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：悪性中皮腫に対する新規ドラッグデリバリーシステムを用いた個別化治療の開発
Study of new drug delivery systems for personalize treatment against malignant mesothelioma

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：田中 一大
Ichidai Tanaka

研究開発代表者　所属機関・部署・役職：
国立大学法人東海国立大学機構名古屋大学 名古屋大学医学部附属病院 呼吸器内科 病院講師
Department of respiratory medicine, Nagoya University Uospital, Tokai National Higher Education and Research System・Assistant Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果及びその意義等

中皮腫は、胸膜、腹膜及び心膜などの中皮細胞を由来とする悪性腫瘍であり、胸膜中皮腫が 85%程度を占める。本邦の人口動態統計・患者調査（2018 年）では、死亡者数は年間約 2,000 人と推計され、希少ながんではあるが、アスベスト曝露後 30～40 年以上経過後に発症するため、現在も増加傾向にある。病期や全身状態を考慮のうえ集学的治療や全身化学療法が選択されるが、一次治療として化学療法を受けた患者の生存期間中央値は 7 ヵ月、相対生存率は 5 年で 9.6%と極めて予後不良で、新規治療法の開発が切望されている。

我々は、極めて予後不良な中皮腫においてオキシトシン受容体（OXTR）が高発現していることを発見した。OXTR は、正常組織では乳腺及び妊娠後期の子宮平滑筋に多く発現しており、下垂体後葉ホルモンであるオキシトシンが結合すると、乳汁分泌及び分娩時の子宮収縮を促進する。このシグナル経路は、幹細胞において細胞増殖を促進することが知られているが、約 40%の中皮腫においては、乳腺・妊娠後期の子宮と同程度まで OXTR の発現が上昇していることを突き止めた。さらに、同遺伝子をノックダウンすると、複数の中皮腫細胞株の増殖が有意に抑制され細胞周期が停止することを見出した（PCT/JP2021/038161、Cancer Sci. 112(9): 3520-3532, 2021）。しかし、候補阻害剤は阻害濃度も高く、全身投与では相当の投与量となることが見込まれた。一方、中皮腫は胸膜に沿って局所進展する特性があり、それによる胸痛、咳、大量の胸水による呼吸困難や胸部圧迫感が生じるため、胸腔の局所コントロールは、集学的治療として手術適応の範囲を広げ、症状緩和の点からも重要な治療戦略になることから、胸腔内へ OXTR 阻害剤を投与することで腫瘍を制御する治療法の開発を開始した。

令和 4 年度より、橋渡し研究プログラムと創薬基盤推進研究事業との技術連携の事業に採択され、送達技術開

発の徳島大学・石田竜弘のグループと共同で、同受容体阻害剤（ペプチド・非ペプチド）を経胸腔的に投与するための最適なイオン液体の選定を進めてきた。また、薬物動態評価技術開発に関わる九州大学・川井隆之のグループと共同で、超高感度 CE-MS 技術を用いてイオン液体化した同阻害剤の検出条件の検討も進めた。さらに新規核酸医薬の開発に向けて、名古屋大学分子生命化学講座と共同で siRNA の主鎖構造を非環状骨格に変換し、*in vitro* で細胞増殖抑制効果・ノックダウン効率を解析したところ、抗腫瘍効果の増強効果を確認した。以上の成果を踏まえ本研究事業では、OXTR に対する核酸試薬のイオン液体化・胸腔内局所制御における抗腫瘍効果を解析した。

1. OXTR を標的とする人工核酸の抗腫瘍効果の解析：

研究分担者である名古屋大学分子生命化学講座、神戸薬科大学薬学部生命分析化学研究室らと共同で、OXTR を標的とする非環状型核酸における off target 効果・血清ヌクレアーゼ耐性及び効果持続時間を確認し、複数の配列の中から *in vitro* で最適となる配列を決定した。さらに、*in silico* 解析で、ミスマッチ数 1-2 の候補遺伝子がゼロでオフターゲット効果が少ない配列を選定した。*in vivo* の解析では、選定した OXTR-非環状型人工核酸を用いて、アテロコラーゲンにより中皮腫細胞株の腹腔移植マウスに投与したところ有意な腫瘍縮小効果があることを確認した。

送達技術開発研究者である徳島大学の石田竜弘のグループとの連携により、過去の核酸医薬の検討で有効であったイオン液体を候補とし、ヌードマウスの中皮腫細胞株胸腔移植モデルを用いて、イオン液体化した OXTR-非環状型核酸を複数の投与濃度で胸腔内投与した。その中で、検討した最高濃度の投与を行った一匹のマウスで、腫瘍の明らかな縮小効果が認められたが（通常、播種した腫瘍が縮小することはない）、その後、再現性が確認されなかった。この原因として、調製したイオン液体 OXTR-非環状型核酸が不安定で、時間とともに物性が変化する可能性が見出された。安定性に課題が生じたため、当該事業期間における核酸用のイオン液体での検討を中止することとした。

