日本医療研究開発機構　　創薬基盤推進研究事業
事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：DDS 技術を活用した経皮投与型ペプチド性乳がん治療薬の開発研究

Development of a transdermal peptide-based breast cancer drug utilizing DDS technology

研究開発実施期間：令和 5 年 4 月 15 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者　氏名：大髙　章

Akira Otaka

研究開発代表者　所属機関・部署・役職：

国立大学法人徳島大学 大学院医歯薬学研究部 教授

Tokushima University, Graduate School of Biomedical Sciences, Professor

II 研究開発の概要

本研究では、経皮投与型ペプチド性乳がん治療薬の創出を目的とした。研究開発代表者らは乳がん細胞増殖抑制機構が破綻するメカニズムの解明研究において、がん増殖抑制因子である prohibitin 2 (以下、PHB2) に着目して取り組んできた。当該研究において「PHB2 が有するがん細胞増殖抑制作用」の不活化機構を明らかにしてきた。すなわち ① 乳がん特異的タンパク質 brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3 (BIG3)、プロテインキナーゼ PKA とプロテインフォスファターゼ PP1Ca のタンパク質三者複合体が形成される、② 本タンパク質複合体がその BIG3 領域を介して PHB2 にタンパク質－タンパク質相互作用 (PPI) をする、③ 当該 PPI により、PHB2 の脱リン酸化が促進され、これが「乳がん増殖抑制機構の破綻」に関与していることを明らかにしている。さらに本知見を基盤として PHB2－BIG3 間 PPI を阻害し、乳がん細胞の増殖抑制を可能とする約 2,000 Da の化学修飾ペプチド stapled ERa activity-regulator synthetic peptide (stERAP) を開発した。乳がん細胞同所性移植ヌードマウスに対する stERAP の静脈内投与によりエストロゲン依存性乳がん増殖を完全に抑制する知見を得ている。さらにサルを用いた毒性試験の結果、stERAP 投与による副作用所見が無いことを証明している。しかし、陽電子放出断層撮影 (PET) 法を用いた正常マウス中での stERAP の体内動態解析の結果、stERAP は尾静脈投与 50 分後には膀胱に集積しており、stERAP の腎クリアランスが高いことが明らかになった。本結果より静脈内投与では、速やかな糸球体ろ過を回避することが困難であると判断した。そこで本研究では、乳がん病巣が比較的皮膚表層に近い点、および late stage の乳がんが皮膚から露出する傾向があることに着目し、stERAP の実用的乳がん治療薬への展開を目指して経皮投与法の確立と、経皮投与時の stERAP の動態解明を実施した。

(1) stERAP 経皮投与法の確立

本研究では、まず連携研究者である石田竜弘博士 (徳島大学) らが開発したイオン液を利用した stERAP の経皮投与化について検討を行った。イオン液体を用いた stERAP の有効性評価に向け、評価に用いる担がんモデルマスを確立した。これまでの検討から stERAP は、エストロゲン依存性乳がん増殖を抑制する知見が得られている。そこでエストロゲン受容体陽性乳がん細胞株 (KPL-3C 細胞株) を免疫不全ヌードマウス (BALB/c/nu/nu) の乳腺に移植し、エストロゲンを連日投与することで担癌モデルマウスを構築した。続いて、乳がん増殖抑制ペプチドである stERAP の経皮投与法の確立に向け、石田博士らと連携し、stERAP 経皮投与に最適なイオン液体を選定した。選定したイオン液体を用いた stERAP 経皮投与の初期検討として、蛍光色素修飾 stERAP を合成した。続いて合成した蛍光色素修飾 stERAP をイオン液体に溶解し ICR マウスに投与後、皮膚を回収し、回収した皮膚から皮膚切片を作成後、共焦点レーザー顕微鏡で蛍光を観察した。この結果、蛍光色素修飾 stERAP をイオン液体に溶解して皮膚に塗布した場合には、6 時間後には皮膚深部まで浸透することが明らかになった。一方で、生理食塩水に溶解して皮膚に塗布した場合には、皮膚透過は観察されなかった。本結果より、イオン液体を利用することで stERAP の経皮投与が可能であることが示唆された。

