

平成30年 5月24日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18937

研究課題名(和文) 腸管吸収促進剤を用いた分子標的化抗がん剤ハイブリッドペプチドの経口製剤化の検討

研究課題名(英文) Improvement of oral delivery of hybrid peptide using absorption enhancer

研究代表者

高娃 阿栄 (Gaowa, Arong)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50643805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、経粘膜吸収促進剤である胆汁酸を用い上皮増殖因子受容体(EGFR)を標的とした抗がん剤EGFR2R-lyticハイブリッドペプチドの消化管吸収性を改善させることを目的とした。ペプチドと胆汁酸との静電的相互作用を利用した経口製剤を作製した。腸管モデル細胞Caco-2を用いた膜透過試験の結果、ペプチド単体と比べ経口製剤で膜透過性の有意な向上が見られ、さらに、皮下移植した担癌モデルマウスを用いた抗腫瘍効果試験の結果、経口製剤では抗腫瘍効果の増強が確認された。以上より、胆汁酸と組み合わせることで、腸管におけるペプチドの吸収効率を改善させ、経口投与後の薬効を向上させることができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to improve the oral absorption of epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted hybrid peptide (EGFR2R-lytic) using bile acid as an absorption enhancer. The oral formulation of peptide was formed through the electrostatic interaction between the cationic peptide and anionic bile acid. In Caco-2 cell monolayers, absorption permeability of peptide from the peptide formulation was significantly increased compared with that of peptide alone. Furthermore, oral administration of peptide formulation to xenograft nude mouse showed significantly improved anti-tumor activity compared to free peptide. These results suggested that the bile acid is an effective absorption enhancer for improving the oral bioavailability and bioactivity of hybrid peptide.

研究分野：医歯薬学

キーワード：薬物動態学 ペプチド ドラッグデリバリー 経口製剤

### 1. 研究開始当初の背景

近年、がん治療を対象にした創薬研究では分子標的薬の開発が盛んに行われている。特に上皮増殖因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) をターゲットに分子標的抗がん剤は注目を集めてきた。しかしながら、がん細胞の種類は多様であり、EGFR 遺伝子変異を有するがんにおいては治療抵抗性・薬剤耐性が知られている。また、分子標的治療薬は多くが細胞増殖に関わる分子を阻害する蛋白製剤であるため、非常に高製造コストと中和抗体産生など問題がある。そこで、我々はこれらの問題を解決すべく癌細胞を特異的に攻撃する革新的な分子標的化合物合成ペプチドを設計することに成功し、「ハイブリッドペプチド」と命名した。EGFR2R-lytic ハイブリッドペプチドは EGFR に結合する標的ペプチド配列 (EGFR 結合部位の2番目のヒスチジンHをアルギニン R に置換) と細胞殺傷を担うペプチド配列 (Lytic) から構成されている。このハイブリッドペプチドは *in vitro* と *in vivo* レベルで癌細胞特異的に殺細胞効果と従来の薬剤耐性癌細胞皮下移植担がんマウスモデルにおいて高い抗腫瘍効果を示し新規抗がん剤候補としての有用性が確認された。さらに、生体適応性の高分子材料と組み合わせた徐放性注射製剤ではペプチドの血中動態が改善され、抗腫瘍効果が増強されることが示された。EGFR2R-lytic ハイブリッドペプチドの臨床応用に向け、投与形態について頻回注射による患者への負担を軽減するためには経口製剤化が望ましい。しかし、ペプチド性の薬物は消化管粘膜透過性が低く、消化酵素などによって分解されやすいため、経口投与時の生物学的利用能が低い。そのため、ハイブリッドペプチドを経口投与製剤化するには、消化管内環境及び分解酵素に暴露された状態でもペプチドを安定に保つことと、消化管上皮細胞層からペプチドを効率的に血液中へ透過させる製剤手法を構築する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、経口製剤化するための医薬品組成として従来から用いられている経粘膜吸収促進剤である胆汁酸、タウロデオキシコール酸を用い、ハイブリッドペプチドの消化管吸収性を改善させ、臨床応用可能な経口製剤として創製することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) タウロデオキシコール酸を用いた EGFR2R-lytic ハイブリッドペプチド経口製剤の作製

胆汁酸、また経口投与後胃に安定性を維持するためにクエン酸を用い、静電的相互作用を介した種々混合比の製剤を作製した。製剤中のペプチド量は波長 280 nm における吸収から算出し、最適なペプチド仕込み量の混合

比を検討した。

(2) 消化管内 pH の変動に対する経口製剤の溶出特性評価

経口製剤を消化管内 pH の変動を考慮して pH1.5、pH3.0、pH5.0、pH7.4、pH9.0 の5種の緩衝溶液中にインキュベート、超遠心分離した時の液相の 280 nm における吸収を経時的に測定することで、胃内酸性 pH 域における安定性及び腸内中性 pH における経口製剤からのペプチド溶出特性を評価した。