一方、腫瘍の特性を踏まえ、腫瘍に集積をする工夫をした LNP に搭載した非環状型核酸により、24 時間以内に中皮腫細胞内に取り込まれることを確認した。*In vivo* においては、中皮腫細胞株の胸腔移植マウスに LNP に搭載した非環状型核酸を経胸腔投与したところ、コントロールと比較し生存期間が有意に延長した。さらに、薬物動態評価技術開発研究者である九州大学の川井隆之のグループにより、OXTR を標的とする非環状型人工核酸の分析プロトコルも確立した。

2. イオン化 OXTR 阻害剤の抗腫瘍効果の解析：

イオン液体化した OXTR 阻害剤 X に関しては、中皮腫細胞株の胸腔移植マウスを用いて、投与方法・投与量の検討を重ね、有意な抗腫瘍効果・生存曲線の延長を、再現性をもって確認した。

薬物動態評価技術開発研究者である九州大学の川井隆之のグループと共同で、イオン液体化 OXTR 阻害剤 X を胸腔内投与した中皮腫細胞株の胸膜播種マウスモデルを対象に、中皮腫細胞組織の微小領域をレーザーマイクロダイセクションによって採取し、CE-MS によって OXTR 阻害剤 X の定量解析を行った。まず、標準品溶液の検量線を作成し、この検量線に基づき試料に含まれる OXTR 阻害剤 X の絶対量を算出した。これにより、胸腔内投与後の組織濃度についての解析が可能となり、薄切から採取した微小切片の全てから OXTR 阻害剤 X を検出した。

イオン液体化 OXTR 阻害剤 X を胸腔内投与後、1 時間後、2 時間後、3 時間後に組織を採取し、組織内濃度を測定したところ、投与 1 時間後の組織内濃度は、IC50 に相当する濃度であったが、2 時間後以降は急速に低下し

ていた。

そのため、投与方法の改良を行い、中皮腫細胞株の胸腔移植マウスにおいて有意な縮小効果を確認した。なお、本手法は、将来的に他の薬剤の胸腔の局所制御効果の解析に活用が可能である。

3. 今後の課題と方向性：

イオン液体化 OXTR 阻害剤 X においては、有効性が期待できたものの、胸腔内の腫瘍内濃度の維持については、課題が認められたため、さらなる DDS の検討、用法・用量の検討等による最適な用法・用量の確認が必要と考える。OXTR 阻害薬 X の販売権を保有している米国の企業と協議を行い、同社と名古屋大学の間で秘密保持契約を締結し、薬剤開発時の Investigator brochure を共有し、今後臨床試験へ移行した際に薬剤提供を含めた共同開発に向けた前向きな協議も行っている。

また、OXTR を標的とする非環状型人工核酸においても、DDS を含めた毒性の検討や製剤化の検討を行ったうえで、非臨床試験及び治験へ向けた開発を進めていく方針である。核酸の製造に関しては、企業と秘密保持契約を締結しており、GMP 製造は可能であることも確認済である。

また、日本製薬工業協会の研究開発委員会が設立した DDS コンソーシアムからの依頼を受けて、本事業のさらなる開発展開に向けて継続的に連携する体制構築に向けた協議を行う。

Mesothelioma is a malignant tumor originating from mesothelial cells of the pleura, peritoneum, and pericardium, with pleural mesothelioma accounting for approximately 85% of all cases. According to Japanese vital statistics and the Patient Survey (2018), the estimated number of annual deaths is around 2,000. Although mesothelioma is classified as a rare cancer, its incidence continues to increase, primarily due to its long latency period of 30–40 years after asbestos exposure. Multimodal therapy or systemic chemotherapy is selected based on disease stage and general condition; however, the median overall survival of patients receiving first-line chemotherapy is only 7 months, and the 5-year relative survival rate is as low as 9.6%, indicating a poor prognosis and highlighting the urgent need for novel therapeutic strategies.

