

ニッポンハム食の未来財団 平成 30 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	新規アナフィラキシー治療薬の開発ービオチニル化ペプチドの有効性評価ー
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）	医療創生大学（旧 いわき明星大学）薬学部 衛生薬学部門 准教授
本助成金による 発表論文，学会発表	<p>【学会発表】</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・佐藤 陽，蝦名敬一，ビオチニル化ペプチドの新規アナフィラキシー治療薬としての有効性評価，一般学術発表（ポスター），日本薬学会第 139 年会，2019 年 3 月 23 日，千葉。</li> </ul> <p>【論文】</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・Akira Sato, Keiichi Ebina, A biotinylated peptide, BP21, alleviates hypotension in anaphylactic mice, J. Pept. Sci., submitted.</li> </ul>

### 研究結果要約

血小板活性化因子（platelet-activating factor: PAF）は、アナフィラキシーの発症に関与する脂質メディエーターとして知られており、その活性を抑えることで致死的なアナフィラキシーを予防、改善できる。最近私達は、PAF 結合特異性ビオチニル化ペプチド（特許第 5982676 号）が、アナフィラキシー・ショックによる体温低下や血管透過性亢進を顕著に抑制することを疾患モデル動物を用いて明らかにしてきた。本研究では、ビオチニル化ペプチドのアナフィラキシー治療薬としての実用化を目指して、疾患モデル動物を用いて、本ペプチドのアナフィラキシー症状に対するさらなる有効性を調べるとともに、現在のアナフィラキシー治療における第一選択薬のアドレナリンと、本ペプチドの効果を比較した。その結果、本ペプチドの一種 BP21 が、アナフィラキシーによる血圧低下を用量依存的かつ顕著に抑制し（特に投与から 20 分以内）、特に高用量では血圧を上昇させた。一方、アドレナリンは、血圧低下を抑制する（高用量では血圧上昇を起こす）が、体温低下を抑制しなかった。さらに、低用量の BP21-アドレナリン併用は、アナフィラキシーによる体温低下および血圧低下に対して顕著な抑制効果を示した。以上より、BP21 を含むビオチニル化ペプチドは新規アナフィラキシー治療薬として、単独もしくはアドレナリンとの併用により有用であると考えられた。今後は、本ペプチドの安全性や体内動態など臨床研究に向けたさらなる研究を進めていきたい。

## 研究目的

アナフィラキシーは、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で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。

最近私達は、PAF との特異的・直接的結合能を有し、ラット PAF 誘発足浮腫試験において静脈内および皮下投与で 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 (図 1、特許第 5982676 号) を見出してきた<sup>1,2)</sup>。また私達は、貴財団からの支援 (平成 28 年度個人研究助成) を受けて、本ペプチドがアナフィラキシー・ショックによる体温低下および血管透過性亢進を顕著に抑制し (既知 PAF 受容体拮抗薬の 20 分の 1 の投与モル量で顕著な抑制効果を示す)、かつ即効性に優れていること、D 体アミノ酸含有ペプチドは持続効果を併せ持つことを疾患モデル動物を用いてそれぞれ明らかにしてきた<sup>3)</sup>。以上より、本ペプチドは 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。

本ペプチドのアナフィラキシー治療薬としての実用化を目指すためには、ペプチドのさらなる有効性を明らかにする必要がある。現在、アドレナリン (エピネフリン) はアナフィラキシー・ショックの救急治療の第一選択薬として用いられているが、動脈硬化症や重症不整脈、糖尿病などの患者へは原則投与禁忌となっている。一方、本ペプチドは動物において副作用が無いことから、いずれの人にも投与することが可能であると考えられる。そこで本研究では、ビオチニル化ペプチドのアナフィラキシー治療薬としての実用化を目指して、疾患モデル動物を用いて体温低下に対するペプチドの効果を調べるとともに、アナフィラキシー・ショック症状に対するペプチドとエピネフリンとの効果を比較し、ペプチドのさらなる有効性を明らかにすることとした。

## 研究計画及び研究手法

### (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、6~15 週令、雄性、日本クレアより購入) に、アレルゲンの OVA 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、所属機関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、機関承認を受けた。また、申請者の所属機関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・ショック症状に対するビオチニル化ペプチドの有効性評価

### ① アナフィラキシー・ショックにより血圧低下に対するビオチニル化ペプチドの有効性評価

(1)の全身性アナフィラキシー・ショック誘導マウスに対し、ペプチドを注射したときの血圧低下に対する効果を血圧計を用いて血圧を測定（モニター）した。なお、当初の計画では、この効果については、ペプチドの投与経路、投与時間（投与間隔）、投与量の点から評価することとしていたが、投与経路および投与間隔については OVA-IgE マウスの本研究費用に対する購入匹数（33,000 円/匹）に限りがあったことから評価ができなかった。

### ② アナフィラキシー・ショック症状（血圧低下、体温低下など）に対するビオチニル化ペプチドとエピネフリンの効果の比較

本ペプチドと、アナフィラキシー・ショック改善の第一選択薬であるアドレナリンとの間で、上記に対する効果の比較を行うとともに、両者併用による効果についても検証した。なお、ペプチドは、先の研究で使用した投与量とした（0～100 nmol/マウス）。アドレナリンは実際に臨床で使用されている推奨投与量（0.01 mg/kg 体重）をもとに、マウスには 0.3 μg = 約 1.6 nmol 前後を投与することとした。また、既知 PAF 受容体拮抗薬の CV-3988（400 nmol/マウス）も用いて効果の比較を検討した。

## 結果と考察

本研究では、PAF 特異結合性ビオチニル化ペプチドの BP21（図 2）および BP4 を用い、BP21 の対照としてその YKDG 配列を GGGG 配列に換えた BGP21 を用いた。

### (1) アナフィラキシーによる血圧低下に対する BP21、BGP21 および BP4 の効果（図 3）

OVA-IgE マウスに OVA（1.5 mg）を注射した後すぐに収縮期血圧の低下が起こり、約 60 分間続いた（アナフィラキシー・ショックの誘導）。BP21（100 nmol）はアナフィラキシーによる血圧低下を顕著に抑制した（BP21 は投与後 20 分以内で効果が得られた）（図 3-A）。また、BP21 は用量依存的にこの血圧低下を抑制し、高用量の投与で血圧を上昇させることがわかった（図 3-B および 3-C）。一方、アナフィラキシー・ショックを誘導しないマウスでは、BP21 は血圧に全く影響を与えなかった。さらに、アナフィラキシー・ショック誘導マウスに対し、BP21 の YKDG 配列を GGGG 配列に置換した BGP21 は BP21 と同様に血圧を上昇させたのに対し、BP4 は血圧に全く影響を与えなかった（図 3-A）。

以上の結果から、BP21 は、アナフィラキシーによる体温低下や血管透過性亢進を顕著に抑制する

だけでなく<sup>3)</sup>、血圧低下も顕著に抑制すること、②BP21の血圧低下抑制作用は、ペプチド中のYKDG配列(PAF分子と結合しその活性を抑制する部分)以外の部分により起こる可能性が考えられた。

(2) アナフィラキシーによる血圧低下に対するBP21、アドレナリンおよび既知PAFアンタゴニストCV-3988の効果(図4)

OVAを注射したOVA-IgEマウス(アナフィラキシー誘導マウス)を用いて検討した結果、BP21(100 nmol)、アドレナリン(4.4 nmol)はともにアナフィラキシーによる血圧低下を顕著に抑制し、その持続効果はBP21よりもアドレナリンの方が長いことがわかった(特に、BP21は投与後20分以内で、アドレナリンは投与後30~40分以内でそれぞれ効果が得られた)(図4-A)。一方、既知PAFアンタゴニストの一種であるCV-3988はこの血圧低下を全く抑制しなかった。

さらに、図4-Bおよび4-Cに示すように、BP21(50 nmol)とアドレナリン(0.44 nmol)との低用量での併用は、アナフィラキシーによる血圧低下を顕著に抑制することがわかった。以上の結果から、BP21、アドレナリンは単独としてのみならず、BP21とアドレナリンとの低用量での併用がアナフィラキシーの治療(血圧低下に対して)において有用であると考えられた。現在、アドレナリンはアナフィラキシー・ショックの救急治療の第一選択薬として用いられているが、動脈硬化症や重症不整脈、糖尿病などの患者へは原則投与禁忌となっている。また、アドレナリンは高用量で投与すると様々な副作用を発現することも知られている。従って、本研究の結果は、アドレナリンの問題点を解決できるものと考えられた。

