

令和元年6月7日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08386

研究課題名(和文) 免疫賦活薬の経鼻投与によりがん免疫細胞療法における患者負担の軽減を目指す研究

研究課題名(英文) Research on reduction of patient burden in cancer immunotherapy using intranasal administration of immunostimulant

研究代表者

古林 呂之 (Furubayashi, Tomoyuki)

神戸薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00399156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：強力な免疫増強作用を有するNKT細胞を活性化することが報告されている α -galactosylceramide (GalCer) を免疫活性化の場となる頸部リンパ節へ効率的に送達するための投与剤形を検討した結果、大豆油とレシチンで調製した脂肪乳剤に封入した場合にGalCerの細胞層透過及び頸部リンパ節移行が最も改善された。また、マウス鼻腔内に投与した後の免疫活性の評価では、脂肪乳剤として投与した場合に未処置群に比べて有意な血清及び頸部リンパ節中サイトカイン(INF- γ 、IL-2、IL-4及びIL12)量の上昇が観察され、GalCerを鼻粘膜を介して頸部リンパ節に送達できる可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床試験中のがん免疫細胞療法は、患者から採取した免疫細胞を体外で α -galactosylceramide (GalCer) と共に培養し、増殖及び活性化した樹状細胞を患者体内に注射により戻す。これを数週間にわたり繰り返すことになるが、患者の身体的・経済的負担は決して軽いものではない。本研究において示された、非侵襲的な鼻腔内投与によるGalCerの頸部リンパ節送達の実現は、患者の苦痛の軽減やQOLの改善につながる。さらに、鼻腔内投与の有効性が上昇することで、がんペプチドワクチン療法やその他注射による治療の代替方法として、患者に寄り添った技術の確立につながっていくと考えている。

研究成果の概要(英文)： α -Galactosylceramide (GalCer) is a superagonist that activates NKT cells via antigen presenting cells such as dendritic cells and promotes the production of interferon- γ . We investigated the direct delivery of GalCer to CLN of mice, which is the site of activation of NKT cells and the production of cytokines, such as IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL12, in serum and CLN after application intranasally of GalCer. Amount of GalCer in the CLN after application intranasally as emulsion to mice was higher than that as suspension, and the ratio of areas under the time-concentration curve of GalCer in the CLN up to 120 min was about 1.5. Furthermore, the amount of cytokines, such as IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL12, in serum and CLN also increased by applying intranasally GalCer as emulsion. These results suggested that the intranasal application using emulsions is useful for the efficient delivery of GalCer to the CLN.

研究分野：生物薬剤学

キーワード： α -galactosylceramide 鼻腔内投与 頸部リンパ節 脂肪乳剤 樹状細胞 サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国の2015年予測がん罹患数は982,100例とされ、2014年のがん統計予測(882,200例)に比べて約100,000例が増加するとされており、がん発症部位別に見ても肺や口腔・咽頭のがん罹患数と死亡数は、今後も増加傾向にある(独立行政法人国立がん研究センターがん情報サービス)。例数の増加は世界に先駆けて超高齢化社会を迎えた我が国の状況が背景にもあり、65歳以上の人口割合である高齢化率は、2025年には約30%、2060年には約40%に達すると見られている(総務省平成25年版情報通信白書)。高齢になるほどがんの罹患率は高まり、死亡リスクは60歳代から増加するとの統計データからも、今後50年以上この状況が続くことは容易に予測される。このような状況の中、様々な新規抗がん剤や治療法が研究・開発されているが、死亡数は増加の一途を辿っている。その中で、近年注目されている治療法の一つに、がん免疫細胞療法がある。強力な免疫増強作用を有するNKT細胞(Invariant Natural Killer T cell)を標的にして肺がんを治療する方法であり、NKT細胞の活性化作用を有する α -galactosylceramide(GalCer)を静脈内投与することにより(Minami K, *et al.*, *Blood*, 2005)、または、患者から採取した樹状細胞にGalCerを取り込ませた後に静脈注射により患者に戻すこと(Toura I, *et al.*, *J. Immunol.*, 1999、Motohashi S, *et al.*, *Clin. Immunol.*, 2011)で殺がん細胞作用が獲得される。同様の樹状細胞を鼻粘膜下に注射することにより、頸部リンパ節(cervical lymph node; CLN)転移を含めた頭頸部癌を治療する臨床研究も進められている(Uchida T, *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 2008、Kunii N, *et al.*, *Cancer Sci.*, 2009)。その他、発症がんの発現する特異ペプチドに対するがんペプチドワクチンが免疫システムを誘導できるペプチドとして注目されている(Matsueda S, *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.*, 2013)。このように、近年は患者の免疫力強化によるがん治療が試みられているが、治療においては免疫細胞の活性化や特異ペプチドの同定とペプチドワクチンの合成に時間と費用が掛かり、また、活性化された免疫細胞の投与には皮下注射を数ヶ月にわたり1~数週毎に反復投与されるなど、治療における身体的・経済的な負担は決して軽くない。そこで注目したのが、これら治療法に共通する免疫獲得が体内ではリンパ節が主な舞台となることである。

