

20111014B

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

「経口型抗がん剤の metronomic dosing による腫瘍内微小環境変化を利用した  
革新的 siRNA デリバリー技術の開発とがん治療への応用」に関する研究

平成 21 年度～23 年度 総合研究報告書

研究代表者 石田 竜弘

平成 24 (2012) 年 5 月

## 目 次

### I. 総合研究報告

「経口型抗がん剤の metronomic dosing による腫瘍内微小環境変化を利用した革新的 siRNA デリ  
バリー技術の開発とがん治療への応用」に関する研究 ----- 1  
石田竜弘

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 1 3

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 1 5

「経口型抗がん剤の metronomic dosing による腫瘍内微小環境変化を利用した革新的 siRNA  
デリバリー技術の開発とがん治療への応用」に関する研究

研究代表者 石田 竜弘 徳島大学大学院ヘルスバイサイエンス研究部・准教授

**研究要旨** siRNA を薬剤として利用する場合、生体内動態を量的・空間的に制御することが重要である。表在性の腫瘍を除き、siRNA の静脈内投与は不可避である。100nm 程の粒子径を持つナノキャリアは腫瘍内新生血管内皮の隙間を通過して腫瘍に集積する。しかし、血管周囲に留まるだけで腫瘍深部まで到達できない。これを改善するには、キャリアの改変だけでは不可能であり、腫瘍内の 3 次元的空間を人為的に変化させる必要があることに気がついた。研究代表者は本研究において、外来化学療法で用いられている経口フッ化ピリミジン系抗がん剤(S-1)の繰り返し投与と siRNA・ナノキャリア複合体を併用することで siRNA・ナノキャリア複合体の腫瘍内移行性および腫瘍内拡散性が亢進され、siRNA・ナノキャリア複合体の全身投与によって顕著な抗腫瘍効果が得られることを世界で初めて確認した。本検討で使用した S-1 は既に臨床応用されており、このような市販の薬剤と組み合わせるだけでこれまで困難であった siRNA の全身投与による効果が獲得できる本戦略は、siRNA を用いたがん治療を臨床で実現しうる優れた戦略であるといえる。

#### A. 研究目的

siRNA を薬剤として利用する場合、その生体内動態を量的・空間的に制御することが重要である。表在性の腫瘍を除き、siRNA の静脈内投与は不可避である。100nm 程の粒子径を持つナノキャリアは腫瘍内新生血管内皮の隙間を通過して腫瘍に集積する。しかし、血管周囲に留まるだけで腫瘍深部まで到達できない。これを改善するには、キャリアの改変だけでは不可能であり、腫瘍内の 3 次元的空間を人為的に変化させる必要がある。研究代表者は、外来化学療法で汎用されている経口フッ化ピリミジン系抗がん剤(S-1)の繰り返し投与に着目し、これと併用することで siRNA・キャリア複合体の腫瘍内移行性および拡散性の亢進と、顕著な抗腫瘍効果の獲得を目指して一連の研究を推進した。

以下に得られた研究成果を纏める。

#### B. 研究方法

##### (1) 担がんマウスの作成

BALB/c *nu/nu* 雄性マウスの背部皮下に DLD-1 あるいは 5-FU に耐性を持つ DLD-1/FU 細胞懸濁液 ( $2 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ L) を接種した。5 日後、腫瘍体積が約 100 mm<sup>3</sup> に達したマウスを実験に用いた。

##### (2) siRNA 搭載リポソームの調製（その 1）

Cationic liposome (CL) は Bangham 法により調製した。脂質組成が DOPE:POPC:CHOL:DC-6-14=3:2:3:2 (モル比) となるように脂質を試験管内で混合した。次に、減圧下溶媒（クロロホルム）を除去し、試験管内に脂質薄膜を形成させた。この

脂質薄膜に内水相として 9% スクロース溶液 (pH 7.4) を加え、脂質薄膜を完全に水和させ、MLV (multilamellar vesicle) を得た。この MLV をエクストリュージョン法により整粒し、粒子径が約 110 nm となる LUV (large unilamellar vesicle) を調製した。CL への PEG 修飾は、ポストインサージョン法により行った。ポストインサージョン法は、基本となるリポソームを調製後、9% スクロース溶液中に完全に溶解させた mPEG<sub>2000</sub>-DSPE を脂質 (DOPE、POPC、DC-6-14) 総量に対してモル比で 5% となるように CL 溶液に添加し、振盪機付きインキュベータ中で 37°C、1 時間、軽く振盪させながら行った。調製した PEG 修飾 CL の粒子径及びゼータ電位は、 $112.3 \pm 8.9$  nm 及び  $20.1 \pm 1.1$  mV であった。

次いで、Core-siRNA を調製するために、siRNA 溶液と 0.2 mg/mL ヒアルロン酸(HA)溶液との混合溶液 (siRNA/HA= 1/1 (weight ratio)) と、0.2 mg/mL プロタミン(PRO)溶液を等量ずつ混合し、室温で 5 分間インキュベーションした。このとき、混合する (siRNA+HA) と PRO の重量比は、最適化検討の結果から、1.8 と固定した。次に Core-lipoplex を調製するために、PEG 修飾 CL 溶液と Core-siRNA 溶液を混合し、15 秒間攪拌した後、10 分間室温で放置した。このとき、混合する Lipid と siRNA のモル比は、最適化検討の結果から 2000 に固定し Core-lipoplex を調製した。

##### (3) siRNA 搭載リポソームの調製（その 2）

より汎用性を高めるため、オーソドックスな方法 (PEG 修飾 cationic liposome と siRNA を混合するだけ) でも lipoplex を調製し、腫瘍への移行性

について検討を行った。

PEG 修飾 cationic liposome は DOPE:POPC: CHOL:DC-6-14=3:2:3:2 (モル比) の脂質組成で、上記(2)と同様に調製した。得られたリポソームの粒子径は約 110 nm であった。Liposome への PEG 修飾は、上記(2)と同様にポストインサーション法で行った。調製した PEG 修飾 CL の粒子径及びゼータ電位は、 $112.3 \pm 8.9$  nm 及び  $20.1 \pm 1.1$  mV であった。

PEG 修飾 lipoplex は、PEG 修飾 CL と siRNA とを N/P 比が 3.81 となるように混合し、10 分間激しく攪拌することで調製した。調製した PEG 修飾 lipoplex の粒子径及びゼータ電位は、 $450.3 \pm 141.2$  nm 及び  $18.8 \pm 2.1$  mV であった。

#### (4) RI・蛍光標識リポソームの調製

<sup>3</sup>H-CHE 修飾リポソーム: 脂質相マーカーとして <sup>3</sup>H-Cholesteryl hexadecylether を脂質量 0.5 μmol あたり 720,000 dpm のカウントを持つように、脂質薄膜を形成させるときに添加した。

DiD 修飾リポソーム: 脂質薄膜を形成させる際、DiD を脂質 (DOPE、POPC、DC-6-14) 総量に対しモル比で 1% となるように添加した。

DiI 修飾リポソーム: 脂質薄膜を形成させる際、DiI を脂質 (DOPE、POPC、DC-6-14) 総量に対しモル比で 1% となるように添加した。

#### (5) In vivo imaging system による siRNA 搭載リポソームの腫瘍移行性評価: 定性的評価

DLD-1 担がんマウスに対して、S-1 溶液を経口用ゾンデにより tegafur 量で 6.9 mg/kg となるように経口投与した。S-1 は投与開始から 7 日間、毎日投与を行った。最終 S-1 投与日に、DiD ラベル化 PEG 修飾 lipoplex を脂質 (DOPE、POPC、DC-6-14) 総量で 25 mg/kg となるように 200 μL ずつ尾静脈より投与した。その投与 6、12、24、48、96、144 時間後に LAS-4000 IR multi color を用いてマウスの全身像を撮影することにより腫瘍内への蓄積を評価した。コントロールとして、S-1 の metronomic 投与を施さなかったマウスを用いた。また、DiD ラベル化 PEG 修飾 lipoplex 投与 24 時間後にマウスを屠殺し、摘出した腫瘍、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓についても撮影を行った。

#### (6) RI を用いた siRNA 搭載リポソームの腫瘍移行性評価: 定量的評価

DLD-1 担がんマウスに対して、上記(5)に示すように S-1 を投与し、最終 S-1 投与日に <sup>3</sup>H-CHE ラベル化 PEG 修飾 lipoplex を脂質 (DOPE、POPC、DC-6-14) 総量で 25 mg/kg となるように 200 μL ずつ尾静脈より投与した。その 24 時間後に血液を心臓より 100 μL 採取し、また肺、肝臓、脾臓、腎臓、腫瘍も採取し、血液および各臓器中の放射活性を測定することで siRNA 搭載リポソームの腫瘍内移行性を評価した。

#### (7) 安全性評価

PEG 修飾 lipoplex (Ago2 標的 siRNA 含有) の全身投与時の安全性評価を以下のように行った。

ddY マウスに対し、以下の 6 群 (Sucrose 0 μg/mouse、PEG 修飾 CL 0 μg/mouse、Free siAgo2 80 μg/mouse、PEG 修飾 lipoplex (siCont 含有) 80 μg/mouse、PEG 修飾 lipoplex (siAgo2 含有) 40 μg/mouse、PEG 修飾 lipoplex (siAgo2 含有) 80 μg/mouse を 1 日間隔で合計 8 回マウス尾静脈より投与した。

体重変化: 頻回投与期間中、マウスの行動や状態の観察及び生死の確認を行うとともに、マウス体重を測定した。

組織重量: 最終投与から 24 時間後にマウスを解剖し、種々の臓器 (脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体) の重量を測定した。

血液学的検査及び血液生化学的検査: 最終投与から 24 時間後に採血を行い、血液学的検査 (RBC (赤血球)、WBC (白血球)、Hb (ヘモグロビン)、Ht (ヘマトクリット)、PLT (血小板))、ならびに血液生化学的検査 (AST (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)、ALT (アラニンアミノトランスフェラーゼ)、AIP (自己免疫性膵炎)、LDH (乳酸脱水素酵素)、BUN (尿素窒素)) を行った。

病理組織学的検査: 摘出した種々の臓器 (脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、胃、空腸、回腸 (パイエル板含む)、骨髄、胸骨、病変部) を 10% 緩衝ホルマリン固定液に浸漬し、常法に従い包埋、薄切の後、ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色を施し、H.E.染色標本を作成した。骨髄、胸骨は切り出しの前に脱灰操作を加えた。その後作成した H.E.染色標本を光学顕微鏡にて観察した。

免疫組織化学的検査: PEG 修飾 siAgo2-lipoplex (80 μg) 及び PEG 修飾 siCont-lipoplex (80 μg) 投与群の肝臓、脾臓組織切片を抗 cleaved caspase-3 抗体で染色し、陽性細胞をカウントした。

#### (8) 腫瘍増殖抑制効果 (その 1) - siBcl2 を用いた検討

##### I. 腫瘍増殖抑制効果の検討

腫瘍体積が約 100 mm<sup>3</sup> 以上に達した DLD-1 担がんマウスに対し、1) PEG 修飾 core-lipoplex (siBcl2 もしくはコントロールとして siGFP 含有) を siRNA 量で 10 μg/200μL ずつ 1 日間隔で合計 8 回マウス尾静脈より投与し、同時に 2) S-1 を tegafur 量で 6.9 mg/kg ずつ毎日経口より投与を行い、腫瘍体積変化と体重変化について検討を行った。さらに、PEG 修飾 core-lipoplex の最終投与 2 日後に、DLD-1 担がんマウスから腫瘍を摘出し、重量を測定した。

##### II. 併用投与時の腫瘍内 Bcl-2 発現抑制とアポトー

シス誘導

ウェスタンブロッティング：DLD-1 担がんマウスから摘出した腫瘍を冷 PBS (-) で洗浄した後、液体窒素に入れて凍結させた。その後粉碎し、重量の 5-10 倍 (20 mg の腫瘍ならば、100-200  $\mu$ L) の冷 Lysis buffer を加え腫瘍を完全に溶解させた。サンプルを 20  $\mu$ L (40  $\mu$ g protein/レーン) となるように SDS-PAGE した。ニトロセルロースに転写後、一次抗体として mouse monoclonal anti-human Bcl-2 antibody、mouse monoclonal anti-human Bax antibody を用いて Bcl-2、Bax を検出した。また、目的タンパク質のバンドを ECL Plus Chemiluminescence Reagent を用いて検出した。

