

3.まとめ

第 I 相試験において血中 KOI2 を測定することは、非臨床予備試験より測定する意義が低いことや技術的にも困難と考えられることから PK 測定を実施しない予定である。

なお、本治験薬の薬動学的検討として骨髄間葉系幹細胞の血中動員程度を測定する予定であるが、信頼性を裏付けるデータが不足していることから治験中の測定項目として設定することが困難であると判断した。このため、KOI2 投与時における骨髄間葉系幹細胞の血中への動員程度の測定については探索的な研究対象として別プロトコールにて実施することにし、治験では被験者の同意を得たうえで研究目的の採血のみ実施することにした。

VII. 治験薬概要書

治験薬概要書

治験薬コード：KOI2

発行者	大阪大学大学院医学系研究科 再生誘導医学寄附講座 教授 玉井 克人 大阪府吹田市山田丘 2-2 TEL:06-6210-8395 FAX:06-6210-8399	
	版番号	発効日
版番号	Ver.0.1	2015年1月19日
改定前の版番号	—	—

機密の保全

本文書情報は、付録及び添付資料とともに大阪大学の機密情報です。治験責任医師、治験分担医師、治験協力者、治験実施医療機関、治験審査委員会・倫理委員会及び規制当局関係者、その他本治験に関与する者に限定して、情報提供するために作成されたものです。従って、本文書情報は、被験者に本治験の内容を説明する場合を除き、大阪大学の文書による同意なしに、いかなる第三者にも開示できません。また、本治験の目的以外に使用することはできません。

目次

表目次	4
図目次	5
1. 要約	7
1.1 物理的・化学的及び製剤学的性質並びに製剤組成	7
1.2 薬理試験	7
1.3 安全性薬理試験	7
1.4 動物における薬物動態と代謝	8
1.5 毒性試験	8
1.6 その他の毒性試験	8
2. 序文	9
2.1 背景	9
2.2 開発の経緯	10
3. 物理的、化学的、製剤学的性質及び製剤組成	13
3.1 被験薬の原薬の化学式及び構造式	13
3.1.1 被験薬コード：KOI2	13
3.1.2 化学式と分子量	13
3.1.3 化学構造	13
3.2 物理的・化学的性質および製剤学的性質	13
3.3 賦形剤を含む製剤組成	13
3.4 他の既知化合物との構造類似性	13
3.5 治験薬の保存条件および保存期間などの取り扱い方法（暫定）	13
4. 非臨床試験	15
4.1 効力を裏付ける薬理試験	15
4.1.1 KOI2 の骨髄 MSC の運動能活性化作用	15
4.1.2 KOI2 の骨髄 MSC 血中動員活性	16

4.1.3	KOI2 の末梢循環不全性難治性皮膚潰瘍ラットモデルに対する治療効果	18
4.1.4	表皮水疱症モデルマウスに対する治療効果.....	20
4.2	安全性薬理試験.....	21
4.2.1	中枢神経系への影響	21
4.2.2	呼吸器系及び循環器系への影響	21
4.3	動物における薬物動態と代謝.....	22
4.3.1	血漿薬物濃度の測定法	22
4.3.2	ラット単回静脈内投与による予備 TK 試験	22
4.3.3	カニクイザル単回静脈内予備 TK 試験	23
4.3.4	4.3.2 および 4.3.3 の結果を踏まえた反復静脈内 TK 試験の実施について	24
4.4	一般毒性試験.....	25
4.4.1	単回投与毒性試験	26
4.4.2	反復投与毒性試験	28
4.4.3	遺伝毒性試験	30
4.4.4	生殖発生毒性試験	34
4.4.5	がん原性試験	34
4.4.6	局所刺激性試験	34
4.4.7	免疫毒性試験	34
5.	非臨床試験データ又は関連化合物から推測される起こりうる危険性及び有害反応	34
5.1.1	血圧低下、心拍数増加、顔面紅潮等の循環器系の有害事象 (4.4.1.2 参照)	34
5.1.2	局所刺激性	35
6.	臨床試験	35
7.	参考文献	36