頸部には、頭頸部や鼻腔、口腔からの細菌やウイルスなどの病原体の侵入に備え、リンパ網が発達しており、多くのリンパ節が存在する(図1)。特に、CLNは、頭部上流の各所のリンパが集合する部位であり、頸リンパ本幹へと繋がることから、耳鼻咽喉・頭頸部領域において臨床的に最も重要なリンパ節群とされている。また、CLN群は、耳鼻咽喉及び隣接領域に発生したがんの転移先となり、外科的治療では原発巣の切除のみならず、転移のない場合にも後発性転移を懸念してCLN群の郭清術が実施される場合も多い。しかし、リンパ節郭清と予後の関係については十分に明らかにされておらず、また、郭清術後の患者のQOLは一般的に著しく低いために、郭清の賛否は分かれている。化学療法による治療も実施されるが、全身循環系からのCLNへの薬物送達効率は低く、血中濃度を上げる必要があるために全身性の副作用発現を覚悟しなければならない。これに対して、抗がん剤をCLNに直接送達することができれば、化学療法における副作用の軽減及び治療成績の向上が期待できると考え、我々は、CLNへの薬物送達研究を推進し、経鼻ルートの優位性と良好なCLN移行性を得るための条件として、薬物の細胞層透過性が高いことに加え、鼻粘膜下でのリンパ指向性が薬物分子量に依存することを速度論的に明らかにしてきた。これは、良好な細胞層透過性を示す高脂溶性薬物や比較的高分子量のペプチド医薬などにとって有利な事実であり、糖脂質のGalCer及びがんペプチドワクチンのCLNへの送達及び免疫賦活化の実現における新規投与ルートとしての可能性を期待させる結果であった。

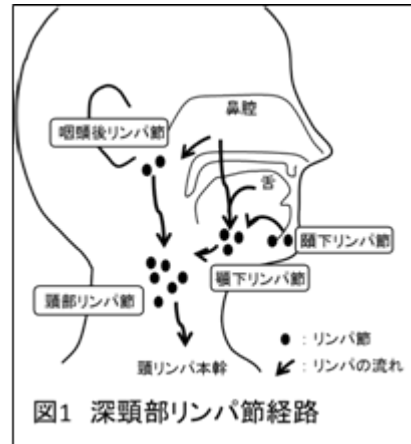


図1 深頭部リンパ節経路

2. 研究の目的

がん免疫細胞療法は、強力な免疫増強作用を有するNKT細胞(Invariant Natural Killer T cell)をGalCerで活性化してがんを治療するが、予め患者から採取した樹状細胞にGalCerを取り込ませた後、樹状細胞を患者に戻す。これを数週に渡って繰り返し注射で行うため、患者の身体的・経済的負担は軽くない。研究代表者は、CLNに薬物を直接送達する投与ルートとして経鼻ルートの有用性を明らかにし、抗がん剤の経鼻投与により舌癌からの転移が抑制できる可能性を見出してきた。CLNはNKT細胞の活性化の場であり、GalCerをCLNへ直接送達できれば樹状細胞採取及び投与は不要になる。患者自身での投与が可能な鼻腔内投与による患者負担の少ないがん免疫細胞療法の確立を目的としている。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞層透過性評価

