

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390013

研究課題名(和文)

ナノキャリアの生体反応性とバイオ応用に関する研究

研究課題名(英文)

Study for Interaction of Biological Milieu with Nano-drug Carrier system

研究代表者

際田 弘志 (KIWADA HIROSHI) 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：50120184

研究成果の概要(和文)：

本研究により、“bio-inert” であると考えられてきたポリエチレングリコール(PEG)であっても薬物キャリア表面に提示されることによってB細胞を直接刺激し、T細胞の補助を受けることなく、特異的なIgM(anti-PEG IgM)を分泌させることを明らかにした。また、バイオ応用に関しては、PEG修飾ナノキャリアによって感作されたB細胞がanti-PEG IgMをその表面に過剰に発現し、2回目投与PEG修飾リポソームを積極的に取り込む可能性があることが明らかとなり、この免疫応答を利用すれば静注型のアジュバントが開発できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

PEG is considered as non-toxic and non-immunogenic material, and surface modification with it can improve the immunogenicity and pharmacokinetics of nanocarriers. However, we reported that PEGylated liposome (SL), which has been approved for clinical use, loses their long circulating properties when they are administered twice in same animal with certain interval (accelerated blood clearance (ABC) phenomenon). We elucidated that anti-PEG IgM, secreted in response to the first dose of SL, is responsible for the rapid clearance of the second dose via initiation of complement activation. We further elucidated that such anti-PEG IgM production is caused in nude mice (no T-cells), while it was not caused in SCID mice (no B and T cells) and splenectomized mice (no spleen). These suggest that spleen B cells produce the anti-PEG IgM in a T-cell independent manner. It appears that SL activates the immunity in spleen as T-cell independent antigens do. Our studies clearly demonstrate that any PEGylated formulations may display unexpected pharmacokinetic behavior upon repeated injection if such formulation induce anti-PEG IgM production and, as a consequence, may show less therapeutic efficacy or even cause undesirable side-effects. Therefore, a strategy to abrogate the immunogenicity of PEGylated formulations without significant compromising their in vivo performance would be highly desirable for the further development of promising PEGylated formulations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：薬物動態制御学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ナノキャリア、免疫系、抗PEG-IgM、B細胞、ナノトキシコロジー

## 1. 研究開始当初の背景

ナノテクノロジーはライフサイエンス、特に医療分野において積極的に応用されようとしている。しかし、ナノテクノロジーとライフサイエンスが融合した結果生み出されるナノデバイスを生体が受け入れるか分かっていなかった。「ナノテクノロジーは新たな毒性の発生源にもなりうるのか？」という問題がナノトキシコロジーとして指摘されており、事実、フラーレン（カーボンナノチューブ）を吸い込んだ動物肺に顕著な障害があらわれたという報告がなされており、大きな衝撃を与えていた。これは大きな粒子では材料の物性は粒子径に依存しないのに対して、ナノレベルになると粒子径に依存するという benefit の裏返しに他ならない。フラーレンに関して、細胞レベルでの毒性は低いという見解が示されたが、所詮細胞レベルの議論であって、システムとしての生体に対する安全性の保証には成り得ない。ナノ粒子が生体におよぼす影響を理解せずして、ライフサイエンスへの応用はありえないと考えられた。

本研究では、既に臨床応用されているナノ粒子（ポリエチレングリコール(PEG)修飾リポソーム(SL))をモデルとして、その生体反応性を実際の dosage regimen において改めて検討し、その影響に関して特に生体防御を司る免疫系との相互作用に着目して検討する点にある。

我々は、PEG 修飾リポソームの繰り返し投与により動物体内で免疫系の活性化が生じ、ある投与間隔で次に投与された PEG 修飾リポソームの血中滞留性が減少することを報告した。さらに、この現象に PEG に対する抗体 (anti-PEG IgM) の分泌と、PEG 修飾リポソームへの anti-PEG IgM の結合に端を発する補体活性化が重要な役割を果たしていることを報告していた。

PEG は bio-inert な水溶性高分子であり、PEG 修飾体は「一般に」抗原性が軽減され、生体内安定性が向上されると信じられている。このような概念に基づき設計されたナノキャリア (PEG 修飾リポソーム) は既に臨床応用されてもいた。しかし、我々が得た結果は、ナノサイズの物質に結合した PEG は「必ずしも」bio-inert ではなくむしろ免疫系の活性化を亢進させることを示唆しており、PEG 修飾体による免疫賦活機構の解明は、ナノトキシコロジーに基づいたより安全な PEG 化製剤の設計・開発に役立つのみならず、新たなバイオ応用への道筋を開くものと期待された。