またイオン液体とは別に、九州大学の後藤雅宏博士らが開発する油状ナノ分散化法（Solid-in-Oil (S/O) 技術）を利用した stERAP の経皮投与製剤化について検討を行った。本検討でも、イオン液体を用いた検討と同様に蛍光色素修飾 stERAP を用いた。S/O 技術を用いて蛍光色素修飾 stERAP を経皮投与製剤化し、マウスから取り出した皮膚への浸透を検証したところ、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に溶解した蛍光色素修飾 stERAP と比較して、S/O 技術で製剤化した蛍光色素修飾 stERAP の皮膚浸透量は約 14 倍になることを明らかにした。

(2) 経皮投与法確立に向けた stERAP の構造最適化と脂肪鎖修飾型 stERAP の開発

イオン液体を用いた経皮投与化に向けて、ERAP の側鎖架橋数を検討した。ERAP の PHB2 との非相互作用面に化学的架橋を 2 つ導入した二架橋型 stERAP の MCF-7 細胞に対するエストロゲン依存性細胞増殖の IC_{50} 値は 0.38 mM であり、一架橋型 stERAP の同 IC_{50} 値は 0.96 mM である。本結果より、二架橋型 stERAP の活性がより強いと判断し、以降の検討は二架橋型 stERAP を用いることとした。

しかし、一架橋型と比較して二架橋型 stERAP では合成工程の煩雑さに起因する合成純度及び合成収率の低下が問題点として挙げられた。さらにモデル動物を用いた検討には、二架橋型 stERAP の大量供給体制の構築が必須であると考えた。そこで二架橋型 stERAP の効率的合成法を確立することとした。研究開発代表者らは、ペプチド合成で近年注目されているマイクロ波ペプチド自動合成機を利用することで、二架橋型 stERAP 合成に要する時間を 2 ヶ月（従来の合成ルート）から 2 週間程度にまで大幅に短縮することに成功した。さらに、本検討で用いたマイクロ波ペプチド自動合成機は、1 回に最大 5 mmol（ペプチドとして 50～100 mg）の合成が可能であることから、大量供給を可能とした。加えて、二架橋型 stERAP 合成に用いるアミノ酸の保護基を最適化することで、合成純度の向上に成功している。加えて、本検討により確立した合成法は、新たなモダリティとして注目されている stERAP 以外の化学架橋型ペプチド医薬品の合成にも応用可能であることから、新規化学架橋ペプチド医薬品創出という社会ニーズへ対応したものであると考える。

また、これまでの検討から stERAP を尾静脈投与すると迅速に腎排泄されることが明らかになっている。そこで経皮投与とは異なる戦略として、体内のアルブミンと stERAP を相互作用させ stERAP の体内動態を改善する戦略を立案した。本戦略では、ペプチド性医薬品に利用されるアルブミンバインダーであるパルミチン酸（Pal）を選択し、パルミチン酸修飾二架橋型 stERAP（Pal-二架橋型 stERAP）を開発した。PET を用いて Pal-二架橋型 stERAP の体内動態を解析したところ、Pal 非修飾型と比較し Pal 修飾型の血中滞留性は大幅に向上し、血中半減

