

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390012

研究課題名(和文)核酸医薬デリバリーにおける免疫活性化機構の解明とそのバイオ応用に関する研究

研究課題名(英文)Anti-PEG Immunity upon nucleic acid delivery

研究代表者

際田 弘志(KIWADA, Hiroshi)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・非常勤講師

研究者番号：50120184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：核酸は新規医薬品として期待されているが、実用化には送達キャリアの開発が必須である。臨床応用可能なキャリアは薬理効果の優劣だけでなく、核酸・キャリア複合体と生体との相互作用に関する評価が必要である。本研究では、臨床的に問題となりうる、核酸・キャリア複合体投与時の初期免疫活性化機構の解明をおこない、siRNAに関してはTLR-7を介した、pDNAに関してはTLR-9を介した免疫活性化が生じていることを明らかにした。また、この免疫活性化を回避する方策として、PEGに代わる表面修飾剤としてポリグリセリンを見出した。臨床応用可能な核酸・キャリア複合体の開発に資する成果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：For in vivo use of pDNA and siRNA, surface modification of the liposome with PEG is frequently applied to achieve gene-expression or suppression in the targeted tissue. However, PEG-coated liposomes induce anti-PEG IgM immunity. Here, we investigated how a Toll-like receptor (TLR) might enhance anti-PEG IgM production. Attenuated anti-PEG IgM production for pDNA-PEG liposome was observed in TLR9 KO mice, the attenuated IgM production for siRNA-PEG liposome was in TLR7 KO mice. In addition, the modification of pDNA-PEG liposome with PG attenuated the production of anti-polymer IgM. In vivo experiment, a second dose of pDNA-PG liposome restored the accumulation level in the tumor tissue, comparable to that of the first dose, whereas the tumor accumulation level of a second dose of pDNA-PEG liposome was significantly compromised. These results may have important implications for the design and development of an efficient PEG-coated non-viral nucleic acid delivery nanocarrier system.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：DDS PEG リポソーム ABC現象 Anti-PEG IgM 免疫活性化

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、これら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い。近年「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、ナノ粒子が生体に与える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。

研究代表者らは既に、PEG 修飾リポソームを繰り返し投与した場合、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見出した。さらに、この現象は、初回投与 PEG 修飾リポソームが脾臓辺縁体(marginal zone)に常在する B 細胞を直接活性化し、その結果 PEG 修飾リポソームに対する抗体(anti-PEG IgM)が分泌され、この抗体が2回目投与 PEG 修飾リポソームに選択的に結合し、補体系を強力に活性化するため生じる事も明らかにした。

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 PEG 修飾リポソームや PEG 修飾インターフェロンなども臨床で既に使用されている。しかし、研究代表者らが得た結果は、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を活性化することを示唆しており、国内外から注目された。

ところで pDNA, siRNA などの核酸は低分子医薬品・抗体医薬品に次ぐ新規医薬品として期待が高まっており、近年では第2世代のアンチセンス医薬や RNAi を利用した医薬品の開発が活発化している。しかし、核酸医薬は生体内安定性および生体膜透過性が乏しいことから、作用部位である標的細胞内にまで的確に核酸を送達可能なキャリアの開発が期待されている。核酸の全身投与を目指したキャリア開発においても、核酸・キャリア複合体の生体内安定性を向上させる目的でやはり PEG 修飾キャリアが使用されている。外来性の核酸は Toll-like receptor(TLR)の強力なアゴニストとして作用し、炎症性サイトカインを誘導することで初期生体防御機構を活性化する。研究代表者らの研究で、薬剤としての核酸であっても、静脈内投与後、強力に免疫賦活作用を発揮する事を確認した。同様の報告が siRNA デリバリー技術の開発で有名な Tekmira Pharmaceuticals の研究グループからも siRNA に関して報告されていた。さらに、最新の検討で、PEG 修飾キャリアに核酸を含有することで、anti-PEG IgM の血中への分泌が亢進され、繰り返し投与した際の核酸・キャリア複合体の血中濃度が著しく減少し、標的組織(固形がん)への移行が抑制される事が明らかとなった。このような条件下では PEG 修飾キャリアによる核酸の生体内

