

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790043

研究課題名(和文) 生体内 FRET 計測によるドラッグデリバリーシステムの系統的動態評価

研究課題名(英文) Intravital FRET Monitoring for Systematic Evaluation of Drug Delivery Systems

研究代表者

松本 有 (Matsumoto, Yu)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80548553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：核酸内包薬物送達システム(Drug Delivery System; DDS)開発では、細胞外環境における高い安定性と標的細胞内における効率的な核酸分子の放出という二律背反的な性能が要求される。本研究では生体内における蛍光共鳴エネルギー移動(Fluorescence Resonance Energy Transfer; FRET)計測を行った。DDSの血中安定性、組織移行性、細胞内安定性、核酸放出といった評価法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Efficient drug delivery system (DDS) must fulfill paradoxical requirements as it should secure the cargo in the off-target environment, and also release the cargo at the target cells. Using a combination of Forster resonance energy transfer (FRET) and intravital imaging techniques, the intravital distribution and intactness of the DDS was evaluated. Intravital performance of the DDS was assessed in many aspects such as blood circulation studies, tissue distribution, intracellular stability, and release of the nucleic acid.

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー 生体イメージング

#### 1. 研究開始当初の背景

申請者は核酸内包 DDS の生体内動態（血中滞留性、標的指向性、組織移行性）を追跡するための「生体顕微鏡」と、細胞内動態（取込、エンドソーム脱出、細胞内輸送、核膜突破、遺伝子放出、転写、タンパク発現）を詳細に追跡するための「スペクトル細胞顕微鏡」を構築し各種 DDS の比較、評価系を確立してきた。生体顕微鏡による観察で DDS は核酸を標的細胞まで送達できていることが判明している。またスペクトル細胞顕微鏡による観察で DDS は pDNA の凝縮状態を保ったまま核まで送達し、核で脱凝縮をした後に遺伝子発現が得られることも判明している。ところが DDS を静脈内投与しても、必ずしも標的細胞で十分な pDNA あるいは siRNA の機能（遺伝子発現・発現抑制）が得られていないことが問題となっている。核酸内包 DDS は血中から標的細胞に至る過程で核酸の凝縮状態を保てないか、あるいは細胞核に到達しているにも関わらず脱凝縮していないという可能性がある。これを解明するためには、同一個体・同一環境で血中 血管外組織 標的細胞 細胞核に至るまでの安定性と核酸放出を系統的に評価することが必要と考えた。

#### 2. 研究の目的

本研究では生体内における血中レベル・組織レベル・細胞レベル・細胞内小器官レベルでの DDS の動態評価、機能評価を同一の個体で行うことを目的とした。

#### 3. 研究の方法

DDS を静脈投与し、血管 血管外組織 標的細胞（細胞核）へと移動する核酸を追跡するとともに、内包された核酸の凝縮・脱凝縮を FRET で評価した。

#### 4. 研究成果

まず pDNA および siRNA を 2 つの蛍光分子で標識し、DDS に内包させた段階で FRET が起こるかどうかにについて検討を行った。生体内で FRET を検出する都合上、自家蛍光が低く組織透過性に有利な高波長域で蛍光標識色素をいくつか試行検討した結果、最終的には Carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) および Cy5 の FRET ペアを選択した。siRNA の両末端に FRET ペアを標識すると、分子間距離が短いため FRET 比が上昇する。市販の遺伝子導入試薬（in vivo-jet PEI）および当研究室で開発された DDS (PEG-PLys) に内包すると、siRNA は凝縮するため FRET 比は更に高くなる。siRNA をそのまま (naked siRNA) 静脈投与すると、1-2 分程度で FRET 比は低下し 10 分程度で検出不能になった。In vivo jet-PEI を用いると、投与直後に血管内で高 FRET 比を示す凝集塊を形成し、その後徐々に低下し 15 分で検出不能になった。PEG-PLys では高 FRET 比を維持したまま 15 分安定に血

