

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04639

研究課題名(和文)核酸医薬デリバリーにおける自然免疫活性化機構の解明とその制御に関する研究

研究課題名(英文)Study of immunological response to nucleic acid delivery system

研究代表者

石田 竜弘 (ISHIDA, Tatsuhiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学系)・教授

研究者番号：50325271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：核酸は抗体医薬に次ぐ新規医薬品として期待されているが、その効果獲得には送達システムの開発が重要である。本検討では全身投与後の自然免疫システムによる認識(TLR familyや補体による認識、炎症性サイトカインの誘導)機構の一端を明らかにすると同時に、これを回避する方法論の提案をすることができた。本検討を通じ、安全で機能的な核酸キャリアの開発に寄与する情報を発信した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we reported that immunostimulatory siRNA/pDNA-containing PEGylated lipoplex (PEGylated siRNA lipoplex) activates the immune system, resulting in the enhanced production of anti-PEG IgM. We revealed the contribution of toll-like receptor 7/9 to activate the innate immune system, respectively. A strategy to evade B cell-intrinsic TLR7/9 activation by siRNA/pDNA, such as chemical modification, may overcome immunological barriers to PEGylated liposome-based nucleic acid therapeutics. In addition, we showed PEG in the cosmetics may trigger anti-PEG IgM production in human. Our study gives the researchers valuable information which is useful to develop PEGylated nucleic acid based therapeutics.

研究分野：薬剤学

キーワード：核酸 免疫 Anti-PEG IgM リポソーム DDS

1. 研究開始当初の背景

Fire と Mello によって発見された RNA 干渉は、遺伝子発現抑制の有用なツールとしてだけに留まらず、新しい医薬品として大いに期待された。事実、これまでに 20 を越える RNAi 関連の核酸医薬品が臨床試験にあがってきている。しかし、現実には臨床開発中止に追い込まれた核酸医薬品も少なくなく、また 2011 年にロシユが siRNA 創薬からの撤退を表明するなど、目論見どおりに開発が進んでいるわけではない。

この理由の一つとして、極性高分子の核酸を作用部位である病態組織の細胞内に的確に送達するデリバリー技術が未完成であることがあげられている。しかし、この指摘は必ずしも正しくない。炎症部位や固形がんへの核酸デリバリー技術は既に確立されており、製剤の供給もなされている。むしろ最も大きな理由は、核酸医薬開発が治療効果を獲得することのみに注力され、核酸・キャリア複合体が生体に与える基本的な反応（拒絶反応や発熱、長期使用による毒性発現など）を蔑にしたことにある。外来からの核酸の侵入は、生体にとって最大の脅威であり、Toll-like receptor (TLR) を介した強力なシグナルの伝達は炎症性サイトカインの誘導や非特異的なインターフェロン応答などを惹起する。これらは、動物を用いた前臨床試験や比較的投与量が少ない第一相試験レベルでは問題にはならないが、臨床効果獲得のための第二相試験レベルでは極めて大きな問題となる。

2. 研究の目的

核酸は抗体医薬に次ぐ新規医薬品として期待されているが、その効果獲得には送達システムの開発が重要である。多くのキャリアが報告されているが、臨床試験の初期段階でドロップアウトしている。これは、薬理効果の優劣によってのみ評価が進められ、生体にとって外来異物である核酸・キャリア複合体と生体との相互作用に関する基礎的な検討が行われていないためである。

本研究は、単に効果を追求するのではなく、真に重要な核酸・キャリア複合体の生体適合性に着目し、全身投与後の自然免疫システムによる認識、即ち TLR family や補体による認識機構、炎症性サイトカインの誘導、これに伴う副反応を詳細に検討することを特色とする。このような検討を通じ、安全で機能的な核酸キャリアの開発に寄与しうる情報を収集し、実際に応用することを目的とした。

3. 研究の方法

【核酸含有 PEG 修飾リポソームに対する免疫反応の評価】

Balb/c マウス (雄性、5 週齢) は、日本 SLC より購入し、TLR7 KO Balb/c マウス (雄性、

6-8 週齢) は、オリエンタルバイオサービス (大阪、日本) より購入して用いた。

各マウス一匹あたり、PCL 及び各 PLpx (GFP-PLpx、ssGFP-PLpx、asGFP-PLpx、 β -gal-PLpx、ss β -gal-PLpx、as β -gal-PLpx) を脂質量 0.75 μ mol、siRNA 量で 12.5 μ g で投与した。このとき、血中の炎症性サイトカインを調べる場合は、投与 4 時間後に眼底静脈より採血を行い、血清を採取した。血中の IL-6、IFN- γ は Quantikine ELISA kit (R&D system、Minneapolis, MN) を用い、IFN- α は VeriKine ELISA kit (PBL Interferon Source、NJ、USA) を用いて測定した。脾臓細胞の IFIT-1 mRNA の発現上昇を調べる場合は、投与 4 時間後に脾臓を採取し、4 時間で RNA later 中に保存した。血中の抗 PEG IgM を測定する場合は、投与 5 日後に尾静脈より採血を行い、血清を採取した。測定は ELISA によって行った。ABC 現象の評価には、放射ラベル体の PEG 修飾リポソームを用いて行った。