アポトーシスの検出：DLD-1 担がんマウスから摘出した腫瘍を 4% PFA 溶液で固定後、30% スクロース溶液中で置換した。その後、腫瘍を Tissue-Tek O.C.T. Compound に包埋・凍結させ、Cryostat (Leica Microsystems, Solms, Germany) を用いて厚さ 5  $\mu$ m の腫瘍切片を得た。この腫瘍切片に対して TUNEL 染色を行った。その後、Hoechst33342 溶液 (5  $\mu$ g/mL) を添加して室温で 10 分間インキュベートすることで核染色を行った。その後、蛍光顕微鏡 (Axiovert 200M) を用いてアポトーシス細胞を観察した。また、Analyze Software (AxioVision, Zeiss) を用いてアポトーシス細胞の割合を定量評価した。

(9) 腫瘍増殖抑制効果 (その 2) - siAgo2 を用いた検討

#### I. 腫瘍増殖抑制効果の検討

DLD-1 担がんマウスに対し、1) PEG 修飾 siRNA 搭載リポソーム (siAgo2 もしくはコントロールとして siGFP 含有) を siRNA 量で 10-80  $\mu$ g/200 $\mu$ L ずつ 1 日間隔で合計 8 回マウス尾静脈より投与し、同時に 2) S-1 を tegafur 量で 6.9 mg/kg ずつ毎日経口より投与を行い、腫瘍体積変化と体重変化について検討を行った。さらに、PEG 修飾 siRNA 搭載リポソームの最終投与 2 日後に、DLD-1 担がんマウスから腫瘍を摘出し、重量を測定した。

II. 併用投与時の腫瘍内 Ago2 発現抑制とアポトーシス誘導

(7)-II. に示した方法で評価を行った。

(10) 腫瘍増殖抑制効果 (その 3) - siTS を用いた検討

#### I. 腫瘍増殖抑制効果の検討

腫瘍体積が約 100 mm<sup>3</sup> 以上に達した DLD-1 あるいは DLD-1/FU 担がんマウスに対し、1) PEG 修飾 siRNA 搭載リポソーム (siTS もしくはコントロールとして siGFP 含有) を siRNA 量で 80  $\mu$ g/200 $\mu$ L ずつ 1 日間隔で合計 8 回マウス尾静脈より投与し、同時に 2) S-1 を tegafur 量で 6.9 mg/kg ずつ毎日経口より投与を行い、腫瘍体積変化と体重変化について検討を行った。さらに、PEG 修飾

siRNA 搭載リポソームの最終投与 2 日後に、担がんマウスから腫瘍を摘出し、重量を測定した。

II. 併用投与時の腫瘍内 TS 発現抑制とアポトーシス誘導

(7)-II. に示した方法で評価を行った。

・倫理面への配慮

当該研究に関して、全ての動物実験プロトコールは所属機関における動物実験委員会による審査・承認を受けている。また、動物愛護の精神に乗っ取り、実験により派生する恐怖・苦痛をできるかぎり軽減できる方法を選択し、用いた。

### C. 研究結果

(1) siRNA 搭載リポソームの腫瘍移行性・腫瘍内拡散性

#### I. PEG 修飾 core-lipoplex に関して

これまでの検討より、S-1 を metronomic 投与することによって腫瘍内の微小環境が変化し、全身投与した PEG 修飾 liposome の腫瘍蓄積量が有意に向上する (liposome に対する EPR 効果が増強される) ことが明らかとなっている。そこで本項では、S-1 の metronomic 投与による EPR 効果の増強が、siRNA 含有 PEG 修飾 core-lipoplex に対しても見られる現象であるのか検討した。本検討では、S-1 を metronomic に投与した群 (S-1 処置群) と無処置群での腫瘍内への PEG 修飾 core-lipoplex の蓄積性の差異を、まず in vivo imaging system を用いて経時的に観察した。その結果、これまでの報告と同様に、S-1 処置群において腫瘍部位に PEG 修飾 core-lipoplex のマーカーである DiD 由来の蛍光が強く確認され、その強度を定量し S-1 処置群と無処置群を比較した結果においても、S-1 処置群の方が無処置群と比べて高い PEG 修飾 core-lipoplex 腫瘍蓄積性を示すことが明らかとなった。また、PEG 修飾 core-lipoplex 投与 144 時間後において、無処置群ではほとんど腫瘍部位に蛍光が観察されないが、S-1 処置群では蛍光が未だ強く観察された。このことから、S-1 の metronomic 投与は、腫瘍内に貯留された PEG 修飾 core-lipoplex の retention を高める作用を有している可能性が示唆された。一方、DiD ラベル化 PEG 修飾 core-lipoplex 投与から 24 時間後に腫瘍及び種々の臓器を採取して観察を行った場合においても、腫瘍において S-1 処置群では蛍光が顕著に強く確認された。また、腫瘍以外の臓器においては、このような違いは観察されなかった。以上より、S-1 の metronomic 投与により PEG 修飾 core-lipoplex の腫瘍蓄積性が亢進されることが確認できた。

次いで、より詳細に S-1 の metronomic 投与による EPR 効果の増強を検証するために、<sup>3</sup>H-CHE ラベル化 PEG 修飾 core-lipoplex を用いた放射活性の

測定による腫瘍蓄積量の定量的評価を行った。その結果、S-1 処置群の方が無処置群と比べて PEG 修飾 core-lipoplex の腫瘍蓄積量が有意に高い (約 1.56 倍) ことが確認された。また、S-1 処置群と無処置群との間で PEG 修飾 core-lipoplex の血中濃度、肺・肝臓・脾臓・腎臓への蓄積量に有意な差は見られなかった。この結果より、S-1 の metronomic 投与による蓄積量の増加は、腫瘍組織のみで見られる現象であり、その他主な臓器では見られないことが明らかとなった。このことは、血管新生阻害作用を有する S-1 が、腫瘍内の血管のみにダメージを与え、その他正常組織内の血管にはダメージを与えていないことを示唆している。

## II. PEG 修飾 lipoplex に関して

次いで、オーソドックスな方法により調製 (PEG 修飾 cationic liposome と siRNA を混合するだけ) した PEG 修飾 siRNA-lipoplex に対する S-1 併用による腫瘍内移行性の亢進に関して検討を行った。オーソドックスな方法によって調製される lipoplex は比較的粒子径が大きく、静脈内投与されると mononuclear phagocyte system (MPS) に比較的取り込まれやすく血中滞留性が低いため、結果的に EPR 効果による腫瘍移行性が低い事が知られている。

In vivo imaging による評価の結果、S-1 非処置群 (Control) と比較し S-1 処置群では、腫瘍において蛍光が強く確認され、PEG 修飾 siRNA-lipoplex の腫瘍移行性が向上している事が確認できた。次いで RI を用いた定量的評価を行ったところ、Control と比較して S-1 処置群のほうが、siRNA-lipoplex の腫瘍蓄積量が有意に高いことが確認できた。また、この siRNA-lipoplex の蓄積量の増加は、他の臓器 (肺、肝臓、脾臓、腎臓) においては観察されなかった。以上より、PEG 修飾 リポソームおよび PEG 修飾 core-lipoplex とは粒子径が全く異なる PEG 修飾 siRNA-lipoplex でも S-1 と併用することにより腫瘍移行性向上が認められ、さらにこの亢進効果は腫瘍部位のみにおいて生じることを確認することができた。

次いで、微視的に S-1 の低用量頻回投与が PEG 修飾 siRNA-lipoplex の腫瘍内分布に与える影響について検討を行った。蛍光顕微鏡による観察から、S-1 の処置日数依存的に、PEG 修飾 siRNA-lipoplex の腫瘍内分布が拡大することが明らかとなった。また、分布領域についても、Control では比較的腫瘍の端部分に蛍光色素の顕著な集積 (ホットスポット) が存在していたが、腫瘍の中心部ではあまり観察されなかった。しかし、S-1 処置により、PEG 修飾 siRNA-lipoplex が腫瘍中心付近にも分布していることが確認された。このことから、S-1 処置による変化は、腫瘍の端から内側にかけて生じて

いるものと考えられる。循環血流は、腫瘍外部から腫瘍新生血管を通り腫瘍内へという方向に流れ込む。しかしながら、腫瘍内は間質圧が高く、また血流が不連続的であるため、S-1 を含有する血液が腫瘍深部まで到達するのは困難であることが予想される。腫瘍内微小環境の変化は S-1 が届く領域で変化が生じると考えられるため、分布の変化が起こる場所に偏りが見られるのだと推測された。

さらに、S-1 の投与日数が与える DiI 標識 PEG 修飾 siRNA-lipoplex の腫瘍移行に対する影響について検討を行った。S-1 投与 4 日目から PEG 修飾 siRNA-lipoplex の腫瘍内分布が増加する傾向があらわれはじめ、7 日間連続投与することで腫瘍内での分布が比較的均等に分布するようになることが分かった。このことから、S-1 投与によって腫瘍内微小環境が微粒子が蓄積しやすい状況になるためには、S-1 投与期間がある程度必要であることが明らかになった。

## (2) siRNA (siAgo2) 搭載リポソーム投与時の安全性

siRNA は核酸であり、大量投与や繰り返し投与によって重篤な副反応が生じる可能性が高い。そこで、がん細胞のみならず正常細胞にも普遍的に存在している Ago2 遺伝子を標的とした siRNA を搭載した PEG 修飾 lipoplex の全身投与時の安全性について検討した。投与中のマウスの様子及び体重変化を検討したところ、まず頻回投与期間中、どの群においてもマウスの行動や状態には異常は見られず、死亡したマウスも存在しなかった。また、体重変化についてはどの群も増加傾向にあったが、siAgo2 含有 PEG 修飾 lipoplex の 80  $\mu$ g 投与群においては、他の群と比較すると増加抑制があることが示された。この結果より、当初想定していたように siAgo2 含有 PEG 修飾 lipoplex の全身投与 (特に 80  $\mu$ g 投与群) によって、正常組織に何らかの影響が生じている可能性が示唆された。

そこで次に、最終投与 24 時間後にマウスを屠殺して種々の臓器を採取し、その重量を測定することで比較検討を行った。その結果、ほとんどの臓器重量において、群間で有意な差は見られなかった。しかし、脾臓重量に関して、siAgo2 含有 PEG 修飾 lipoplex 投与群の脾臓重量は、スクロス投与群と比較して有意に増大 (脾臓肥大) していることが明らかとなった。

次いで、マウス屠殺時に血液を採取し、血液学的検査 (RBC、WBC、Hb、Ht、PLT)、ならびに血液生化学的検査 (AST、ALT、AIP、LDH、BUN) を行った。まず血液学的検査の結果、どの群間においても検査値に有意な差は見られなかった。しかし、siAgo2 含有 PEG 修飾 lipoplex 投与によって、軽度ながら赤血球数の減少ならびに中等度の網

状赤血球数の増加が認められた。従って、siAgo2 含有 PEG 修飾 lipoplex 投与が造血組織に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。また、血液生化学的検査の結果、siAgo2 含有 PEG 修飾 lipoplex 投与によって、軽度ながら LDH 値が高くなる傾向が観察されたが、どの群間においても有意な差は見られなかった。LDH は乳酸脱水素酵素であり、ほとんどあらゆる細胞に含まれているが、肝臓や腎臓、心筋、骨格筋、赤血球などに特に多く含まれている。従って、siAgo2 含有 PEG 修飾 lipoplex の全身投与によって、これら臓器中の一部細胞が壊死している可能性が示唆された。