中を循環した。同様に腎臓の観察を行ったところ、naked siRNA は初回通過時点で高 FRET のまま近位尿管空に原尿として濾過され、in vivo-jet PEI では投与 5 分後に低 FRET で濾過された。PEG-PLys では高 FRET のまま腎毛細血管を循環し、尿管腔で検出されることは無かった。

以上により、生体内 FRET 検出方法論を確立した。現在種々の腫瘍モデルマウスを作成し、腫瘍組織に到達した DDS の分布および核酸の凝縮・脱凝縮について解析を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 24 件)

1. An Injectable Spheroid System with Genetic Modification for Cell Transplantation Therapy, Uchida S, Itaka K, Nomoto T, Endo T, Matsumoto Y, Ishii T, Kataoka K, Biomaterials, 査読有, 35, 2499-506, 2014
2. Multicompartment Micelles with Adjustable Poly(Ethylene Glycol) Shell for Efficient in Vivo Photodynamic Therapy, Synatschke CV, Nomoto T, Cabral H, Fortsch M, Toh K, Matsumoto Y, Miyazaki K, Hanisch A, Schacher FH, Kishimura A, Nishiyama N, Muller AH, Kataoka K, ACS Nano, 査読有, 8, 1161-72, 2014
3. Aggregation Behavior of Cationic Nanohydrogel Particles in Human Blood Serum, Nuhn L, Gietzen S, Mohr K, Fischer K, Toh K, Miyata K, Matsumoto Y, Kataoka K, Schmidt M, Zentel R, Biomacromolecules, 査読有, 2014
4. Three-Layered Polyplex Micelle as a Multifunctional Nanocarrier Platform for Light-Induced Systemic Gene Transfer, Nomoto T, Fukushima S, Kumagai M, Machitani K, Arnida, Matsumoto Y, Oba M, Miyata K, Osada K, Nishiyama N, Kataoka K, Nat Commun, 査読有, 5, 3545, 2014
5. Targeted Gene Delivery by Polyplex Micelles with Crowded PEG Palisade and cRGD Moiety for Systemic Treatment of Pancreatic Tumors, Ge Z, Chen Q, Osada K, Liu X, Tockary TA, Uchida S, Dirisala A, Ishii T, Nomoto T, Toh K, Matsumoto Y, Oba M, Kano MR, Itaka K, Kataoka K, Biomaterials, 査読有, 35, 3416-26, 2014
6. 他領域からのトピックス ナノバイオテクノロジーを応用した医療イノベーション, 松本有, 山嵜達也, 片岡一則, 日本耳鼻咽喉科学会会報, 査読無, 113, 133-139, 2013
7. A Toolbox of Differently Sized and Labeled PMMA Nanoparticles for Cellular

Uptake Investigations, Vollrath A, Schallon A, Pietsch C, Schubert S, Nomoto T, Matsumoto Y, Kataoka K, Schubert US, Soft Matter, 査読有, 9, 99-108, 2013

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

9. Cyclic RGD-Linked Polymeric Micelles for Targeted Delivery of Platinum Anticancer Drugs to Glioblastoma through the Blood-Brain Tumor Barrier, Miura Y, Takenaka T, Toh K, Wu S, Nishihara H, Kano MR, Ino Y, Nomoto T, Matsumoto Y, Koyama H, Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K, ACS Nano, 査読有, 7, 8583-92, 2013

10. Lipid Envelope-Type Nanoparticle Incorporating a Multifunctional Peptide for Systemic siRNA Delivery to the Pulmonary Endothelium, Kusumoto K, Akita H, Ishitsuka T, Matsumoto Y, Nomoto T, Furukawa R, El-Sayed A, Hatakeyama H, Kajimoto K, Yamada Y, Kataoka K, Harashima H, ACS Nano, 査読有, 7, 7534-41, 2013

