

## 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 25 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最適化を終了し、医師主導治験実施に必要な非臨床安全性試験プロトコル内容を確定した。

### 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・瘢痕形成を抑制し、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。

昨年度までに我々は 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。平成 25 年度は、これらの研究成果を基にして最終候補化合物を決定するとともに、非臨床安全性試験内容の確定作業を進めた。

### B．研究方法

HMGB1 ペプチド医薬の最適化作業により選定された候補化合物について、間葉系幹細胞培養株 ST2 を用いた遊走活性試験およびマウス血中投与による間葉系幹細胞血中動員活性試験を実施した。これら実験で得られた容量-薬効相関を基にしてヒト投与量を概算し、その数値を基に医師主導治験 Phase I 試験開始に必要な非臨床安全性試験プロトコルを作成した。

1) 間葉系幹細胞株 ST2 を用いた遊走活性試験：遊走活性を評価する目的で作成された培養チャンパー

（中央に着脱式プラスチック製隔壁のある培養皿）内に ST2 細胞を播種・培養し、サブコンフルエント状態で中央隔壁を脱着して帯状の無細胞ゾーンを作成、同時に評価化合物（HMGB1 ペプチド）または溶媒（PBS）コントロールを添加して、以後経時的に ST2 の無細胞ゾーンへの遊走程度を比較評価した。

2) 間葉系幹細胞血中動員試験：評価化合物（HMGB1 ペプチド）および溶媒コントロール（生理食塩水）を PDGFR $\alpha$  プロモーター/EGFP ノックインマウス尾静脈より投与し、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 $\alpha$  の発現（EGFP 蛍光）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。

3) 非臨床安全性試験プロトコル作成：1) 2) で得られた用量-薬効相関データを外挿してヒト投与量を決定し、医師主導治験 Phase I 試験開始に必要な非臨床安全性試験プロトコルを決定した。

### （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

1) 間葉系幹細胞株 ST2 を用いた遊走活性試験：HMGB1 ペプチド添加群は、濃度依存性に間葉系幹細胞株 ST2 の遊走を活性化した。最大活性に必要な濃度は 10  $\mu$  M であった。ペプチド塩の種類（TFA 塩、酢酸塩、塩酸塩）で活性に大きな違いは認めなかった。

2) 間葉系幹細胞血中動員試験：HMGB1ペプチドを種々の用量でPDGFR $\alpha$ プロモーター/EGFPノックインマウス尾静脈より投与し、12時間後の血中EGFP陽性細胞(PDGFR陽性間葉系幹細胞)数をコントロール(溶媒投与群)と比較した結果、ペプチド投与群で有意に間葉系幹細胞が増加した。最少有効用量は10  $\mu$ g/bodyであった。

3) 非臨床安全性試験プロトコル作成：上記の試験で得られた用量-活性相関を基に、薬効の得られるHMGB1ペプチドのヒト投与量を500  $\mu$ g/kgと設定し、Phase I試験申請に必要な非臨床安全性試験を計画した。具体的には遺伝毒性試験、安全性薬理試験、一般毒性試験それぞれについて、試験プロトコル、動物種、投与量、投与回数、投与期間を決定した。平成26年度12月までにすべての試験を終了し、Phase I医師主導試験を申請する予定である。

## D. 考察

平成25年度の研究により、HMGB1の骨髄間葉系幹細胞血中動員活性医薬開発のための最終候補化合物が確定し、マウスを基にした非臨床薬理試験(間葉系幹細胞血中動員活性試験)結果から推定したヒト投与量を基にした非臨床安全性試験内容が確定した。

HMGB1は生体内のすべての細胞が産生しているクロマチン制御蛋白であり、健常人でも通常5~10ng/ml濃度で血中に存在している。一方、末梢組織に大量壊死が生じる病態では壊死組織から大量のHMGB1が血中に放出され、その血中濃度は100ng/ml以上の濃度で維持される(たとえば大量皮膚壊死を伴う皮膚疾患では重症薬疹、表皮水疱症などでHMGB1の血中濃度が極めて高値となる)が、これらの疾患において心血管系、呼吸系、肝臓、腎臓などに対するHMGB1毒性を疑わせる根拠は無い。これらの事実は、HMGB1蛋白それ自体には毒性が無いことを示している。さらに、現在開発を進めている最終開発候補化合物は化学合成HMGB1断片ペプチドであり、HMGB1タンパクと比較して血中での安定性は極めて低く、現在進めつつある探索的安定性試験ではラット静脈内投与数分後に検出感度以下まで消失する。また、これまで実施した非臨床薬効薬理試験では推定投与量の50倍量を投与しても毒性は得られていない。

以上の事実から、HMGB1ペプチドの安全性は極めて高いと予想される。平成26年度に実施する非臨床安全性試験により予想通りの高い安全性が証明され次

第、PMDAの機構相談を実施し、平成27年には医師主導Phase I試験を開始する予定である。

## E. 結論

骨髄間葉系幹細胞血中動員活性医薬開発のためのHMGB1ペプチド最終候補化合物選定を終え、非臨床薬効薬理試験により得られた推定ヒト投与量を基にした非臨床安全性試験プロトコル内容を確定した。

## F 研究発表

### 論文発表

1. Furumoto T, Ozawa N, Inami Y, Toyoshima M, Fujita K, Zaiki K, Sahara S, Akita M, Kitamura K, Nakaoji K, Hamada K, Tamai K, Kaneda Y, Maeda A. Mallotus philippinensis bark extracts promote preferential migration of mesenchymal stem cells and improve wound healing in mice. *Phytomedicine*. 2014. 21(3). 247-253, pii: S0944-7113(13)00360-7. doi: 10.1016/j.phymed.2013.09.003.
2. Umegaki-Arao N, Tamai K, 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*. 2013 Oct 3;8(10):e76416. doi: 10.1371/journal.pone.0076416.

### 学会発表

1. Katsuto Tamai, In vivo mobilization of bone marrow mesenchymal stem cells accelerates regeneration of tissue injury. International Symposium of Anatomical Science for Advance in Healgh and Clinical Therapy, 2013.Aug.27-28, Sendai.
2. 玉井克人、皮膚と骨髄のクロストーク：間葉系幹細胞の体内移動メカニズム解明と治療への応用。第41回日本臨床免疫学会総会 6学会合同シンポジウム：トランスレーショナル研究と新規治療。2013.11.-28, 山口

## 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

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
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.	21 (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.	8(10)	e76416	2013

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