次いで、摘出した種々の臓器 (脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、胃、空腸、回腸 (パイエル板含む)、骨髄、胸骨、病変部) に対して、病理組織学的検査を行った。その結果、siAgo2 含有 PEG 修飾 lipoplex の 80 µg 投与群において、一例ではあるが、脾臓における中程度の髄外造血像 (赤芽球及び未成熟赤芽球の増加を含む) が認められた。また、肺・肝臓・腎臓において変化が見られたものの、発生状況から用量に対応した変化ではなく、毒性学的意味はない変化と判断した。

最後に、siAgo2 もしくは siCont 含有 PEG 修飾 lipoplex の 80 µg 投与群の脾臓ならびに肝臓の組織切片を用いて、siAgo2 含有 PEG 修飾 lipoplex の全身投与によるアポトーシス細胞数の増加の有無について免疫組織化学的検査を行った。その結果、脾臓、肝臓ともに cleaved caspase-3 陽性細胞の有意な増加は認められなかった。ただし、先程 siAgo2 含有 PEG 修飾 lipoplex の 80 µg 投与群で髄外造血像が認められた 1 個体については、cleaved caspase-3 陽性細胞の顕著な増加が認められるという興味深い結果が得られた。

以上をまとめると、siAgo2 含有 PEG 修飾 lipoplex の繰り返し全身投与によって脾臓等に何らかの変化を生じたものの、その他重篤な変化は生じず、siAgo2 含有 PEG 修飾 lipoplex の安全性が確認された。

### (3) 抗腫瘍効果の検討

#### I. siBcl-2 を用いた検討

siBcl2 含有 PEG 修飾 core-lipoplex (全身投与) と S-1 (metronomic 投与) とを組み合わせることによって、I) 腫瘍細胞 (特に腫瘍血管周辺の細胞) 内の Bcl-2 タンパク質発現量の低下によって、S-1/5-FU に対する感受性が亢進し、S-1/5-FU による殺細胞効果が増強し、さらに II) S-1 の metronomic 投与により PEG 修飾 core-lipoplex がより腫瘍組織へ、且つより腫瘍深部まで移行し、siBcl2 による殺細胞効果が腫瘍内のより広範囲で見られ、結果として *in vivo* で非常に高い抗腫瘍効果が得られるのではないかと考え、検討を行った。

治療スケジュールとしては、siBcl2 含有 PEG 修飾 core-lipoplex を 1 日おきに計 8 回、siRNA 量で 10 µg/200 µL ずつ尾静脈より投与し、一方 S-1 は tegafur 量で 6.9 mg/kg となるように毎日経口投与した。その結果、スクロース群と比較して siBcl2 含有 PEG 修飾 core-lipoplex と S-1 はそれぞれ単剤で 21.5%、31.4% (DLD-1 接種後 20 日目) の腫瘍成長抑制効果を示したが、siBcl2 含有 PEG 修飾 core-lipoplex と S-1 とを併用することによって 62.8%と顕著に高い腫瘍成長抑制効果が得られた。この併用効果は、それぞれの薬剤単独時の効果を単純に足した効果 (52.9%) に比べて約 10%も効果が増強しており、相乗的な効果であると言える。この相乗的な効果は、先程 I)、II) で示した効果に起因したものと考えられる。また、最終投与から 48 時間後 (DLD-1 接種後 21 日目) にマウスを屠殺し、摘出した腫瘍重量を測定して比較検討した結果、siBcl2 含有 PEG 修飾 core-lipoplex と S-1 の併用群では、それぞれ単独群 (siBcl2; 20.4%、S-1; 28.8%) と比較して顕著に高い腫瘍重量抑制効果 (63.0%) が確認された。一方、siBcl2 含有 PEG 修飾 core-lipoplex と S-1 併用群において、他の群と比較して顕著な体重減少は見られず、これらの併用療法は安全性が高いことが示唆された。

次に、上記治療後のマウスから摘出した DLD-1 腫瘍を用いて、腫瘍内の Bcl-2 及び Bax タンパク質発現量をウェスタンブロッティングによって確認した。その結果、siBcl2 含有 PEG 修飾 core-lipoplex、S-1 のそれぞれ単独投与によって、多少の Bcl-2 タンパク質発現低下が見られたが、両者併用することによって顕著な Bcl-2 タンパク質発現低下が確認された。これに対して、siBcl2 含有 PEG 修飾 core-lipoplex や S-1 投与によって Bax タンパク質発現には変化が見られなかった。さらに、上記の DLD-1 腫瘍を用いて腫瘍内アポトーシス細胞の比率を評価するために、腫瘍切片を TUNEL 染色し蛍光顕微鏡にて観察を行った。また、Hoechst33342 を用いて核染色を行った。得られた像から解析ソフトを用いて定量評価したところ、siBcl2 含有 PEG 修飾 core-lipoplex 単独投与群では 10.5%、S-1 単独投与群では 15.9%のアポトーシス誘導が見られたが、これら併用投与群では 29.6%と顕著に高いアポトーシス誘導が確認された。以上の結果をまとめると、siBcl2 含有 PEG 修飾 core-lipoplex と S-1 の併用療法によって、siBcl2 含有 PEG 修飾 core-lipoplex の腫瘍蓄積性が向上し、siBcl2 によるアポトーシス誘導効果が増強され、同時に腫瘍内 Bcl-2 タンパク質の顕著な発現抑制により S-1/5-FU に対する感受性が向上し、S-1/5-FU によるアポトーシス誘導効果が増強された結果、顕著に高い抗腫瘍効果に繋がったのではないかと考えられた。

## II. siAgo2 を用いた検討

研究代表者は RNAi において主たる役割を果たす Argonaute2 (Ago2) を siRNA によって knockdown する事で細胞死が誘導される事を確認した。そこで、DLD-1 細胞における siAgo2 による細胞成長抑制、そして siAgo2 を細胞に前処置した後に 5-FU を処置することで、細胞成長にどのような影響を生じるのか、検討を行った。結果として、5-FU を併用することで、siAgo2 単独の場合よりも高い細胞成長抑制率が得られることが分かった。この場合の IC50 の変化は、siRNA を前処置していない細胞(control)では 0.39 $\mu$ g/ml、control 配列の siRNA(Luciferase 標的 siRNA)を前処置したものでは 0.43 $\mu$ g/ml、Ago2 標的 siRNA の前処置をしたものでは 0.19 $\mu$ g/ml であった。これらのことから、Ago2 標的 siRNA を前処置することで、5-FU に対する感受性が約 2.0 倍向上することを確認する事ができた。

前述のように *in vitro* において Ago2 遺伝子を knockdown することで、DLD-1 の 5-FU に対する感受性が上がり、高い細胞成長抑制効果を示すことを確認した。このことから、*in vivo* においても同様に高い抗腫瘍活性を示すことが考えられる。そこで、S-1 処置後に PEG 修飾 siRNA-lipoplex 投与を行い、抗腫瘍効果について検討を行った。その結果、siBcl-2 と同様に、併用投与を行った場合に極めて高い抗腫瘍効果が得られることを確認した。

ついで、併用処置後の腫瘍内における新生血管とアポトーシス部位の評価を行った。結果として、PEG 修飾 siRNA-lipoplex 単独処置と S-1 単独処置、そしてそれらを併用処置したものとはアポトーシスが起る部位に違いがあることが明らかとなった。PEG 修飾 siRNA-lipoplex 単独処置により誘導されたアポトーシス部位は、腫瘍新生血管とほぼ同じ位置に観察された。S-1 単独処置により誘導されたアポトーシス部位は、新生血管とほとんど一致せず、血管外でアポトーシスを起こしていることが明らかとなった。一方で併用群では、血管、そして血管外の両方においてアポトーシスが顕著に誘導されていることが分かった。

## III. siTS を用いた検討

### III-I. DLD-1 腫瘍 (5-FU 感受性) 移植モデルでの検討

PEG 修飾 TS-siRNA 搭載リポソーム(全身投与)と S-1 (metronomic 投与) とを組み合わせることによる抗腫瘍効果について検討を行った。

治療スケジュールとしては、PEG 修飾 TS-siRNA 搭載リポソームを1日おきに計8回、

siRNA量で80  $\mu$ g/200  $\mu$ Lずつ尾静脈より投与し、一方S-1はtegafur量で6.9 mg/kgとなるように毎日経口投与した。その結果、スクロース投与群(Control)に対してPEG修飾TS-siRNA搭載リポソームとS-1単独投与でもそれぞれ高い腫瘍成長抑制効果を示したが、PEG修飾TS-siRNA搭載リポソームとS-1とを併用することによって極めて高い相乗的な腫瘍成長抑制効果が得られた。

さらに、治療後の腫瘍を用いて腫瘍内アポトーシス細胞の比率を評価したところ、PEG 修飾 TS-siRNA 搭載リポソーム単独投与群、S-1 単独投与群よりも併用投与群で顕著に高いアポトーシス誘導が確認された。

ついで、併用処置後の腫瘍内における新生血管とアポトーシス部位の評価を行った。結果として、PEG 修飾 siRNA-lipoplex 単独処置と S-1 単独処置、そしてそれらを併用処置したものとはアポトーシスが起る部位に違いがあることが明らかとなった。PEG 修飾 TS-siRNA-lipoplex 単独処置により誘導されたアポトーシス部位は、腫瘍新生血管とほぼ同じ位置に観察された。S-1 単独処置により誘導されたアポトーシス部位は、新生血管とほとんど一致せず、血管外でアポトーシスを起こしていることが明らかとなった。一方で併用群では、血管、そして血管外の両方においてアポトーシスが顕著に誘導されていることが分かった。

また、治療後の TS 遺伝子ノックダウンに関して、腫瘍内の TS タンパク発現状況をウェスタンブロッティングによって評価したところ、PEG 修飾 TS-siRNA 搭載リポソーム単独投与群では顕著な発現の抑制は観察されなかったが、併用投与群においては顕著な発現抑制効果を観察することができた。

### III-II. DLD-1/FU 腫瘍 (5-FU 耐性-TS 高発現腫瘍) 移植モデルでの検討

5-FU耐性腫瘍においても、PEG修飾TS-siRNA搭載リポソーム(全身投与)とS-1 (metronomic投与) とを組み合わせることで、高い抗腫瘍効果が得られるか検討を行った。

治療スケジュールとしては、I.の検討と同様に、PEG修飾TS-siRNA搭載リポソームを1日おきに計8回、siRNA量で80  $\mu$ g/200  $\mu$ Lずつ尾静脈より投与し、一方S-1はtegafur量で6.9 mg/kgとなるように毎日経口投与した。

その結果、極めて残念であるが、5-FU耐性のDLD-1/FU移植マウスモデルにおいては、I.と同様の高い抗腫瘍効果を獲得することはできなかった。

## D. 考察

これまでの siRNA の DDS 研究は、siRNA を運ぶナノキャリア (送り手) に焦点を当てた研究が



主流であった。しかし、ナノキャリアは血行性に腫瘍組織へ到達するため、腫瘍内への移行はおのずと腫瘍内血管ネットワークに依存する。ところが、腫瘍内の無秩序な血管パターンや高い間質圧が原因となり、腫瘍深部の細胞まで siRNA を送達させることは現状の DDS では困難である。このことを改善するためにはキャリアの改変だけでは不可能であり、腫瘍内 (受け手) の三次元的空間を人為的に変化させる必要があると思われる。従って、siRNA の効率的な DDS の開発研究を進める上で、キャリアの改変のみならず、腫瘍内の微小環境を改変させて siRNA の腫瘍移行性・腫瘍内拡散性をもたせることは、革新的な siRNA デリバリー技術の開発につながるものと考えられる。

我々が見出した S-1 の metronomic 投与による EPR 効果の増強メカニズムに関しては次のように考察している。S-1 の metronomic 投与によって、A) 腫瘍新生血管の内皮細胞が傷害され、内皮細胞間の間隙が広がり、より漏出性の高い血管が形成されたこと、B) 腫瘍内血管系が正常化し、腫瘍内の広範囲に血液が分布するようになったこと、さらに C) 血管近傍のがん細胞が傷害され、血管外スペースが増加したことなど腫瘍内の微小環境が改変されたことが想定される。その結果、全身投与した PEG 修飾 liposome の腫瘍蓄積量が増加しているのではないかと考察している。また、この現象は、粒子径が約 400 nm の PEG 修飾 lipoplex を用いた場合でも見られており、ナノキャリアの粒子径に依存しない現象である可能性が示唆されてもいる。

