

(対象患者除外基準)

- ・二次性心筋症
- ・心移植を受けた者
- ・その他医師が不適当と認めた者

(臨床研究デザイン)

- ・単群非ランダム化オープン試験
- ・被験者数：3名
- ・主評価項目：安全性評価

(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」にての承認を得て、3例の集積を目標に平成25年8月より臨床研究を開始した。3症例にアフエレーシスを実施し、現在まで医療機器と因果関係がある重篤な有害事象は認めていない。現在最後の症例のアフエレーシス後のフォローアップ期間中である。

## D. 考察

心抑制性心筋自己抗体を測定し、陽性を示す症例の中で同意の得られた3症例に、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を安全に施行することができた。最後の症例のフォローアップ期間が終了後、心抑制性心筋自己抗体の測定と治療前後の心機能の比較等の評価を行い、総括報告書を作成する予定である。

## E. 結論

AMT-0902-1(イムソーバTR)をもちいたアフエレーシス治療に関しては、安全に使用できると考えて

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

## UMIN UMIN CTR 臨床試験登録情報の閲覧

BACK TOP UMIN-CTRホーム 用語の説明(簡易版) 用語の説明(詳細版) 準備中 FAG

**試験進捗状況** : 一般募集中/Open public recruiting  
:(参加医療機関受診により、基準を満たせば被験者となる)

UMIN試験ID : UMIN00012944

試験名 : 左室補助人工心臓(LVAD)を装着した拡張型心筋症に対する免疫吸着療法の安全性の検討

登録日(=情報公開日) : 2014/01/24

最終データ内容更新日時 : 2014/01/30 09:57:33

\* 本ページ掲載の情報は、臨床試験に関する情報公開を目的として、UMINが開発しているUMIN臨床試験登録システムに提供された臨床試験情報です。

\* 特定の医薬品や治療法等については、医療関係者や一般の方に向けて広告することは目的としていません。

基本情報 (Basic information)		
項目 (Item)	日本語 (Japanese)	英語 (English)
試験名 (Official scientific title of the study)	左室補助人工心臓 (LVAD) を装着した拡張型心筋症に対する免疫吸着療法の安全性の検討	Assessment of safety and feasibility of Immunoabsorption Therapy for Dilated Cardiomyopathy Patients with LVAD
試験原題名 (Title of the study (Brief title))	左室補助人工心臓 (LVAD) を装着した拡張型心筋症に対する免疫吸着療法の安全性の検討	Assessment of safety and feasibility of Immunoabsorption Therapy for Dilated Cardiomyopathy Patients with LVAD
試験実施地域 (Region)	日本/Japan	

対象疾患 (Condition)		
項目 (Item)	日本語 (Japanese)	英語 (English)
対象疾患名 (Condition)	拡張型心筋症	Dilated Cardiomyopathy
疾患区分1 (Classification by specialty)	血管外科学/Vascular surgery	
疾患区分2 (Classification by malignancy)	悪性腫瘍以外/Others	
ゲノム情報の取扱い (Genomic information)	いいえ/NO	

目的 (Objectives)		
項目 (Item)	日本語 (Japanese)	英語 (English)
目的1 (Narrative objectives 1)	安全性の評価	Evaluation of safety
目的2 (Basic objectives 2)	安全性/Safety	
目的2 その他詳細 (Basic objectives -Others)		

<https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr.cgi?function=brows&action=brows...> 2014/02/19

試験の性質1 (Trial characteristics 1)	
試験の性質2 (Trial characteristics 2)	
試験のフェーズ (Developmental phase)	

評価 (Assessment)		
項目 (Item)	日本語 (Japanese)	英語 (English)
主要アウトカム評価項目 (Primary outcome)	有害事象の件数	number of adverse event
副次アウトカム評価項目 (Key secondary outcomes)		

基本事項 (Base)		
項目 (Item)	日本語 (Japanese)	英語 (English)
試験の種類 (Study type)	介入/Interventional	

試験デザイン (Study design)		
項目 (Item)	日本語 (Japanese)	英語 (English)
基本デザイン (Basic design)	単群/Single arm	
ランダム化 (Randomization)	非ランダム化/Non-randomized	
ランダム化の単位 (Randomization unit)		
ブラインド化 (Blinding)	オープン/Open -no one is blinded	
コントロール (Control)	無対照/Uncontrolled	
層別化 (Stratification)		
動的割付 (Dynamic allocation)		
試験実施施設の考慮 (Institution consideration)		
ブロック化 (Blocking)		
割付コードを知る方法 (Concealment)		

介入 (Intervention)		
項目 (Item)	日本語 (Japanese)	英語 (English)
群数 (No. of arms)	1	

<https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr.cgi?function=brows&action=brows...> 2014/02/19

介入の目的 (Purpose of intervention)	治療・ケア/Treatment
介入の種類 (Type of intervention)	医療器具・機器/Device/equipment
介入1 (Interventions/Control 1)	3週間で5回の免疫吸着療法を施行する。
介入2 (Interventions/Control 2)	5 sessions of immunoabsorption therapy using Immusorba TR will be performed in 3 weeks
介入3 (Interventions/Control 3)	
介入4 (Interventions/Control 4)	
介入5 (Interventions/Control 5)	
介入6 (Interventions/Control 6)	
介入7 (Interventions/Control 7)	
介入8 (Interventions/Control 8)	
介入9 (Interventions/Control 9)	
介入10 (Interventions/Control 10)	

適格性 (Eligibility)		
項目 (Item)	日本語 (Japanese)	英語 (English)
年齢(下限) (Age-lower limit)	20歳/years-old以上/<=	
年齢(上限) (Age-upper limit)	適用なし/Not applicable	
性別 (Gender)	男女両方/Male and Female	
選択基準 (Key inclusion criteria)	・特発性拡張型心筋症と診断された患者。 ・NYHA心機能分類IV度であり、LVAD装着をしなければ生命の維持が困難な患者 ・LVADを装着した患者	idiopathic dilated cardiomyopathy NYHA Functional Class iv and patient sustaining life by LVAD patient with LVAD
除外基準 (Key exclusion criteria)	・二次性心筋疾患である患者 ・心臓再同期療法 (CRT、CRT-Dの適応) 施行後、6か月以内の患者 ・心臓移植を受けた患者	Secondary DCM Received Cardiac resynchronization therapy (CRT or CRT-D) in the past 6 months Received Heart transplantation
目標参加者数 (Target sample size)	3	