研究開始時点では、当該研究課題に関連した研究は国内・国外でほとんどなく、同時期に本現象を報告したオランダのグループに

よるもののみであったが、その後このグループは研究を継続していない。類似の研究としては、台湾のグループが PEG 修飾タンパクの投与により免疫系が活性化され、抗 PEG-IgM が分泌されることを報告していたが、両グループともに PEG 修飾体による免疫活性化の詳細な機構に関して、何ら明らかにしていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究は、研究代表者らが明らかにした新事実、即ち“bio-inert であると考えられてきた PEG による免疫活性化”の機構を解明し、PEG あるいはその他類似の高分子を用いた医薬品開発に寄与する情報を提示する事を主たる目的として研究を行った。マクロとマイクロ (ナノ) の間で、生体反応性に臨界があることはナノトキシコロジーでは常識となっているが、PEG などの bio-inert な高分子による修飾がなぜ生体反応性を亢進させるか明らかとなっていなかった。この点を解明し、生体適合性が高く安全な独自のナノデバイスの開発を実現させるとともに、現在行われているナノ粒子を用いた多くの DDS 研究の実用化や安全性の確立に寄与する情報を発信することを最終目的とした。

## 3. 研究の方法

### ・PEG 修飾リポソームによる B 細胞活性化機構の解明

これまでの検討から、PEG 修飾リポソームは T 細胞非依存的な抗原 (TI-antigen) として作用し、脾臓の marginal zone に存在する B 細胞を直接刺激して anti-PEG IgM を分泌させていることが分かっている。そこで、PEG 修飾リポソームが TD-antigen の Type 1 あるいは Type 2 のいずれに分類されるかを検討した。また、同時に脾臓内でのリンパ球の活性化 (具体的には増殖状況) も検討した。

### ・Anti-PEG IgM と PEG の相互作用の解析

IgM と PEG 修飾リポソームの相互作用に関して解析した。解析はプレートに種々の PEG-脂質誘導体を固相化し、アナライトとして抗 PEG-IgM を含む抗血清を用いた。本検討によって、PEG 修飾リポソーム投与により誘導された IgM の認識エピトープを同定することができるものと期待された。

### ・次世代免疫回避型 (ステルス) ナノキャリアの開発

研究代表者らはグルタミン酸を基材としたポリグルタミン高分子 (PG10) 修飾リポソームでは、抗 PG10 抗体の誘導が観察されず、また anti-PEG IgM の誘導も観察されない事

を見いだしていた。PG10 修飾リポソームを PEG 修飾リポソームと比較することで、免疫活性化を誘導しない、生体にとって優しいキャリア（次世代免疫回避型ナノ・キャリア）の開発を試みた。

#### ・Anti-PEG IgM による補体活性化の検討

PEG 修飾リポソーム初回投与後に血清を採取し、これに PEG 修飾リポソームを添加してインキュベーションすることによる補体消費について検討した。

#### ・バイオ応用の可能性

PEG 修飾リポソームは直接 B 細胞を刺激し、IgM の分泌を誘導する可能性が高い。この IgM は理論的に PEG のみならず、代謝されにくくかつ繰り返し構造を持つような物質（例えば細菌の糖鎖など）に結合するものと考えられた。このような性質を利用し、ワクチンプラットフォームへの応用の可能性を模索した。

## 4. 研究成果

### (1) PEG 修飾リポソームによる B 細胞活性化機構の解明

PEG 修飾リポソーム投与 4 日後に蛍光色素 (DiI) でラベルした PEG 修飾リポソームを再度投与して脾臓 B 細胞への結合状況をフローサイトメーターで観察したところ、IgM<sup>+</sup> の B 細胞に PEG 修飾リポソームが結合していることが観察され、初回 PEG 修飾リポソーム投与によって PEG に親和性を持つ IgM を発現した B 細胞が脾臓内で増加していることが分かった。また、前述の条件で処置した脾臓組織切片を蛍光顕微鏡下観察したところ、PEG 修飾リポソームを結合した B 細胞は脾臓辺縁帯から濾胞へと活発に移動していることが分かった。このことから、PEG 修飾リポソームによる刺激を受けた脾臓 B 細胞は、anti-PEG IgM を分泌するだけでなく、次に侵入してくる抗原 (PEG 修飾リポソーム) を結合し、濾胞に存在する樹状細胞などに抗原を送達する準備もしている可能性が高い事が示唆された。この知見は、全く想定外のものであり、新たな概念に基づくワクチン開発にもつながる重要な情報であると考えられる。

