

201415029A

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業))

難治性潰瘍性大腸炎を対象とした医師主導
治験のためのアドレノメデュリン製剤の作成

平成 26 年度 総括研究報告書

研究代表者 北村和雄

平成 27 (2015) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

難治性潰瘍性大腸炎を対象とした医師主導治験のためのアドレノメデュリン製剤の作成 北村 和雄 -----	1
--	---

II. 資料

1. (資料1) 治験薬概要書 -----	7
2. (資料2) 治験実施計画書 -----	49
3. (資料3) 説明文書・同意文書 -----	79

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	93
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	95
-----------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等実用化研究事業

（難治性疾患実用化研究事業）総括研究報告書

難治性潰瘍性大腸炎を対象とした医師主導治験のための

アドレノメデュリン製剤の作成

研究代表者 北村 和雄 宮崎大学医学部 教授

研究要旨

アドレノメデュリン（AM）は本研究代表者等が発見した強力な降圧作用を有した循環調節に重要な生理活性ペプチドである（BBRC 192, 553-560, 1993）。興味深いことに、炎症性疾患ではAMの産生が増加し、AMが抗炎症・臓器保護因子として作用していることを見出した。実際、本研究代表者等は炎症性腸疾患のモデルである酢酸誘発潰瘍性大腸炎モデル動物にAMを投与すると、炎症が抑制され、病態が改善することを明らかにし（Peptides 26, 2610-2615, 2005）、AMの炎症性腸疾患治療薬としての特許を取得した。さらに、平成21～23年度に臨床応用基盤研究事業として、「AMの炎症性腸疾患治療薬としての臨床応用」として、基礎研究と探索的臨床研究を実施した。その結果、ステロイドやLCAPに抵抗性の難治性潰瘍性大腸炎の患者に1.5pmol/kg/minのAMを投与することで、顕著な腸管粘膜再生がみられ、潰瘍が治癒し寛解に導入できた（Inflamm Bowel Dis 19, E26-E27, 2013）。現在までに7例の患者に投与を行い、有効性は80%以上ときわめて良好であり、有害事象は認めなかった。AMの難治性潰瘍性大腸炎患者に対する効果は明白であり、従来の治療薬とは異なる作用機序の薬剤で、既存の薬剤に上乗せして使用することもできる。しかし、2014年にAMの物

質特許が切れることや、低分子化合物ではなく52個のアミノ酸からなるペプチドであるため、合成が難しいことなどから、企業の参入は得難い状況である。そこで、次のステップとして医師主導型治験を実施し、できるだけ早期に治療薬としての承認を得たい。本研究では、医師主導型治験のための製剤の確保とプロトコール作成を行う。現在ペプチド研究所にてAM原末をGMPグレードで製造中であり、平成26年7月に完成する完成した原末を用いて、GMP基準の施設(富士薬品)にて製剤化を行い、その後に製剤の物性と安定性を評価する。そして、最終的な臨床治験のプロトコールを作成する。一連の研究には、SMOのノイエス社及びヒュービット社が連携企業・研究協力者として参加することで、各種規制に準拠した治験薬製造及び治験計画作成を担保する。

【研究分担者】

芦塚 伸也 宮崎大学医学部 助教

北 俊弘 宮崎大学医学部 准教授

稲津 東彦 宮崎大学医学部 講師

一圓 剛 ヒュービットジェノミクス株式会社 代表取締役社長

【研究協力者】

寒川 賢治 循環器病研究センター 研究所所長

天本 敏昭 ノイエス株式会社 代表取締役社長

A. 研究目的

本研究代表者等は1993年にヒト褐色細胞腫組織より、アドレノメデュリン (AM) を強力な降圧作用をはじめ多彩な作用を有する生理活性ペプチドとして発見 (BBRC 192, 553-560, 1993) した。AMは循環器疾患治療薬としても有望であり、連携企業のヒュービットジェノミクス株式会社がAMの急性心筋梗塞治療薬としてのGLP準拠の非臨床試験を実施した。

一方、AMは消化管の粘膜や筋層にも認められ、炎症性疾患では血中濃度が増加している。またAM遺伝子は、IL-6やTNF- α 等の炎症性サイトカインで誘導され、誘導されたAMはこれらのサイトカインを強力に抑制する。実際、我々は炎症性腸疾患モデルである酢酸誘発潰瘍性大腸炎モデルラットを用いて、AMの新規かつ特徴的作用である大腸潰瘍治癒促進効果を報告した

(Peptides 26, 2610-2615, 2005) ; 炎症性腸疾患治療薬としての特許成立済)。

以上の研究成果を踏まえて、我々は平成21~23年度に臨床応用基盤研究事業として、基礎研究と探索的臨床研究を実施した。その結果、ステロイドやLCAPに抵抗性の難治性

潰瘍性大腸炎の患者にAMを持続投与することで、顕著な粘膜再生がみられ、潰瘍が治癒し寛解に導入できた。現在までに、8例の患者にAM投与を実施し、有効性は80%以上ときわめて良好であり、有害事象は認めなかった。