責任研究者 (Research contact person)		
項目 (Item)	日本語 (Japanese)	英語 (English)
責任研究者名 (Name of lead principal investigator)	澤 芳樹	Yoshiki Sawa
所属組織 (Organization)	大阪大学大学院医学系研究科	Osaka University Graduate School of Medicine
所属部署 (Division name)	心臓血管外科	Division of Cardiovascular Surgery
	大阪府吹田市山田丘2-2	2-2 Yamadaoka Suita, Osaka

<https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr.cgi?function=brows&action=brows...> 2014/02/19

住所 (Address)	
電話 (TEL)	06-6879-3154
Eメール (Email)	sawa@surg1.med.osaka-u.ac.jp

試験問い合わせ窓口 (Public contact)		
項目 (Item)	日本語 (Japanese)	英語 (English)
担当者名 (Name of contact person)	吉岡 大輔	Daisuke Yoshioka
組織名 (Organization)	大阪大学大学院医学系研究科	Osaka University Graduate School of Medicine
部署名 (Division name)	心臓血管外科	Division of Cardiovascular Surgery
住所 (Address)	大阪府吹田市山田丘2-2	2-2 Yamadaoka Suita, Osaka
電話 (TEL)	06-6879-3154	
試験のホームページ (Homepage URL)		
Eメール (Email)	yoshioka@surg1.med.osaka-u.ac.jp	

実施責任組織 (Sponsor)		
項目 (Item)	日本語 (Japanese)	英語 (English)
実施責任組織 (Name of primary sponsor)	大阪大学	Osaka University

実施責任組織とは、「試験の計画、解析と結果公表、研究費調達を含めた実施のための運営管理に対して責任を持つ組織」です。英語名でスポンサーとありますが、通常イメージする資金提供者のことではありません。従いまして、「なし」という記載はありません。

研究費提供組織 (Funding Source)		
項目 (Item)	日本語 (Japanese)	英語 (English)
研究費提供組織 (Source of funding)	早期・探索的臨床試験拠点事業	Health and Labour Sciences Research Grants
組織の区分 (Category of Org.)	厚生労働省/MHLW(Japan)	
研究費拠出国 (Nation of funding)	日本	JAPAN

その他の関連組織 (Other related organizations)		
項目 (Item)	日本語 (Japanese)	英語 (English)
共同実施組織 (Name of secondary sponsor(s))		
その他の研究費提供組織 (Name of secondary funder(s))		

<https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr.cgi?function=brows&action=brows...> 2014/02/19

他機関から発行された試験ID (Secondary study IDs)		
項目(Item)	日本語(Japanese)	英語(English)
他機関から発行された試験ID (Secondary study ID)	いいえ/NO	
試験ID1 (Secondary study ID.1)		
ID発行機関1 (Org. issuing Secondary study ID.1)		
試験ID2 (Secondary study ID.2)		
ID発行機関2 (Org. issuing Secondary study ID.2)		
治験種 (IND to MHLW)		

試験実施施設 (Institutions)		
項目(Item)	日本語(Japanese)	英語(English)
試験実施施設名称 (Institutions)		

試験進捗状況 (Progress)		
項目(Item)	日本語(Japanese)	英語(English)
試験進捗状況 (Recruitment status)	一般募集中/Open public recruiting (参加医療機関受診により、基準を満たせば被験者となる)	
プロトコル確定日 (Date of protocol fixation)	2012/10/01	
登録・組入れ開始(予定)日 (Anticipated trial start date)	2012/11/01	
フォロー終了(予定)日 (Last follow-up date)		
入力終了(予定)日 (Date of closure to data entry)		
データ固定(予定)日 (Date trial data considered complete)		
解析終了(予定)日 (Date analysis concluded)		

関連情報 (Related information)		
項目(Item)	日本語(Japanese)	英語(English)

プロトコル掲載URL (URL releasing protocol)	
試験結果の公開状況 (Publication of results)	未公表/Unpublished
結果掲載URL (URL releasing results)	
主な結果 (Results)	
その他関連情報 (Other related information)	

管理情報		
項目(Item)	日本語(Japanese)	英語(English)
登録日 (Date of registration)	2014/01/24	
最終情報更新日 (Date of last update)	2014/01/30 09:57:33	

閲覧ページへのリンク	
日本語URL	https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr.cgi?function=brows&action=brows&receptno=R000015142&type=summary&language=J
英語URL	https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr.cgi?function=brows&action=brows&receptno=R000015142&type=summary&language=E

※ 本ページ記載の情報は、臨床試験に関する情報公開を目的として、UMINが開設しているUMIN臨床試験登録システムに提供された臨床試験情報です。  
 ※ 特定の医薬品や治療法等については、医療関係者や一般の方に向けて広告することは目的としていません。

戻る

UMIN臨床試験登録システムのご使用に関するお問い合わせは、こちらのお問い合わせフォームからお願いいたします。それ以外のお問い合わせは、こちらよりお願い致します。



## 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 20 年間に 2 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、本年度までに、薬効薬理試験、薬物動態試験、製剤最適化を終了した。現在、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の稼働準備中である。さらに、リポソーム製剤を用いた安全性薬理試験・毒性試験を実施中である。

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 20 年間に 2 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しい炎症が生じるため、同部位での血管透過性亢進を利用したリポソーム製剤の高い有効性が期待できる。研究分担者は、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 (PCT/JP2013/064384)。

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。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. 薬効薬理試験（学内で信頼性基準）

ラット心筋梗塞モデルを用い、再灌流時にリポソーム製剤、または製剤の静脈内単回投与を行う。

#### 2. 薬物動態試験（信頼性基準）

3H標識製剤を封入したリポソーム製剤の体内分布を定量オートラジオグラフィ法で解析し、製剤体内分布を検討する。

#### 3. 安全性薬理試験・一般毒性試験

PMDA薬事戦略相談（対面助言）を反映し、Lipo-CsA



を用いた安全性薬理コアバッテリー試験ならびに拡張型単回投与毒性試験を実施する。

### C. 研究結果

#### 基礎的検討

製剤では心筋梗塞サイズ縮小効果はないが、リポソーム製剤で著明な心筋梗塞サイズ縮小効果を認めた。さらに、投与タイミングによる心筋梗塞縮小効果の影響を検討した。

#### GMPリポソーム製剤の組成・製造－PMDA相談

GMPリポソーム製剤の組成・製造については、PMDA相談を反映し、市販リポソーム製剤ドキシルと同様の組成で、ロット間の均一性を担保しつつ製造している。大阪大学医学部附属病院薬剤部での治験薬GMPに基づくリポソーム製造に準備中である。