### (2) B 細胞からの anti-PEG IgM 分泌および TI 抗原としての PEG 修飾リポソーム

PEG 修飾リポソームを投与後、経日的に脾臓細胞を採取し、培養系にて anti-PEG IgM の分泌を確認したところ、投与後 3 日目以後に強い anti-PEG IgM の分泌が確認された。この結果は、PEG 修飾リポソーム投与後、数日間は脾臓内で IgM を分泌させるための何らかのイベントが進行するための時間が必要であることを示唆しており、非常に興味深い。

また、B 細胞、T 細胞を持たない SCID マウスに無処置マウスから得た脾臓細胞を輸注 (静脈内に注入) し、この SCID マウスに PEG 修飾リポソームを投与することで anti-PEG IgM の分泌が誘導されることを確認した。更に、脾臓細胞から B 細胞のみを単離して、前述のように SCID マウスに輸注し、ついで PEG 修飾リポソームを投与したところ、同様に anti-PEG IgM の分泌が誘導される事を確認した。これらの結果から、anti-PEG IgM の分泌は主として脾臓 B 細胞から行われている事を明らかにすることができた。

さらに、T 細胞を持たない SCID マウスに B 細胞のみを輸注した場合でも anti-PEG IgM の分泌が確認された事から PEG 修飾リポソームは明らかに T 細胞の補助を必要とせずに IgM の分泌を誘導する TI 抗原であることが明確になった。

### (3) PEG 修飾リポソームによる補体活性化

In vitro 系の実験結果から、anti-PEG IgM が存在する血清中で、PEG 修飾ナノキャリアは補体系を強力に活性化する事を確認した。このことから、C3a や C5a の遊離に伴うアナフィラキシーショックが生じる事が懸念されたが、in vivo 系の試験では 2 回目 PEG 修飾ナノキャリア投与時において動物に顕著な変化は生じず、生体に異常を生じさせるほどのレベルではない事が分かった。

### (4) Anti-PEG IgM と PEG の相互作用の解析

末端の残基 (-CH<sub>3</sub>, -OH, -COOH, -NH<sub>2</sub> など) が異なる種々の PEG リン脂質誘導体を用いて、anti-PEG IgM の結合性について検討したところ、末端残基に関わらず anti-PEG IgM の結合性は変化しなかった。このことから anti-PEG IgM の認識エピトープは PEG 鎖中の -(O-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-であることが示唆された。

### (5) 次世代免疫回避型 (ステルス) ナノキャリアの開発

PEG 鎖中に側鎖を持つポリグリセリン (PG) を PEG の代わりに修飾剤として用いたところ、anti-PG IgM の誘導は観察されず、2 回目投与時の血中濃度推移も初回投与時のそれとほぼ同じであることが分かった。詳細な機構は明らかではないが、修飾剤の違いによって B cell とナノキャリアとの相互作用が変化した事が、PG 修飾ナノキャリアにおいて特異的 IgM が誘導されなかった理由ではないかと考えられる。PEG に代わり PG を用いることで免疫回避型 (ステルス) ナノキャリアを開発することが可能であることが示唆された。

### (6) バイオ応用の可能性

バイオ応用に関しては、PEG 修飾ナノキャリアによって感作された B cell が anti-PEG

IgM をその表面に過剰に発現し、2回目投与PEG 修飾リポソームを積極的に取り込む可能性が考えられたため、2回目投与PEG 修飾リポソームに抗原を封入し、抗原に対する抗体分泌の有無を検討した。検討の結果、モデル抗原に対する多量のIgMの分泌が誘導される事を確認でき、PEG 修飾ナノキャリアに対する免疫応答を一種のアジュバントとして利用できる可能性が示唆された。