11. Multifunctional Polyion Complex Micelle Featuring Enhanced Stability, Targetability, and Endosome Escapability for Systemic siRNA Delivery to Subcutaneous Model of Lung Cancer, Kim HJ, Ishii T, Zheng M, Watanabe S, Toh K, Matsumoto Y, Nishiyama N, Miyata K, Kataoka K, Drug Delivery and Translational Research, 査読有, 4, 50-60, 2013

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

13. PEG-Detachable Cationic Polyaspartamide Derivatives Bearing Stearoyl Moieties for Systemic siRNA Delivery toward Subcutaneous BxPC3 Pancreatic Tumor, Kim HJ, Oba M, Pittella F, Nomoto T, Cabral H, Matsumoto Y, Miyata K, Nishiyama N, Kataoka K, J Drug Target, 査読有, 20, 33-42, 2012

14. Targeted Polymeric Micelles for siRNA Treatment of Experimental Cancer by Intravenous Injection, Christie RJ, Matsumoto Y, Miyata K, Nomoto T, Fukushima S, Osada K, Halnaut J, Pittella F, Kim HJ, Nishiyama N, Kataoka K, ACS Nano, 査読有, 6, 5174-89, 2012

15. Micellization of Cisplatin

(NC-6004) Reduces its Ototoxicity in Guinea Pigs, Baba M, Matsumoto Y, Kashio A, Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K, Yamasoba T, J Control Release, 査読有, 157, 112-7, 2012

16. In Situ Quantitative Monitoring of Polyplexes and Polyplex Micelles in the Blood Circulation Using Intravital Real-Time Confocal Laser Scanning Microscopy, Nomoto T, Matsumoto Y, Miyata K, Oba M, Fukushima S, Nishiyama N, Yamasoba T, Kataoka K, J Control Release, 査読有, 151, 104-9, 2011

17. Improving Drug Potency and Efficacy by Nanocarrier-Mediated Subcellular Targeting, Murakami M, Cabral H, Matsumoto Y, Wu S, Kano MR, Yamori T, Nishiyama N, Kataoka K, Sci Transl Med, 査読有, 3, 64ra2, 2011

18. Effect of Polymer Structure on Micelles Formed between siRNA and Cationic Block Copolymer Comprising Thiols and Amidines, Christie RJ, Miyata K, Matsumoto Y, Nomoto T, Menasco D, Lai TC, Pennisi M, Osada K, Fukushima S, Nishiyama N, Yamasaki Y, Kataoka K, Biomacromolecules, 査読有, 12, 3174-85, 2011

19. Accumulation of Sub-100 Nm Polymeric Micelles in Poorly Permeable Tumours Depends on Size, Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, Chen Q, Murakami M, Kimura M, Terada Y, Kano MR, Miyazono K, Uesaka M, Nishiyama N, Kataoka K, Nat Nanotechnol, 査読有, 6, 815-23, 2011

〔学会発表〕

(招待講演 5 件、一般演題 78 件、計 83 件)

(招待講演)

1. Intravital Confocal Microscopy for Dds Evaluation and Development, 16th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, Matsumoto Y, Sheraton Salt Lake City Hotel, Salt Lake City, UT, USA, 2013.2.6

2. Intravital Imaging of Drug Delivery Systems and Auditory Hair Cells, Matsumoto Y, 12th Taiwan-Japan Conference on Otolaryngology Head and Neck Surgery, International Convention Center, National Taiwan University Hospital, Taipei City, Taiwan, 2013.12.06

3. 生体内リアルタイム共焦点顕微鏡の手法の実際, 松本有, 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 札幌コンベンションセンター、北海道札幌市, 2012.7.5

4. 生体内リアルタイム共焦点顕微鏡による DDS 挙動解析, 松本有, 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 札幌コンベンションセンター、北海道札幌市, 2012.7.5