### C. 考察

基礎的検討では、リポソーム製剤の用量設定、濃度測定の実験系構築、薬理薬効試験、薬物動態試験をおこなった。また、リポソーム製剤のGMP院内製造に向け、1) GMP基準受け入れ態勢の構築と手順書の作成、2) 阪大病院薬剤部にGMP基準対応リポソーム製造機を設置した。GMP基準対応リポソーム製造機では、低分子化合物、ペプチド、核酸製剤も封入可能なため、アカデミアシーズの早期探索臨床試験へのトランスレーショナルを著しく促進することが期待できる。

### D. 結論

本年度は、リポソーム製剤の基礎的検討と、阪大病院薬剤部無菌製剤室に設置するGMP基準対応無菌リポソーム製造装置インフラ整備を中心に行った。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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, Kitakaz 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
- 3) Kioka H, Kato H, Fujikawa M, Tsukamoto O, Suzuki T, Imamura H, Nakano A, Higo S, Yamazaki

S, Matsuzaki T, Takafuji K, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Shintani Y, Yoshida M, Noji H, Kitakaze M, Komuro I, Asano Y, Takashima S. Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 Jan 7;111(1):273-8.

#### 2. 学会発表

○南野哲男

日本循環器学会学術集会総会（2014年3月、東京）  
プレナリーセッション<循環器病学のトランスレーショナルリサーチ>

「Academic Drug Development for Treatment of Acute Myocardial Infarction Using Nano-sized Liposomes」

### G. 知的財産権の出願・登録状況

発明の名称：炎症性疾患治療用医薬組成物

国際出願番号：PCT/JP2013/064384

出願日：平成24年5月23日

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
Ishii T, Asai T, Oyama D, Agato Y, Yasuda N, Fukuta T, Shimizu K, <u>Minamino T</u> , Oku N	Treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury with PEGylated liposomes encapsulating FK506.	The FASWB Journal	Vol.27	1362-1370	Apr.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, <u>Komuro I</u> , Kitakaz M, <u>Minamino T</u>	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
Kioka H, Kato H, Fujikawa M, Tsukamoto O, Suzuki T, Imamura H, Nakano A, Higo S, Yamazaki S, Matsuzaki T, Takafuji K, Asanuma H, Asakura M, <u>Minamino T</u> , Shintani Y, Yoshida M, Noji H, Kitakaze M, Komuro I, Asano Y, Takashima S.	Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation.	PNAS Proc Natl Acad Sci U S A.	Vol.111	273-278.	Jan.2014

## 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

分担研究者 宮川 繁 大阪大学大学院医学系研究科 講師  
研究協力者 福寫 五月 大阪大学大学院医学系研究科 助教

### 【研究要旨】

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。

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、SDF-1、HMGB1 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。

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）モデルにおける最小有効投与量を確認した後、PMDA 対面助言にて追加非臨床試験項目・内容を決定した。現在追加非臨床試験を実施しており、平成 26 年 3Q に PMDA 対面助言にて医師主導治験プロトコルを決定し、年末に First in human（FIH）試験を開始する予定である。

### A. 研究目的

重症心不全（虚血性心筋症および拡張型心筋症）の治療に対し、従来の人工心臓、心臓移植療法や長期培養を有する自己細胞移植療法に代わるような、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り、汎用性の向上および緊急使用可能な心血管・心筋再生療法剤の開発を目的とする。

### B. 研究方法

ONO-1301MS 剤心臓局所投与における各種重症心不全モデルで薬効薬理試験を実施し、有効性を確認している。

1) マウス左冠動脈結紮心筋梗塞モデルに対し、梗塞心筋周囲に ONO-1301MS（4 週間徐放剤）を直接筋注投与し、その効果を検討した。マウスを冠動脈結紮後に、ONO-1301MS（4 週間徐放剤）および ONO-1301 を含まない MS 剤を梗塞周辺部 2 か所に局所投与した。

2) 開心術によりアメリロイドコンストリクターをブタ心臓左回旋枝（LCx）の根部に埋め込み、4 週間後に冠動脈造影（CAG）を施行、LCx 完全閉塞を認めたブタを対象とした。ONO-1301MS 剤（4 週間徐放剤）および ONO-1301 を含まない MS 剤を虚血周辺部の心筋内に投与し、2 群間比較を行った。

3) ONO-1301MS（3 週間徐放剤）を用いて、イヌ高速ペーシング（拡張型心筋症）モデルで誘発された拡張型心筋症モデルに対する心機能改善効果の検討を行った。心室ペーシングは 240 ビート/分で、4 週間処理を行い、4 週後に、ONO-1301 を含まない MS 群および ONO-1301MS 群の 2 群に分け、左室心筋内に投与を行った。

4) 心筋梗塞マウスへの ONO-1301MS（4 週間徐放剤）心臓貼付の治療効果に関して、骨髄由来細胞の影響について検討した。

5)  $\delta$ -筋グリカン欠損自然発症拡張型心筋症モデルである J2N-K ハムスターに、ONO-1301MS（4 週間徐放剤）をアテロコラーゲン膜に浸透させたシートを心

臓に直接貼付投与群、ONO-1301を含まないMS剤群、および正常群にて比較を行った。

6) ミニブタ陳旧性心筋梗塞(OMI)モデルを用いて、ONO-1301MS(4週間徐放剤)心臓貼付投与での心機能改善効果を示す最小有効投与量を検討した。

#### (倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

1) 28日後の、生存曲線では、薬物投与群で有意な延長が認められ、心破裂を抑制し、心エコー図でも心機能改善効果が認められた。組織学的評価では、梗塞サイズの縮小、心筋細胞の肥大化、間質の線維化を抑制した。また7日目の免疫組織学的検査では毛細血管密度は薬剤投与群で増加し、HGFおよびVEGFのmRNAの増加が確認され、これらの作用は抗HGF/抗VEGF抗体投与により減弱した。