#### (7) ナノキャリアのリスク評価

本研究により、それ自体はbio-inertであると考えられる合成高分子であっても、リポソームという構造体の表面に提示された場合には免疫系を刺激し、特異抗体の分泌を誘導する可能性がある事が分かった。医薬品開発において、キャリアや核酸、タンパクなどの安定性を高め、同時に抗原性を減弱させる目的で合成高分子による修飾が汎用されており、これらは適切な薬効を得るために繰り返し投与する必要がある事が考えられる。このような場合、これらの医薬品に対する特異抗体の出現は大きなリスクであり、開発途上における動物レベルでの前臨床試験において特異抗体出現の有無を検討しておくことは、開発上のリスクを回避するという意味で重要であると考えられる。

また、PEG 修飾ナノキャリアに核酸 (siRNA, pDNA) などを付加すると Toll like receptor を介した刺激が誘導され、炎症性サイトカインの誘導が生じるだけでなく anti-PEG IgM の分泌誘導も生じる事が明らかとなった。ナノキャリア投与後の血中サイトカイン濃度を測定することで簡易的ではあるが、ナノキャリアのリスク評価が可能である事が示唆された。

#### 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 12 件)

1. Ichihara M., Shimizu T., Imoto A., Hashiguchi Y., Uehara Y., Ishida T., Kiwada H., Anti-PEG IgM response against PEGylated liposomes in mice and rats. *Pharmaceutics*, in press (2011) 査読有
2. Tagami T., Uehara Y., Moriyoshi N., Ishida T., Kiwada H., Anti-PEG IgM production by siRNA encapsulated in a PEGylated lipid nanocarrier is dependent on the sequence of the siRNA. *J. Control. Release*, in press (2011) 査読有
3. Ishihara T., Maeda T., Sakamoto H., Takasaki N., Shigyo M., Ishida T., Kiwada H., Mizushima Y., Mizushima T., Evasion of the accelerated blood clearance phenomenon by coating of nanoparticles with various hydrophilic polymers. *Biomacromolecules*, 11, 2700-2706 (2010) 査読有
4. Eto Y., Yoshioka Y., Ishida T., Yao X., Morishige T., Narimatsu S., Mizuguchi H., Mukai Y., Okada N., Kiwada H., Nakagawa S., Optimized PEGylated adenovirus vector reduces the anti-vector humoral immune response against adenovirus and induces a therapeutic effect against metastatic lung cancer. *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 149-154 (2010) 査読有
5. Koide H., Asai, T., Hatanaka, K., Akai, S., Ishii, T., Kenjo, E., Ishida, T., Kiwada, H., Tsukada, H., Oku, N., T cell-independent B cell response is responsible for ABC phenomenon induced by repeated injection of PEGylated liposomes. *Int. J. Pharm.*, 392, 218-223 (2010) 査読有
6. Tagami, T., Nakamura, K., Shimizu, T., Yamazaki, N., Ishida, T., Kiwada, H., CpG motifs in pDNA-sequences increase anti-PEG IgM production induced by PEG-coated pDNA-lipoplexes. *J. Control. Release*, 142, 160-166 (2010) 査読有
7. Ishihara, T., Takeda, M., Sakamoto, H., Kimoto, A., Kobayashi, C., Takasaki, N., Yuki, K., Tanaka, K., Takenaga, M.,

- Igarashi, R., Maeda, T., Yamakawa, N., Okamoto, Y., Otsuka, M., Ishida, T., Kiwada, H., Accelerated blood clearance phenomenon upon repeated injection of PEG-modified PLA-nanoparticles. *Pharm. Res.*, 26, 2270-2279 (2009) 査読有
8. Mizushima, Y., Mizushima, T., Accelerated blood clearance phenomenon upon repeated injection of PEG-modified PLA-nanoparticles. *Pharm. Res.*, 26, 2270-2279 (2009) 査読有
9. Tagami, T., Nakamura, K., Shimizu, T., Ishida, T., Kiwada, H., Effect of siRNA in PEG-coated siRNA-lipoplex on anti-PEG IgM production. *J. Control. Release*, 137, 234-240 (2009) 査読有
10. Koide H., Asai, T., Hatanaka, K., Urakami, T., Ishii, T., Kenjo, E., Nishihara, M., Yokoyama, M., Ishida, T., Kiwada, H., Oku, N., Particle size-dependent triggering of accelerated blood clearance phenomenon. *Int. J. Pharm.*, 362, 197-200 (2008) 査読有
11. Ishida, T., Kashima, S., Kiwada, H., The contribution of phagocytic activity of liver macrophages to the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon of PEGylated liposomes in rats. *J. Control. Release*, 126, 162-165 (2008) 査読有
12. Ishida, T., Kiwada, H., Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes. *Int. J. Pharm.*, 354, 56-62 (2008) 査読有
- [学会発表] (計 45 件)
1. Hashiguchi, Y., Shimizu, T., Ichihara, M., Ishida, T., Kiwada, H., PEG on nanocarriers induces anti PEG IgM production as a result of activation of immune system., *Nano in Cancer: Linking Chemistry, Biology and Clinical Applications in vivo*, Miami USA, Jan. 12-15 (2011)
2. 市原理子、石田竜弘、際田弘志、PEG 修飾 ナノキャリア生体内投与後に生ずる免疫活性化(ABC 現象)機構解明に関する検討、第 19 回 DDS カンファレンス (静岡)、2010 年 9 月 4 日
3. Ishida, T., Kiwada, H., Immunostimulatory properties of liposomes containing PEG. *International Liposome Research Days & Lipids, Liposomes & Membrane Biophysics*, Vancouver, Canada, Aug. 6 (2010)
4. Hashiguchi, Y., Shimizu, T., Ishida, T., Kiwada, H., Sequential treatment, pre-dose with empty PEGylated liposome (SL) and second dose antigen-encapsulating SL, promotes activation in a primary immune response. *International Liposome Research Days & Lipids, Liposomes & Membrane Biophysics*, Vancouver, Canada, Aug. 5-7 (2010)
5. Ichihara, M., Imoto, A., Hashiguchi, Y., Uehara, Y., Ishida, T., Kiwada, H., Spleen cells secrete anti-PEG IgM following intravenous injection of PEGylated liposome. *International Liposome Research Days & Lipids, Liposomes & Membrane Biophysics*, Vancouver, Canada, Aug. 5-7 (2010)
6. 石田竜弘、際田弘志、核酸デリバリーにおける ABC 現象、遺伝子・デリバリー研究会 第 10 回シンポジウム (札幌)、2010

年6月3日

7. Koide, H., Asai, T., Yokoyama, M., Ishida, T., Kiwada, H., Oku, N.,  
Elucidation of ABC phenomenon caused by repeat injection of PEGylated nanocarrier. 4th International Liposome Society Conference. Liposome advances: Progress in Drug and Vaccine Delivery, London, UK, Dec. 14 (2009)
8. 石田竜弘、際田弘志、核酸デリバリーにおける accelerated blood clearance (ABC) 現象、第25回日本DDS学会(東京)、2009年7月3日
9. Shimizu, T., Ishida, T., Kiwada, H.,  
Interaction of PEGylated liposomes with splenic marginal zone B cells may trigger production of anti-PEG IgM in the ABC phenomenon. 11<sup>th</sup> Liposome Research Days conference, Yokohama (Japan), July 19-22 (2008)
10. Tagami, T., Nakamura, K., Shimizu, T., Ishida, T., Kiwada, H., Effect of siRNA on anti-PEG IgM production in the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon when formulated with PEGylated cationic liposome. 11<sup>th</sup> Liposome Research Days conference, Yokohama (Japan), July 19-22 (2008)
11. Ishida, T., Kiwada, H., Unexpected immunological response against sterically stabilized, PEGylated, liposome after intravenous injection. International Symposium on “Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes” (ISNT2008), Sapporo, Japan, June 16-17, 2008

12. Shimizu, T., Ishida, T., Kiwada, H.,  
Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon on PEGylated nanocarrier: Unexpected immune-reaction against PEGylated liposome. International Symposium on “Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes” (ISNT2008), Sapporo, Japan, June 16-17, 2008

[図書] (計1件)

1. Ishida, T., Kiwada, H., Unexpected reactions by in vivo application of PEGylated liposomes. “Safety of Nanoparticles: From Manufacturing to Clinical Applications (A volume in the Nanostructure Science and Technology series)” T. J. Webster (Ed.), Chapter 6, p111-130 Springer Science + Business Media, New York, USA (2009)

[その他]

ホームページ等  
<http://www.ph.tokushima-u.ac.jp/article/0015027.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

際田 弘志 (KIWADA HIROSHI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授  
研究者番号：50120184

##### (2) 研究分担者

石田 竜弘 (ISHIDA TATSUHIRO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・准教授  
研究者番号：50325271

##### (3) 連携研究者

なし