【ガングリオシド修飾の有用性検討】

シアル酸含有糖脂質であるガングリオシドは、 α 2, 3 結合シアル酸を有する糖脂質であり、B 細胞上の抑制性の受容体である siglec-G に結合し、抗原特異的な B 細胞のアポトーシスを誘導することが知られている。ガングリオシド分子内の脂質構造を利用して PEG 修飾リポソーム膜中に組み込むことで、PEG 特異的な免疫反応 (anti-PEG IgM 分泌誘導) を抑制できるのではないかと考えた。具体的には、ブタ脳由来ガングリオシドを用い、0, 5, 10 mol% になるようにリポソーム膜中に添加し、3 種類のリポソームを調製 (粒子径: 約 100 nm) し、これらをそれぞれマウスに静脈内投与し、5 日後の血清中 anti-PEG IgM 量を ELISA で測定した。

【ヒト (女性患者) で観察された anti-PEG IgM 自然抗体獲得経緯の検証】

我々は、女性患者に anti-PEG IgM 自然抗体のキャリアが存在することが明らかにした。患者背景から、長期に渡って使用されている化粧品中の PEG が皮膚を透過して免疫系を感作した可能性が考えられた。そこで、長期に渡って化粧品をヘアレスラットに塗布し、anti-PEG IgM 誘導の有無を検討した。

4. 研究成果

核酸含有 PEG 修飾リポソーム (PLpx) による抗 PEG IgM 分泌亢進は何か引き金として起こされているのか、という点に着目し、その引き金として siRNA を *in vivo* で用いる際に、オフターゲット効果として頻繁に取り沙汰される TLR7 の活性化に焦点を当て検討を行った。この TLR7 の活性化と抗 PEG IgM 分泌亢進の関連性を調べるため、TLR7 による自然免疫の活性化に伴い発現上昇すると考えられるサイトカインレスポンスの誘導と

相関するか、そして TLR7 欠損マウスにおいて亢進反応が生じるかを確認した。その結果、TLR7 の活性化と抗 PEG IgM 分泌亢進は密接な繋がりがあることが示された。このとき、1 本鎖に分割した siRNA で PLpx を投与した際にも同様、炎症性サイトカン及び anti-PEG IgM が分泌されることを確認することができた。このため、完全に又は部分的に 1 本鎖に乖離した siRNA が TLR7 の「1 本鎖 RNA を認識する」機能によって認識されていることが示唆された。このことにより、非常に安定な 2 本鎖形成能を持つ siRNA では、その siRNA を構成する RNA 配列に TLR7 刺激能を有する配列があった場合でも、ある程度その TLR7 刺激を抑えることができるのではないかと考えられた。また、興味深いことに血中サイトカンを既存の ELISA 法の検出感度以下しか誘導できず、遺伝子変動レベルでしか検出できないほど僅かな自然免疫応答の活性化しか引き起こせない RNA を搭載した PLpx でも、抗 PEG IgM 分泌亢進が生じることが確認された。このことは、微弱レベルでも TLR7 が活性化される事が、抗 PEG IgM の分泌亢進に必須であることを示唆しているものと考えられた。

次いで、(1) PEG 修飾リポソームと TLR7 アゴニストの生体内挙動が異なる場合、抗 PEG IgM 分泌応答はどのようになるのか？、(2) B 細胞だけの環境下でも抗 PEG IgM 分泌応答が生じ得るものなのか？、(3) B 細胞に発現する TLR7 を欠落させた場合、抗 PEG IgM 分泌応答はどうなるのか？、という観点より検討を行った。その結果、siRNA 搭載 PEG 修飾リポソーム投与後に誘起される抗 PEG IgM 分泌亢進には、PEG に対する BCR と TLR7 の共刺激が重要であることが分かった。逆に、B 細胞以外の pDC などの TLR7 発現細胞が TLR7 刺激に伴い誘導するサイトカインはあまり寄与せず、また T 細胞を必要としないという特性があることも分かった。以上の結果より、核酸による抗 PEG IgM 分泌亢進は、PEG に対する BCR が siRNA 搭載 PEG 修飾リポソームと架橋形成を行い、エンドソームに取り込まれた際に、BCR と TLR7 が共刺激されるというステップを踏むことで誘導されるということが示唆された。