2) ONO-1301MS投与群では、多数の側副血行路が形成され、さらにNOGAシステムによる拡張末期容量(LVSDV)は、投与群で少なく心筋リモデリングを抑制した。さらに、8週後に採取した心臓内虚血部位のCD31陽性細胞は、投与群で有意に多数であった。ONO-1301MSは心筋内の血管新生を促進し、心筋リモデリングを抑制した。

3) 心エコー検査および心カテーテル検査ではONO-1301MS投与により有意な縮小作用を示した。また、組織学的検査において、心筋線維化面積およびcell diameterはONO-1301投与により有意に縮小していた。電顕検査において、ミトコンドリアの変化がONO-1301投与により回復していた。これらの結果は、ONO-1301MSにより誘導された幾つかの体内再生因子による血管新生・心筋再生効果によることが示唆された。(論文1)

4) ONO-1301MSまたはONO-1301を含まないMS剤をアテロコラーゲン膜に浸透させたシートを心臓表面に貼付することにより、ONO-1301MS群で4週間後の梗塞周辺部において、SDF-1、HGF、VEGFは上昇していた。骨髓細胞をGFP陽性細胞により置換したマウスを用いて、冠動脈完全閉塞心筋梗塞モデルにONO-1301MSシート貼付し、2ヵ月後に検討した結果、心筋梗塞部にGFP陽性細胞が存在し、そのいくつか

は毛細血管の構成部に存在していた。また、ONO-1301MS投与群において、LV壁は肥厚し、梗塞面積は縮小しており、生存率の延長も認めた。ONO-1301MSの心筋貼付により、体内再生因子(SDF-1)を産生促進し、骨髓細胞から梗塞部へ修復細胞を補充することにより、心筋梗塞を治癒することが示唆された。(論文2)

5) ONO-1301群で有意な生存率の延長、及び心エコー検査により、心機能の有意な改善効果が認められた。また、ONO-1301投与により毛細血管数の増加とコラーゲン蓄積の減少が認められた。ONO-1301MSシートにより、拡張型心筋症発症により障害を受けた心筋を再生することが示唆された。(論文3)

6) 心エコー検査(LVEF)において、心臓貼付における最小有効投与量は0.3mg/kgであることが確認された。(学会発表1)

### D. 考察

虚血性心筋症および拡張型心筋症モデルを用いたONO-1301MS剤の心筋内投与およびアテロコラーゲンシートを用いたONO-1301MS剤懸濁の心臓貼付投与における有効性は、すでにマウス、ハムスター、イヌ、ブタモデルにおいて心機能、梗塞面積、線維化面積、生存率において確認しているが、臨床投与予定ルート(ゼラチンシートにONO-1301MSを吸収させ心臓梗塞部に貼付)におけるブタ虚血性心筋症モデルでの有効性薬理試験では、最小有効投与量は0.3mg/kgであることが確認された。長期有効性に関しては、現在実施中である。

### E. 結論

今後、臨床投与予定ルート(ゼラチンシートにONO-1301MSを吸収させ心臓梗塞部に貼付)における虚血性心筋症モデルにおいて、最小有効投与量は0.3mg/kgであった。これらの有効性薬理試験結果から、臨床試験開始に必要な非臨床試験項目を決定し、PMDA対面助言にて確認後、現在実施中である。これらの結果とFIH試験プロトコル(案)の確認を平成26年3QにPMDA対面助言にて行う予定である。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Imanishi Y, Miyagawa S, Fukushima S, Ishimaru K, Sougawa N, Saito A, Sakai Y, Sawa Y  
Sustained-release delivery of prostacyclin analog



l infarction in mice. PLoS One. 2013 Jul 19;8 (7):1-8

2) T. Shirasaka, S. Miyagawa, S. Fukushima, A. Saito, M. Shiozaki, N. Kawaguchi, N. Matsuura, S. Nakatani, Y. Sakai, 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 J Thorac Cardioasc Surg. 2013 Aug;146(2):413-421

3) Ishimaru K, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Sakai Y, Ueno T, Sawa Y.

Synthetic prostacyclin agonist, ONO1301, enhances endogenous myocardial repair in a hamster model of dilated cardiomyopathy: a promising regenerative therapy for the failing heart.

J Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Dec;146(6):1516-1525.

4) Kubota Y, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Watabe H, Daimon T, Sakai Y, Akita T, Sawa Y.

Impact of cardiac support device combined with slow-release prostacyclin agonist in a canine ischemic cardiomyopathy model. J Thoracic Cardiovascular Surgery Vol.147 #3 1081-1087

## 2. 学会発表

1) Hiroki Mizoguchi ; Shigeru Miyagawa ; Satsuki Fukushima ; Atsuhiko Saito ; Yoshiki Sakai ; Yukiko Imanishi ; Akima Harada ; Takayoshi Ueno ; Koich Toda ; Toru Kuratani ; Yoshiki Sawa

A Novel Therapeutic Technology of Long-Acting Prostacyclin Agonist for Mature Porcine Ischemic Heart Model AHA2013(American Heart Association Nov.2013, Dallas)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

1) ONO-1301類新規作用機序、適応症、ONO-1301MS製剤特許:「内因性修復因子産生促進剤」

出願日:2003年10月9日

国際出願番号:W02004/032965

出願国:日米欧取得:米(US7,547,715B2)日(特許第4497320号)、欧(EP1563846)