この現象を利用して、Bcl-2 標的 siRNA (siBcl2) あるいは siAgo2 と経口型抗がん剤 S-1 を組み合わせた新規がん治療戦略を考えた。両 siRNA とともに標的遺伝子を knockdown することによって細胞死を誘導する事を確認しており、この siRNA 依存的な細胞死の誘導と S-1 の本体である 5-FU による細胞死誘導が相加・相乗的に作用して、結果として高い抗腫瘍効果が得られるのではないかと考えた。実際この併用療法が機能すれば、異なる 2 つの薬剤が互いに効果を向上し合うわけで『Double modulation therapy』と定義されるべきものである。検討の結果、顕著に高い、且つ相乗的な抗腫瘍効果が得られ、この併用療法の有用性を確認することができた。現在に至るまで、siRNA を effector (抗がん作用を示す薬剤)、もしくは modulator (effector の効果を変化させる作用を示す薬剤) としてのみ用いる研究が主流であった。しかし、組み合わせによっては siRNA に effector と modulator の両作用を発揮させることが可能であり、また、抗がん剤に関してもほとんどが effector として用いるのが通常であるが、組み合わせによっては modulator として機能させることが可能で

あることも明らかとなった。本検討で得られた知見は、今後、siRNA に代表される核酸医薬と化学療法とを組み合わせた新しいがん治療法の開発に向けた一歩になるものと期待している。

昨今のがん化学療法は多剤併用療法が主流となっており、5-FU は多くのがん種における first line regimen の構成薬剤となっている。5-FU に対する直接的な耐性機構は明らかになっていないが、5-FU の標的分子である TS の発現亢進が、耐性化の一つの機構として言われている。5-FU による治療は 5-FU に感受性のある (TS 発現が相対的に低い) 細胞に有効であり、治療サイクルに依存してこれらの細胞は死滅し、代わって 5-FU 治療で死ななかった (TS の発現が比較的高い) 細胞が多くを占めるようになるものと考えられる。この細胞の置き代わりが耐性化に他ならず、治療初期から siRNA によって TS の発現を抑制できれば、このような耐性化を阻止する事が可能になるものと期待され、臨床上的意義も高まるものと考えた。そこで、今回、TS 強発現株を用いて S-1 と siRNA 搭載ナノキャリアの併用治療を試みたが、残念ながら想定通りの高い抗腫瘍効果を得る事はできなかった。これは、S-1 が今回の投与条件では TS 高発現細胞に障害を与える事が出来なかったからであると考えている。一方、臨床においては 5-FU に感受性を示さない症例であっても、必ずしも全ての細胞が TS 高発現になっているわけではなく、また TS 発現もまちまちであると考えるのが妥当であると思われる。したがって、今回の併用療法は、臨床においては高い効果を示す可能性が高く、この事を実証するような実験系を構築し、今後検討していく予定である。

先に述べたように、研究代表者が見出した S-1 の metronomic 投与による EPR 効果の増強メカニズムに関しては、以下のように考察してきた。即ち、S-1 の metronomic 投与によって、A) 腫瘍新生血管の内皮細胞が傷害され、内皮細胞間の間隙が広がり、より漏出性の高い血管が形成されたこと、B) 腫瘍内血管系が正常化し、腫瘍内の広範囲に血液が分布するようになったこと、さらに C) 血管近傍のがん細胞が傷害され、血管外スペースが増加したこと、など腫瘍内の微小環境が改変されたことによるものであろうとするものである。本研究成果として、5-FU に耐性を示す DLD-1/FU 細胞を用いた場合、併用効果による高い抗腫瘍効果が得られなかった。この事から、S-1 の metronomic 投与による EPR 効果の増強メカニズムは、主として C) の血管近傍のがん細胞が傷害され、血管外スペースが増加したこと、に起因する可能性が極めて高い事が分かった。

5-FU による細胞死の誘導による腫瘍細胞の減少は、先に述べたような腫瘍内圧の低下による細

胞間隙内の自由水の拡散性の向上とこれに伴う siRNA 搭載ナノキャリアの拡散を導くだけでなく、腫瘍細胞の圧力から解放された血管の開放とこれに伴う血流の改善（ナノキャリア自体の腫瘍移行量が増加する）、さらには障害の反動としての活発な新生血管の造成（ナノキャリアの血管外への漏出が増加する）などを誘起することも考えられ、結局、前段落で示した A)-C)の全ての過程を連鎖的に誘起しているものと現時点では考えている。

#### E. 結論

ナノキャリアを利用した抗がん剤の腫瘍へのデリバリー術はすでに確立されており、Doxil などの製剤が臨床で用いられている。抗がん剤の場合、漏れ出した薬剤自体が腫瘍内を拡散して効果を発揮するのに対し、siRNA はキャリアからの放出性に乏しく、また siRNA 単体では細胞膜不透過性であるため、キャリアを介して細胞内に導入されなければ、その効果を発揮することはできない。したがって、siRNA が薬効を発現できる領域はナノキャリアの分布領域に依存する。そのため、siRNA の薬効が及ぶ領域を拡大させるためには、腫瘍内においてナノキャリア自体の拡散性を向上させ、その分布領域を拡大させることが非常に重要となる。本研究課題を遂行した結果、経口型抗がん剤 S-1 の繰り返し投与が腫瘍内の微小環境を変化させ、siRNA 含有ナノキャリアの腫瘍内移行性を亢進させると共にその腫瘍内分布領域を拡大させ、結果として高い抗腫瘍効果を発揮させる事を世界で初めて確認することができた。S-1 は大腸がん・胃がん・膵がん治療などで既に臨床応用されており、この S-1 との併用によって、より腫瘍深部の細胞に siRNA が導入され、薬効発現につながったことは、siRNA を用いたがん治療『Double modulation therapy』の実現に大きく貢献する新たな知見である。

一方で、TS の発現が亢進した腫瘍に関しては、S-1+TS-siRNA 搭載ナノキャリアは腫瘍増殖抑制効果を確認する事はできなかった。しかし、この事は S-1 が腫瘍血管から漏出し、腫瘍細胞に障害を与える事が引き金となり、siRNA 搭載ナノキャリアの腫瘍移行性および腫瘍内拡散性が改善される事を示唆しており、期せずして S-1 の腫瘍内微小環境変化誘導機構を明らかにすることに繋がる重要な知見となった。

昨今のがん化学療法は多剤併用療法が主体であり、これら遊離型抗がん剤の投与は S-1 のように腫瘍内の微小環境をナノキャリアが移行しやすいものに変化させている可能性が非常に高く、今後このような観点からの検討を種々の抗がん剤に対して継続していく予定である。また、この

ような性質を利用し、これらの抗がん剤の効果を亢進させるような siRNA を腫瘍に選択的に送達すれば、臨床でのより高い抗腫瘍効果の獲得と患者の QOL の向上に寄与できるものと期待している。

本研究で確立した siRNA デリバリーシステムは、抗がん剤による治療時に生ずる腫瘍内微小環境変化を利用しており、臨床応用へのバリアは極めて低く、siRNA を用いたがん治療の実現に大きく貢献する優れた成果である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1)Ishihara, T., Takeda, M., Sakamoto, H., Kimoto, A., Kobayashi, C., Takasaki, N., Yuki, K., Tanaka, K., Takenaga, M., Igarashi, R., Maeda, T., Yamakawa, N., Okamoto, Y., Otsuka, M., Ishida, T., Kiwada, H., Mizushima, Y. and Mizushima, T., Accelerated blood clearance phenomenon upon repeated injection of PEG-modified PLA-nanoparticles. *Pharm. Res.*, 26, 2270-2279 (2009)
- (2)Abu-Lila, A, Suzuki, T., Doi, Y., Ishida, T., Kiwada, H., Oxaliplatin targeting to angiogenic vessels by PEGylated cationic liposomes suppresses the angiogenesis in a dorsal air sac mouse model. *J. Control. Release*, 134, 18-25 (2009)
- (3)Ishida, T., Shiraga, E., Kiwada, H., Synergistic antitumor activity of metronomic dosing of cyclophosphamide in combination with doxorubicin-containing PEGylated liposomes in a murine solid tumor model. *J. Control. Release*, 134, 194-200 (2009)
- (4)Abu Lila, A., Kizuki, S., Doi, Y., Suzuki, T., Ishida, T., Kiwada, H., Oxaliplatin encapsulated in PEG-coated cationic liposomes induces significant tumor growth suppression via a dual-targeting approach in a murine solid tumor model. *J. Control. Release*, 137, 8-14 (2009)
- (5)Tagami, T., Nakamura, K., Shimizu, T., Ishida, T., Kiwada, H., Effect of siRNA in PEG-coated siRNA-lipoplex on anti-PEG IgM production. *J. Control. Release*, 137, 234-240 (2009)
- (6)Doi Y., Okada T., Matsumoto H., Ichihara M., Ishida T., Kiwada H., Combination therapy of metronomic S-1 dosing with oxaliplatin-containing PEG-coated liposome improves antitumor activity in a murine colorectal tumor model. *Cancer Sci.*, 101, 2470-2475 (2010)
- (7)Tagami, T., Nakamura, K., Shimizu, T., Yamazaki, N., Ishida, T., Kiwada, H., CpG motifs in pDNA-sequences increase anti-PEG IgM production induced by PEG-coated pDNA-lipoplexes. *J. Control. Release*, 142,