安定性向上は期待できず、薬効は得られない。TLR を介した核酸の免疫賦活作用が anti-PEG IgM 分泌亢進作用の本質であると類推しているが、その詳細な機構は分かっていない。

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、作用部位たる標的細胞内への送達キャリアの開発が実用化の鍵を握っている。多くのキャリアが候補として報告されているが、臨床応用可能なレベルでの開発は進んでいない。これは、薬理効果の優劣によってのみキャリアの評価が進められ、生体にとって基本的に異物である核酸・キャリア複合体と生体との相互作用に関する評価が行われていないためである。本研究では、既に研究代表者らが確認し、臨床的に問題となりうる、核酸・キャリア複合体投与時の初期免疫活性化(1. 炎症性サイトカインの分泌誘導(サイトカイン・ストーム)、2. ポリエチレングリコール(PEG)に対する抗体(anti-PEG IgM)誘導亢進)機構の解明をおこない、臨床応用可能な核酸・キャリア複合体の開発を試みる事を目的としている。

3. 研究の方法

(1) 核酸含有 PEG 修飾リポソーム投与による免疫活性化(サイトカイン・anti-PEG IgM 誘導)機構の解明

① 炎症性サイトカインの測定

核酸(pDNA, siRNA)含有 PEG 修飾カチオンリポソーム投与後、マウスから血清を採取し、血清中の炎症性サイトカイン(IFN- α 、TNF- α 、IL-6)を ELISA により定量する。これまでの検討から、これらのサイトカインの分泌は投与後4時間で最大になる事を確認しており、投与後4時間後の血清をサンプルとした。

② Anti-PEG IgM の測定

核酸(pDNA, siRNA)含有 PEG 修飾カチオンリポソーム投与後、マウスから血清を採取し、血清中の anti-PEG IgM を ELISA により定量した。これまでの検討から、anti-PEG IgM の分泌は投与後5日で最大になる事を確認しており、投与後5日の血清をサンプルとした。

③ Toll-like receptor の寄与

外来性核酸の認識受容体として TLR-3, -7, -9 が知られている。これらの寄与を明らかにするために、まず MyD88 に注目する。MyD88 は TLR を介して活性化されるため、MyD88 欠損マウス(MyD88 knockout mouse)に核酸含有 PEG 修飾リポソームを投与し、サイトカインの誘導および anti-PEG IgM の誘導を調べた。両者の誘導が抑制された場合、TLR の関与が強く疑われるため、TLR-7 欠損マウス、TLR-9 欠損マウスを用いて同様の検討を行った。

(2) 免疫回避型(ステルス)核酸含有キャリアの開発

① 免疫賦活作用における核酸配列の影響

これまでの検討で、pDNA においては CpG motif の除去した配列のものを、siRNA においては炎症性サイトカインの分泌誘導が低い配列のものをを用いた場合、anti-PEG IgM 分泌亢進が生じない事を明らかにしている。しかし、核酸の配列とサイトカイン誘導・anti-PEG IgM 誘導亢進との間に相関があるか、分かっていない。そこで、配列の異なる種々の核酸を含む PEG 修飾リポソームを投与し、その影響について検討した。

② 新規高分子修飾剤 (ポリグリセリン(PG)) の影響

ポリグリセリンは PEG のポリオキシエチレン鎖からヒドロキシメチル基が分枝した構造をもつ合成高分子であり、PEG ほどではないものの、リポソームの血中滞留性を向上する機能を有している。この分枝鎖が MZ-B 細胞上の抗原受容体(anti-PEG IgM)との相互作用を抑制し、PG に対する抗体の分泌を抑制することが考えられた。そこで、核酸含有 PG 修飾カチオンリポソームを投与し、投与 5 日後の血清中に PG に対する抗体が分泌されているか、また本リポソームを繰り返し投与した際の体内動態の変化の有無に関して検討を行った。

(3) バイオ応用の可能性の検討

PEG 修飾リポソームは直接 MZ-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る。このような IgM の分泌は、PEG 修飾リポソームに核酸を含ませる事によって亢進される事を確認しており、このような核酸含有 PEG 修飾リポソームの性質を利用し、ワクチンへの応用の可能性を模索した。

4. 研究成果

Anti-PEG IgM 分泌誘導において、核酸の配列が大きな影響を与える事が明らかとなった。pDNA においては Toll-like receptor (TLR) 刺激性がある CpG 配列が、siRNA においてもやはり TLR 刺激活性がある配列を有する物が anti-PEG IgM の分泌を亢進する事が分かった。さらに、TLR 刺激に密接に関連する事が知られる炎症性サイトカイン (IFN- γ 、TNF- α 、IL-6) の分泌を評価したところ、CpG を含む pDNA においては全てのサイトカインにおいて有意な分泌亢進作用が確認された。一方、siRNA においては TNF- α 、IL-6 において有意な分泌亢進作用が確認されたが、IFN- γ においては有意な亢進作用は観察されなかった。これは両核酸が刺激する TLR が異なる事を示唆している可能性が高いことを示唆しているものと考えられた。

ついで、TLR の寄与をより明確にするため、MyD88 欠損マウス(MyD88 knockout mouse)を

用いた検討を行った。結果、anti-PEG IgM 分泌および各サイトカインの分泌誘導ともに顕著な抑制が観察され、予想通り TLR を介した免疫刺激が anti-PEG IgM 分泌亢進において極めて重要な役割を果たしている事を直接的に明らかにすることができた。

Anti-PEG IgM 分泌誘導において、共存する薬物(抗がん剤)が大きな影響を与えるか検討を行った。これまでの検討で、キャリアに搭載した核酸 (pDNA, siRNA) が anti-PEG IgM の分泌誘導を亢進させることを示してきたが、抗がん剤のオキサリプラチンを併用した場合、遊離型のオキサリプラチンを併用した場合であっても anti-PEG IgM の分泌抑制効果が見られた。さらに興味深いことに、キャリア内に封入した場合、さらに顕著な抑制を示すことがわかった。サイトカインの分泌も同時に評価したところ、同様に大きく抑制しており、オキサリプラチンが核酸による TLR を介した刺激をサイトカイン分泌及び anti-PEG IgM 分泌の両面から抑制する事が明らかとなった。現実のがん治療では、作用機序の異なる抗がん剤の多剤併用療法が一般となっており、今後の臨床応用に向けた重要な知見が得られたものと考えている。

ポリグリセリン(PG)で表面修飾した核酸含有リポソームを投与した場合、PG に対する抗体(IgM, IgG ともに)は誘導されず、PEG 修飾リポソームよりも単回投与時の血中濃度・腫瘍移行性は低いものの、繰り返し投与時には一定量の核酸を腫瘍に送達しうる事が明らかとなった。構造的に PEG と類似性の高い PG がなぜ特異抗体を誘導しないのか未だ明らかではないが、PEG 修飾リポソームを用いて誘導した anti-PEG IgM が PG と反応しなかったことから、MZ-B 細胞上の抗原受容体(anti-PEG IgM)が PG を認識できないことが理由ではないかと考えられた。

バイオ応用への試みとして、本検討で明らかとなった PEG に対する免疫反応を利用したワクチン・アジュバントの開発を行った。これまでに研究代表者らは、PEG 修飾リポソームをある投与間隔で 2 回繰り返し投与を行うと、2 回目投与リポソームが脾臓辺縁帯 B 細胞に選択的に結合し、濾胞に輸送されることを見出した。濾胞は免疫反応の成熟領域であるため、2 回目投与リポソーム中に抗原を封入して免疫することにより、抗原特異的免疫反応を増強できるのではないかと考えた。濾胞への抗原輸送を促進するために、空の PEG 修飾リポソームを静脈内投与した後、モデル抗原の OVA を封入した PEG 修飾リポソームを静脈内投与して免疫を行った。がん細胞として OVA を発現する EG7-OVA を用い、皮下移植により担癌マウスを作製した。OVA 封入 PEG 修飾リポソーム単独で免疫した場合、腫瘍成長抑制効果はほとんど見られなかったが、空の PEG 修飾リポソームの前投与により、腫瘍成長が著しく抑制された。また α ガラクトシルセラミドをアジュバントとし