PEG 修飾リポソーム構成脂質中にガングリオシドを添加することによって、抗 PEG IgM の分泌が抑制できるかについて検討を行った。混合ガングリオシドを用いた諸検討により、抗 PEG IgM 分泌抑制は、長期的かつ PEG 修飾タンパクである PEG-OVA に対しても生じることが明らかとなった。また、ガングリオシドと PEG が同一リポソーム上に存在する場合においてのみ、抗体分泌の抑制が観察され、PEG 特異的な免疫抑制が可能であることが示唆された。この結果から、ガングリオシド含有 PEG 修飾リポソームは、PEG 特異的な免疫抑制剤としても使用できることを示唆している。また、精製ガングリオシ

ドを用いた検討において、in vivo、in vitro ともに抗 PEG IgM 分泌を抑制し、非特異的なサイトカイン応答を引き起こさなかった GT1b が最も抗 PEG 免疫の抑制に適しているガングリオシド種であることが示唆された。ガングリオシドによる抗 PEG IgM 分泌抑制のメカニズムについてであるが、B 細胞上の抑制性受容体である CD22 や siglec-G といったシアル酸受容体が関与しているのではないかと考えられた。

PEG 含有化粧品によって anti-PEG IgM が誘導されるか検討を行った。PEG 成分が含まれている化粧水、日焼け止め、シャンプーのいずれかを 1 日 1 回ラットの腹部に塗布し、塗布開始 16、37、60 日後に血清を採取した。採取した血清中の anti-PEG IgM 量を ELISA により評価した。その結果、化粧水塗付ラットにおいて anti-PEG IgM 量の増加が確認された。抗体量は塗布開始 37 日後にピークとなったが、60 日後には抗体量が減少していることが明らかとなった。また、日焼け止めとシャンプーを塗布したラットにおいては anti-PEG IgM の誘導が確認されなかった。この理由の一つとして、日焼け止めとシャンプーは化粧水に比べて皮膚透過性が低く、表皮樹状細胞であるランゲルハンス細胞にまで到達しなかったために、抗体産生が生じなかった可能性が考えられる。また、IgG の誘導に関しても同様の検討を行った結果、PEG 含有化粧品による anti-PEG IgG の誘導は生じないことが確認された。

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 7 件)

Abu Lila, A.S., Kato, C., Fukushima, M., Huang, C., Wada, H., Ishida, T., Downregulation of thymidylate synthase by RNAi molecules enhances the antitumor effect of pemetrexed in an orthotopic malignant mesothelioma xenograft mouse model. *Int. J. Oncol.*, 査読有, 48, 2018, 1399-1407

DOI: 10.3892/ijco.2016.3367

Ando, H., Abu Lila, A.S., Tanaka, M., Doi, Y., Terada, Y., Yagi, N., Shimizu, T., Okuhira, K., Ishima, Y., Ishida, T., Intratumoral visualization of oxaliplatin within a liposomal formulation using X-ray fluorescence spectrometry. *Mol Pharm.*, 査読有, 15, 2018, 403-409

DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00762

Ando, H., Abu Lila, A.S., Kawanishi, M., Shimizu, T., Okuhira, K., Ishima, Y., Ishida, T., Reactivity of IgM antibodies elicited by PEGylated liposomes or PEGylated lipoplexes against auto and foreign antigens. *J. Control. Release*, 査読有, 270, 2018,

114-119

DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.12.002

Mima, Y., Abu Lila, A.S., Shimizu, T., Ukawa, M., Ando, H., Kurata, Y., Ishida, T., Ganglioside inserted into PEGylated liposome attenuates anti-PEG immunity. *J. Control Release*, 査読有, 250, 2017, 20-26
DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.01.040

Abu Lila, A.S., Moriyoshi, N., Fukushima, M., Huang, C., Wada, H., Ishida, T., Metronomic S-1 dosing and thymidylate synthase silencing have synergistic antitumor efficacy in a colorectal cancer xenograft model. *Cancer Letters*, 査読有, 400, 2017, 223-231

DOI: 10.1016/j.canlet.2016.11.005

Alaaeldin, E., Abu Lila, A.S., Ando, H., Fukushima, M., Huang, C., Wada, H., Sarhan, H.A., Khaled, K.A., Ishida, T., Co-administration of liposomal l-OHP and PEGylated TS shRNA-lipoplex: A novel approach to enhance anti-tumor efficacy and reduce the immunogenic response to RNAi molecules. *J. Control. Release*, 査読有, 255, 2017, 210-217

DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.04.040

Shimizu, T., Abu Lila, A.S., Nishio, M., Doi, Y., Ando, H., Ukawa, M., Ishida, T., Ishida, T., Modulation of antitumor immunity contributes to the enhanced therapeutic efficacy of liposomal oxaliplatin in mouse model. *Cancer Sci.*, 査読有, 108, 2017, 1864-1869

DOI: 10.1111/cas.13305

[学会発表](計 13 件)

石田竜弘, PEG 修飾リポソームに対する免疫反応(ABC 現象)の解明とワクチンへの応用、日本薬学会北海道支部・特別講演会、北海道大学薬学部(北海道札幌市) 2018 年 1 月 16 日

Ishida, T., Immunological response to PEGylated nanoparticles: Anti-PEG antibody issues. ILS Liposome Advances and Liposome Research Days Combined Conference. Athens, Sept. 17 (2017)

清水太郎、栗田瑞月、吉岡千尋、異島優、石田竜弘、補体活性化能を持つポリマー修飾リポソームによる脾臓辺縁帯 B 細胞標的化に関する検討、日本薬学会第 32 年会、大宮ソニックシティ(埼玉県大宮市) 2017 年 5 月 13 日

Ishida, T., Development of a RNAi-based anticancer drug. 12th France-Japan Drug Delivery Systems Symposium, Paris, France, Oct. 10 (2016)

Ishida, T., Anti-PEG immunity against PEGylated materials. An international workshop for Immune Effects of Nanomedicines: Clinical and Experimental

Evidence, Prediction and Prevention. Semmelweis University, Budapest, Hungary, June 21 (2016)

清水太郎、久保幸代、石田竜弘、ヒトにおける抗 PEG 抗体保有率の調査、日本薬学会第 31 年会、長良川国際会議場・岐阜都ホテル(岐阜県岐阜市) 2016 年 5 月 21 日

高山拓磨、清水太郎、鶴川真実、石田竜弘、リポソーム化抗がん剤投与が引き起こす腫瘍免疫細胞の影響、日本薬学会第 31 年会、長良川国際会議場・岐阜都ホテル(岐阜県岐阜市) 2016 年 5 月 19 日

本藤栄里、美馬優、清水太郎、石田竜弘、ポリエチレングリコール修飾タンパク製剤 Pegasys に対する抗 PEG IgM 応答、日本薬学会第 136 年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2016 年 3 月 27 日

久保幸代、本藤栄里、阿部遼、美馬優、清水太郎、石田竜弘、PEG 化製剤に対する anti-PEG IgM 結合特性に関する検討、第 54 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、高知テルサ(高知県高知市) 2015 年 10 月 31 日

西田健太郎、柏木美咲、室木究、柴俊輔、池田理沙、石田竜弘、長澤一樹、オキサリプラチン封入 PEG 修飾リポソーム製剤投与ラットの後肢皮膚組織における手足症候群様症状の評価、第 53 回日本癌治療学会学術集会、京都国際会館、(京都府京都市) 2015 年 10 月 29 日

渡邊奈美、安藤英紀、石田竜弘、胃がん腹膜播種モデルにおけるオキサリプラチン封入リポソーム静脈内投与による腫瘍増殖抑制効果、第 31 回日本 DDS 学会学術集会、京王プラザホテル(東京都新宿区) 2015 年 7 月 3 日

阿部遼、清水太郎、石田竜弘、IV 投与 PEG リポソームに対する anti-PEG IgM 応答への腹腔内免疫細胞の関与、日本薬学会第 30 年会、長崎ブリックホール(長崎県、長崎市) 2015 年 5 月 21 日

本藤栄里、美馬優、際田弘志、石田竜弘、PEG 修飾タンパク質 Pegasys® 投与による ABC 現象誘導、日本薬学会第 30 年会、長崎ブリックホール(長崎県、長崎市) 2015 年 5 月 21 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 竜弘 (ISHIDA, Tatsuhiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号: 50325271

(2)研究分担者

南川 典昭 (MINAKAWA, Noriaki)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：40209820

異島 優 (ISHIMA, Yu)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号：00457590

清水 太郎 (SHIMIZU, Taro)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特任助教
研究者番号：30749388

安藤 英紀 (ANDO, Hidenori)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特任助教
研究者番号：00735524

鷓川 真実 (UKAWA, Masami)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特任助教
研究者番号：50735511