順書を作成し、それに則った治験薬概要書・実施計画書・症例報告書・患者説明文書の作成準備として、まずは健康人を対象としたパッチテストに対して行なってきた。次年度の患者での臨床試験に向けた準備として、分担研究者の横手教授を中心にウエルナー症候群の患者会で本研究の取り組みを紹介し、患者への情報提供を積極的に行なった。今後患者での臨床試験の内容が固まったところで、患者レジストリーの作成を進めていきたいと考える。

D. 考察

医師主導治験として、自ら開発した化合物を原薬・製剤化から取り組んでおり、治験薬GMPの体制作り・ドキュメント整理などから実施してきたが、今年度でほぼ予備検討を終了することができた。また、非臨床試験に関してもPMDAでの対面助言で充足性を確認した試験を概ね終了することができた。来年度は、治験薬の合成を進めながら残りの非臨床試験を行い、まずは健康人での皮膚刺激性試験(パッチテスト)から開始する予定である。

E. 結論

早老症に合併する難治性皮膚潰瘍の新規治療薬開発を目指して、非臨床試験・CMC・臨床試験に向けた書類・体制整備を行なった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tomiooka H, Nakagami H, Tenma A, Saito Y, Kaga T, Kanamori T, Tamura N, Tomono K, Kaneda Y, Morishita R. Novel Anti-Microbial peptide, SR-0379, Accelerates Wound Healing via the PI3 Kinase/Akt/mTOR Pathway. PLOS ONE 2014. Mar 27

2. 学会発表

中神 啓徳「Clinical Application of Novel Angiogenic Peptide for Severe Ischemic Ulcer; from Discovery to Drug Development from Academia」第78回日本循環器学会学術集会、2014.3.23、東京<シンポジウム>

3. 新聞報道

「傷治し感染を抑える化合物を開発、大阪大、皮膚潰瘍に。」2014.3.28. 毎日新聞、中日新聞、西日本新聞、大分合同新聞他

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

出願日：2000年10月5日

医師主導臨床治験に向けた非臨床試験および治験薬製造の予備検討

研究分担者

富岡 英樹 アンジェスMG株式会社（兼 大阪大学大学院医学系研究科 大学院生）

中神 啓徳 大阪大学大学院連合小児発達学研究科 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。大阪大学で同定した新規抗菌ペプチド 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から、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-0379）を作成した。立体構造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や線維芽細胞の増殖を促進する作用を有していた。SR-0379の薬効薬理試験では、ラットの皮膚損傷モデルにおいて創修復作用の促進を認めた。SR-0379の生体試料中濃度を測定する測定系を確立し、薬物動態試験を実施した。非臨床試験として、ラット4週反復毒性試験、ウサギでの眼刺激性試験、皮膚刺激性試験、モルモットでの感作性試験、ラットでの安全性薬理試験（呼吸・中枢系）を行った。原薬合成・製剤化の予備検討を行い、次年度から治験薬GMP下での治験薬合成および臨床試験（フェーズI）を開始する予定である。

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-0379の非臨床試験として、薬物動態試験、毒性試験、刺激性・感作性試験、安全性薬理試験を行い、次年度の健康人を用いたパッチテストの準備を行った。

LC-MS/MSを用いたMRM（Multiple Reaction Monitoring）でのSR-0379の測定法を用いて、ラットに静脈内投与あるいは皮下投与した時のSR-0379の血漿中濃度測定を行った。

治験薬GMPを想定した原薬合成および製剤化の予備検討を行った。

また、SR-0379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

薬物動態試験ではLC/MS/MSを用いたSR-0379の測定法を確立し、ラット血漿では定量下限値が

5 ng/ml、サル血漿では、さらに高感度の測定法を確立し、定量下限値が1 ng/mlの高感度測定法を確立した。ラットにSR-0379を200 µg/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。また、1 mg/kg以上の投与量で皮下投与した際の薬物動態を調べたところ、投与後30分後には血漿中濃度が定量下限値未満であることが分かった。

雄性ラットにSR-0379を1、10、100 mg/2 mL/kgの用量で単回皮下、または0.5 mg/1 mL/kgの用量で単回静脈内投与し、経時的にSR-0379の血漿中濃度を測定し、血漿中濃度推移について検討した。皮下投与群においてSR-0379の最高血漿中濃度は投与量増加に伴い、高値を示したが、投与量に比例していなかった。消失半減期は静脈内投与で15分、皮下投与で1、10及び100 mg/kgでそれぞれNC（算出不能）、3.7及び8.8分であった。

非臨床試験においては、ラット4週間反復皮下投与毒性試験で全身毒性と考えられる所見は認めず、安全性薬理試験（呼吸・中枢系）でも異常は認められず、ウサギ連続皮膚刺激性試験でも陰性であった。モルモット感作生試験においてのみ、SR-0379とアジュバントを併用した場合に、感作性が陽性を示した。

サル1週間反復皮下投与毒性試験（非GLP試験、予備試験）を実施した結果、死亡は認められず、体重、摂餌量、血液学的検査及び器官重量の結果に異常はみられなかった。また、一般状態及び血液生化学的検査には、被験物質による毒性変化は認められなかった。一方、剖検及び病理組織学的検査結果には、被験物質の薬理作用によると考えられる変化のほか、投与部位局所に対する変化が認められたが、全身性の影響はみられなかった。

治験薬の製造については、予備検討として、原薬の規格値の決定、生理食塩水に溶解し、スプレー容器に充填した製剤中での安定性試験などを行い、安定性に関するデータを得た。予備安定性試験では室温・冷蔵では安定であり、光に対しても安定であった。また、製造工程を検討し、製品標準書を作成した。

SR-0379は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。

次年度の健康人でのパッチテストの準備として、手順書の確認と実施計画書、症例報告書、患者説明文書の作成を行った。

D. 考察

SR-0379は皮膚潰瘍治療薬として外用剤として開発を行っており、これまでの試験で薬効試験での有用性と薬物動態試験で局所治療薬としての特性を見出している。非臨床試験において、全身毒性は認めず、皮膚刺激性試験も陰性であったが、感作性試験（アジュバントと同時に投与したモルモットの感作性試験）でのみ陽性を認めたため、今後の臨床試験で注意して進める必要がある。今後は健康人でのパッチテストを行った後に、患者でのPOC試験を予定している。

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-0379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

Tomioka H, Nakagami H, Tenma A, Saito Y, Kaga T, Kanamori T, Tamura N, Tomono K, Kaneda Y, Morishita R. Novel Anti-Microbial peptide, SR-0379, Accelerates Wound Healing via the PI3 Kinase/Akt/mTOR Pathway. PLOS ONE 2014. Mar 27.