て共封入した場合、より少ない免疫回数でも顕著な腫瘍成長抑制効果を示した。このことから、当該研究の成果を応用することで、抗原封入 PEG 修飾リポソームによる抗腫瘍免疫誘導など、バイオ応用に展開できることが示された。

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 Hashimoto, Y., Abu Lila A., Shimizu, T., Ishida, T., Kiwada, H., B cell-intrinsic toll-like receptor 7 is responsible for the enhanced anti-PEG IgM production following injection of siRNA-containing PEGylated lipoplex in mice. *J. Control. Release*, 査読有、184C, 1-8 (2014)
DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.04.003.
- ② Hashimoto Y., Shimizu T., Mima Y., Abu Lila A., Ishida T., Kiwada H., Generation, characterization and in vivo biological activity of two distinct monoclonal anti-PEG IgMs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 査読有、277, 30-38 (2014)
DOI: 10.1016/j.taap.2014.03.002.
- ③ Abu Lila, A.S., Uehara, Y., Ishida, T., Kiwada, H., Application of polyglycerol-coating to pDNA lipoplex for the evasion of the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon in nucleic acid delivery. *J. Pharm. Sci.*, 査読有、103, 557-566 (2014)
DOI: 10.1002/jps.23823.
- ④ Nagao, A., Abu Lila, A.S., Ishida, T., Kiwada, H., Abrogation of the accelerated blood clearance phenomenon by SOXL regimen: Promise for clinical application. *Int. J. Pharm.*, 441, 395-401 (2013)
DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.11.015. 11.
- ⑤ Alaaeldin, E., Abu Lila, A.S., Moriyoshi, N., Sarahan, H.A., Ishida, T., Khaled A. Khale, Kiwada, H., The co-delivery of oxaliplatin abrogates the immunogenic response to PEGylated siRNA-lipoplex. *Pharm. Res.*, 査読有、30, 2344-2354 (2013)
DOI: 10.1007/s11095-013-1078-4.
- ⑥ Suzuki, T., Ichihara, M., Hyodo, K., Yamamoto, E., Ishida, T., Kiwada, H., Ishihara, H., Kikuchi, H., Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes containing doxorubicin upon repeated administration to dogs. *Int. J. Pharm.*, 査読有、436, 636-643 (2012)
DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.07.049.
- ⑦ 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*, 査読有、151, 149-154 (2011)

DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.12.013.

[学会発表] (計 28 件)

- ① 石田 竜弘、際田 弘志、抗がん剤による腫瘍内微小環境変化を利用した新規 DDS の開発、2013.7.4、第 29 回日本 DDS 学会学術集会、京都テルサ (京都府京都市)
- ② 石田 竜弘、PEG 修飾ナノキャリア投与時に惹起される免疫応答～抗 PEG-IgM 分泌誘導とナノキャリアの体内動態への影響～、2011.8.10、広島臓器移植セミナー、広島大学医学部 (広島県広島市)
- ③ 石田 竜弘、腫瘍内微小環境変化を利用した核酸デリバリー戦略、2011.8.9、遺伝子・デリバリー研究会第 11 回夏期セミナー、三翠園ホテル (高知県高知市)
- ④ Ishida, T., Kiwada, H., Biological responses against lipid membrane containing PEG. 2011.7.14、3rd International Symposium on Surface and Interface of Biomaterials (SIB2011)、北海道大学学術交流会館 (北海道札幌市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○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

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・非常勤講師

研究者番号：50120184

(2)研究分担者

石田 竜弘 (ISHIDA, Tatsuhiko)

徳島大学・大学院ヘルスハイサイエンス研究部・教授
研究者番号：50325271

(3)連携研究者
なし