AMの炎症性腸疾患治療薬としての有用性を示す動物実験の成果はヨーロッパをはじめ、国内外のいくつかのグループからも公表 (Gut. 55, 824-832, 2006, Int J Colorectal Dis 26, 1453-62, 2011) された。しかし、潰瘍性大腸炎患者に対するトランスレーショナルリサーチは他施設では行われておらず、我々により臨床研究でのproof of concept(POC)が得られていることは大きな強みである。

以上のように、AMの難治性潰瘍性大腸炎に対する効果は明白であり、質の高い潰瘍性大腸炎治療を達成できる可能性が非常に高い。しかし、2014年にAMの物質特許が切れることなどから、企業の参入は得難い状況である。そのため我々は医師主導型治験を実施し、早期に治療薬としての承認へとつなげたい。そのための最初のステップとして、本研究では医師主導型治験を実施するための製剤の確保とプロトコール

作成を行うい、本研究終了後には Phase I の医師主導治験へ移行する。

B. 方法 C. 結果

医師主導型治験を実施するための製剤の確保とプロトコール作成を行う計画であり、現在の進捗状況は次の通りである。

1. AM原末の作成

ペプチド研究所に委託して、前臨床試験を含めて今回のAM製剤化に必要なペプチド原末の一括生産を実施し、AM原薬は平成26年7月に完成した。

2. 非臨床試験

平成26年3月27日にPMDAでの対面助言を実施し、Phase I 開始のための非臨床試験は充足していることを確認いただいた。しかしながら Phase I（単回持続投与試験）の終了後に Phase I（反復投与試験）を実施する予定だが、Phase I（反復持続投与試験）の前に反復持続投与の毒性試験を実施することが望ましいとのPMDAからの指導を受けた。そのため、平成26年度に追加配分をいただき、反復持続投与の毒性試験の予備試験を実施しており、平成27年度に Phase I（単回持続投与試験）実施中に反復持続投与の毒性試験の本試験

を実施する予定である。

3. AM製剤化・製剤の物性・安定性検証

AM原末の作成は平成26年7月に終了し、治験薬の作成は富士薬品で実施し、予定通り平成26年12月に治験薬が完成した。作成した製剤が一般的な医薬品が満たすべき基準（厚生労働省「新医薬品の規格及び試験方法の設定に関するガイドライン」）を満たしていることを富士薬品で検証した。また、現在加速試験を実施している。治験薬概要書を資料1として添付する（特許申請の可能性がある内容は削除している）。

4. 治験プロトコールの作成

治験の第一段階である第一相試験（単回投与試験）のプロトコール作成を行った。第一相治験（単回投与試験）のプロトコール案に関しても、PMDAの対面助言で相談した。対面助言を実施後に、プロトコールの変更を行い、第一相治験（単回投与試験）のプロトコール最終案を資料2として添付した。

D. 考察

医師主導治験のためのアドレノメデュリン製剤の作成と Phase I のプ

ロトコールの作成を実施した。AM 原末の作成は平成 26 年 7 月に終了し、治験薬の作成は富士薬品で実施し、予定通り平成 26 年 12 月には治験薬が完成し、現在加速試験を実施している。当初計画していた研究は順調に進捗しており、平成 27 年度には Phase I（単回投与試験）を開始できる状態になっている。

しかしながら Phase I（単回持続投与試験）の終了後に Phase I（反復投与試験）を実施する予定だが、Phase I（反復持続投与試験）の前に反復持続投与の毒性試験を実施することが望ましいとの PMDA からの指導を受けた。そのため、平成 26 年度に追加配分をいただき、反復持続投与の毒性試験の予備試験を実施しており、平成 27 年度に Phase I（単回持続投与試験）実施中に反復持続投与の毒性試験の本試験を実施する予定である。

E. 結論

アドレノメデュリン治験薬の製造は順調に進み、Phase I を開始するための非臨床試験も充足しており、さらに Phase I（単回投与試験）のプロトコールも完成したことから、本事業はほぼ順調に進展した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. S. Nagata, T. Hikosaka, K. Kitamura, Effect of Adrenomedullin Administration in Two Rat Models of Experimental Inflammatory Bowel Disease, Am J Life Sci 3 (2015) 39-42.
2. S. Kawano, Y. Kawagoe, K. Kuwasako, S. Shimamoto, K. Igarashi, M. Tokashiki, K. Kitamura, J. Kato, Gender-related alterations in plasma adrenomedullin level and its correlation with body weight gain, Endocr Connect 4 (2015) 43-49.
3. K. Kubo, M. Tokashiki, K. Kuwasako, M. Tamura, S. Tsuda, S. Kubo, K. Yoshizawa-Kumagaye, J. Kato, K. Kitamura, Biological properties of adrenomedullin conjugated with polyethylene glycol, Peptides 57 (2014) 118-121.

2. 学会発表

1. K. Kitamura: Twenty years from adrenomedullin discovery: From basic study to translational research. The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014, 2014-9, Kyoto, Japan.
2. K. Kuwasako, K. Kitamura, S. Nagata, J. Kato J: Novel functions of two G protein-coupled receptor kinases: their marked inhibitory effect on adrenomedullin type 1 receptor signaling. The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014, 2014-9, Kyoto, Japan.
3. K. Kubo, M. Tokashiki, K. Kuwasako, M. Tamura, S. Tsuda, S. Kubo, K.K. Yoshizawa, J. Kato, K. Kitamura: Biological properties of adrenomedullin conjugated with polyethylene glycol. The European Society of Cardiology Congress 2014, 2014-8, Barcelona, Spain.

H. 知的財産権の出願登録状況

1. 出願番号：特願2014-058225
出願日：平成26年3月20日
発明の名称：長時間作用型アドレノメデュリン誘導体
発明者：北村和雄、加藤丈司、久保恵是、桑迫健二（宮崎大学）
久保茂、熊谷久美子（ペプチド研究所）
出願人：国立大学法人宮崎大学

ヒト合成アドレノメデュリン治験薬概要書

宮崎大学医学部内科学講座循環体液制御学分野

版番号：1版

発行日：2015年3月30日

1. 序文

潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis: UC) は若年～青年層に好発し、再燃を繰り返す原因不明の難病で、1975年(昭和50年10月)より特定疾患治療研究対象疾患に指定されている。本邦においても患者数は増加傾向にあり、潰瘍性大腸炎は現在12万人を超えている。原因が不明で根治療法がない現状では、病勢をコントロールし、正常の社会生活を継続できる事が本疾患の治療の目標となっている。

潰瘍性大腸炎は治療ガイドラインに準じて治療がなされ、アミノサリチル酸製剤やステロイド製剤の全身投与・局所投与、血液成分除去療法、免疫抑制剤療法などが行われる。しかし、最も強力な治療効果を発揮するステロイド療法に反応しない「ステロイド抵抗症例」や、ステロイド療法の効果が得られるもののステロイド漸減中に再燃する「ステロイド依存症例」が少なからず存在し、「難治性」として問題になっている。また、ステロイドの長期使用による有害事象が問題となっており、如何にステロイドに頼らない治療で寛解を維持できるかが肝要である。それら難治性潰瘍性大腸炎に対しては、免疫抑制剤や生物学的製剤などの新たな治療法が保険認可されたが、それらの薬剤にも抵抗性を示す症例が少なからず存在し、また治療薬に関連した重篤な感染症や悪性腫瘍を合併する懸念もあり、新たな作用機序による治療薬の開発が急務である。アドレノメデュリンは1993年、ヒト褐色細胞腫から発見された52個のアミノ酸より構成される内因性血管拡張ペプチドである¹。その後の研究で血管内皮細胞、心筋細胞のアポトーシス抑制効果^{2, 3}、さらに副側血行路の発達促進作用があることが報告され^{4, 5}、アドレノメデュリンの心血管保護効果が明らかとなった。加えて、大腸潰瘍モデルおよび大腸炎モデルにおいて、アドレノメデュリン(注腸および腹腔内投与)が大腸において炎症改善作用を有することが判明しており⁶⁻¹¹、その機序として炎症性サイトカインの抑制や腸管血流改善作用、上皮再生作用等が関与していると考えられている。さらに、本大学で実施した先行臨床研究にて、難治性の潰瘍性大腸炎患者に対し、アドレノメデュリン1.5 pmol/kg/min (9 ng/kg/min)、2週間の持続静注療法により、良好かつ安全な治療効果が得られている¹²。

ラット、イヌにおける単回投与¹³⁻¹⁵及び28日間反復投与毒性試験¹⁶⁻¹⁸の結果、その最小無影響量はヒトでの推定臨床投与量を上回ることが確認されている。また、溶血性試験¹⁹、血管刺激性試験^{20, 21}、変異原性試験^{22, 23}などの特殊毒性試験あるいは呼吸器²⁴、心血管系²⁵、中枢神経系²⁶に関する安全性薬理試験においても問題となる所見は認められていない。さらに、Toxicokinetics試験²⁷並びに薬物動態学的検討²⁸の結果、本薬に蓄積性は認められず、排泄²⁸も速やかであることが確認されている。

なお本薬は、国内²⁹⁻³²並びに海外³³⁻³⁷において健常成人志願者あるいは種々の疾患患者に対する医師主導型の臨床薬理試験が報告されている。健常成人志願者における試験^{29, 33-35}では最大4.32µg/kg (0.096µg/kg/分で45分間投与)までの持続静脈内投与においてアドレノメデュリンの忍容性が確認されているが、血管拡張によると推測される血圧の低下が観察されていることから、本剤の投与は血圧をモニターしながら、慎重に行うことが必要とされる。本大学でも健常者並びに高血圧患者に対して持続静注試験を行い、安全性を確認しているが、2.5 pmol/kg/min (15 ng/kg/min)以上の投与では血圧低下が出現している

2. 要約

2.1 物理化学的性質

構造及び特性	ヒトアドレノメデュリン (huAM)は化学合成法により製造される天然型ヒトアドレノメデュリン。
剤形及び成分	本薬は用時溶解して用いる注射剤で、1バイアル中に500 μ gのhuAMを含有する凍結乾燥製剤である。
貯法・安定性	密封容器にて遮光・冷蔵(2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C)で36ヶ月

2.2 薬理作用

薬効薬理

これまでに以下の薬理・生理作用が報告されている

- 平滑筋細胞⁴⁰及び内皮細胞⁴¹に作用しcAMP並びにNOを介し、血管を拡張し血圧を低下させる。
- 尿細管に対する水、電解質の再吸収抑制により水、ナトリウム利尿を引き起こす⁴²。
- 心臓に直接作用しプロテインキナーゼCの活性化によりカルシウム濃度の調節により心筋の収縮性を増加させる⁴³。
- PI3K/Aktシグナルの活性化により抗アポトーシス作用を示す^{2, 3}。
- 血管内皮障害モデルにおいて内皮細胞修復作用を示した⁴⁴。
- 下肢虚血モデルにおいて副側血行路の発達を促した^{4, 5}。
- 炎症物質の分泌抑制⁴⁵並びに炎症物質による内皮細胞の透過性を抑制⁴⁶する抗炎症作用を示した。
- In vivo*での大腸潰瘍モデルにおいて、潰瘍治癒を促進した⁶。
- In vivo*での大腸炎モデルにおいて、症状を軽減し、炎症を改善した⁷⁻¹¹。

安全性薬理

項目	動物 (投与量)-単回静脈内投与	結果
呼吸器系への影響 ²⁴	ラット (0, 3, 30, 300 μ g/kg)	呼吸数、1回換気量及び分時換気量に有意な影響は認められなかった(全群)。
心血管系への影響 ²⁵	イヌ (0, 3, 30, 100 μ g/kg)	血圧 \downarrow ・心拍数 \uparrow ($\geq 30\mu$ g/kg), 自発運動 \downarrow (100 μ g/kg), 心電図及び体温には影響は認められなかった(全群)。
中枢神経系への影響 ²⁶	ラット (0, 3, 30, 300 μ g/kg)	認知力、気分、運動性、中枢興奮、姿勢、運動失調、筋緊張度、反射及び睡眠に影響は認められなかった(全群)。自律神経症状(皮膚の発赤)(300 μ g/kg)

2.3 毒性

項目	動物 (投与量)	結果
単回投与試験	ラット ¹³ (0, 100, 300, 1000μg/kg; iv)	LD ₅₀ >1000μg/kg, 四肢・耳介の発赤(≥300μg/kg), 呼吸不整(1000μg/kg)
	ラット 強制劣化製剤 ¹⁴ -純度 86.5% (0, 100, 300, 1000μg/kg; iv)	LD ₅₀ >1000μg/kg, 四肢・耳介の発赤(≥300μg/kg)
	イヌ ¹⁵ (0, 100, 300, 1000μg/kg; iv)	LD ₅₀ >1000μg/kg, 自発運動↓・排便(≥100μg/kg), 不整呼吸(≥300μg/kg)
28日反復投与試験	ラット ¹⁶ (0, 100, 300, 1000μg/kg; iv)	毒性学的無影響量=100μg/kg, α ₂ -glb↑(≥100μg/kg)♂, 心重量↑(300μg/kg), 四肢・耳介の発赤(≥300μg/kg), 呼吸不整(1000μg/kg), Fbg・ALP↑(1000μg/kg), 精巣・副腎・肝重量↑(1000μg/kg), MCH・MCV・Na↑(1000μg/kg 回復群), 胸腺・脾臓・腎臓・精巣重量↓(1000μg/kg 回復群♂)
	イヌ ^{17, 18} (0, 30, 100, 300μg/kg; iv)	毒性学的無影響量=30μg/kg, 自発運動↓・脈拍↑・血圧↓・排便(≥100μg/kg), 結膜充血・呼吸不整(300μg/kg)
Toxicokinetics	ラット 28日反復投与 ²⁷ (0, 100, 300, 1000μg/kg; iv)	全群 Tmax=5分。Cmax, AUC _{0-24hr} は用量依存に増大。28日後に蓄積性は認められなかった。
	イヌ単回投与 ^{47, 48} (0, 100, 300, 1000μg/kg; iv)	全群 Tmax=5分。Cmax, AUC _{0-24hr} は用量依存に増大。
	イヌ 28日反復投与試験 ²⁷ (0, 30, 100, 300μg/kg; iv)	全群 Tmax=5分。Cmax, AUC _{0-24hr} は用量依存に増大。28日後に蓄積性は認められなかった。
溶血性試験 ¹⁹	ウサギ血液	溶血性は認められなかった。
局所刺激性試験 ^{20, 21}	ウサギ血管	血管刺激性は認められなかった。
遺伝毒性試験	細菌を用いた 復帰突然変異試験 ²²	復帰突然変異誘発性は認められなかった。
	培養細胞を用いた 染色体異常試験 ²³	染色体異常誘発性は認められなかった。

2.4 薬物動態

125I-hAM 18μg/kg の雄性ラットへの単回静脈内投与により以下の結果が得られた	
血中動態 ²⁸	βT _{1/2} : 7.3 時間

体内分布 ²⁸	肺、腎臓、肝臓、脾臓、副腎及び骨髄のみが血漿中濃度より高値を示した。心臓への分布は投与5分後では血漿中と同程度であったが、2時間後以降24時間までは血漿中の1/3程度であった。
排泄 ²⁸	投与後24時間までに投与量の70%が尿及び糞中に排泄された。主要な排泄経路は尿中排泄と考えられた。

2.5 臨床使用報告

健常成人志願者並びに種々の疾患患者を対象としたアドレノメデュリン原薬による単回持続静脈内投与による臨床薬理試験が国内²⁹⁻³²並びに海外³³⁻³⁷において報告されている。その結果、健常成人志願者では最大4.32 μ g/kg (0.096 μ g/kg/分の用量で45分間の投与)、また疾患患者(急性心筋梗塞)においては最大18 μ g/kg (0.025 μ g/kg/分の用量で12時間の投与)において、アドレノメデュリンの忍容性が確認されている。しかしながら、多くの研究において血圧の低下がみられていることより、本剤の投与は血圧をモニターしながら、慎重に行うことが必要であると考えられる。

下表にこれまでのアドレノメデュリン原薬を用いた臨床薬理研究の一覧を示した。

疾患	実施国	試験デザイン	結果
健常成人志願者を対象	日本 ²⁹	プラセボコントロール, オープン試験, 健常成人7例(男性6例, 女性1例), 0.05 μ g/kg/分 iv: 30分	頭痛, 血圧↓, 心拍数・心係数↑, 尿量・尿中Na・クレアチニン・クリアランス↑
	英国 ³³	プラセボコントロール, 単盲検試験, クロスオーバー. 健常成人男子8例, 0.019-0.081 μ g/kg/分 iv: 40分	自覚症状なし, 血圧↓, 心拍数↑, プロラクチン↑
	ニュージーランド ³⁴	プラセボコントロール, オープン試験, クロスオーバー, 健常成人男子8例, 0.016 & 0.032 μ g/kg/分 iv; 120分間隔の段階的漸増法	自覚症状なし, 血圧↓, 心拍数・心係数↑, 血漿中レニン活性・プロラクチン・ノルアドレナリン・cAMP ↑
	オーストリア ³⁵	プラセボコントロール, オープン試験, 健常成人男子4例, 0, 0.019, 0.039, 0.058, 0.077 & 0.096 μ g/kg/分 iv; 45分間隔の段階的漸増法	自覚症状なし, 血圧↓, 心拍数↑
亜急性心筋梗塞	日本 ³⁰	単盲検試験, 1ヶ月前に心筋梗塞でPCI治療を受けた男性患者7例, 0.05 μ g/kg/分 iv: 18分	自覚症状なし, 心筋機能の改善(左室収縮・拡張の改善, 心係数増加, 冠状洞血流増加), 心筋の酸素消費量に影響せず

うっ血性心不全	日本 ²⁹	プラセボコントロール，オープン試験，健常成人7例（男性5例，女性2例），0.05 μ g/kg/分 iv: 30分	自覚症状なし，血行動態の改善（血圧・肺毛細血管楔入圧↓，心拍数・心出量・心係数↑），尿量・尿中 Na↑，アルドステロン↓
うっ血性心不全	日本 ³¹	プラセボコントロール，二重盲検試験，0.10 μ g/kg/分 iv: 30分	自覚症状なし，血行動態の改善（血圧・肺毛細血管楔入圧↓，心拍数・心係数↑），尿量・尿中 Na↑，アルドステロン↓
本態性高血圧	ニュージーランド ³⁶	プラセボコントロール，単盲検試験，クロスオーバー，男性健常人8例，0.017, 0.035 μ g/kg/分 iv; 120分間隔の段階的漸増法	自覚症状：軽度の頭痛・軽度の顔面紅潮と結膜充血，血圧↓，心拍数・心出量↑，血漿中レニン活性・プロラクチン・ノルアドレナリン・cAMP ↑
肺高血圧	日本 ³²	プラセボコントロール，単盲検試験，患者13例（男性6例，女性7例），0.05 μ g/kg/分 iv: 30分	自覚症状：頭痛・動悸，肺動脈血圧・肺血管抵抗↓，心係数↑，アルドステロン↓，cAMP↑
慢性腎症	ニュージーランド ³⁷	プラセボコントロール，単盲検試験，クロスオーバー，男性健常人8例，0.02 & 0.04 μ g/kg/分 iv; 120分間隔の段階的漸増法	自覚症状：軽度の顔面紅潮と頭痛，血圧↓，心拍数・心出量↑，尿量・尿中 Na↑，血漿中レニン活性・アンジオテンシン II↑，プロラクチン・ノルアドレナリン・cAMP ↑