2) ONO-1301MS個別製剤・製法特許:「組織再生治療用徐放性製剤」

出願日:2007年10月18日

国際出願番号:W02008/047863

出願国:日米欧;米・欧取得済

3) ONO-1301MS心臓貼付剤・ネット併用:「心筋・血管再生デバイスとしての重症心不全治療材」

出願日:2012年9月13日

特願2012/208799、PCT出願番号:JP2013/74948

4) ONO-1301MS静注肺DDS:「肺疾患特異的治療剤」

出願日:2012年10月29日

特願2012/238017、PCT出願番号:JP2013/79134

5) ONO-1301MSステントグラフト:「薬剤溶出性ステントグラフト」

出願日:2013年10月15日、

特願2013/215067

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
Imanishi Y, <u>Miyagawa S</u> , Fukushima S, Ishimaru K, Sougawa N, Saito A, Sakai Y, <u>Sawa Y.</u>	Sustained-release delivery of prostacyclin analogue enhances bone marrow-cell recruitment and yields functional benefits for acute myocardial infarction in mice.	PLoS One.	Vol.8 Issue 7 e69302	1-8	2013
T.Shirasaka , <u>S.Miyagawa</u> , S.Fukushima, <u>A.Saito</u> M.Shiozaki, N.Kawaguchi, N.Matsuura, S.Nakatani, Y.Sakai, T.Daimon, Y.Okita, <u>Y.Sawa</u>	A slow-releasing form of prostacyclin agonist(ONO1301SR) enhances endogenous secretion of multiple cardiotherapeutic cytokines and improves cardiac functiuon in a rapid-pacing-induced model of canineheart failure	J Thoracic Cardiovascular Surgery	Vol.146 #2	413-421	2013
Ishimaru K, <u>Miyagawa S</u> , Fukushima S, Saito A, Sakai Y, Ueno T, <u>Sawa Y.</u>	Synthetic prostacyclin agonist, ONO1301, enhances endogenous myocardial repair in a hamster model of dilated cardiomyopathy: a promising regenerative therapy for the failing heart.	J Thoracic Cardiovascular Surgery	Vol.146 #6	1516-1525	2013
Kubota Y, <u>Miyagawa S</u> , Fukushima S, Saito A, Watabe H, Daimon T, Sakai Y, Akita T, <u>Sawa Y.</u>	Impact of cardiac support device combined with slow-release prostacyclin agonist in a canine ischemic cardiomyopathy model.	J Thoracic Cardiovascular Surgery	Vol.147 #3	1081-1087	2014

## 慢性心不全治療薬としてのHGFプラスミドの開発

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  
研究分担者 宮川 繁 大阪大学大学院医学系研究科 講師  
研究分担者 森下 竜一 大阪大学大学院医学系研究科 寄附講座教授

### 【研究要旨】

国内で発見された 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を目標に、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。

本薬は遺伝子治療用医薬品であり遺伝子治療の確認申請制度廃止後の「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保について」（平成 25 年 7 月 1 日薬食審査発 0701 第 4 号別添）の指針に規定された品質及び安全性に係る基本的な技術要件を満たす必要がある。これらの確保の確認に加えて、臨床試験デザインや実施計画書の内容についても、PMDA 薬事戦略相談対面助言を活用し、医師主導治験の準備を進める。IRB 申請や治験届に必要な書類を準備し、本事業期間中の平成 26 年度内の医師主導治験の開始に向け、体制を整備する。

### A. 研究目的

国内で発見されたHGF\*プラスミド(\*ヒト肝細胞増殖因子/hepatocyte growth factor:HGF)は国内企業(アンジェスMG株式会社 以下、アンジェス社)では、末梢動脈疾患やリンパ浮腫に対する血管・リンパ管新生促進薬としての開発がなされている薬剤であるが、またこのHGFプラスミドは各種の心不全モデル動物において抗線維化作用、心筋細胞に対する抗アポトーシス作用や血管新生作用による心機能改善効果が認められている。

慢性心不全では、内因性HGF量の低下がみられ、心筋細胞の変性、喪失、線維化等が生じている。HGF プラスミドの投与により一定期間持続的に産生したHGFは、オートクライン・パラクライン効果により内在性のHGFの産生をも増強させる。

本剤投与による治療は、国内で推定患者数100~250万人と言われ年々増加傾向にあるとされる慢性心不全に対するHGFの補充療法にあたり、病態の進行を抑え、心機能をもとの状態に近づけることで重症心不全患者の救命や生活の質(quality of life: QOL)を改善することが期待される。同時に、超高齢化社会における医療費の抑制にも資するものと期待する。

### B. 研究方法

アンジェス社では、重症安定狭心症患者を対象に、HGFプラスミドのインジェクションカテーテルによる左室心筋内投与による第I相臨床試験を、米国にて実施しており、この時安全性に問題がなかった事が確認されている。重篤な有害事象はすべて本剤との関連性は否定されており、本剤との関連性の可能性ありと判断された副作用は、心室性頻脈1例1件(4mg群)であった。その他の有害事象や副作用に関しては投与手技かデバイス(心筋内投与用カテーテル)に関連するものであった。

今回我々は、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(第I相臨床試験)を計画しているが、より確実な心筋内への投与方法であることから副作用の発生頻度も低くなりより安全であると考えている。同時に上記の米国での試験以上の効果が期待される。

医師主導治験(第I相臨床試験) 骨子

1) 概要: 開胸下で HGF プラスミドを投与し、投与後観察期間(AMG0001 投与 24 週後まで)及び追

跡期間（AMG0001 投与 48 週後まで）、安全性の評価を実施する。合わせて有効性に係る予備的な検討を行なう。

2) 対象患者：最大限の内科的治療及び外科的治療が行われた NYHA 心機能分類 III 又は IV 度に該当する虚血性心筋症を基礎疾患とする慢性心不全患者

3) 投与量・方法：4.0mg の HGF プラスミドを 2mL に希釈調製し、MIDCAB により左室側壁の心筋 10 箇所に投与する（1 部位あたりの投与量が 0.2mL）。

4) 目標症例数：3 例

5) 選択基準：

- (1) 治験参加に本人の自由意思による文書同意が得られた患者。
- (2) 同意取得時の年齢が 20 歳以上 85 歳未満であること。性別不問。
- (3) 虚血性心筋症と診断された患者。
- (4) NYHA 心機能分類 III 又は IV 度の心不全患者。
- (5) 病変部位が特定可能で、心臓を脱転することなく投与可能な患者。
- (6) スクリーニング検査、又は治験薬投与前 8 週以内の心エコーのデータにおいて、安静時の左室駆出率（left ventricular ejection fraction:LVEF）が 40%以下の患者。
- (7) ジギタリス、利尿剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬や β 遮断薬等による最大限の内科的治療が行われている患者。
- (8) 冠動脈バイパス術、左室形成術、僧帽弁形成術等の最大限の外科的治療が行われている患者。
- (9) 経皮的冠動脈インターベンション、両心室ペースメーカー心臓再同期療法(cardiac resynchronization therapy: CRT)、又は植込み型除細動器（implantable cardioverter defibrillator: ICD）等の措置が施され、当該治療効果が不十分で有症状の患者。若しくは、当該措置が適用されず、有症状の患者。

