

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790530

研究課題名(和文) ナノキャリアの複数回投与が及ぼす免疫原性の解明と回避

研究課題名(英文) Elucidation and evasion of the immunogenicity induced by the repeated administration of the PEGylated nanocarrier

研究代表者

藤 加珠子 (Toh, Kazuko)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90342732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ドラッグデリバリーシステム(DDS)において薬剤を搭載するキャリアにポリエチレングリコール(PEG)を修飾することで高い血中安定性が獲得できる。しかし、PEG修飾ナノキャリアを複数回投与することによって血中滞留性が著しく損なわれるAccelerated blood clearance(ABC)現象はDDSの開発において障害となっている。本研究では生体内共焦点顕微鏡を用いてABC現象の評価法を確立し、様々なキャリアについて調べることによりABC現象を回避する構造を検討した。また、siRNAを搭載する際のintact性保持の評価法、長時間測定で問題となるフォトブリーチングの抑制法を確立した。

研究成果の概要(英文)：In drug delivery system (DDS), the modification of nanocarriers with polyethylene glycol (PEGylated nanocarrier) is commonly used technique to improve blood circulation time. However, it is reported that repeated injection of PEGylated carrier cause 'accelerated blood clearance (ABC)' phenomenon in animal experiments. The ABC phenomenon is one of the barriers in the DDS development. In this study, the convenient evaluation method using in vivo confocal microscopy was established. After the investigation of various nanocarrier, the structure avoiding the ABC phenomenon was examined. The evaluation method of siRNA intact ratio including the nanocarrier and the inhibition method of photobleaching in case of long time measurement were also established.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：ドラッグデリバリーシステム ポリエチレングリコール ABC現象 生体内共焦点顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

ポリエチレングリコール(PEG)は、ナノキャリアの血中安定性すなわちステルス性を向上させるために最も汎用されている表面修飾用高分子である。PEGで修飾されたナノキャリアは表面に水和層を形成し補体や抗体によるオプソニン化を防ぎ、細網内皮系による認識を免れ血中を長期滞留する特性を持つ。がん治療および再生医療などを対象としたナノキャリアについては、高分子ミセルあるいはPEG修飾リポソームなどを利用する研究が著しく発展し、数々の臨床試験が行われている。ドキシソルピシンを内包したPEG修飾リポソームはドキシルという商品名で本邦においても臨床応用されている。

近年PEG修飾ナノキャリアの問題点として、Accelerated Blood Clearance (ABC)現象が報告されている。ABC現象とは、ナノキャリアの頻回投与時において血中からの急速なクリアランスが起こり肝臓に蓄積する現象である^{1,2}。ABC現象はドラッグデリバリーシステムの開発において障害となっている。ABC現象のメカニズムとして、初回投与時のPEG修飾ナノキャリアが脾臓B細胞に認識され、IgM抗体を産生し誘導されることが示唆されている³。ABC現象の惹起は投与量、投与間隔、表面のPEG密度、粒子径、内包した薬剤によって左右されることが報告されているが、経験則の積み重ねでありその詳細な発生機序の解明には至っていない。この理由は、DDS研究がこれまで主に薬理効果を追求しABC現象に取り組むグループが少ないこと、またそれ故にABC現象の分析手法が多様化されていないことが挙げられる。ABC現象の解明は全てのPEG修飾ナノキャリアが安全にヒトに投与されるために解決すべき重要課題である。

2. 研究の目的

(1) ABC現象の評価方法の確立

従来の研究では、血中滞留性、臓器集積の

評価、抗IgM抗体の測定は全てex vivoで行われており、同一のマウスで経時変化を見ることはできなかった。本研究では新たにABC現象をリアルタイムで評価する方法を確立する。生体リアルタイム蛍光共焦点顕微鏡 (Intravital Real-time Confocal Laser Scanning Microscopy: IVRTCLSM) は小動物での様々な生理機能や薬物代謝のリアルタイムで観察できる^{4,5}。耳介血管を非侵襲的に観察することにより、1匹のマウスで経時的に評価する事ができるため、ABC現象の画期的な分析手法として応用出来ると考えた。生きたままの動物を組織・細胞レベルの空間解像度で経時観察する事によって、従来のex vivoでは決して見ることが出来ないダイナミックな現象を捉えることが可能となる。

(2) ABC現象とナノキャリアの組成や構造との関係の解明とABC現象を回避するシステムの設計

(1)で確立した評価方法を用いて既に臨床応用が進んでいるナノキャリア(抗癌剤内包ミセル)あるいは現在当研究室で開発中のナノキャリアなどを網羅的に用いABC現象に誘起されるナノキャリアの動態の変化を解明すると同時にABC現象を誘起するナノキャリアの構造や性質に関するライブラリを作成する。ライブラリに基づいてABC現象の回避策を構築し次世代高分子ミセルの設計指針を決定する。

3. 研究の方法

(1)リアルタイムでのABC現象の評価

耳介血管から非侵襲的にナノキャリアの血中滞留性の評価を行う。IgM抗体が十分に血中に存在する場合は、ナノキャリアと結合・架橋することにより凝集体形成が起こると考えられる。PEG修飾されていないカチオン性遺伝子キャリアを用いた血中凝集体形成の評価については既に報告済みである⁵。また、ABC現象により捕捉されたナノキャリ

アはクッパー細胞に貪食され肝臓に蓄積することが電子顕微鏡により判明している⁶。ナノキャリアがクッパー細胞に取り込まれる様子をリアルタイムで捉えることが出来れば、血中での凝集が明確でなくても、肝臓への蓄積を見ることにより ABC 現象を評価できる。さらに、ナノキャリアが分解されて生じた低分子の代謝物は腎排泄されることが知られている。IVRTCLSM では糸球体濾過を受けた代謝物が尿細管に進む様子を観察することが出来る⁴。ABC 現象の有無によるナノキャリア分解物の腎排泄の影響を詳細に検討する。

(2)ABC 現象に関するライブラリの構築と ABC 現象を回避するキャリア設計

既存の報告ではリポソームにおいて PEG の表面密度、ミセルにおいて粒径や親-疎水性などの構造の違いにより ABC 現象の起こりやすさが変わることが知られている^{6,7}。ここでは、当研究室で開発した幅広い各種高分子ナノキャリアに対して(1)で構築した評価方法を用いて、ABC 現象を回避する構造、投与方法について検討する。また抗凝固薬の併用などその他の回避手段も同時に検討する。

4. 研究成果

(1)ABC 現象の評価手法の確立

血中滞留時間減少の評価方法として耳介血管から非侵襲的に観察し、同一マウスで、初回投与時および 2 回目以降の投与時の血中滞留性の評価を可能にした。*in vitro*では ABC 現象により産生された IgM 抗体は PEG 修飾キャリアに吸着するということが報告されている³が、IVRTCLSM によりリアルタイムに血中で凝集体形成観察が可能になった。また ABC 現象により捕捉されたナノキャリアがクッパー細胞に貪食され肝臓に蓄積する様子をリアルタイムで評価した。これらの手法は PEG-リポソームおよび当研究室で開発している各種高分子ミセルに用いることがで

き、IVRTCLSM が ABC 現象の評価手段として有効であることが示された。

腎臓や肝臓における代謝の評価手段として FRET (fluorescence resonance energy transfer) の手法を取り入れた。アンチセンス鎖の両端にペアで FRET を誘起する蛍光色素をもった siRNA はインタクトな状態では FRET を起こし分解されると FRET が解除されるという仕組みをもつ。このナノキャリアを用いて IVRTCLSM により血中や腎臓での siRNA のインタクト性を評価できることを確認した。これにより ABC 現象によるナノキャリアおよび内包薬物の安定性への影響や代謝の経路を知ることができた。

血中滞留性の良いナノキャリアでは の評価方法を用いると、同じ場所での長時間イメージングが必要となるためフォトブリーチングへの対策が課題となった。フォトブリーチングとは蛍光色素に励起光を当てつづけることにより分子的に不可逆な変化が起こり蛍光を失う現象であり、集積したキャリアの定量性に問題が生じる。その原因の一つに活性酸素種の影響が知られている。ポリフェノールなどの抗酸化剤を用いたフォトブリーチングの抑制は Hemmateenejad らにより行われており⁸、今回は *in vivo* に応用した。その結果、N-アセチルシステインやビタミン E 誘導体を事前投与することにより、フォトブリーチングを抑えることができた。

(2)ABC 現象の回避

ABC 現象は脾臓 B 細胞、肝臓のクッパー細胞が関与していることが知られているので、脾臓、肝臓の貪食細胞を一時的に除去するクロドロネートリポソームの事前投与により、ナノキャリアを投与する前に一時的に細網内皮系を抑制して、ABC 現象を回避することを試みた。その結果、クロドロネート処理がナノキャリアの初回投与時、2 回目投与時の

いずれにおいても肝臓へのナノキャリアの集積性が著しく落ちた(Fig.1)。さらにキャリアのサイズや初回投与量の検討を行った。キャリアの構造についても架橋率の違いやリガンドの有無などによる影響を IVRTCLSM や IgM 抗体量の測定によって検討した。その結果、初回投与時と異なる架橋率のナノキャリアも用いることにより ABC 現象が緩和・回避できることがわかった(Fig.2)。

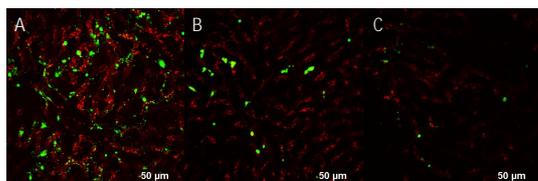


Figure 1 クロドネートリポソームの事前投与によるナノキャリアの肝臓集積性の変化 (A) 事前投与なし、(B) ナノキャリア初回投与前投与、(C) ナノキャリア2回目投与前投与 緑(microbeads, 貪食細胞)、赤(PEG修飾ナノキャリア)