GalCerは糖脂質であり、鼻腔内投与後の十分な粘膜透過量を確保するためには粘膜上での溶解が一つの問題となる。そこでまず、GalCerの鼻腔内での溶解量を確保するための投与条件を

ヒト肺腺癌由来培養細胞層 (Calu-3) 透過性を指標に行った。

投与液

透過実験に用いた投与液の組成及び調製方法は表 1 に示す。いずれの投与液も透過実験用緩衝液 (transport medium; TM) の Hank's balanced salt solution (pH7.4) を用いて希釈した。不溶の GalCer を除去するために孔径 0.45 μ m のセルロース系フィルター (Millipore Millex) を用いてろ過した。

表 1 透過実験に用いた投与液

投与液	GalCer濃度	組成及び調製方法***
DMSO*	0.04 μ g/mL	0.8% DMSOにGalCerを添加・攪拌後、ろ過
懸濁液 (SUS)	50 μ g/mL	TMにGalCerを添加 (5% ethanol)
脂肪乳剤 (EM/L)	10 μ g/mL	TMで2倍希釈した市販脂肪乳剤にGalCerを添加・攪拌
脂肪乳剤ろ過処理 (EM/L-filt)	1.42 μ g/mL	TMで2倍希釈した市販脂肪乳剤にGalCerを添加・攪拌後、ろ過
1%Pluronic**	0.36 μ g/mL	1%PL F68 TM溶液にGalCerを添加・攪拌後、ろ過
5%Pluronic**	0.60 μ g/mL	5%PL F68 TM溶液にGalCerを添加・攪拌後、ろ過

* DMSO: dimethylsulfoxide, ** PL: Pluronic, *** 各投与液の希釈及び調製には、HBSS pH7.4(TM)を用いた。

Calu-3 細胞層の作製

定法により継代培養した Calu-3 細胞 (継代数 41~55) を、透過実験用のポリカーボネートフィルター上に 2.0×10^5 cells/mL の濃度で播種し、気 - 液界面培養法で 10~14 日間培養したものを実験に用いた。

透過実験

透過実験には、Millicell ERS-2(Merck Millipore) で測定した膜抵抗値が 600~1000 Ω を示したものを選択肢し、TM で 30 分間プレインキュベートした後に用いた。漿膜側溶液には、細胞層透過後の GalCer の溶解補助のために 4.5% albumin を加えた TM (Alb-TM) を用いた。細胞層上に各投与液を添加した後、30、60、90 及び 120 分に漿膜側から 100 μ L を採取し、透過実験試料とした。採取後、漿膜側溶液の減量分を補うために同量 (100 μ L) の新たな Alb-TM を漿膜側に加えた。採取した各透過実験試料に 12 倍量の methanol を加え、除タンパク処理して遠心 (13,200 rpm、10 min) した上清を蒸発乾固し、定量用の移動相で再溶解した。

(2) 鼻腔内投与後の CLN 移行性評価

透過実験において良好な GalCer の膜透過を示し、CLN 移行性が期待できる脂肪乳剤を鼻腔内投与 (IN) の製剤とした。調製した各脂肪乳剤の乳濁粒子径を動的光散乱法により測定した (表 2)。また、製剤対照群には懸濁液 (GalCer 0.5 mg/mL、0.1% Tween80 含有) を投与し、投与経路対照群は静脈内投与 (IV) とした。

脂肪乳剤の調製

ダイズ油 (脂質)、卵黄レシチン (乳化剤) 及び GalCer を混合し、加熱溶解したものに 2.5% グリセリン水溶液を加えて攪拌し、粗乳化後、超音波ホモジナイザーを用いて乳化した。

<脂肪乳剤組成>

- ・10%脂肪乳剤 large (EM/L) ... 10%大豆油 / 卵黄レシチン (1 : 0.12)、GalCer 0.05 mg/mL
- ・10%脂肪乳剤 large ろ過処理 (EM/L-filt) ... 10%脂肪乳剤 large を調製した後、孔径 0.45 μ m のセルロース系フィルター (Millipore Millex) を用いてろ過した。
- ・10%脂肪乳剤 small (EM/S) ... 10%大豆油 / 卵黄レシチン (1 : 1)、GalCer 0.5 mg/mL で小粒子径の乳剤を調製した後、孔径 0.45 μ m のセルロース系フィルター (Millipore Millex) を用いてろ過した。