6) 評価項目：

- ・安全性（有害事象、一般臨床検査、理学的検査による心不全症状、バイタルサイン及び心電図）
- ・探索的な有効性の検討項目：
  - (1) 心機能評価：心エコー、CT、Gated SPECT（<sup>99m</sup>Tc-MIBI）
  - (2) 臨床評価：自覚症状、NYHA 心機能分類
  - (3) 運動耐容能：6 分間歩行試験、Specific Activity Scale (SAS)
  - (4) QOL 評価：SF-36
  - (5) BNP 検査

#### （倫理面への配慮）

- 1) 研究対象者に対する人権擁護上の配慮、不利益、危険性の排除や説明と同意に関する状況：本年度は人を対象とした研究を実施していないため該当しない。今後予定される臨床試験においては「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」（厚労省通知）、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」（GCP 省令）、ヘルシンキ条約などを厳守し被験者保護を最優先に実施する予定である。
- 2) 実験動物に対する動物愛護上の配慮：本研究で行ったすべての動物実験は、大阪大学実験動物倫理委員会の承認を受けており、最大限の配慮のもとに実施した。
- 3) 基礎的研究においては、遺伝子組み換え生物などの使用などの規制による生物多様性の確保に関する法律、カルタヘナ条約など各種法令・告示・通知に基づき研究を実施した。

#### C. 研究結果

PMDA薬事戦略相談対面助言を実施して、遺伝子治療の確認申請制度廃止後の「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保について」（平成25年7月 | 日薬食審査発0701第4号別添）の指針に規定された品質及び安全性に係る基本的な技術要件を満たす事を確認した。又、実施計画書の内容に関してもPMDAからの助言を受け、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HGFプラスミドの臨床での安全性の確認を目標に医師主導治験の準備を進めることとした。臨床試験デザインの詳細について検討し、各種手順書、実施計画書、試験薬概要書、患者説明文書を作成し、その他IRB申請に必要な書類を準備した。これら以外の文書作成も開始し、本事業期間中の平成26年度内の医師主導治験の開始に向け、体制を整備中である。

品質部分に関しては治験薬提供企業であるアンジェス社より提供される予定であり、その為の契約書の作成も進めた。

#### D. 考察

本剤は遺伝子治療用医薬品であるため、治験の実施に先立ち、「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保について」の指針に規定された品質及び安全性に係る基本的な技術要件を満たす事が必要である。

非臨床安全性に関しては、アンジェス社が米国の試験と同投与経路にて行っており、本医師主導治験

を行うにあたり、現行の非臨床安全性試験で十分と考えている。また、治験薬はアンジェス社より提供を受ける予定であり、どちらも基本的な要件を満たすことを薬事戦略相談の対面助言で確認できた。

医師主導治験では胸部左側方に小切開を施行し、HGFプラスミドを病変部位の心筋内に直接投与する。米国第I相臨床試験において、既にヒトへの投与がなされており、特に本剤による副作用は問題となっていないことや、手技的にもより確実に投与できるため、開胸下投与での本剤によるリスクが増強する可能性は低いと考える。医師主導治験の計画の内容に関しても薬事戦略相談対面助言を実施してPMDAからの助言を受け、患者の安全性に配慮しながら第I相の臨床試験を計画している。

#### E. 結論

品質、及び非臨床部分は薬事戦略相談対面助言にてPMDAとの確認を行ない整備を終了した。臨床部分は平成26年度内の医師主導治験の開始に向け、体制を整備している。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

医師主導治験終了後速やかに臨床試験報告書を作成するとともに、内容を論文にまとめ投稿予定である。

##### 学会発表

論文作成と平行して学会への発表も予定している。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 特許取得

- 1) 発明の名称：HGF遺伝子からなる医薬  
PCT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
- 2) 発明の名称：心筋症遺伝子治療  
PCT出願番号：PCT/JP/06947  
出願日： 2000年10月5日



### Ⅲ. 研究成果の刊行に 関する一覧表(集約版)



研究成果の刊行に関する一覧表 (集約表)

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
Furumoto T, Ozawa N, Inami Y, Toyoshima M, Fujita K, Zaiki K, Sahara S, Akita M, Kitamura K, Nakaoji K, Hamada K, <u>Tamai K</u> , Kaneda Y, Maeda A.	Mallotus philippinensis bark extracts promote preferential migration of mesenchymal stem cells and improve wound healing in mice.	Phytomedicine.	Vol. 21 Issue 3	247-253	2014
Umegaki-Arao N, <u>Tamai K</u> , Nimura K, Serada S, Naka T, Nakano H, Katayama I.	Karyopherin Alpha2 Is Essential for rRNA Transcription and Protein Synthesis in Proliferative Keratinocytes.	PLOS ONE (Public Library of Science, PLOS)	Vol.8 Issue 10	1-9 e76416	2013
Tomioka H, <u>Nakagami H</u> , 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	Vol. 9 Issue 3	1-11 e92597	2014
Ishii T, Asai T, Oyama D, Agato Y, Yasuda N, Fukuta T, Shimizu K, <u>Minamino T</u> , Oku N	Treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury with PEGylated liposomes encapsulating FK506.	The FASWB 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, <u>Komuro I</u> , Kitakaz M, <u>Minamino T</u>	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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kioka H, Kato H, Fujikawa M, Tsukamoto O, Suzuki T, Imamura H, Nakano A, Higo S, Yamazaki S, Matsuzaki T, Takafuji K, Asanuma H, Asakura M, <u>Minamino T</u> , Shintani Y, Yoshida M, Noji H, Kitakaze M, Komuro I, Asano Y, Takashima S.	Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation.	PNAS Proc Natl Acad Sci U S A.	Vol.111	273-278.	.2014
Imanishi Y, <u>Miyagawa</u> S, Fukushima S, Ishimaru K, Sougawa N, Saito A, Sakai Y, <u>Sawa</u> <u>Y.</u>	Sustained-release delivery of prostacyclin analogue enhances bone marrow-cell recruitment and yields functional benefits for acute myocardial infarction in mice.	PLoS One.	Vol.8 Issue 7 e69302	1-8	2013
T.Shirasaka <u>S.Miyagawa</u> , S.Fukushima, <u>A.Saito</u> , M.Shiozaki, N.Kawaguchi, N.Matsuura, S.Nakatani, Y.Sakai,, T.Daimon, Y.Okita, <u>Y.Sawa</u>	A slow-releasing form of prostacyclin agonist(ONO1301SR) enhances endogenous secretion of multiple cardiotherapeutic cytokines and improves cardiac functiuon in a rapid-pacing-induced model of canineheart failure	J Thoracic Cardiovascular Surgery	Vol.146 #2	413-421	2013
Ishimaru K, <u>Miyagawa</u> S, Fukushima S, Saito A, Sakai Y, Ueno T, <u>Sawa Y.</u>	Synthetic prostacyclin agonist, ONO1301, enhances endogenous myocardial repair in a hamster model of dilated cardiomyopathy: a promising regenerative therapy for the failing heart.	J Thoracic Cardiovascular Surgery	Vol.146 #6	1516-1525	2013