2. 学会発表

中神 啓徳「Clinical Application of Novel Angiogenic Peptide for Severe Ischemic Ulcer; from Discovery to Drug Development from Academia」第78回日本循環器学会学術集会、2014.3.23、東京<シンポジウム>

富岡 英樹 「血管新生作用を有する新規ペプチドの虚血性潰瘍治療への応用」脳心血管抗加齢研究会2013、2013.12.14

3. 新聞報道

「傷治し感染を抑える化合物を開発、大阪大、皮膚潰瘍に。」2014.3.28. 毎日新聞、中日新聞、西日本新聞、大分合同新聞他

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

医師主導治験に向けた書類整備（手順書・実施計画書の作成）

研究分担者

楽木 宏実 大阪大学大学院医学系研究科・教授
上坂 浩之 大阪大学臨床医工学研究教育融合センター 特任研究員
横手 幸太郎 千葉大学大学院医学研究科・教授
三木 哲郎 愛媛大学大学院医学系研究科・教授
中神 啓徳 大阪大学大学院連合小児発達学研究科・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。創に対する治療法として、創傷治癒を促進するための湿潤環境を作る湿潤療法が提唱されている。他方、創部では皮膚のバリアー機構が破綻しているために種々の細菌が繁殖することが多く、創の治りに関与しない汚染あるいは繁殖（コロニゼーション）の状態か、又は創の治癒を遅延させる感染の状態かを正確に見極めて、適切な治療を行うことが重要とされる。難治性皮膚潰瘍では局所感染兆候（発熱・発赤・腫脹・疼痛）の判定が困難なことが多く、その感染に至る前段階（クリティカルコロニゼーション）での見極めが難しい。特にウエルナー患者での皮膚潰瘍は圧のかかる部位に好発するため創傷被覆材が用いられることが多い。難治性潰瘍患者では特に QOL の改善から新しい治療法が求められている。

我々が同定した新規抗菌性ペプチド AG30 を用いた難治性皮膚潰瘍治療薬の開発は、早期探索型臨床試験拠点のシーズとし選定されたことを契機に、医師主導型治験あるいは将来的な企業への導出を念頭におき改変体を作成し、AG30/5C ペプチドが血清によって分解される代謝産物の機能解析から、20 残基のアミノ酸で一部 D 体にアミノ酸を置換した低コストで活性のあるペプチドの作成に成功した（SR ペプチド）。このペプチドを用いた同疾患への医師主導型治験として、健康人でのパッチテストの実施、その後患者での試験を計画している。

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を用いた難治性皮膚潰瘍治療薬の開発に向けて、臨床試験に必要な体制整備と手順書・実施計画書・患者説明文書・症例報告書などの書類作成の準備などを行う。

B. 研究方法

SRペプチドを用いた臨床試験として、平成26年度に健康人を用いたパッチテスト（フェーズI）及び次年度の患者の皮膚潰瘍の試験を予定した。まずはフェーズIに向けて、医師主導治験のための各種手順書・治験体制および関連書類の作成を行なった。

（倫理面への配慮）

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

臨床試験に向けた準備としては、本研究課題を医師主導治験として行なうための手順書を確認・作成した、それに則った治験薬概要書・実施計画書・症例報告書・患者説明文書の作成準備を行な

った。2014年の健康人を対象としたパッチテスト実施に向けて、IRBでの審査・治験届に必要な書類を順次作成している。

医師主導治験の体制として、以下のように計画した。

自ら治験を行なうもの：楽木宏実教授を予定。

【役割】

- 1) 治験責任医師及び治験実施医療機関の調査
- 2) 治験薬概要書の作成
- 3) 治験実施計画書の作成
- 4) 症例報告書の見本の作成
- 5) 説明文書・同意書の作成
- 6) 治験総括報告書の作成
- 7) 治験薬の交付・回収
- 8) その他、本治験に係る業務

開発業務受託機関

【役割】

- 1) 治験実施医療機関及び治験責任医師の選定に関する提案
- 2) 治験実施計画書(案)の作成及び合意支援
- 3) 症例報告書(案)の作成
- 4) 説明・同意文書(案)の作成
- 5) 治験責任医師への説明・同意文書の作成依頼
- 6) 治験実施医療機関の長への文書の事前提出
- 7) 治験契約書の作成及び締結支援
- 8) 業務範囲に属する治験に係る文書及び記録等の発行・受理
- 9) 治験薬の交付・回収
- 10) モニタリングの実施
- 11) 症例報告書と原資料等との照合及び回収に関する業務
- 12) 統計解析業務
- 13) 治験総括報告書(案)の作成
- 14) 治験終了後における各資料の電子媒体化
- 15) その他、本治験に係る業務

モニタリング責任者及びモニタリング担当者

【役割】

治験実施計画書及び標準業務手順書に従いモニタリングを行う。

症例報告書の内容と原資料等の治験関連記録類を照合し、これらが正確であることを確認する。

統計解析責任者

【役割】

治験の実施により得られたデータの統計解析を行う。

監査責任者

【役割】

自ら治験を実施する者、開発業務受託機関及び治験実施医療機関について、監査手順書に従い監査を行う。

パッチテスト、SR-0379液の皮膚刺激性試験（第I相）—SR-0379液の健康成人男性を対象とした単回貼付（塗布）時の皮膚刺激性及び安全性の検討—は以下のような予定をしている。