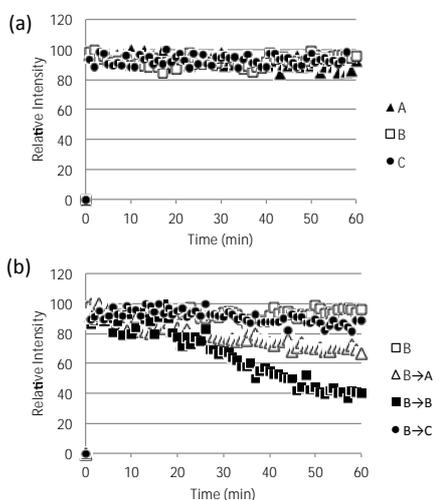


Figure 2 架橋率の違いによるABC現象の変化 (a) PEG修飾ナノキャリアA,B,C(架橋率:A<B<C)の血中滞留性、(b) Bを投与し、2回目に架橋率の異なるPEG修飾ナノキャリアを投与した時の血中滞留性。 B→A:2回目にAを投与、B→B:2回目にBを投与、B→C:2回目にCを投与

<引用文献>

Dams E, et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 292 (2000) 1071-1079.
 Ishida T, et al., J. Control. Release 105 (2001) 305-317.
 Ishida T, et al., J. Control. Release 112 (2006) 15-25.
 Matsumoto Y, et al., Biomed. Opt. Express 1 (2010) 1209-1216.
 Nomoto T, et al., J. Control. Release 151 (2011) 104-109.
 Ishida T, et al., J. Control. Release

105 (2005) 305-317.

Koide H, et al., Int. J. Pharm. 362 (2008) 197-200.

Hemmateenejad B, et al., Analyst, 137 (2012) 4029-4036.

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計3件)

Intravital confocal microscopy assay for the evaluation of antioxidant capacity. Matsumoto Y, Toh K, Kataoka K and Yamasoba T, 37th ARO MidWinter Meeting, 2014.2.22-26, San Diego, California, USA.

生体内顕微鏡下における Förster Resonance Energy Transfer を利用した血中 siRNA 安定性の定量的評価 藤加珠子, 野本 貴大, 松本 有, 渡邊 秀美代, 福島 重人, 茶谷 洋行, Christie R. James, 宮田 完二郎, 西山 伸宏, 片岡 一則 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 2013年11月25-26日 タワーホール船堀 (東京、江戸川区)

Intravital Monitoring of Intact siRNA Using Fluorescence Resonance Energy Transfer. Toh K, Nomoto T, Matsumoto Y, Watanabe S, Fukushima S, Chaya H, Christie R. James, Miyata K, Nishiyama N, Kataoka K. 40th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society 2013.7.21-24 Honolulu, Hawaii, U. S. A.

[雑誌論文] (計5件)

Multicompartment Micelles with Adjustable Poly(Ethylene Glycol) Shell for Efficient in Vivo Photodynamic Therapy, Synatschke CV, Nomoto T, Cabral H, Fortsch M, Toh K, Matsumoto Y, Miyazaki K, Hanisch A,

Schacher FH, Kishimura A, Nishiyama N, Muller AH, Kataoka K, ACS Nano, 査読有, 8, 1161-72, 2014

Multifunctional Polyion Complex Micelle Featuring Enhanced Stability, Targetability, and Endosome Escapability for Systemic siRNA Delivery to Subcutaneous Model of Lung Cancer, Kim HJ, Ishii T, Zheng M, Watanabe S, Toh K, Matsumoto Y, Nishiyama N, Miyata K, Kataoka K, Drug Delivery and Translational Research, 査読有, 4, 50-60, 2014. DOI 10.1007/s13346-013-0175-6

Targeted Gene Delivery by Polyplex Micelles with Crowded Peg Palisade and Crgd Moiety for Systemic Treatment of Pancreatic Tumors, Ge Z, Chen Q, Osada K, Liu X, Tockary TA, Uchida S, Dirisala A, Ishii T, Nomoto T, Toh K, Matsumoto Y, Oba M, Kano MR, Itaka K, Kataoka K, Biomaterials, 査読有, 35, 3416-26, 2014. DOI 10.1016/j.biomaterials.2013.12.086

Tethered Peg Crowdedness Determining Shape and Blood Circulation Profile of Polyplex Micelle Gene Carriers, Tockary TA, Osada K, Chen Q, Machitani K, Dirisala A, Uchida S, Nomoto T, Toh K, Matsumoto Y, Itaka K, Nitta K, Nagayama K, Kataoka K, Macromolecules, 査読有, 46, 6585-6592, 2013. DOI 10.1021/ma401093z

リアルタイム生体内共焦点レーザー顕微鏡を用いた Drug Delivery Systems(DDS)の動態評価法, 野本貴大, 松本有, 藤加珠子, Christie RJ, 宮田完二郎, 大庭誠, Cabral H, 村上真美, 福島重人, 西山伸宏, 片岡一則, 薬学雑誌, 査読有, 132, 1347-54, 2012.

<http://dx.doi.org/10.1248/yakushi.12-00234-1>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

藤 加珠子 (TOH, Kazuko)
東京大学・大学院医学系研究科・研究員
研究者番号 : 90342732