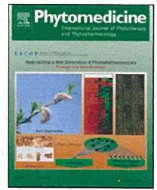
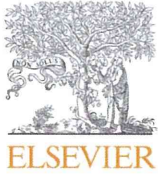
発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kubota Y, <u>Miyagawa S</u> , Fukushima S, Saito A, Watabe H, Daimon T, Sakai Y, Akita T, <u>Sawa</u> <u>Y</u> .	Impact of cardiac support device combined with slow-release prostacyclin agonist in a canine ischemic cardiomyopathy model.	J Thoracic Cardiovascular Surgery	Vol.147 #3	1081-1087	2014

### 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
玉井克人	表皮水疱症に対する再 生医療の現状と未来	天谷雅行	皮膚科臨床アセ ット:19巻、水疱 性皮膚疾患	中山書店	東京	2014	196-201
玉井克人	表皮水疱症の再生医療	宮地良樹	WHAT' S NEW in 皮膚科学	メディカル レビュー社	東京	2014	26-27

# IV. 研究成果の 刊行物・別刷





## *Mallotus philippinensis* bark extracts promote preferential migration of mesenchymal stem cells and improve wound healing in mice



Tadashi Furumoto<sup>a</sup>, Noriyasu Ozawa<sup>a,b</sup>, Yuta Inami<sup>a,b</sup>, Misaki Toyoshima<sup>a,b</sup>, Kosuke Fujita<sup>a,b</sup>, Kaori Zaiki<sup>a,b</sup>, Shunya Sahara<sup>a,b</sup>, Mariko Akita<sup>a,b</sup>, Keiko Kitamura<sup>a,b</sup>, Koichi Nakaoji<sup>a,b</sup>, Kazuhiko Hamada<sup>b</sup>, Katsuto Tamai<sup>c</sup>, Yasufumi Kaneda<sup>d</sup>, Akito Maeda<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Skin Regeneration, PIAS Collaborative Research, UIC, Osaka University, Japan

<sup>b</sup> Research & Development Division, PIAS Corporation, Japan

<sup>c</sup> Division of Stem Cell Therapy Science, Graduate School of Medicine, Osaka University, Japan

<sup>d</sup> Division of Gene Therapy Science, Graduate School of Medicine, Osaka University, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 July 2013

Accepted 19 September 2013

#### Keywords:

Phenolic compounds

*Mallotus philippinensis*

Mesenchymal stem cells

Migration

Wound healing

### ABSTRACT

In the present study, we report the effects of the ethanol extract from *Mallotus philippinensis* bark (EMPB) on mesenchymal stem cell (MSC) proliferation, migration, and wound healing *in vitro* and in a mouse model. Chemotaxis assays demonstrated that EMPB acted an MSC chemoattractant and that the main chemotactic activity of EMPB may be due to the effects of cinnamtannin B-1. Flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells in EMPB-injected mice indicated that EMPB enhanced the mobilization of endogenous MSCs into blood circulation. Bioluminescent whole-animal imaging of luciferase-expressing MSCs revealed that EMPB augmented the homing of MSCs to wounds. In addition, the efficacy of EMPB on migration of MSCs was higher than that of other skin cell types, and EMPB treatment improved of wound healing in a diabetic mouse model. The histopathological characteristics demonstrated that the effects of EMPB treatment resembled MSC-induced tissue repair. Taken together, these results suggested that EMPB activated the mobilization and homing of MSCs to wounds and that enhancement of MSC migration may improve wound healing.

© 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) are capable of differentiating into various cells and secrete numerous pro-regenerative factors, thereby enabling the regeneration of damaged tissue (Phinney and Prockop 2007). MSCs are found in the bone marrow or perivascular regions of blood vessels (Crisan et al. 2008) and express Sca-1 and platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)  $\alpha$  on the cell surface (Morikawa et al. 2009). Several studies have indicated that MSCs migrate to the wound site during wound healing (Fathke et al. 2004; Sasaki et al. 2008). MSCs are used as cell therapy for several diseases because they can be easily isolated (Vojtassak et al. 2006). Therefore, methods for enhancing the mobilization and homing of MSCs to wounds have the potential to improve the effectiveness of wound healing.

*Mallotus philippinensis* Muell-Arg (Euphorbiaceae) has been widely used in traditional medicine (Sharma and Varma 2011). In a preliminary screening experiment, the ethanol extract of *M. philippinensis* bark (EMPB) was found to activate MSC migration *in vitro* (Furumoto et al., unpublished data). In the present study, we characterized the migratory activity of MSCs after EMPB treatment and examined the effects of EMPB on wound healing in mice in order to identify novel EMPB components with the ability to enhance MSC migration.

### Materials and methods

#### Preparation of the extract

*M. philippinensis* from Nepal was purchased from MARUZEN PHARMACEUTICALS Ltd. (Hiroshima, Japan). Chopped bark from *M. philippinensis* was extracted for 2 h with aqueous ethanol (80%, v/v) by reflux extraction. The isolated extract was adjusted to have an ethanol concentration of 50% v/v, dried, and collected as a powder of EMPB.

\* Corresponding author at: Skin Regeneration, PIAS Collaborative Research, UIC, Osaka University, 2-1 Yamada-oka, Suita 565-0871, Japan. Tel.: +81 6 6816 8456; fax: +81 6 6816 8460.

E-mail address: [amaeda@uic.osaka-u.ac.jp](mailto:amaeda@uic.osaka-u.ac.jp) (A. Maeda).