対象者：健康人男性20名

試験薬：SR-0379を0.01、0.1、0.25及び0.5 %含有する生理食塩水（SR-0379液）および生理食塩水

試験方法：

1) 試験デザイン

各被験者の上背部左側に5か所の試験部位を定め、生理食塩水およびSR-0379製剤4用量を、5試験部位5被験者群からなる5 x 5ラテン方格配置に従い割り付ける、単施設単盲検無作為化ラテン方格配置デザイン

2) 割付方法

薬剤割付責任者が、各被験者をラテン方格の行に、等例数になるように無作為に割り付ける。

次年度の患者での臨床試験に向けた準備として、分担研究者の横手教授を中心にウエルナー症候群の患者会で本研究の取り組みを紹介し、患者への情報提供を積極的に行なった。今後患者での臨床試験の内容が固まったところで、患者レジストリーの作成を進めていきたいと考える。

D. 考察

SR-0379の非臨床試験において、全身毒性は認めず、刺激性試験も陰性であったが、感作性試験（アジュバントと同時に投与したモルモットの感作性試験）でのみ陽性を認めたため、今後の臨床試験で注意して進める必要がある。今後は健康人でのパッチテストを行った後に、患者での試験を予定している。

E. 結論

医師主導治験に向けて体制および必要書類の整備を行なった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tomioka H, Nakagami H, Tenma A, Saito Y, Kaga T, kanamori T, Tamura N, Tomono K, Kaneda Y, Morishita R. Novel Anti-Microbial peptide, SR-0379, Accelerates Wound Healing via the PI3 Kinase/Akt/mTOR Pathway. PLOS ONE 2014. Mar 27.

2. 学会発表

中神 啓徳「Clinical Application of Novel Angiogenic Peptide for Severe Ischemic Ulcer; from Discovery to Drug Development from Academia」第78回日本循環器学会学術集会、2014.3.23、東京<シンポジウム>

3. 新聞報道

「傷治し感染を抑える化合物を開発、大阪大、皮膚潰瘍に。」2014.3.28. 毎日新聞、中日新聞、西日本新聞、大分合同新聞他

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

研究成果の刊行に関する一覧表

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
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	16(7)	1629-1639	2012
Tomioka H, Nakagami H, Tennma A, Saito Y, Kaga T, Kanamori T, Tamura N, Tomono K, Kaneda Y, Morishita R	Novel Anti-Microbial peptide, SR-0379, Accelerates Wound Healing via the PI3 Kinase/Akt/mTOR Pathway.	PLOS ONE	9(3)	e92597	2014

研究成果の刊行物・別刷



Novel Anti-Microbial Peptide SR-0379 Accelerates Wound Healing via the PI3 Kinase/Akt/mTOR Pathway

Hideki Tomioka^{1,2}, Hironori Nakagami^{3*}, Akiko Tenma², Yoshimi Saito², Toshihiro Kaga², Toshihide Kanamori², Nao Tamura², Kazunori Tomono⁵, Yasufumi Kaneda⁴, Ryuichi Morishita^{1*}

1 Department of Clinical Gene Therapy, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka, Japan, **2** AnGesMG, Inc., 7-7-15 Saito Bio-Incubator, Ibaraki, Osaka, Japan, **3** Division of Vascular Medicine and Epigenetics, Osaka University United Graduate School of Child Development, 2-1 Yamada-oka, Suita, Osaka, Japan, **4** Division of Gene Therapy Science, Osaka University Graduate School of Medicine, School of Child Development, 2-1 Yamada-oka, Suita, Osaka, Japan, **5** Division of Infection Control and Prevention, Graduate School of Medicine, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka, Japan

Abstract

We developed a novel cationic antimicrobial peptide, AG30/5C, which demonstrates angiogenic properties similar to those of LL-37 or PR39. However, improvement of its stability and cost efficacy are required for clinical application. Therefore, we examined the metabolites of AG30/5C, which provided the further optimized compound, SR-0379. SR-0379 enhanced the proliferation of human dermal fibroblast cells (NHDFs) via the PI3 kinase-Akt-mTOR pathway through integrin-mediated interactions. Furthermore SR-0379 promoted the tube formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in co-culture with NHDFs. This compound also displays antimicrobial activities against a number of bacteria, including drug-resistant microbes and fungi. We evaluated the effect of SR-0379 in two different wound-healing models in rats, the full-thickness defects under a diabetic condition and an acutely infected wound with full-thickness defects and inoculation with *Staphylococcus aureus*. Treatment with SR-0379 significantly accelerated wound healing when compared to fibroblast growth factor 2 (FGF2). The beneficial effects of SR-0379 on wound healing can be explained by enhanced angiogenesis, granulation tissue formation, proliferation of endothelial cells and fibroblasts and antimicrobial activity. These results indicate that SR-0379 may have the potential for drug development in wound repair, even under especially critical colonization conditions.

Citation: Tomioka H, Nakagami H, Tenma A, Saito Y, Kaga T, et al. (2014) Novel Anti-Microbial Peptide SR-0379 Accelerates Wound Healing via the PI3 Kinase/Akt/mTOR Pathway. PLoS ONE 9(3): e92597. doi:10.1371/journal.pone.0092597

Editor: Ganesh Chandra Jagetia, Mizoram University, India

Received: October 5, 2013; **Accepted:** February 24, 2014; **Published:** March 27, 2014

Copyright: © 2014 Tomioka et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by a Health Labour Sciences Research Grant in Japan, and partially funded by AnGes MG. No additional funding was received for this study. Hideki Tomioka, Akiko Tenma, Yoshimi Saito, Toshihiro Kaga, Toshihide Kanamori and Nao Tamura are employees of AnGes MG. The funder provided support in the form of salaries for authors, but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of these authors are articulated in the "Author Contributions" section.

Competing Interests: Ryuichi Morishita is an Editorial Board Member of PLOS ONE. Ryuichi Morishita is a founder of AnGes MG, and a stockholder. AnGes MG has the following patent licenses of AG30/5C (PCT/JP2008/052020: Novel polypeptide and antibacterial agent comprising the same as active ingredient) and SR-0379 (PCT/JP2010/058838: Polypeptides and antibacterial or antiseptic use of same). Hideki Tomioka, Akiko Tenma, Yoshimi Saito, Toshihiro Kaga, Toshihide Kanamori and Nao Tamura are employees of AnGes MG. Department of clinical gene therapy is financially supported by AnGes MG, Novartis, Shionogi, Boehringer, and Rohto. Division of Vascular Medicine and Epigenetics is financially supported by Bayel. This study is partially supported by the fund of AnGes MG. There are no further patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: nakagami@gts.med.osaka-u.ac.jp (HN); morishit@cgt.med.osaka-u.ac.jp (RM)

Introduction

Antimicrobial peptides are produced by multicellular organisms as a defense mechanism against competing pathogenic microbes [1]. Currently, more than 1,200 antimicrobial peptides have been discovered in animals and plants [2]. In addition to their antimicrobial functions, some peptides, such as LL-37, are known to have other functions. For example, LL-37 is chemotactic for monocytes, T cells, neutrophils and mast cells and also stimulates mast cell histamine release and angiogenesis [3]. These observations have led to the development of a therapeutic concept using antimicrobial peptides as multifunctional effector molecules to prevent infection directly and to promote wound healing in various ulcers. Indeed, many researchers have tried to develop antimicrobial peptides for topical use and systemic application [4] [5]. Before these peptides can be used in clinical applications, several improvements must be made, including 1) increased

stability, 2) reduced cytotoxicity and 3) improved antimicrobial activity [6]. To improve the stability of antimicrobial peptides, converting amino acids from L to D conformations has been attempted [7]. Antimicrobial peptides are usually positively charged, between 12 and 100 amino acids in length and form amphipathic structures. The production of shorter analogs may also resolve the cost issue for clinical applications.

We previously developed an antimicrobial peptide named AG30 (angiogenic peptide 30) that contained 30 amino acids and possessed both angiogenic and antibacterial functions [8] [9]. For clinical application in the treatment of drug-resistant ulcers, we have modified AG30 to enhance its angiogenic activity, broaden its antibacterial function, enhance its stability and reduce its cost. In this study, we have demonstrated the production of a stable, shorter peptide, SR-0379, that contains twenty amino acids, including one lysine residue that has been converted to D-lysine. This peptide exhibited antimicrobial activities against a

number of bacteria, including drug-resistant bacteria, and induced the proliferation, tube formation, migration and contraction of human dermal fibroblast cells.

Treatment with SR-0379 significantly accelerated wound healing in a skin ulcer model. In the intracellular mechanism of wound healing, we focused on the PI3K/Akt/mTOR pathway. It has been reported that Akt/mTOR activation, by the ablation of Pten and Tsc1, dramatically increased epithelial cell proliferation, migration, and cutaneous wound healing, while pharmacological inhibition of mTOR with rapamycin delays wound closure [10]. Indeed, SR-0379 would activate the Akt/mTOR pathway which lead to accelerate wound healing. Further application of SR-0379 might provide a new therapeutic option to treat various ulcers, such as diabetic ulcers and severe burns.

Results

Design of SR-0379

For use in clinical applications, we first modified AG30 to improve its stability and reduce its cost. To perform the lead-to-drug-candidate optimization, various approaches to improve stability were evaluated. The metabolic stability of AG30/5C was evaluated by using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Figure S1 in File S1). The major metabolites were 20 amino acids (aa), 18 aa and 17 aa, which overlap the N terminus AG30/5C and 12 aa in the middle of AG30/5C (Fig. 1A). The metabolites of AG30/5C were cleaved by endopeptidases and exopeptidase at multiple sites, with most cleavage sites present in the C-terminus. Those metabolites were synthesized (Fig. 1B), and their proliferation in HUVECs, tube formation in co-culture of HUVECs and NHDFs and antibacterial activities against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* were evaluated. Treatment with the 20-aa peptide (SR-0007) yielded significant increases in proliferation of HUVECs (Fig. 1C), whereas other metabolites did not have significant effects (data not shown). The stimulatory effects of SR-0007 were equivalent to the effects of AG30/5C (Fig. 1C). Furthermore, the treatment with SR-0007 (10 µg/ml) induced tube form in co-culture of HUVECs and NHDFs with the same level of AG30/5C (Fig. 1D). SR-0007 exhibited similar antibacterial activities against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* as AG30/5C (Table 1). These results revealed that SR-0007, which consists of 20 amino acids, is a potent candidate metabolite like AG30. However, SR-0007 was rapidly degraded by rat and human sera at 37°C (Figure 1E). Therefore, we further modified SR-0007 to improve its stability. The lysine in SR-0007 was replaced with D-form lysine, and the resulting compound was named SR-0379. As shown in Fig. 1E, the stability of SR-0379 was significantly improved, suggesting that SR-0379 might be resistant to the actions of known natural peptidases [11].

Antibacterial activity of SR-0379 in drug-resistant/sensitive strains

We examined the antibacterial effects of AG30/5C, SR-0007 and SR-0379 against *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* (Table 1). Importantly, SR-0379 exhibited more potent antibacterial activity against *E. coli* compared to the original SR-0007 peptide, whereas the minimal inhibitory concentration (MIC) of SR-0379 against *P. aeruginosa* was equivalent to that of SR-0007. A number of strains were then evaluated for their sensitivities to SR-0379 (Table 2). SR-0379 demonstrated potent antibacterial activity against gram-positive and gram-negative aerobes and anaerobes. Additionally, SR-0379 exhibited antibacterial effects against fungi such as

Candida krusei. Notably, the antimicrobial spectrum of SR-0379 is broader than the spectra for antibiotics such as chloramphenicol or amphotericin B (Table 2) failed to exhibit an inhibitory activity against fungi or bacteria, respectively. Furthermore, we tested the antibacterial effects of SR-0379 on antibiotic-resistant/sensitive strains for use in clinical applications. Unexpectedly, SR-0379 exhibited similar inhibitory effects on various antibiotic-resistant strains, such as methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, compared to the sensitive strains (Table 3). As antimicrobial peptide functional mechanisms are related to the disruption of the bacterial membrane [12], SR-0379 may exhibit potent antibacterial effects against other antibiotic-resistant strains.

Cellular functions of SR-0379 and its molecular mechanisms

We investigated the effects of SR-0379 on the proliferation, migration and contraction capacity of neonatal normal human dermal fibroblasts (NHDFs) and examined the angiogenic activity of HUVECs in co-culture with NHDFs. In the proliferation assay, the treatment with SR-0379 (1, 3 and 10 µg/ml) resulted in significant increase in the proliferation of fibroblasts in a dose-dependent manner (Fig. 2A). Whereas Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEKs) were treated with SR-0379 (1, 3 and 10 µg/ml), SR-0379 did not affect cell proliferation (Figure S2 in File S1). Similarly, in the tube formation assay, the treatment with SR-0379 (0.5, 2.5 and 10 µg/ml) significantly induced tube formation of HUVECs in co-culture with NHDFs as angiogenic activity (Fig. 2B). In the migration assay, the treatment with SR-0379 (1 and 10 µg/ml) also resulted in significant increases in migration activity (Fig. 2C). In the fibroblast-collagen-matrix contraction assay, the treatment with SR-0379 (1, 3, 10 and 30 µg/ml) significantly induced contraction as a measure of wound healing activity (Fig. 2D). When compared to the activities of FGF2 (0.3 µg/ml), the contraction activity of SR-0379 (30 µg/ml) was more potent, while the other activities were equivalent or less potent in SR-0379. Interestingly, the treatment with SR-0379 significantly increased the mRNA expression of interleukin-8 (IL-8) which was attenuated with pretreatment of Wortmannin (PI3kinase inhibitor, 100 nM) (Figure S3A in File S1). Similarly, the treatment with SR-0379 increased IL-8 protein expression in a dose dependent manner Figure S3B in File S1).

What are the molecular mechanisms of these actions of SR-0379? The phosphorylation effects of SR-0379 on FAK at Tyr397 and Tyr925 and on Akt at Ser473 were examined in NHDFs. As shown in Fig. 3A, treatment with SR-0379 (10 µg/ml) increased the phosphorylation of FAK Tyr397 and Akt Ser473 but not of FAK Tyr925 after 30 minutes, similar to the well-known antimicrobial peptide LL-37. The treatment with SR-0379 at doses of 0.3 to 10 µg/ml also significantly increased the phosphorylation of FAK Tyr397 and Akt Ser473 (Fig. 3B). The involvement of integrins was also tested in NHDFs. Pretreatment with RGD peptide (30, 100 and 300 µM), a small-molecule integrin antagonist, inhibited the activation of FAK and Akt induced by SR-0379 (Fig. 3C). Wortmannin (100 nM) and Rapamycin (1 nM) also inhibited the activation of Akt induced by SR-0379 (Fig. 3D, 3E). The treatment with SR-0379 (10 µg/ml) resulted in a significant increase in cell proliferation of fibroblast, whereas Akt knockdown using siRNA attenuated SR-0379-induced cell proliferation (Figure 3F and Figure S4A in File S1). Similarly, an inhibitor of Akt by Akt inhibitor IV (1 µM) also attenuated SR-0379-induced cell proliferation (Figure S4B in File S1). These results demonstrated the importance of Akt pathway in the effect of SR-0379.

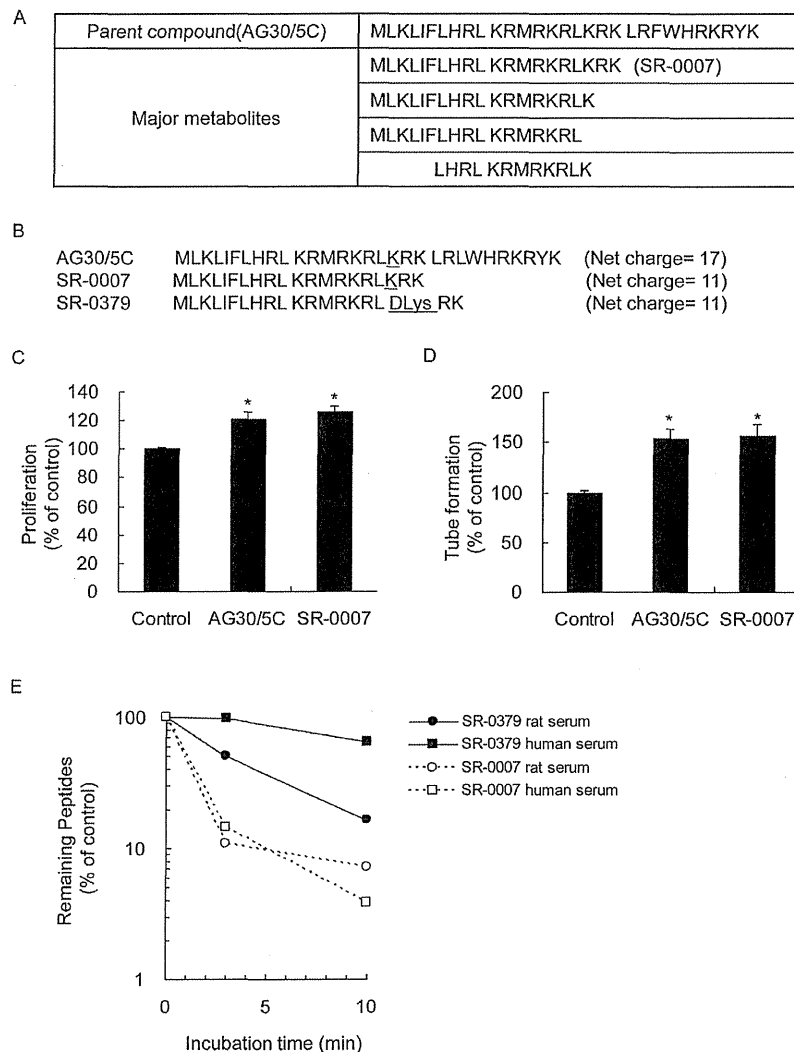


Figure 1. Lead optimization from the angiogenic peptide AG30/5C. A) Major metabolites of AG30/5C determined by MALDI-TOF MS. The parent compound (AG30/5C) was incubated with rat serum *in vitro* 60 minutes. The metabolites were identified by comparison with the pre-incubation peptide. B) Sequences and net charges of AG30/5C and AG30/5C-derived peptides (SR-0007 and SR-0379). The lysine (K) of SR-0007 was replaced with D-lysine in SR-0379. C) Effect of AG30/5C (10 μ g/ml) and SR-0007 (10 μ g/ml) on HUVECs proliferation. N=3 per group. *P<0.05 vs. control. D) Effect of AG30/5C (10 μ g/ml) and SR-0007 (10 μ g/ml) on tube formation. The formation of capillary-like structures was observed in co-cultures of HUVECs and NHDFs. N=5-12 per group. *P<0.05 vs. control. E) Stability of SR-0007 and SR-0379 in rat and human sera. SR-0007 and SR-0379 were quantified before or after incubation *in vitro* with rat and human sera for either 3 or 10 minutes. N=2. doi:10.1371/journal.pone.0092597.g001

Acceleration of wound healing by SR-0379 *in vivo*

To evaluate the potential use of SR-0379 in clinical practice, a full-thickness wound model with a skin flap was employed in a streptozotocin-induced diabetic rat model. On day 2, the wound area was quickly and significantly reduced in the SR-0379 (0.2 mg/ml) group but not in the saline and FGF2 groups (Fig. 4A, 4B). As shown in Fig. 4A, the color of the wound surface on day 6 was red (bloody) in the SR-0379 treatment group. In contrast, the color of the wound surface was still dark with necrotic skin visible in both the saline and FGF2 groups. Reduced wound area in the SR-0379 group was sustained on days 6 and 13 (Fig. 4B). The skin wound was completely healed at day 19 with SR-0379 treatment, whereas the wound did not heal until day 24 with saline treatment (Fig. 4C).

To determine the utility of SR-0379 in a clinical situation, we finally evaluated whether the compound could accelerate wound healing in an acute infection wound model, as the presence of infection largely diminishes the wound-healing process. After creating full-thickness defects, *S. aureus* was inoculated. Treatment with SR-0379 (1 mg/ml) significantly reduced the unhealed wound size on days 8 and 15 compared to the saline and FGF2 groups (Fig. 5A, 5B). The effects of SR-0379 on wound healing were more potent than the effects of FGF2, which is currently a standard therapy (Fig. 4B, 5B). To determine the effect of SR-0379 on wound healing, granulation tissue formation was analyzed by subcutaneously implanting a paper disc (Fig. 5C). Granulation tissue weight was significantly increased by treatment with SR-0379 (100 μ g/disc). To further evaluate the effect of SR-0379 on

Table 1. MICs of several compounds against *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*.

Compound	<i>E. coli</i> (ATCC25922)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC27853)	<i>S. aureus</i> (ATCC29213)
	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
AG30/5C	32	16/32	16/32
SR-0007	64	16/32	16/32
SR-0379	8	16/32	16
Tobramycin	0.25–1	0.25–1	0.12–1
Meropenem	0.008–0.06	0.25–1	0.03–0.12
Oxacillin	-	-	0.12–0.5

The scores indicate the MICs (mg/ml) for *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*. MICs represent the individual data from two independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0092597.t001

wound healing, collagen production and proliferation were measured using the incised wound rat model. The tensile strength after SR-0379 treatment (5 μg) was significantly increased compared to saline treatment. Treatment with SR-0379 induced granulation tissue formation and collagen production, which may accelerate wound healing.

Collagen gel assay is a conventional method to investigate cell behavior that more closely resembles cell behavior *in vivo*. As shown in Figure 2D, the diameter of the collagen gel containing went down by treatment of SR-0379. The promotion of the wound healing with SR-0379 was supported by the enhanced contraction *in vitro*.

Discussion

Recently, wet dressing has been strongly recommended to accelerate the process of wound healing because epithelial cells and dermal fibroblasts proliferate well under wet conditions [13]. However, wounds under wet conditions present an ideal

environment for bacterial growth due to the presence of moisture and warmth. Wound infection has become one of the major risk factors in the delay of wound healing [14], although physicians take many precautions to prevent wound infection. Wound colonization is defined as the presence of multiplying microorganisms on the surface of a wound but with no associated clinical signs and symptoms of infection [15]. Recently, the term critical colonization has gained acceptance and is defined as the borderline of colonization and infection. As wound colonization is most frequently polymicrobial and involves numerous microorganisms that are potentially pathogenic, the diagnosis of clinical colonization is difficult for general physicians in a clinical setting. Recombinant growth factor proteins, such as FGF2 and PDGF, have been shown to stimulate ulcer-healing processes in clinical applications [16,17]. However, the wound might fail to be healed by these growth factors in the event of an infection, as these growth factors have no antibacterial properties. Therefore, a wound-healing drug with antibacterial properties would be ideal to avoid the risk of infection during wound care.

Table 2. *In vitro* activities of SR-0379 against Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi.

		Gram staining	Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
				SR-0379	Chloramphenicol	
Bacteria	Aerobes	G(+)Bacilli	<i>Micrococcus luteus</i>	2	1	
			<i>Bacillus subtilis</i>	2	4	
		G(-)Bacilli	<i>Salmonella</i> Enteritidis	8	4	
			<i>Salmonella</i> Typhimurium	8	4	
			<i>Acinetobacter baumannii</i>	8	16/32	
	Anaerobes	G(-)Bacilli	<i>Propionibacterium acnes</i>	16/32	NT	
			<i>Bacteroides fragilis</i>	32	1	
			<i>Fusobacterium nucleatum</i>	16/32	0.25	
			Strain		SR-0379	Amphotericin B
			<i>Penicillium glabrum</i>		8/16	0.125
Fungi	<i>Fusarium solani</i>		8	1		
	<i>Alternaria alternata</i>		32	1		
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>		32	0.125		
	<i>Trichophyton rubrum</i>		64	0.125		
	<i>Candida krusei</i>		32	2		

The scores indicate the MICs (mg/ml) for gram-positive and gram-negative bacteria and fungi. MICs represent the individual data from two independent experiments. NT: Not tested.

doi:10.1371/journal.pone.0092597.t002

Table 3. *In vitro* activities of SR-0379 against seven strains of drug-resistant bacteria.

Bacteria	Drug resistance	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aminoglycoside-resistant	16
	Carbapenem-resistant	16–64
	Fluoroquinolone-resistant	16/64
<i>Staphylococcus aureus</i>	Methicillin-sensitive	32
	Methicillin-resistant (1)	32
	Methicillin-resistant (2)	32
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Multidrug-resistant	16

MICs represent the individual data from two independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0092597.t003

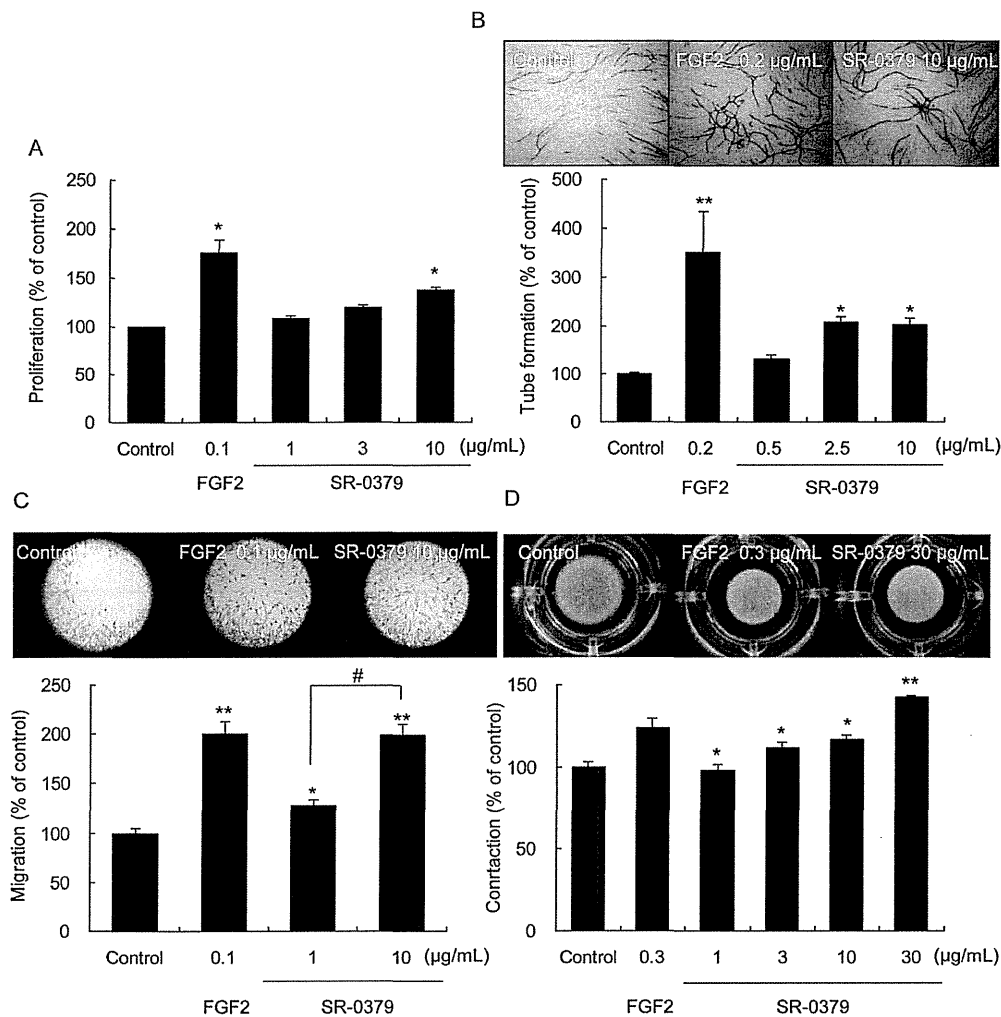


Figure 2. Cellular function of SR-0379. A) Effect of SR-0379 on NHDFs proliferation. NHDFs were treated with SR-0379 (1, 3 and 10 $\mu\text{g/ml}$) or FGF2 (0.1 $\mu\text{g/ml}$). N = 4 per group. * $P < 0.05$ vs. control. B) The upper panel shows representative pictures of tube formation in a co-culture of HUVECs and NHDFs (Control, FGF2: 0.2 $\mu\text{g/ml}$) and SR-0379 (10 $\mu\text{g/ml}$). The lower panel shows the effects of SR-0379 on tube formation in a co-culture of HUVECs and NHDFs. N = 5 per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control. C) The upper panel shows representative pictures of the migration induced by FGF2 (0.1 $\mu\text{g/ml}$) and SR-0379 (10 $\mu\text{g/ml}$). The lower panel shows the effects of FGF2 (0.1 $\mu\text{g/ml}$) and SR-0379 (1 and 10 $\mu\text{g/ml}$) on migration. N = 4 per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control, # $P < 0.01$ vs. SR-0379 (1 $\mu\text{g/ml}$). D) The upper panel shows representative pictures of the fibroblast-collagen-matrix contraction assay with FGF2 (0.3 $\mu\text{g/ml}$) and SR-0379 (1, 3, 10 and 30 $\mu\text{g/ml}$). The lower panel shows the effects of FGF2 (0.3 $\mu\text{g/ml}$) and SR-0379 (1, 3, 10 and 30 $\mu\text{g/ml}$) on fibroblast-collagen matrix contraction. N = 3 per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control.
doi:10.1371/journal.pone.0092597.g002

