

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。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、その後に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5×5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