4. 非臨床試験

4.1 非臨床薬理試験

4.1.1 薬理作用

アドレノメデュリンは CLR (calcitonin receptor like receptor) と RAMP (receptor activity-modifying protein) のサブタイプである RAMP2 あるいは RAMP3 の複合体である CLR/RAMP2 及び CLR/RAMP3 を特異的受容体とし⁵⁰、これまでに以下のような生理・薬理作用を有することが報告されている。【発表論文要約】

4.1.1.1 血管拡張、降圧作用

アドレノメデュリンは血管拡張作用を主とする降圧作用を示す。アドレノメデュリンレセプターは Gs タンパク質と共役してアデニル酸シクラーゼを活性化すると同時に、Gq と共役してホスホリパーゼ C を活性化することから、アドレノメデュリンは血管平滑筋細胞内の cAMP 増加を介し、A キナーゼを介してミオシン軽鎖キナーゼの不活性化により平滑筋を弛緩させる⁴⁰ほか、内皮細胞にも作用し、NO 合成酵素の活性化により放出された NO が平滑筋に働き、cGMP 産生も増加して弛緩させる機序が考えられている⁴¹。【発表論文要約】

4.1.1.2 体液量調整作用

アドレノメデュリンは腎臓に対して尿細管における水、電解質の再吸収を抑制することで、水とナトリウム利尿をもたらす考えられている⁴²。【発表論文要約】

4.1.1.3 心臓に対する作用

アドレノメデュリンを経静脈的に投与すると、心拍出量の増加が見られる。アドレノメデュリンは血管の拡張による後負荷の低下のほかに、心臓に直接作用することが考えられている。アドレノメデュリンは心筋の収縮性を増加させ、陽性変力作用を有するが、これは cAMP 非依存性の作用であり、Ca²⁺チャンネルからの Ca²⁺流入を介していることが示唆されている⁴³。【発表論文要約】

4.1.1.4 細胞のアポトーシス抑制作用

アドレノメデュリンは血管内皮細胞や心筋細胞において PI3K/Akt シグナルの活性化を促す^{2, 3}。Akt のリン酸化は細胞の生存には欠かせない Survival signal と考えられおり、アドレノメデュリンは Akt をリン酸化することで細胞のアポトーシスを抑制すると考えられている。【発表論文要約】

4.1.1.5 血管保護作用

損傷内皮再生課程の *in vitro* モデルである Wound healing assay を用いてアドレノメデュリンの内皮再生作用を検討すると、10⁻¹¹~10⁻⁷M で損傷内皮の修復面積は用量依存

的に有意に増加した⁴⁴。【発表論文要約】

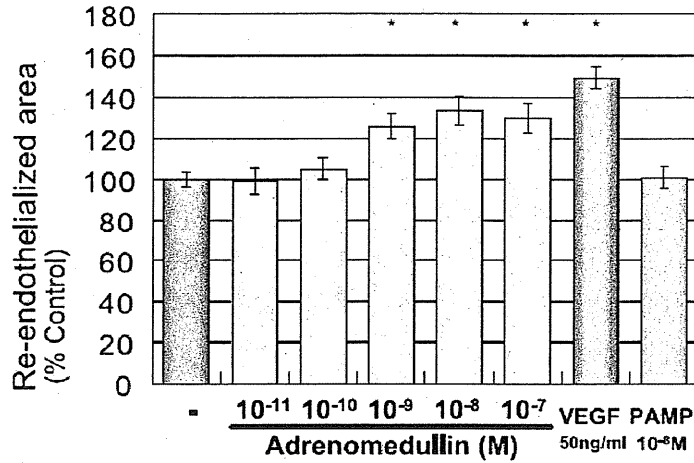


図 4.1.1.5 アドレノメデュリンの損傷内皮修復効果

*: P<0.01 vs control (n=12)

4.1.1.6 血管新生作用

アドレノメデュリン遺伝子ホモノックアウトマウスでは血管構築不全により胎生致死となる⁵¹ことから、アドレノメデュリンは血管の発生に関与していることが明らかとなった。アドレノメデュリン遺伝子をマウス⁴及びウサギ⁵下肢虚血モデルに投与すると、著明な副側血行路の発達が確認されている。【発表論文要約】

