

84. 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

石田 竜弘

徳島大学 大学院医歯薬学研究部 薬物動態制御学分野

Key words : 核酸医薬, DDS, リポソーム, 自然免疫, anti-PEG IgM

緒 言

核酸は新規医薬品として期待されているが、その実現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きたが、その多く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、生体にとって異物である核酸・キャリア複合体の免疫原性に関する検討が行われてこなかったため、想定外のアレルギー反応や体内動態変化が生じたためである。我々はこれまで、核酸の送達体としても注目されているポリエチレングリコール (PEG) 表面修飾ナノキャリアを繰り返し投与した際に、初回投与した PEG 修飾ナノキャリアが脾臓辺縁帯の B 細胞を選択的に刺激し、PEG に対する抗体 (anti-PEG IgM) を分泌させ、この抗体が次に投与された同じリポソームに結合し、補体系の活性化を介して肝臓での取り込みを亢進させ、その血中滞留性を減ずることを見出し、accelerated blood clearance (ABC) 現象と名付け報告してきた¹⁾。核酸は Toll-like receptor (TLR) を介して自然免疫系を活性化することが知られており、上記のような PEG 修飾キャリアに対する免疫反応を亢進させることが想定されるが、その詳細は明らかではない。そこで本研究では、核酸送達デバイスとしてのキャリア開発において真に重要となる全身投与後の自然免疫システムによる認識機構を検討することを目的として実験を行った。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得たので報告する。

方法、結果および考察

1. Anti-PEG IgM 誘導への Toll-like receptor (TLR) の寄与

核酸の全身投与を目指したキャリア開発にポリエチレングリコール (PEG) 修飾ナノキャリアが汎用されている。外来性の核酸は 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ことが知られている。しかし、核酸含有 PEG 修飾ナノキャリア投与時の anti-PEG IgM 誘導における TLR の寄与は明らかではなかった。そこで、TLR 7 あるいは TLR 9 を欠損したマウス (knockout mouse) に siRNA あるいは pDNA を含有した PEG 修飾ナノキャリアを投与し、投与後の anti-PEG IgM の分泌を ELISA によって評価した。その結果、siRNA 含有 PEG 修飾ナノキャリアによる anti-PEG IgM の分泌誘導が TLR 7 欠損マウスで顕著に抑制されたことから、TLR 7 刺激を介して誘導されていることが明らかとなった (図 1A) ²⁾。一方、pDNA 含有 PEG 修飾ナノキャリアによる anti-PEG IgM の分泌誘導が TLR 9 欠損マウスで顕著に抑制されたことから、TLR 9 刺激を介して誘導されることが明らかとなった (図 1B) ³⁾。TLR 9 を pDNA が刺激し、炎症性サイトカインなどの分泌を誘導することは以前から知られているが、double strand である siRNA が TLR 7 を刺激する経路は知られていなかった。siRNA は single strand RNA をその相補的な配列を利用して結合させて double strand を形成させている。その結合は可逆的であることから、エンドサイトーシスなどでナノキャリアと細胞内に取り込まれた後、細胞内環境の変化により double strand から single strand に変化し、結果 TLR 9 を刺激したものと考えられた。

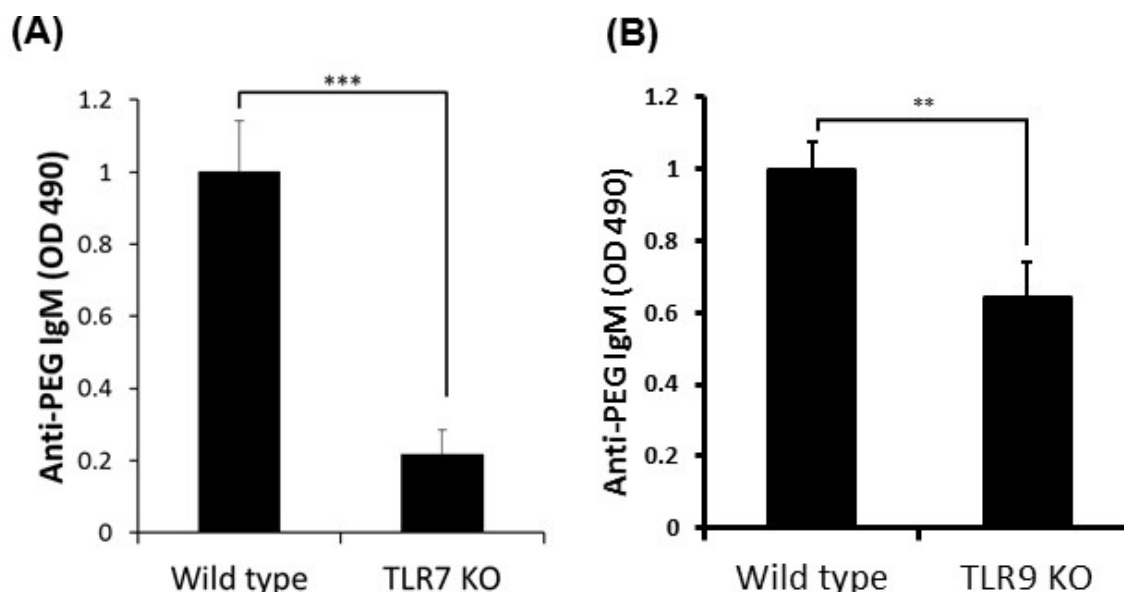


図1. TLR 欠損マウスにおける核酸含有 PEG 修飾ナノキャリアに対する anti-PEG IgM 誘導
 (A) TLR 7 欠損マウスに siRNA 含有 PEG 修飾ナノキャリアを投与した際の anti-PEG IgM 分泌誘導を検討した。(B) TLR 9 欠損マウスに siRNA 含有 PEG 修飾ナノキャリアを投与した際の anti-PEG IgM 分泌誘導を検討した。A two-tailed unpaired Student's t test, **p < 0.01, ***p < 0.005.

2. ヒトにおける抗 PEG 抗体保有率の調査

PEG による修飾は、タンパクやナノキャリアの血中滞留性を向上させる有用な手段として汎用されており、本邦でも数多くの PEG 化製剤が臨床応用されている。しかし、マウスやラットに PEG 化製剤を投与すると PEG に特異的に結合する IgM (抗 PEG IgM) が誘導され、PEG 化製剤の血中滞留性を著しく低下させることを前述のとおり明らかにしてきた^{1,4)}。一方で、ヒトは長年に渡り PEG を医薬品・食品添加物、化粧品として摂取・塗布しており、自然抗体として anti-PEG IgM を保有している可能性がある。そこで、ヒトにおける抗 PEG 抗体保有率に関する調査を行った。厚生労働省が策定する献血血液の研究開発等での使用に関する指針に基づいて申請を行い、日本赤十字社より献血血液の一部をサンプルとして受領した。ヒト血清中の anti-PEG IgM 量の測定には ELISA 法を用い、PEG 修飾ナノキャリアの構成成分である methoxyPEG2000-DSPE に結合する IgM 量を測定することで評価した。200 例の血清中の抗 PEG IgM 量を測定したところ、17 例の anti-PEG IgM 陽性者がいることが分かった (図 2)。一方、anti-PEG IgG 陽性者はみられなかった。また血液型の違いによる anti-PEG IgM 保持率の差異は認められなかった。以上の結果より、anti-PEG IgM 保持者がヒトにおいて一定の割合で存在しており、このようなヒトに PEG 化製剤を投与する場合は、アレルギー反応や製剤の体内動態の変化に注意を払う必要があることが示唆された。