期が延長することを明らかにした。続いて、Pal-二架橋型 stERAP のがん増殖抑制活性を評価した。MCF-7 細胞を用いた in vitro でのがん細胞増殖抑制活性評価では、Pal-二架橋型 stERAP は、Pal 非修飾型と同等の活性を示すことが明らかになった。一方で、エストロゲン受容体陽性乳がん細胞（KPL-3C 細胞）を乳腺に移植した担がんマウスを用いた Pal-二架橋型 stERAP の活性評価では、Pal-二架橋型 stERAP を 10 mg/kg/週で尾静脈投与した場合にはがん増殖を完全抑制するが、1 mg/kg/週での投与では Pal 非修飾型より活性が弱いことが示唆された。本結果はペプチドの Pal 修飾による滞留性向上、腫瘍集積そして in vitro 活性維持のデータに矛盾する。可能な解釈は、二架橋型 stERAP の Pal 修飾が、投与ペプチドの内因性 PHB2 への親和力減弱をもたらし、その結果、Pal 修飾ペプチドの BIG3 に対するドミナントネガティブペプチドとしての作用が弱くなるとの考えである。そこで、現在、腫瘍組織への集積後、がん細胞内で Pal の切断除去が起こり、二架橋型 stERAP が放出されるプロドラッグ体の合成を進めている。これら一連の結果は、アルブミンバインダーを結合したペプチド性医薬品開発を促進するとともに、in vitro 活性現象の問題点を解決するものであり、細胞内タンパク質ータンパク質間相互作用阻害型薬物の開発基盤の汎用性向上に寄与すると判断する。

(3) 改良型 stERAP の PET イメージングによる乳がん細胞同所移植マウスを用いた体内動態解析と抗腫瘍効果に関する検討

PET イメージングによる二架橋型 stERAP のマウスを用いた動体解析のため、二架橋型 stERAP の N 末端に放射性同位体核種（^{64}Cu）のキレーターを導入した二架橋型 stERAP 誘導体を開発した。続いて、キレーター導入二架橋型 stERAP の ^{64}Cu 標識をしたところ、放射化学分解等を生じることなく ^{64}Cu 標識に成功した。次に正常マウスに対してイオン液体を用いて ^{64}Cu 標識二架橋型 stERAP の経皮投与を行い、二架橋型 stERAP の体内動体を解析した。具体的には、マウスに対してイオン液体に溶解した ^{64}Cu 二架橋型 stERAP を 4 時間塗布後、ダイナミック PET スキャンした結果、皮膚透過後、膀胱に蓄積する結果を得た。一方で、コントロール実験である生理食塩水に溶解した ^{64}Cu 標識二架橋型 stERAP をマウスに塗布 4 時間後、ダイナミック PET スキャンしたところ、皮膚透過及び膀胱への蓄積は確認されなかった。本結果よりイオン液体を利用することで二架橋型 stERAP は皮膚を透過し、膀胱へ排泄されることが確認された。この結果より、イオン液体によって dstERAP の皮膚浸透性が向上し、真皮中の毛細血管から吸収され、全身循環に移行し、腫瘍に届くことで抗腫瘍効果が得られる可能性が強く示唆された。現在、イオン液体による経皮浸透促進メカニズムおよび抗腫瘍効果について詳細に検討している。本検討は、本研究開発代表者と長崎大学の向井英史博士間での適切な連携体制の構築により PET 測定と解析を可能とし、さらにイオン液体による二架橋型 stERAP 経皮投与時の PET による動態解析データの取得は、本開発研究課題を中心として、連携研究者である徳島大学の石田博士および長崎大学の向井博士との適切な連携体制が構築できた結果である。

また PET イメージングとは別に、金ナノ粒子を用いた高分解能 X 線計測による stERAP 経皮投与時の動態解析について検討を行った。その結果、金標識二架橋型 stERAP の皮下投与では、リンパ節に移行することを明らかにした。さらに金標識部と二架橋型 stERAP 間のリンカーとして用いているポリエチレングリコール（PEG）の長さを長くするほど、リンパ節移行量が増加することが明らかになった。そこで本特性を利用すれば、術前リンパ節転移診断や乳がんのリンパ節転移抑制剤の開発展開が可能と考え、検討開始した。今後、リンパ節中での二架橋型 stERAP のがん増殖抑制能を明らかにすることで新たな医薬品展開能可能性を示すことが可能となるため、創薬基盤としての応用性が示されたと考えている。