We discovered that the oxytocin receptor (OXTR) is highly expressed in mesothelioma, a cancer with an extremely poor prognosis. In normal tissues, OXTR is predominantly expressed in the mammary glands and uterine smooth muscle in late pregnancy, where its ligand oxytocin (a posterior pituitary hormone) promotes milk ejection and uterine contractions during labor. Although this signaling pathway is known to enhance cellular proliferation in stem cells, we found that approximately 40% of mesothelioma cases exhibit OXTR expression at levels comparable to mammary glands or late-pregnancy uterus. Furthermore, knockdown of the OXTR gene significantly suppressed cell proliferation and induced cell cycle arrest in multiple mesothelioma cell lines (PCT/JP2021/038161, Cancer Sci. 112(9): 3520–3532, 2021).

However, candidate OXTR inhibitors require high concentrations for efficacy, and systemic administration would involve substantial dosing. Given that malignant mesothelioma characteristically spreads locally along the pleura, causing chest pain, cough, and dyspnea due to massive pleural effusion, local control of the pleural cavity is a crucial therapeutic strategy not only to broaden surgical indications within multimodal treatment but also to alleviate symptoms. Therefore, we initiated the development of an intrapleural therapy using OXTR inhibitors.

Since fiscal year 2022, we have been conducting this study under a collaborative project integrating the Translational Research Program and Drug Discovery Support Program. In collaboration with Dr. Tatsuhiro Ishida's group at Tokushima University, we evaluated the optimal ionic liquids for intrapleural delivery of OXTR inhibitors. Additionally, with Dr. Takayuki Kawai's group at Kyushu University, we investigated detection methods for the OXTR inhibitors using ultra-sensitive CE-MS technology. In collaboration with the Department of Molecular Life Chemistry at Nagoya University, we also converted the backbone structure of siRNAs targeting OXTR to a non-cyclic scaffold and confirmed their enhanced antitumor activity and knockdown efficiency *in vitro*. Based on these findings, this project focused on analyzing the antitumor effects of ionic-liquid-formulated nucleic acid reagents targeting OXTR for local intrapleural administration.

1. Evaluation of Antitumor Effects of Artificial Nucleic Acids Targeting OXTR:

In collaboration with the Department of Molecular Life Chemistry at Nagoya University and the Laboratory of Bioanalytical Chemistry at Kobe Pharmaceutical University, we evaluated off-target effects, serum nuclease resistance, and duration of action of non-cyclic artificial nucleic acids targeting OXTR, identifying the most effective sequence *in vitro*. *In silico* analyses selected sequences with zero candidate genes having 1–2 mismatches, ensuring minimal off-target effects. *In vivo*, the selected OXTR-targeting siRNA was delivered to mesothelioma-bearing mice via intraperitoneal administration with atelocollagen, resulting in significant tumor regression.

Collaborating with Dr. Ishida's group at Tokushima University, we selected candidate ionic liquids based on previous successes with nucleic acid therapeutics and administered non-cyclic OXTR-targeting nucleic acids intrapleurally every other day for several doses using a pleural mesothelioma xenograft model. A significant tumor regression effect was observed in one mouse in high dose, although this result could not be consistently replicated. The loss of reproducibility was attributed to

instability in the ionic-liquid-formulated nucleic acids over time, which likely impaired their delivery. Given this challenge, we decided to halt the use of ionic liquids for nucleic acid delivery during this project period.

Separately, since mesothelioma tumors are known to have certain microenvironment, we employed unique LNPs (lipid nanoparticles) to deliver the non-cyclic nucleic acids. *In vitro*, the nucleic acids were successfully taken up by mesothelioma cells within 24 hours. *In vivo*, LNP-formulated non-cyclic nucleic acids were administered to mesothelioma-bearing mice, resulting in significantly prolonged survival compared to controls, validating the potential of this DDS (drug delivery system). We also established a robust analytical protocol for quantifying these artificial nucleic acids.

2. Evaluation of Antitumor Effects of Ionic-Liquid-Formulated OXTR Inhibitor X:

Using a pleural mesothelioma xenograft mouse model, we determined that intrapleural administration of ionic-liquid-formulated OXTR inhibitor X significantly suppressed tumor growth and prolonged survival with reproducibility.

In collaboration with Dr. Kawai's group at Kyushu University, we performed pharmacokinetic analysis using CE-MS. After intrapleural administration of OXTR inhibitor X, mesothelioma tissues were collected using laser microdissection. The standard curve was constructed using the standard product, and the absolute amount of the drug in tissue was calculated based on peak area and sample volume. The OXTR inhibitor was detected in all microdissected sections from treated mice.

Tissue concentrations measured at 1-, 2-, and 3-hours post-administration showed a peak at 1 hour, followed by a rapid decline. Based on this, we explored delivery system, and this system achieved significant tumor regression in the xenograft model, demonstrating its utility not only for evaluating OXTR-targeting agents but also as a platform for future therapeutics *in vivo*.