

研究課題名	ビオチニル化ペプチドを用いた新規アナフィラキシー治療薬の開発
フリガナ	サトウ アキラ
代表者名	佐藤 陽
所属機関（機関名） （役職名）	いわき明星大学 薬学部 助教
本助成金による発表論文，学会発表	・ <u>Sato A</u> , Ebina K. A biotinylated peptide, BP21, as a novel potent anti-anaphylactic agent targeting platelet-activating factor. (海外雑誌へ投稿中)

## 研究結果要約

アナフィラキシーはそばや卵、ピーナッツなどの食物アレルギーなどにより起こる最も重篤で生命に危険を及ぼす全身性の疾患である。血小板活性化因子（PAF）はアナフィラキシーにおける重要な脂質メディエーターとして知られており、PAF 活性を阻害することにより致命的なアナフィラキシーを予防できる。最近私達は、PAF に対して特異的に結合しその活性を劇的に抑制する複数種のビオチニル化ペプチド（特許第 5982676 号）を創出してきた。本研究では、ビオチニルペプチドを用いた新規アナフィラキシー治療薬の開発、実用化を目指して、疾患モデル動物を用いてペプチドの有効性を調べた。その結果、ビオチニル化ペプチドの BP21、dK(Btn)P6 はともに、既知の PAF 受容体拮抗薬に比べてその 20 分の 1 の投与モル量で、アナフィラキシーにより起こる体温低下を劇的かつ用量依存的に抑制し、かつ即効性に優れていること、特に D 体アミノ酸を含む dK(Btn)P6 は持続効果を併せ持つことが明らかとなった。また、その抑制効果にはペプチド中の Tyr-Lys-Asp-Gly 配列が重要な役割を果たしていること、BP21 はアナフィラキシーにより起こる血管透過性亢進を抑制することもそれぞれ明らかとなった。以上より、ビオチニル化ペプチド BP21、dK(Btn)P6 はともに新規アナフィラキシー治療薬として期待できることから、実用化に向けてさらに有用性を検証していきたい。

## 研究目的

アナフィラキシーは、そばや卵、ピーナッツなどの食物アレルギーなどにより起こる最も重篤で生命に危険を及ぼす全身性の疾患である。血小板活性化因子 (platelet-activating factor: PAF) は、アナフィラキシーにおける重要な脂質メディエーターとして知られており<sup>1,2)</sup>、PAF 活性を阻害することにより致死的なアナフィラキシーを予防できる。しかし、PAF を対象とした薬剤 (PAF 受容体拮抗薬など) は未だ実用化されていないのが現状である。

私達はこれまで、既知の PAF 受容体拮抗薬とは異なり、PAF との特異的・直接的結合能を有し、ラット PAF 誘発足蹠浮腫試験において静脈内投与、皮下投与いずれにおいても PAF 活性を特異的かつ劇的に抑制するビオチニル化ペプチド (特許第 5982676 号) を見出した (本ペプチドは既知 PAF 受容体拮抗薬の 40 分の 1 の投与量で劇的な抗 PAF 活性を示す)<sup>3)</sup>。さらに、一部のアミノ酸を D 体化したビオチニル化ペプチドが血漿中安定性に優れ、かつ従来のペプチドと同様に特異的かつ劇的な抗 PAF 活性を示すことも明らかにしてきた<sup>4)</sup>。以上より、本ビオチニル化ペプチドは PAF を標的とした新しいアナフィラキシー治療薬として期待できる。

一方、本ペプチドのアナフィラキシー治療薬としての開発、実用化を目指すためには、実際に疾患モデル動物を用いてペプチドの有効性などを評価し、臨床試験につなげていく必要がある。本研究では、ビオチニル化ペプチドを用いた新規アナフィラキシー治療薬の開発、実用化を目指して、疾患モデル動物を用いてペプチドの有効性、ならびに従来の PAF 受容体拮抗薬に対する優位性などを評価した。

