

PEG 修飾ナノ粒子製剤に対する
免疫応答と動物種差に関する研究

2020

鈴木卓也

目次

略語表.....	1
第1章 序論.....	3
第2章 Doxil®投与時の抗 PEG IgM 産生量と体内動態変化の動物種差に関する検討	
第1節 緒言.....	10
第2節 実験方法.....	11
第1項 試薬・動物.....	11
第2項 薬物未封入の PEG 修飾リポソームの調製.....	12
第3項 抗 PEG IgM 陽性コントロール血清の作製.....	12
第4項 各動物種への Doxil®の投与および採血.....	12
第5項 血漿中ドキシソルビシン (DXR) の定量.....	14
第6項 薬物動態解析.....	14
第7項 ELISA による血清中抗 PEG IgM の測定.....	14
第8項 統計学的解析.....	15
第3節 結果.....	15
第1項 マウス及びラットにおける Doxil®投与時の抗 PEG IgM 産生と体内動態	15
第2項 イヌにおける Doxil®繰り返し投与時の抗 PEG IgM 産生と体内動態.....	17
第3項 サルにおける Doxil®繰り返し投与時の抗 PEG IgM 産生と体内動態.....	19
第4項 ミニブタにおける Doxil®繰り返し投与時の抗 PEG IgM 産生と体内動態	21
第4節 考察.....	25
第3章 PEG 修飾リポソームの脂質投与量がイヌにおける抗 PEG IgM 産生量と体内動態変化に及ぼす影響の検討	
第1節 緒言.....	28
第2節 実験方法.....	28
第1項 試薬・動物.....	28
第2項 薬物未封入の PEG 修飾リポソームの調製.....	29
第3項 抗 PEG IgM 陽性コントロール血清の作製.....	29
第4項 イヌへの Doxil®および薬物未封入の PEG 修飾リポソーム (プラセボ) の投与および採血.....	29
第5項 血漿中ドキシソルビシン (DXR) の定量.....	30
第6項 薬物動態解析.....	30

第7項	ELISAによる血清中抗PEG IgMの測定.....	30
第8項	統計学的解析.....	30
第3節	結果.....	30
第1項	Doxil®およびプラセボの初回脂質投与量がABC現象に及ぼす影響.....	30
第2項	PEG修飾リポソーム繰り返し投与時の脂質投与量がABC現象に及ぼす影響.....	31
第4節	考察.....	34
第4章	PEG修飾脂質ナノ粒子投与におけるABC現象の誘導性とその抑制方法に関する検討	
第1節	緒言.....	37
第2節	実験方法.....	38
第1項	試薬・動物.....	38
第2項	Lipid nanoparticles (LNP) の調製.....	40
第3項	平均粒子径、siRNA濃度、封入率の測定.....	40
第4項	核磁気共鳴分光法 (NMR spectroscopy) によるPEG脱離速度の測定.....	41
第5項	LNP投与による抗PEG抗体産生の評価.....	42
第6項	Factor VII ノックダウン評価.....	42
第7項	<i>Ex vivo</i> におけるsiRNAの体内分布評価.....	42
第8項	siRNAの肝臓内分布評価.....	43
第9項	統計学的解析.....	43
第3節	結果.....	44
第1項	LNPからのPEG脂質の脱離速度.....	44
第2項	DMG-LNPおよびDSG-LNP単回投与時の抗PEG抗体産生量.....	45
第3項	RNAi活性に対するPEGアシル鎖長の影響.....	46
第4項	初回投与LNPのPEGアシル鎖長が2回目投与LNPの生体内分布に与える影響.....	48
第4節	考察.....	51
第5章	総括.....	55
	引用文献.....	57
	論文目録.....	68
	謝辞.....	69

略語表

ABC	Accelerated blood clearance
ApoE	Apolipoprotein E
AUC	Area under the blood concentration time curve
BSA	Bovine serum albumin
CL	Clearance
DDS	Drug delivery system
DMG	Dimiristoylglycerol
DSG	Distearoyl-rac-glycerol
DSPC	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DSPE	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
DXR	Doxorubicin
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPR	Enhanced permeability and retention
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FSC	Forward scatter
FVII	Factor VII
GFP	Green fluorescent protein
HEPC	Hydrogenated egg phosphatidylcholine
HSPC	Hydrogenated soybean phosphatidylcholine
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
IS	Internal standard
ISO	International organization for standardization
LDLR	Low density lipoprotein Receptor
LNP	Lipid nanoparticles
MFI	Mean fluorescence intensity
MPS	Mononuclear phagocyte system
mRNA	Messenger RNA
MZ	Marginal zone
NMR	Nuclear magnetic resonance

OD	Optical density
PBS	Phosphate buffered saline
PDI	Polydispersity index
PEG	Polyethylene glycol
PK	Pharmacokinetics
PI	Propidium iodide
RNAi	RNA interference
S.D.	Standard deviation
SEM	Standard error of the mean
siRNA	Small interfering RNA
SSC	Side scatter
T _{1/2}	Half-life
TI	T cell independent

第1章 序論

国際標準化機構 (ISO) 規格では、ナノ粒子は 1 nm ~ 100 nm の範囲内にある粒子を指す[1]。一方で、薬物送達システム (DDS) の分野では、様々な材料からなるナノ粒子の医薬品応用が進められており、多くの文献で 100 nm ~ 500 nm の範囲にあるサブミクロン粒子も“ナノ粒子”として扱われている (Figure 1-1) [2-6]。ナノ粒子を医薬品に用いる目的は様々であるが、受動的・能動的に関わらず、大部分が薬物を作用部位に効率的に送達することを目的としている [7-11]。そのため、生体内に投与された後もナノ粒子が意図した機能を保持する必要がある。また、医薬品化を実現する上では、開発したナノ粒子製剤が有害な免疫応答等を引き起こさないことはもちろん、一定の品質を保ちつつ製造可能であり、保存安定性が確保できることが必須である。

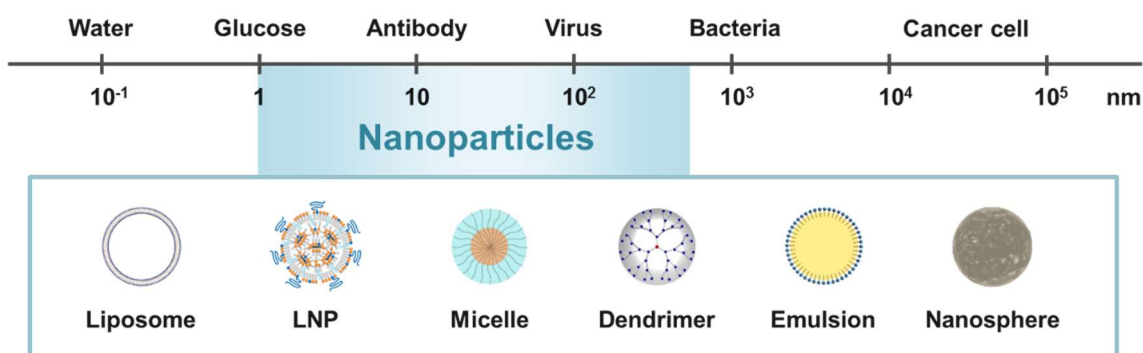


Figure 1-1. Size comparison of nanoparticles with biological materials

ナノ粒子を用いた医薬品開発において、安定性を向上させるためのゴールドスタンダードはポリエチレングリコール (PEG) によるナノ粒子の表面修飾である。PEG 修飾は、ナノ粒子の安定性の向上のみならず、生体内においてその抗原性を減少させることから、リポソーム、核酸内包脂質ナノ粒子 (LNP)、ミセル、エマルジョン、デンドリマー、そしてポリ乳酸等のナノスフェアなど幅広い分野で汎用されている [12-18]。その代表例が、ドキソルビシン (DXR) を封入した PEG 修飾リポソーム製剤である Doxil[®] (FDA 承認 1995 年、本邦承認 2007 年)、そしてトランスサイレンチン (TTR) に対する small interfering RNA (siRNA) を内包した LNP である Onpatro[®] (FDA 承認 2018 年、本邦承認 2019 年)である [19, 20]。

PEG 修飾リポソームの高い血中滞留性は、リポソーム表面の水溶性ポリマーである PEG 分子が形成する水和相と PEG 分子自体の立体障害により、リポソームとオプソニンなどの血清タンパクや単核貪食細胞系 (Mononuclear phagocyte system : MPS) に属する細胞との相互作用が抑制されることが主たる要因であると考えられている [21-24]。PEG 修飾リポソ

ームは、その長期血中滞留性から、正常組織に比べて、血管が未成熟であり血管内皮細胞間の間隙が広いがん組織への集積が向上するという Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果により副作用の軽減と薬効の増強が期待され、現在でも複数の低分子医薬を内封した PEG 修飾リポソームの開発が進められている (Figure 1-2)[25-29]。

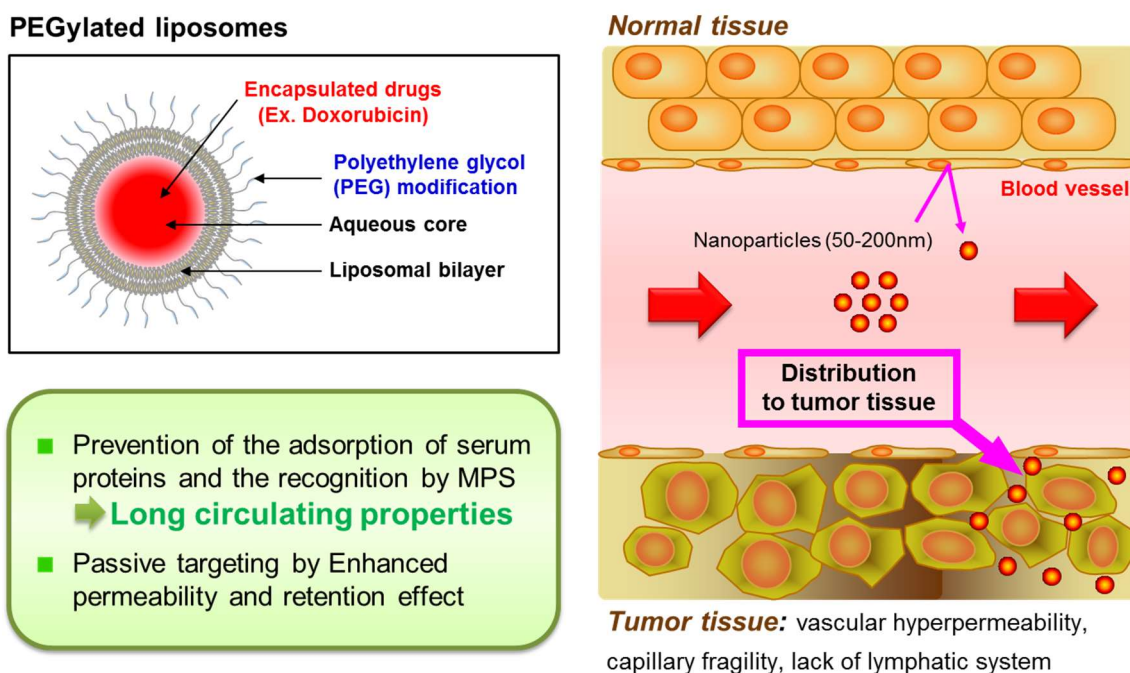


Figure 1-2. Characteristics of PEGylated liposomes

LNP は、近年、低分子医薬および抗体医薬に次ぐ次世代の医薬品として期待が高まっている siRNA や messenger RNA (mRNA) などの核酸医薬のデリバリーに用いられるツールである [30, 31]。これらの核酸医薬は、理論的には全ての疾患原因タンパク質の産生を RNA 干渉 (RNAi) により阻害、もしくは任意のタンパク質を産生・補充することが可能であり、従来の手法ではアプローチが困難と考えられていた標的に対する創薬への道を開いた [32, 33]。しかしながら、siRNA や mRNA を単独で投与した場合、ヌクレアーゼによる分解を受けやすいこと、さらには、低分子医薬と比較して分子量が大きく、かつ連続したホスホジエステル構造に由来する負電荷を有するため、疎水性の細胞膜を透過しにくく、作用部位である細胞質内にほとんど移行しないことが医薬品化の大きな課題であった [34]。このように、当時新たな創薬モダリティとして注目された核酸医薬であったが、その医薬品化には標的細胞内に効率的に核酸を送達可能なデリバリー技術開発が必須であった。本課題の解決のため、様々なデリバリー技術開発が進められ、実用化に至った技術のひとつが、2006 年に Zimmermann らによって報告された 3 級アミンを有するイオン化脂質をベースとした LNP 技術である [35]。LNP は、血中に取り込まれると血中のアポリポタンパク E (ApoE)

が吸着し、肝実質細胞表面上の低比重リポ蛋白（LDL）受容体を介してエンドサイトーシスにより取り込まれる。その後、エンドソーム内の pH 低下に伴い LNP の構成成分であるイオン化脂質が正に帯電し細胞内膜と融合、内包した siRNA や mRNA などの核酸を細胞質に放出する (Figure 1-3) [36-38]。

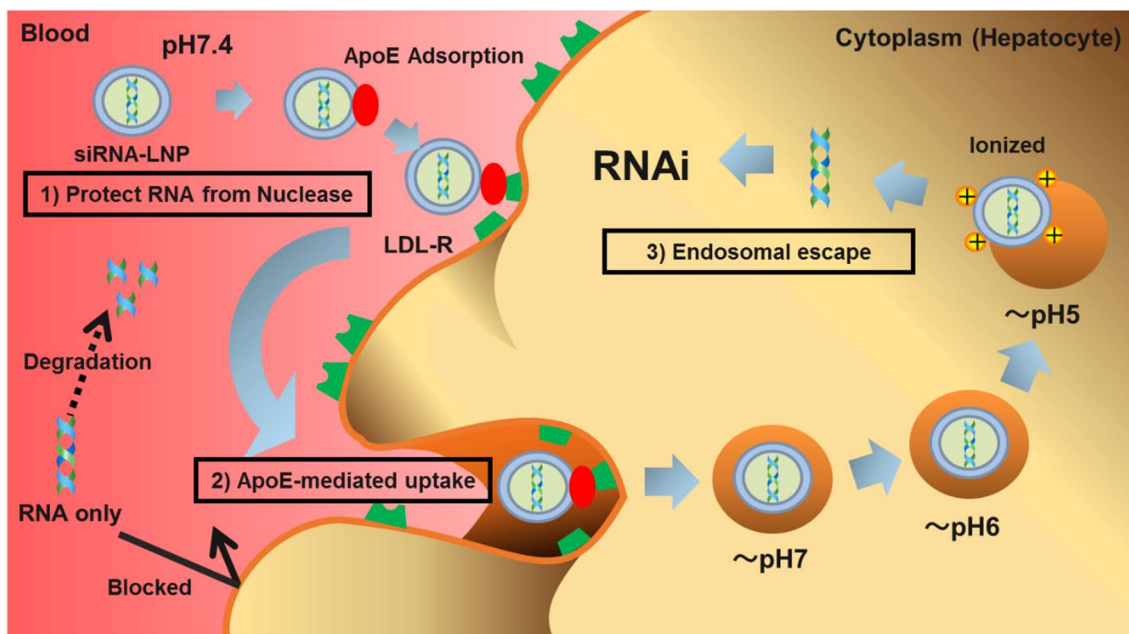


Figure 1-3. Mechanism of LNP delivery to hepatocytes (Ex. siRNA-LNP)

この LNP は、肝実質細胞を標的としており、PEG 修飾リポソームのような長期の血中滞留性による EPR 効果を期待していない。しかしながら、ナノ粒子の形成工程および製剤の保存安定性を確保する上で、粒子の凝集を抑制する PEG 修飾が必要不可欠であることが明らかとなっており、LNP の細胞内取り込みを阻害しない範囲の最低限の PEG が修飾されることが一般的である [39, 40]。また、粒子内部は脂質と核酸で構成された電子密度の高いコアを形成していることが知られており、粒子内部に水相を有するリポソーム製剤とは構造が異なる (Figure 1-4) [41, 42]。

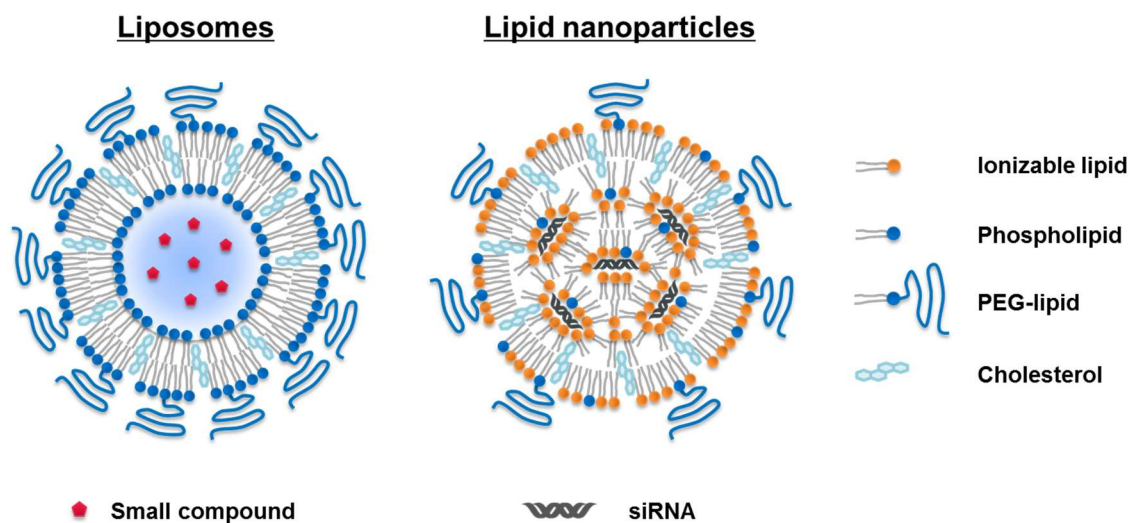


Figure 1-4. Structure image of liposomes and lipid nanoparticles (LNP)

一方、PEGは必ずしもbio-inertではなく、生体への投与条件によっては体内動態の変化を伴う免疫応答（Accelerated blood clearance phenomenon：ABC現象）を引き起こすことが明らかとなっている。ABC現象は、2000年にDamsらによって初めて報告された現象であり、長期の血中滞留性を有するPEG修飾リポソームを数日間隔で繰り返し投与した場合、2回目投与時に従来の高い血中滞留性が損なわれ、PEG修飾リポソームが血中から速やかに消失するというものである（Figure 1-5）[43]。当時、既にPEGは免疫原性や毒性が低いと考えられており、リポソーム製剤のみならず、タンパク製剤などの医薬品から化粧品、そして食品にまで応用されていたことから、このようにPEGに対する免疫応答が起こるといふ報告は非常に大きな衝撃を業界に与えた。

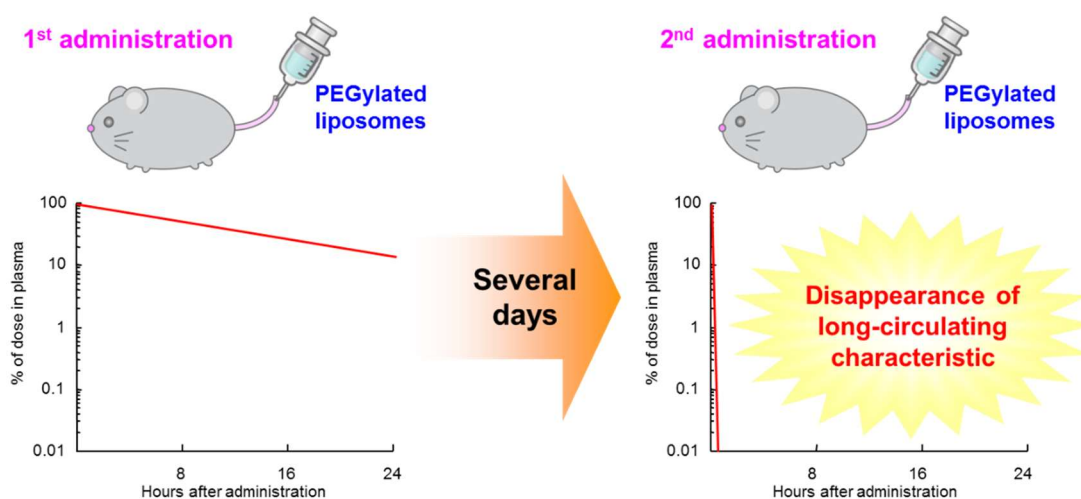


Figure 1-5. Typical image of ABC phenomenon

その後、主として際田および石田らのグループにより本現象の機構解明が進められ、①初回投与した PEG 修飾リポソームが、細菌のポリサッカライドと同じような T 細胞非依存的抗原 (TI-2 抗原) として作用し、数日以内に抗 PEG 抗体 (主として抗 PEG IgM) が産生されること、②この抗 PEG IgM の産生には脾臓辺縁帯 (MZ) の B 細胞 (MZ-B 細胞) が重要な役割を果たしていること、③誘導された抗 PEG 抗体が血中に存在している期間に PEG 修飾リポソームを投与すると PEG 修飾リポソーム表面に抗 PEG 抗体が結合し、補体系の活性化が誘導されること、④最終的に PEG 修飾リポソームが異物として認識され、Kupffer 細胞に取り込まれ血中から速やかに消失することが明らかとなっている (Figure 1-6)[44-52]。

ABC 現象に影響するナノ粒子側の因子としては、(1)抗 PEG 抗体は、PEG 修飾リポソームの脂質の投与量が低いほど誘導されやすく、高投与量では過剰な免疫刺激が原因と考えられる免疫寛容により、抗 PEG 抗体の産生が抑制されること、(2)抗がん剤などの細胞傷害性を有する薬物が内封されている PEG 修飾リポソームの場合、抗 PEG 抗体の産生は確認されず、これが MZ-B 細胞などの免疫関連細胞の傷害によると考えられること、(3)免疫賦活能を有する核酸を内包したりポソームなどの場合、核酸を内包しない場合と比較して、比較的高投与量においても抗 PEG 抗体の産生を伴う ABC 現象が確認されること、が明らかとなっている[53-58]。

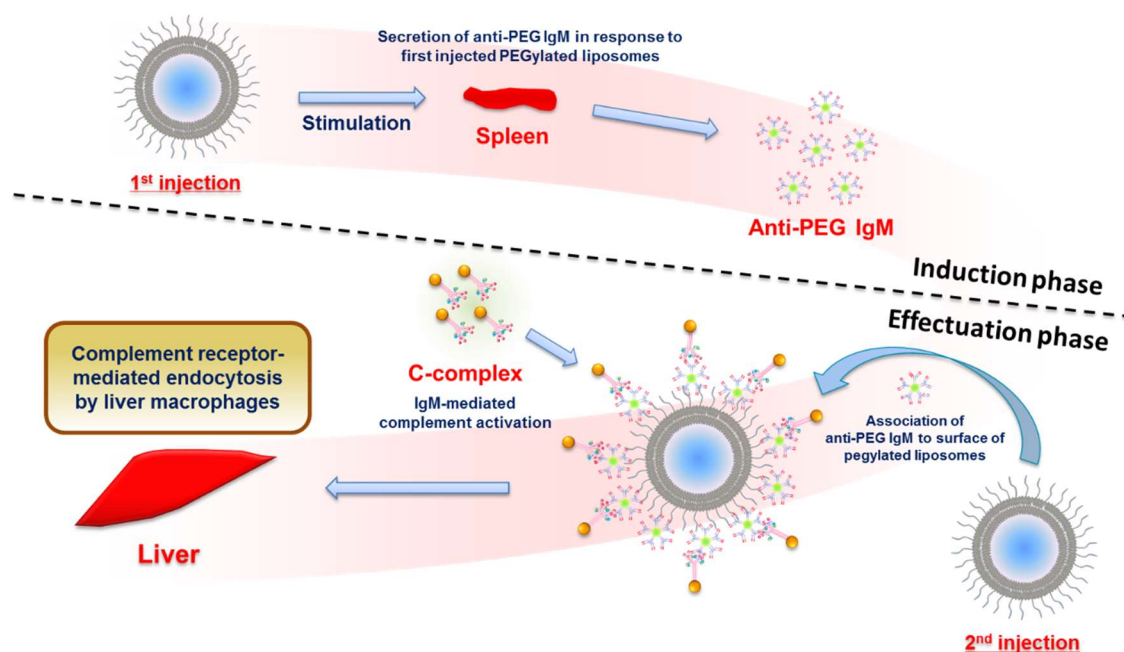


Figure 1-6. Suggested mechanism of ABC phenomenon

当時、ABC 現象に関する研究の多くは、主として PEG 修飾リポソームを用いたものであった。しかしながら、PEG に対する免疫応答への関心が高まるにつれて、ナノ粒子であるか否かに関わらず、様々な PEG 修飾体に関して同様の研究が複数の研究機関で開始された。その結果、今日までにミセル、アデノウイルス、タンパク、アプタマー、エマルジョン、ポリ乳酸等のナノスフェア、そして近年では LNP においても ABC 現象が誘導されることが明らかとなっている[59-65]。PEG 修飾ナノ粒子に限らず、投与された医薬品に対する抗体が産生された場合、医薬品が本来の効果を発揮しないだけでなく、意図しない副作用が生じる可能性がある。実際、PEG 修飾タンパク製剤である PEG 修飾アスパラギナーゼ (Pegaspargase) や PEG 修飾ウリカーゼ (Pegloticase) では、ヒトで抗 PEG 抗体が誘導されること、さらに抗 PEG 抗体が陽性の場合には、製剤の血中滞留性の低下とそれに伴う治療効果の減弱が確認されている[66-68]。また、PEG 修飾医薬品の投与によって誘導された抗 PEG 抗体ではなく、治療歴とは関係なくヒトが有している既存の抗 PEG 抗体 (Pre-existing anti-PEG antibody) が課題となる事例も報告され始めている。Pegnivacogin は、冠動脈疾患治療薬として開発されていた PEG 修飾アプタマーであるが、その臨床試験においてアナフィラキシー様症状を示す事例が確認され、それが既存の抗 PEG 抗体量と関連があったことが明らかとなっている[69,70]。ただし、本試験においては、同じく高い抗 PEG 抗体が検出された場合においてもアレルギー様症状が確認されなかった事例があることから、抗 PEG 抗体は主要な要因ではあるが、それだけでアレルギー様症状が誘導されるわけではなく、複数の要因が関係している可能性が示唆されている。

ヒトにおける既存の抗 PEG 抗体の報告は 1980 年代から存在するが、当時 0.2%程度と報告されていた保有率が、近年では最大で 70%程度まで上昇してきている[71-75]。これは PEG が医薬品だけでなく、化粧品から食品まで幅広く応用されてきていることから、PEG に暴露される人口が増えたことで保有率が上昇している可能性が考えられる。このことから、既存の抗 PEG 抗体のヒトにおける保有率は今後も増える可能性があり、新規の PEG 修飾医薬品を開発する際には、医薬品によって誘導される抗 PEG 抗体のみならず、既存の抗 PEG 抗体のモニタリングを行う必要性が高まる可能性がある。