(3) 経口製剤の腸管膜透過性評価

ヒト結腸癌由来腸管上皮細胞株 Caco-2 をトランスウェル上に培養し、2~3日ごとに培地交換を行い単層膜形成後 FITC 蛍光標識したペプチド単体または経口製剤を添加し、透過した液の蛍光強度を経時的に測定し、腸管膜透過性評価を行った。また、膜抵抗測定器を用いて、製剤化による腸管上皮細胞のバリア機能変化を評価した。

(4) 経口製剤の担癌マウスモデルへの抗腫瘍効果評価

EGFR 発現ヒト胃癌細胞株 MKN-45 を BALB/c 系ヌードマウスに皮下移植し、担癌マウスモデルを作製した。移植5日後からモデルマウスに対し予備実験により定めた有効量のペプチドまたはその経口製剤 (5 mg/kg) を1日2回、週5日、4週間投与した。ノギスを用いて腫瘍の大きさを経時的に測定した。

### 4. 研究成果

(1) EGFR2R-lytic ハイブリッドペプチド経口製剤の作製

高モル濃度比 (EGFR2R-lytic:Bile acid: Citric acid=1:5:5 or 1:10:10) ではペプチドの殺細胞効果が同濃度のペプチド単体より低く、薬効が低下した。一方、混合比が 1:2:2 ではペプチドの殺細胞効果には変化が認められず、ペプチドが安定に保たれているためこの混合比の製剤を用いて評価した (図1)。

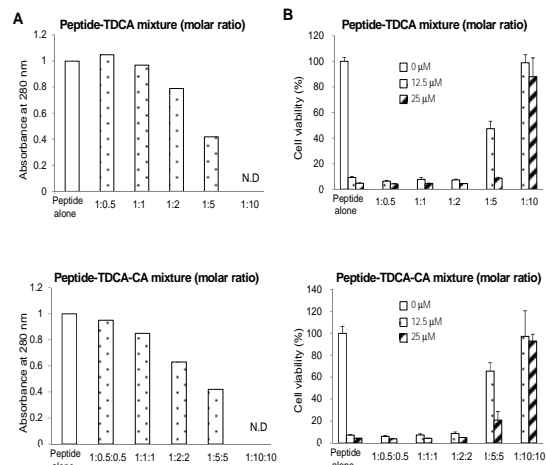


図1 種々混合比製剤のペプチド仕込み量(A)及び殺細胞効果(B)。N.D.は不検出を示す。

(2) 消化管内 pH の変動に対する経口製剤の溶出特性

EGFR2R-lytic ハイブリッドペプチド経口製剤は胃の pH 範囲(pH 3.0 以下)では 144h まで安定性を示し、小腸環境と相当する pH 5.0 では 48h から時間経過とともにペプチドが製剤から溶出されることが確認された(図 2)。

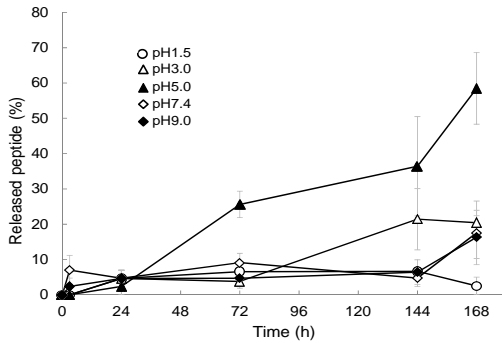


図 2 経口製剤の pH 変動によるペプチド溶出特性。

(3) 経口製剤の腸管膜透過性

ペプチド単体と比べ、経口製剤では細胞のバリアー機能指標である経上皮電気抵抗 (TEER) 値が低く(図 3A)、膜透過した溶液の蛍光強度が強くなる(図 3B)、製剤化による膜透過性上昇が確認された。

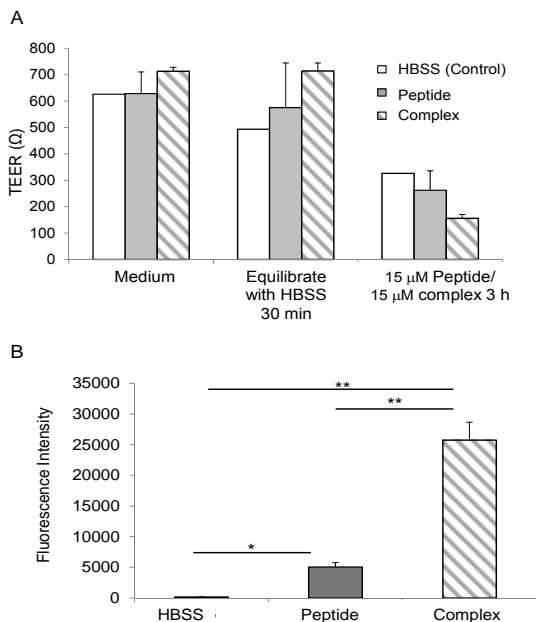


図 3 Caco-2 細胞単層膜におけるペプチド経口製剤の経上皮電気抵抗値変化(A)及びペプチドの膜透過性の変化(B)。\* : P<0.05, \*\* : P<0.01。