## 研究計画及び研究手法

### 【全身性アナフィラキシー症状に対するビオチニル化ペプチドの有効性の評価】

#### (1) アレルギーモデルマウスに対する全身性アナフィラキシー・ショックの誘導

卵白アルブミン (OVA) に特異的 IgE を恒常的に産生する遺伝子改変 BALB/c マウス (OVA-IgE マウス、10~14 週令、日本クレア株式会社より購入) に、アレルゲンの OVA (1.5 mg/匹) を注射して、全身性アナフィラキシー・ショックを誘導した。なお、この実験では遺伝子改変マウスを用いることから、本学の遺伝子組換え生物等委員会に計画書等の書類を提出し、機関承認を受けるとともに、本学の実験動物委員会に動物実験計画書を提出し、審査・承認を受けた後、本学の定める規定に従って実施した。

#### (2) アナフィラキシー症状の評価の指標

- ①エバンスブルーを用いた血管透過性の測定

(1) のマウスにアレルゲン (OVA) とともに青色色素 (エバンスブルー) を注射し、その 30 分後、75 分後に両足や耳に漏出する色素の血管透過性の程度を調べた。具体的には、各組織に漏出したエバンスブルーの量を ng/mg 組織として算出した (漏出した色素の波長 595 nm における吸光度を出し、色素の標準溶液の吸光度による検量線より算出した)。

## ②直腸温の測定

アナフィラキシーによる体温低下を調べるため、マウスの直腸温を測定した。具体的には、マウスに OVA を投与してから 0、10、20、30、45、60、75 分後にそれぞれ直腸温を測定した。

## (3) ビオチニル化ペプチドのアナフィラキシーに対する有用性の評価

OVA-IgE マウスに OVA (1.5 mg/匹) を投与すると同時に、各用量のビオチニル化ペプチド (2-100 nmol/匹) を投与して、アナフィラキシーの各症状 (エバンスブルーを用いた血管透過性の測定、直腸温の測定) に対する効果を調べた。また、既知 PAF 受容体拮抗薬 CV-3988<sup>5)</sup> とビオチニル化ペプチドの上記症状に対する効果の比較を行った。

なお、当初の計画では、ビオチニル化ペプチドのアナフィラキシーに対する有用性の評価として、投与量や投与時間の他に、投与経路によるペプチドの効果を調べることにしていたが、OVA-IgE マウスが非常に高価 (33,000 円/匹) で購入数に限りがあったことから、本研究においてこれらの評価はできなかった。

## 結果と考察

本研究では、アナフィラキシーにより起こる体温低下、血管透過性亢進の 2 つの症状に対するビオチニル化ペプチドの効果を調べることにより、そのアナフィラキシー治療薬としての有効性を評価した。なお、ビオチニル化ペプチドについては本研究実施中の 2016 年 8 月に特許を取得した (佐藤陽ら、抗 PAF 活性を有するビオチニル化ペプチド化合物、特許第 5982676 号)。PAF はアナフィラキシーにおける重要な脂質メディエーターとして知られているが<sup>1,2)</sup>、本ペプチドは Tyr-Lys-Asp-Gly 配列を介して PAF に対して特異的に結合しその活性を劇的に抑制することが明らかとなっている<sup>3)</sup>。本研究では、ビオチニル化ペプチドの BP21 と dK(Btn)P6 (図 1) についてアナフィラキシーの各症状に対する効果を調べた。以下に結果と考察、今後の課題および学会・論文発表などの予定について示す。また、図については別紙 (添付ファイル) により示す。

### 【本研究による結果と考察】

(1) アナフィラキシーによる体温低下に対する BP21 の効果

OVA-IgE マウスに OVA のみ、OVA + BP21 (100 nmol)、BP21 (100 nmol)のみ、またはその担体溶媒 (vehicle) のみを投与して、0~75 分後における直腸温を測定した。まず、OVA 単独の投与により直ぐに直腸温の低下がみられた (図 2)。BP21 はその投与後から 30 分以内において OVA による直腸温低下を劇的に抑制したが、その抑制効果は 45 分後以降で減弱する傾向にあった (図 2A)。また、この抑制効果におけるペプチド中の Tyr-Lys-Asp-Gly 配列の重要性を調べる目的から、BP21 中の Tyr-Lys-Asp-Gly 配列を Gly-Gly-Gly-Gly 配列に換えた BGP21 を用いてアナフィラキシーによる体温低下に対する効果を調べた。その結果、BGP21 の直腸温低下に対する抑制効果は BP21 に比べて低いことが解った。なお、BP21、BGP21、担体溶媒それ自体はいずれも直腸温の低下を抑制しなかった (図 2A)。また、BP21 (0~100 nmol) は用量依存的に直腸温の低下を抑制することも明らかとなった (図 2B)。

さらに、BP21 と既知の代表的な PAF 受容体拮抗薬 CV-3988 のアナフィラキシーの体温低下に対する効果の比較を行った結果、BP21 は CV-3988 の 20 分の 1 の投与モル量で顕著な抑制効果を示した (図 2C)。

以上より、BP21 はアナフィラキシーにより起こる体温低下に対し即効性に優れているが、持続性は低いと考えられた。また、OVA-IgE マウスに BP21 (100 nmol) + OVA を投与し、その 30 分後に BP21 (100 nmol)を追加投与して持続的な抑制効果が得られるか否かを検討したが、BP21 はアナフィラキシー発症直後の投与で効果があるものの、その後追加投与しても抑制効果をほとんど示さなかった (図 3)。その主な原因としては、PAF がアナフィラキシーの出現直後に多量産生され、直ぐに PAF 受容体を介して体温低下や血管透過性などの作用を示すためだと考えられた。

以上の結果から、BP21 は、既知 PAF 受容体拮抗薬の 20 分の 1 の投与モル量で、Tyr-Lys-Asp-Gly 配列を介して、アナフィラキシーによる体温低下を劇的かつ用量依存的に抑制し、かつ即効性に優れていること、またその抑制効果はアナフィラキシー発症後すぐに投与することで発揮されることが明らかとなった。

## (2) アナフィラキシーによる血管透過性亢進に対する BP21 の効果

OVA-IgE マウスに対し、OVA のみ、OVA + BP21 (100 nmol)、BP21 (100 nmol)のみ、またはその担体溶媒 (vehicle) のみを 1%エバンスブルー (青色色素) とともに投与し、その 30 分後、75 分後に左足、右足、両耳の各組織に漏出したエバンスブルーの量を算出した。その結果、BP21 は、投与から 30 分後ではいずれの組織においても OVA 投与による血管透過性亢進を抑えていたが、75 分後における血管透過性亢進の程度は OVA 単独とほぼ同等になっていた (図 4)。なお、BP21、担体溶媒それ自体による血管透過性亢進はいずれもみられなかった。以上の結果から、BP21 は投与から 30 分程度まではアナフィラキシーによる血管透過性亢進を抑制するが、それ以

降（30分以降）での抑制効果は減弱することが明らかとなった。

### （3）アナフィラキシーによる体温低下に対する D 体アミノ酸含有ビオチニル化ペプチド dK(Btn)P6 の効果

最近私達は、D 体アミノ酸を含有し Tyr-Lys-Asp-Gly 配列を有するビオチニル化ペプチド dK(Btn)P6 が、血漿中安定性に優れ、BP21 と同様に特異的かつ劇的な抗 PAF 活性を示すことを明らかにしてきた<sup>4)</sup>。そこで、アナフィラキシーによる体温低下に対する dK(Btn)P6 の効果を調べる目的から、OVA-IgE マウスに OVA のみ、OVA + dK(Btn)P6 (100 nmol)、dK(Btn)P6 (100 nmol)のみ、またはその担体溶媒 (vehicle) のみを投与して、各時間 (0~75 分) における直腸温を測定した。その結果、dK(Btn)P6 は、OVA 投与により起こるマウスの直腸温低下を顕著に抑制し、その効果は投与から 30 分以降においても持続していることがわかった (図 5)。

### 【本研究による所期の結果ならびに本研究期間後に残された課題】

今回用いたビオチニル化ペプチドの BP21、dK(Btn)P6 はいずれも新規アナフィラキシー治療薬として期待できることがわかり、所期の結果はある程度得られたと考えている。BP21 は、アナフィラキシーにより起こる体温低下や血管透過性亢進に対し、投与から 30 分後までは劇的に抑制するが、45 分後以降でその効果は減弱することがわかった。一般にペプチドは酵素等による分解を受け易く、生体内安定性に乏しいという問題点を有しており、その解決法としてペプチドの D-アミノ酸化や環状化などが知られている。実際に、血漿中安定性に優れた D 体アミノ酸含有ビオチニル化ペプチドの dK(Btn)P6 は、アナフィラキシーによる体温低下に対し、BP21 よりも持続的な抑制効果を示すことが解った。一方、本研究期間後に残された課題としては、投与経路からみたペプチドの効果、ならびにアナフィラキシーによる体温低下や血管透過性亢進以外の症状に対する効果など未だ不明な点が多く残されているため、今後早急に検証していきたいと考えている。

### 【学会・論文発表等の予定】

本ビオチニル化ペプチドについては 2016 年 8 月に特許を取得した。また現在、本研究の成果をまとめた論文を海外雑誌に投稿中である。今後、本成果について各種学会（日本アレルギー学会や日本薬学会など）、各種イベントでの出展（例えば、イノベーション・ジャパン、BioJapan のような企業・他研究機関とのマッチングイベント）などを通じて対外的に発表することを目指している。

### 今後の研究活動について

今後は、ビオチニル化ペプチド BP21、dK(Btn)P6 のアナフィラキシー治療薬としての有用性に

ついてさらに検証を進めていきたい。具体的には、本研究で出来なかった経口投与など投与経路からみたペプチドの効果や、アナフィラキシーにより起こる体温低下や血管透過性亢進以外の症状（血圧低下や気管支収縮など）に対するペプチドの効果などを疾患モデル動物を用いて調べ、これらの結果と本助成による研究結果を併せて、本ペプチドのアナフィラキシー治療薬としての実用化に向けた次のステージに進めていきたいと考えている。

また、本研究の成果については、論文の海外雑誌への掲載を通じて、また各種イベントでの出展（例えば、イノベーション・ジャパンや BioJapan のような、企業・他研究機関等とのマッチングイベントなど）や学会発表などを通じて、対外的に発表するとともに、実用化へ向けた共同研究や技術移転も目指していきたい。

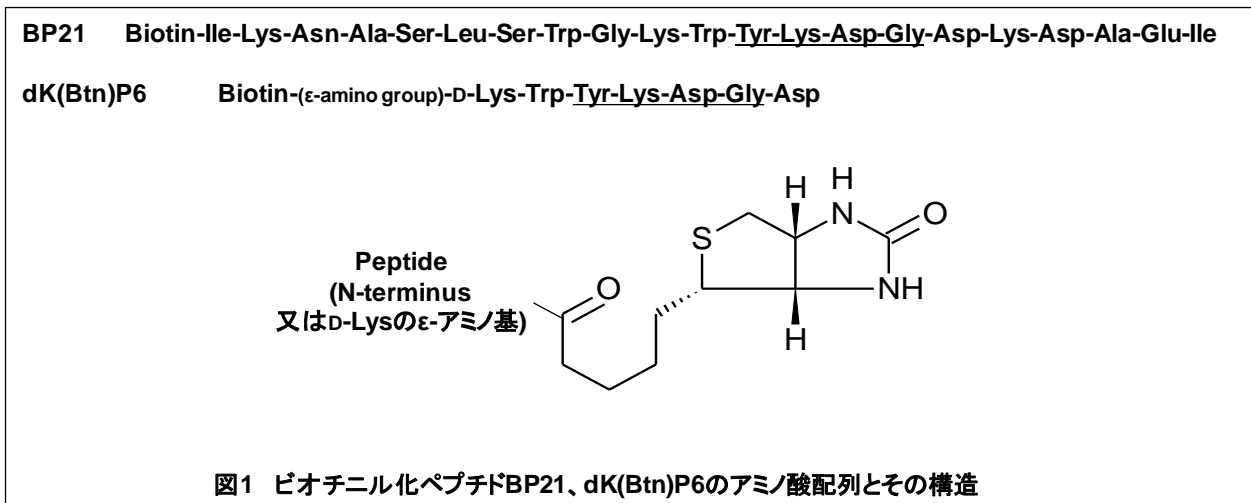
#### 参考文献

- 1) Shibamoto T, Liu W, Cui S, Zhang W, Takano H, Kurata Y. PAF, rather than histamine, participates in mouse anaphylactic hypotension. *Pharmacology* 2008 Aug;82(2):114-20.
- 2) Shiva D, Matsumoto T, Kremenik MJ, Kato Y, Yano H. High dose of lipopolysaccharide pre-treatment prevents OVA-induced anaphylactic decreases in rectal temperature in the immunized mice. *Immunol Lett.* 2008 Jun;118(1):59-64.
- 3) Sato A, Kumagai T, Aoki J, Ebina K. Synthetic biotinylated peptide compounds derived from Asp-hemolysin: Novel potent inhibitors of platelet-activating factor. *Eur J Pharmacol.* 2012 Jun;685(1-3):202-12.
- 4) Sato A, Yokoyama I, Ebina K. Biotinylated heptapeptides substituted with a D-amino acid as platelet-activating factor inhibitors. *Eur J Pharmacol.* 2015 Oct;764:202-7.
- 5) Terashita Z, Tsushima S, Yoshioka Y, Nomura H, Inada Y, Nishikawa K. CV-3988 – a specific antagonist of platelet-activating factor (PAF). *Life Sci.* 1983 Apr;32(17):1975-82.

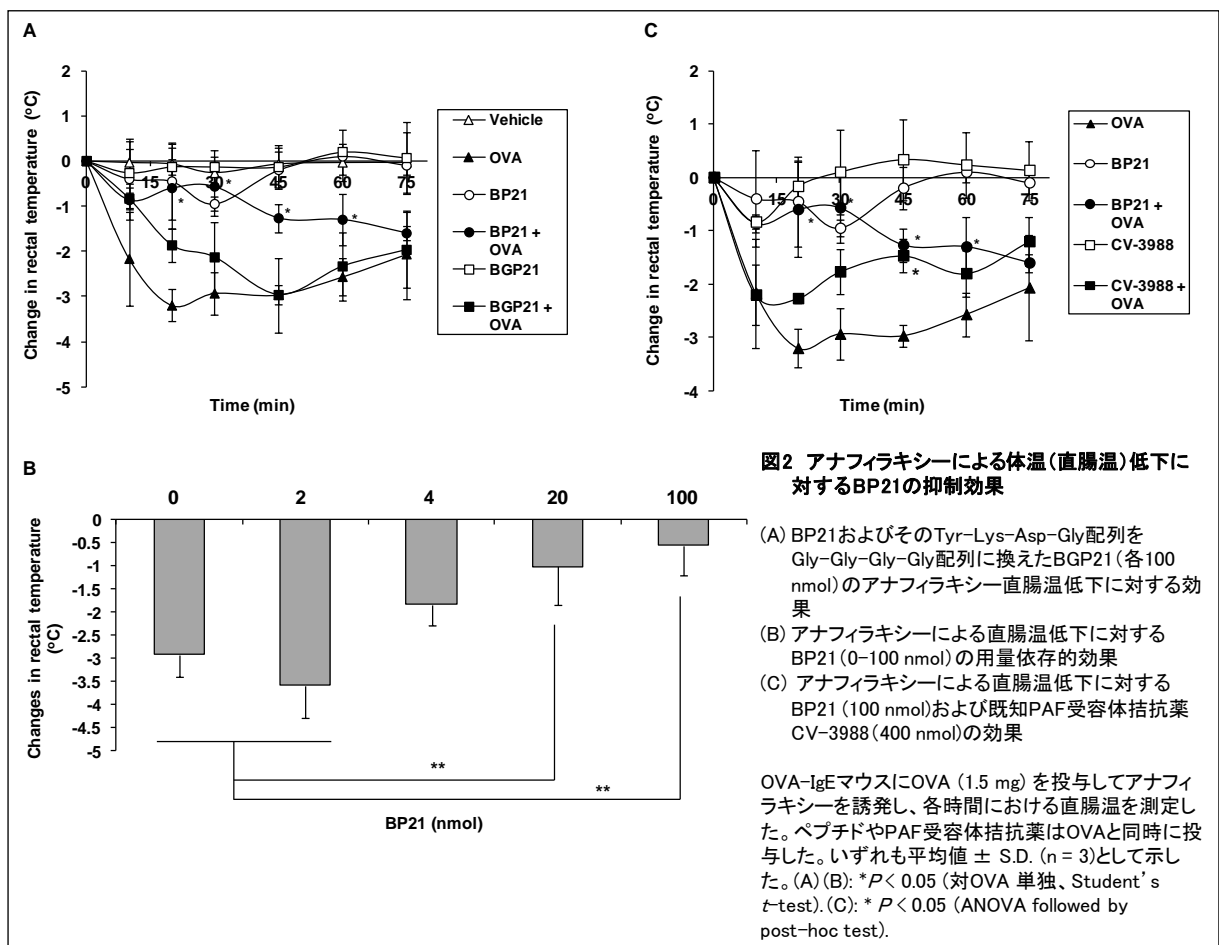
以上

次ページ以降に添付資料（図 1～図 5）あり

【図1】



【図2】



【図 3】

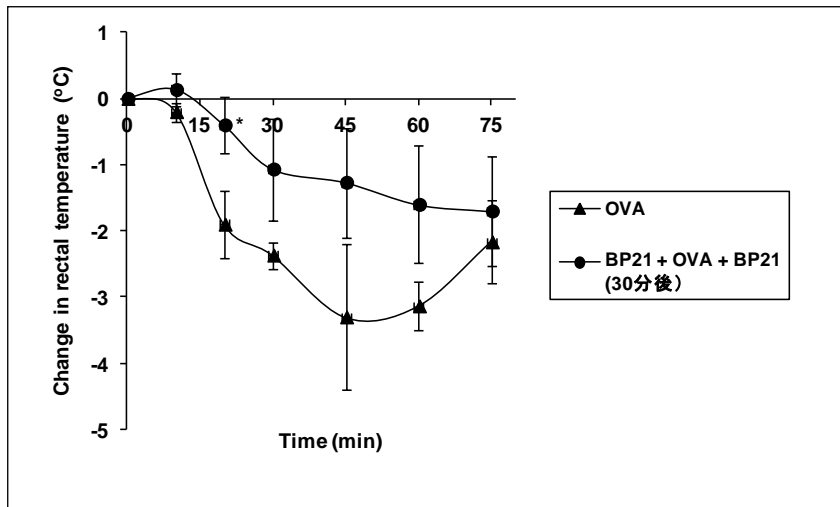


図3 アナフィラキシーによる体温(直腸温)低下に対するBP21の追加投与の効果

OVA-IgEマウスにOVA (1.5 mg) を投与してアナフィラキシーを誘発し、各時間における直腸温を測定した。BP21 はOVAと同時に100 nmolを投与し、その30分後に100 nmolを追加投与した。いずれも平均値 ± S.D. (n = 3)として示した。\* $P < 0.05$  (対OVA 単独、Student's *t*-test)。

【図 4】

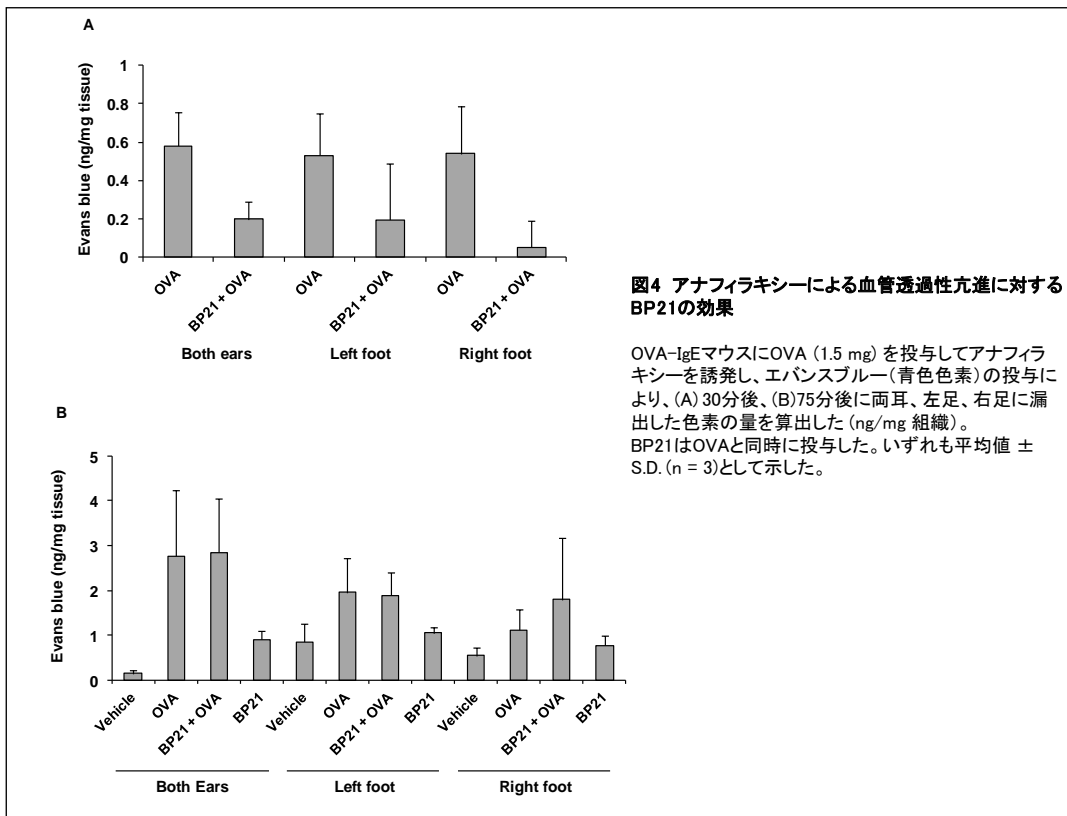
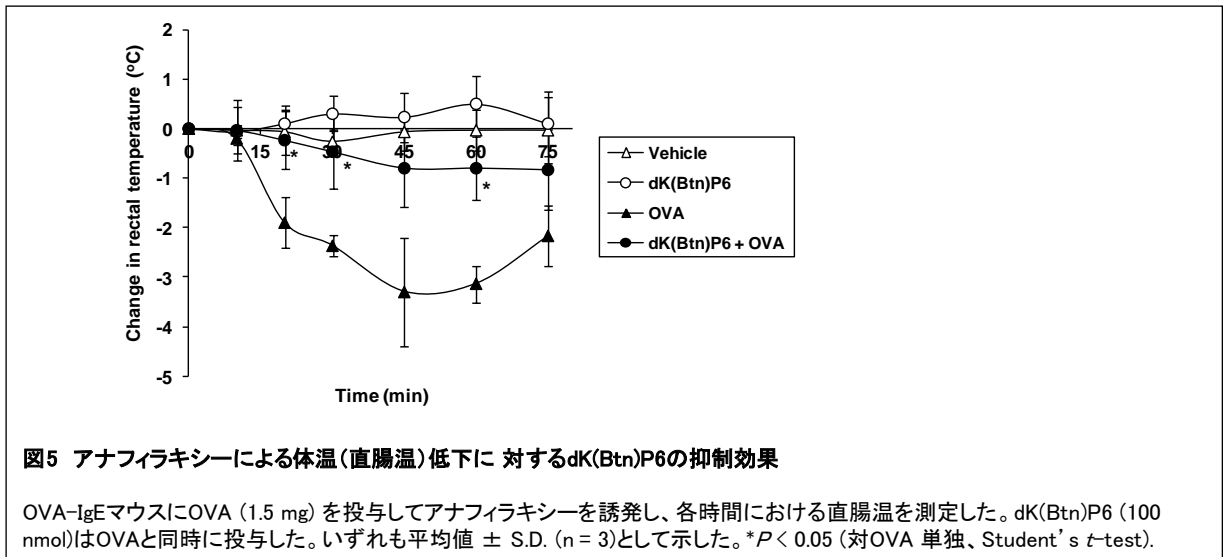


図4 アナフィラキシーによる血管透過性亢進に対するBP21の効果

OVA-IgEマウスにOVA (1.5 mg) を投与してアナフィラキシーを誘発し、エバンスブルー(青色色素)の投与により、(A) 30分後、(B) 75分後に両耳、左足、右足に漏出した色素の量を算出した (ng/mg 組織)。BP21はOVAと同時に投与した。いずれも平均値 ± S.D. (n = 3)として示した。



[図 5]



以上