### HPLC fingerprint analysis

Separation of the extract was performed using the Wakosil-II 5C18HG HPLC column (Wako, Japan) in 0.172% phosphoric acid containing 12.5% acetonitrile and 1.5% tetrahydrofuran. The flow rate was 1 ml/min at 40 °C, and detection was carried out at 280 nm. LC–MS was performed using the Xevo G2 Tof system (Waters, Milford, USA). The mobile phase consisted of solvent A (0.1% formic acid/H<sub>2</sub>O) and solvent B (0.1% formic acid/MeCN). Gradient elution was performed (0–1 min A:B, 90:10; 1–8 min A:B, 90:10 → 0:100; 8–9 min A:B, 0:100; and 9–10 min A:B, 90:10) at a flow rate of 0.4 ml/min. Mass spectrometry was performed in the negative ion mode. The NMR values of cinnamtannin B-1 in peak 3 were analyzed as described previously (Kamiyama et al. 2001).

### In vitro assays

KUM6 cells were provided by the RIKEN, Japan. NIH-3T3 and RAW264.7 cells were cultured in DMEM containing 10% FBS and 2 mM L-glutamine. Normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) were purchased from KURABO Industries Ltd. (Osaka, Japan). Maintenance of human aortic endothelial cells (HAECs), proliferation assay, migration assay, and real-time PCR with primers of type I collagen were carried out as described previously (Nishikawa et al. 2009).

### In vivo experiments

Mice were obtained from Clea Japan (Osaka, Japan). All experimental protocols were approved by the Osaka University Graduate School of Medicine Standing Committee on Animals. In MSC mobilization assay, nucleated cells in blood were analyzed as described previously (Tamai et al. 2011). In MSC homing assay, full-thickness wounds (0.8 cm in diameter) were created and AteloCell (Koken Co. Ltd., Tokyo, Japan) containing EMPB was topically applied. At 4 days post surgery (day 0),  $2.5 \times 10^5$  KUM6 cells transiently transfected with an expression vector for firefly luciferase, pGL4.50 (Promega, USA) were injected into the tail veins of mice. Bioluminescence was measured as described previously (Battula et al. 2010). In the wound healing model, full-thickness wounds (1.5 cm in diameter) were made as previously described (Greenhalgh et al. 1990). EMPB

was topically applied 3 times per week. Serial sections from the wound were evaluated with H&E staining,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA; DAKO, Glostrup, Denmark) immunostaining, and Masson Trichrome staining.

### Statistical analysis

Results are expressed as means  $\pm$  SE. Statistically significant differences between control and other groups were determined using the Dunnett's test. \* and \*\* corresponded to  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

## Results

### HPLC fingerprint analysis of EMPB

HPLC profiles of EMPB (Fig. 1) showed that EMPB consists of 3 compounds eluting with different retention times. The individual compounds were further characterized by LC/MS and identified as protocatechuic acid (peak 1, 5.788 min), salicylic acid (peak 2, 7.676 min), and cinnamtannin B-1 (peak 3, 12.817 min). In terms of abundance, peaks 1, 2, and 3 accounted for 52%, 17%, and 31% of total EMPB composition, respectively. LC/MS signals for condensed tannins were also observed in minor peaks.

### Effects of EMPB on MSC proliferation and migration

We examined the effect of EMPB and its constituents on the proliferation of mouse MSC cells KUM6 (Umezawa et al. 1992) by MTS assays, and on the migration of KUM6 cells by Boyden chamber migration assay. The proliferation of KUM6 cells was enhanced in EMPB (0.16–4  $\mu$ g/ml) (Fig. 2A), whereas EMPB was toxic at 20  $\mu$ g/ml. The migratory activity of KUM6 cells increased with 0.8–4  $\mu$ g/ml EMPB, as compared with the control (Fig. 2B). Cinnamtannin B-1 promoted the proliferation and migration of KUM6 cells when used at concentrations of 0.16–20  $\mu$ g/ml and 0.8–4  $\mu$ g/ml, respectively (Fig. 2C and D), whereas protocatechuic acid caused only a slight increase in the proliferation at high concentrations (Fig. 2E and F). Salicylic acid did not affect either proliferation or migration under comparable conditions (Fig. 2G and H). These results strongly suggest that EMPB enhances the proliferation and

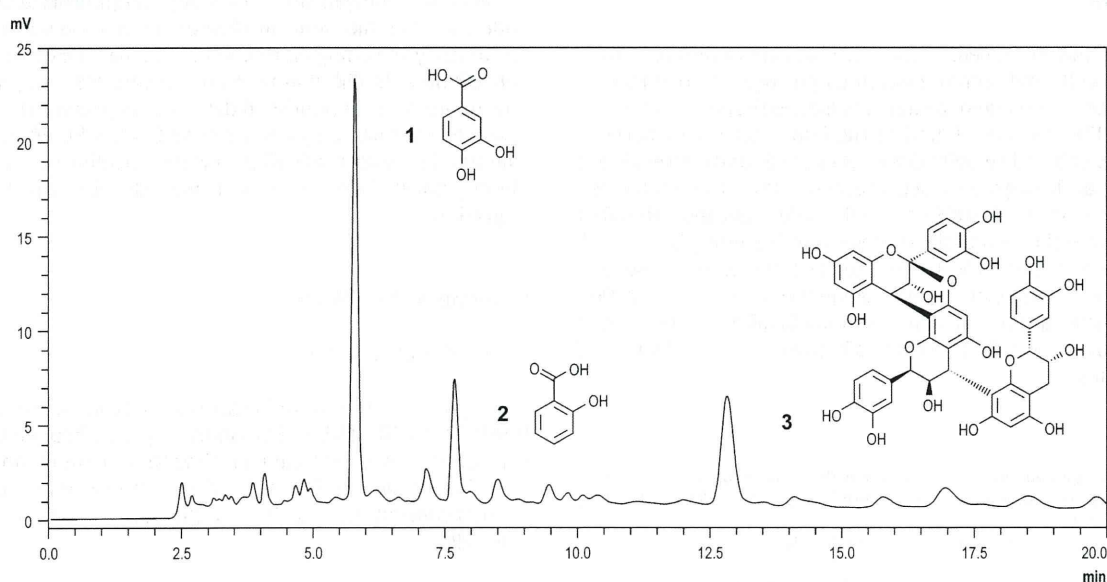


Fig. 1. HPLC analysis of EMPB composition.