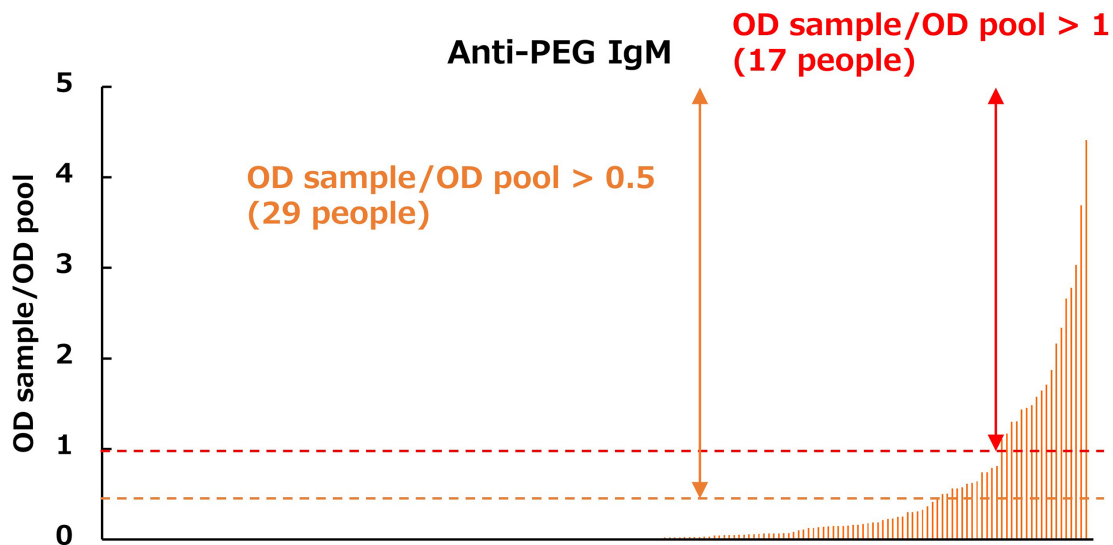


図2. 日本赤十字社提供献血血液中の anti-PEG IgM 保持者

日本赤十字社より献血血液 200 検体の供与を受け、ヒト血清中の anti-PEG IgM を ELISA 法により評価した。

3. 市販化粧品塗布による抗 PEG 抗体産生評価

前項において健常ヒト血清中に anti-PEG IgM が見られることが明らかとなった。これらの被験者が anti-PEG IgM を保有するに至った原因は明らかではないが、PEG は医薬品や食品の添加物に用いられているだけでなく、化粧品などに多く含まれており、このような日常的な PEG への曝露が anti-PEG IgM 獲得の理由ではないかと考えた。本仮説を検証するため、PEG 含有化粧品をラットに塗布した際に anti-PEG IgM が誘導されるか検討した。その結果、市販の 3 種類の化粧品（化粧水、日焼け止め、シャンプー）をそれぞれ塗布したラットでは、いずれの群においても anti-PEG IgM の産生が認められ、特に化粧水を塗布したラットにおいて、他の群と比較して有意に高い anti-PEG IgM の誘導が観察された（図 3）。本検討で比較した製品の中で化粧水が最も皮膚への浸透性が高いものと考えられた。したがって、製品内に含有されている PEG が角質層のバリアを突破し、皮膚内に移行したため anti-PEG IgM の誘導が生じた可能性が考えられた。

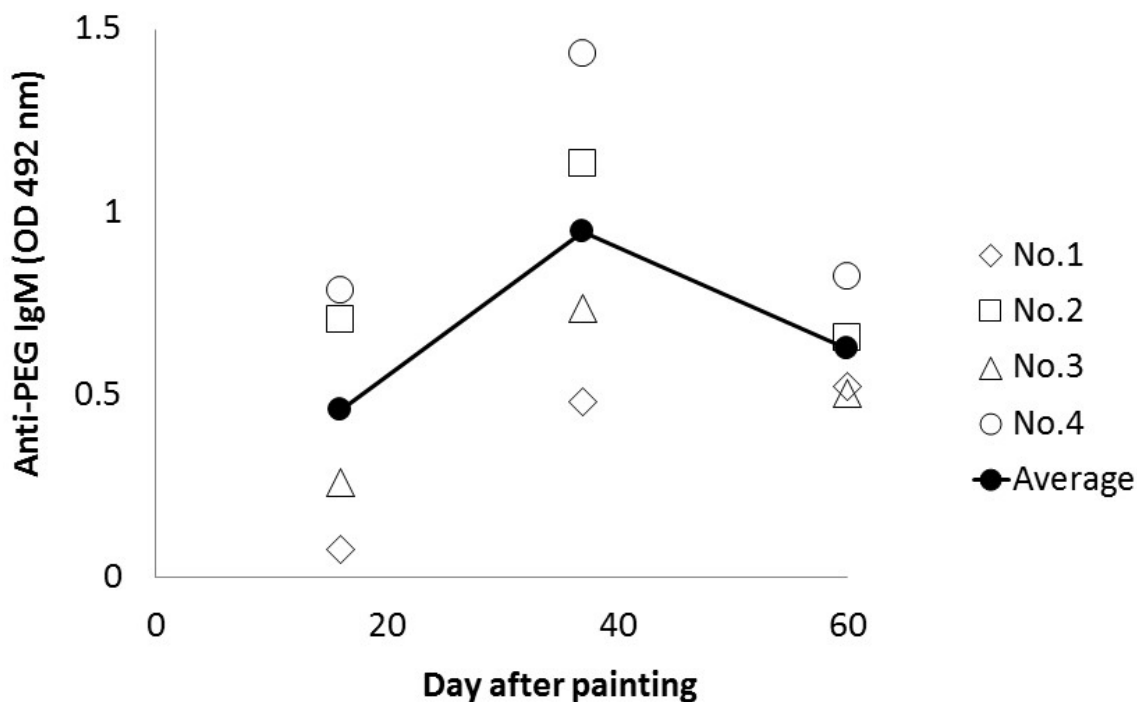


図 3. PEG 含有化粧品塗付による anti-PEG IgM の誘導

市販の化粧品をヘアレスラットの腹部に 1 日 1 回塗布した。塗布開始後、16、37、60 日後に血清を採取し、血清中の anti-PEG IgM を ELISA により測定した。

共同研究者

本研究の共同研究者は、徳島大学大学院医歯薬学研究部教授の南川典昭、特任助教の清水太郎である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Abu Lila AS, Kiwada H, Ishida T. The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: clinical challenge and approaches to manage. J Control Release. 2013;172(1):38-47. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.07.026. Epub 2013 Aug 7. Review. PubMed PMID: 23933235
- 2) Hashimoto Y, Abu Lila AS, 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. 2014;184:1-8. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.04.003. PubMed PMID: 24727075
- 3) Hashimoto Y, Uehara Y, Abu Lila AS, Ishida T, Kiwada H. Activation of TLR9 by incorporated pDNA within PEG-coated lipoplex enhances anti-PEG IgM production. Gene Ther. 2014;21(6):593-8. doi: 10.1038/gt.2014.32. PubMed PMID: 24694537
- 4) Mima Y, Abu Lila AS, Shimizu T, Ukawa M, Ando H, Kurata Y, Ishida T. Ganglioside inserted into PEGylated liposome attenuates anti-PEG immunity. J Control Release. 2017;250:20-26. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.01.040. PubMed PMID: 28179196