- 160-166 (2010)
- (8) Abu Lila, A., Doi, Y., Nakamura, K., Ishida, T., Kiwada, H., Sequential administration with oxaliplatin-containing PEG-coated cationic liposomes promotes a significant delivery of subsequent dose into murine solid tumor. *J. Control. Release*, 142, 167-173 (2010)
- (9) Ishihara T., Maeda T., Sakamoto H., Takasaki N., Shigyo M., Ishida T., Kiwada H., Mizushima Y., Mizushima T., Evasion of the accelerated blood clearance phenomenon by coating of nanoparticles with various hydrophilic polymers. *Biomacromolecules*, 11, 2700-2706 (2010)
- (10) Abu Lila, A., Ishida, T., Kiwada, H., Targeting anticancer drugs to tumor vasculature using cationic liposomes. *Pharm. Res.*, 27, 1171-1183 (2010)
- (11) Tagami T., Uehara Y., Moriyoshi N., Ishida T., Kiwada H., Anti-PEG IgM production by siRNA encapsulated in a PEGylated lipid nanocarrier is dependent on the sequence of the siRNA. *J. Control. Release*, 151, 149-154 (2011)
- (12) Barichello, J.M., Kizuki, S., Tagami, T., Asai, T., Ishida, T., Kikuchi, K., Oku, N., Kiwada, H., Agitation during lipoplex formation improves the gene knockdown effect of siRNA. *Int. J. Pharm.*, 410, 153-160 (2011)
- (13) Tagami, T., Suzuki, T., Hirose, K., Barichello, J.M., Yamazaki, N., Asai, T., Oku, N., Ishida, T., Kiwada, H., Argonaute2 is a potential target for siRNA-based cancer therapy for HT1080 human fibrosarcoma. *Drug Deliv. Transl. Res.*, 1, 277-288 (2011)
- (14) Nakamura, K., Abu Lila A., Matsunaga, M., Doi, Y., Ishida, T., Kiwada H., A double-modulation strategy in cancer treatment with a chemotherapeutic agent and siRNA. *Mol. Ther.*, 19, 2040-2047 (2011)
- (15) Tagami, T., Abu Lila, A.S., Matsunaga, M., Moriyoshi, N., Nakamura, H., Nakamura, K., Suzuki, T., Doi, Y., Ishida, T., Kiwada, H., Improved intratumoral delivery of PEG-coated siRNA-lipoplexes by combination with metronomic S-1 dosing in a murine solid tumor model. *Drug Deliv. Transl. Res.*, 2, 77-86 (2012)
- (16) Tagami, T., Suzuki, T., Matsunaga, M., Nakamura, K., Moriyoshi, N., Ishida, T., Kiwada, H., Anti-angiogenic therapy via cationic liposome-mediated systemic siRNA delivery. *Int. J. Pharm.*, 422, 280-289 (2012)
- (17) Barichello, J.M., Kizuki, S., Tagami, T., Luiz Alberto Lira Soares, L.A.L., Ishida, T., Kikuchi, H., Kiwada, H., Agitation during lipoplex formation harmonizes the interaction of siRNA to cationic liposomes. *Int. J. Pharm.*, 430, 359-365 (2012)
- (1) Ishida, T., Kiwada, H., Improvement of tumor-targeting therapy with nanocarriers by changing the tumor microenvironment. 2009 International Symposium of the Intelligent Drug Delivery System., Korea, April (2009)
- (2) Doi, Y., Hira, Y., Ishida, T., Kiwada, H., Synergistic antitumor activity of metronomic S-1 dosing in combination with oxaliplatin (1-OHP) - containing PEGylated liposome in a murine solid tumor model. AACR 100th Annual Meeting 2009, USA, April (2009)
- (3) Ishida, T., Amr A., Suzuki, T., Doi, Y., Kiwada, H., Oxaliplatin encapsulated in PEG-coated cationic liposome induces significant tumor growth suppression via dual-targeting approach in murine solid tumor model. AACR 100th Annual Meeting 2009, USA, April (2009)
- (4) 石田竜弘, 浅井知浩, 奥直人, 際田弘志, Argonaute2 標的 siRNA リポプレックスを用いたがん治療戦略, 学術シンポジウム 4 RNAi 医薬の展望 -From Bench to Bedside -, 日本薬剤学会第 24 年会 (静岡), 2009 年 5 月
- (5) 石田竜弘, 抗がん剤 targeted delivery によるがん治療 ~その現状と今後の課題について~, がん治療フォーカスグループシンポジウム, 日本薬剤学会第 24 年会 (静岡), 2009 年 5 月
- (6) Abu-Lila Amr, 鈴木卓也, 土井祐輔, 石田竜弘, 際田弘志, Oxaliplatin targeting to angiogenic vessels by PEG-coated cationic liposomes suppresses the angiogenesis in a dorsal air sac mouse model. 日本薬剤学会第 24 年会 (静岡), 2009 年 5 月
- (7) 松永真理子, 中村和也, 鈴木卓也, 土井祐輔, 石田竜弘, 際田弘志, フッ化ピリミジン系経口抗がん剤併用による siRNA-lipoplex の腫瘍移行向上の試み, 日本薬剤学会第 24 年会 (静岡), 2009 年 5 月
- (8) 田上辰秋, 中村和也, 石田竜弘, 際田弘志, siRNA 封入 PEG 修飾リポソーム投与時における siRNA 配列の anti-PEG IgM 分泌に与える影響, 遺伝子・デリバリー研究会第 9 回シンポジウム (大阪), 2009 年 7 月
- (9) 中村和也, 松永真理子, 鈴木卓也, 田上辰秋, 石田竜弘, 際田弘志, Argonaute2 標的 siRNA の全身投与による制がん効果及び毒性の検討, 遺伝子・デリバリー研究会第 9 回シンポジウム (大阪), 2009 年 7 月
- (10) 石田竜弘, 際田弘志, 核酸デリバリーにおける accelerated blood clearance (ABC)現象, 第 25 回日本 DDS 学会 (東京), 2009 年 7 月
- (11) 松永真理子, 中村和也, 石田竜弘, 際田弘志, 腫瘍移行性向上を目指した siRNA-lipoplex の改良とその評価, 第 25 回日本 DDS 学会 (東

## 2. 学会発表

- 京)、2009年7月
- (12) 中村和也、松永真理子、鈴木卓也、田上辰秋、石田竜弘、際田弘志、Argonaute2 遺伝子を標的とした siRNA によるがん治療法の有用性と安全性、第 25 回日本 DDS 学会 (東京)、2009 年 7 月
- (13) 田上辰秋、中村和也、清水太郎、山崎尚志、石田竜弘、際田弘志、ポリエチレングリコール(PEG)を利用した核酸送達システムにおいてプラスミド DNA 配列内の CpG 除去が抗 PEG 抗体産生に与える影響、第 25 回日本 DDS 学会 (東京)、2009 年 7 月
- (14) Abu-Lila Amr、城慎二、土井祐輔、鈴木卓也、石田竜弘、際田弘志、Oxaliplatin encapsulated in PEG-coated cationic liposomes induces significant tumor growth suppression via dual-targeting approach in a murine solid tumor model、第 25 回日本 DDS 学会 (東京)、2009 年 7 月
- (15) 土井祐輔、岡田知子、松本春菜、石田竜弘、際田弘志、ナノキャリアに対する EPR 効果に寄与する腫瘍内微小環境変化に関する検討：S-1 の低用量頻回投与(metronomic chemotherapy)から得られた知見、第 18 回 DDS カンファレンス (静岡)、2009 年 9 月
- (16) 田上辰秋、石田竜弘、際田弘志、PEG を用いた核酸送達システムにおいて核酸が anti-PEG IgM 分泌に与える影響、第 18 回 DDS カンファレンス (静岡)、2009 年 9 月
- (17) 土井祐輔、石田竜弘、際田弘志、S-1 の metronomic chemotherapy がもたらすナノキャリア腫瘍集積性向上に関わる腫瘍内微小環境変化、第 68 回日本癌学会学術総会(横浜)、2009 年 10 月
- (18) 中村和也、土井祐輔、石田竜弘、際田弘志、siRNA による Bcl-2 遺伝子ノックダウンと S-1 のメトロニック療法の組み合わせによる相乗的な制がん効果、第 68 回日本癌学会学術総会 (横浜)、2009 年 10 月
- (19) 上原友美、田上辰秋、石田竜弘、際田弘志、ABC 現象回避を目的としたポリグリセロール修飾リポプレックスの有効性評価、第 48 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (徳島)、2009 年 11 月
- (20) 岡田知子、土井祐輔、Abu-Lila Amr、石田竜弘、際田弘志、フッ化ピリミジン系経口抗癌剤と Oxaliplatin 封入 PEG 修飾カチオンリポソーム併用による抗腫瘍効果の検討、第 48 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (徳島)、2009 年 11 月
- (21) 松本春菜、土井祐輔、石田竜弘、際田弘志、がん細胞種の違いが及ぼす PEG 修飾リポソームの腫瘍移行及び分布への影響、第 48 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (徳島)、2009 年 11 月
- (22) 岩木雄大、城慎二、中村和也、田上辰秋、石田竜弘、際田弘志、Lipoplex の PEG 修飾による細胞内取り込み量の変化及び RNAi 効果に与える影響に関する検討、第 48 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (徳島)、2009 年 11 月
- (23) Koide, H., Asai, T., Yokoyama, M., Ishida, T., Kiwada, H., Oku, N., Elucidation of ABC phenomenon caused by repeat injection of PEGylated nanocarrier. 4th International Liposome Society Conference. Liposome advances: Progress in Drug and Vaccine Delivery, London, UK, Dec. (2009)
- (24) Ishida, T., Nakamura, K., Matsunaga, M., Doi, Y., Kiwada, H., A novel double modulation strategy in cancer treatment with chemotherapeutic agent and siRNA: siRNA-induced Bcl-2 knockdown increases chemosensitivity against 5-FU and S-1 improves siRNA accumulation in human colorectal tumor xenograft model. 4th International Liposome Society Conference. Liposome advances: Progress in Drug and Vaccine Delivery, London, UK, Dec. (2009)
- (25) Doi, Y., Okada, T., Matsumoto, H., Ishida, T., Kiwada H., Alteration of tumor microenvironment by metronomic S-1 dosing results in augmentation of EPR effect against PEG-coated liposomes. 4th International Liposome Society Conference. Liposome advances: Progress in Drug and Vaccine Delivery, London, UK, Dec. (2009)
- (26) 岩木雄大、田上辰秋、中村和也、石田竜弘、際田弘志、RNAi 効果発現に対する Lipoplex への PEG 修飾の影響に関する検討、日本薬学会第 130 年会 (岡山)、2010 年 3 月
- (27) 土井祐輔、松本春菜、岡田知子、石田竜弘、際田弘志、ナノキャリアに対する EPR 効果に寄与する腫瘍内微小環境変化に関する研究：S-1 の低用量頻回投与(metronomic chemotherapy)から得られた知見、日本薬学会第 130 年会 (岡山)、2010 年 3 月
- (28) 松本春菜、土井祐輔、石田竜弘、際田弘志、がん細胞種が及ぼす抗がん剤封入リポソームの腫瘍移行性とその治療効果への影響、日本薬学会第 130 年会 (岡山)、2010 年 3 月
- (29) 中村和也、松永真理子、岩木雄大、土井祐輔、石田竜弘、際田弘志、テガフル製剤 S-1 と Bcl-2 標的 siRNA 封入リポソームの併用によ

- る double modulation therapy の有用性、日本薬学会第 130 年会 (岡山)、2010 年 3 月
- (30) 上原友美、田上辰秋、石田竜弘、際田弘志、ABC 現象回避を目的とした lipoplex に対する polymer 修飾剤 polyglycerol の有効性評価、日本薬学会第 130 年会 (岡山)、2010 年 3 月
- (31) Abu-Lila Amr、土井祐輔、中村和也、石田竜弘、際田弘志、Sequential administration with oxaliplatin-containing PEG-coated cationic liposomes promotes a significant delivery of subsequent dose into murine solid tumor、日本薬学会第 25 年会 (徳島)、2010 年 5 月
- (32) 森吉直人、中村和也、松永真理子、石田竜弘、際田弘志、テガフル製剤 S-1 と Bcl-2 標的 siRNA 封入 liposome の併用療法によるがん治療の有用性に関する検討、第 26 回日本 DDS 学会 (大阪)、2010 年 6 月
- (33) 上原友美、田上辰秋、石田竜弘、際田弘志、核酸デリバリーにおける修飾剤種が与えるポリマー特異性 IgM 分泌への影響、遺伝子・デリバリー研究会第 10 回シンポジウム (札幌)、2010 年 6 月
- (34) 岩木雄大、田上辰秋、中村和也、石田竜弘、際田弘志、Lipoplex のエンドソーム/ライソソームからの脱出メカニズムに関する検討、遺伝子・デリバリー研究会第 10 回シンポジウム (札幌)、2010 年 6 月
- (35) 松永真理子、中村和也、森吉直人、石田竜弘、際田弘志、腫瘍移行性向上を目指した siRNA-lipoplex の改良と評価、遺伝子・デリバリー研究会第 10 回シンポジウム (札幌)、2010 年 6 月
- (36) 石田竜弘、腫瘍への siRNA デリバリーシステムの開発～効果と安全性の観点から～、第 47 回薬剤学懇談会研究討論会 (高山)、2010 年 6 月
- (37) 石田竜弘、生体内動態検討を基盤としたリポソーム DDS の開発、第 26 回日本 DDS 学会 (大阪)、2010 年 6 月
- (38) 石田竜弘、際田弘志、核酸デリバリーにおける ABC 現象、遺伝子・デリバリー研究会第 10 シンポジウム (札幌)、2010 年 6 月
- (39) Matsumoto, H., Doi, Y., Ishida, T., Kiwada, H., Tumor localization and therapeutic effect of PEG-coated liposomal anticancer agent: Tumor type-dependency. International Liposome Research Days & Lipids, Liposomes & Membrane Biophysics, Vancouver, Canada, Aug. (2010)
- (40) Okada, T., Doi, Y., Abu Lila, A. Abu Lila., Ishida, T., Kiwada, H., Metronomic oral S-1, a fluoropyrimidine anticancer agent, dosing affects tumor accumulation of PEG-coated liposome. International Liposome Research Days & Lipids, Liposomes & Membrane Biophysics, Vancouver, Canada, Aug. (2010)
- (41) Matsunaga, M., Nakamura, K., Doi, Y., Moriyoshi, N., Ishida, T., Kiwada, H., Development of new cancer treatment strategy that combines siRNA-lipoplex with oral tegafur anticancer drug S-1. International Liposome Research Days & Lipids, Liposomes & Membrane Biophysics, Vancouver, Canada, Aug. (2010)
- (42) Iwaki, T., Tagami, T., Nakamura, K., Ishida, T., Kiwada H., The effect of PEGylation of siRNA-lipoplex on intracellular uptake quantity of siRNA and intracellular behavior of siRNA. International Liposome Research Days & Lipids, Liposomes & Membrane Biophysics, Vancouver, Canada, Aug. (2010)
- (43) 上原友美、田上辰秋、市原理子、石田竜弘、際田弘志、ナノ粒子ポリマー修飾剤の構造の違いが与える抗ポリマーIgM の分泌機構への影響に関する検討、ナノライフサイエンス・オープンセミナー2010 (大阪)、2010 年 8 月
- (44) 岩木雄大、中村和也、田上辰秋、石田竜弘、際田弘志、siRNA-lipoplex への PEG 修飾が RNAi 効果発現に与える影響、ナノライフサイエンス・オープンセミナー2010 (大阪)、2010 年 8 月
- (45) 北川瑞野、岩木雄大、田上辰秋、石田竜弘、際田弘志、トランスフェクション後の細胞内 siRNA 量の経時変化に関する検討、ナノライフサイエンス・オープンセミナー2010 (大阪)、2010 年 8 月
- (46) 長尾愛、市原理子、土井祐輔、石田竜弘、際田弘志、S-1 と l-OHP 封入 PEG 修飾リポソームの併用条件下における抗 PEG IgM 抗体分泌の検討、ナノライフサイエンス・オープンセミナー2010 (大阪)、2010 年 8 月
- (47) 石田竜弘、田上辰秋、上原友美、森吉直人、岩木雄大、際田弘志、リポソームを用いた腫瘍への siRNA デリバリーシステムの開発、遺伝子・デリバリー研究会第 10 回夏季セミナー (滋賀)、2010 年 9 月
- (48) 石田竜弘、際田弘志、腫瘍内微小環境変化を利用した siRNA デリバリーシステムの開発、第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (富山)、2010 年 11 月
- (49) 長尾愛、市原理子、土井祐輔、石田竜弘、際田弘志、抗 PEG IgM 抗体誘導における S-1 と l-OHP 封入 PEG 修飾リポソーム併用条件が与える影響の検討、第 49 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (鳥取)、2010 年 11 月
- (50) 北川瑞野、岩木雄大、田上辰秋、石田竜弘、