(4) 経口製剤の EGFR 発現担癌マウスモデルへの抗腫瘍効果

まず、EGFR 高発現胃癌細胞株 MKN45 に対する EGFR2R-lytic ハイブリッドペプチド及びその経口製剤の殺細胞効果を調べた結果、両方ともに有効な殺細胞効果 (IC50 が

10 μM 程度)を示した(図 4A)。さらに、MKN45 細胞皮下移植担癌マウスモデルへの抗腫瘍効果を調べた結果、腫瘍体積が生食塩水を摂取した陰性対象群では 617 ± 132 mm<sup>3</sup> まで肥大したのに対し、ペプチド単体のみとペプチド経口製剤を摂取した群ではそれぞれ 495 ± 148 mm<sup>3</sup> 及び 318 ± 185 mm<sup>3</sup> 程度であり(図 4 B)、胆汁酸との組み合わせによるペプチドの腫瘍抑制効果増強が確認された。

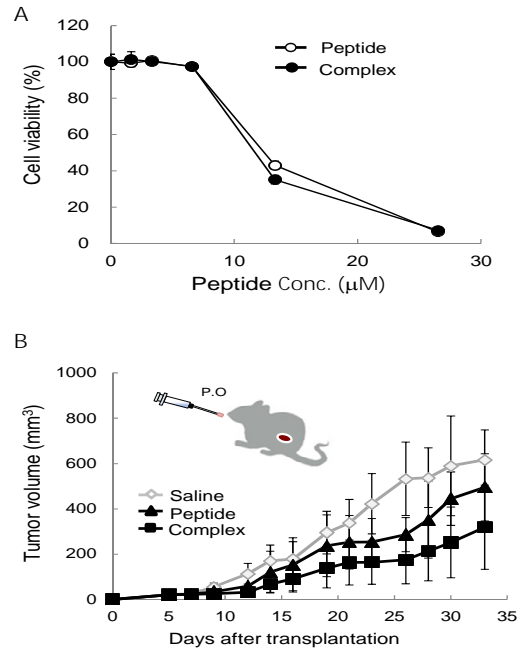


図 4 経口製剤の EGFR 発現癌細胞株 MKN45 に対する殺細胞効果(A)及び皮下移植担癌マウスモデルへの抗腫瘍効果(B)。

以上の結果より、EGFR2R-lytic ハイブリッドペプチドを経粘膜吸収促進剤胆汁酸と組み合わせることで、小腸におけるペプチドの吸収効率を改善させ、経口投与後の薬効を向上させることができた。これらの知見は、ハイブリッドペプチドの臨床応用化に向けて、最適な投与方法の確立には有用な情報を提供するものと考えられる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Gaowa, A., Horibe, T., Kohno, M., Kawakami, K.

Bile Acid as an Effective Absorption Enhancer for Oral Delivery of Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Hybrid Peptide.

*J Pharm Sci* 107, 1322-1329, 2018 (査読有り)

2. 堀部 智久、河野 雅之、瀬戸 佳穂里、阿栄高娃、川上 浩司  
ハイブリッドペプチドを用いた新たながん分子標的治療を目指して  
生化学 第 89 巻第 1 号、pp.31-38, 2017 (査読有り)

3. Gaowa, A., Horibe, T., Kohno, M., and Kawakami, K.  
Bile acid as an effective absorption enhancer for oral delivery of hybrid peptide.  
*34th European Peptide Symposium & 8th International Peptide Symposium Proceedings*, p143, 2016 (査読有り)

4. Gaowa, A., Horibe, T., Kohno, M., and Kawakami, K.  
Improvement of oral delivery of EGFR-targeted hybrid peptide using absorption enhancer.  
*Peptide Science*, p127-128, 2016 (査読有り)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Gaowa, A., Horibe, T., Kohno, M., and Kawakami, K.  
Improvement of oral delivery of EGFR-targeted hybrid peptide by combination with bile acid.  
The 12th Australian Peptide Conference (15-20 Oct, 2017, Peppers Noosa Resort, Australia)

2. Gaowa, A., Horibe, T., Kohno, M., and Kawakami, K.  
IMPROVEMENT OF ORAL DELIVERY OF EGFR-TARGETED HYBRID PEPTIDE USING ABSORPTION ENHANCER.  
The 53rd Japanese Peptide Symposium (26-28 Oct, 2016, Kyoto Terrsa, Kyoto)

3. Gaowa, A., Horibe, T., Kohno, M., and Kawakami, K.  
BILE ACID AS AN EFFECTIVE ABSORPTION ENHANCER FOR ORAL DELIVERY OF HYBRID PEPTIDE.  
The 34th European Peptide Symposium & The 8th International Peptide Symposium (4-9 Sep, 2016, Leipzig, Germany)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
高娃 阿栄 (Gaowa, Arong)  
三重大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：50643805

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
堀部 智久 (HORIBE, TOMOHISA)  
京都大学・大学院医学研究科・特定准教授  
研究者番号：20467468

河野 雅之 (KOHNO, MASAYUKI)  
京都大学・大学院医学研究科・特定講師  
研究者番号：00437203