表目次

表 4-1	ラットによる KOI2 の単回静脈内投与試験（予備的試験）	22
表 4-2	カニクイザル単回静脈内予備 TK 試験概略.....	23
表 4-3	毒性試験一覧	25
表 4-4	カニクイザル単回静脈内投与試験.....	27
表 4-5	試験群の構成及び投与量.....	28
表 4-6	試験群の構成及び投与量.....	29
表 4-7	細菌を用いた復帰変異原性予備試験（FAT）結果（TA100）	31
表 4-8	細菌を用いた復帰変異原性予備試験（FAT）結果（TA98）	31

図目次

図 4-1	HMGB1 および KOI2 による MSC 運動能活性化	16
図 4-2	静脈内投与によるマウス血中 PDGFR α 陽性細胞増加	17
図 4-3	KOI2 の難治性皮膚潰瘍治癒促進効果	19
図 4-4	表皮水疱症モデルマウス治療効果	20
図 4-5	ラット血漿中 KOI2 濃度の経時的推移	23
図 4-6	カンクイザル血漿中 KOI2 濃度の経時的推移	24
図 4-7	カンクイザル KOI2 投与後の血漿中ヒスタミン濃度の経時的推移	27

略号一覧

略語	詳細	和訳
FBS	fetal bovine serum	ウシ胎児血清
GMP	good manufacturing practice	製造品質管理基準
GVHD	graft versus host disease	移植片対宿主病
HMGB1	high mobility group box 1	核内の遺伝子発現調節タンパク
LC	liquid chromatography	液体クロマトグラフィー
LPS	lipopolysaccharide	リポ多糖（グラム陰性菌細胞外膜構成成分）
MS	mass spectrometry	質量分析法
MSC	mesenchymal stem cells	間葉系幹細胞
NOAEL	no-observed-adverse-effect level	無毒性量
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝液
PDGFR α	platelet-derived growth factor receptor alpha	血小板由来増殖因子 α 受容体
RP-HPLC	reversed-phase high performance liquid chromatography	逆相高速液体クロマトグラフィー
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
TLR	Toll-like receptor	トル受容体

1. 要約

high mobility group box 1 (HMGB1) は核内の遺伝子発現調節タンパクであり、重度の生体組織損傷時に血中に大量放出され、骨髄内間葉系幹細胞を刺激して血中へ動員し、損傷組織の再生を誘導する作用が明らかにされ、着目されている。しかし、HMGB1 はタンパクであり、そのまま医薬品へ応用することには制約が多い。

KOI2 は HMGB1 の部分ペプチドで、TLR を刺激せずに PDGFR α 陽性細胞を血中に動員することを目的に開発が行われており、HMGB1 の欠点を克服する医薬品としての応用が期待されている。

1.1 物理的・化学的及び製剤学的性質並びに製剤組成

- ・ KOI2 は HMGB1 の部分ペプチドで、44 個のアミノ酸残基からなるポリペプチドである。通常のペプチド合成手法により化学的に合成される。
- ・ 製剤は、蒸留水に KOI2 を溶解したもので、1 mL 中に 30 mg の KOI2 を含有し、1 バイアルあたり 5 mL 含まれる。添加剤は含まれていない。
- ・ 保存条件（暫定）：冷凍保存（-20～-50℃）
取り扱い方法：保存庫から製剤を取り出し、室温で完全に融解する。大塚生食注（大塚製薬工場）で 100 mL となるように希釈し、点滴静脈内注射にのみ使用する。

1.2 薬理試験

- ・ KOI2 は高い骨髄 MSC の運動能活性化作用を有する。
- ・ KOI2 は骨髄 MSC 血中動員活性（抹消血中の PDGFR α 陽性細胞の割合の増加）を有する。
- ・ KOI2 は抹消循環不全性難治性皮膚潰瘍ラットモデルに対し、皮膚拘縮が軽度であった皮膚壊死の拡大の抑制、創傷治癒促進の効果が推察された。
- ・ 表皮水疱症モデルマウスに対して KOI2 投与群は明らかな体重増加率及び生存率の改善効果を示した。食道粘膜の創傷治癒による摂食行動が改善したためと推察された。