際田弘志、細胞内導入後の siRNA 量の経時的変化に関する検討、第 49 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会（鳥取）、2010 年 11 月

- (51) 橋本 洋佑、森吉 直人、上原 友美、田上 辰秋、石田 竜弘、際田 弘志、siRNA 含有 PEG 修飾ナノキャリアによる anti-PEG IgM 誘導におけるトール様受容体 (TLR) の関与、第 27 回日本 DDS 学会学術集会、東京、2011 年 6 月
- (52) 石田竜弘、腫瘍内微小環境変化を利用した核酸デリバリー戦略、遺伝子・デリバリー研究会第 11 回夏期セミナー (高知)、2011 年 8 月
- (53) 岡田 知子、土井 祐輔、Amr S. Abu Lila、石田 竜弘、際田 弘志、フッ化ピリミジン系経口抗癌剤が PEG 修飾カチオニックリポソームの腫瘍移行性に与える影響、第 20 回 DDS カンファランス (静岡)、2011 年 9 月
- (54) 松本 春菜、土井 祐輔、中村 浩之、西尾 美穂、石田 竜弘、原田 雅史、際田 弘志、PEG 修飾リポソームの腫瘍内分布領域可視化の試み、第 20 回 DDS カンファランス (静岡)、2011 年 9 月
- (55) 橋本 洋佑、上原 友美、石田 竜弘、際田 弘志、siRNA リポプレックス投与時の TLR 刺激が及ぼす anti-PEG IgM 分泌誘導への影響、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2011 (大阪)、2011 年 9 月
- (56) 森吉 直人、中村 和也、松永 真理子、石田 竜弘、際田 弘志、Tegaful 製剤 S-1 と siRNA 含有 liposome の併用による新規がん治療法の開発、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2011 (大阪)、2011 年 9 月
- (57) Moriyoshi, N., Matsunaga, M., Nakamura, K., Ishida, T., Kiwada, H., Development of new cancer treatment strategy that combines PEG-coated siRNA-lipoplex with metronomic S-1 dosing. International Liposome Society 2011 meeting, University of London, London, UK, Dec. (2011)
- (58) 石田 竜弘、際田 弘志、腫瘍内微小環境の能動的制御に基づく siRNA デリバリー技術の開発とがん治療への展開、日本薬学会第 132 年会 (札幌)、2012 年 3 月
- (59) 岡田 知子、土井 祐輔、Amr ABU LILA、石田 竜弘、際田 弘志、フッ化ピリミジン系経口抗癌剤 S-1 が PEG 修飾カチオニックリポソームの腫瘍移行性に与える影響、日本薬学会第 132 年会 (札幌)、2012 年 3 月
- (60) 中村 浩之、土井 祐輔、石田 竜弘、際田 弘志、S-1 とオキサリプラチン封入 PEG 修飾リポソームの併用療法におけるリポソームの

体内動態の変化に関する検討、日本薬学会第 132 年会 (札幌)、2012 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishihara, T., Takeda, M., Sakamoto, H., Kimoto, A., Kobayashi, C., Takasaki, N., Yuki, K., Tanaka, K., Takenaga, M., Igarashi, R., Maeda, T., Yamakawa, N., Okamoto, Y., Otsuka, M., <u>Ishida, T.</u> , Kiwada, H., Mizushima, Y. and Mizushima, T.,	Accelerated blood clearance phenomenon upon repeated injection of PEG-modified PLA-nanoparticles.	<i>Pharm. Res.</i>	26	2270-2279	2009
Abu-Lila, A, Suzuki, T., Doi, Y., <u>Ishida, T.</u> , Kiwada, H.,	Oxaliplatin targeting to angiogenic vessels by PEGylated cationic liposomes suppresses the angiogenesis in a dorsal air sac mouse model.	<i>J. Control. Release</i>	134	18-25	2009
<u>Ishida, T.</u> , Shiraga, E., Kiwada, H.,	Synergistic antitumor activity of metronomic dosing of cyclophosphamide in combination with doxorubicin-containing PEGylated liposomes in a murine solid tumor model.	<i>J. Control. Release</i>	134	194-200	2009
Abu Lila, A., Kizuki, S., Doi, Y., Suzuki, T., <u>Ishida, T.</u> , Kiwada, H.,	Oxaliplatin encapsulated in PEG-coated cationic liposomes induces significant tumor growth suppression via a dual-targeting approach in a murine solid tumor model.	<i>J. Control. Release</i>	137	8-14	2009
Tagami, T., Nakamura, K., Shimizu, T., <u>Ishida, T.</u> , Kiwada, H.,	Effect of siRNA in PEG-coated siRNA-lipoplex on anti-PEG IgM production.	<i>J. Control. Release</i>	137	234-240	2009
Doi Y., Okada T., Matsumoto H., Ichihara M., <u>Ishida T.</u> , Kiwada H.	Combination therapy of metronomic S-1 dosing with oxaliplatin-containing PEG-coated liposome improves antitumor activity in a murine colorectal tumor model.	<i>Cancer Sci.</i>	101	2470-2475	2010
Tagami, T., Nakamura, K., Shimizu, T., Yamazaki, N., <u>Ishida, T.</u> , Kiwada, H.	CpG motifs in pDNA-sequences increase anti-PEG IgM production induced by PEG-coated pDNA-lipoplexes.	<i>J. Control. Release</i>	142	160-166	2010
Abu Lila, A., Doi, Y., Nakamura, K., <u>Ishida, T.</u> , Kiwada, H.	Sequential administration with oxaliplatin-containing PEG-coated cationic liposomes promotes a significant delivery of subsequent dose into murine solid tumor.	<i>J. Control. Release</i>	142	167-173	2010
Ishihara T., Maeda T., Sakamoto H., Takasaki N., Shigyo M., <u>Ishida T.</u> , Kiwada H., Mizushima Y., Mizushima T.	Evasion of the accelerated blood clearance phenomenon by coating of nanoparticles with various hydrophilic polymers.	<i>Biomacromolecules</i>	11	2700-2706	2010
Abu Lila, A., <u>Ishida, T.</u> , Kiwada, H.	Targeting anticancer drugs to tumor vasculature using cationic liposomes.	<i>Pharm. Res.</i>	392	1171-1183	2010

Tagami T., Uehara Y., Moriyoshi N., <u>Ishida T.</u> , Kiwada H.	Anti-PEG IgM production by siRNA encapsulated in a PEGylated lipid nanocarrier is dependent on the sequence of the siRNA.	<i>J. Control. Release,</i>	151	149-154	2011
Barichello, J.M., Kizuki, S., Tagami, T., Asai, T., <u>Ishida, T.</u> , Kikuchi, K., Oku, N., Kiwada, H.,	Agitation during lipoplex formation improves the gene knockdown effect of siRNA.	<i>Int. J. Pharm.</i>	410	153-160	2011
Tagami, T., Suzuki, T., Hirose, K., Barichello, J.M., Yamazaki, N., Asai, T., Oku, N., <u>Ishida, T.</u> , Kiwada, H.,	Argonaute2 is a potential target for siRNA-based cancer therapy for HT1080 human fibrosarcoma.	<i>Drug Deliv. Transl. Res.,</i>	1	277-288	2011
Nakamura, K., Abu Lila A., Matsunaga, M., Doi, Y., <u>Ishida, T.</u> , Kiwada H.,	A double-modulation strategy in cancer treatment with a chemotherapeutic agent and siRNA.	<i>Mol. Ther.</i>	19	2040-2047	2011
Tagami, T., Suzuki, T., Matsunaga, M., Nakamura, K., Moriyoshi, N., <u>Ishida, T.</u> , Kiwada, H.,	Anti-angiogenic therapy via cationic liposome-mediated systemic siRNA delivery.	<i>Int. J. Pharm.</i>	422	280-289	2012
Tagami, T., Abu Lila, A.S., Matsunaga, M., Moriyoshi, N., Nakamura, H., Nakamura, K., Suzuki, T., Doi, Y., <u>Ishida, T.</u> , Kiwada, H.,	Improved intratumoral delivery of PEG-coated siRNA-lipoplexes by combination with metronomic S-1 dosing in a murine solid tumor model.	<i>Drug Deliv. Transl. Res.</i>	2	77-86	2012
Barichello, J.M., Kizuki, S., Tagami, T., Luiz Alberto Lira Soares, L.A.L., <u>Ishida, T.</u> , Kikuchi, H., Kiwada, H.	Agitation during lipoplex formation harmonizes the interaction of siRNA to cationic liposomes.	<i>Int. J. Pharm.</i>	430	359-365	2012



## Research Paper

# Accelerated Blood Clearance Phenomenon Upon Repeated Injection of PEG-modified PLA-nanoparticles

Tsutomu Ishihara,<sup>1,2</sup> Miho Takeda,<sup>1</sup> Haruka Sakamoto,<sup>1</sup> Ayumi Kimoto,<sup>1</sup> Chisa Kobayashi,<sup>1</sup> Naoko Takasaki,<sup>1</sup> Kanae Yuki,<sup>1</sup> Ken-ichiro Tanaka,<sup>1</sup> Mitsuko Takenaga,<sup>3</sup> Rie Igarashi,<sup>3</sup> Taishi Maeda,<sup>1</sup> Naoki Yamakawa,<sup>1</sup> Yoshinari Okamoto,<sup>1</sup> Masami Otsuka,<sup>1</sup> Tatsuhiro Ishida,<sup>4</sup> Hiroshi Kiwada,<sup>4</sup> Yutaka Mizushima,<sup>2</sup> and Tohru Mizushima<sup>1,5</sup>

Received May 24, 2009; accepted July 13, 2009; published online July 25, 2009

**Purpose.** We recently developed prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>)-encapsulated nanoparticles, prepared with a poly(lactide) homopolymer (PLA, Mw=17,500) and monomethoxy poly(ethyleneglycol)-PLA block copolymer (PEG-PLA) (NP-L20). In this study, we tested whether the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon is observed with NP-L20 and other PEG-modified PLA-nanoparticles in rats.