Research background and objectives

This study aims to develop a transdermal peptide-based therapeutic agent for breast cancer. We have been investigating the mechanisms of the disruption of cancer growth suppression mechanisms in breast cancer involving the cancer growth suppressor prohibitin 2 (PHB2). The inactivation mechanism of "PHB2-mediated inhibition of cancer cell proliferation" is as follows: 1) Formation of a protein complex consisting of breast cancer-specific protein brefeldin A inhibitor guanine nucleotide exchange protein 3 (BIG3), protein kinase A (PKA), and protein phosphatase (PP1Cα), 2) Additional complex formation between BIG3/PKA/PP1Cα and PHB2 via the protein-protein interaction (PPI) of BIG3 with PHB2, and 3) Dephosphorylation of PHB2 resulting from this supramolecular complex, leading to the suppression of the anti-tumor effect of PHB2. These prompted us to develop stapled ERa activity-regulator synthetic peptide (stERAP), a chemically modified peptide with a molecular weight of approximately 2,000 Da that inhibits breast cancer growth via PPI inhibition of PHB2-BIG3. In previous studies, intravenous administration of stERAP to nude mice with orthotopic breast cancer xenografts completely inhibited estrogen-dependent breast cancer growth. Furthermore, toxicity studies in monkeys showed that stERAP administration did not induce adverse effects. However, in vivo, kinetic analysis of stERAP in normal mice utilizing positron emission tomography (PET) revealed high renal clearance of stERAP, as the tail vein administered stERAP accumulated in the bladder immediately. These results suggest the difficulty of completely avoiding glomerular filtration of stERAP due to the intravenously administered stERAP circulating throughout the body. The relatively close location of breast cancer lesions to the skin surface and the tendency of advanced-stage breast cancer to be exposed through the skin motivated us to establish a method for transdermal administration of stERAP and to analyze the dynamics of stERAP during transdermal administration.

Results

To establish a transdermal delivery method for stERAP using ionic liquids, this study began with a selection of ionic liquids suitable for stERAP. To observe the skin penetration of stERAP dissolved in ionic liquids, fluorescently labeled stERAP was dissolved in the selected ionic liquids, and the solution was applied to the skin of ICR mice. After preparing skin sections from the skin of mice treated with the ionic liquid containing stERAP, fluorescence was observed using a confocal laser microscope (CLSM). In CLSM measurements, a 6-hour skin treatment with ionic liquids containing fluorescently labeled stERAP resulted in fluorescence observed deep in the skin, whereas no fluorescence was observed with saline containing stERAP. These results suggest that transdermal administration of stERAP is achievable through the use of ionic liquids.

The rapid renal excretion of stERAP administered by the tail vein prompted us to improve its pharmacokinetics through the interaction of albumin in the body, apart from establishing a transdermal administration method. Therefore, we synthesized stERAP conjugated with palmitic acid (Pal), an albumin binder used in peptide drugs such as GLP-1, and subsequently analyzed Pal-stERAP pharmacokinetics using PET analysis. Attempted PET analysis of Pal-stERAP revealed that modification of stERAP with Pal markedly improved its blood retention and prolonged its elimination half-life from the blood. We then evaluated the cancer growth inhibitory activity of Pal-stERAP. Although the in vitro cancer cell growth inhibitory activity of Pal-stERAP against MCF-7 cells was comparable to that of Pal unmodified stERAP, the activity of Pal-stERAP against carrier cancer mice transplanted with KPL-3C cells in the mammary gland was lower than that of the Pal unmodified form. Based on these results, we hypothesized that Pal-modification could weaken the stERAP activity as a dominant peptide, and we are currently developing a prodrug that cleaves Pal and stERAP in cancer cells to release stERAP.

Next, we performed a dynamic analysis of stERAP labeled with the positron-emitting radioactive isotope ^{64}Cu

administered transdermally using an ionic liquid to normal mice. After treatment of mouse skin with ionic liquid containing ^{64}Cu-stERAP for 4 hours, dynamic PET measurements revealed that ^{64}Cu-stERAP accumulated in the bladder after penetrating the skin. These results suggest that dstERAP enhances skin permeability through ionic liquids, enabling tumor delivery and exhibiting antitumor effects. Investigations into the mechanism of transdermal penetration promotion of stERAP using ionic liquids and verification of antitumor effects are underway.