1.3 安全性薬理試験

- ・ KOI2 のラットの 4 週間反復静脈内投与毒性試験において、中枢神経系に影響を及ぼさなかった。
- ・ KOI2 のサルの呼吸器系及び循環器系に及ぼす探索的試験において、血圧の低下と心拍数の上昇が見られた。急速静注で見られたこれらの減少は持続静注の投与により減弱した。
- ・ KOI2 のサルにおける持続静脈内投与の循環器系に対する影響を検討したが、循環器系に対する影響は認められなかった（速報）。

1.4 動物における薬物動態と代謝

- ・ ラット及びカニクイザルへの単回投与試験において、薬物動態を検討した結果、KOI2は血中からの消失は速やかで、5分後には検出限界以下であった。雌雄差は見られなかった。
- ・ 反復投与試験における薬物動態の検討は、有効量と推定する量において単回投与試験と同じく、速やかな消失が予測されることと、KOI2が生理活性タンパクの部分ペプチドであることを考慮して、反復投与試験での薬物動態を検討しなかった。

1.5 毒性試験

- ・ カニクイザルでの単回毒性試験（20 mg/kg）で、顔面紅潮と低体温が観察された。これらの現象はKOI2のヒスタミンの血中濃度上昇作用によるものと考えられた。これらのヒスタミンの上昇は持続静脈内投与により発現が認められなくなり、臨床症状も発現しなかった。ラットにおいては特に異常所見を認めなかった。
- ・ カニクイザルの4週間反復持続静脈内投与試験（12、25 mg/kg）において投与部位での血栓による栓子、血栓の転帰としての器質化、再疎通が見られた。これらの原因は留置針刺入による血管内皮の損傷部位に高濃度のKOI2が貯留する場合に限定して生じる複合的局所反応と推察された。
- ・ ラットにおいては単回投与（2、20 mg/kg）及び反復投与（5、12、25mg/kg）とも異常を認めなかった。

1.6 その他の毒性試験

- ・ 復帰変異原性予備試験：KOI2は陽性を示したがKOI2の厚生アミノ酸のヒスチジンが試験系に供給された可能性があり、擬陽性と判断した。
- ・ マウスリンフォーマTK試験：KOI2は、L5178Y tk+/-3.7.2c細胞に対して遺伝子突然変異誘発性を有さなかった。
- ・ 染色体異常試験：KOI2はCHL/IU細胞に対して染色体異常誘発性は有さなかった。
- ・ 生殖発生毒性試験
サル及びラットを用いた4週間反復投与毒性試験の検討項目として雄性生殖器に対する影響を併せて評価した。サル及びラットの試験とも、雄性生殖器に関して被験物質による影響は認められなかった。
- ・ 免疫毒性試験
サルとラットを用いた4週間反復投与毒性試験の検討項目として免疫毒性の可能性を示す変化（兆候；血液学的変化、免疫系器官の重量変化および病理組織学的変化、血清グロブリン濃度の変化等）について評価が行なわれたが、被験物質による影響は認められなかった。

2. 序文

2.1 背景

近年、核内の遺伝子発現調節タンパクである high mobility group box 1 (HMGB1) が、重度の生体組織損傷時に血中に大量放出され、骨髄内間葉系幹細胞を刺激して血中へ動員し、さらに損傷組織特異的に骨髄間葉系幹細胞を集積させて、間葉系幹細胞の持つ抗炎症、血管新生能、多分化能により、損傷組織の再生を誘導するという、これまで全く知られていなかった「HMGB1 による骨髄間葉系幹細胞の血中動員」という新しい再生誘導機構が発見された¹⁾。

しかしながら HMGB1 は分子内にエンドトキシンの 1 つである LPS との結合ドメインを有すること、LPS と結合した HMGB1 は TLR を活性化して強い炎症反応を喚起することが知られている²⁾。