**Methods.** The plasma levels of PGE<sub>1</sub> and anti-PEG IgM antibody were determined by EIA and ELISA, respectively.

**Results.** Second injections of NP-L20 were cleared much more rapidly from the circulation than first injections, showing that the ABC phenomenon was induced. This ABC phenomenon, and the accompanying induction of anti-PEG IgM antibody production, was optimal at a time interval of 7 days between the first and second injections. Compared to NP-L20, NP-L33s that were prepared with PLA (Mw=28,100) and have a smaller particle size induced production of anti-PEG IgM antibody to a lesser extent. NP-L20 but not NP-L33s gave rise to the ABC phenomenon with a time interval of 14 days. NP-L33s showed a better sustained-release profile of PGE<sub>1</sub> than NP-L20.

**Conclusions.** This study revealed that the ABC phenomenon is induced by PEG-modified PLA-nanoparticles. We consider that NP-L33s may be useful clinically for the sustained-release and targeted delivery of PGE<sub>1</sub>.

**KEY WORDS:** ABC phenomenon; anti-PEG IgM antibody; biodegradable nanoparticles; encapsulation; prostaglandin E<sub>1</sub>.

## INTRODUCTION

Nanoparticles such as liposomes, lipid emulsions and polymeric solid particles that are approximately 100–200 nm in diameter have been widely used as carrier systems for

targeted drug delivery to tumors, inflammatory tissues and vascular lesions due to their enhanced permeability and retention (EPR) effects (1). However, this size of particles is easily captured by the mononuclear phagocyte system (MPS), or in other words by the reticuloendothelial system, resulting in rapid clearance from the circulation (2,3). Modification of the nanoparticle surface with poly(ethyleneglycol) (PEG) enables such nanoparticles to escape this uptake due to the steric barrier by which the PEG chain prevents interaction of the nanoparticles with opsonins and the cells responsible for MPS, such as Kupffer cells (stealth effect) (2–4). For example, doxorubicin-containing PEG-modified (PEGylated) liposomes are used clinically because, due to EPR effects, this formulation gives more potent anti-tumor activity and less drug-related toxicity than doxorubicin itself (5).

However, a pharmacokinetic issue for PEGylated liposomes, the so-called accelerated blood clearance (ABC) phenomenon, was recently revealed (6,7). In this phenomenon, a second dose of PEGylated liposomes is rapidly cleared from the circulation when administered within a certain time interval from the first dose injection due to their accelerated accumulation in the liver. This has been observed for a number of different animal species (8). The ABC phenomenon is of clinical concern because it decreases the

<sup>1</sup> Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-honmachi, Kumamoto 862-0973, Japan.

<sup>2</sup> DDS Institute, The Jikei University School of Medicine, Tokyo 105-8461, Japan.

<sup>3</sup> Division of Drug Delivery System, Institute of Medical Science, St. Marianna University, Kawasaki 216-8512, Japan.

<sup>4</sup> Institute of Health Bioscience, The University of Tokushima, Tokushima 770-8505, Japan.

<sup>5</sup> To whom correspondence should be addressed. (e-mail: mizu@gpo.kumamoto-u.ac.jp)

**ABBREVIATIONS:** ABC, Accelerated blood clearance; ADAM, 9-anthryldiazomethane; AUC, Area under the blood concentration-time curve; CL, Total body clearance; DEA, diethanolamine; EPR, Enhanced permeability and retention; FBS, Fetal bovine serum; <sup>1</sup>H-NMR, Proton nuclear magnetic resonance; HPLC, High-performance liquid chromatography; MPS, Mononuclear phagocyte system; MQW, Milli-Q water; Mw, Molecular weight; PBS, Phosphate-buffered saline; PEG, Poly(ethyleneglycol); PGE<sub>1</sub>, Prostaglandin E<sub>1</sub>; PLA, Poly(lactide); QOL, Quality of life; S.E.M., Standard error mean.

therapeutic efficacy of an encapsulated drug upon repeated administration and may cause adverse effects due to altered biodistribution of the drug. The time interval between repeated injections, the dose and physicochemical properties of the PEGylated liposomes and species of encapsulated drugs were shown to affect the extent of the ABC phenomenon (8–14). Although the mechanism causing the ABC phenomenon is still unclear, it was recently proposed that this phenomenon involves sequential events, including induction of anti-PEG IgM antibody production in the spleen by the first dose of PEGylated liposomes, complement activation by the IgM antibody and opsonization by C3 fragments following the second dose of PEGylated liposomes, and their uptake by MPS (6,11,14–18).

The number of patients with peripheral obstructive vascular diseases, such as arteriosclerosis obliterans, has increased in line with aging of the population and increases in the prevalence of diabetes and hyperlipidemia (19). While various clinical treatments, such as vascular bypass surgery, have been developed for these diseases, the prognosis is still not good. Prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>), which has various physiological actions, such as vasodilation, angiogenesis and inhibition of platelet aggregation, serves as an effective treatment for peripheral obstructive vascular diseases (20–22). However, when administered systemically, PGE<sub>1</sub> also has related adverse effects, such as hypotension and diarrhea (21,23). Furthermore, in addition to its chemical instability (hydrolysis to PGA<sub>1</sub>), PGE<sub>1</sub> is easily inactivated by 15-hydroxydehydrogenase during its passage through the lung (24–26). In order to overcome these issues, we developed lipo-PGE<sub>1</sub>, a preparation incorporating PGE<sub>1</sub> into an oil-in-water lipid emulsion consisting of a soybean oil core and lecithin surfactant with a diameter of approximately 200 nm (27–29). Incorporation of PGE<sub>1</sub> into lipid emulsion protects PGE<sub>1</sub> from inactivation in the lung and enables the selective delivery of PGE<sub>1</sub> to damaged blood vessels, resulting in enhanced therapeutic effects and reduced drug-related toxicity (27,30). However, lipid emulsion cannot retain PGE<sub>1</sub> for a long period *in vivo* (4,31). Therefore, daily intravenous drip infusion is necessary for clinical treatment with lipo-PGE<sub>1</sub>, which in turn requires patient hospitalization, resulting in a low quality of life (QOL).

We recently developed another formulation of PGE<sub>1</sub> in which the PGE<sub>1</sub> is encapsulated in biodegradable and biocompatible polymeric solid particles prepared with poly(lactide) homopolymer (PLA) and monomethoxy poly(ethyleneglycol)-PLA block copolymer (PEG-PLA). These particles have a mean diameter of 120 nm, which enhances the selective delivery of PGE<sub>1</sub> to damaged blood vessels due to the EPR effect (4). We also achieved a good sustained-release profile of PGE<sub>1</sub> from the nanoparticles, which may permit a longer-lasting therapeutic effect (4). The use of PEG-PLA enabled the nanoparticles to escape uptake by MPS (4). Based on these data, we proposed that PGE<sub>1</sub>-encapsulated PEG-modified PLA-nanoparticles are of significant clinical benefit, because a single administration of this formulation may maintain a certain level of PGE<sub>1</sub> around damaged blood vessels for 1–2 weeks; in other words, repeated administration of this formulation with a time interval of 1–2 weeks to patients with peripheral obstructive vascular diseases may improve the symptom without patient hospitalization (4). However, prior to applying this formulation for

clinical use, it was necessary to test whether the ABC phenomenon is induced by these nanoparticles. In this study, we have found that the ABC phenomenon and the accompanying production of anti-PEG IgM antibody are induced by the intravenous administration of PGE<sub>1</sub>-encapsulated PEG-modified PLA-nanoparticles. We successfully developed a modified formulation of the nanoparticles, which induces the ABC phenomenon *in vivo* to a lesser extent and shows a better sustained-release profile of PGE<sub>1</sub> *in vitro* than the original PGE<sub>1</sub>-encapsulated PEG-modified PLA-nanoparticles.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials and Animals

L-PLA (Mw=20,000 or 33,000 on the catalogue) was from Taki Chemical Co. Ltd. (Kakogawa, Japan). The molecular weights of the polymers were determined by gel permeation chromatography and were slightly different from the molecular weights specified in the catalogue. The molecular weight of L-PLA (Mw=20,000 or 33,000 on the catalogue) was determined to be 17,500 or 28,100, respectively. PEG-D,L-PLA (average molecular weight of PEG and PLA are 5,600 and 9,400, respectively) was synthesized and evaluated as described previously (4). PGE<sub>1</sub> was purchased from Cayman Chemical Co. (Osaka, Japan). Iron chloride and 1,4-dioxane were purchased from Wako Pure Chemicals Industries Ltd. (Osaka, Japan). 9-anthryldiazomethane (ADAM) was purchased from Funakoshi Co. Ltd. (Tokyo, Japan). Wistar rats (5–7 weeks old) were from Kyudo Co. Ltd. (Kumamoto, Japan). The rats were allowed free access to water and rat chow, and were housed under controlled environmental conditions (constant temperature, humidity and a 12 h dark-light cycle). The experiments and procedures described here were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the National Institutes of Health, and were approved by the Animal Care Committee of Kumamoto University.

### Detection of PGE<sub>1</sub> by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

A Waters Alliance system running Empower software (Milford, MA) was used for HPLC analysis. Samples were separated using a 4.6×100-mm TSKgel Super-ODS column (Tosoh Co., Tokyo, Japan).

Solvent A (acetonitrile) and solvent B (Milli-Q water (MQW)) were used at a flow rate of 0.3 ml/min. Samples were incubated with ADAM at 37°C for 8 h. After injection of the sample (0 min), the mobile phase was changed as follows: 65% solvent A (25 min), a linear gradient of 65–100% solvent A (10 min) and then 100% solvent A (10 min). Fluorescence of ADAM reagent (excitation: 365 nm, emission: 412 nm) was detected using a 2475 Multi  $\lambda$  Fluorescence Detector.

ADAM is a fluorescent labelling reagent for carboxylic acids. ADAM is chemically unstable, but 9-anthrylmethyl ester derivative formed from ADAM and carboxylic acid is relatively stable (32). The derivative is sufficiently separated on a reversed-phase column and can be detected as reported

previously (4). The detection limit of PGE<sub>1</sub> in this method is approximately 50 ng/ml.

### Preparation and Characterization of Nanoparticles

Nanoparticles were prepared by using the oil-in-water solvent diffusion method as described previously (4,33). L-PLA in 1,4-dioxane was mixed with PGE<sub>1</sub>, PEG-D,L-PLA, iron chloride and diethanolamine (DEA) in acetone (the total amount of block copolymers and homopolymer was fixed at 25 mg). The different sizes of nanoparticles were prepared by altering the volume of 1,4-dioxane and acetone, as described previously (34). Samples were incubated for 10 min at room temperature and added to 25 ml of Milli-Q water (MQW) that stirred at 1,000 rpm. After addition of 0.5 ml of 0.5 M EDTA (pH 7.0) and 12.5  $\mu$ l (62.5  $\mu$ l for NP-L33s) of 200 mg/ml Tween 80, nanoparticles were purified and concentrated by ultrafiltration (Centriprep YM-50, Millipore Co., Billerica, MA). We have named the nanoparticles based on the isomer and molecular weight of PLA (from the catalogue). NP-L20 means nanoparticles (NP) prepared with L-PLA (L) of molecular weight 20,000 (as specified in the catalogue). NP-L20s means NP-L20 with a smaller particle size.

For determination of nanoparticle PGE<sub>1</sub> content, nanoparticles were dissolved in 150  $\mu$ l of 1,4-dioxane and mixed with 150  $\mu$ l of acetonitrile containing 3-phenylpropionate and 1.7 ml of 0.05 M EDTA (pH 3.6). After a 20 min incubation at room temperature, the solution was applied to a C18 reverse phase cartridge column (SepPak C18 200 mg, Waters, Milford, MA). After washing with 6 ml of MQW, PGE<sub>1</sub> was eluted with 3 ml of acetonitrile. The PGE<sub>1</sub> content was determined using HPLC, as described above. For determination of nanoparticle weight, the nanoparticle suspension was mixed with 0.05 M EDTA (pH 7.0) and centrifuged at 50,000 g for 30 min. The pellet was suspended in MQW, freeze-dried and weighed. The drug content was defined as the ratio of PGE<sub>1</sub> weight to the total weight of nanoparticles.

The PEG content of the nanoparticles was assayed as described previously (35) with some modifications. NaOH solution (4 N) was added to the nanoparticle suspension to give a final concentration of 0.8 N and incubated at 50°C for 24 h and neutralized by the addition of HCl solution (1 N). The mixtures were diluted in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and, following the addition of iodine and potassium iodide, the absorbance was read at 520 nm.

Particle size and distribution were determined by the dynamic light scattering method (ZETASIZER Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK).

### Pharmacokinetics of PGE<sub>1</sub>-Encapsulated PLA-nanoparticles

The blood concentration profile of PGE<sub>1</sub> was monitored as described previously (4) with some modifications. PGE<sub>1</sub>-encapsulated nanoparticles suspended in PBS were intravenously administered to rats via the tail vein. We used more than three rats for each group, and rats were assigned to each group, with the restriction that the groups were equated for average weight.

At the indicated periods, blood was collected from the tail vein using heparin-treated capillary tubes (Microhematocrit capillary tubes, Thermo Fisher Scientific, Yokohama,

Japan), and 50  $\mu$ l of each blood sample was mixed with 400  $\mu$ l of 1,4-dioxane and 50  $\mu$ l of 10 mM EDTA (pH 7.0) to extract PGE<sub>1</sub> from the nanoparticles. The mixture was centrifuged at 13,400 g for 10 min. The supernatant (200  $\mu$ l) was evaporated to dryness and dissolved in 500  $\mu$ l of PGE<sub>1</sub> enzyme immunoassay (EIA) buffer (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN). Samples were centrifuged at 13,400 g for 2 min and the supernatant diluted appropriately. The PGE<sub>1</sub> content was determined using a PGE<sub>1</sub> EIA kit (R&D Systems Inc.) according to the manufacturer's protocol. AUC<sub>(0-24)</sub> is the area under the blood concentration-time curve from 0 to 24 h post-injection. The AUC<sub>(0-24)</sub> and total body clearance (CL) were calculated using the trapezium method by use of Microsoft Excel.

### Determination of Anti-PEG IgM Antibody in Plasma

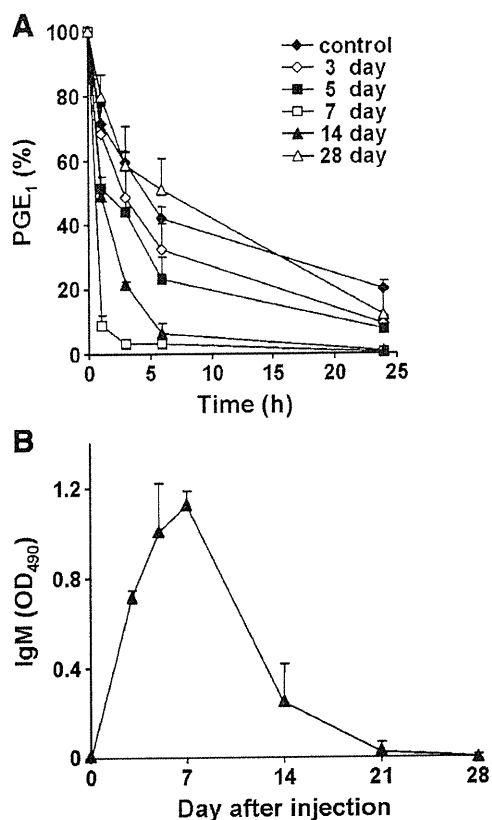
Quantification of IgM antibody reactive to PEG-PLA in plasma was determined by ELISA. All incubations were carried out at room temperature. PEG-PLA (10 nmol) in 50  $\mu$ l ethanol was added to 96-well plates (EIA/RIA plate, AGC Techno Glass Co. Ltd., Funabashi, Japan) and air dried completely for 1 h. Then, 200  $\mu$ l of blocking buffer (50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 0.14 M NaCl and 1% BSA) was added and incubated for 1 h, and the wells were washed three times with washing buffer (50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 0.14 M NaCl and 0.05% Tween 20). Plasma obtained by centrifugation (15 min, 2,700 g) of collected blood samples was then diluted appropriately and added to the wells to incubate for 1 h. The wells were washed five times with the washing buffer, and 100  $\mu$ l of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody (0.2  $\mu$ g/ml, goat anti-rat IgM IgG-HRP conjugate, Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX) in blocking buffer containing 0.05% Tween 20 was added to each well. After incubation for 1 h, the wells were washed five times with washing buffer. Coloration was initiated by adding *o*-phenylene diamine (1 mg/ml) (Sigma, St. Louis, MO) and stopped by adding 100  $\mu$ l of 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> after a 5 min incubation. The absorbance was measured at 490 nm using a Microplate reader (FLUOstar, BMG LAB-TECH Ltd., Offenburg, Germany).

## RESULTS

### Induction of the ABC Phenomenon and Production of Anti-PEG IgM Antibody

In general, hydrophilic drugs such as PGE<sub>1</sub> are very hard to encapsulate in PLA-nanoparticles. We recently succeeded in encapsulating PGE<sub>1</sub> by precipitating PGE<sub>1</sub> with iron ions (4). In that previous report, we prepared various types of PLA-nanoparticles. Of them, NP-L20, which was prepared with L-PLA (Mw=17,500) and PEG-D,L-PLA and had a mean diameter of 120 nm, showed a good sustained-release profile of PGE<sub>1</sub> (the half life *in vitro* was about 10 days), a relatively good efficiency of encapsulation (about 1% drug content) and a long blood residence time (4). Thus, in the current study, we have tested whether NP-L20 induces the ABC phenomenon.

We estimated the clinical dose of PGE<sub>1</sub>-encapsulated nanoparticles is 120  $\mu$ g PGE<sub>1</sub> for individual human (about 2  $\mu$ g PGE<sub>1</sub>/kg) because lipo-PGE<sub>1</sub> at 5–10  $\mu$ g PGE<sub>1</sub>/day is



**Fig. 1.** Induction of the ABC phenomenon and production of anti-PEG IgM antibody by repeated administration of NP-L20. **A** Rats were intravenously administered NP-L20 (50  $\mu$ g nanoparticles/rat). At 3, 5, 7, 14 or 28 days after the injection, NP-L20 (1,000  $\mu$ g nanoparticles/rat) was intravenously administered. Plasma PGE<sub>1</sub> levels were monitored after injection of the second dose as described in the "Materials and Methods" and shown relative to the initial level. As a control, alteration of plasma PGE<sub>1</sub> levels following administration of NP-L20 (1,000  $\mu$ g nanoparticles/rat) to naïve rats is shown. Values are given as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n=3-10$ ) **B** Rats were intravenously administered NP-L20 (50  $\mu$ g nanoparticles/rat) and blood samples were prepared periodically. The amount of anti-PEG IgM antibody was determined by ELISA as described in "Materials and Methods." Values are mean  $\pm$  S.E.M. ( $n=3$ ).

used clinically, and we assumed that the sustained-release formulation would be delivered as one injection per 2 weeks. Thus, we used a dose of 50  $\mu$ g NP-L20 for individual rat (about 2  $\mu$ g PGE<sub>1</sub>/kg) for the first injection. We examined the

pharmacokinetics of PLA-nanoparticles by determining the plasma level of PGE<sub>1</sub>: a pilot study revealed that about 1,000  $\mu$ g NP-L20 (about 10  $\mu$ g PGE<sub>1</sub>) was required for this detection (data not shown). Therefore, we used a dose of 1,000  $\mu$ g NP-L20 for individual rat for the second injection. However, it is possible that the increased dosing results in higher uptake by liver and leads to clearance.

Rats were administered NP-L20 twice at a time interval of 3, 5, 7, 14 or 28 days, and the pharmacokinetic behaviour (blood clearance profile) of the second dose of NP-L20 was investigated by measuring plasma concentration of PGE<sub>1</sub>, and the behaviour was compared to that without a prior injection (control). As shown in Fig. 1A, compared to the control, more rapid clearance of NP-L20 was observed after injection of the second dose, indicating that the ABC phenomenon was induced by the injection of the first dose. The ABC phenomenon was most apparent at the time interval of 7 days between the first and second injections, and the phenomenon was not so apparent at a time interval of 3 or 14 days, showing that the ABC phenomenon induced by PEG-modified PLA-nanoparticles is dependent on the time interval, as reported for PEGylated liposomes (14). A strong inverse relationship between the dose of initially injected PEGylated liposomes and the extent of the ABC phenomenon was reported (10,36). But we found that induction of the ABC phenomenon by NP-L20 was not so clearly affected by the initial dose (from 1  $\mu$ g to 1 mg NP-L20; data not shown).

We also measured the plasma levels of IgM antibodies reactive to PEG-PLA after injection of 50  $\mu$ g NP-L20 by use of a modified ELISA with PEG-PLA-coated 96-well plates. The production reached its maximum level at day 7 post-injection and returned to the original level until day 28 post-injection (Fig. 1B). This time course correlates with the time course for induction of the ABC phenomenon (Fig. 1A), suggesting that IgM antibodies reactive to PEG-PLA are responsible for the ABC phenomenon. However, the amount of anti-PEG IgM antibody did not completely correlate with the level of ABC phenomenon: the level of IgM antibody at day 3 after the injection of first dose was higher than that at day 14 after, whereas the level of the ABC phenomenon showed the opposite trend (Fig. 1).

When the ELISA was performed with PLA-coated wells, production of IgM antibodies was not observed, (data not shown). On the other hand, when the ELISA was performed with PEG-coated wells, production of IgM antibodies was observed; however, the level was less than that observed with PEG-PLA-coated plates (data not shown), suggesting that the

**Table I.** Characteristics of PGE<sub>1</sub>-Encapsulated PLA-nanoparticles Containing Different Amounts of PEG

Codes	L-PLA Mw (kDa)	PEG content (%)	PGE <sub>1</sub> content (%)	Particle size (nm)
PEG 0	17.5	0	1.01 $\pm$ 0.14	154 $\pm$ 4
PEG 7	17.5	5.4 $\pm$ 0.5	0.86 $\pm$ 0.09	120 $\pm$ 2
PEG11	17.5	9.8 $\pm$ 0.9	0.60 $\pm$ 0.03	110 $\pm$ 3
PEG18	17.5	12.8 $\pm$ 0.3	0.92 $\pm$ 0.34	109 $\pm$ 3
PEG30	17.5	23.7 $\pm$ 1.2	1.11 $\pm$ 0.10	119 $\pm$ 2

Nanoparticles encapsulating PGE<sub>1</sub> were prepared with L-PLA (Mw=17 500)/PEG-D,L-PLA (25 mg/0 mg, 22 mg/3 mg, 21 mg/4 mg, 18 mg/7 mg and 13 mg/12 mg for preparation of PEG0, PEG7, PEG11, PEG18 and PEG30 (NP-L20), respectively) in the presence of 5 mg PGE<sub>1</sub>, 1.2 mg iron chloride and 4.8 mg DEA by an oil-in-water solvent diffusion method. The amounts of PEG in prepared nanoparticles were determined and the PEG content (w/w) is shown. PGE<sub>1</sub> content and nanoparticle size were determined as described in "Materials and Methods." Values are mean  $\pm$  S.E.M. ( $n=3$ ).