鼻腔内投与と実験

ddy 雄性マウス (18~23 g) に各脂肪乳剤及び懸濁液 5 μ L を左右の外鼻孔から投与し、投与後 15、30、60、90 及び 120 分に血液及び CLN を採取した。血液は、ヘパリンを加えた遠心チューブに採取し、遠心分離 (13,200 rpm、10 min) したものを (100 μ L) を血漿試料とした。除タンパク処理後の上清を蒸発乾固し、定量用の移動相で再溶解した。CLN は、質量を測定した後、methanol (1 mL) を加えてホモジナイズし、遠心分離 (13,200 rpm、10 min) 後、上清を蒸発乾固し、定量用の移動相で再溶解した。

表 2 脂肪乳剤の乳濁粒子径

脂肪乳剤	粒子径(d.nm \pm 標準偏差)
EM/L	176.6 \pm 4.8
EM/L-filt	207.0 \pm 2.7
EM/S	100.7 \pm 2.1

(3) 免疫活性効果の評価

実験条件の確認として、ddy 雄性マウス (18~23 g) に血清に溶解した GalCer (1 μ g/匹) を尾静脈から投与し、4 時間後の血清中 INF- γ 及び IL-4 濃度を測定した結果、GalCer を静脈内に

投与したマウスの血清中 IFN- γ 及び IL-4 濃度が未処置の control 群に比較してそれぞれ 1.66 倍及び 5.74 倍と有意に高くなった。IFN- γ は NKT 細胞により、また、IL-4 は CD4⁺T 細胞により産生されることが知られており、GalCer による免疫の活性化が確認された。

ddy 雄性マウス (18~23 g) の外鼻孔から、0.2 mg/mL の GalCer を封入した EM/L-filt (0.2)、0.4 mg/mL の GalCer を封入した EM/L-filt (0.4) 及び 0.5 mg/mL の GalCer を封入した EM/S をそれぞれ 20 μ L、単回投与及び 2~3 日間隔で 4 回の反復投与を行った。最終投与後 4 時間に血液及び CLN を採取した。血液は氷冷下で 30 分間静置した後、遠心分離 (13,200rpm, 10 分) により得られた血清を試料とした。また、CLN は、定量用の溶媒を加えてホモジナイズした後、遠心分離 (13,200rpm, 10 分) により得られた上清を試料とした。得られた血清及び CLN 中の IFN- γ 、IL-2、IL-4 及び IL-12 は、市販の ELISA-Kit (ProteintechTM) を用いて、製品プロトコルに従い定量した。また、未処置群を陰性対照 (CTL) とした。

(4) GalCer の定量

各実験で得られた試料中の GalCer は、高速液体クロマトグラフィー質量分析装置 (6460 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies) を用いて下記条件により定量した。本条件により 5~500 ng/mL の GalCer 標準試料を定量し、原点を通る相関係数 0.9996 の良好な直線性が得られることを確認した (図 2)。

LC 条件

- ・移動相: 0.25% formic acid 含有 methanol/5 mM ammonium formate (95:5)
- ・流量: 0.2 mL/min
- ・注入量: 15 μ L
- ・カラム: TSKgel SuperC8, 2.0 mm ID. \times 10 cm, 2.3 μ m (TOSOH)

MRM 測定条件

- ・イオン化方式: ESI+
- ・Precursor ion(m/z): 859.3 (+)
- ・Product ion(m/z): 696.5(+), 687.5(+), 282.1(+)
- ・Fragmentor (V): 170
- ・Capillary (V): 3500(+)
- ・Collision energy(V): 30

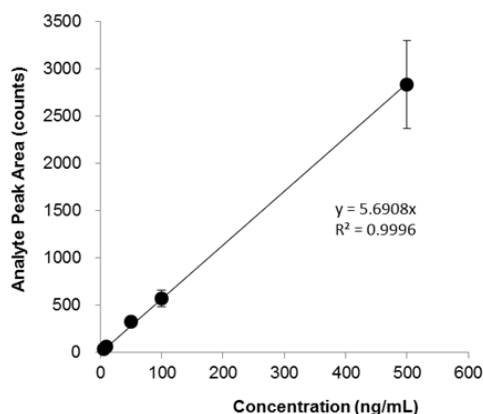


図 2 α -Galactosylceramide 定量における

4. 研究成果

(1) 培養細胞層透過性評価 (図 3)

実験開始から 120 分間の GalCer の累積透過量は、EM/L が最も高く、次いで EM/L-filt、5% PL、1% PL、DMSO、SUS の順となった。また、脂肪乳剤では膜抵抗値の低下は観察されなかったが、5% PL、1% PL ではそれぞれ実験開始時の 20% 及び 80% に低下したことから粘膜傷害性が懸念された。脂肪乳剤により GalCer の膜透過促進効果が示され、鼻腔内投与と実験において CLN 送達量の確保に繋がること期待された。

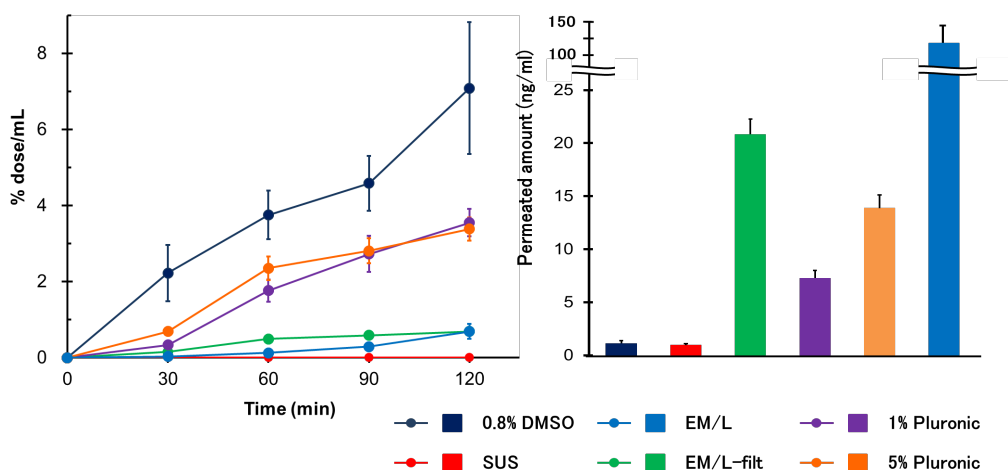


図 3 各種投与製剤からの GalCer の Calu-3 細胞層透過性 (左) 透過プロファイル、(右) 120 分間累積透過量

(2) 鼻腔内投与後の CLN 移行性評価 (図 4)

CLN への GalCer の移行は、EM/L 投与群が SUS 投与群に比較して速く、また、120 分までの AUC₀₋₁₂₀ も高かった。特に、EM/L-filt で最も高い移行を示した。脂肪乳剤とすることにより、投与液中の GalCer の溶解量が増大したことに加え、鼻粘膜吸収及び吸収後の鼻粘膜下り

ンパ管への移行が増大した可能性が考えられた。これらの結果から、さらに GalCer の吸収量を改善するために、GalCer 含有量を 10 倍とし、さらに乳濁粒子径を小さくした脂肪乳剤 (EM/S) を投与した結果、CLN 移行は増加し、 AUC_{0-120} は EM/L に比べて約 2 倍の値を示した。投与量に比例する程の増加ではないものの、CLN への移行量を改善することができた。

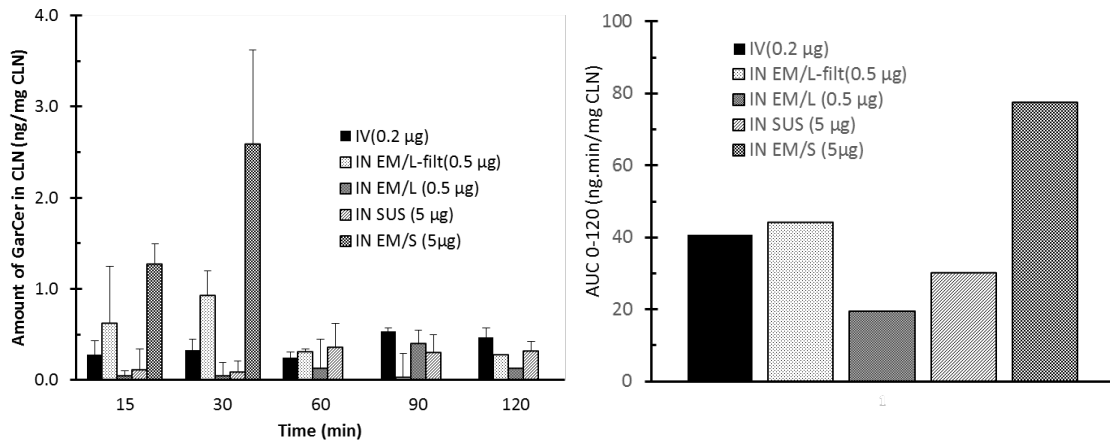


図 4 鼻腔内投与後の CLN 中 GalCer 濃度推移 (左) と 120 分間の AUC (右)

(3) 免疫活性効果の評価 (図 5、6)

EM/L-filt (0.2) の単回投与群 (s) では、血清中及び CLN 中の各サイトカイン量の上昇は認められなかったものの (データ未提示)、反復投与群 (r) において、特に CLN 中のサイトカイン量の顕著な上昇が観察された。この結果より、更なる活性化の増大を目的として GerCer 封入量を増量した脂肪乳剤 (EM/L-filt (0.4)) を調製し、同様の実験を行った。

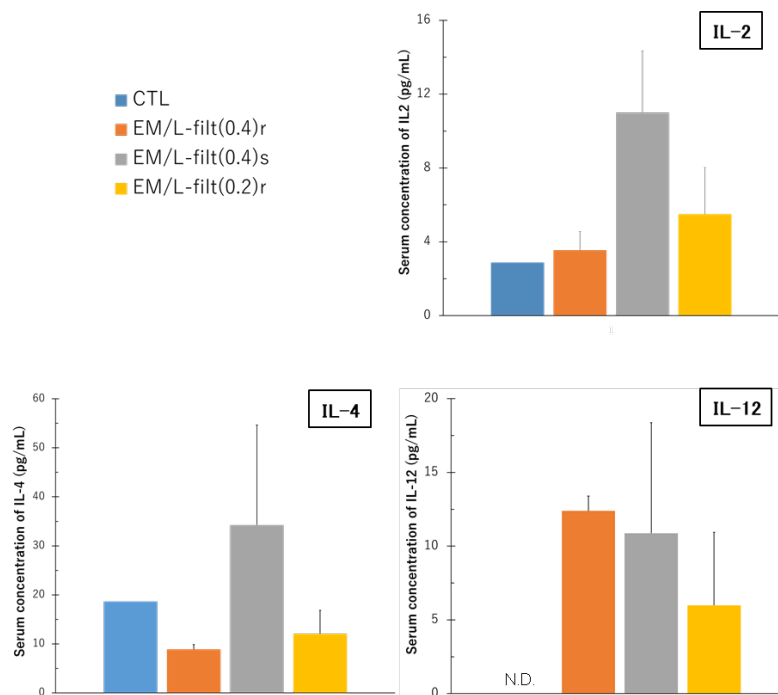


図 5 脂肪乳剤 GalCer 鼻腔内投与後の血清中サイトカインの評価

EM/L-filt (0.4) の単回投与群 (s) において、血清中 IL-2、IL-4 及び IL-12 の上昇が観察され、いずれにおいても EM/L-filt (0.2) に比べて高い値を示し、GalCer 増量の効果が確認された。CLN 中ではすべてのサイトカインの値が CTL 群に比べて上昇することが観察された。

EM/L-filt (0.4) の反復投与群 (r) において、血清では IL-12 のみが単回投与と同程度の値を示したが、IL-2 及び IL-4 は CTL 群よりと同程度かあるいは低い値となった。静脈内への GalCer の反復投与では anergy が引き起こされ、免疫の活性化が起こらなくなるとの報告があることから、鼻腔内投与量の増量により吸収量が増大したために同様の現象が生じた可能性も考えられるが、一方で CLN 中のサイトカイン量は、IL-2 を除いて単回投与よりも濃度の上昇は低いものの、いずれも CTL 群に比較して上昇が観察された。鼻粘膜を介して GalCer が直接 CLN へ移行したことによる効果と考えられ、鼻腔内投与により anergy を回避できる可能性が示された。なお、各脂肪乳剤投与後の血清中 INF- は、いずれの投与群においても検

出されなかった。

以上の結果より、GalCer の脂肪乳剤化は、製剤中の GalCer 溶解量と粘膜吸収性を改善することが明らかとなった。さらに、脂肪乳剤として GalCer を鼻腔内投与することにより、樹状細胞の活性化、NKT 細胞の活性化の指標となるサイトカインの産生が増大することが明らかとなり、本手法が新たな治療手段となる可能性が示された。

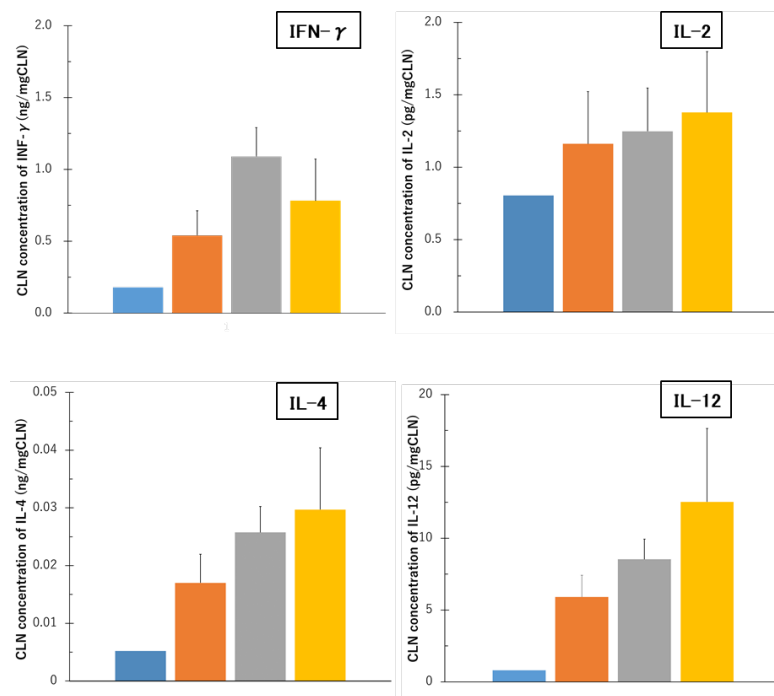


図6 脂肪乳剤化 GalCer 鼻腔内投与後の CLN 中サイトカインの評価

5. 主な発表論文等

[学会発表](計4件)

古林呂之、田中晶子、井上大輔、小林正樹、湯谷玲子、坂根稔康、「鼻腔内投与による α -Galactosylceramide の頸部リンパ節送達性改善に関する検討」日本薬学会第 139 年会、2019

古林呂之、井上大輔、小林正樹、田中晶子、勝見英正、山本 昌、湯谷玲子、坂根稔康、「鼻腔内投与による α -Galactosylceramide の頸部リンパ節送達に関する検討」第 34 回日本 DDS 学会学術集会、2018

古林呂之、小林正樹、松原嘉子、井上大輔、田中晶子、勝見英正、山本 昌、湯谷玲子、寺岡麗子、坂根稔康、「 α -Galactosylceramide の鼻粘膜透過性改善を目指した製剤最適化に関する検討」日本薬学会第 138 年会、2018

松原嘉子、井上大輔、田中晶子、勝見英正、山本 昌、湯谷玲子、寺岡麗子、坂根稔康、古林呂之、「鼻粘膜透過性改善に向けた α -Galactosylceramide の可溶性の検討」、第 56 回日本薬学会中国四国支部学術大会、2017

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：井上大輔

ローマ字氏名：Daisuke Inoue

所属研究機関名：就実大学

部局名：薬学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 50550620

(2)研究協力者

研究協力者氏名：坂根稔康

ローマ字氏名：Toshiyasu Sakane

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。