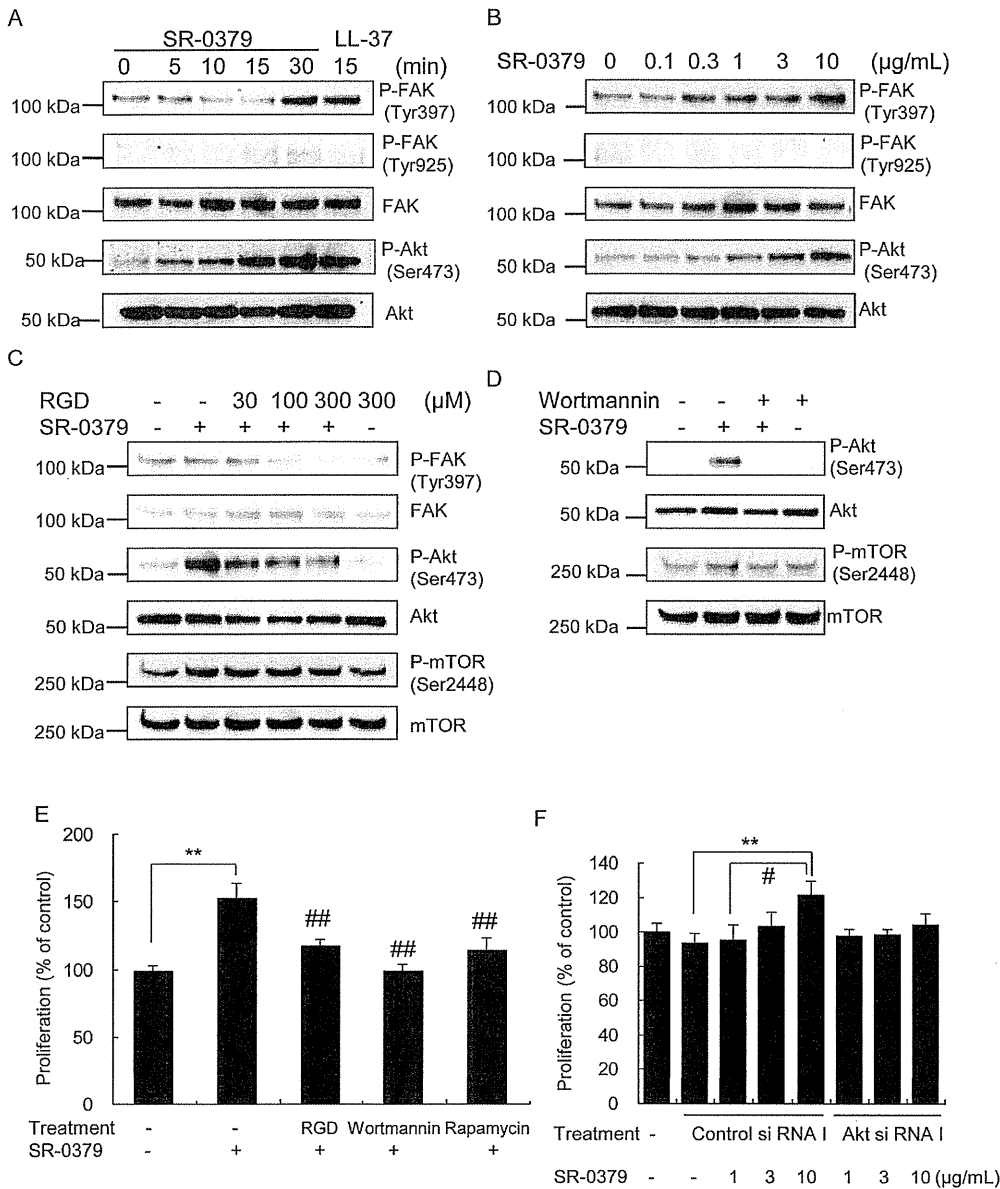


Figure 3. Activation of the PI3 kinase/AKT/mTOR pathway by SR-0379 in NHDFs. A) Effects of SR-0379 on phosphorylated FAK (Tyr397 and Tyr925) and phosphorylated Akt (Ser473) as determined by Western blot. The cells were treated with SR-0379 (10 µg/ml) for 0, 5, 15 and 30 minutes or LL-37 (10 µg/ml) for 15 minutes. B) Effects of SR-0379 on phosphorylated FAK (Tyr397 and Tyr925) and phosphorylated Akt (Ser473) as determined by Western blot. The cells were treated with SR-0379 (0.1, 0.3, 1, 3 and 10 µg/ml) for 30 minutes. C, D) Effects of RGD peptide and wortmannin on the SR-0379-induced phosphorylation of FAK (Tyr397 and Tyr925) and Akt (Ser473) as determined by Western blot. The cells were preincubated with RGD peptide (30, 100 and 300 µM, an inhibitor of integrin-ligand interactions) (C) or wortmannin (100 nM) (D) for 30 minutes and were then treated with SR-0379 (10 µg/ml) for 30 minutes. E) Effects of RGD, wortmannin and rapamycin on the NHDFs proliferation stimulated by SR-0379. The cells were preincubated with RGD (1000 µM), wortmannin (100 nM) or rapamycin (1 nM) for 2 hours and then were treated with SR-0379 (10 µg/ml). N=3 per group. **P<0.01 vs. control, ### P<0.01 vs. SR-0379 (10 µg/ml). F) Effects of Akt knockdown using siRNA on the NHDFs proliferation stimulated by SR-0379. The cells were pretreated with Akt si RNA or Control si RNA for 24 hours and then were treated with SR-0379 (1, 3 and 10 µg/ml). N=4 per group. **P<0.01 vs. control si RNA, # P<0.05 vs. SR-0379 (1 µg/ml) treated with control siRNA. doi:10.1371/journal.pone.0092597.g003

Based on this idea, we developed AG30, an antibacterial peptide with angiogenic activity. Although our previous study demonstrated that AG30/5C is useful to in the treatment of ulcers [8,9], cost and stability are problems for clinical applications. Therefore, in this study, we modified AG30/5C as a lead

compound to achieve 1) more stability upon exposure to serum, 2) lower cost, 3) wider antibacterial activity and 4) rapid wound healing. The initial analysis using the metabolites of AG30/5C revealed that a core sequence of 20 aa (MLKLIFLHRLKRMKRKRLKRRK; SR-0007) was enough to