5. Intravital Confocal Micro - Videography, Matsumoto Y, International Conference on Biomaterials Science (ICBS) 2011, Tsukuba International Congress Center, Tsukuba, Ibaraki, Japan, 2011.3.16

(一般演題)

1. Intravital Confocal Microscopy Assay for the Evaluation of Antioxidant Capacity, Matsumoto Y, 37th Annual MidWinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology, Manchester Grand Hyatt Hotel, San Diego, CA, USA, 2014.2.24
2. DDS Evaluation Using Intravital Real-Time Laser Scanning Confocal Microscopy, Matsumoto Y, 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Hawaii Convention Center, Honolulu, HI, USA, 2013.7.21-24
3. Intravital Microscopy for DDS Evaluation and Development, Matsumoto Y, The 12th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, The Westin Maui Resort and Spa, Lahaina, Maui, HI, USA, 2013.12.16-20
4. Intravital Calcium Imaging of Cochlear Hair Cells Upon Sound Stimulation, Matsumoto Y, 50th Inner Ear Biology Workshop, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain, 2013.9.11
5. Intravital Calcium Imaging of Cochlear Hair Cells, Matsumoto Y, 36th Annual MidWinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology, Baltimore Marriott Waterfront Hotel, Baltimore, MD, USA, 2013.2.18
6. 生体内リアルタイム共焦点顕微鏡の手技の実際, 松本有, 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 札幌コンベンションセンター、北海道札幌市, 2012.7.5
7. 生体内リアルタイム共焦点顕微鏡による DDS 挙動解析, 松本有, 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 札幌コンベンションセンター、北海道札幌市, 2012.7.5
8. 生体内リアルタイム共焦点顕微鏡を用いた DDS 機能評価, 松本有, 第 27 回日本 DDS 学会, 東京大学、東京都文京区, 2011.6.9
9. 生体内リアルタイム共焦点顕微鏡と蝸牛イメージングへの展開, 松本有, 第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会, 沖縄コンベンションセンター、沖縄県宜野湾市, 2011.11.24
10. Imaging DDS Using Intravital Real-Time Confocal Microscopy, Matsumoto Y, The 11th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, The Westin Maui Resort

and Spa, Lahaina, Maui, HI, USA, 2011.12.18

〔図書〕(計 1 件)

1. Intravital Real-Time Confocal Laser Scanning Microscopy for the in Situ Evaluation of Nanocarriers, Matsumoto Y, Nomoto T, Toh K, Cabral H, Murakami M, Christie RJ, Kim HJ, Ogura T, Miyata K, Nishiyama N, Yamasoba T, Kataoka K, Cancer Targeted Drug Delivery, Bae, Y. H., Mrsny, R. J., and Park, K.s. Bae, Y. H., Mrsny, R. J., and Park, K., Springer New York, 査読無, 607-620, 2013

〔産業財産権〕

出願状況 (計 8 件)

1. 名称: 複合体微粒子およびその製造方法、ならびに該複合体微粒子を用いた薬学組成物

発明者: 片岡一則, 宮田完二郎, 西山伸宏, 大庭誠, 山崎裕一, 須磨知也, グダノ八, 武元宏泰, 松本有, 野本貴大

権利者: 国立大学法人東京大学

種類:

番号: 特願 2011-552789

出願年月日: 2011/02/02

国内外の別: 国内

2. 名称: 複合体微粒子およびその製造方法、ならびに該複合体微粒子を用いた薬学組成物

発明者: 片岡一則, 宮田完二郎, 西山伸宏, 大庭誠, 山崎裕一, 須磨知也, グダノ八, 武元宏泰, 松本有, 野本貴大

権利者: 国立大学法人東京大学

種類:

番号: PCT/JP2011/052081

出願年月日: 2011/02/02

国内外の別: 国外

3. 名称: 粒子組成物および該粒子組成物を用いた医薬組成物

発明者: 片岡一則, ロナルドジェイムズクリスティ, 西山伸宏, 宮田完二郎, 福島重人, 松本有, 野本貴大, 加藤泰己

権利者: 東京大学工学系研究科, 東京大学工学系研究科, 東京大学医学系研究科, 東京大学医学系研究科, 東京大学工学系研究科, 東京大学医学系研究科, 東京大学工学系研究科, ナノキャリア株式会社

種類:

番号: 12733905.9

出願年月日: 2012/01/16

国内外の別: 国外

4. 名称: 粒子組成物および該粒子組成物を用いた医薬組成物

発明者：片岡一則,ロナルドジェイムズクリ  
ステイ,西山伸宏,宮田完二郎,福島重人,松  
本有,野本貴大,加藤泰己

権利者：東京大学工学系研究科,東京大学工  
学系研究科,東京大学医学系研究科,東京大  
学医学系研究科,東京大学工学系研究科,東  
京大学医学系研究科,東京大学工学系研究科,  
ナノキャリア株式会社

種類：

番号：特願 2011-006318

出願年月日：2012/01/14

国内外の別：国内

5. 名称：粒子組成物および該粒子組成物を  
用いた医薬組成物

発明者：片岡一則,ロナルドジェイムズクリ  
ステイ,西山伸宏,宮田完二郎,福島重人,松  
本有,野本貴大,加藤泰己

権利者：東京大学工学系研究科,東京大学工  
学系研究科,東京大学医学系研究科,東京大  
学医学系研究科,東京大学工学系研究科,東  
京大学医学系研究科,東京大学工学系研究科,  
ナノキャリア株式会社

種類：

番号：特願 2012-552778

出願年月日：2012/01/16

国内外の別：国内

6. 名称：粒子組成物および該粒子組成物を  
用いた医薬組成物

発明者：片岡一則,ロナルドジェイムズクリ  
ステイ,西山伸宏,宮田完二郎,福島重人,松  
本有,野本貴大,加藤泰己

権利者：東京大学工学系研究科,東京大学工  
学系研究科,東京大学医学系研究科,東京大  
学医学系研究科,東京大学工学系研究科,東  
京大学医学系研究科,東京大学工学系研究科,  
ナノキャリア株式会社

種類：

番号：13/979546

出願年月日：2012/01/16

国内外の別：国外

7. 名称：粒子組成物および該粒子組成物を  
用いた医薬組成物

発明者：片岡一則,ロナルドジェイムズクリ  
ステイ,西山伸宏,宮田完二郎,福島重人,松  
本有,野本貴大,加藤泰己

権利者：東京大学工学系研究科,東京大学工  
学系研究科,東京大学医学系研究科,東京大  
学医学系研究科,東京大学工学系研究科,東  
京大学医学系研究科,東京大学工学系研究科,  
ナノキャリア株式会社

種類：

番号：PCT/JP2012/050683

出願年月日：2012/01/16

国内外の別：国外

8. 名称：薬剤送達用のキャリア、コンジュ  
ゲートおよびこれらを含んでなる組成物並

びに投与方法

発明者：片岡一則,安楽泰孝,西山伸宏,宮田  
完二郎,石井武彦,松本有,福里優,溝口明祐,  
横田隆徳,桑原宏哉,仁科一隆,水澤英洋

権利者：東京大学工学系研究科,東京大学工  
学系研究科,東京大学医学系研究科,東京大  
学医学系研究科,東京大学工学系研究科,東  
京大学医学部附属病院,東京大学工学系研究  
科,東京大学医学系研究科,国立大学法人東  
京医科歯科大学,国立大学法人東京医科歯科  
大学,国立大学法人東京医科歯科大学,国立  
大学法人東京医科歯科大学

種類：

番号：特願 2013-242347

出願年月日：2013/11/22

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

1. <http://www.bmw.t.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 有 (MATSUMOTO Yu)

東京大学・医学部付属病院・助教

研究者番号：80548553

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし