

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07034

研究課題名（和文）がんペプチドワクチン療法患者の治療負担を軽減する経鼻投与型粉末ペプチド製剤の研究

研究課題名（英文）Research of nasal powder formulation of peptide drug for cancer therapy

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：がんペプチドワクチン（WT1p）のマウス鼻腔内投与において、頸部リンパ節（CLN）移行の優位性の指標（DTI）が優位性の基準となる1を大きく超え（8.1）、CLN総移行量に占める鼻粘膜ルートの寄与率（DTP）は87.7%となり、WT1pのCLN送達における経鼻ルートの有用性が示された。WT1p溶液を鼻腔内投与した後の免疫活性評価では、interferon の上昇傾向が観察されたが、より高い免疫活性化を得るために、WT1pの粉末を鼻腔内投与し、CLN送達量の増大を図ったところ、CLN中WT1p濃度-時間曲線下面積が溶液投与に比べて約20倍高くなり、強力ながん免疫誘導が期待できる結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アジュバントと共に皮下注射するこれまでのがんペプチドワクチン療法では、アジュバントの影響でがん応答性が惹起されたT細胞がワクチン接種部位に留まる、あるいは血液中から逆戻りするとの報告があり、臨床試験の成績不良の原因とされているが、本研究で得られたがんペプチドの鼻腔内投与では、ペプチドを直接頸部リンパ節に送達することにより、アジュバントを用いずに免疫が誘導でき、また、投与剤形を粉末とすることでペプチドの頸部リンパ節送達量を増大させることにも成功した。アジュバントの影響を避けることで継続的で強力な免疫誘導が得られ、また、アジュバントによる副作用及び注射の回避によるQOLの改善にも繋がる成果である。

研究成果の概要（英文）：In the nasal administration of a cancer peptide vaccine (WT1p) to mice, the drug targeting index (DTI), which is showed WT1p directly delivered from nasal cavity into the cervical lymph node (CLN), was well above 1 (the DTI value was 8.1), and the direct transport percentage (DTP), which indicated the contribution of the intranasal route, accounted for 87.7%, indicating the usefulness of the intranasal route for delivery of WT1p to the CLN. In the assessing an immune activity after intranasal administration of WT1p by the solution, a tendency to increase interferon was observed. To achieve greater immune activation, the powder of WT1p was administered intranasally to increase CLN delivery. In that case, the area under the concentration-time curve of WT1p was approximately 20-fold higher than solution was administered, indicating the possibility to strongly induce of cancer immunity.

研究分野：生物薬剤学、DDS

キーワード：経鼻投与 がんペプチドワクチン 頸部リンパ節 粉末投与 WT1ペプチド

1. 研究開始当初の背景

がんペプチドワクチン療法は、患者が保有するがんに提示されるペプチドをターゲットとするため、副作用が少なく、患者の QOL を保ったまま生存期間を延ばせる、あるいは再発を予防できる治療法として注目され (Matsueda S, *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.*, **41**, 68-76, 2013)、臨床試験が進められていたが、十分な効果を認めず、開発が断念されているのが現状であった。

がんペプチドワクチン療法は、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) ががん細胞表面の HLA に提示されているペプチドを認識して殺傷することを利用する治療法であり、がんの特異的なペプチドをワクチン接種することにより、がんに対する免疫応答を惹起させる必要がある。臨床試験の結果が思わしくない原因については様々な見解があり、ワクチン接種によりがん応答性が惹起された T 細胞がワクチン接種部位に留まってしまったり、あるいは血液中から逆戻りしてしまうとの報告がある (Y Hailemichael, *et al.*, *Nature medicine*, **19**, 465, 2013)。この原因はペプチドと併用するアジュバントにあるとされ、皮下にアジュバントが留まる皮下注射による投与方法が故の現象とも考えられていた。一方、清野らは、カチオン性のナノゲルをアジュバントの代わりとしてがん抗原ペプチドを経鼻投与することにより、免疫応答を確認している。鼻粘膜下にはリンパ管が発達しており、粘膜を透過した薬物の一部がリンパ管に分布した後、頸部リンパ節 (CLN) に到達する。がんペプチドワクチンがこのルートに乗れば、粘膜下に加えて免疫活性化の場でもあるリンパ節でもペプチドが認識され、より強い免疫応答が得られる可能性があり、既に経鼻投与型インフルエンザワクチンが実用化されてもいた。そこで、経鼻投与後の直接的な CLN 送達に及ぼすペプチドの物理化学的性質を明らかにすることで、効率良くペプチドを送達することが可能となり、より強力な免疫応答が期待できると考えた。当時、臨床試験に進んでいたがんペプチドワクチンによる免疫療法は、注射投与によるもので、患者の身体的苦痛や経済的負担が大きかった。自己投与が可能な経鼻投与は、これらの負担を軽減できる方法であることは間違いないが、患者が自己投与するためには、患者の手元にすぐに投与できる状態で保管される必要がある。したがって、ペプチドワクチンの製剤としての安定化を考慮すると、液剤よりも粉末状製剤とすることが望ましいが、粉末状製剤とした場合、粘膜上でのペプチドの溶解及び粘膜透過が問題となる。特に、経口投与と異なり、鼻粘膜上に存在する水分は限られていることから、効率の良い免疫応答を得るためには水分が制限された中でペプチド物性と溶解及び CLN 移行性との関係を詳細に解析する必要があった。これらを明らかにすることにより、経鼻投与型のがんペプチドワクチンに適した剤形の選択が可能になり、製剤化への光が見えると考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、親水性のモデルペプチドとして oxytocin (OXT、分子量：1007.19)、疎水性のモデルペプチドとして cyclosporine A (CsA、分子量：1202.61) を選択し、それぞれの物性と経鼻投与後の CLN 送達性との関係、また、粉末投与における鼻粘膜上での溶解プロファイルを明らかにし、より効率的な膜透過を実現できる剤形を検討した。さらに、ほとんどのがんに発現している WT1 遺伝子により生成される HLA-A*02:01 WT1 タンパクの 37-45 番のペプチド鎖の WT1 ペプチド (WT1p、分子量 886.02) を用いて経鼻投与後の CLN 移行性及び免疫応答の関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 鼻粘膜上におけるペプチド粉末の溶解性評価

ヒト肺腺癌由来培養細胞株 (Calu-3) を定法により培養後、Calu-3 の懸濁液を透過実験用インサート (Becton Dickinson) の多孔質ポリカーボネート製フィルター上に播種し、14-18 日間培養して細胞層を作製し、疑似鼻粘膜とした。インサートからフィルターと共に切り取った細胞層をスライドガラスに静置し、モデル薬物の OXT 及び CsA の試薬原末を噴霧した後、顕微ラマン分光測定器により 5 分ごとに 30 分まで撮像した。

(2) モデルペプチド溶液の経鼻投与実験

<経鼻投与実験> 親水性モデルペプチドの OXT を水溶液として、また、疎水性モデルペプチドの CsA を 5% Tween20 を加えた溶液として、ddy 系マウス (雄、30g) の鼻腔内に投与した後の CLN への移行性を、腹腔内投与を対照として評価した。いずれも投与後、5、15、30、60、90、120 分 (CsA は 180 分まで) に血液及び CLN を採取した。

<サンプル処理> 血液から血漿を、また、CLN に水を加えて磨り潰したホモジネートの上清を分取し、それぞれに acetonitrile を加えて除タンパク処理した後、遠心分離した上清を蒸発乾固し測定試料とした。

<ペプチドの定量> 測定試料に各移動相を添加して再溶解した試料中の CsA 及び OXT をシングル四重極型質量分析計 (LCMS-2020、島津製作所)、WT1p をトリプル四重極型質量分析計 (LCMS-8045、島津製作所) を用いて、下記条件により分析した。

<分析条件>

移動相：メタノール/0.1%ギ酸溶液 = CsA (15:85)、OXT (32:68)、WT1p (40:60)
流速：0.2 mL/min
分離カラム：TSKgel ODS-100v 3 μm, 2.0 mm O.D.×7.5 cm (TOSOH)
カラム温度：40°C
注入量：10 μL、
検出 m/z：CsA→1230.6 (+)、OXT→504 (+)、WT1p→887.0> 341.3(+)

<データ処理及び CLN 移行性評価>

腹腔内及び経鼻投与後の血漿及び CLN 中ペプチド濃度の時間推移より、台形公式法により 120 分まで (CsA は 180 分まで) の血中濃度-時間曲線下面積 $AUC_{bl,i.p.}$ 及び $AUC_{bl,i.n.}$ 、CLN 中濃度-時間曲線下面積 $AUC_{ly,i.p.}$ 、及び $AUC_{ly,i.n.}$ を求め、CLN 移行における投与ルートの優位性の指標となる drug targeting index (DTI; 式①) 及び CLN 総移行量に対する鼻粘膜ルートの寄与率を示す direct transport percentage (DTP; 式②) を算出し、CLN 送達における経鼻投与の優位性を評価した。

$$DTI = \frac{AUC_{ly,i.n.}}{AUC_{pls,i.n.}} \bigg/ \frac{AUC_{ly,i.p.}}{AUC_{pls,i.p.}} \dots \textcircled{1} \quad DTP(\%) = \frac{AUC_{ly,i.n.} - AUC_{ly,i.p.} \times \frac{AUC_{pls,i.n.}}{AUC_{pls,i.p.}}}{AUC_{ly,i.n.}} \times 100 \dots \textcircled{2}$$

(3) WT1p 経鼻投与後の免疫活性評価

WT1p の水溶液 (1mg/mL) をそれぞれ左右鼻腔内に 5 μL ずつ、また、同用量となるように静脈内及び腹腔内投与し、4 時間後に血液及び CLN を採取した。血液は 30 分静置後、遠心分離により得られた血清を試料とした。また、CLN はリン酸緩衝液でホモジナイズ後、遠心分離した上清を定量試料とした。得られた血清及び CLN 定量試料中のサイトカイン interferon (IFN) -γ、interleukin (IL) -2、IL-4 及び IL-12 を、市販の ELISA-Kit (Proteintech™) を用いて、製品プロトコルに従い定量した。また、生理食塩投与群及び未処置群を陰性対照 (Control) とした。

(4) モデルペプチド粉末の経鼻投与実験

経鼻投与実験：OXT 及び CsA の試薬原末を ddy 系マウス (雄、30 g) の鼻腔内に噴霧投与した後の CLN 移行性を評価した。

<サンプル処理>、<各ペプチドの定量> 及び <データ処理及び CLN 移行性評価> については、溶液投与と同様の方法・条件で行った。

4. 研究成果

(1) 鼻粘膜上におけるペプチド粉末の溶解性評価

高い溶解性を有する OXT は、噴霧後、直ちに溶解したと考えられ、噴霧 5 分後には OXT の粉末は観察されなかった。一方、溶解性が極めて低い CsA は、粉末粒子の形状変化はほとんど観察されず、また、CsA の粘膜上での溶解を促進するために、粘膜上水分を増加させる乳糖や塩化ナトリウムを添加しても溶解性はほとんど変化しなかった。CsA の溶解度は、pH にほとんど影響されないことから、経鼻投与後の粘膜透過量を改善するためには溶解を補助する工夫が必要と考えられた。

(2) モデルペプチドの CLN 移行性評価 (図 1、2、3、表)

OXT について、マウスの経鼻投与及び腹腔内投与後の血漿中濃度推移から求めた AUC より OXT の経鼻吸収率は 2.3% となり、また、CLN 中には AUC 比で約 3.6 倍高い値が検出された。一方、CsA の経鼻吸収率は約 27.8% となり、疎水性のペプチドは溶解さえすれば比較的高い吸収率を示すことが明らかとなった。

また、OXT では、CLN 移行の優位性の指標となる DTI 及び CLN 総移行量に対する鼻粘膜ルートの寄与率を示す DTP は、それぞれ 160.9 及び 99.4% と極めて高い値を示した。また、CsA の DTI 及び DTP は 13.8 及び 92.8% となり、いずれのペプチドにおいても鼻粘膜から CLN へ優位に直接送達されることが明らかとなった。さらに、WT1p の溶液投与では、OXT と同程度の DTI (132.4) 及び DTP (99.2%) を示したことから、CLN への直接送達を示され、経鼻投与によるがん免疫の獲得に向けた可能性が示された。

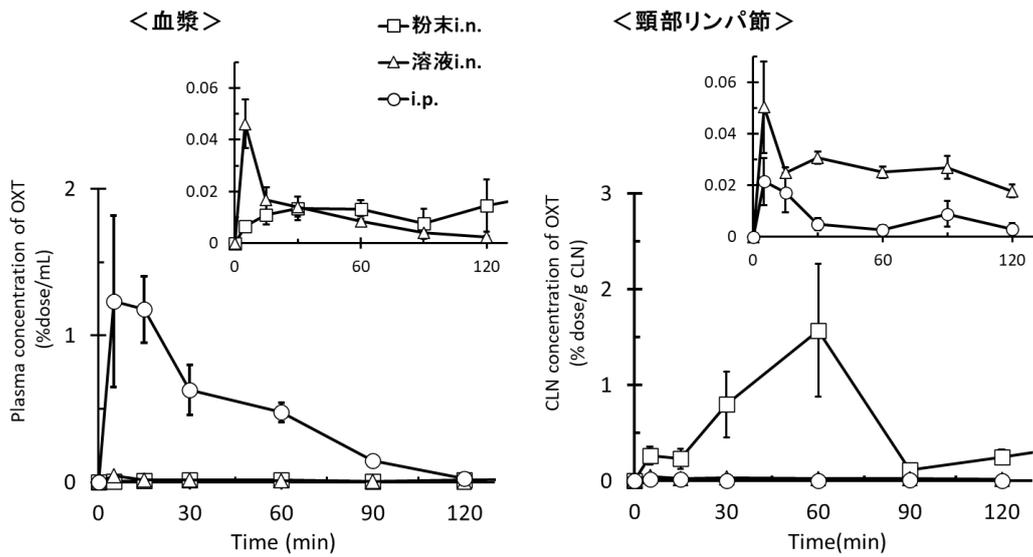


図1 経鼻投与後のOXTの血漿及びCLN中濃度推移

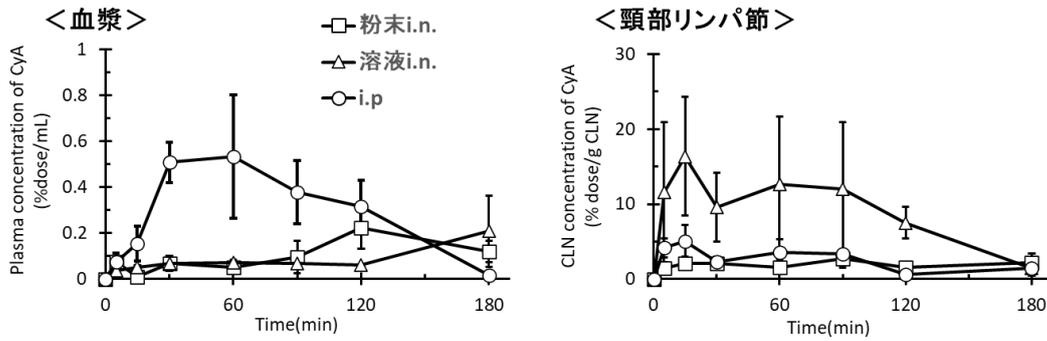


図2 経鼻投与後のCsAの血漿及びCLN中濃度推移

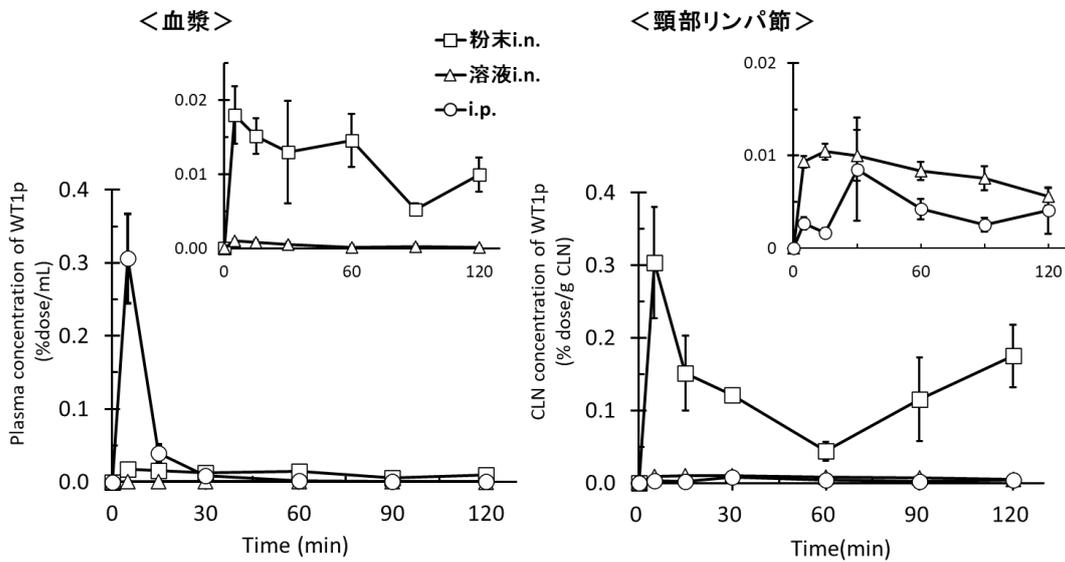


図3 経鼻投与後のWT1pの血漿及びCLN中濃度推移

表 ペプチド経鼻投与後の AUC 及び DTI、DTP

	CsA			OXT			WT1p		
	粉末i.n.	溶液i.n.	i.p.	粉末i.n.	溶液i.n.	i.p.	粉末i.n.	溶液i.n.	i.p.
AUC _{Cl_y} (%dose·min/g)	350.41	1628.22	422.66	202.22	3.20	0.88	31.57	0.98	0.50
AUC _{plsm} (%dose·min/mL)	20.25	15.60	56.01	4.21	1.29	57.18	3.27	0.05	3.06
DTI	2.29	13.83		3124.84	160.94		59.50	132.41	
DTP(%)	56.38	92.77		99.97	99.38		98.32	99.24	