(3) アナフィラキシーによる体温低下に対するBP21とアドレナリンの効果(図5)

OVAを注射したOVA-IgEマウス(アナフィラキシー誘導マウス)を用いて検討した結果、アナフィラキシーによる体温低下に対し、BP21(100 nmol)は顕著に抑制したのに対し(特に投与後30分以内)、アドレナリン(0.44 nmol)は全く抑制しなかった(図5-A)。

さらに、BP21(50 nmol)とアドレナリン(0.44 nmol)の併用はアナフィラキシーによる体温低下を顕著に抑制し、その効果はBP21(100 nmol)単独投与よりも優れていた(図5-Aおよび5-B)。以上の結果から、BP21は単独、もしくはアドレナリンとの併用がアナフィラキシーの治療(体温低下に対して)において有用であると考えられた。

4) まとめ(本研究期間後に残された課題を含む)

本研究による前述(1)~(3)の結果、および私達のこれまでの研究成果から、PAF特異結合性ビオチニル化ペプチド(図1)の一種であるBP21は、アナフィラキシーによる体温低下や血管透過性亢進のみならず、体温低下をも顕著に抑制することを疾患モデル動物を用いて明らかにした。こ

の抑制効果は、BP21 単独でも期待できるが、現在臨床においてアナフィラキシーの救急治療の第一選択薬であるアドレナリンを低用量にし、かつ BP21 と併用することでも十分期待できると考えられた。このことは、アドレナリンの問題点（高用量投与による副作用や、投与が原則禁忌の疾患があること、など）を解決できるものと考えられた。従って、本研究による結果から、ビオチニル化ペプチド BP21 はアナフィラキシーにおける新たな治療薬として有用であると考えられた。

一方、アナフィラキシーによる血圧低下に対する BP21 の抑制効果は、ペプチド中の YKDG 配列以外の配列部分を介して行われる可能性があり、この点については今後解析を進めていく必要がある。また、投与経路や投与時間からみたペプチドの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。さらに、本ペプチドの実用化へ向けて、ペプチドの物理化学的安定性や安全性（毒性）、体内動態などの臨床試験を目指した様々な試験を行う必要があると考えている。

#### 5) 学会や論文発表等の予定

私達は、2019年3月20～23日に千葉で開催された日本薬学会第139年会において、以下の内容で本研究成果を発表した。

・佐藤 陽, 蝦名敬一, ビオチニル化ペプチドの新規アナフィラキシー治療薬としての有効性評価, 一般学術発表 (ポスター), 日本薬学会第139年会, 2019年3月23日, 千葉.

また現在私達は、本研究成果をまとめた以下の内容の論文を *J. Pept. Sci.* に投稿しており、現在査読中である。

・Akira Sato, Keiichi Ebina, A biotinylated peptide, BP21, alleviates hypotension in anaphylactic mice, *J. Pept. Sci.*, submitted.

今後、本研究成果について日本薬学会以外の学会（日本アレルギー学会など）、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も検討中である。

#### 今後の研究活動について

前述の通り、本研究の結果、アナフィラキシーによる血圧低下に対する BP21 の抑制効果は、ペプチド中の YKDG 配列（PAF 分子と結合しその活性を抑制する部分）以外の配列部分を介して行われる可能性が考えられたことから、この点については今後さらなる解析を進めていく必要がある。また、投与経路や投与時間からみたペプチドの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。さらに、本ペプチドの実用化へ向けて、まずはヒトでの臨床試験を目指し、ペプチドの物理化学的安定性や安全性（毒性）、体内動態など、動物を用いた各種試験（非臨床試験）を行う必要があると考えている。

今後、本研究成果について各種学会（日本アレルギー学会など）、各種イベントでの出展（JST 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。

#### 参考文献

- 1) 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):205-12.
- 2) 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(1-3):202-7.
- 3) Sato A, Ebina K. A biotinylated peptide, BP21, as a novel potent anti-anaphylactic agent targeting platelet-activating factor. *J Pept Sci.* 2017 Sep;23(9):727-35.

以上