医薬品の開発過程では複数の動物種を用いて薬効・安全性の評価が行われるが、免疫系の構造や機能には動物間の種差があることが報告されている[76]。ABC 現象は、PEG 修飾体と免疫系との相互作用により生じる現象であるため、脾臓 MZ-B 細胞を始めとした免疫細胞による PEG 修飾体の取り込み量、その後産生される抗 PEG 抗体の量と親和性、それに伴う補体の活性化能などが動物種によって異なり、ABC 現象の誘導性が異なる可能性がある。事実として、前述の Pegnivacogin は、ヒトでは重篤なアレルギー様症状が確認されたが、霊長類での評価では、炎症反応、ヒスタミン放出、または補体活性化を引き起こしていない[69]。

また、PEG を新薬開発に用いる場合、多くは原薬または製剤の安定性や体内動態の改善が目的である。PEG 修飾ナノ粒子の開発過程においては、開発中の新薬候補が意図した機

能を有しているかを確認するため、前述の通り、複数の動物種で体内動態の評価が行われる。しかしながら、投与量などの試験条件によっては、または試験に用いる動物種が PEG 修飾ナノ粒子に対する感受性が高い種であった場合には、たとえ抗がん剤などの細胞傷害性の薬物が内封された PEG 修飾ナノ粒子においても抗 PEG 抗体が誘導される可能性がある。加えて、これらの体内動態評価では、休薬期間を設定した上で、同個体の動物で処方の異なる複数の新薬候補を評価することも想定されることから、抗 PEG 抗体が誘導される試験条件で評価を行った場合、2 回目以降に投与した PEG 修飾医薬品候補の性能を正確に評価できず、有力な新薬候補を取り落としてしまう可能性がある。

以上のことから、今後新規の PEG 修飾ナノ粒子医薬品の開発を行うにあたり、複数の動物種において PEG 修飾ナノ粒子投与による抗 PEG 抗体の産生および ABC 現象の誘導の有無はもちろん、既存の抗 PEG 抗体が PEG 修飾ナノ粒子に及ぼす影響を明らかとする意義は非常に大きい。しかしながら、現時点で調査した限りにおいて、PEG 修飾ナノ粒子製剤の代表格である PEG 修飾リポソーム製剤においてすら、その報告の多くはげっ歯類を用いたものであり、特に複数の大動物を含めた ABC 現象の動物種差を系統的な評価により明らかとした報告はなく、種差に関しては未だ不明な点が多い。さらに、ここ数年で実用化段階に入り、今後様々な新薬候補に応用が期待される LNP に至っては、ABC 現象に関する研究がほとんど行われておらず、どのような投与条件や製剤処方で抗 PEG 抗体が誘導されるのか、そして ABC 現象を抑制するための有効な戦略が存在するかなど、検討すべき課題が多数存在する。

そこで本研究では、PEG 修飾リポソームの代表例として Doxil[®]を用い、ABC 現象における動物種差の検討を行うとともに、LNP の ABC 現象の誘導性とその抑制方法について検討した。

第2章 Doxil[®]投与時の抗 PEG IgM 産生量と体内動態変化の動物種差に関する検討

第1節 緒言

ABC 現象は、PEG 修飾リポソームなどの PEG 修飾体がある条件下で投与した際に確認される抗 PEG 抗体産生を伴う血中滞留性の消失現象である。これまでの研究から、本現象は初回脂質投与量が比較的低いほど誘導されやすい傾向にあることがわかっており、抗 PEG 抗体の産生と補体活性化により、肝臓の Kupffer 細胞を始めとするマクロファージへの取り込みが促進されることが特徴である。また、抗がん剤などの細胞傷害性の薬物が内封されている場合には、脾臓の B 細胞を始めとした免疫細胞を傷害することから抗 PEG 抗体の産生が抑制され、ABC 現象が誘導されないとされている。しかしながら、これらの検討は主としてマウスやラットといったげっ歯類での評価であり、医薬品開発時に試験が行われるイヌ、サル、ブタなどの大動物での報告はほとんどない。医薬品の開発過程において、薬効、安全性は複数の投与量で試験をされることが一般的であり、試験に採用される投与量や動物種によっては抗がん剤を内封した PEG 修飾体であっても、ABC 現象が誘導される可能性がある。実際、ABC 現象と並んで研究が進められている PEG 修飾リポソーム投与時の補体活性化を伴う免疫応答の代表例である CARPA (Complement activation-related pseudoallergy: 補体活性化を伴うアレルギー様症状) では、ラットなどのげっ歯類では CARPA の誘導が弱い、イヌやブタでの誘導は強いことが明らかとなっている [77, 78]。CARPA の誘導に種差がある原因は、未だ研究段階であるが、補体の活性化だけでなく、肺血管内マクロファージ (Pulmonary intravascular macrophage: PIM)、肝臓および脾臓内マクロファージの活性化の違いが影響している可能性が考えられる [79]。ABC 現象の誘導においても、補体およびマクロファージの活性化はナノ粒子のクリアランスを促進する重要なファクターであることから、特にイヌやブタにおいては、ABC 現象がより強く誘導される可能性がある [80-82]。また、PEG 修飾リポソームなどの DDS 技術を新薬開発に応用する場合、対象の薬物に応じて様々な処方設計が行われ、当然ながら意図した機能が得られているかを確認するため体内動態評価も行われる。万が一、採用した試験プロトコルが ABC 現象を誘導する条件であった場合、その製剤の機能を正確に評価できず、本来新薬候補となるべき製剤処方を取り落としてしまう可能性がある。しかしながら、前述の通り、特に大動物に関しては、これまで同じ製剤を複数の動物種に暴露し、その抗 PEG 抗体産生や ABC 現象の誘導性を系統的に評価した報告は残念ながらない。今後、様々な PEG 修飾ナノ粒子の開発が進められると考えられることから、PEG 修飾ナノ粒子投与時の抗 PEG 抗体産生量と体内動態変化の動物種差を明らかとすることは、迅速な新薬候補の開発に貢献し得る重要な知見を提供するものと考えられる。そこで、本章では、PEG 修飾ナノ粒子の代表格

であるドキシソルビシン (DXR) 封入 PEG 修飾リポソーム製剤 (Doxil[®]) をモデルとし、げっ歯類だけでなく、イヌ、サルおよびミニブタなどの大動物を含め、ABC 現象の動物種差について系統的な検討を行った。

第2節 実験方法

第1項 試薬・動物

Doxil[®]はヤンセンファーマ (Tokyo, Japan) より購入した。ダウノルビシン塩酸塩およびコレステロール (Cholesterol) は富士フイルム和光純薬 (Tokyo, Japan) より購入した。5% グルコース溶液 (大塚糖液 5%) は大塚製薬 (Tokyo, Japan) より購入した。水素添加卵黄ホスファチジルコリン (HEPC) および 1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-n-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (DSPE-PEG) は日油 (Tokyo, Japan) から提供を受けた。Goat anti-mouse IgM HRP conjugate、goat anti-rat IgM HRP conjugate および goat anti-pig IgM antibody HRP conjugated は Bethyl Laboratories (Montgomery, TX) より購入した。Goat anti-dog IgM HRP conjugate および goat anti-monkey IgM HRP conjugate は LifeSpan BioSciences (Seattle, WA) より購入した。その他の試薬に関しては HPLC 用、特級品 (特級品がない場合は購入可能な範囲で高グレード品) を用いた。

BALB/c マウス (雄、4-5 週齢) は日本チャールス・リバー (Kanagawa, Japan) より購入した。Wistar 系ラット (雄、4-8 週齢) は日本 SLC (Hamamatsu, Japan) または日本チャールス・リバー (Kanagawa, Japan) より購入した。ビーグル系イヌ (雄、8-11 月齢) は北山ラベス (Nagano, Japan) より購入した。カニクイザル (雄、2-3 年齢) はハムリー (Ibaraki, Japan) より購入した。Göttingen 系ミニブタ (雄、4-5 月齢) はエレガード (Ellegaard Göttingen Minipigs A/S, Dalmose, Denmark) から認定ベンダーであるオリエンタル酵母 (Tokyo, Japan) を通して購入した。マウスおよびラットは水および飼料を自由摂取とした。イヌは水を自由摂取とし、飼料は TC-1 (オリエンタル酵母工業) を 250 g (1 回/日) とした。サルは水を自由摂取とし、飼料は PS (オリエンタル酵母工業) を 120 g (60 g × 2 回/日)、バナナ (半量/日) とした。ミニブタは水を自由摂取とし、飼料は NS (日生研株式会社) を 400 g (1 回/日) とした。動物実験はエーザイ株式会社、徳島大学の動物実験委員会の承認の下で実施した。

第2項 薬物未封入の PEG 修飾リポソームの調製

PEG 修飾リポソームの脂質組成は、HEPC/Cholesterol/DSPE-PEG = 1.85/1/0.15 (モル比) とした。リポソームの調製は、Bangham 法に従い実施した。まず、上記の脂質組成になるように脂質をクロロホルムで溶解させた。その後、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下でクロロホルムを除去し、脂質薄膜を形成させた。次に、HEPES buffered saline (25 mM HEPES、140 mM NaCl、pH 7.4) を添加し、加熱振とうにより脂質を水和させて粗リポソームを調製した。得られた粗リポソームはエクストルーダーを用いて、ポリカーボネートフィルター (400, 200, 100, 80 nm, Nucleopore Corp., Pleasanton, CA) を通過させることで、約 100 nm の粒子径を有するリポソームを得た。調製したリポソームの粒子径を動的光散乱法 [NICOMP370HPL submicron particle analyzer (Particle Sizing Systems, Santa Barbara, CA)] により測定した。この際の平均粒子径は、107.1 nm (PdI: 0.029) であった。また、調製したリポソーム溶液のリン脂質濃度を Colorimetric assay により測定した[83]。

第3項 抗 PEG IgM 陽性コントロール血清の作製

調製した PEG 修飾リポソーム (0.001 μmol phospholipids/kg) をラットに静脈内投与した。投与 5 日後に血清分離用チューブ (栄研, Tokyo, Japan) に採血を実施し、30 分室温で静置後、15 分間遠心 (4°C、1509 \times g) することで血清を得た。得られた血清は、試験に使用するまで冷凍保管した。

第4項 各動物種への Doxil®の投与および採血

本項の実験では、血液はヘパリン処理済みのシリンジおよびチューブ、血液採血用チューブ [キャピジェクト; CJ-AS, CJ-HL (テルモ, Tokyo, Japan)] または真空採血管 [ベノジェクト II; VP-AS054 K (テルモ, Tokyo, Japan)] のいずれかを用いて採取し、血漿および血清を得た。血漿および血清は、試験に使用するまで冷凍保管した。また、Doxil®の希釈には、大塚糖液 5%を用いた。Doxil®の投与レジメンの詳細は Table 2-1 に示す。投与は、Doxil®のエイズ関連カポジ肉腫の推奨投与量である 20 mg DXR/m² を基準に 0.2, 2, 20 mg DXR/m² の 3 用量を設定した[84-86]。

1. マウスにおける試験

Doxil®を 0.2, 2, 20 DXR mg/m² (0.066, 0.66, 6.6 mg DXR/kg) となるように、1 週間間隔で 2 回尾静脈内に急速投与した。各 Doxil®用量の体内動態を評価するため、投与前、5 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、および 24 時間において、全採血により血液を採取し、血漿を得た。また、抗 PEG IgM を測定するため、初回投与 5 日後に全採血により血液を採取

し、血清を得た。

2. ラットにおける試験

ラット 9 匹を 3 グループに分け、Doxil[®]を 0.2, 2, 20 DXR mg/m² (0.0333, 0.333, 3.33 mg DXR/kg)となるように、1 週間間隔で 2 回尾静脈内に急速投与した。各 Doxil[®]用量の体内動態を評価するため、投与前、5 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、および 24 時間において、経時的に血液を採取し、血漿を得た。また、抗 PEG IgM を測定するため、初回投与 5 日後に血液を採取し、血清を得た。

3. イヌにおける試験

イヌ 9 頭を 3 グループに分け、Doxil[®]を 0.2, 2, 20 DXR mg/m² (0.01, 0.1, 1 mg DXR/kg)となるように、3 週間間隔で 3 回静脈内に持続投与した。その際、全ての投与量において、投与溶液量を 1 mL/kg、投与時間を 1 時間とした。各 Doxil[®]用量の体内動態および抗 PEG IgM を評価するため、投与前、投与後 5、30 分、1、2、4、8、24、48、72、96、120、216、336 および 456 時間において、経時的に橈側皮静脈より血液を採取し、血漿および血清を得た (3 回目投与に関しては、投与後 120 時間までで評価を終了とした。)

4. サルにおける試験

サル 9 頭を 3 グループに分け、Doxil[®]を 0.2, 2, 20 DXR mg/m² (0.016, 0.16, 1.6 mg DXR/kg)となるように、3 週間間隔で 3 回静脈内に持続投与した。その際、全ての投与量において、投与溶液量を 1 mL/kg、投与時間を 1 時間とした。各 Doxil[®]用量の体内動態および抗 PEG IgM を評価するため、投与前、投与後 5、30 分、1、2、4、8、24、48、72、96、120、216、336 および 456 時間において、経時的に橈側皮静脈、伏在静脈、または大腿静脈より血液を採取し、血漿および血清を得た (3 回目投与に関しては、投与後 120 時間までで評価を終了とした。)

5. ミニブタにおける試験

ミニブタ 6 頭を 2 グループに分け、Doxil[®]を 2, 20 DXR mg/m² (0.056, 0.56 mg DXR/kg)となるように、3 週間間隔で 2 回静脈内に持続投与した。その際、全ての投与量において、投与溶液量を 1 mL/kg、投与時間を 1 時間とし、前大静脈洞に挿入した投与用カテーテルより投与した。各 Doxil[®]用量の体内動態および抗 PEG IgM を評価するため、投与前、投与後 5、30 分、1、2、4、8、24、48、72、96、120、216、336 および 456 時間において、経時的に採血を行った。血漿用の血液は、大腿動脈より挿入したカニューレから採取した。血清用の血液は、前大静脈洞から真空採血管 [Venoject II VP-AS054 K (テルモ, Tokyo, Japan)]を用い採取した。その際、血清に関しては、24 時間未満のサンプリングポイントは、投与前のみとした。

第5項 血漿中ドキシソルピシン (DXR) の定量

DXR は、リポソーム内封 DXR およびフリー-DXR の総量として定量した。典型的な前処理方法を以下に示す。初めに、5 μ L のダウノルピシン溶解液 (100 μ g/mL) を内部標準 (IS) として 50 μ L の血漿に添加した。次に、150 μ L のアセトニトリル/メタノール (1/1, v/v) を添加し、ボルテックスにより混合した。その後、本サンプル混合液を遠心 (19,160 \times g, 10 min, 4°C) し、上澄みサンリングすることで、血漿タンパク除去した。サンプリングした上澄み中の DXR は、逆相 HPLC を用いて定量した。DXR の検出限界は 0.01-0.025 μ g DXR/mL であった。典型的な HPLC の分析条件を以下に示す。

カラム	Kinetex 2.6 μ m C18 100A (75 \times 3.0 mm i.d., Phenomenex Inc., Torrance, CA)
移動相 A	Acetonitrile/water (1/9, v/v) containing ammonium acetate (10 mM)
移動相 B	Acetonitrile/water (9:1, v/v) containing ammonium acetate (10 mM)
送液速度	0.4 mL/min
カラム温度	50°C
グラジエント B	(0–3 min, 20–40%) \rightarrow (3–5 min, 40–100%) \rightarrow (5–6 min, 100%)
インジェクション	15 μ L
検出器	蛍光 (Excitation; 470 nm, Emission; 550 nm)

第6項 薬物動態解析

血漿中総 DXR の各種薬物動態 (PK) パラメーター [半減期 ($T_{1/2}$)、血中濃度–時間曲線下面積 (AUC) およびクリアランス (CL)] は、Phoenix WinNonlin version 6.1 (Pharsight Corp., Cary, NC) を用い、ノンコンパートメントモデル解析により求めた。

第7項 ELISA による血清中抗 PEG IgM の測定

血清の抗 PEG IgM の ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) による典型的な測定法を以下に示す。初めに、96 ウェルプレートにエタノールを用い調製した 0.2 mM DSPE-PEG 溶液を 50 μ L/well (10 nmol/well) 添加し、インキュベーションした後、Blocking buffer [50 mM Tris, 0.14 mM NaCl pH 8.0) containing 1 % BSA] を 300 μ L/well 添加し、1 時間インキュベーションした。次に、Washing buffer [Tris-buffed saline (pH 8.0) containing 0.05 % Tween 20] で 3 回洗浄した。その後、Sample buffer [Tris-buffed saline (pH 8.0) containing 1 % BSA and 0.05 % Tween 20] を用い 100 または 200 倍希釈した血清を 100 μ L/well 添加し、1 時間インキュベーション後に、Washing buffer で 5 回洗浄した。この際、第2章の第3項で取得した抗 PEG IgM 陽性コントロール血清を比較対照として用いた。次に、Sample buffer を用い希釈した後述の各 HRP 標識抗体 (希釈倍率は各メーカーの推奨値を参考に任意に変更) を 100 μ L/well 添加し、1 時間インキュベーション後

に、Washing buffer で5回洗浄した。その後、Enzyme solution (36 mM Anhydrous citric acid, 67 mM Na₂HPO₄, 0.05% Hydrogen peroxide) により 1 mg/mL に調製した *o*-phenylene diamine 溶液を 100 µL/well 添加し、発色反応させた。発色時間は、陽性コントロールであるラット血清が十分に発色するのを目安とし、約 1-10 分後に 2N H₂SO₄ を 100 µL 添加することで、発色反応を停止させた。その後、490 nm における吸光度 (OD) をマイクロプレートリーダー (Sunrise、TECAN Japan、Kanagawa, Japan) を用いて測定した。本試験は、全て室温で実施し、各動物種の抗 PEG 抗体は、陽性コントロールとの比率で算出した。

第 8 項 統計学的解析

全ての値は平均値±標準偏差 (S.D.) で表した。統計学的処理は、GraphPad Prism Software version 5.04 and 6.0 (San Diego, CA)を用い、two-tailed unpaired Student's t-test および one-way or two-way ANOVA により評価した。

第 3 節 結果

第 1 項 マウス及びラットにおける Doxil®投与時の抗 PEG IgM 産生と体内動態

マウスおよびラットなどのげっ歯類に DXR 封入 PEG 修飾リポソームを投与した研究報告は多数存在するが、その多くは DXR 封入 PEG 修飾リポソームを 1 週間間隔、もしくはより短い投与間隔で投与されている [87-89]。従って、本試験では Doxil®を 1 週間間隔で 2 回投与し、抗 PEG IgM の産生とそれに伴う ABC 現象が誘導されるか評価した。投与量は、前述の通り、DXR として、0.2, 2, 20 mg DXR/m²であり、その際のリン脂質の投与量は、マウスでは 0.44, 4.4, 44 µmol phospholipids/kg、ラットでは 0.222, 2.22, 22.2 µmol phospholipids/kg であった。また、抗 PEG IgM に関しては、過去のげっ歯類での報告で高い値を示すことが明らかとなっている初回投与から 5 日後の血清を用いて評価した [46, 90]。

その結果、2 および 20 mg DXR/m²を投与したマウスでは、抗 PEG IgM の産生およびそれに伴う ABC 現象は観察されず (Figure 2-1A および 2-1B)、PK パラメーターにも有意な変化はなかった (Table 2-1)。一方、0.2 mg DXR/m²で試験を行ったマウスでは、2 回目の投与後に抗 PEG IgM の産生に起因すると考えられる ABC 現象が観察され、血漿中 DXR のクリアランス値の増加および半減期と AUC 値の低下が確認された (Figure 2-1A および Table 2-1)。その際、AUC の値は、初回投与時の 18 分の 1 以下であった。さらに、抗 PEG IgM 値は初回投与後 5 日目に有意に増加しており (Figure 2-1B)、これは Figure 2-1A で観察された 2 回目の投与時の薬物動態学変化を反映していた。

マウスでの結果と同様に、ラットにおいても 2 および 20 mg DXR/m²で試験を行った場

合、初回投与と2回目投与時のDXR血漿レベルは同等の推移を示した (Figure 2-2A)。その際、2 mg DXR/m²での半減期、AUC およびクリアランス値に有意な差はなかった。しかしながら、20 mg DXR/m²で試験を行ったマウスでは、2回目投与時のAUCの有意な増加とクリアランスの低下が確認され、半減期に関しても延長する傾向が認められた (Table 2-1)。また、本条件では、抗PEG IgMの産生は確認されなかった (Figure 2-2B)。一方で、0.2 mg DXR/m²で試験を行ったラットでは、抗PEG IgM産生が確認された。その値を反映し、2回目の投与直後のDoxil[®]は速やかにクリアランスされ、投与後30分で検出限界以下となり、PKパラメーターの算出が不可能であった (Figure 2 および Table 1)。

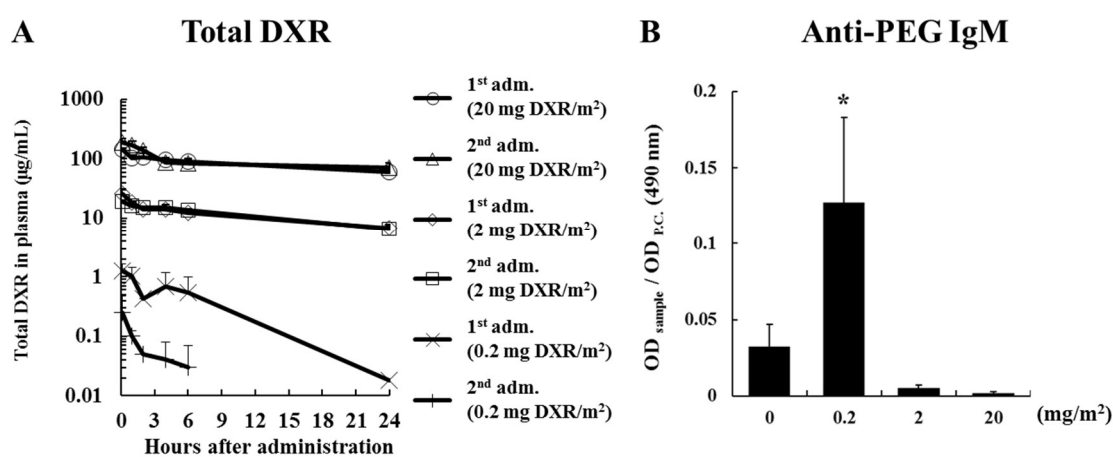


Figure 2-1. Effect of Doxil[®] dose on induction of the ABC phenomenon and anti-PEG IgM production after a single and repeated administrations to mice. (A) Pharmacokinetic profiles of total DXR (free and liposomal DXR). Mice received 2 sequential administrations of Doxil[®] with different doses of either 0.2 mg DXR/m², 2 mg DXR/m² or 20 mg DXR/m² at a 1-week interval. DXR was measured as described in 2-2-4. The values of DXR concentration represent the mean \pm S.D. (n = 3) in most cases. The DXR concentration under the detection limit was replaced by 0. In this case, the S.D. was not calculated. If the DXR concentration was below the detection limit for 2 individual animals simultaneously, the data were omitted. (B) Anti-PEG IgM induction by Doxil[®]. Mice were treated with Doxil[®] using different doses of either 0.2, 2 or 20 mg DXR/m². Serum was collected on Day 5 after administration. Anti-PEG IgM was determined as described in 2-2-6. Anti-PEG IgM titers were expressed as a ratio of the OD of serum sample to the OD of rat serum (positive control, P.C.). Each value represents the mean \pm S.D. (n = 3). *p < 0.05 versus control (0 mg DXR/m²), 2 and 20 mg DXR/m².

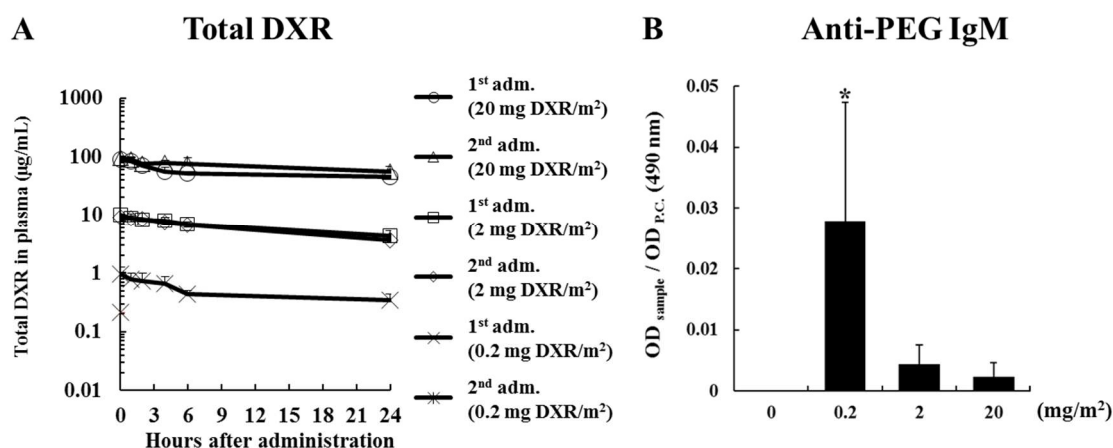


Figure 2-2. Effect of Doxil® dose on induction of the ABC phenomenon and anti-PEG IgM production after a single and repeated administrations to rats. (A) Pharmacokinetic profiles of total DXR (free and liposomal DXR). Rats received 2 sequential administrations of Doxil® with different doses of either 0.2 mg DXR/m², 2 mg DXR/m² or 20 mg DXR/m² at a 1-week interval. DXR was measured as described in 2-2-4. The values of DXR concentration represent the mean ± S.D. (n = 3). The values of DXR below the detection limit were treated as described in the legend of Figure 2-1. (B) Anti-PEG IgM induction by Doxil®. Rats were treated with Doxil® at different doses of either 0.2, 2 or 20 mg DXR/m². Serum was collected on Day 5 after administration. Anti-PEG IgM was determined as described in 2-2-6. Anti-PEG IgM titers were expressed as a ratio of the OD of serum sample to the OD of rat serum (positive control, P.C.). Each value represents the mean ± S.D. (n = 4). *p < 0.05 versus control (0 mg DXR/m²), 2 and 20 mg DXR/m².

第2項 イヌにおける Doxil®繰り返し投与時の抗 PEG IgM 産生と体内動態

これまで抗がん剤の内封の有無に関わらず PEG 修飾リポソームがイヌで ABC 現象を誘導することを示した報告はない。そのため、本研究では Doxil®を用い、抗 PEG IgM 産生とそれに伴う ABC 現象が誘導されるか検証した。投与量は、げっ歯類と同様に 0.2, 2, 20 mg DXR/m²とし、その際のリン脂質の投与量は 0.067, 0.67, 6.7 µmol phospholipids/kg であった。一方で、投与間隔に関しては、げっ歯類とは異なり、ヒトのエイズ関連カポジ肉腫に対する Doxil®の臨床推奨投与レジメン(20 mg DXR/m²を 2-3 週間毎に投与) [84]に従い、3 週間間隔で 3 回繰り返した。

その結果、20 mg DXR/m²で試験を行った群では、過去のげっ歯類を用いた報告と同じく、試験期間を通して抗 PEG IgM は検出されなかった (Figure 2-4)。また、半減期および AUC の低下も確認されず、ABC 現象が誘導されないことが明らかとなった (Table 2-1)。しかしながら、有意ではないものの、初回投与時の DXR 血漿半減期が 2 および 3 回目より短く、かつ初回投与 5 日目の血漿中 DXR の値の低下が確認されていることから、初回投与後に微量に産生された抗 PEG IgM が、数日後に同じく初回投与した Doxil®のクリアランスを促進した可能性がある (Figure 2-3A)。実際、初回投与 3 日目までの血漿中 DXR の半減期は 34.5 ± 12.9 時間であり、2 回目および 3 回目投与時とほぼ同じ値であった。これらの結果は、微量の抗 PEG IgM が初回投与 3 日目以降に産生された可能性、さらには、非常

に軽微な影響であるものの、産生された抗 PEG IgM により血中を循環中の Doxil[®]がクリアランスされた可能性を示唆している。

一方、2 mg DXR/m²で試験を行った群では、初回投与と比較して、2 回目投与以降の血漿中 DXR 濃度は明らかな低値を示し (Figure 2-3B)、半減期および AUC の値は、初回投与時の値と比較して劇的に小さくなることが明らかとなった (Table 2-1)。これらの値は、3 回目投与時には回復傾向にあったが、初回投与から 6 週間が経過しているにもかかわらず同等の水準には至っていなかった。また、血清中には抗 PEG IgM の産生も確認され、初回投与から 3 週間以上残存していることが明らかとなった (Figure 2-4)。さらに、0.2 mg DXR/m²で試験を行った群では、初回投与時のみ DXR が血漿中に検出されたが、2 回目および 3 回目投与時には血漿中 DXR は検出限界以下であった (投与後 5 分で 0.025 μg/mL 未満) (Figure 2-3C)。本条件下では、抗 PEG IgM の産生は初回投与 3 日後から検出され始め、5~9 日目で最大レベルに達した。その後、抗 PEG IgM は徐々に減少したが、初期値に戻るまで 7 週間以上を要した (Figure 2-4)。また、2 mg DXR/m²で試験を行った群でも同様であるが、げっ歯類における報告と同じく、抗 PEG IgM は 2 回目と 3 回目の Doxil[®]投与ではブーストされず、むしろ、抗 PEG IgM の値は、Doxil[®]の 2 回目および 3 回目の投与後に減少することが確認された。これは投与された Doxil[®]に抗 PEG IgM が結合することで、結果的に抗 PEG IgM が Doxil[®]と共にクリアランスされたことを示唆している。また、0.2 および 2 mg DXR/m²投与群ともに、抗 PEG IgM の値は初回投与 9 日目で最大値を示したが、その値には 3 倍以上の差が認められた。このことから、内封された DXR による免疫系の傷害作用も寄与していると考えられるが、げっ歯類での知見と同様に、イヌにおいても PEG 修飾リポソームの投与量が低いほど、抗 PEG 抗体が産生される傾向にあることが明らかとなった (Figure 2-4)。

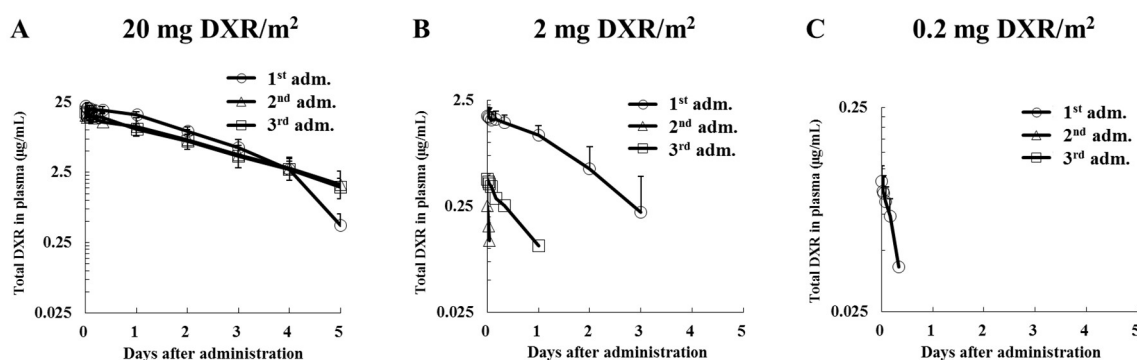


Figure 2-3. Effect of Doxil[®] dose on the concentration of total DXR (free and liposomal DXR) in plasma after repeated administrations to dogs. Dogs received 3 sequential administrations of Doxil[®] with different doses of either (A) 20 mg DXR/m², (B) 2 mg DXR/m² or (C) 0.2 mg DXR/m² in 3-week intervals. Blood samples were taken from the cephalic vein at the same time points as shown in Table 2-1. DXR was determined as described in 2-2-4. The values represent the mean \pm S.D. (n = 3) for DXR in most cases. The values of DXR below the detection limit were treated as described in the legend of Figure 2-1.

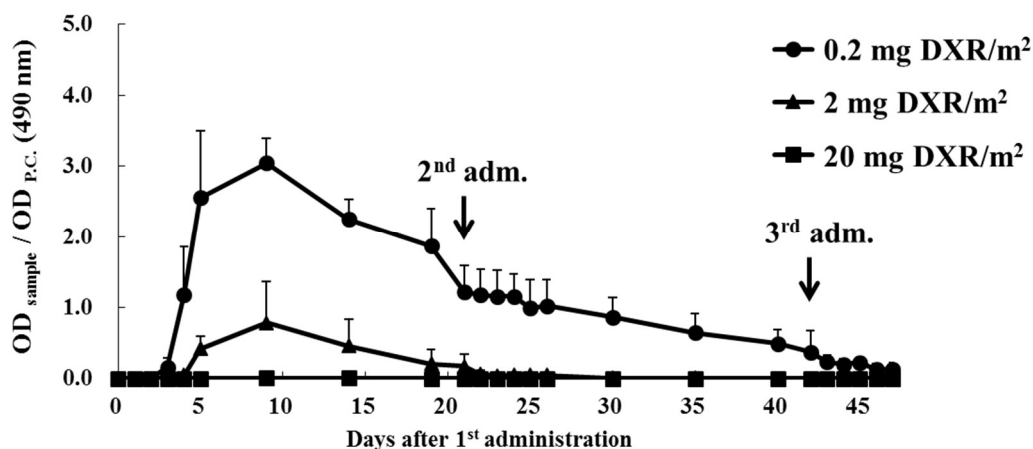


Figure 2-4. Anti-PEG IgM production in serum of dogs following repeated administrations of Doxil®. Dogs received 3 sequential administrations of Doxil® with different doses of either 0.2, 2 or 20 mg DXR/m². Anti-PEG IgM was determined as described in 2-2-6. Anti-PEG IgM titers were expressed as a ratio of the OD of serum sample to the OD of rat serum (positive control, P.C.). Each value represents the mean ± S.D. (n = 3).

第3項 サルにおける Doxil®繰り返し投与時の抗 PEG IgM 産生と体内動態

前項のイヌと同様に、これまで Doxil®のような抗がん剤を内封した PEG 修飾リポソームがサルで ABC 現象を生じさせたことを示した報告はない。そのため、Doxil®を用い、サルにおいて抗 PEG IgM 産生とそれに伴う ABC 現象が誘導されるか検証した。投与レジメはイヌと同様とし、3用量 (0.2, 2, 20 mg DXR/m², 0.107, 1.07, 10.7 μmol phospholipids/kg に相当) の Doxil®を3週間間隔で3回投与した。その結果、20 mg DXR/m²では、全ての投与回で、抗 PEG IgM の産生および ABC 現象は確認されず (Figure 2-5A and 2-6)、PK パラメーターにも有意な変化はなかった (Table 2-1)。また、2 mg DXR/m²においても、同じく投与回毎の血漿中 DXR 濃度推移に大きな変化はなく (Figure 2-5B)、PK パラメーターに有意差はなかった (Table 2-1)。しかしながら、血清中の抗 PEG IgM は、初回投与3日目以降にわずかながら産生されていることが確認された。一方、0.2 mg DXR/m²では、初回投与3日目から5日目にかけて、抗 PEG IgM が有意差を持って産生された (Figure 2-6)。その結果を反映し、2回目および3回目以降では、血漿中の DXR は投与後5分の時点で検出限界以下でとなったことから、ABC 現象が生じていることが示唆された (Figure 2-5C)。本試験では、0.2 および 2 mg DXR/m²での試験において、抗 PEG IgM は、初回投与後3日目までに検出され、5日目に最大に達し、その後徐々に減少することが確認された。

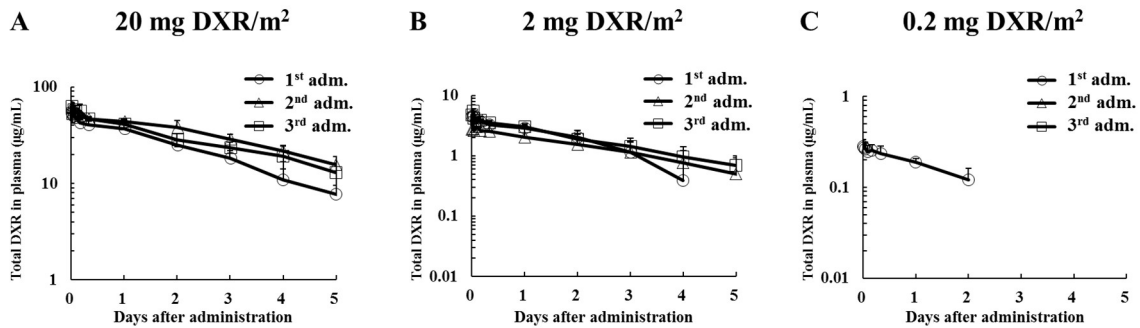


Figure 2-5. Effect of Doxil[®] dose on the concentration of total DXR (free and liposomal DXR) in plasma after repeated administration to monkeys. Monkeys received 3 sequential administrations of Doxil[®] with different doses of either (A) 20 mg DXR/m², (B) 2 mg DXR/m² or (C) 0.2 mg DXR/m² in 3-week intervals. DXR was measured as described in 2-2-4. Each value of DXR concentration represents the mean \pm S.D. (n = 3) in most cases. The values of DXR below the detection limit were treated as described in the legend of Figure 2-1.

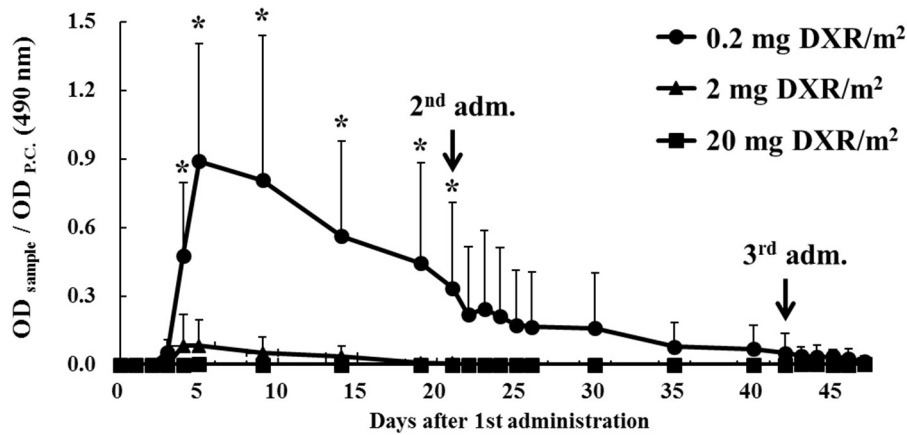


Figure 2-6. Anti-PEG IgM production in serum of monkeys following repeated administrations of Doxil[®]. Monkeys received 3 sequential administrations of Doxil[®] with different doses of either 0.2, 2 or 20 mg DXR/m². Anti-PEG IgM was determined as described in 2-2-6. Anti-PEG IgM titers were expressed as a ratio of the OD of serum sample to the OD of rat serum (positive control, P.C.). **p* < 0.05 versus before the 1st administration (0 days).

第4項 ミニブタにおける Doxil[®]繰り返し投与時の抗 PEG IgM 産生と体内動態

ミニブタは、生理学および解剖学的にヒトと類似しているため、非げっ歯類を用いた前臨床研究で汎用され始めている[91-93]。しかしながら、これまでにミニブタにおいて ABC 現象を検証した報告はなく、ミニブタが PEG 修飾リポソームに対してどのような免疫応答を示すか不明な点が多い。そのため、ミニブタに 2, 20 mg DXR/m² (0.37, 3.7 μmol phospholipids/kg) となるように 3 週間間隔で 2 回投与を行い、抗 PEG IgM の産生と DXR の体内動態の変化を精査した。その結果、20 mg DXR/m² では、初回投与 5 日目以降にわずかな抗 PEG IgM 産生が確認され、9 日目に最大レベルに達し、その後徐々に減少し、Doxil[®] の 2 回目の投与が行われた 21 日目までに消失していた (Figure 2-8)。そのため、2 回目投与時に抗 PEG IgM に起因するとみられるクリアランスの上昇は確認されなかった (Figure 2-7A)。しかしながら、イヌにおける 20 mg DXR/m² での試験結果と同じく、初回投与後 5 日目に血漿中 DXR の濃度低下が確認された。これは初回投与により産生された抗 PEG IgM が原因である可能性が示唆され、PK パラメーターに関しても、2 回目投与と比較して、初回投与時の半減期は有意に短かった (Table 2-1)。また、2 mg DXR/m² では、2 回目投与時の血漿中 DXR 濃度が、投与直後から急速に低下することが確認され (Figure 2-7B)、2 回目投与時の半減期と AUC 値は、1 回目投与時と比較して有意に減少することが明らかとなった (Table 2-1)。さらに、2 mg DXR/m² では、初回投与後に有意な抗 PEG IgM 産生が確認され、血清中抗 PEG IgM は 4 日目以降に上昇し、9 日目に最大レベルに達してから徐々に減少した。これらの観察結果は、ミニブタが Doxil[®] の投与後に抗 PEG IgM を産生し、その結果 ABC 現象が生じたことを示している。

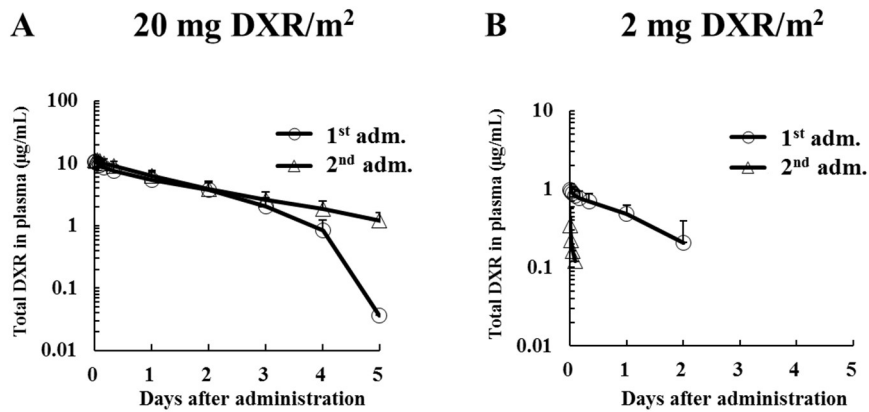


Figure 2-7. Effect of Doxil® dose on the concentration of total DXR (free and liposomal DXR) in plasma after repeated administration to minipigs. Minipigs received 2 sequential administrations of Doxil® with a different dose of either (A) 20 mg DXR/m² or (B) 2 mg DXR/m² in 3-week intervals. DXR was measured as described in 2-2-4. Each value of DXR concentration represents the mean ± S.D. (n = 3) in most cases. The values of DXR below the detection limit were treated as described in the legend of Figure 2-1.

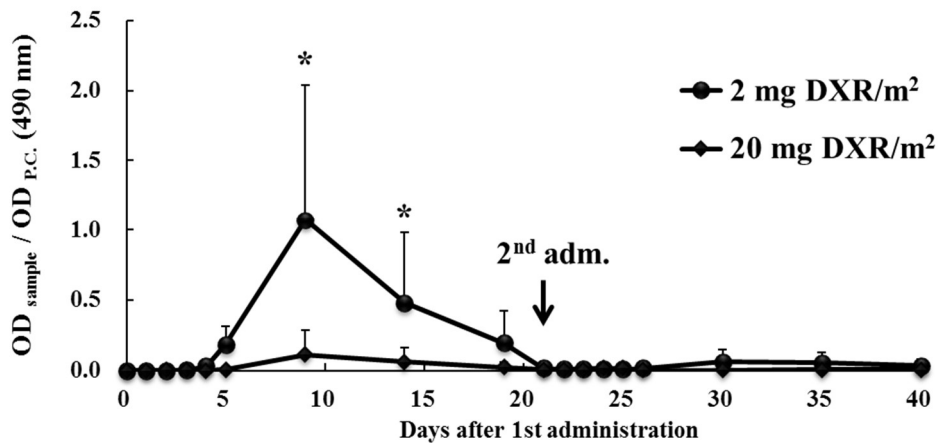


Figure 2-8. Anti-PEG IgM production in serum of minipigs following repeated administrations of Doxil®. Minipigs received 2 sequential administrations of Doxil® with different doses of 2 or 20 mg DXR/m². Anti-PEG IgM was determined as described in 2-2-6. Anti-PEG IgM titers were expressed as a ratio of the OD of serum sample to the OD of rat serum (positive control, P.C.). **p* < 0.05 versus before the 1st administration (0 days).

Table 2-1. Pharmacokinetic parameters of DXR after repeated administration of Doxil® in mice, rats, dogs, monkeys and minipigs.

Species (Dosage schedule)	Dose	Number of doses	T _{1/2} (hr)	AUC _{INF_obs} (µg/mL·hr)	AUC _{%Extrap_obs} (%)	CL _{obs} (mL/hr/kg)
Mice (Q7D2)	0.2 mg DXR/m ² (0.44 µmol PL/kg)	1st	4.1	9.4	1.2	7.0
		2nd	2.2	0.5	18.2	128.6
	2 mg DXR/m ² (4.4 µmol PL /kg)	1st	15.2	412.2	35.5	1.6
		2nd	16.8	435.5	36.7	1.5
	20 mg DXR/m ² (44.0 µmol PL /kg)	1st	23.4	3974.3	50.3	1.7
		2nd	19.9	4143.9	48.7	1.6
Rats (Q7D2)	0.2 mg DXR/m ² (0.222 µmol PL /kg)	1st	18.3 ± 2.0	20.1 ± 5.0	44.2 ± 4.9	1.7 ± 0.5
		2nd	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	2 mg DXR/m ² (2.22 µmol PL /kg)	1st	21.3 ± 0.3	279.2 ± 31.2	46.8 ± 0.1	1.2 ± 0.1
		2nd	19.0 ± 7.5	249.1 ± 94.9	39.7 ± 17.0	1.5 ± 0.7
	20 mg DXR/m ² (22.2 µmol PL /kg)	1st	29.7 ± 1.8	3240.9 ± 110.8	60.4 ± 1.6	1.0 ± 0.0
		2nd	36.0 ± 3.5	4522.5 ± 316.8*	63.3 ± 3.2	0.7 ± 0.1*
Dogs (Q21D3)	0.2 mg DXR/m ² (0.067 µmol PL/kg)	1st	8.1 ± 1.3	1.3 ± 0.4	55.6 ± 6.0	8.4 ± 3.2
		2nd	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		3rd	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	2 mg DXR/m ² (0.67 µmol PL/kg)	1st	24.1 ± 11.8	76.0 ± 36.9	10.1 ± 12.0	1.5 ± 0.6
		2nd	1.5	0.9	21.6	127.8
		3rd	17.5	13.5	17.2	8.7
	20 mg DXR/m ² (6.7 µmol PL/kg)	1st	25.7 ± 3.8	1107.4 ± 157.2	1.5 ± 0.7	0.9 ± 0.1
		2nd	35.1 ± 1.3	920.3 ± 373.1	3.1 ± 3.6	1.3 ± 0.6
		3rd	35.1 ± 4.5	899.5 ± 196.4	8.7 ± 2.2*	1.2 ± 0.3

Table 2-1 (continued)

Species (Dosage schedule)	Dose	Number of doses	T _{1/2} (hr)	AUC _{INF_obs} (µg/mL·hr)	AUC _{%Extrap_obs} (%)	CL _{obs} (mL/hr/kg)	
Monkeys (Q21D3)	0.2 mg DXR/m ² (0.107 µmol PL /kg)	1st	42.7 ± 11.4	17.0 ± 5.1	43.5 ± 11.5	1.0 ± 0.4	
		2nd	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
		3rd	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
	2 mg DXR/m ² (1.07 µmol PL /kg)	1st	34.1 ± 5.4	221.6 ± 47.3	12.7 ± 2.2	0.7 ± 0.1	
		2nd	44.3 ± 17.1	207.7 ± 143.5	4.7 ± 1.3	1.0 ± 0.6	
		3rd	43.9 ± 7.1	278.1 ± 52.0	15.7 ± 4.7	0.6 ± 0.1	
	20 mg DXR/m ² (10.7 µmol PL /kg)	1st	52.3 ± 8.4	3595.9 ± 1071.6	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.2	
		2nd	55.3 ± 7.9	5437.0 ± 850.9	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.1	
		3rd	57.8 ± 10.2	4618.8 ± 900.8	23.1 ± 5.5	0.4 ± 0.1	
	Minipigs (Q21D2)	2 mg DXR/m ² (0.37 µmol PL /kg)	1st	22.4 ± 10.5	33.0 ± 15.8	21.2 ± 16.7	2.0 ± 0.8
			2nd	1.1 ± 1.2*	0.9 ± 1.1*	20.7 ± 25.6	230.8 ± 279.0
		20 mg DXR/m ² (3.7 µmol PL /kg)	1st	22.1 ± 4.1	410.6 ± 121.4	2.0 ± 2.7	1.5 ± 0.5
2nd			37.1 ± 4.8*	581.6 ± 109.4	2.0 ± 1.2	1.0 ± 0.2	

Each value represents the mean ± standard deviation (S.D.) (n = 3) for most cases. These parameters of mice were calculated using the mean value (n = 3). In addition, if the DXR concentration was below the detection limit after 2nd administrations, the data were omitted and shown as “Not determined (N.D.)”. * *p*<0.05 versus 1st administration. PL, Phospholipids; T_{1/2}, Half-life; AUC_{INF_obs}, Area under the curve from time zero extrapolated to infinity, based on the last observed concentration; AUC_{%Extrap_obs}, Percentage of AUC_{INF_obs} due to extrapolation from last sample time to infinity; CL_{obs}, Observed clearance; Q7D2, Twice-weekly administration; Q21D2, Once every three weeks for a total of 2 administrations; Q21D3, Once every three weeks for a total of 3 administrations.

第4節 考察

本章では、市販の Doxil[®]を用い、種々の動物種（マウス、ラット、イヌ、サル、ミニブタ）において、Doxil[®]投与時の抗 PEG IgM 誘導性と血漿中 DXR 濃度に関して、系統的な評価を行った。これまでの報告から、抗がん剤などの細胞傷害性の薬物が内封された PEG 修飾リポソームは、抗 PEG 抗体の産生とそれに起因する ABC 現象が誘導されないと考えられていた[55, 56, 94]。しかしながら、本章での検討の結果、低投与量（0.2 mg DXR/m²）では全ての動物種で Doxil[®]投与による抗 PEG IgM の産生とそれに伴う DXR の血漿中濃度低下（ABC 現象）が引き起こされることが明らかとなった。さらに、イヌやミニブタなどの大動物では中投与量（2 mg DXR/m²）においても ABC 現象が誘導され、特にイヌに関しては3回目に投与した Doxil[®]（初回投与から 6 週間後）においても血中滞留性の低下が確認された。げっ歯類における報告で、初回投与による抗 PEG IgM の産生は、程度の差はあるものの、脂質投与量が低いほど誘導される傾向にあることがわかっている[81]。そのため、Doxil[®]の投与量を下げたことで、内封された DXR による免疫細胞への傷害性が低下したこと、さらには脂質の投与量自体の低下により抗 PEG IgM の誘導能が高まり、ABC 現象が誘導されやすくなったと考えられる。

また、Doxil[®]の臨床におけるエイズ関連カポジ肉腫の推奨投与量である高投与量（20 mg DXR/m²）では、Doxil[®]に起因する抗 PEG IgM の産生は確認されない、もしくは非常に微量確認されたのみで、それに伴う有意な DXR の血漿中濃度変化は認められなかったことを明記しておく。本結果は、げっ歯類において実施された DXR 封入 PEG 修飾リポソームを使用した過去の報告と一致しており[55, 56, 94]、非げっ歯類の関してもリポソームに内封された抗がん剤は脾臓の MZ-B 細胞を始めとする免疫細胞を傷害することで、ABC 現象を抑制可能であることを示唆している。類似の現象は、DXR の他、ミトキサントロンやオキサリプラチンなどの抗がん剤を内封した PEG 修飾リポソーム製剤でも確認されていることから、多くの抗がん剤に関して共通の現象であると考えられる[95, 96]。

以上のことから、抗 PEG IgM の誘導とその後の ABC 現象の誘導性を Doxil[®]を用いて検証した結果、PEG 修飾リポソームに対する免疫系の感受性には明確な種差があることが明らかとなった。特に、今回試験を行った動物種の中では、イヌおよびミニブタは、Doxil[®]に対して非常に高い感受性を示す一方で、げっ歯類およびサルは、臨床推奨投与量の 100 分の 1 で反応を示したのみで、比較的感受性が低いことが示された（Figure 2-9）。

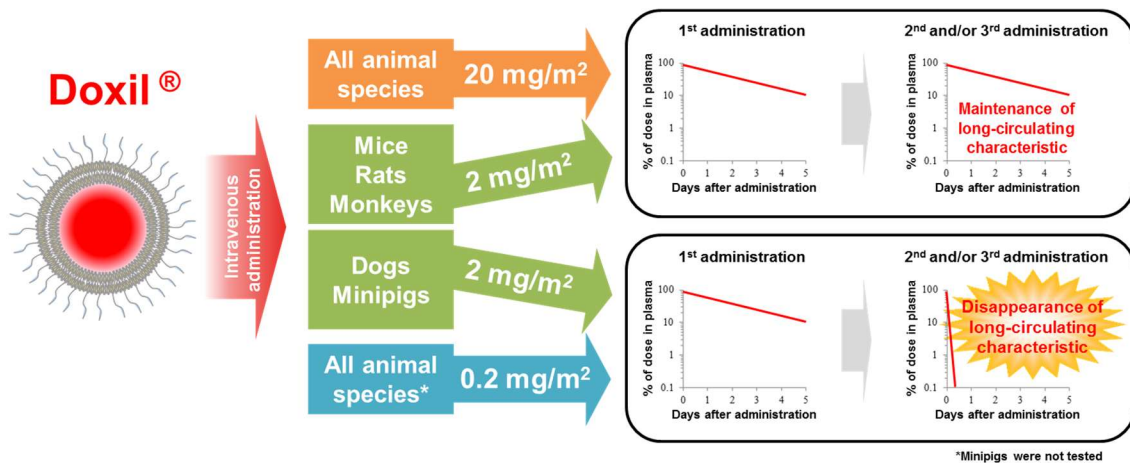


Figure 2-9. Animal species difference in the ABC phenomenon upon repeated administration of Doxil®

これまでに報告されている ABC 現象の発生メカニズムは、①初回投与された PEG 修飾リポソームが脾臓の MZ-B 細胞を刺激し、T 細胞非依存的に抗 PEG IgM が産生される。②産生された抗 PEG IgM が 2 回目投与以降の PEG 修飾体に結合し、補体とマクロファージの活性化により PEG 修飾体が急速にクリアランスされる、というものである [53, 80-82]。このように、ABC 現象は、誘導段階（初回投与検体による抗 PEG 抗体の産生段階）と作用段階（2 回目投与検体のクリアランス段階）に大別される [94]。この「誘導段階」においては PEG 修飾体の脾臓移行性と MZ-B 細胞との相互作用の両方が重要であり、「作用段階」では補体とマクロファージの活性化の程度が大きく影響すると考えられる。一方で、抗 PEG 抗体を産生する脾臓 MZ-B 細胞に関しては、げっ歯類とヒトにおいて、顕微解剖学的な機能および遊走能に多くの違いがあり、げっ歯類では、特に大きな B リンパ球が脾臓 MZ に存在し、これらの細胞が TI-2 抗原に対する抗体を産生することが報告されている [97-100]。さらに、脾臓 MZ はげっ歯類では十分に発達しており、霊長類では中程度、イヌとネコではほとんど発達していないことも報告されている [101]。さらに、補体活性化を伴う Infusion reaction である CARPA の研究から、イヌやブタはげっ歯類などと比較して、PEG 修飾リポソーム投与時に補体およびマクロファージが活性化されやすいことが報告されている [77, 79, 102]。

以上のことから、PEG 修飾リポソームに対する感受性が動物種によって異なる明確な原因は明らかではないものの、脾臓 MZ および MZ-B 細胞の種固有の特性および MZ-B 細胞と PEG 修飾リポソーム間の相互作用の違い、さらには補体およびマクロファージの活性化が動物種間で異なることが、ABC 現象の誘導性の種差に繋がっていると考えられる。

その他、今回実施したイヌ試験の中投与量 (2 mg DXR/m²) において、初回投与により産生された血清中の抗 PEG IgM が経時的に消失していき、2 回目および 3 回目投与時には抗 PEG IgM が検出されなかったにも関わらず、血漿中の DXR 濃度が低下する事例が確認された (Figure 2-3B and 2-4)。これは、本試験で用いた ELISA による抗 PEG IgM の測定

法では検出できないほど微量な抗体量でも Doxil[®]のクリアランスが促進されたことを示している。本原因としては、2回目および3回目に投与した Doxil[®]の投与量が少なかったため、より抗 PEG IgM の影響を受けやすかった可能性、さらにはイヌにおける補体およびマクロファージの活性化能が高く、PEG 修飾リポソーム表面に少量の抗 PEG 抗体が結合しただけでクリアランスするに十分な能力を備えていた可能性が考えられる。しかしながら、本結果は、現在採用している抗 PEG IgM 測定法のみでは ABC 現象の誘導性を完全には予測できないことを示唆しており、PEG 修飾ナノ粒子医薬品の開発過程においては、今後、より高感度かつ定量的な抗 PEG IgM 測定法の開発が必要となると考えられる。

このように、本章では、抗がん剤を封入した PEG 修飾リポソームにおいても、投与条件によっては抗 PEG IgM 産生に伴う ABC 現象が生じることを明らかとした。このことから、前臨床における新薬の開発段階においては、PEG 修飾ナノ粒子の投与量や投与間隔だけでなく、試験に用いる動物種の選定を含め、試験プロトコルの作成には注意が必要であると考えられる。

一方で、現時点で調査した限りにおいては、抗がん剤を封入した PEG 修飾リポソームがヒトにおいて ABC 現象を誘導したとする報告はない。従って、少なくとも抗がん剤のような細胞傷害性の薬物を用いている以上、本現象が臨床で使用する上で大きな課題となる可能性は低いと考えられる。

第 3 章 PEG 修飾リポソームの脂質投与量がイヌにおける抗 PEG IgM 産生量と体内動態変化に及ぼす影響の検討

第 1 節 緒言

医薬品の開発過程において、未だイヌはげっ歯類としての動物実験で汎用される動物種である。一方で、前章の通り、げっ歯類やサルなどの動物種と比較して PEG 修飾リポソームへの感受性が非常に高いことが明らかとなった。従って、抗がん剤封入 PEG 修飾リポソームの開発においては当然であるが、より細胞傷害性が低い新薬候補を内封した PEG 修飾リポソーム医薬品の開発過程でイヌを用いる場合、ABC 現象の誘導を一層考慮しつつ試験をデザインする必要がある。

これまでに報告されたげっ歯類における研究によれば、抗 PEG 抗体産生を伴う ABC 現象は、脂質投与量が高いほど抑制される傾向にあることが明らかとなっている。ABC 現象の抑制の程度には差があるものの、マウスでは、10 μmol phospholipids/kg、ラットにおいては、5 μmol phospholipids/kg 以上であれば、DXR 未封入の PEG 修飾リポソーム単独で十分な ABC 現象の抑制効果が得られると考えられる [53, 55, 81, 90, 103]。今回のイヌ試験における脂質投与量は、DXR の投与量が 0.2, 2, 20 mg/m^2 に対して、0.067, 0.67, 6.7 μmol phospholipids/kg であり、高投与量で ABC 現象が抑制されていた要因が、①PEG 修飾リポソームに封入された DXR による免疫細胞系への傷害性、②投与脂質による免疫寛容、のどちらの寄与が大きいか明確でない。今後、PEG 修飾リポソームがより細胞傷害性の低い薬物に応用される可能性、さらにはその開発過程でイヌが用いられる可能性は非常に高い。そこで本章では、Doxil[®]および薬物未封入の PEG 修飾リポソーム（プラセボ）を用いて、イヌにおいて PEG 修飾リポソームの脂質投与量が抗 PEG 抗体産生量と体内動態変化に及ぼす影響の検討を行った。

第 2 節 実験方法

第 1 項 試薬・動物

水素添加大豆リン脂質 (HSPC) はリポイド (Ludwigshafen, Germany) より購入した。1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-n-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (DSPE-PEG) は日油 (Tokyo, Japan) から提供、またはジェンザイム (Liestal, Switzerland) より購入した。コレステロール (Cholesterol) は富士フィルム和光純薬 (Tokyo, Japan) または日本精化 (Osaka, Japan) から購入した。その他の試薬は、第 2 章・第 2 節・第 1 項に記載のものを使用した。Wistar 系ラット (雄、8 週齢) は日本 SLC (Shizuoka, Japan) より購入した。ビーグル系イヌ (雄、8-11 月齢) は北山ラベス (Nagano,

Japan)より購入した。ラットは水および飼料を自由摂取とした。イヌは水を自由摂取とし、飼料はTC-1c)を250g(1回/日)とした。動物実験はエーザイ株式会社、徳島大学の動物実験委員会の承認の下で実施した。

第2項 薬物未封入のPEG修飾リポソームの調製

ラットにおける抗PEG IgM陽性コントロール血清作製のPEG修飾リポソームは、第2章・第2節・第2項に記載の通り調製した。

イヌ試験用の薬物未封入のPEG修飾リポソーム(プラセボ)の脂質組成は、Doxil[®]と同様にHSPC/Cholesterol/DSPE-PEG=[(9.58/3.19/3.19,重量比)、(56.3/38.4/5.3(モル比))]とした。初めに、上記の脂質組成になるように脂質をエタノールで溶解させた。次に本脂質エタノール溶解液を加温した20倍量の250mM硫酸アンモニウム溶液に攪拌しながら添加することで、粗リポソームを調製した。得られた粗リポソームを、エクストルーダーを用いて、ポリカーボネートフィルター(400, 200, 50nm, Whatman Inc., Clifton, NJ)を通過させることで粒子径を調整した。調製したリポソームの粒子径を動的光散乱法[Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK)]により測定した。この際の平均粒子径は、78.45nm(PdI:0.074)であった。続いて、ポリエーテルスルホン製限外濾過膜[分画分子量:300kDa(Millipore Corp., Burlington, MA)]を用いて、外水相をL-ヒスチジンを含むスクロース溶液に置換した。その後、調製したリポソーム溶液のHSPCの濃度をHPLCにより測定した。

第3項 抗PEG IgM陽性コントロール血清の作製

第2章・第2節・第3項に記載の通り作製した。

第4項 イヌへのDoxil[®]および薬物未封入のPEG修飾リポソーム(プラセボ)の投与および採血

本項の実験では、Doxil[®]および薬物未封入のPEG修飾リポソームをTable 3-1に示す投与量となるように、イヌ12頭を4グループ(グループA, B, C, D)に分け、3週間間隔で3回静脈内に持続投与した。その際、全ての投与量において、投与溶液量を1mL/kg、投与時間を1時間とした。各Doxil[®]用量の体内動態および抗PEG IgMを評価するため、投与前、投与後5、30分、1、2、4、8、24、48、72、96、120、216、336および456時間において、経時的に橈側皮静脈より血液を採取し、血漿および血清を得た。採血に使用する資材および保管方法等は第2章・第2節・第4項の記載に従った。

第5項 血漿中ドキシソルピシン (DXR) の定量

第2章・第2節・第4項の記載に従い定量した。

第6項 薬物動態解析

第2章・第2節・第6項の記載に従い解析した。

第7項 ELISA による血清中抗 PEG IgM の測定

第2章・第2節・第7項の記載に従い測定した。

第8項 統計学的解析

第2章・第2節・第8項の記載に従い解析した

第3節 結果

第1項 Doxil[®]およびプラセボの初回脂質投与量が ABC 現象に及ぼす影響

グループ A については、Table 3-1 に示すように、Doxil[®]初回投与における DXR と脂質の投与量が ABC 現象に及ぼす影響を精査した。初回に投与した Doxil[®]は、DXR の投与量が中投与量である 2 mg DXR/m²であるところに、プラセボを添加することで、脂質投与量が Figure 2-3A で ABC 現象の抑制が確認された高投与量である 20 mg DXR/m²相当 (6.7 μmol phospholipids/kg) となるように調整した。また、2 回目および 3 回目の投与は、プラセボを添加せずに Doxil[®]を中投与量である 2 mg DXR/m² (0.67 μmol phospholipids/kg) で投与した。その結果、初回投与時には、Figure 2-3B と同様に良好な血中滞留性を示したのに対し、2 回目投与時には投与後 5 分の時点で血漿中に DXR は検出されなかった。また、3 回目投与時には、投与後 5 分のみ DXR が検出されたものの、その値は非常に低く、直後に検出限界以下となった (Figure 3-1)。また、Figure 3-3 に示す通り、本条件では抗 PEG IgM の誘導も確認され、脂質投与量の増加 (プラセボ添加) により ABC 現象は抑制されなればかりか、プラセボ添加なしの条件 (第2章、Figure 2-3B および Figure 2-4) と比較して、初回投与後の血清中抗 PEG IgM 産生量は増加し、それに起因して 2 回目投与以降の DXR の消失は促進された。このことから、Doxil[®]に過剰量のプラセボを添加し、脂質投与量を高めることで、ABC 現象がより強く誘導されることが示唆された。また、同様の結果は、初回にプラセボのみを投与したグループ B および C でも確認され、初回に投与する脂

質量を、0.67 から 6.7 μmol phospholipids/kg に高めることで、抗 PEG IgM の産生量自体は抑制可能であるものの、同脂質投与量で Doxil[®]を投与した場合と比較すると、むしろ抗体産生量は増加する傾向にあることが明らかとなった (Figure 2-4 versus Figure 3-3)。また、これらのグループでは、2 回目および 3 回目に投与した Doxil[®]が急速にクリアランスされ、投与後 5 分の時点で検出限界以下となった (data not shown)。

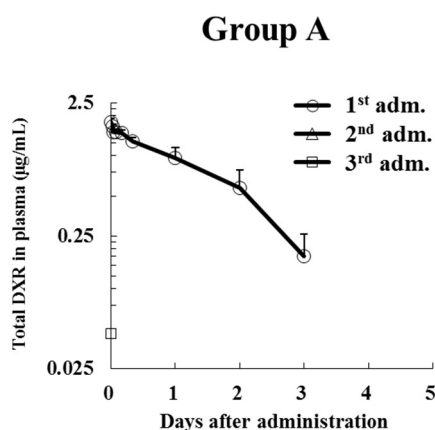


Figure 3-1. The effect of a lipid dose in the first dose of Doxil[®] on the concentration of total DXR (free and liposomal DXR) from subsequently administered Doxil in plasma of dogs (Group A). As a first dose, dogs received Doxil[®] plus an excess amount of “empty” PEGylated liposomes (placebo) (2 mg DXR/m², 6.7 μmol phospholipids/kg). Three weeks later, dogs received 2 sequential administrations of Doxil[®] with a dose of 2 mg DXR/m² (0.67 μmol phospholipids/kg) as the test dose in 3-week intervals. DXR was determined as described in 2-2-4. The values represent the mean \pm S.D. (n = 3) for DXR in most cases. The values for DXR that were below the detection limit were treated as described in the legend of Figure 2-1.

第 2 項 PEG 修飾リポソーム繰り返し投与時の脂質投与量が ABC 現象に及ぼす影響

前述の通り、ABC 現象は、誘導段階（初回投与検体による抗 PEG 抗体の産生段階）と作用段階（2 回目投与検体のクリアランス段階）に大別される [94]。前項において、イヌにおいては、脂質投与量を高めることで「誘導段階」を抑制できる傾向にあるものの、その効果は十分ではないことを示した。そこで、本項では 3 回の繰り返し投与を通じて、PEG 修飾リポソームの脂質投与量を高めることで、「作用段階」を含めた ABC 現象が抑制可能か検証した。Doxil[®]のヒトにおける最大投与量は、卵巣がんにおいて設定されている 50 mg DXR/m²であり、その際の脂質投与量は、イヌでは 16.7 μmol phospholipids/kg に相当する。そのため、Doxil[®]の DXR 投与量を 2 mg DXR/m²に固定し、プラセボを添加することで、脂質投与量を想定される中で最大となる 16.7 μmol phospholipids/kg とし、3 週間間隔で 3 回投与を行った（グループ D）。その結果、脂質投与量を高めたものの、抗 PEG IgM の産生量は、6.7 μmol phospholipids/kg で試験を行ったグループ A および C と同等であり、「誘導段階」への効果は限定的であった。一方で、2 回目投与直後に血清中抗 PEG 抗体の急激な

減少が認められたことから、脂質投与量を高めたことで血清中の抗 PEG IgM クリアランスを促進することが可能であることが明らかとなった (Figure 3-3)。それに伴い、2 回目投与以降の DXR の血漿中濃度推移は改善が認められ (Figure 3-2)、2 回目投与時の血漿中 DXR の半減期は有意に短縮されたものの、3 回目投与時の半減期は初回投与と有意差なく同等の値を示した (Table 3-2)。このことから、脂質投与量を高めることで、「作用段階」において ABC 現象の抑制効果が得られることを示された。

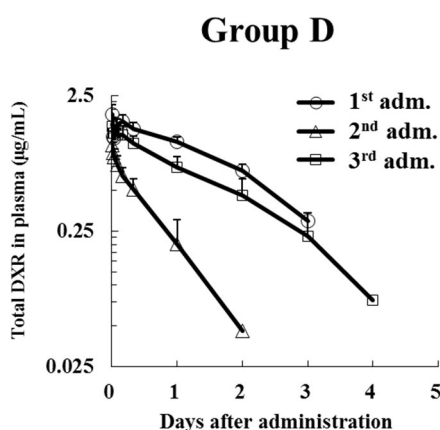


Figure 3-2. The effect of an increase in the lipid dose of Doxil® on the concentration of total DXR (free and liposomal DXR) in plasma of dogs (Group D). Dogs received 3 sequential administrations of Doxil® plus an excess amount of “empty” PEGylated liposomes (placebo) at a dose of 0.2 mg DXR/m² (16.7 µmol phospholipids/kg) in 3-week intervals. DXR was determined as described in 2-2-4. Each value represents the mean ± S.D. (n = 3) for DXR in most cases. The values of DXR that were below the detection limit were treated as described in the legend of Figure 2-1.

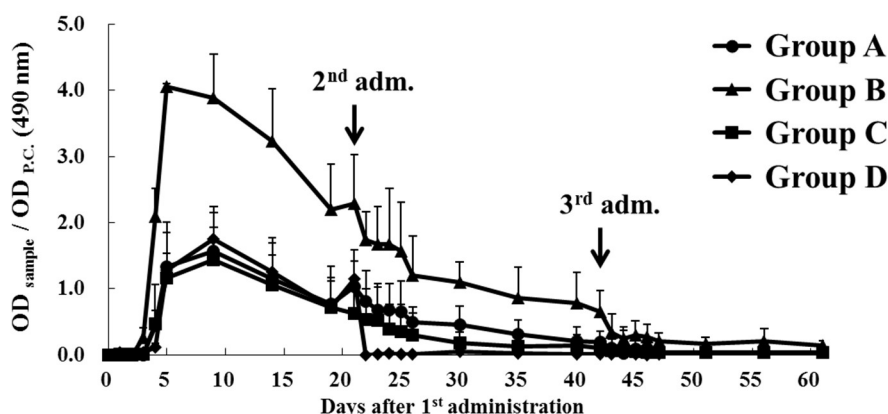


Figure 3-3. Anti-PEG IgM production in serum of dogs following repeated administrations of Doxil® and/or “empty” PEGylated liposomes (Placebo). Dogs received 3 sequential administrations of Doxil® plus an excess amount of “empty” PEGylated liposomes (placebo) that mimics the lipid composition of Doxil® as shown in Table 3-1. Anti-PEG IgM was determined as described in 2-2-4. Anti-PEG IgM titers were expressed as a ratio of the OD of serum sample to the OD of rat serum (positive control, P.C.). Each value represents the mean ± S.D. (n = 3)

Table 3-1. Dosage amounts of Doxil* and/or “empty” PEGylated liposomes (Placebo) # administered to dogs

Group	1st dose				2nd and 3rd dose			
	Doxil*		“empty” PEGylated liposomes#	Total Phospholipids in Doxil* + “empty” PEGylated liposomes#	Doxil*		“empty” PEGylated liposomes #	Total phospholipids in Doxil* + “empty” PEGylated liposomes#
	DXR (mg/m ²)	Phospholipids (μmol/kg)	Phospholipids (μmol/kg)	(μmol/kg)	DXR (mg/m ²)	Phospholipids (μmol/kg)	Phospholipids (μmol/kg)	(μmol/kg)
A	2	0.67	6.03	6.7	2	0.67	-	0.67
B	-	-	0.67	0.67	2	0.67	-	0.67
C	-	-	6.7	6.7	2	0.67	-	0.67
D	2	0.67	16.03	16.7	2	0.67	16.03	16.7

*The commercially available Doxil (purchased from Janssen Pharmaceutical K.K.)

#The homemade “empty” PEGylated liposomes (placebo) was equivalent to the lipid composition of the commercially available Doxil. (HSPC/Cholesterol/DSPE-PEG, 9.58/3.19/3.19, weight ratio, 56.3/38.4/5.3, mol%)

Doxil and/or “empty” PEGylated liposomes were administered to dogs 3 times in 3-week intervals by reference to the clinically recommended dosage regimen of Doxil for AIDS-related Kaposi’s sarcoma. Each dose was intravenously administered at an infusion rate of 1 mL/kg for 1 hr. Blood samples were taken from the cephalic vein at indicated time points (Prior administration, 5, 30 min, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 216, 336 and 456 hr. after administrations). The administrated DXR dosages were 2 mg DXR/m² corresponding to 0.1 mg DXR/kg.

Table 3-2. Pharmacokinetic parameters of DXR after repeated administrations of Doxil and “empty” PEGylated liposomes in dogs (Group D)

Dose	Number of doses	T _{1/2} (hr)	AUC _{INF_obs} (µg/mL·hr)	AUC _{%Extrap_obs} (%)	CL _{obs} (mL/hr/kg)
2 mg DXR/m ² (0.67 µmol phospholipids/kg)	1st	34.7 ± 7.9	82.8 ± 5.8	18.2 ± 6.0	1.2 ± 0.1
+					
(16.03 µmol phospholipids/kg)	2nd	10.9 ± 3.0*	*15.5 ± 5.1	8.4 ± 3.1	*6.9 ± 2.0
→Total phospholipids :					
16.7 µmol phospholipids/kg	3rd	25.9 ± 5.4	55.9 ± 14.2*	*7.6 ± 1.9	1.9 ± 0.4

The lipid dose of Doxil was increased by the addition of an excess amount of “empty” PEGylated liposomes (placebo). Each value represents the mean ± S.D. (n = 3). * p<0.05 versus 1st dose.

第4節 考察

これまでのげっ歯類を用いた報告では、PEG 修飾リポソームの脂質投与量を 5-10 µmol phospholipids/kg 以上に設定することにより、抗 PEG IgM の産生とそれに伴う ABC 現象を抑制できることが示されていた[53, 55, 81, 90, 103]。しかしながら、本章での検討により、少なくともイヌにおいては、プラセボ添加により Doxil®投与時の脂質量を 6.7-16.7 µmol phospholipids/kg まで高めても抗 PEG IgM の産生は抑制されなかった。それだけでなく、Doxil®単独と比較して、プラセボを添加したことで抗体の産生量が増え、その後に投与した Doxil® (プラセボ添加なし) の血中滞留性の消失が促進されるという結果であった。この一因として、投与された PEG 修飾リポソームと内封薬物量の比が影響している可能性が考えられる。小出らの報告によれば、過去の報告の通り、DXR 封入 PEG 修飾リポソームは抗 PEG IgM 産生を抑制するが、同投与量のフリーDXR と PEG 修飾リポソームの混合物を投与した際には、抗 PEG IgM の産生が抑制されないということが明らかとなっている[56]。また、本検討と同時期に、抗がん剤であるトポテカンを封入した PEG 修飾リポソームにおいて、イヌで抗 PEG IgM 産生を伴う ABC 現象が誘導されることが報告された[104, 105]。本論文では、試験に用いたトポテカン封入 PEG 修飾リポソームからのトポテカンの放出速度が非常に速かったため、ABC 現象が誘導された可能性が指摘されている。つまり、トポテカン封入 PEG 修飾リポソームが抗体産生の原因となる免疫細胞系に到達するまでに、PEG 修飾リポソーム中のトポテカン濃度が著しく低下し、十分な細胞傷害性が得られず、抗体産生とそれに伴う ABC 現象が誘導されたというものである。前章において、Doxil®は各動物種で長期血中滞留性を示すことが明らかとなっていることから、放出速度が速いこ

とが原因である可能性は低く、添加したプラセボの免疫刺激により抗体産生が促進されたと考えられる。各動物種の PEG 修飾リポソームに対する感受性の違いの根本的な原因は明らかでないが、げっ歯類と比較して、高脂質投与量においても抗体産生が確認された原因としては、前章で述べたように動物種によって、脾臓 MZ-B 細胞の発達の違いや組織構造の違いが影響している可能性がある。特に、イヌやネコに関しては、脾臓は、厚い皮膜と収縮性の高い発達した平滑筋、そして多数の脾柱および疎らなリンパ組織から構成され、老化した赤血球を捕捉・除去するが、最大で循環血液量の 3 分の 1 をも貯蔵できることが報告されている。そのため、他の動物種より、貯留可能なリポソーム量が多く、脂質投与量によって免疫寛容が起きるまでの許容レベルが高い可能性も考えられる [76]。

本章での検討により、イヌは、げっ歯類と比較して、明らかに PEG 修飾リポソームへの感受性が高いことが示された。また、今回検討を行った範囲では、脂質投与量を高めても、抗体産生の抑制は十分ではなく、抗 PEG IgM の産生とそれに伴う ABC 現象が誘導されやすいことが明らかとなった (Figure 3-4)。以上のことから、イヌを PEG 修飾ナノ粒子医薬品の開発に用いる場合、試験デザインの立案には細心の注意が必要であると考えられる。

また、特に抗がん剤などの低分子医薬品を内封した PEG 修飾リポソーム製剤の開発においては、先行して開発が進む、もしくは既に承認された低分子医薬品の薬効および副作用の改善が目的であることが多い。医薬品の開発過程では、当然ながらナノ粒子であるか否かに関わらず、げっ歯類などの小動物の他、イヌ、サルおよびミニブタなどの大動物を用いた試験が行われる。従って、内封する低分子医薬品によっては、既に大動物での体内動態や安全性のデータを取得されている場合がある。そのようなケースでは、既存のデータを生かすことが可能であることから、同じ動物種で体内動態や安全性の評価を行うことが推奨される。一方で、前述の通り、選択された動物種によっては、抗 PEG 抗体の産生を伴う ABC 現象が誘導される可能性があり、その程度によっては、PEG 修飾リポソーム製剤の投与量・期間・回数などが制限されることが想定される。従って、本研究結果より、内封される低分子医薬品の開発段階から、ABC 現象が誘導されにくいサルを選定し開発を進めることが長期的にみて効率的であると考えられる。

他方、開発中の PEG 修飾ナノ粒子の ABC 現象の誘導性の評価を行うにあたっては、イヌは最適な種であると言える。現時点では、ヒトでの ABC 現象を予測するモデルは、残念ながら確立されていないが、PEG 修飾ナノ粒子製剤の開発を行う際、イヌを用いて ABC 現象を抑制する条件、もしくは製剤処方を見出すことができれば、より感受性が低いと考えられる霊長類では ABC 現象が誘導されにくく、開発上の課題を大幅に低減できる可能性がある。

近年、がん免疫療法が脚光を浴びる中、免疫に関する動物種差の注目度が高まっており、遺伝子レベルで免疫応答に関する調節因子を解明しようという取り組みも進められている [106]。今後、このような取り組みを応用することで、抗 PEG 抗体の産生量、補体およびマクロファージなどの活性化の程度といった最終的なアウトプットではなく、各動物種の免

疫細胞の遺伝子発現の差によって誘導される ABC 現象の種差の原因を明らかとし、その予測まで可能となると考えられる。

さらに、ヒト予測に関しても、近年技術的発展が著しいヒト化マウスモデル構築技術により解決できる可能性がある。現時点では、がん免疫療法の開発に応用されている傾向にあるが、マウスにおいてヒト免疫系の再現にも成功し始めており[107, 108]、これらのヒト化マウスを用いることで、PEG 修飾ナノ粒子製剤のヒトでの免疫応答を予測できる可能性がある。

以上より、PEG 修飾ナノ粒子医薬品投与時における免疫応答の種差やヒト予測に関しては、今後も解決すべき課題は多い。しかしながら、これらの課題が解決した後においても、PEG 修飾ナノ粒子の処方検討段階においては、コスト等の観点からヒト化マウスを汎用することは現実的ではないと考えられ、前章および本章で明らかとした動物種差の特徴を生かし、目的に合わせた動物種の選定と試験デザインの立案を行い、PEG 修飾医薬品候補の評価を行うことが肝要と考える。

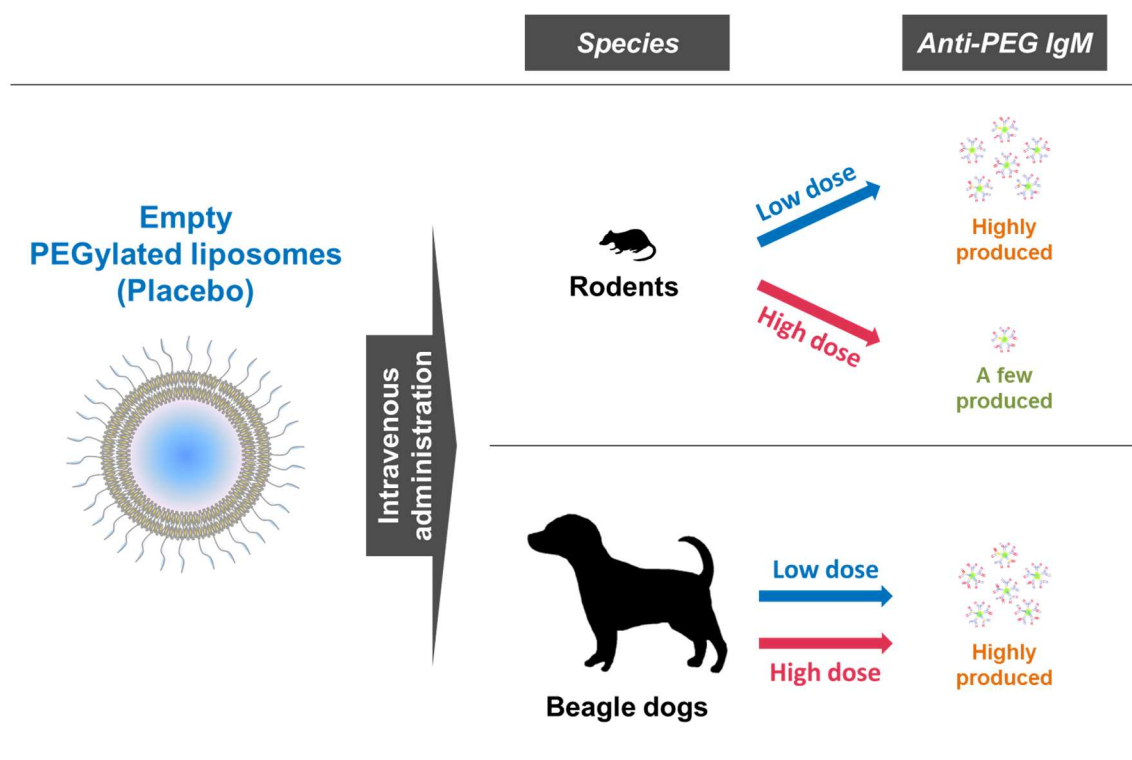


Figure 3-4. Comparison of sensitivity to PEGylated liposomes

第 4 章 PEG 修飾脂質ナノ粒子投与における ABC 現象の誘導性と その抑制方法に関する検討

第 1 節 緒言

脂質ナノ粒子 (LNP) は、siRNA などの核酸医薬に有用なデリバリー技術である。既に多くの前臨床および臨床研究において、siRNA 内包 LNP (siRNA-LNP) が全身投与で肝臓のタンパク質発現を強力に抑制可能であることが証明されている [10, 20, 109-111]。一般的に、LNP は、低 pH で正に荷電するイオン化脂質、リン脂質、コレステロールおよび PEG 脂質の 4 成分で構成されている。これらの構成成分の中で、ナノ粒子表面に修飾された PEG 脂質は、その水和相と PEG 分子自体の立体障害により、ナノ粒子の凝集抑制と製造性および安定性の向上に寄与している [39, 112]。一方で、過剰な PEG 修飾は、LNP と細胞間の相互作用を抑制し、内封した siRNA の肝細胞への取り込みを低下させ、肝臓における RNAi 活性 (mRNA/タンパクのノックダウン効果) を減少させることが報告されている [40]。通常、PEG 脂質は、PEG 鎖末端にある疎水性のアシル鎖を介して LNP の脂質膜に固定されている。この PEG 脂質の疎水性部位の長さは、PEG 脂質と LNP の脂質膜間の相互作用と強い相関があることがわかっており、短いアシル鎖を持つ PEG 脂質は、長いアシル鎖を持つものよりも早く LNP から脱離することが明らかとなっている [113]。さらに、粒子表面の PEG 分子の密度が低いほど、肝細胞などの標的細胞との相互作用をしやすいため、特に肝臓を標的とする場合、粒子形成および安定性を担保可能な最低限の PEG 脂質を修飾することが一般的である。このことから、既に臨床で使用されている、または臨床試験中の肝臓標的 LNP のほとんどは、短いアシル鎖の PEG 脂質 (炭素数 14 などの "Fast shedding PEG 脂質") が使用されている [37, 114-117]。

また、前述の肝臓標的 LNP の成功を皮切りに、LNP の適用範囲は拡大しており、近年では核酸を腫瘍組織に送達することを目的として、より長いアシル鎖の PEG 脂質 (炭素数 18 などの "Slow shedding PEG 脂質") を修飾した LNP が開発されている。これらの報告では、LNP 表面に強固に PEG を修飾することで粒子の長期血中滞留性を確保し、腫瘍組織への核酸の送達量を増やすことを企図している [118-120]。

現時点で調査した限りにおいて、LNP が抗 PEG 抗体産生を伴う ABC 現象により、RNAi 活性が減弱したという臨床報告はない。この理由としては、現在臨床に入っている多くの LNP は、粒子表面から PEG 脂質が速やかに脱離することで免疫原性を低下させ、抗 PEG 抗体の産生を抑制している可能性が考えられる。しかしながら、近年、肝臓を標的とした mRNA を内包した LNP において、繰り返し投与時に ABC 現象が誘導されたとする報告も確認され、LNP に関しても投与条件によっては ABC 現象が誘導されることが明らかになってきた [121]。さらに、前述のように、Slow shedding PEG 脂質を用いた腫瘍細胞標的 LNP の開発もさかんに行われており、今後、LNP を用いた新薬開発において、抗 PEG 抗体の産

生とそれに伴う ABC 現象が開発の課題となる可能性は否定できない (Figure 4-1)。しかしながら、現状 siRNA 内包 LNP の繰り返し投与における PEG 脱離速度 (PEG shedding rate) が抗 PEG 抗体の産生さらには RNAi 活性に与える影響を精査した報告はほとんどない。

以上のことから、本章では、LNP 投与時のマウスにおける抗 PEG 抗体の誘導と ABC 現象に対する PEG 脱離速度の影響に関して検討を行った。

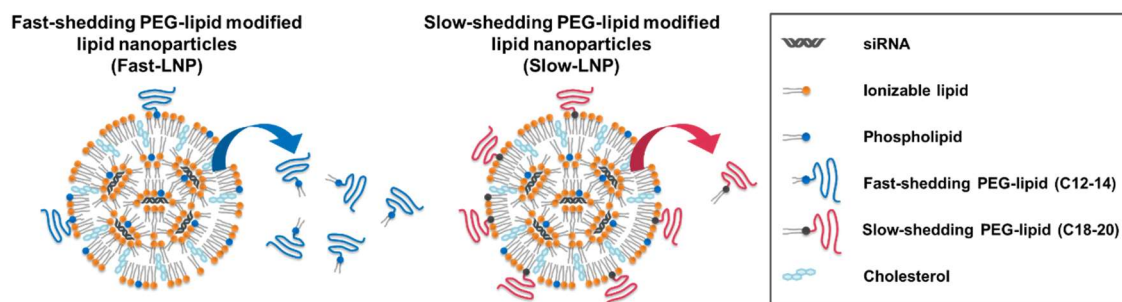


Figure 4-1. Image of lipid nanoparticles (LNP) modified with fast and slow-shedding PEG-lipid

第2節 実験方法

第1項 試薬・動物

2-ブチルオクチル 10-(1-メチルピペリジン-4-カルボニルオキシ)イコサノエート (L120) は相互薬工 (Fukuoka, Japan) で合成したものをを用いた。1,2-ジステアロイルグリセロール-3-ホスファチジルコリン (DSPC)、コレステロールは日本精化 (Osaka, Japan) より購入した。1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン-2000 (DMG-PEG, Cat. No. GM-020)、2-ジステアロイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン-2000 (DSG-PEG, Cat. No. GS-020) は日油 (Tokyo, Japan) より購入した。酢酸ナトリウム、硫酸、リン酸二ナトリウム、無水クエン酸、過酸化水素、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 粉末、PBS (-)、Triton X-100、メタノール、エタノール、1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール、ダルベッコ変法イーグル培地 (低グルコース)、コラゲナーゼタイプ X、ペニシリン-ストレプトマイシンは富士フイルム和光純薬 (Tokyo, Japan) より購入した。クエン酸一水和物は Avantor (Radnor, PA) より購入した。トリス EDTA 緩衝液 (10× Powder) はタカラバイオ (Shiga, Japan) より購入した。トリエチルアミン、ウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin, BSA) はシグマアルドリッチ (St. Louis, MO) より購入した。SuperBlock T20 (TBS) ブロッキング緩衝液はテルモ (Tokyo, Japan) より購入した。1,2-フェニレンジアミンは東京化成工業 (Tokyo, Japan) より購入した。Goat anti-Mouse IgM Antibody HRP Conjugated (Cat. No. A90-101P) および goat anti-Mouse IgG-Fc Fragment Antibody HRP

Conjugated (Cat. No. A90-131P) は Bethyl Laboratories (Montgomery, TX)より購入した。トリス緩衝生理食塩水(Tween 20 含有) (TBST-10×)は Cell Signaling (Tokyo, Japan) より購入した。各 siRNA はジーンデザイン (Osaka, Japan)より購入した (Table 4-1)。Biophen Factor VII Assay Kit は Aniera Diagnostica (West Chester, OH)より購入した。イソフルランは MSD Animal Health (Tokyo, Japan)より購入した。UltraPure DNase/RNase-Free distilled water、Quant-iT RiboGreen RNA Assay Reagent、Liver Perfusion Medium、エチレンジアミン四酢酸、ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)、ウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin、BSA)、 fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse F4/80 antibody (Cat. No. 11-4801-85) はサーモフィッシャー (Waltham, MA) より購入した。Percoll は GE ヘルスケア (Chicago, IL)より購入した。Pharm Lyse buffer、anti-mouse CD16/CD32 antibody (Cat. No. 553141) 、 phycoerythrin-cyanine 7-conjugated anti-mouse CD11b antibody (Cat. No. 552850) は BD Biosciences (San Jose, CA) より購入した。ヨウ化プロピジウムは同仁化学研究所(Kumamoto, Japan)より購入した。重水 (D₂O) は Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA)より購入した。

BALB/cCrSlc マウス (雄、4-5 週齢) は日本 SLC (Hamamatsu, Japan)より購入した。マウスは水および飼料を自由摂取とした。動物実験はエーザイ株式会社の動物実験委員会の承認の下で実施した。

Table 4-1. siRNA sequences used

siRNA	Sense or antisense	Sequence [5'-3']
siFVII	Sense	GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdT
	Antisense	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT
siGFP	Sense	AcAuGAAGcAGcACGACuUuu
	Antisense	AAGUCGUGCUGCUUcAUGUuu
Alexa647-labeled siGFP	Sense	AcAuGAAGcAGcACGACuUdTsdT
	Antisense	AAGUCGUGCUGCUUcAUGUdTsdTs-aminoC6 linker-Alexa Fluor 647

N = RNA, dN = DNA, n = 2'-OMe RNA, Nf = 2'-F RNA, s = phosphorothioated. Alexa Fluor 647 was attached to the 3' -end of the antisense strand. FVII, factor VII; GFP, green fluorescent protein.

第2項 Lipid nanoparticles (LNP) の調製

典型的な LNP の調製法を以下に示す。初めに、siRNA を 1.5 mg/mL となるように pH 4.0 に調製した 25 mM 酢酸ナトリウム緩衝液または 10 mM クエン酸緩衝液に溶解した。イオン化脂質 (L120)、DSPC、コレステロールおよび PEG-lipid [DMG-PEG (C14) or DSG-PEG (C18)]は、モル比 60/8.5/30/1.5 として、エタノールに溶解し、47 mg/mL とした。siRNA および総脂質の質量比は 0.1 (wt/wt)となるようにシリンジポンプおよびマイクロミキサーを用いて、siRNA 水溶液および脂質エタノール溶液を混合することで LNP を調製した。混合時の siRNA およびエタノールの送液速度は、15 mL/min および 5 mL/min とした。得られた 25%のエタノールを含む LNP 溶液は、透析チューブ (100 kD) を用いて、外水相を pH 7.5 のリン酸緩衝液 (PBS) に置換した。置換後、LNP を 0.22- μ m のメンブレンフィルターを用いて濾過滅菌後、実験に用いた。

第3項 平均粒子径、siRNA 濃度、封入率の測定

平均粒子径および多分散度指数 (PdI) を動的光散乱法 [Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK)] により測定した。また、siRNA の LNP への封入率 (Encapsulation efficiency, EE %) は、全 siRNA 濃度 (Total) および内包されていない siRNA 濃度 (Free) を、蛍光色素を用いた Quant-iT Rigoreen RNA assay kit または逆相 HPLC により測定し、以下の式に従って算出した: $EE (\%) = (1 - \text{free siRNA concentration} / \text{total siRNA concentration}) \times 100$ 。試験に用いた LNP の平均粒子径および PdI は 70–100 nm (PdI < 0.2)、封入率は 80%以上であった (Table 4-2)。

典型的な HPLC の分析条件を以下に示す。

カラム	XBridge BEH C18 XP (130Å, 2.5 μ m, 4.6 mm \times 75 mm; Waters, Tokyo, Japan)
移動相 A	Water containing 100 mM 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol and 8 mM triethylamine
移動相 B	Methanol
送液速度	1.0 mL/min
カラム温度	60°C
グラジエント B	(0–17 min, 5–30%) \rightarrow (17–18.01 min, 30–100%) \rightarrow (18.01–32 min, 100%) \rightarrow (32–33.01 min, 100–5%) \rightarrow (33.01–35 min, 5%)
インジェクション	15 μ L
検出器	UV (260 nm)

Table 4-2. Particle sizes, polydispersity index, and siRNA encapsulation efficiency of LNP

LNP ID	Mean particle size (nm)	PdI	siRNA encapsulation efficiency (%)
siGFP-DMG-LNP	94	0.15	91
siGFP-DSG-LNP	87	0.03	92
sFVII-DMG-LNP	85	0.13	88
siFVII-DSG-LNP	77	0.05	91
siGFP-Alexa Fluor 647-DMG-LNP	82	0.02	96

Particle sizes and polydispersity index (PdI) were determined with a Zetasizer Nano ZS particle and molecular size analyzer. Encapsulation efficiency (EE) was evaluated by using a Quant-iT RiboGreen assay Reagent and calculated as follows: EE (%) = (1 – free siRNA concentration/total siRNA concentration) × 100.

第4項 核磁気共鳴分光法 (NMR spectroscopy) による PEG 脱離速度の測定

各 LNP を 68 μ L (siRNA として 0.68 mg/mL) サンプルングし、17 μ L の D₂O (99.8% D) および 85 μ L の BALB/cCrSlc マウス血清と室温で混合した。その後、混合物を 3-mm NMR 管に移し、迅速に NMR による試験を開始した。測定には、Bruker AVANCE II 700 NMR 分光計 (Bruker, Billerica, MA) を用い、300 K で実施した。PEG 脱離プロファイルは、2D stimulated echo pulse sequence (Bruker パルスプログラム step1s) で記録した [113]。その際、磁場勾配強度 (gradient strength, g) は、16 ステップで 5% から 95% まで増加させた。拡散時間 (diffusion time, Δ) は 200 ms、グラジエントの長さ (diffusion gradient length, δ) は 10 ms、緩和時間 (relaxation delay, d1) は 1 s、観測時間 (acquisition time) は 4 s とした。

「LNP に修飾 (結合) されている PEG, PEG-LNP」と「遊離の PEG, Free-PEG」は ¹H 化学シフトが重複している一方、それらの拡散係数 (diffusion coefficients) は著しく異なるため、観測された NMR シグナル強度を次の方程式に当てはめることができる。

$$S = S_{0,LNP} \exp\left\{-\gamma^2 \delta^2 g^2 D_{LNP} \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right\} + S_{0,free} \exp\left\{-\gamma^2 \delta^2 g^2 D_{free} \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right\}$$

ここで、 S は各ステップで観測された PEG のシグナル強度であり、 $S_{0,LNP}$ および $S_{0,free}$ は、磁場勾配強度 g が 0 の場合の PEG-LNP および Free-PEG のシグナル強度を指す。また、

γ は ^1H の磁気回転比であり、 D_{LNP} および D_{free} は、それぞれ PEG-LNP および Free-PEG の拡散係数である。各実験ポイントでの PEG-LNP と Free-PEG の存在割合は、 $S_{0,\text{LNP}} / (S_{0,\text{LNP}} + S_{0,\text{free}})$ および $S_{0,\text{free}} / (S_{0,\text{LNP}} + S_{0,\text{free}})$ として表すことができる。また、各 LNP の NMR データは TopSpin 3.2 (Bruker, Billerica, MA) を用いてプロセッシングした。

第5項 LNP 投与による抗 PEG 抗体産生の評価

各グループ 4 匹のマウスに、PBS または緑色蛍光タンパク質に特異的な siRNA (siGFP) を内包した LNP (siGFP-LNP) を 0.003、0.03 または 0.3 siGFP mg/kg (0.053、0.53 または 5.3 $\mu\text{mol total lipid/kg}$) となるように尾静脈より単回投与した。その後、任意の時点で、血液採血用チューブ [キャピジェクト; CJ-AS (テルモ, Tokyo, Japan)] を用い、イソフルラン麻酔下で下大静脈から採血を行い、得られた血清を試験まで冷凍保存した。その後、血清中の抗 PEG IgM または抗 PEG IgG を第2章・第2節・第7項の記載に従い測定した。その際、一部の試薬は第4章・第2節・第1項に記載のものを使用した。

第6項 Factor VII ノックダウン評価

各グループ 4 匹のマウスに、PBS または siGFP-LNP を 0.3 siGFP mg/kg (5.3 $\mu\text{mol total lipid/kg}$) となるように尾静脈より単回投与した。1 週間後、Factor VII に特異的な siRNA (siFVII) を内包した LNP (siFVII-LNP) を 0.3 または 1 siFVII mg/kg (5.3 または 17.8 $\mu\text{mol total lipid/kg}$) となるように尾静脈より投与した。siFVII-LNP 投与から 1 日後に、イソフルラン麻酔下で下大静脈から採血を行い、得られた血漿中の Factor VII レベルを Biophen Factor VII Assay Kit を用いて測定した。PBS 投与群の Factor VII 測定値を 100% とし、各検体の相対 Factor VII 値を算出した。

第7項 *Ex vivo* における siRNA の体内分布評価

各グループ 3~4 匹のマウスに、PBS または siGFP-LNP を 0.3 siGFP mg/kg (5.3 $\mu\text{mol total lipid/kg}$) となるように尾静脈より単回投与した。1 週間後、Alexa Fluor 647 でラベルした siGFP (siGFP-Alexa Fluor 647) を内包した LNP (siGFP-Alexa Fluor 647-DMG-LNP) を 0.3 siGFP-Alexa Fluor 647 mg/kg (5.1 $\mu\text{mol total lipid/kg}$) となるように尾静脈より投与した。1 時間後、マウスから各臓器 (肝臓、脾臓、腎臓、肺、心臓) を採取し、ImageQuant LAS 4000 digital imaging system (富士フイルム、Tokyo, Japan) を使用して画像解析を行った。

第8項 siRNAの肝臓内分布評価

各グループ3匹のマウスに、PBSまたはsiGFP-LNPを0.3 siGFP mg/kg (5.3 μ mol total lipid/kg)となるように尾静脈より単回投与した。1週間後、siGFP-Alexa Fluor 647-DMG-LNPを0.3 siGFP-Alexa Fluor 647 mg/kg (5.1 μ mol total lipid/kg)となるように尾静脈より投与し、1時間後にイソフルラン麻酔下で、肝臓をLiver Perfusion Mediumで10分間灌流した。次に、100 units/mL コラゲナーゼタイプXを含むダルベッコ変法イーグル培地(低グルコース)を用い、追加で10分間灌流を行った。その後、肝臓を採取し、培地[10% FBSおよび1 \times penicillin-streptomycinを含むダルベッコ変法イーグル培地(低グルコース)]に分散させた。次に、100 μ m-mesh cell strainerでろ過後、細胞を100 \times gで5分間遠心分離し、肝細胞画分(ペレット)とクッパー細胞画分(上清)を得た。肝細胞画分は45% (v/v) Percollと0.5 \times PBSを含む50 mLの培地に再懸濁し、300 \times gで10分間遠心分離した。クッパー細胞画分は700 \times gで3分間遠心分離し、1 mLの Pharm Lyse bufferに再懸濁することで赤血球を除去した。FACS (fluorescence-activated cell sorting) 染色を行う前に、両画分をFACS緩衝液[2 mMのエチレンジアミン四酢酸および0.5% (w/w) BSAを含むPBS (-)]で2回洗浄した。

各細胞(1-2 \times 10⁶)をanti-mouse CD16/CD32 antibodyと氷上で5分間プレインキュベートし、Fc受容体をブロックした。続いて、fluorescein isothiocyanate-labeled anti-mouse F4/80 antibodyおよびphycoerythrin-cyanine 7-conjugated anti-mouse CD11b antibodyを用い、氷上で30分間染色した。次に、細胞を氷上で5 μ g/mL ヨウ化プロピジウム (PI)と5分間インキュベートした。染色した細胞は、SH800セルソーター(ソニー、Tokyo, Japan)とFlowJoソフトウェア10.4(Tree Star, Ashland, OR)を用いて解析した。ゲーティング戦略を以下に示す。肝細胞(FSC^{high} SSC^{high} F4/80⁻ CD11b⁻);クッパー細胞(FSC^{low} SSC^{low} PI⁻ F4/80⁺ CD11b⁺)。LNPを投与していないマウス細胞の平均蛍光強度(MFI)を差し引いた後のMFIの変化(Δ MFI)を蛍光ラベルsiRNA (siGFP-Alexa Fluor 647)の細胞蓄積量として定量化した。

第9項 統計学的解析

グラフ描画と統計解析は、GraphPad Prism 8.3.1 (GraphPad Software, San Diego, CA)を使用して行った。Brown-Forsythe testにより分散の均一性を評価した後、データをordinary one-way ANOVAまたはBrown-Forsythe ANOVAにて解析した。その後、Dunnett's multiple comparisons test、Tukey's multiple comparisons testまたはDunnett's T3 multiple comparisons testを行った。全てのデータは平均値 \pm S.E.M.で表した。

第3節 結果

第1項 LNPからのPEG脂質の脱離速度

初めに、GFPまたはFVII特異的なsiRNAを内包したDMG-LNP(短いアシル鎖のPEG脂質が修飾されたLNP)およびDSG-LNP(長いアシル鎖のPEG脂質が修飾されたLNP)のPEG脱離プロファイルを評価した。本試験は、*in vitro*において、各LNPをマウス血清と混合後にインキュベートし、NMRによってLNPに結合しているPEG脂質の量を決定するものである[113]。検討の結果、実験開始時点(血清と混合直後)で、PEG脂質の80%~87%がLNPに結合していることが明らかとなった。siGFPおよびsiFVIIを内包したDSG-LNPの場合、PEG脂質は強固にLNPに結合しており、非常に脱離速度が遅く、初期値と比較して試験中に大きな変化は確認されなかった。対照的に、siGFPおよびsiFVIIを内包したDMG-LNPでは、DMG-PEGの約50%が3時間以内にLNPから脱離し、80%以上が6時間以内に脱離することが明らかとなった。本項での検討により、LNPに内包されているsiRNAの配列は、PEG脂質の脱落速度に影響を与えないことが確認された(Figure 4-2)。

以上のことから、DSG-PEGと比較するとDMG-PEGは速やかにLNPから脱離していることが明らかとなり、意図した通り、PEG脱離速度の異なるLNPが調製されていることが示された。

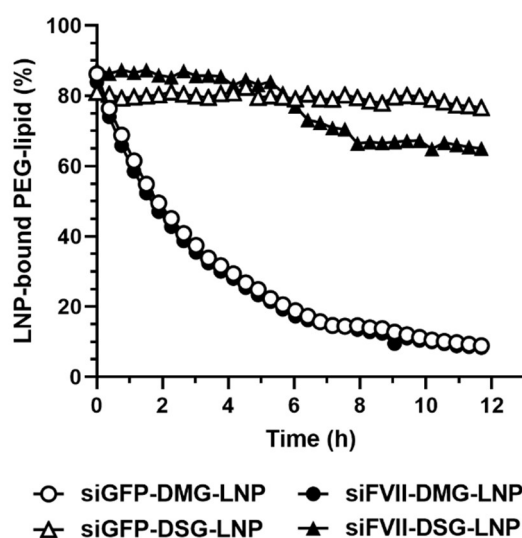


Figure 4-2. PEG shedding profiles of DMG-LNP and DSG-LNP in mouse serum. Sixty-eight microliters of lipid nanoparticles (LNP) conjugated with DMG-PEG or DSG-PEG and encapsulating siRNA specific for green fluorescent protein (GFP) or factor VII (FVII) was mixed with 17 μ L of D₂O and 85 μ L of mouse serum. The mixture was transferred to a 3-mm nuclear magnetic resonance tube, and the PEG shedding rate was immediately evaluated by nuclear magnetic resonance.

第2項 DMG-LNP および DSG-LNP 単回投与時の抗 PEG 抗体産生量

前項において、DMG-PEG が Fast shedding PEG 脂質、DSG-PEG が Slow shedding PEG 脂質として機能することを示した。本項では、これらの PEG 脂質を用い、LNP からの PEG の脱離速度が抗 PEG IgM の産生に与える影響を評価した。まず、siGFP を内包した DMG-LNP (Fast-LNP) または DSG-LNP (Slow-LNP) を 0.003、0.03 または 0.3 mg siGFP/kg (0.053、0.53 または 5.3 $\mu\text{mol total lipid/kg}$) となるようにマウス尾静脈内に投与した。対照実験には PBS を用いた。血清サンプルは、過去の報告で抗 PEG 抗体の産生とそれに伴う ABC 現象が誘導されることが期待される初回投与後 7 日目とした[53, 81, 90]。その結果、DMG-LNP では、0.003 および 0.03 mg/kg で、わずかではあるものの PBS 群と比較して抗 PEG IgM レベルが有意に増加することが確認された。また、0.3 mg/kg では、PBS と比較して有意な変化は認められなかった。一方、DSG-LNP では、全ての投与量で有意かつ著しい抗 PEG IgM 産生が確認された。この際の DSG-LNP によって誘導された抗 PEG IgM レベルは、DMG-LNP によって誘導されたレベルの 3 倍から 5 倍程度であった(Figure 4-3A)。

次に、抗 PEG IgM の産生が認められた siGFP-DSG-LNP (0.3 siGFP mg/kg) を尾静脈内投与したマウスにおいて、血清中抗 PEG IgM の経時変化を評価した。その結果、血清中の抗 PEG IgM は投与後 1 週間でピークに達し、その後徐々に減少、5 週間後では 1 週間後の抗 PEG IgM の量の 3 分の 1 程度まで減少することが明らかとなった (Figure 4-3B)。この推移は、PEG 修飾リポソームを使用した過去の報告と一致していた[90]。以上のことから、PEG 脂質のアシル鎖の長さ、つまりは LNP からの PEG 脂質の脱離速度が、抗 PEG IgM の産生に影響することが示唆された。

また、本項での検討において、siGFP-DMG-LNP および siGFP-DSG-LNP (0.3 siGFPmg/kg) 共に、単回投与後 5 週目まで抗 PEG IgG をモニタリングしたが、顕著な抗 PEG IgG の産生量の増加は確認されなかった (Data not shown)。

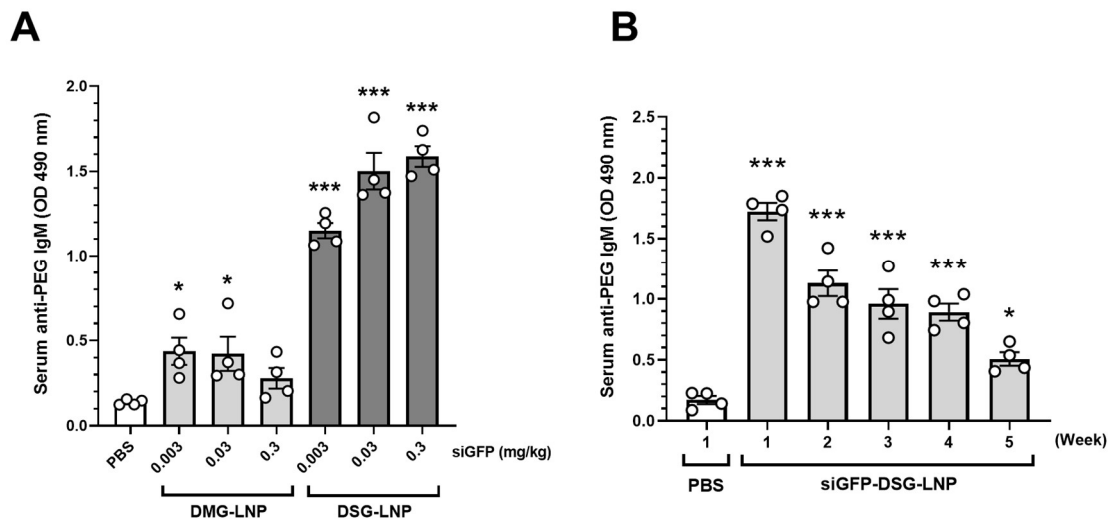


Figure 4-3. Effects of PEG-lipid acyl chain length and lipid nanoparticle dose on anti-PEG IgM production. (A) Mice were injected with DMG-LNP or DSG-LNP via the tail vein at 0.003, 0.03, or 0.3 siGFP mg/kg corresponding to 0.053, 0.53, or 5.3 μ mol total lipids/kg. Serum was collected on Day 7 after administration. Anti-PEG IgM in the serum was quantified by enzyme-linked immunosorbent assay. (B) Mice were administered with DSG-LNP (0.3 siGFP mg/kg corresponding to 5.3 μ mol total lipids/kg) via the caudal vein. Sera were collected weekly until Week 5 after administration. Anti-PEG IgM in the serum was quantified by enzyme-linked immunosorbent assay. Open circles represent values for individual mice. Data are presented as means \pm S.E.M. (n = 4). * and *** indicate $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively, vs. PBS-treated control.

第3項 RNAi 活性に対する PEG アシル鎖長の影響

PEG アシル鎖長が LNP の RNAi 活性に与える影響を精査するため、初回投与に siGFP-DMG-LNP (Fast-LNP) または siGFP-DSG-LNP (Slow-LNP) を 0.3 siGFP mg/kg (5.3 μ mol total lipid/kg) となるようにマウスに投与した。初回投与から 7 日後に siFVII-DMG-LNP (Fast-LNP) または siFVII-DSG-LNP (Slow-LNP) を 0.3 または 1 siFVII mg/kg (5.3 または 17.8 μ mol total lipid/kg) となるようにマウスに投与することで、初回に投与された LNP により誘導された抗 PEG IgM が 2 回目投与以降の siFVII-LNP の RNAi 活性にどの程度影響を及ぼすか検討した。対照実験には、前項と同じく PBS を投与したマウスを用いた。

その結果、PBS を前投与した群では、2 回目に siFVII-DMG-LNP を投与することで、血漿中 FVII タンパク質レベルが有意に低下した。また、その際のノックダウン効率は 0.3 または 1 siFVII mg/kg 共に 90% 以上であった。同様に、siGFP-DMG-LNP を前投与した群においても、1 週間後に siFVII-DMG-LNP を投与することで、血漿中 FVII タンパク質レベルが有意に低下することを確認した。本群では、PBS を前投与した群と比較して、わずかに血漿中 FVII タンパク質レベルが有意に高い値を示したものの、80% 程度のノックダウン

効果は維持されており、siGFP-DMG-LNP 前投与による影響は顕著ではなかった。一方で、siGFP-DSG-LNP を前投与した群では、siFVII-DMG-LNP の高投与量 (1 siFVII mg/kg) では血漿中 FVII タンパク質レベルのほぼ 80% をノックダウンするという高い活性を維持していたのに対し、低投与量 (0.3 siFVII mg/kg) においては、血漿中 FVII タンパク質のノックダウン効果は 20% 程度まで低下した (Figure 4-4A)。

次に、2 回目に siFVII-DSG-LNP を投与した場合において検証を行った。その結果、PBS を前投与した群では、2 回目に投与した siFVII-DSG-LNP により血漿中 FVII タンパク質レベルは有意に減少した。その RNAi 活性は、siGFP-DMG-LNP と比較してわずかに劣るものの、それぞれの投与量で、70% および 90% 程度のノックダウン効果を示した。また、siGFP-DMG-LNP を前投与した群では、2 回目に投与した siFVII-DSG-LNP により血漿中 FVII タンパク質レベルが有意に低下した。その際の活性は PBS を前投与した群で観察された活性と同等であったことから、siGFP-DMG-LNP 前投与の影響はほぼないものと考えられる。しかしながら、siGFP-DSG-LNP を前投与した群では、siFVII-DSG-LNP を 0.3 siFVII mg/kg で投与した場合、コントロール群 (PBS⇒PBS) と比較して有意なノックダウン活性を示さなかった。また、siFVII-DSG-LNP を 1 siFVII mg/kg で投与した場合においても、コントロール群と比較して血漿中 FVII タンパク質レベルを約 40% 程度は減少させたものの、有意な変化は確認されなかった (Figure 4-4B)。

以上のことから、siGFP-DSG-LNP (Slow-LNP) を前投与した群では、2 回目投与以降の siFVII-LNP による RNAi 活性が有意に低下することが明らかとなり、siFVII-DMG-LNP (Fast-LNP) よりも siFVII-DSG-LNP (Slow-LNP) の方がより初回投与検体の影響を受けやすいことが示された。

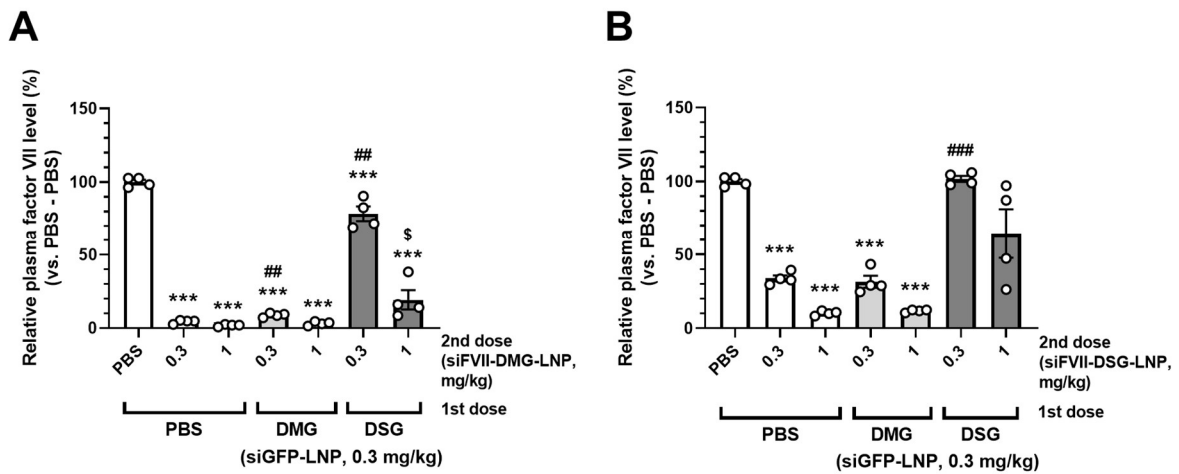


Figure 4-4. Effects of PEG acyl chain length on RNAi activity in mice. As the initial dose, LNP encapsulating siGFP (siGFP-DMG-LNP or siGFP-DSG-LNP, 0.3 siGFP mg/kg corresponding to 5.3 μ mol total lipids/kg) were intravenously administered to mice. On Day 7 after the initial dose, LNP containing siRNA to factor VII (siFVII) (siFVII-DMG-LNP or siFVII-DSG-LNP, 0.3 or 1 siFVII mg/kg corresponding to 5.3 or 17.8 μ mol total lipids/kg) were intravenously administered. Mouse plasma was collected 1 day after the second dose of LNP and FVII protein levels were determined. (A) FVII activity in mice treated with siFVII-DMG-LNP as the second dose of LNP. ***, $p < 0.001$ vs. mice treated with PBS at both dosings. ##, $p < 0.01$ vs. mice treated with PBS and then siFVII-DMG-LNP (0.3 siFVII mg/kg corresponding to 5.3 μ mol total lipids/kg). §, $p < 0.05$ vs. mice treated with PBS and then siFVII-DMG-LNP (1 siFVII mg/kg corresponding to 17.8 μ mol total lipids/kg). (B) FVII activity in mice treated with siFVII-DSG-LNP as the second dose of LNP. ***, $p < 0.001$ vs. mice treated with PBS at both dosings. ### $p < 0.001$ vs. mice treated with PBS and then siFVII-DSG-LNP (0.3 siFVII mg/kg corresponding to 5.3 μ mol total lipids/kg). Open circles represent values for individual mice. Data are presented as means \pm S.E.M. (n = 4).

第 4 項 初回投与 LNP の PEG アシル鎖長が 2 回目投与 LNP の生体内分布に与える影響

初回投与 LNP の PEG アシル鎖長の違いにより、抗 PEG IgM の産生とそれに起因すると考えられる 2 回目投与 LNP の RNAi 活性の低下が認められたことから、各 LNP で前処置を行ったマウスにおいて、2 回目投与 LNP により送達される siRNA の生体内分布がどのような変化するか精査した。まず、マウスに PBS、siGFP-DMG-LNP (Fast-LNP) または siGFP-DSG-LNP (Slow-LNP) を前投与した。次に、1 週間後に siGFP-Alexa Fluor 647-DMG-LNP (Fast-LNP) を投与し、各種臓器 (肝臓、脾臓、腎臓、肺、心臓) 中の siRNA の生体内分布を評価した。その結果、PBS を前投与した群では、siRNA は主に肝臓に蓄積し、脾臓、腎臓、肺への蓄積量は低く、心臓にはほとんど蓄積していなかった。siGFP-DMG-LNP または siGFP-DSG-LNP を前投与した群では、PBS 前投与群と比較して肝臓と脾臓で有意な蓄積量の増加が認められた。また、siGFP-DSG-LNP を前投与した群では、PBS および siGFP-DMG-LNP を前投与した群と比較して、有意差を持って肺へより多く蓄積する

ことが明らかとなった。一方で、腎臓や心臓では、siRNA の蓄積量に有意な変化は認められなかった (Figure 4-5)。

次に、フローサイトメトリーを使用して、PBS、siGFP-DMG-LNP および siGFP-DSG-LNP の前投与により、その後の siGFP-Alexa Fluor 647-DMG-LNP (0.3 siGFP-Alexa Fluor 647 mg/kg) の肝臓 (肝細胞またはクッパー細胞) における siRNA の細胞蓄積量と分布に及ぼす影響について評価した。肝細胞とクッパー細胞の細胞分画は、各細胞の特異的マーカーを使用して評価した (Figure 4-6A および 6B)。その結果、PBS を前投与した群では、2 回目に投与した LNP により、siRNA は肝細胞とクッパー細胞の両方に蓄積していることが明らかとなった。一方で、siGFP-DMG-LNP を前投与した群では、肝細胞への siRNA の蓄積量はコントロールである PBS 前投与群と比較して有意に低くなることが明らかとなった。また、クッパー細胞における蓄積量も増加する傾向にあったが、PBS 群と比較して増加しているものの有意ではなかった。一方で、siGFP-DSG-LNP を前投与した群では、肝細胞において siRNA の蓄積は非常に微量しか確認されず、ほぼ全てがクッパー細胞に蓄積し、その値も PBS 群と比較して著しく高かった (Figure 4-6C)。

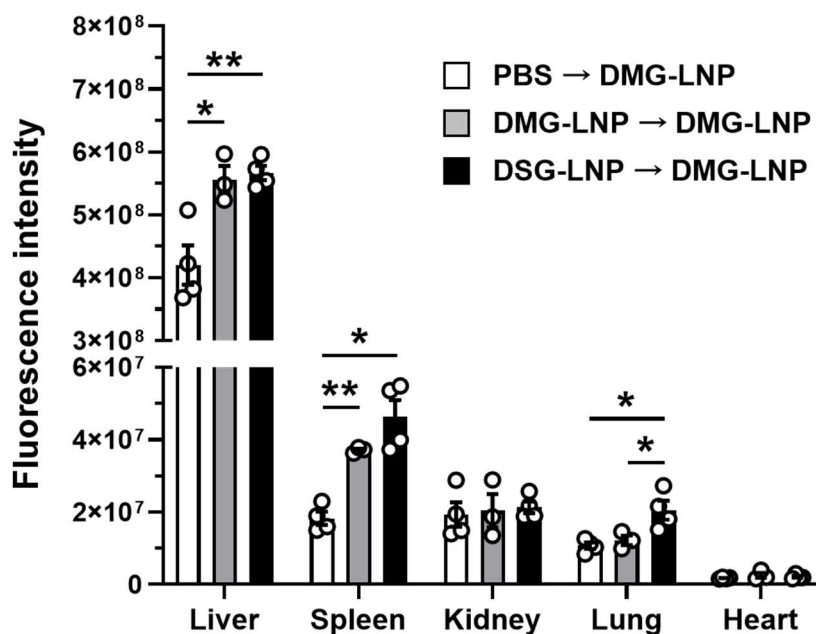


Figure 4-5. Biodistribution of siRNA delivered via DMG-LNP in mice pretreated with different LNP. Mice were intravenously administered PBS, siGFP-DMG-LNP, or siGFP-DSG-LNP (0.3 siGFP mg/kg corresponding to 5.3 μ mol total lipids/kg). On Day 7 after the initial injection, siGFP-Alexa Fluor 647-DMG-LNP (0.3 siGFP-Alexa Fluor 647 mg/kg corresponding to 5.1 μ mol total lipids/kg) was intravenously administered to the mice. One hour after the second injection, the organs (liver, spleen, kidney, lung, and heart) were harvested and the *ex vivo* fluorescence intensity in each organ was measured by using an ImageQuant LAS 4000 digital imaging system. Open circles represent values for individual mice. Data are presented as means \pm S.E.M. (n = 3 or 4). * and ** indicate p < 0.05 and p < 0.01, respectively.

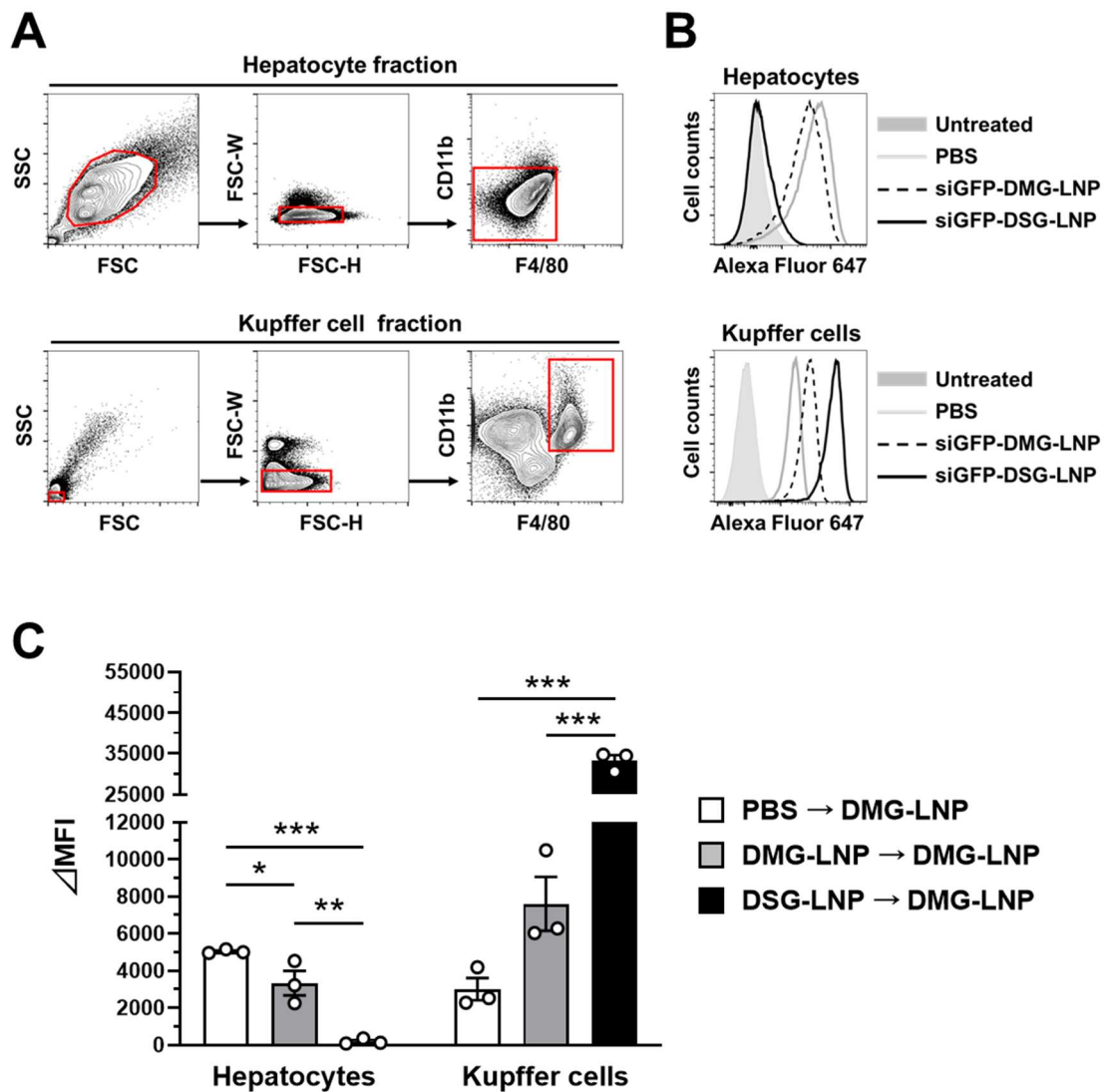


Figure 4-6. Accumulation of siRNA delivered by DMG-LNP in hepatocytes and Kupffer cells in the liver. Mice were intravenously administered PBS, siGFP-DMG-LNP, or siGFP-DSG-LNP (0.3 siGFP mg/kg corresponding to 5.3 μmol total lipids/kg). On Day 7 after the first administration, siGFP-Alexa Fluor 647-DMG-LNP (0.3 siGFP-Alexa Fluor 647 mg/kg corresponding to 5.1 μmol total lipids/kg) was intravenously administered. One hour after the second administration, hepatocytes and Kupffer cells were isolated from the liver and analyzed by using flow cytometry. (A) Gating strategies for hepatocytes ($\text{FSC}^{\text{high}} \text{SSC}^{\text{high}} \text{F4/80}^- \text{CD11b}^-$) and Kupffer cells ($\text{FSC}^{\text{low}} \text{SSC}^{\text{low}} \text{PI}^- \text{F4/80}^+ \text{CD11b}^+$). (B) Representative histograms of siGFP-Alexa Fluor 647 in the hepatocyte and Kupffer cell fractions. Pretreatments are shown in the figures. Gray solid, black dashed, and black solid lines indicate the PBS-, siGFP-DMG-LNP-, and siGFP-DSG-LNP-treated groups, respectively. Shaded histograms show the untreated group. (C) Amounts of siGFP-Alexa Fluor 647 in the hepatocyte and Kupffer cell fractions. ΔMFI = mean fluorescence intensity (MFI) – MFI of cells of non-LNP-treated mice. Open circles represent values for individual mice. Data are presented as means \pm S.E.M. ($n = 3$). *, **, and *** indicate $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively.

第4節 考察

PEG 修飾は、LNP にとって製剤の調製工程だけでなく、その保管安定性を確保する上で重要である[39, 112]。また、PEG 修飾により、LNP がマクロファージなどの貪食細胞に取り込まれる割合が減り、LNP の血中滞留性も向上する。これにより LNP が他の細胞に取り込まれる確率が高まる。しかしながら、過剰な PEG 修飾は、ナノ粒子と標的細胞との相互作用を妨げ、内包された siRNA などの薬物の細胞内取り込みおよび細胞質への送達量を減少させることが知られている。このような PEG による「ナノ粒子の生体安定性の向上」と「細胞との接触阻害による細胞内取り込み量の減少」という相反する特性は“PEG ジレンマ”として広く認識されている[122-125]。

LNP では、この“PEG ジレンマ”の課題に対して、血中で PEG 脂質自体をナノ粒子から脱離させるという手法が取られることが多く、PEG 修飾 LNP が内包する siRNA を標的細胞に効率的に送達するために、PEG 脂質の脱離速度が重要なファクターであることが複数の論文で提唱されている[40, 116, 118, 126]。LNP に内包された薬物を効率的に標的細胞へ送達するためには、LNP が細胞に取り込まれる前、もしくは相互作用が始まるまでに LNP 表面の PEG 脂質の一部または全てが LNP から脱離することが理想である。この PEG 脱離のタイミングが非常に重要であり、脱離が速すぎる場合、その動態特性から LNP の標的細胞はほぼ肝臓に限定される。一方で、脱離が遅すぎる場合には、LNP を肝臓以外の組織へ分布させることは可能となるが、逆に LNP の細胞内移行が妨げられ、期待した効果を得られない可能性がある。

本章における検討の結果、脱離速度の速い PEG 脂質 (Fast shedding PEG 脂質) を用いることで、抗 PEG IgM の産生が抑制されることを見出した。既報において、抗 PEG IgM 産生における脾臓 MZ-B 細胞が重要な役割を果たすこと、さらには抗 PEG IgM の誘導には PEG 修飾ナノ粒子による MZ-B 細胞の刺激が重要であり、遊離の PEG 分子のみでは抗 PEG IgM の産生は非常に弱いことが明らかとなっている[51, 53, 64, 81]。これらの報告から、今回投与された Fast shedding PEG 脂質 (DMG-PEG) の大部分が血中で速やかに LNP から脱離し、LNP が脾臓に到達した時には、LNP の表面に残った PEG 脂質の量が非常に少なく、脾臓の MZ-B 細胞を刺激するに至らなかった可能性が示唆される。その結果、Fast shedding PEG 脂質で修飾した LNP (Fast-LNP) を前投与した場合、抗 PEG IgM がほとんど産生されず、2 回目に投与した siFVII-DMG-LNP および siFVII-DSG-LNP の FVII タンパク質のノックダウン効果を阻害しなかったと考えられる。対照的に、Slow shedding PEG (DSG-LNP) を修飾した LNP (Slow-LNP) は、投与後に抗 PEG IgM の産生を誘導し、2 回目に投与した siFVII-DMG-LNP および siFVII-DSG-LNP のクッパー細胞への取り込みを促進することで、肝細胞への siFVII の移行量が低下し、FVII タンパク質のノックダウン効果が減弱したと考えられる。従って、本結果は、PEG の脱離速度を最適化することによ

り、LNP の細胞との相互作用と免疫原性を制御することが可能であることを示唆するものである。

PEG 修飾リポソームにおいては、初回に投与する脂質量が低いほど、抗 PEG IgM が産生され、ABC 現象が誘導されやすいことが明らかとなっている[81, 90, 103]。さらに、既報、第 2 章および第 3 章の結果から、抗がん剤などの細胞傷害性の薬物を内封した PEG 修飾リポソームでは、治療効果が期待できないほどの低投与量では抗 PEG IgM 産生が誘導されたが、臨床推奨投与量では誘導されないことが示されている[53, 81]。一方で、免疫を刺激する傾向がある核酸（プラスミド DNA または siRNA）を送達する場合、PEG 修飾リポプレックス/リポソームが、比較的高い脂質投与量においても ABC 現象を誘発することが報告されている[57, 58]。PEG 修飾リポプレックス/リポソームと LNP では、その体内動態やナノ粒子自体の免疫刺激性も異なると考えられるが、抗 PEG IgM の誘導と ABC 現象について議論をする場合、PEG 修飾ナノ粒子の脂質投与量と送達する薬物の両方の関係が非常に重要となると考えられる。

本章では、マウスに薬効用量の siGFP-DSG-LNP を投与した際にも、抗 PEG IgM が誘導されたことを示した。これは、LNP に関しては、高い脂質投与量においても、MZ-B 細胞等に免疫寛容は誘導されず、抗 PEG IgM が産生されることを示唆している。また、LNP 単独（核酸を内封しない LNP）が、ワクチンアジュバントに対する応答と同様に、B 細胞応答を誘導することが報告されている[127]。従って、LNP 自体が免疫系を活性化し、結果としてより高い脂質投与量でも PEG に対する免疫寛容が生じず、抗 PEG IgM が産生されている可能性が考えられる。さらに、本研究では、2'-*O*-メチルウリジン修飾 siRNA (siGFP) などの免疫刺激性の低い siRNA を使用していることから、内包 siRNA が免疫を過剰に刺激している可能性は低いと考えられる。これらの知見は、MZ-B 細胞の活性化を抑制するためには、「PEG の脱離速度の制御」と「siRNA の化学修飾」の両方が重要であることを示唆するものである。

今回の検討では、siFVII-DMG-LNP の FVII タンパク質のノックダウン活性が siGFP-DMG-LNP (Fast-LNP) の前投与によって影響を受けないのに対し、siGFP-DSG-LNP (Slow-LNP) を前投与した場合には、ノックダウン活性が低下することを示した。これは、siGFP-DMG-LNP を前投与した群の方が siGFP-DSG-LNP を前投与した群より、2 回目に投与した siFVII-DMG-LNP の肝細胞への移行性が高かったことを意味している。しかしながら、これらの群において肝臓全体の移行量に有意な差は認められなかった。この LNP を介した siFVII のノックダウン活性が変化するメカニズムを明らかとするため、本章では、FACS を用いて肝臓における siRNA の細胞分布を精査した。その結果、siGFP-DMG-LNP を前投与したマウスでは、肝細胞とクッパー細胞の両方で siRNA が確認されたのに対し、siGFP-DSG-LNP を前投与したマウスでは、2 回目に投与した siRNA はほぼ全てクッパー細胞に蓄積することを明らかとした。これは、DSG-LNP の初回投与によって誘導された抗 PEG IgM によって、2 回目に投与した siRNA の分布が肝細胞からクッパー細胞にシフトし

たことを意味している。以上のことから、肝細胞を標的とした siRNA の有効性をその体内動態から評価する場合、肝臓全体に蓄積した siRNA の量からは必ずしも活性を予測することができず、より正確な予測には細胞レベルでの評価が必要である可能性が示唆された。

また、過去のプラスミド DNA 内包リポソーム製剤を用いた類似の研究で、リポソームからの脱離速度の速い PEG 脂質を用いた場合には、繰り返し投与時においても皮下に移植した腫瘍組織でのタンパク質の発現量は変化しなかったことが報告されており、腫瘍組織を標的とした場合にも Fast-shedding PEG 脂質が有用である可能性が示唆されている [128]。一方で、上記の報告では、脱離速度の遅い PEG 脂質を用いた場合、抗 PEG 抗体産生により、2 回目投与製剤の腫瘍組織でのタンパク発現量は減弱するものの、肝臓におけるタンパク質の発現量は逆に増加する事例も報告されている [128]。このことから、ナノ粒子や内包する薬物の種類、そして標的組織や使用目的によっては、抗 PEG 抗体が有利に働く可能性がある。実際、PEG 修飾体の繰り返し投与時の抗体産生を利用して、脾臓 MZ-B 細胞を標的としたがん免疫療法開発を目指している報告もあり、抗 PEG 抗体とそれに伴う ABC 現象を利用した治療薬の開発が期待される [129]。

その他、本章における検討の中で非常に興味深い点は、初回投与 LNP によって血中に抗 PEG IgM が存在している状況では、例え Fast shedding PEG 脂質を修飾した LNP である DMG-LNP (Fast-LNP) を投与した場合においても、内包された siFVII の RNAi 活性が抑制される傾向にあったということである。これは、クッパー細胞による DMG-LNP の急速な取り込みが原因で、siRNA の肝細胞への移行性が低下したことを示唆している。過去の研究より、ABC 現象による PEG 修飾リポソームのクリアランスは投与後 15 分以内に発生することが明らかとなっている [43, 103]。従って、全ての PEG が LNP から脱離する前に、既存の抗 PEG IgM が LNP の表面の PEG に速やかに結合し、補体系を活性化、最終的に LNP のクリアランスが促進されていると考えられる (Figure 4-7)。

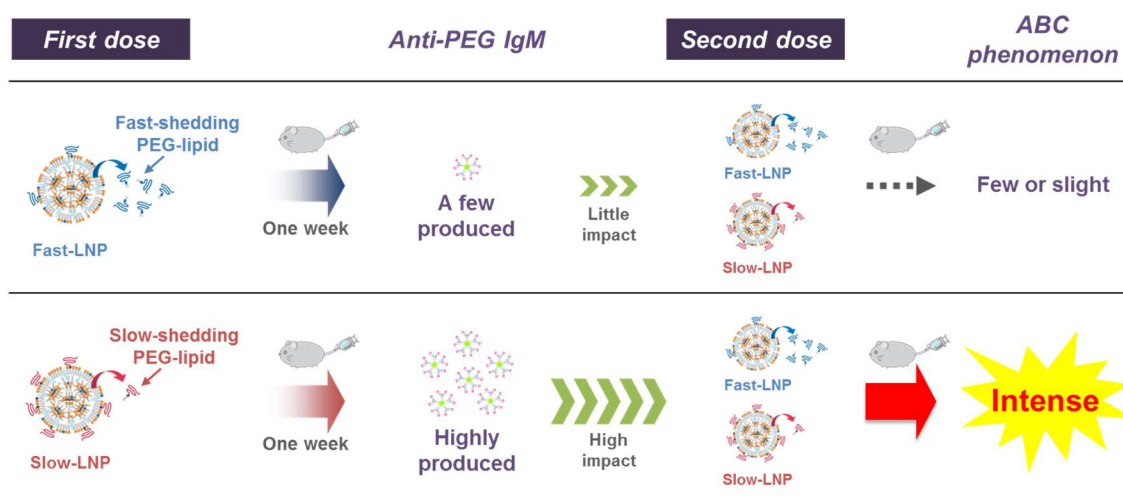


Figure 4-7. Summary of ABC phenomenon in fast and slow-shedding PEG-lipid modified LNP

近年、ヒトにおいて PEG 修飾医薬品の治療歴の有無に関わらず、さらには健常人においても既存の抗 PEG 抗体を保有している事例が多数報告されている[52, 72-74]。加えて、既存の抗 PEG 抗体が、PEG 修飾ナノ粒子や PEG 修飾タンパクなどの PEG 修飾医薬品の治療効果の減弱またはアレルギー反応などの副作用発症の原因となり得ることを示唆する報告も増えてきている[66, 69, 121, 128, 130, 131]。このことから、PEG 修飾医薬品の開発を行う上で、抗 PEG 抗体への関心は今後も増していくと考えられる。

以上より、前臨床および臨床に関わらず、既存の抗 PEG 抗体が存在した場合には、Fast-shedding PEG 脂質を用いた製剤においても ABC 現象が誘導される可能性がある。これらの知見は、PEG 修飾ナノ粒子医薬品の開発過程における抗 PEG 抗体の保有量のモニタリングの重要性を示唆するものである。

第5章 総括

本研究では、PEG 修飾ナノ粒子製剤の代表格である Doxil[®]およびそのプラセボを用い、繰り返し投与時の抗 PEG 抗体の産生とそれに伴う ABC 現象に関し、顕著な動物種差が存在することを明らかとした。また、近年、核酸のデリバリーツールとして注目される LNP に関し、ABC 現象が誘導される条件を明らかとし、さらに Fast-shedding PEG 脂質を用いることで抗 PEG IgM の産生を制御可能であることを示した。

第2章では、市販の Doxil[®]を用い、種々の動物種（マウス、ラット、イヌ、サル、ミニブタ）において、Doxil[®]投与時の抗 PEG IgM 誘導性と血漿中 DXR 濃度推移に関して、系統的な評価を行った。検討の結果、これまで ABC 現象が誘導されないと考えられていた細胞傷害性の薬物が内封された PEG 修飾リポソームにおいても、低投与量では ABC 現象が誘導されることを示した。さらに、イヌやミニブタなどの大動物に関しては、げっ歯類やサルと比較して PEG 修飾リポソームへの感受性が高く、ABC 現象が誘導されやすいことを明らかとした。加えて、全ての動物種において、Doxil[®]の臨床推奨投与量で試験を行う限り、ABC 現象が大きな課題とはならないことを示した。

第3章では、PEG 修飾リポソームに対する感受性が高いことが明らかとなったイヌにおいて、市販の Doxil[®]およびそのプラセボを用い、脂質投与量と ABC 現象の関係を精査した。検討の結果、げっ歯類で免疫寛容が引き起こされ、ABC 現象が誘導されないとされるレベルまで脂質投与量を高めても、イヌにおいては抗 PEG 抗体の産生とそれに伴う ABC 現象が誘導されることを示した。これにより、脂質投与量と抗 PEG 抗体の産生には大きな動物種差が存在することが明らかとなり、使用する動物種毎に最適な試験プロトコルを立案する必要性を示すと共に、動物種の選定の重要性を明らかとした。

第4章では、これまで十分な評価がされていなかった LNP に関し、siRNA 内包 LNP をモデルに、その ABC 現象の誘導性を評価した。その結果、製剤の安定性向上のための必要最低限の PEG 修飾を施した LNP においても、抗 PEG IgM の産生とそれに起因する ABC 現象が生じることを明らかとした。さらに、修飾した PEG 脂質が生体内で速やかに脱離するように Fast-shedding PEG 脂質を用いることで、抗 PEG IgM の産生を制御可能であることを示した。一方で、Fast-shedding PEG 脂質を修飾した LNP においても、既存の抗 PEG IgM が存在する場合には、ABC 現象が誘導され、LNP に内包した核酸の活性が低下することを明らかとした。このことから、投与する LNP 自体の抗 PEG 抗体の誘導性だけでなく、既存の抗 PEG 抗体をモニタリングすることの重要性を示した。

医薬品の開発過程では、様々な動物種を用いて開発が進められることから、各動物種の PEG 修飾ナノ粒子に対する感受性を考慮せずに試験を実施した場合、その医薬品候補の本来の性能を正確に評価できない可能性がある。従って、評価する PEG 修飾ナノ粒子製剤の特性および各動物における感受性を考慮しつつ、最適な試験をデザインすることが重要となる。

本研究では、抗がん剤封入 PEG 修飾リポソームに関しては、投与量を最適化することで、核酸内包 LNP に関しては、Fast-shedding PEG 脂質を用いることで、抗 PEG 抗体の産生とそれに伴う ABC 現象を制御可能であることを示した。一方で、今後は、抗がん剤のような細胞傷害性のある薬物だけでなく、より細胞傷害性の低い薬物を用いた PEG 修飾リポソーム製剤の開発が進められる可能性が考えられる。また、LNP に関しても、腫瘍組織を標的とした場合、抗 PEG 抗体を誘導しやすいことが明らかとなった Slow-shedding PEG 脂質が用いられる傾向にある。このようなケースでは、より抗 PEG 抗体が産生されやすくなることは想像に難しくなく、新薬の開発段階では ABC 現象に一層の注意が必要になる。

PEG 修飾リポソームを始めとする PEG 修飾ナノ粒子製剤の開発においては、先行して開発が進む、もしくは既に承認された医薬品の薬効および副作用の改善が目的であることがある。その場合、PEG 修飾ナノ粒子製剤に内封される医薬品に関しては、既に大動物での体内動態や安全性データが取得されていることが想定される。そのようなケースでは、既存のデータを生かせることから、同じ動物種で体内動態や安全性の評価を行うことが推奨される。しかしながら、選択されていた動物種が ABC 現象を誘導しやすい種であった場合、PEG 修飾ナノ粒子製剤の試験デザインが制限される可能性がある。従って、本研究成果より、PEG 修飾ナノ粒子製剤に内封される医薬品の開発段階から、ABC 現象が誘導されやすいイヌまたはブタではなく、サルを用いて前臨床試験を進めることで、より効率的な PEG 修飾ナノ粒子製剤の開発が可能となると考えられる。

以上のように、本研究成果は、PEG 修飾ナノ粒子製剤を用いた医薬品開発において留意すべき基礎的知見を提供するものであり、今後の新薬の迅速な開発に貢献することが期待される。

引用文献

- [1] Nanotechnologies — Vocabulary — Part 2: Nano-objects. ISO/TS 80004-2:2015.
- [2] S.A.A. Rizvi, A.M. Saleh, Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology, *Saudi Pharm J*, 26 (2018) 64-70.
- [3] D.J. Lundy, K.H. Chen, E.K. Toh, P.C. Hsieh, Distribution of Systemically Administered Nanoparticles Reveals a Size-Dependent Effect Immediately following Cardiac Ischaemia-Reperfusion Injury, *Sci Rep*, 6 (2016) 25613.
- [4] M. Gaumet, A. Vargas, R. Gurny, F. Delie, Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 69 (2008) 1-9.
- [5] N. Hoshyar, S. Gray, H. Han, G. Bao, The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction, *Nanomedicine (Lond)*, 11 (2016) 673-692.
- [6] T. Tagami, T. Ozeki, DDS technology of nano/micro particles and clinical application, *Organ Biology*, 24 (2017) 54-60.
- [7] P.Y. Liyanage, S.D. Hettiarachchi, Y. Zhou, A. Ouhtit, E.S. Seven, C.Y. Oztan, E. Celik, R.M. Leblanc, Nanoparticle-mediated targeted drug delivery for breast cancer treatment, *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1871 (2019) 419-433.
- [8] N. Iturrioz-Rodriguez, M.A. Correa-Duarte, M.L. Fanarraga, Controlled drug delivery systems for cancer based on mesoporous silica nanoparticles, *International journal of nanomedicine*, 14 (2019) 3389-3401.
- [9] E. Perez-Herrero, A. Fernandez-Medarde, Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 93 (2015) 52-79.
- [10] S. Yonezawa, H. Koide, T. Asai, Recent advances in siRNA delivery mediated by lipid-based nanoparticles, *Advanced drug delivery reviews*, (2020).
- [11] T.M. Allen, P.R. Cullis, Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications, *Advanced drug delivery reviews*, 65 (2013) 36-48.
- [12] Y. Suzuki, K. Hyodo, T. Suzuki, Y. Tanaka, H. Kikuchi, H. Ishihara, Biodegradable lipid nanoparticles induce a prolonged RNA interference-mediated protein knockdown and show rapid hepatic clearance in mice and nonhuman primates, *Int. J. Pharm.*, 519 (2017) 34-43.
- [13] S. Somani, P. Laskar, N. Altwaijry, P. Kewcharoenwong, C. Irving, G. Robb, B.S. Pickard, C. Dufes, PEGylation of polypropylenimine dendrimers: effects on cytotoxicity, DNA condensation, gene delivery and expression in cancer cells, *Sci Rep*, 8 (2018) 9410.
- [14] J. Bushman, A. Vaughan, L. Sheihet, Z. Zhang, M. Costache, J. Kohn, Functionalized nanospheres for targeted delivery of paclitaxel, *J. Control. Release*, 171 (2013) 315-321.
- [15] P. Rafiei, A. Haddadi, Docetaxel-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles for intravenous application: pharmacokinetics and biodistribution profile, *International journal of*

nanomedicine, 12 (2017) 935-947.

[16] T.M. Allen, Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery, *Trends Pharmacol. Sci.*, 15 (1994) 215-220.

[17] H. Cabral, K. Miyata, K. Osada, K. Kataoka, Block Copolymer Micelles in Nanomedicine Applications, *Chem. Rev.*, 118 (2018) 6844-6892.

[18] S. Hak, Z. Garaiova, L.T. Olsen, A.M. Nilsen, C. de Lange Davies, The effects of oil-in-water nanoemulsion polyethylene glycol surface density on intracellular stability, pharmacokinetics, and biodistribution in tumor bearing mice, *Pharm. Res.*, 32 (2015) 1475-1485.

[19] Y. Barenholz, Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned, *J. Control. Release*, 160 (2012) 117-134.

[20] I. Urits, D. Swanson, M.C. Swett, A. Patel, K. Berardino, A. Amgalan, A.A. Berger, H. Kassem, A. Kaye, O. Viswanath, A Review of Patisiran (ONPATPRO(R)) for the Treatment of Polyneuropathy in People with Hereditary Transthyretin Amyloidosis, *Neurol Ther*, (2020).

[21] T. Ishida, H. Kiwada, Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon induced by administration of PEGylated liposome, *Yakugaku Zasshi.*, 128 (2008) 233-243.

[22] T.M. Allen, C. Hansen, F. Martin, C. Redemann, A. Yau-Young, Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo, *Biochim. Biophys. Acta*, 1066 (1991) 29-36.

[23] J. Senior, C. Delgado, D. Fisher, C. Tilcock, G. Gregoriadis, Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation: studies with poly(ethylene glycol)-coated vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, 1062 (1991) 77-82.

[24] D. Needham, T.J. McIntosh, D.D. Lasic, Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1108 (1992) 40-48.

[25] T.R.J. Evans, E. Dean, L.R. Molife, J. Lopez, M. Ranson, F. El-Khouly, I. Zubairi, C. Savulsky, L. Reyderman, Y. Jia, L. Sweeting, A. Greystoke, J. Barriuso, R. Kristeleit, Phase 1 dose-finding and pharmacokinetic study of eribulin-liposomal formulation in patients with solid tumours, *Br. J. Cancer*, 120 (2019) 379-386.

[26] A. Gabizon, H. Shmeeda, E. Tahover, G. Kornev, Y. Patil, Y. Amitay, P. Ohana, E. Sapir, S. Zalipsky, Development of Promitil(R), a lipidic prodrug of mitomycin c in PEGylated liposomes: From bench to bedside, *Advanced drug delivery reviews*, (2020).

[27] N. Lamichhane, T.S. Udayakumar, W.D. D'Souza, C.B. Simone, 2nd, S.R. Raghavan, J. Polf, J. Mahmood, Liposomes: Clinical Applications and Potential for Image-Guided Drug Delivery, *Molecules*, 23 (2018).

[28] A Phase 1 Dose-escalation Study of FF-10832 Monotherapy or in Combo With Nab-paclitaxel for Treatment of Solid Tumors, <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03440450>.

- [29] A Study of FF-10850 Topotecan Liposome Injection in Advanced Solid Tumors, <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04047251>.
- [30] E. Samaridou, J. Heyes, P. Lutwyche, Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives, *Advanced drug delivery reviews*, (2020).
- [31] K.J. Hassett, K.E. Benenato, E. Jacquinet, A. Lee, A. Woods, O. Yuzhakov, S. Himansu, J. Deterling, B.M. Geilich, T. Ketova, C. Mihai, A. Lynn, I. McFadyen, M.J. Moore, J.J. Senn, M.G. Stanton, O. Almarsson, G. Ciaramella, L.A. Brito, Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines, *Mol Ther Nucleic Acids*, 15 (2019) 1-11.
- [32] Y.V. Svitkin, Y.M. Cheng, T. Chakraborty, V. Presnyak, M. John, N. Sonenberg, N1-methylpseudouridine in mRNA enhances translation through eIF2alpha-dependent and independent mechanisms by increasing ribosome density, *Nucleic Acids Res*, 45 (2017) 6023-6036.
- [33] Y. Dorsett, T. Tuschl, siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics, *Nat Rev Drug Discov*, 3 (2004) 318-329.
- [34] B.R. Meade, K. Gogoi, A.S. Hamil, C. Palm-Apergi, A. van den Berg, J.C. Hagopian, A.D. Springer, A. Eguchi, A.D. Kacsinta, C.F. Dowdy, A. Presente, P. Lonn, M. Kaulich, N. Yoshioka, E. Gros, X.S. Cui, S.F. Dowdy, Efficient delivery of RNAi prodrugs containing reversible charge-neutralizing phosphotriester backbone modifications, *Nat. Biotechnol.*, 32 (2014) 1256-1261.
- [35] T.S. Zimmermann, A.C. Lee, A. Akinc, B. Bramlage, D. Bumcrot, M.N. Fedoruk, J. Harborth, J.A. Heyes, L.B. Jeffs, M. John, A.D. Judge, K. Lam, K. McClintock, L.V. Nechev, L.R. Palmer, T. Racie, I. Rohl, S. Seiffert, S. Shanmugam, V. Sood, J. Soutschek, I. Toudjarska, A.J. Wheat, E. Yaworski, W. Zedalis, V. Koteliansky, M. Manoharan, H.P. Vornlocher, I. MacLachlan, RNAi-mediated gene silencing in non-human primates, *Nature*, 441 (2006) 111-114.
- [36] T.C. Roberts, R. Langer, M.J.A. Wood, Advances in oligonucleotide drug delivery, *Nat Rev Drug Discov*, (2020).
- [37] Y. Suzuki, H. Ishihara, Structure, activity and uptake mechanism of siRNA-lipid nanoparticles with an asymmetric ionizable lipid, *Int. J. Pharm.*, 510 (2016) 350-358.
- [38] J.A. Kulkarni, P.R. Cullis, R. van der Meel, Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility, *Nucleic Acid Ther*, 28 (2018) 146-157.
- [39] A.K. Leung, Y.Y. Tam, P.R. Cullis, Lipid nanoparticles for short interfering RNA delivery, *Adv. Genet.*, 88 (2014) 71-110.
- [40] B.L. Mui, Y.K. Tam, M. Jayaraman, S.M. Ansell, X. Du, Y.Y.C. Tam, P.J.C. Lin, S. Chen, J.K. Narayanannair, K.G. Rajeev, M. Manoharan, A. Akinc, M.A. Maier, P. Cullis, T.D. Madden, M.J. Hope, Influence of Polyethylene Glycol Lipid Desorption Rates on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of siRNA Lipid Nanoparticles, *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2 (2013) e139.
- [41] J.A. Kulkarni, M.M. Darjuan, J.E. Mercer, S. Chen, R. van der Meel, J.L. Thewalt, Y.Y.C.

- Tam, P.R. Cullis, On the Formation and Morphology of Lipid Nanoparticles Containing Ionizable Cationic Lipids and siRNA, *ACS Nano*, 12 (2018) 4787-4795.
- [42] A.K. Leung, I.M. Hafez, S. Baoukina, N.M. Belliveau, I.V. Zhigaltsev, E. Afshinmanesh, D.P. Tieleman, C.L. Hansen, M.J. Hope, P.R. Cullis, Lipid Nanoparticles Containing siRNA Synthesized by Microfluidic Mixing Exhibit an Electron-Dense Nanostructured Core, *J Phys Chem C Nanomater Interfaces*, 116 (2012) 18440-18450.
- [43] E.T. Dams, P. Laverman, W.J. Oyen, G. Storm, G.L. Scherphof, J.W. van Der Meer, F.H. Corstens, O.C. Boerman, Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 292 (2000) 1071-1079.
- [44] T. Ishida, R. Maeda, M. Ichihara, K. Irimura, H. Kiwada, Accelerated clearance of PEGylated liposomes in rats after repeated injections, *J. Control. Release*, 88 (2003) 35-42.
- [45] T. Ishida, K. Masuda, T. Ichikawa, M. Ichihara, K. Irimura, H. Kiwada, Accelerated clearance of a second injection of PEGylated liposomes in mice, *Int. J. Pharm.*, 255 (2003) 167-174.
- [46] T. Ishida, M. Ichihara, X. Wang, K. Yamamoto, J. Kimura, E. Majima, H. Kiwada, Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes, *J. Control. Release*, 112 (2006) 15-25.
- [47] T. Ishida, H. Kiwada, Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes, *Int. J. Pharm.*, 354 (2008) 56-62.
- [48] T. Shimizu, T. Ishida, H. Kiwada, Transport of PEGylated liposomes from the splenic marginal zone to the follicle in the induction phase of the accelerated blood clearance phenomenon, *Immunobiology*, (2012).
- [49] T. Ishida, X. Wang, T. Shimizu, K. Nawata, H. Kiwada, PEGylated liposomes elicit an anti-PEG IgM response in a T cell-independent manner, *J. Control. Release*, 122 (2007) 349-355.
- [50] T. Shimizu, T. Ishida, Characteristics, evaluation and suppression of anti-poly(ethylene glycol) antibody, *Drug Delivery System*, 2016, pp. 300-307.
- [51] T. Shimizu, Y. Mima, Y. Hashimoto, M. Ukawa, H. Ando, H. Kiwada, T. Ishida, Anti-PEG IgM and complement system are required for the association of second doses of PEGylated liposomes with splenic marginal zone B cells, *Immunobiology*, 220 (2015) 1151-1160.
- [52] T. Shimizu, Y. Ishima, T. Ishida, Animal species difference in the ABC phenomenon, *Drug Delivery System*, 2017, pp. 396-401.
- [53] M. Mohamed, A.S. Abu Lila, T. Shimizu, E. Alaaeldin, A. Hussein, H.A. Sarhan, J. Szebeni, T. Ishida, PEGylated liposomes: immunological responses, *Science and Technology of Advanced Materials*, 20 (2019) 710-724.
- [54] A.S. Abu Lila, M. Ichihara, T. Shimizu, T. Ishida, H. Kiwada, Ex-vivo/in-vitro anti-polyethylene glycol (PEG) immunoglobulin M production from murine splenic B cells stimulated by PEGylated liposome, *Biol. Pharm. Bull.*, 36 (2013) 1842-1848.

- [55] T. Ishida, K. Atobe, X. Wang, H. Kiwada, Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes upon repeated injections: effect of doxorubicin-encapsulation and high-dose first injection, *J. Control. Release*, 115 (2006) 251-258.
- [56] H. Koide, T. Asai, K. Hatanaka, S. Akai, T. Ishii, E. Kenjo, T. Ishida, H. Kiwada, H. Tsukada, N. Oku, T cell-independent B cell response is responsible for ABC phenomenon induced by repeated injection of PEGylated liposomes, *Int. J. Pharm.*, 392 (2010) 218-223.
- [57] T. Tagami, K. Nakamura, T. Shimizu, T. Ishida, H. Kiwada, Effect of siRNA in PEG-coated siRNA-lipoplex on anti-PEG IgM production, *J. Control. Release*, 137 (2009) 234-240.
- [58] T. Tagami, Y. Uehara, N. Moriyoshi, T. Ishida, H. Kiwada, Anti-PEG IgM production by siRNA encapsulated in a PEGylated lipid nanocarrier is dependent on the sequence of the siRNA, *J. Control. Release*, 151 (2011) 149-154.
- [59] E. Hara, M. Ueda, A. Makino, I. Hara, E. Ozeki, S. Kimura, Factors Influencing in Vivo Disposition of Polymeric Micelles on Multiple Administrations, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 5 (2014) 873-877.
- [60] H. Koide, T. Asai, H. Kato, H. Ando, K. Shiraishi, M. Yokoyama, N. Oku, Size-dependent induction of accelerated blood clearance phenomenon by repeated injections of polymeric micelles, *Int. J. Pharm.*, 432 (2012) 75-79.
- [61] M. Liu, Y. Chu, H. Liu, Y. Su, Q. Zhang, J. Jiao, M. Liu, J. Ding, M. Liu, Y. Hu, Y. Dai, R. Zhang, X. Liu, Y. Deng, Y. Song, Accelerated Blood Clearance of Nanoemulsions Modified with PEG-Cholesterol and PEG-Phospholipid Derivatives in Rats: The Effect of PEG-Lipid Linkages and PEG Molecular Weights, *Mol Pharm*, 17 (2020) 1059-1070.
- [62] A. Moreno, G.A. Pitoc, N.J. Ganson, J.M. Layzer, M.S. Hershfield, A.F. Tarantal, B.A. Sullenger, Anti-PEG Antibodies Inhibit the Anticoagulant Activity of PEGylated Aptamers, *Cell Chem Biol*, 26 (2019) 634-644 e633.
- [63] T. Shimizu, M. Ichihara, Y. Yoshioka, T. Ishida, S. Nakagawa, H. Kiwada, Intravenous administration of polyethylene glycol-coated (PEGylated) proteins and PEGylated adenovirus elicits an anti-PEG immunoglobulin M response, *Biol. Pharm. Bull.*, 35 (2012) 1336-1342.
- [64] Y. Mima, Y. Hashimoto, T. Shimizu, H. Kiwada, T. Ishida, Anti-PEG IgM Is a Major Contributor to the Accelerated Blood Clearance of Polyethylene Glycol-Conjugated Protein, *Molecular Pharmaceutics*, 12 (2015) 2429-2435.
- [65] G. Besin, J. Milton, S. Sabnis, R. Howell, C. Mihai, K. Burke, K.E. Benenato, M. Stanton, P. Smith, J. Senn, S. Hoge, Accelerated Blood Clearance of Lipid Nanoparticles Entails a Biphasic Humoral Response of B-1 Followed by B-2 Lymphocytes to Distinct Antigenic Moieties, *Immunohorizons*, 3 (2019) 282-293.
- [66] J.K. Armstrong, G. Hempel, S. Koling, L.S. Chan, T. Fisher, H.J. Meiselman, G. Garratty, Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute

lymphoblastic leukemia patients, *Cancer*, 110 (2007) 103-111.

[67] A.E. Green, P.G. Rose, Pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer, *International journal of nanomedicine*, 1 (2006) 229-239.

[68] M.S. Hershfield, N.J. Ganson, S.J. Kelly, E.L. Scarlett, D.A. Jagers, J.S. Sundy, Induced and pre-existing anti-polyethylene glycol antibody in a trial of every 3-week dosing of pegloticase for refractory gout, including in organ transplant recipients, *Arthritis Res Ther*, 16 (2014) R63.

[69] N.J. Ganson, T.J. Povsic, B.A. Sullenger, J.H. Alexander, S.L. Zelenkofske, J.M. Sailstad, C.P. Rusconi, M.S. Hershfield, Pre-existing anti-polyethylene glycol antibody linked to first-exposure allergic reactions to pegnivacogin, a PEGylated RNA aptamer, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 137 (2016) 1610-1613 e1617.

[70] T.J. Povsic, M.G. Lawrence, A.M. Lincoff, R. Mehran, C.P. Rusconi, S.L. Zelenkofske, Z. Huang, J. Sailstad, P.W. Armstrong, P.G. Steg, C. Bode, R.C. Becker, J.H. Alexander, N.F. Adkinson, A.I. Levinson, R.-P. Investigators, Pre-existing anti-PEG antibodies are associated with severe immediate allergic reactions to pegnivacogin, a PEGylated aptamer, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 138 (2016) 1712-1715.

[71] A.W. Richter, E. Akerblom, Polyethylene glycol reactive antibodies in man: titer distribution in allergic patients treated with monomethoxy polyethylene glycol modified allergens or placebo, and in healthy blood donors, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 74 (1984) 36-39.

[72] J.K. Armstrong, R. Leger, R.B. Wenby, H.J. Meiselman, G. Garratty, T.C. Fisher, Occurrence of an antibody to poly(ethylene glycol) in normal donors., *Blood*, 102 (2003) 556A.

[73] C. Lubich, P. Allacher, M. de la Rosa, A. Bauer, T. Prenninger, F.M. Horling, J. Siekmann, J. Oldenburg, F. Scheiflinger, B.M. Reipert, The Mystery of Antibodies Against Polyethylene Glycol (PEG) - What do we Know?, *Pharm. Res.*, 33 (2016) 2239-2249.

[74] B.M. Chen, Y.C. Su, C.J. Chang, P.A. Burnouf, K.H. Chuang, C.H. Chen, T.L. Cheng, Y.T. Chen, J.Y. Wu, S.R. Roffler, Measurement of Pre-Existing IgG and IgM Antibodies against Polyethylene Glycol in Healthy Individuals, *Anal. Chem.*, 88 (2016) 10661-10666.

[75] Q. Yang, T.M. Jacobs, J.D. McCallen, D.T. Moore, J.T. Huckaby, J.N. Edelstein, S.K. Lai, Analysis of Pre-existing IgG and IgM Antibodies against Polyethylene Glycol (PEG) in the General Population, *Anal. Chem.*, 88 (2016) 11804-11812.

[76] P.J. Haley, Species differences in the structure and function of the immune system, *Toxicology*, 188 (2003) 49-71.

[77] J. Szebeni, C.R. Alving, L. Rosivall, R. Bungler, L. Baranyi, P. Bedocs, M. Toth, Y. Barenholz, Animal models of complement-mediated hypersensitivity reactions to liposomes and other lipid-based nanoparticles, *Journal of liposome research*, 17 (2007) 107-117.

[78] J. Szebeni, Hemocompatibility testing for nanomedicines and biologicals: predictive assays for complement mediated infusion reactions, *European Journal of Nanomedicine*, 4 (2012).

- [79] J. Szebeni, D. Simberg, A. Gonzalez-Fernandez, Y. Barenholz, M.A. Dobrovolskaia, Roadmap and strategy for overcoming infusion reactions to nanomedicines, *Nat Nanotechnol*, 13 (2018) 1100-1108.
- [80] C. Lai, C. Li, X. Luo, M. Liu, X. Liu, L. Hu, L. Kang, Q. Qiu, Y. Deng, Y. Song, Use of Dual-Ligand Modification in Kupffer Cell-Targeted Liposomes To Examine the Contribution of Kupffer Cells to Accelerated Blood Clearance Phenomenon, *Molecular Pharmaceutics*, 15 (2018) 2548-2558.
- [81] A.S. Abu Lila, H. Kiwada, T. Ishida, The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: clinical challenge and approaches to manage, *J. Control. Release*, 172 (2013) 38-47.
- [82] T. Ishida, S. Kashima, H. Kiwada, The contribution of phagocytic activity of liver macrophages to the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon of PEGylated liposomes in rats, *J. Control. Release*, 126 (2008) 162-165.
- [83] G.R. Bartlett, Colorimetric assay methods for free and phosphorylated glyceric acids, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 469-471.
- [84] M. Sharpe, S.E. Easthope, G.M. Keating, H.M. Lamb, Polyethylene glycol-liposomal doxorubicin: a review of its use in the management of solid and haematological malignancies and AIDS-related Kaposi's sarcoma, *Drugs*, 62 (2002) 2089-2126.
- [85] S.E. Krown, D.W. Northfelt, D. Osoba, J.S. Stewart, Use of liposomal anthracyclines in Kaposi's sarcoma, *Semin. Oncol.*, 31 (2004) 36-52.
- [86] N.D. James, R.J. Coker, D. Tomlinson, J.R. Harris, M. Gompels, A.J. Pinching, J.S. Stewart, Liposomal doxorubicin (Doxil): an effective new treatment for Kaposi's sarcoma in AIDS, *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol)*. 6 (1994) 294-296.
- [87] A. Cabanes, D. Tzemach, D. Goren, A.T. Horowitz, A. Gabizon, Comparative study of the antitumor activity of free doxorubicin and polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin in a mouse lymphoma model, *Clin. Cancer Res.*, 4 (1998) 499-505.
- [88] G.J. Charrois, T.M. Allen, Multiple injections of pegylated liposomal Doxorubicin: pharmacokinetics and therapeutic activity, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 306 (2003) 1058-1067.
- [89] A. Gabizon, D. Tzemach, J. Gorin, L. Mak, Y. Amitay, H. Shmeeda, S. Zalipsky, Improved therapeutic activity of folate-targeted liposomal doxorubicin in folate receptor-expressing tumor models, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 66 (2010) 43-52.
- [90] M. Ichihara, T. Shimizu, A. Imoto, Y. Hashiguchi, Y. Uehara, T. Ishida, H. Kiwada, Anti-PEG IgM Response against PEGylated Liposomes in Mice and Rats, *Pharmaceutics*, 3 (2010) 1-11.
- [91] C. Suenderhauf, N. Parrott, A physiologically based pharmacokinetic model of the minipig: data compilation and model implementation, *Pharm. Res.*, 30 (2013) 1-15.
- [92] G.J. van Mierlo, N.H. Cnubben, C.F. Kuper, J. Wolthoorn, A.P. van Meeteren-Kreikamp, M.M. Nagtegaal, R. Doornbos, N.C. Ganderup, A.H. Penninks, The Gottingen minipig((R)) as

an alternative non-rodent species for immunogenicity testing: A demonstrator study using the IL-1 receptor antagonist anakinra, *Journal of immunotoxicology*, 10 (2013) 96-105.

[93] M.L. Weaver, A.B. Grossi, J. Schutzsack, J. Parish, J. Logsted, I.B. Bogh, D. Cameron, W. Harvey, M. Festag, N. Downes, S. Venturella, J. Schlichtiger, S. Mhedhbi, V. Ross, T. Kissner, C. Stark, S. Milano, P. Heining, M. Sanchez-Felix, Vehicle Systems and Excipients Used in Minipig Drug Development Studies, *Toxicol. Pathol.*, 44 (2016) 367-372.

[94] P. Laverman, M.G. Carstens, O.C. Boerman, E.T. Dams, W.J. Oyen, N. van Rooijen, F.H. Corstens, G. Storm, Factors affecting the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-liposomes upon repeated injection, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 298 (2001) 607-612.

[95] A. Nagao, A.S. Abu Lila, T. Ishida, H. Kiwada, Abrogation of the accelerated blood clearance phenomenon by SOXL regimen: promise for clinical application, *Int. J. Pharm.*, 441 (2013) 395-401.

[96] J. Cui, C. Li, C. Wang, Y. Li, L. Zhang, H. Yang, Repeated injection of pegylated liposomal antitumour drugs induces the disappearance of the rapid distribution phase, *J. Pharm. Pharmacol.*, 60 (2008) 1651-1657.

[97] B. Steiniger, E.M. Timphus, P.J. Barth, The splenic marginal zone in humans and rodents: an enigmatic compartment and its inhabitants, *Histochem. Cell Biol.*, 126 (2006) 641-648.

[98] E. Claassen, N. Kors, C.D. Dijkstra, N. Van Rooijen, Marginal zone of the spleen and the development and localization of specific antibody-forming cells against thymus-dependent and thymus-independent type-2 antigens, *Immunology*, 57 (1986) 399-403.

[99] I.C. MacLennan, Y.J. Liu, Marginal zone B cells respond both to polysaccharide antigens and protein antigens, *Res. Immunol.*, 142 (1991) 346-351.

[100] F. Martin, J.F. Kearney, Marginal-zone B cells, *Nature reviews. Immunology*, 2 (2002) 323-335.

[101] O. Garraud, G. Borhis, G. Badr, S. Degrelle, B. Pozzetto, F. Cognasse, Y. Richard, Revisiting the B-cell compartment in mouse and humans: more than one B-cell subset exists in the marginal zone and beyond, *BMC immunology*, 13 (2012) 63.

[102] L. Dezsi, T. Fulop, T. Meszaros, G. Szenasi, R. Urbanics, C. Vazsonyi, E. Orfi, L. Rosivall, R. Nemes, R.J. Kok, J.M. Metselaar, G. Storm, J. Szebeni, Features of complement activation-related pseudoallergy to liposomes with different surface charge and PEGylation: comparison of the porcine and rat responses, *J. Control. Release*, 195 (2014) 2-10.

[103] T. Ishida, M. Harada, X.Y. Wang, M. Ichihara, K. Irimura, H. Kiwada, Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes following preceding liposome injection: effects of lipid dose and PEG surface-density and chain length of the first-dose liposomes, *J. Control. Release*, 105 (2005) 305-317.

[104] C. Li, X. Zhao, Y. Wang, H. Yang, H. Li, W. Tian, J. Yang, J. Cui, Prolongation of time

interval between doses could eliminate accelerated blood clearance phenomenon induced by pegylated liposomal topotecan, *Int. J. Pharm.*, 443 (2013) 17-25.

[105] C. Li, J. Cao, Y. Wang, X. Zhao, C. Deng, N. Wei, J. Yang, J. Cui, Accelerated blood clearance of pegylated liposomal topotecan: influence of polyethylene glycol grafting density and animal species, *J. Pharm. Sci.*, 101 (2012) 3864-3876.

[106] T. Hagai, X. Chen, R.J. Miragaia, R. Rostom, T. Gomes, N. Kunowska, J. Henriksson, J.E. Park, V. Proserpio, G. Donati, L. Bossini-Castillo, F.A. Vieira Braga, G. Naamati, J. Fletcher, E. Stephenson, P. Vegh, G. Trynka, I. Kondova, M. Dennis, M. Haniffa, A. Nourmohammad, M. Lassig, S.A. Teichmann, Gene expression variability across cells and species shapes innate immunity, *Nature*, 563 (2018) 197-202.

[107] C. Brendel, P. Rio, E. Verhoeven, Humanized mice are precious tools for evaluation of hematopoietic gene therapies and preclinical modeling to move towards a clinical trial, *Biochem. Pharmacol.*, 174 (2020) 113711.

[108] M. Wang, L.C. Yao, M. Cheng, D. Cai, J. Martinek, C.X. Pan, W. Shi, A.H. Ma, R.W. De Vere White, S. Airhart, E.T. Liu, J. Banchereau, M.A. Brehm, D.L. Greiner, L.D. Shultz, K. Palucka, J.G. Keck, Humanized mice in studying efficacy and mechanisms of PD-1-targeted cancer immunotherapy, *FASEB J.*, 32 (2018) 1537-1549.

[109] P.R. Cullis, M.J. Hope, Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies, *Mol Ther*, 25 (2017) 1467-1475.

[110] J.A. Kulkarni, D. Witzigmann, J. Leung, Y.Y.C. Tam, P.R. Cullis, On the role of helper lipids in lipid nanoparticle formulations of siRNA, *Nanoscale*, 11 (2019) 21733-21739.

[111] M. Germain, F. Caputo, S. Metcalfe, G. Tosi, K. Spring, A.K.O. Aslund, A. Pottier, R. Schiffelers, A. Ceccaldi, R. Schmid, Delivering the power of nanomedicine to patients today, *J. Control. Release*, 326 (2020) 164-171.

[112] Y. Suzuki, K. Hyodo, Y. Tanaka, H. Ishihara, siRNA-lipid nanoparticles with long-term storage stability facilitate potent gene-silencing in vivo, *J. Control. Release*, 220 (2015) 44-50.

[113] S.C. Wilson, J.L. Baryza, A.J. Reynolds, K. Bowman, M.E. Keegan, S.M. Standley, N.P. Gardner, P. Parmar, V.O. Agir, S. Yadav, A. Zunic, C. Vargeese, C.C. Lee, S. Rajan, Real Time Measurement of PEG Shedding from Lipid Nanoparticles in Serum via NMR Spectroscopy, *Molecular Pharmaceutics*, 12 (2015) 386-392.

[114] K.H. Moss, P. Popova, S.R. Hadrup, K. Astakhova, M. Taskova, Lipid Nanoparticles for Delivery of Therapeutic RNA Oligonucleotides, *Mol Pharm*, 16 (2019) 2265-2277.

[115] D. Parashar, V. Rajendran, R. Shukla, R. Sistla, Lipid-based nanocarriers for delivery of small interfering RNA for therapeutic use, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 142 (2020) 105159.

[116] V. Kumar, J. Qin, Y. Jiang, R.G. Duncan, B. Brigham, S. Fishman, J.K. Nair, A. Akinc, S.A. Barros, P.V. Kasperkovitz, Shielding of Lipid Nanoparticles for siRNA Delivery: Impact on

Physicochemical Properties, Cytokine Induction, and Efficacy, *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 3 (2014) e210.

[117] S.C. Semple, A. Akinc, J. Chen, A.P. Sandhu, B.L. Mui, C.K. Cho, D.W. Sah, D. Stebbing, E.J. Crosley, E. Yaworski, I.M. Hafez, J.R. Dorkin, J. Qin, K. Lam, K.G. Rajeev, K.F. Wong, L.B. Jeffs, L. Nechev, M.L. Eisenhardt, M. Jayaraman, M. Kazem, M.A. Maier, M. Srinivasulu, M.J. Weinstein, Q. Chen, R. Alvarez, S.A. Barros, S. De, S.K. Klimuk, T. Borland, V. Kosovrasti, W.L. Cantley, Y.K. Tam, M. Manoharan, M.A. Ciufolini, M.A. Tracy, A. de Fougères, I. MacLachlan, P.R. Cullis, T.D. Madden, M.J. Hope, Rational design of cationic lipids for siRNA delivery, *Nat. Biotechnol.*, 28 (2010) 172-176.

[118] H. Akita, R. Ishiba, R. Togashi, K. Tange, Y. Nakai, H. Hatakeyama, H. Harashima, A neutral lipid envelope-type nanoparticle composed of a pH-activated and vitamin E-scaffold lipid-like material as a platform for a gene carrier targeting renal cell carcinoma, *J. Control. Release*, 200 (2015) 97-105.

[119] E. Ehexige, M. Bao, P. Bazarjav, X. Yu, H. Xiao, S. Han, H. Baigude, Silencing of STAT3 via Peptidomimetic LNP-Mediated Systemic Delivery of RNAi Downregulates PD-L1 and Inhibits Melanoma Growth, *Biomolecules*, 10 (2020).

[120] K. Gokita, J. Inoue, H. Ishihara, K. Kojima, J. Inazawa, Therapeutic Potential of LNP-Mediated Delivery of miR-634 for Cancer Therapy, *Mol Ther Nucleic Acids*, 19 (2020) 330-338.

[121] T.C. Chang, B.M. Chen, W.W. Lin, P.H. Yu, Y.W. Chiu, Y.T. Chen, J.Y. Wu, T.L. Cheng, D.Y. Hwang, A.S. Roffler, Both IgM and IgG Antibodies Against Polyethylene Glycol Can Alter the Biological Activity of Methoxy Polyethylene Glycol-Epoetin Beta in Mice, *Pharmaceutics*, 12 (2019).

[122] M. Kanamala, B.D. Palmer, S.M. Jamieson, W.R. Wilson, Z. Wu, Dual pH-sensitive liposomes with low pH-triggered sheddable PEG for enhanced tumor-targeted drug delivery, *Nanomedicine (Lond)*, 14 (2019) 1971-1989.

[123] M. Kanamala, B.D. Palmer, W.R. Wilson, Z. Wu, Characterization of a smart pH-cleavable PEG polymer towards the development of dual pH-sensitive liposomes, *Int. J. Pharm.*, 548 (2018) 288-296.

[124] H. Hatakeyama, Development of a Novel Liposomal DDS by Manipulating Pharmacokinetics and Intracellular Trafficking for Drug Therapy and Nucleic Acid Medicine, *Yakugaku Zasshi.*, 138 (2018) 591-598.

[125] H. Hatakeyama, H. Akita, H. Harashima, A multifunctional envelope type nano device (MEND) for gene delivery to tumours based on the EPR effect: a strategy for overcoming the PEG dilemma, *Advanced drug delivery reviews*, 63 (2011) 152-160.

[126] Y. Xu, M. Ou, E. Keough, J. Roberts, K. Koeplinger, M. Lyman, S. Fauty, E. Carlini, M. Stern, R. Zhang, S. Yeh, E. Mahan, Y. Wang, D. Slaughter, M. Gindy, C. Raab, C. Thompson, J.

- Hochman, Quantitation of physiological and biochemical barriers to siRNA liver delivery via lipid nanoparticle platform, *Mol Pharm*, 11 (2014) 1424-1434.
- [127] G. Swaminathan, E.A. Thoryk, K.S. Cox, S. Meschino, S.A. Dubey, K.A. Vora, R. Celano, M. Gindy, D.R. Casimiro, A.J. Bett, A novel lipid nanoparticle adjuvant significantly enhances B cell and T cell responses to sub-unit vaccine antigens, *Vaccine*, 34 (2016) 110-119.
- [128] A. Judge, K. McClintock, J.R. Phelps, I. MacLachlan, Hypersensitivity and Loss of Disease Site Targeting Caused by Antibody Responses to PEGylated Liposomes, *Molecular Therapy*, 13 (2006) 328-337.
- [129] T. Shimizu, A.S. Abu Lila, Y. Kawaguchi, Y. Shimazaki, Y. Watanabe, Y. Mima, Y. Hashimoto, K. Okuhira, G. Storm, Y. Ishima, T. Ishida, A Novel Platform for Cancer Vaccines: Antigen-Selective Delivery to Splenic Marginal Zone B Cells via Repeated Injections of PEGylated Liposomes, *J. Immunol.*, 201 (2018) 2969-2976.
- [130] Y.C. Hsieh, H.E. Wang, W.W. Lin, S.R. Roffler, T.C. Cheng, Y.C. Su, J.J. Li, C.C. Chen, C.H. Huang, B.M. Chen, J.Y. Wang, T.L. Cheng, F.M. Chen, Pre-existing anti-polyethylene glycol antibody reduces the therapeutic efficacy and pharmacokinetics of PEGylated liposomes, *Theranostics*, 8 (2018) 3164-3175.
- [131] G. Kozma, T. Shimizu, T. Ishida, J. Szebeni, Anti-PEG antibodies: Properties, formation and role in adverse immune reactions to PEGylated nano-biopharmaceuticals, *Advanced drug delivery reviews*, (2020).

論文目録

1. **Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes containing doxorubicin upon repeated administration to dogs**
T. Suzuki, M. Ichihara, K. Hyodo, E. Yamamoto, T. Ishida, H. Kiwada, H. Ishihara, H. Kikuchi
Int. J. Pharm., 436 (2012) 636-643.
2. **Development of liposomal anticancer drugs**
K. Hyodo, E. Yamamoto, T. Suzuki, H. Kikuchi, M. Asano, H. Ishihara
Biol. Pharm. Bull., 36 (2013) 703-707.
3. **Influence of dose and animal species on accelerated blood clearance of PEGylated liposomal doxorubicin**
T. Suzuki, M. Ichihara, K. Hyodo, E. Yamamoto, T. Ishida, H. Kiwada, H. Kikuchi, H. Ishihara
Int. J. Pharm., 476 (2014) 205-212.
4. **PEG shedding-rate-dependent blood clearance of PEGylated lipid nanoparticles in mice: faster PEG shedding attenuates anti-PEG IgM production**
T. Suzuki, Y. Suzuki, T. Hihara, K. Kubara, K. Kondo, K. Hyodo, K. Yamazaki, T. Ishida, H. Ishihara
Int. J. Pharm., 588 (2020) 119792.

謝辞

本論文の執筆にあたり、的確なご指導・ご鞭撻ならびに激励を賜りました徳島大学 大学院医歯薬学研究部 衛生薬学分野 小暮健太郎教授に厚く御礼申し上げます。

同じく、終始ご懇意なるご指導・ご鞭撻を賜りました徳島大学 大学院医歯薬学研究部 創薬理論化学分野 立川正憲教授に深く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行および本論文の執筆にあたり、多大なるお時間を割いて頂き、長年に渡りご指導・ご鞭撻を賜りました徳島大学 大学院医歯薬学研究部 薬物動態制御学分野 石田竜弘教授に心から感謝の意を表します。

本研究に際し、有益なご助言・ご指導を賜りました徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 際田弘志名誉教授に心から感謝の意を表します。また、抗体測定において、多大なるご指導・ご助力を賜りました徳島大学 大学院医歯薬学研究部 市原理子博士、本論文の執筆にあたり、的確かつ有益なご指導・ご助言を賜りました同研究部 清水太郎特任助教に深く御礼申し上げます。

ナノ粒子製剤に関する広範な知識および経験に基づく数多くのご指導・ご鞭撻を賜りました株式会社LTTバイオファーマ 取締役 湘南研究所長 菊池寛博士に心から感謝の意を表します。

分析評価に関する深い知識および経験に基づく的確かつ有益なご指導・ご鞭撻を賜りました国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 第2室 室長 山本栄一博士に深く御礼申し上げます。

動物実験に関して、数々のご助言を賜りました国立研究開発法人科学技術振興機構 監査・法務部 研究公正課 浅野誠博士に心から御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始ご懇意なるご指導・ご鞭撻を賜り、長年に渡り論文執筆の後押しをして頂いたエーザイ株式会社 石原比呂之博士、ナノ粒子の調製方法、生物学的評価など懇切丁寧にご指導・ご鞭撻を賜りました同 兵頭健治博士、常日頃から活発な議論を通じて、ご助言・ご支援を賜りました同 鈴木裕太博士に厚く御礼申し上げます。同じく、実験内容の立案から論文執筆まで、日頃から親身的に的確かつ有益なご指導・ご鞭撻を賜りました同 山崎一斗博士、動物実験に関し、多大なるご指導・ご尽力を賜りました同 日原太郎博士、細胞解析に関し、有益なるご指導・ご支援を賜りました同 久原健嗣修士、分子間相互

作用解析に関し、親身なご指導・ご支援を賜りました同 近藤啓太博士に心から感謝の意を表します。また、動物実験手技の取得に関し、ご支援を賜りました同 渡隆爾修士、論文執筆に関し、ご支援を賜りました同 大堀良博士に深く感謝致します。

また、脂質合成にご協力を賜りました相互薬工株式会社の関係者皆様に深く御礼申し上げます。

論文執筆に関し、資料のご提供を賜りました東京理科大学薬学部 生物薬剤学 西川元也教授に厚く御礼申し上げます。

日頃から有益なご指導・ご鞭撻を賜りましたエーザイ株式会社の諸先輩、同輩の皆様に心から御礼申し上げます。

最後になりましたが、深い理解をもって常に支えてくれた家族、そして郷里の両親に深く感謝致します。