(3) WT1p 経鼻投与後の免疫活性評価 (図 4)

WT1 ペプチドを溶液として経鼻投与することにより、WT1 ペプチドが CLN に直接送達されることが示されたため、マウス (C57BL/6) 経鼻投与後の免疫誘導に関する評価をサイトカインの血清及び CLN 中レベルの上昇を指標に検討した。その結果、血清中の INF- γ レベルの上昇傾向が確認されたものの、対照群の静脈内投与後のレベルと比較して有意ではなく、その他 IL-4 や IL-12 の血清レベルについては対照群と同程度であった。また、CLN 中の各サイトカインレベルは対照群と同程度であった。

より強力に免疫を誘導するためには、WT1 ペプチドの膜透過量及び CLN 移行量を増大させる必要があると考えられた。

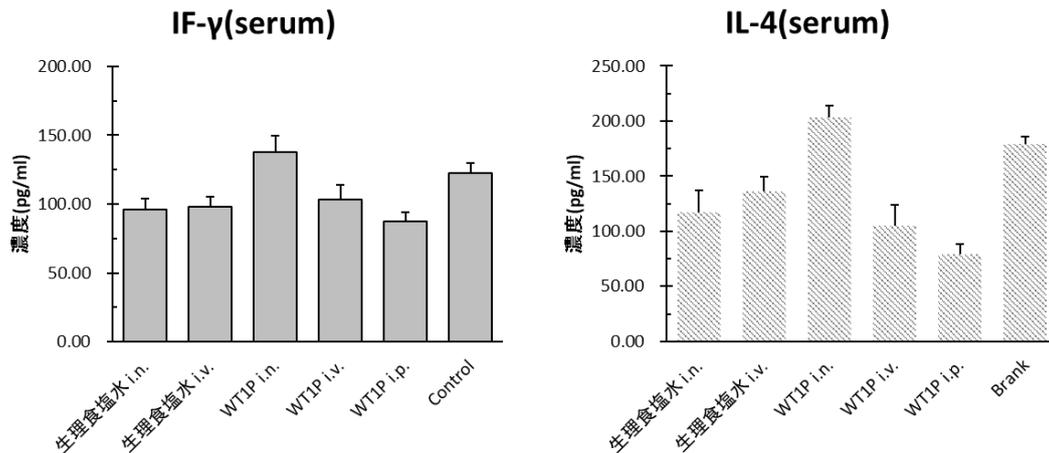


図 4 WT1p 経鼻投与後の免疫活性評価

(4) モデルペプチド粉末の経鼻投与実験 (図 1、2、3、表)

剤形検討として各ペプチドの粉末を経鼻投与した結果、DTI 及び DTP は、OXT で 3124.8 及び 99.9%、CsA で 2.29 及び 56.4% となり、WT1p では 59.5 及び 98.3% となった。OXT は極めて溶解が速いため、投与された粉末の殆どが鼻粘膜上で溶解したことが DTI 及び DTP の更なる増大に繋がったと考えられる。一方、CsA は極端に溶解が遅く、投与した多くの粉末が溶解する前に咽頭から食道に排出したため、ロスが多くなったと考えられる。難水溶性ペプチドでは製剤添加物を利用し、溶解状態で投与することが望ましいことが示唆された。また、WT1p の溶解性は比較的高いものの、構成アミノ酸 9 個の内、疎水性アミノ酸が 8 個であることから、WT1p の親疎水性は、OXT と CsA の間と考えられ、OXT よりも溶解性が低い分、DTI 及び DTP が溶液投与と比較して低い値となったと考えられる。

以上、本研究によりがんペプチドワクチン WT1p の CLN 送達量及び免疫誘導を増大させるための投与方法として、粉末製剤の経鼻投与が有効であることが示され、今後のがんペプチドワクチン療法における新たな投与ルートの可能性を示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古林呂之、仲村綾夏、北條仁菜、井上大輔、田中晶子、坂根稔康
2. 発表標題 鼻粘膜を介したペプチド性薬物の頸部リンパ節送達
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北條仁菜、古林呂之、仲村綾夏、早崎莉沙、井上大輔、田中晶子、坂根稔康
2. 発表標題 鼻粘膜を介した頸部リンパ節送達におけるペプチド薬の物性の影響
3. 学会等名 日本薬剤学会第37年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 晶子 (Tanaka Akiko) (30824320)	神戸薬科大学・薬学部・助教 (34512)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------