そこで TLR を刺激せずに PDGFR α 陽性細胞を血中に動員する HMGB1 ペプチド医薬の探索を進めた。具体的には、HMGB1 分子内の少しずつオーバーラップするさまざまなペプチド断片を合成し、それぞれのペプチドの PDGFR α 陽性骨髄間葉系幹細胞培養株に対する細胞遊走活性化能（マイグレーション活性）の評価を試みた。その結果、PDGFR α 陽性細胞動員活性を有するペプチド断片の同定に成功し、そのなかから本開発候補物（開発コード KOI2）を選択した。当初の期待通り、KOI2 のアミノ酸配列は LPS 結合ドメインを含まず、より安全な医薬品の開発が可能になる。また、全長が約 200 アミノ酸からなる HMGB1 タンパク質に対し、KOI2 は分子量が 5 分の 1 程度のペプチド断片であり、化学的合成による製造が可能であるため、医薬品として製造する場面において、精製純度の向上、安定生産、コスト削減が期待されるようになった。

2.2 開発の経緯

生体内に存在する幹細胞を利用した医療としてすでに確立している造血幹細胞移植（骨髄移植等）に加えて、新しい先進医療として間葉系幹細胞移植治療の開発が進められつつある。

骨髄間葉系幹細胞を生体内損傷組織に移植する基礎研究から、骨髄間葉系幹細胞は中胚葉由来組織である骨、軟骨、脂肪に加えて、外胚葉由来組織である神経や表皮にも分化できる多能性幹細胞としての性質を持つ可能性が示され、さらに種々の抗炎症分子、血管新生因子を放出して炎症を抑制的に制御しつつ組織再生を誘導することが明らかにされている。これらの基礎研究成果を基にして、心筋梗塞、脳梗塞、脊髄損傷や移植片対宿主反応（GVHD）に罹患した患者に対する自家または他家骨髄由来培養間葉系幹細胞の移植臨床研究が進められており、その有効性が示されつつある。

しかしながら、骨髄間葉系幹細胞移植を実施するためにはGMPレベルでの細胞培養を保証する特殊な培養設備が必要であり、限られた医療機関でのみ実施可能な医療である。また、骨髄血採取は侵襲を伴う医療行為であり、特に他家移植の場合はドナーを得ることも容易ではない。また、十分量の間葉系幹細胞を得るためには数週間におよぶ細胞培養期間が必要であり、脳梗塞や心筋梗塞の急性期に対する迅速な移植は不可能である。これらの問題点を解決し、かつ骨髄間葉系幹細胞の持つ多くの長所を生かした治療を可能にする新たな方法論の開発が必要である。

我々は、核内の遺伝子発現調節タンパクであるhigh mobility group box 1（HMGB1）が、重度の生体組織損傷時に血中に大量放出され、骨髄内間葉系幹細胞を刺激して血中へ動員し、さらに損傷組織特異的に骨髄間葉系幹細胞を集積させて、間葉系幹細胞の持つ抗炎症、血管新生能、多分化能により、損傷組織の再生を誘導するという、これまで全く知られていなかった「HMGB1による骨髄間葉系幹細胞の血中動員」という新しい再生誘導機構を発見した¹⁾。具体的には、皮膚基底膜領域の接着分子遺伝子異常により生下時より全身皮膚が剥離して全身熱傷様の症状を呈する遺伝性皮膚難病「表皮水疱症」における剥離表皮の再生機序の解明を目的とする研究の過程で、剥離表皮内の壊死細胞から血中に放出されるHMGB1が骨髄中に存在するPDGFR α （platelet-derived growth factor receptor alpha）陽性細胞を刺激して血中に動員し、剥離表皮部への集積を誘導していること、さらに剥離表皮部に集積したPDGFR α 陽性細胞は線維芽細胞や表皮細胞に分化して損傷皮膚の再生に強く寄与していることを、GFP（green fluorescent protein）トランスジェニック骨髄細胞を移植した表皮水疱症モデルマウスを用いることにより明らかにした。

さらに、HMGB1により血中動員されたPDGFR α 陽性MSCの損傷部皮膚集積メカニズムを探索し、損傷皮膚内血管内皮細胞から産生されるケモカインCXCL12が、その受容体CXCR4を表面に持つ末梢循環MSCを損傷部特異的に集積させていることを見出した³⁾。

そこで、CXCR4阻害剤AMD3100を投与して表皮水疱症モデルマウス皮膚再生過程における骨髄由来MSCの皮膚集積を阻害し、その影響を検討した。その結果、AMD3100投与群では非投与群と比較して著しい皮膚再生障害が観察されたことから、HMGB1により血中動員されたMSCは表皮水疱症皮膚を始めとする損傷組織障害の修復に極めて重要な役割を担っていることが示された⁴⁾。