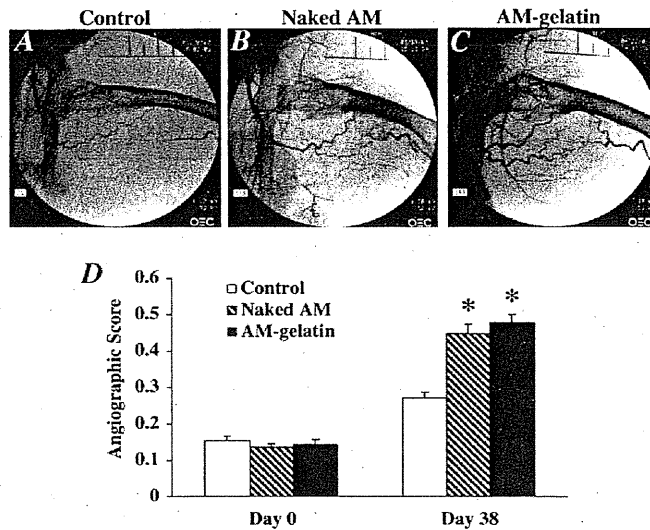


図 4.1.1.6 ウサギ下肢虚血モデルにおけるアドレノメデュリン遺伝子治療の血管新生作用

AM-gelatin; AM 遺伝子のゼラチンによる徐放化; *: P<0.05 vs control

4.1.1.7 抗炎症作用

アドレノメデュリンはマクロファージで産生される炎症性サイトカインの分泌を抑制し、抗炎症作用を発揮する⁴⁵。また炎症細胞以外にも、アドレノメデュリンは活性酸素、エンドトキシンあるいはサイトカインにより亢進した内皮細胞の透過性を抑制する⁴⁶。【発表論文要約】

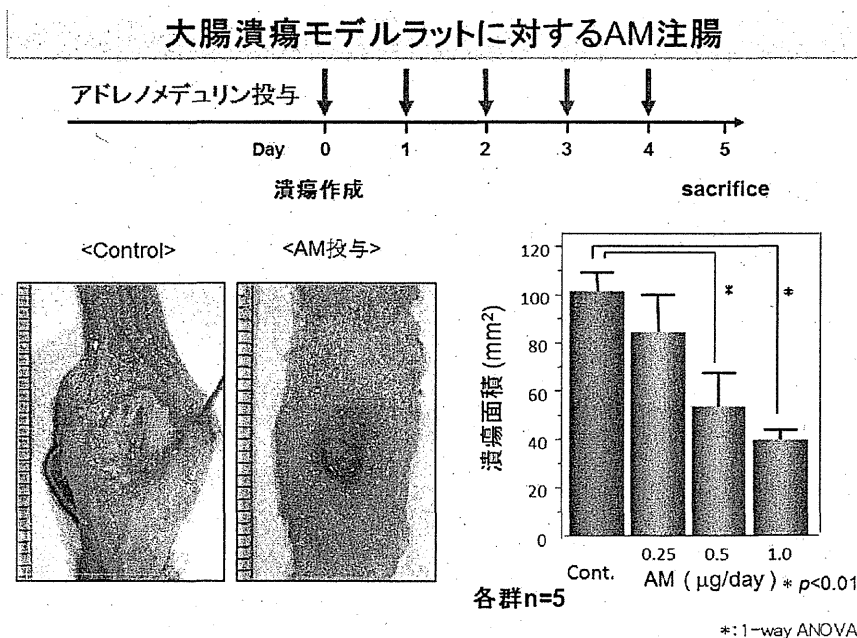
4.1.2 疾患モデルにおける検討

アドレノメデュリンは血管拡張作用、利尿作用以外に、炎症性サイトカインの抑制や腸管血流改善作用、上皮再生作用等を介して、腸管粘膜再生促進作用があることが報告されている。

4.1.2.1 ラット *in vivo* 大腸潰瘍モデル

大腸潰瘍モデルラットに対しアドレノメデュリンを経肛門的に5日間連日投与した。アドレノメデュリン投与により用量依存的に潰瘍面積は縮小し、組織学的検討でも潰瘍部への炎症細胞浸潤が改善された。また、アドレノメデュリン投与群において潰瘍大腸組織における interferon (IFN) - γ や IL-6 などの炎症性サイトカインが有意に低値であった⁶。

【発表論文要約】



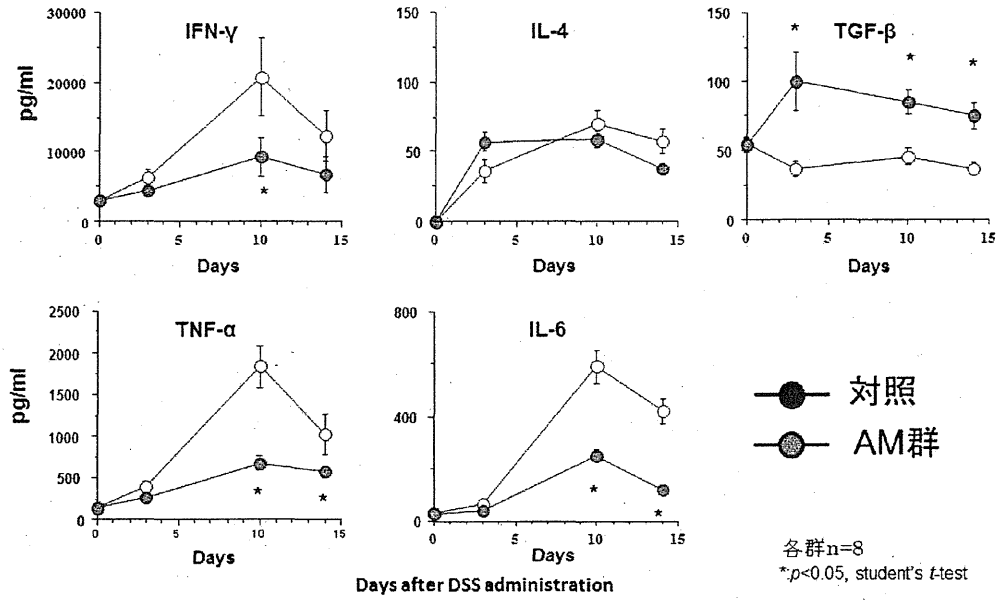
アドレノメデュリン0.25~1.0 µgを生食0.5mlに溶解し、肛門よりチューブを用い病変部に1日1回急速注入を5日間実施した

4.1.2.2 ラット *in vivo* 大腸炎モデル

炎症性腸疾患汎用モデルであるデキストラン硫酸 (DSS) 腸炎モデルを用い、アドレノメデュリンの大腸炎改善機序の一部を解明。アドレノメデュリン投与群において炎症性サイトカイン (INF- γ , TNF- α , IL-6) の抑制, 制御性サイトカイン(TGF- β)の亢進が認められた。大腸IELにおけるTCR $\gamma\delta$ の維持がTGF- β 亢進に関与した可能性が示唆された。さらに、アドレノメデュリン投与群では腸炎に伴う大腸上皮細胞接合分子の損傷が軽度であった⁹。【発表論文要約】

DSS腸炎モデルマウスへのAM投与

<大腸上皮細胞間リンパ球(IEL)サイトカインの変化>



アドレノメデュリン 0.05 μg を生食 0.2 ml に溶解し、肛門よりチューブを用い大腸に 1 日 1 回急速注入を 7 日間実施し

た

図 4. 1. 2. 2 実験腸炎に対する AM の効果

4.2 安全性薬理試験

4.2.1 ラットにおける呼吸器への影響

SD系雄性ラット（6週齢；体重157-221g）において0, 3, 30及び300 μ g/kgのアドレノメデュリンを単回静脈内投与（n=10/群）したところ、1分間の呼吸数、1回換気量及び分時換気量に有意な影響は認められなかった²⁴。

4.2.2 イヌにおける心血管系への影響

イヌ（ビーグル雄；9-10ヶ月齢；体重10.0-11.4kg）においてアドレノメデュリン0, 3, 30, 100 μ g/kgの本薬単回静脈内投与（n=4/群）が、血圧、心拍数、心電図及び体温に及ぼす影響が調べられた²⁵。アドレノメデュリンの30 μ g/kg静脈内投与群では、4例全例とも投与後1時間まで血圧（収縮期血圧、平均血圧、拡張期血圧）が低下し、心拍数の増加が観察された。しかし、心電図（PR間隔、QRS時間、QT間隔、QTc）及び体温には投与後8時間まで本薬の投与による影響は認められなかった。100 μ g/kg静脈内投与群では、投与後2時間まで4例全例とも血圧低下と心拍数の増加が認められましたが、心電図及び体温には本薬の投与による影響は認められなかった。なお、3 μ g/kg静脈内投与群では、血圧、心拍数、心電図及び体温ともに投与後8時間まで4例全例に本薬の投与による影響は認められなかった。

一般状態の観察では、30 μ g/kg以下の静脈内投与群で投与後8時間まで異常症状は認められなかった。しかし、100 μ g/kg静脈内投与群では投与後30分までの間で自発運動低下が4例中3例に認められたが、その後、異常は認められなかった。以上のことから、心血管系に対するアドレノメデュリンの無作用量としては、3 μ g/kgと考えられた。

4.2.3 ラットにおける中枢神経系への影響

SD系雄性ラット（6週齢；体重171-213g）において0, 3, 30及び300 μ g/kgのアドレノメデュリンを単回静脈内投与（n=6/群）したところ、媒体対照群、本薬の3及び30 μ g/kg群では、投与後0.5、1、2、4及び6時間の観察で各群の6例全例に、認知力、気分、運動性、中枢興奮、姿勢、運動失調、筋緊張度、反射、自律神経症状、睡眠は認められず、死亡発現もなかった。一方、本薬の300 μ g/kg群では、皮膚色（耳、四肢及び尾）が一様にピンク色を呈する動物が出現し、投与後0.5時間では6例全例、投与後1時間では6例中5例であり、投与後2時間以降では消失し、観察されなかった。その他の観察項目には異常は認められなかった。以上の結果から、本薬の30 μ g/kgまでの静脈内投与は、ラットの一般症状および行動に影響を及ぼさない投与量であると判断された。なお、300 μ g/kgの静脈内投与は皮膚の発赤を呈したものの、投与後2時間までに消失するものであった²⁶。