骨髄内PDGFR α 陽性細胞は骨、軟骨、脂肪への分化能を持つ、いわゆる間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell; MSC) としての性質を持つこと⁵⁾、さらに、PDGFR α 陽性MSCには神経や上皮にも分化可能な多能性幹細胞としての性質を持つ細胞分画が含まれることが明らかになりつつある⁶⁾。即ち、HMGB1投与により骨髄内PDGFR α 陽性間葉系幹細胞を末梢循環に動員し、損傷組織への集積を促進することで、間葉系のみならず上皮系、神経系組織損傷の再生を誘導する画期的な治療薬の開発が期待される¹⁾。実際に、糖尿病モデルマウス (db/dbマウス) 背部に全層皮膚欠損を作成した難治性皮膚潰瘍モデルマウスに対して組換えHMGB1蛋白10 μ gを連日5日間静脈内投与し、上皮化癒促進効果、瘢痕抑制効果、骨髄由来間葉系細胞集積効果について、生理食塩水投与群と比較検討した。その結果、HMGB1蛋白投与群では潰瘍部皮膚に骨髄由来間葉系細胞が集積し、上皮化促進効果、瘢痕抑制効果が確認された。

しかしながら、HMGB1は分子内にエンドトキシンの1つであるLPSとの結合ドメインを有すること、LPSと結合したHMGB1はTLRを活性化して強い炎症反応を喚起することが知られている²⁾。このことは、HMGB1蛋白を医薬品として開発する過程で求められる安全性保証にとり、大いに懸念材料となることが容易に予想される。そこで、HMGB1の骨髄内PDGFR α 陽性細胞活性化ドメインを探索し、TLRを刺激せずにPDGFR α 陽性細胞を血中に動員するHMGB1ペプチド医薬の探索を進めた。具体的には、HMGB1分子内の少しずつオーバーラップするさまざまなペプチド断片を合成し、それぞれのペプチドのPDGFR α 陽性骨髄間葉系幹細胞培養株に対する細胞遊走活性化能 (マイグレーション活性) の評価を試みた。その結果、本申請者らは、PDGFR α 陽性細胞動員活性を有するペプチド断片の同定に成功し、そのなかから本開発候補物 (開発コードKOI2) を選択した。当初の期待通り、KOI2のアミノ酸配列はLPS結合ドメインを含まず、より安全な医薬品の開発が可能になる。また、全長が約200アミノ酸からなるHMGB1タンパク質に対し、KOI2は分子量が5分の1程度のペプチド断片であり、化学的合成による製造が可能であるため、医薬品として製造する場面において、精製純度の向上、安定生産、コスト削減が期待されるようになった。

そこで我々は、難治性皮膚潰瘍に対するKOI2静脈内投与の有効性を検証した。具体的には、成皮弁形成によるラット末梢循環不全性皮膚潰瘍モデルに対してKOI2静脈内投与が潰瘍上皮化促進効果を示すことを証明し、さらに、表皮水疱症モデルマウス (VII型コラーゲン低形成マウス) に対してKOI2を静脈内投与し、生存率および体重増加率

が改善されることを確認した（4.1 効力を裏付ける薬理試験の項参照）。

これらの研究成果を背景として、現在我々は大阪大学早期探索的臨床試験拠点整備事業の重点研究として、末梢循環不全を伴う難治性皮膚潰瘍治療薬としてKOI2医薬開発を進めている。具体的には、表皮水疱症、膠原病性潰瘍、糖尿病性潰瘍、動脈硬化性潰瘍など、先天的または後天的異常により癒痕、慢性炎症、免疫異常による末梢循環不全により生じる難治性皮膚潰瘍に対し、KOI2の静脈内投与により潰瘍部及びその周囲に骨髄由来間葉系幹細胞の集積を誘導し、間葉系幹細胞の持つ抗炎症作用、癒痕抑制作用、血管新生作用を利用して、機能的組織再生を誘導する。

特定の疾患メカニズムに作用する従来の医薬品と異なり、KOI2は幅広い適応症が想定できる。実際に我々はKOI2の投与により、皮膚潰瘍以外に、脳梗塞、心筋梗塞、脊髄損傷など、種々の損傷組織の治癒を促進することを、疾患モデル動物を用いた実験により見出している。

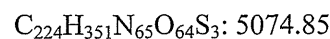
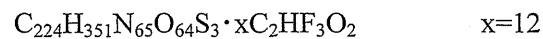
3. 物理的、化学的、製剤学的性質及び製剤組成

3.1 被験薬の原薬の化学式及び構造式

3.1.1 被験薬コード：KOI2

被験薬の一般名：JAN、INN とともに未定

3.1.2 化学式と分子量



3.1.3 化学構造

KOI2 は 44 個のアミノ酸残基からなるポリペプチドである

アミノ酸組成：

Ala_2 Asp_2 Asn_1 Arg_2 Cys_1 Gln_1 Glu_3 Gly_3 His_2
Lys_9 Met_2 Phe_4 Pro_3 Ser_5 Thr_1 Tyr_1 Val_2

3.2 物理的・化学的性質および製剤学的性質

被験薬の原薬の物理的・化学的性質および製剤学的性質を以下に示す。

項目	性質（暫定）
性状	白色の塊状または粉末の凍結乾燥品で、水に溶けやすい。
製造	ペプチド固相合成法による化学合成したものである。

3.3 賦形剤を含む製剤組成

製剤は、蒸留水に KOI2 を溶解したもので、1 mL 中に 30 mg の KOI2 を含有し、1 バイアルあたり 5 mL 含まれる。

添加剤は含まれていない。

3.4 他の既知化合物との構造類似性

構造が類似する既知化合物はない。

3.5 治験薬の保存条件および保存期間などの取り扱い方法（暫定）

保存条件：冷凍保存（-20～-50℃）

使用期限：長期安定性試験を実施中で、結果に基づき設定する。

KO12
大阪大学

取り扱い方法：保存庫から製剤を取り出し、室温で完全に融解する。大塚生食注（大塚製薬工場）で 100 mL となるように希釈し、点滴静脈内注射にのみ使用する。

4. 非臨床試験

4.1 効力を裏付ける薬理試験

4.1.1 KOI2 の骨髄 MSC の運動能活性化作用

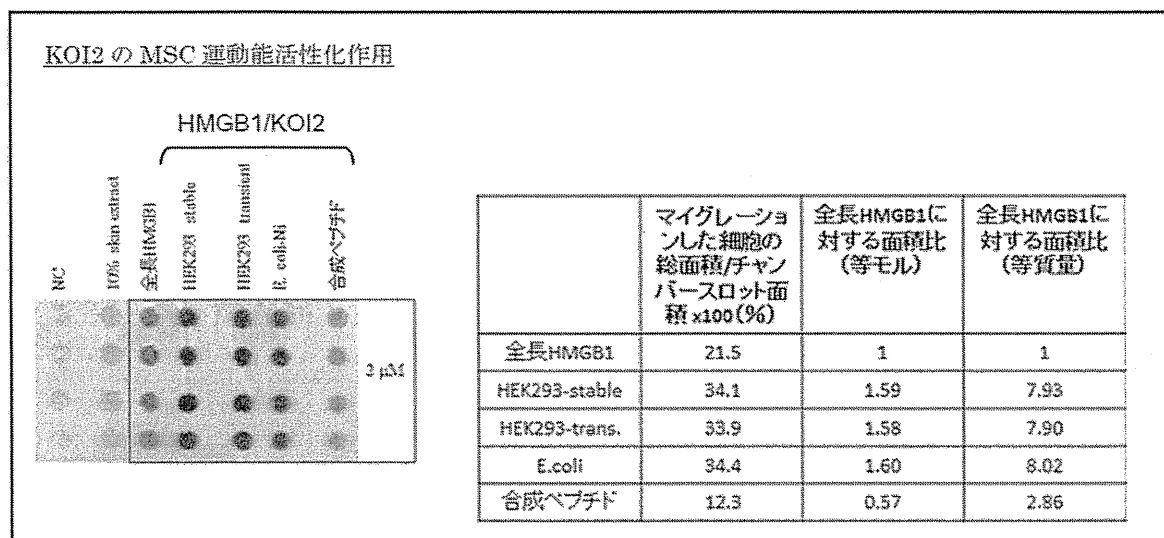
【方法】

HMGB1およびKOI2の骨髄MSCに対する運動能活性化作用の検討をおこなった。
大阪大学にて樹立したマウスPDGFR α 陽性骨髄MSC株、MSC-1細胞¹⁾をディッシュからトリプシンを使用して4℃、1200rpm、10分の遠心により回収した。ペレットをほぐし、細胞濃度が $2.0\sim 3.0\times 10^6$ 個/mlになるように、10% fetal bovine serum (FBS) 含Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) を加え混濁した。HMGB1およびKOI2を10% FBS含D-MEMに希釈した。陰性コントロールとしてはphosphate buffered saline (PBS) を使用した。アクリル製ボイデンチャンバーを使用し、上層には 3×10^6 個/mlに調製されたMSC-1細胞、下層には希釈したHMGB1タンパクもしくはKOI2を入れた。底板の上に8 μ m 孔のポリカーボネートメンブレン (Neuro Probe, Inc.) を載せて、さらに上板を載せてネジで固定した。チャンバーは37℃、5% CO₂のインキュベーター内で静置した。4時間後チャンバーのメンブレンを回収し、Diff-Quick (Sysmex) を用いて、膜の孔を通り抜け下層に向かってマイグレーションした細胞を染色により検出し、ケモタキシスチャンバーの孔の面積とマイグレーションした細胞の面積を、画像解析ソフトを用いて計測した。

【結果と考察】

等モルあたりでは HMGB1 に対して化学合成した KOI2 は 0.57 倍の活性であったが、等質量あたりでは 2.86 倍の高い活性を示した (図 4-1 参照、図中合成ペプチドは KOI2 である)。

図 4-1 HMGB1 および KOI2 による MSC 運動能活性化



4.1.2 KOI2 の骨髄 MSC 血中動員活性

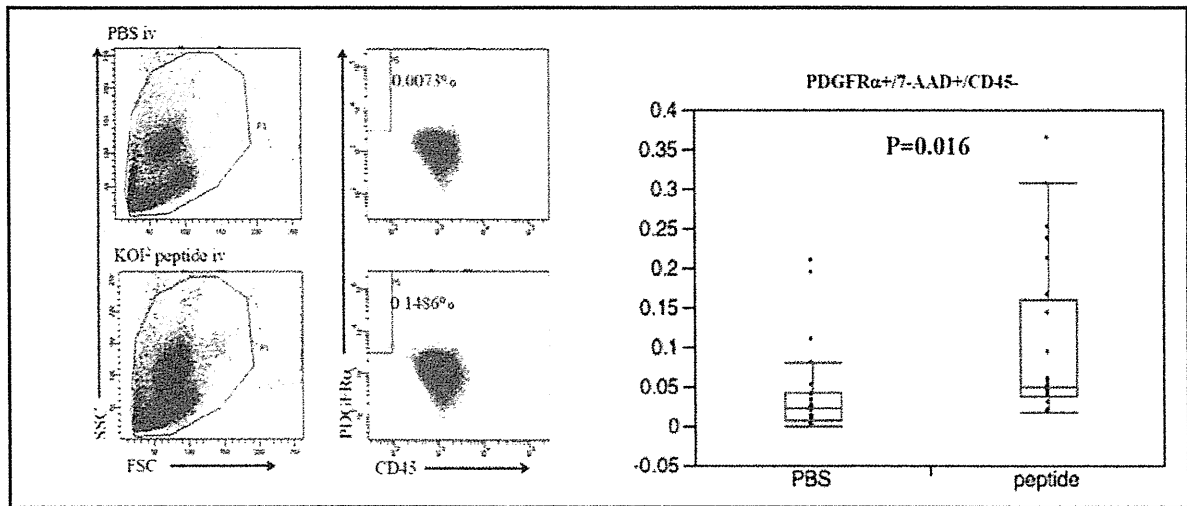
【方法】

静脈投与による、マウス骨髄内PDGFR α 陽性MSCの末梢血動員活性を測定した。

C57BL/6系雌性マウス（8週齢）の尾静脈から0.5mg/kgのKOI2を投与した。陰性コントロールには同量のPBSを投与した。12時間後イソフルランによる全身麻酔下で左心室から末梢血液を採血した。3 mlのPBSを加えた後、Ficoll-Paque Plus 3 mlを重層した。遠心機を用い複数回の遠心操作を行い、沈殿した単核細胞を回収した。回収した単核細胞を丸底96 well プレートに、 1×10^6 個/100 μ l（2% FBS 含PBS）で調製した。PE-mouse CD140a（PDGFR α ）もしくはFITC-mouse CD44を、それぞれ単核細胞の入ったウェルに1 μ lずつ加え遮光し、20分間4 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。PBS 200 μ lずつ加え、1500rpm、4 $^{\circ}$ Cで10分間遠心を行った。上清を捨て再度PBS 200 μ lずつ加え、1500rpm、4 $^{\circ}$ Cで10分間遠心を行った。PBS 100 μ lに細胞を懸濁後、1%パラホルムアルデヒド300 μ lを加えた。なおイソタイプコントロール用抗体を使用して同様にコントロールを作製した。FACSCantTM IIを使用して上記で調製した細胞の解析を行った。

【結果と考察】陰性コントロール群と比較して、KOI2 投与群では有意差（P=0.016）を持って末梢血中の PDGFR α 陽性細胞の割合が増加した（図 4-2 参照）。

図 4-2 静脈内投与によるマウス血中 PDGFR α 陽性細胞増加



PBS : 陰性コントロール ; Peptide : KOI2

4.1.3 KOI2 の末梢循環不全性難治性皮膚潰瘍ラットモデルに対する治療効果

【方法】

HMGB1タンパクおよびKOI2について、皮膚の阻血性組織壊死に対する治療効果を測定した。SD系雄性ラット（8週齢）をイソフルランによる吸入麻酔によって十分な麻酔を施行した後、背部に横3cm縦7cmの短冊状の皮膚切開（皮弁）を作製した。ただし、頭側の一边は切除せず、皮膚は皮下の組織から十分に遊離した。切開した3辺を周囲の皮膚と4号絹糸を用いて縫合し、テガダーム（スリーエム）を使用して保護し細菌感染を予防した。

ラット(n=5)にHMGB1タンパク（100 µg/回/日）、KOI2（50 µg/回/日）を、手術後6時間を初回として以後24時間ごとに計5回、薬剤をリン酸緩衝液で200 µlに希釈し尾静脈から投与した。陰性コントロールとしてはPBSを同様に投与した。

1週間後、テガダームを除去し1週ごとに創傷部位を観察した。壊死部分の面積を測定した。面積測定にはImageJ (NIH)を使用した。

【結果と考察】

手術1週後に陰性コントロール群では5匹中4匹に強い皮膚壊死が発生した。HMGB1投与群では5匹中3匹で強い皮膚壊死が発生した。KOI2投与群では5匹中3匹で強い皮膚壊死が発生していた。手術7週間後には陰性コントロール群では5匹中4匹において皮膚の強い拘縮が起きているのに対し、全長HMGB1投与群では5匹中3匹で、KOI2投与群では5匹中2匹で拘縮が認められた。

HMGB1投与群およびKOI2投与群いずれにおいても1週間後から壊死組織の縮小効果を認め、壊死組織の面積がそれぞれ陰性コントロール群の半分の面積に縮小していた（図4-3参照）。4週後以降もKOI2投与群は陰性群に比較して創傷面積が縮小傾向にあった。7週後の治癒過程においても、KOI2投与群の方がより創傷面積が小さい傾向にあった。

骨髄 MSC は低酸素状態における皮膚細胞の増殖を促進することが知られており、HMGB1 や KOI2 によって動員された骨髄 MSC が皮弁作製によって生じた低栄養、低酸素による皮膚壊死の拡大を抑制し、創傷治癒を促進したと予想された。この結果から、臨床では皮膚の疎血、外傷、手術による損傷の拡大などを抑制する KOI2 の薬理効果が期待される。