

## 学位論文の内容の要旨

学位論文題目 DDS の生体内挙動の精確な評価を可能とする  
時空間イメージング技術の創出

指導教員 丁 野 純 男

学位申請者 石 澤 清 心



病巣に薬物を効率よく送達することで薬効増強と副作用軽減を実現する、ドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発研究が盛んに行われている。近年開発されている DDS は多種多様かつ分子レベルの精密な戦略に基づくものであり、その生体内挙動を評価する技術力不足が臨床応用への足枷となる場合がある。特に、DDS の病巣への分布をリアルタイム又は詳細なスケールで評価するための、視覚的評価技術の開発が強く求められている。

体内の状況を視覚的に表現する技術である、X 線 CT などの放射線イメージング法は、低侵襲的イメージング技術として臨床で広く利用されているが、分解能が低く微小な変化の検出には不向きである。一方、蛍光イメージング法は、励起光の照射が必要であることから前臨床までの利用に限られるものの、撮影装置の選択により全身から細胞レベルまで多様なスケールでの観察が可能である。しかしながら、DDS の蛍光イメージングにおいては、ドラッグキャリアの標識又は内封物質の標識に用いる蛍光プローブが DDS から解離又は流出することに加えて、組織内の観察において光が減衰することが問題となり、精確な評価を妨げている。

以上の背景を踏まえ、本研究では DDS の開発研究に用いる蛍光イメージング法の応用技術について検討した。ドラッグキャリアとして、様々な機能を搭載可能であり、幅広い薬物を内封可能な高分子ナノ粒子を用い、第 1 章では、ドラッグキャリアと内封された薬物の正確な時間的体内挙動を可視化するために、フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) 現象を応用したイメージング技術を構築した。第 2 章では、病巣組織内の薬物の精密な空間的分布を可視化するために、組織透明化手法を応用したイメージング技術を構築した。第 3 章では、第 1 章及び第 2 章で構築した新規技術を用いて、腫瘍病巣における DDS の精確な生体内挙動を時空間的に可視化した。

## 1. FRET 現象を応用したイメージング技術の構築

効率的に薬物を病巣へ送達するためには、薬物を内封したドラッグキャリアが標的臓器に到達するまで、その形態を保持していなければならない。現在、単一のプローブを内封することでドラッグキャリアを標識し、その挙動を追跡するイメージング技術が汎用されている。しかしながら、ドラッグキャリアが崩壊した後もプローブ由来のシグナルが検出されるため、ドラッグキャリアの正確な挙動を評価できない。

FRET 現象とは、2 種類の蛍光物質が近接しているとき、donor が発した蛍光エネルギーが acceptor に遷移する現象である (Fig. 1A)。FRET 現象の発生の有無から donor と acceptor 間の距離の変化を検出できることから、一般に、タンパク質など分子間相互作用や分子内立体構造の変化を評価するために用いられている。本章では、ドラッグキャリア自体とその崩壊後に放出された蛍光プローブの時間的体内挙動を区別して可視化するため、FRET 現象を応用した蛍光イメージング戦略を立案し (Fig. 1B)、全身から細胞レベルまでの幅広いスケールにおいて応用可能かを検討した。

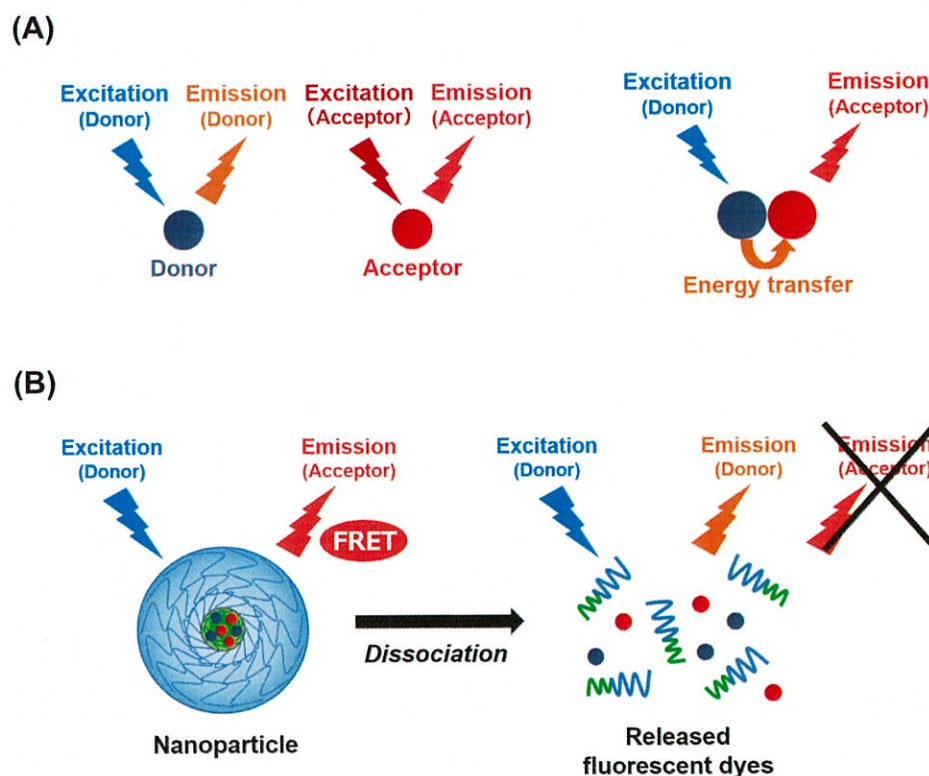


Fig. 1 FRET phenomenon (A) and FRET imaging strategy for detecting the dissociation of polymeric nanoparticle (B)

Poly(ethylene glycol) methyl ether-block-poly(D, L lactide) (PEG-PDLLA; PEG = 2 kDa, PDLLA = 2 kDa)を構成成分とし、FRET現象を発生可能な donor として DiD を、acceptor として DiR を内封した高分子ナノ粒子を調製した。調製したナノ粒子をマウスに静脈内投与し、経時的に蛍光 *in vivo* imaging を行った。マウスの全身に検出された FRET シグナルは経時的に減弱し、逆に donor シグナルは経時的に増強した (Fig. 2A)。また、*ex vivo* imaging では、特に肺と肝臓に強いシグナルが検出された (Fig. 2B)。以上の結果から、投与したナノ粒子が主に肺及び肝臓に分布し、経時的に崩壊することが示された。

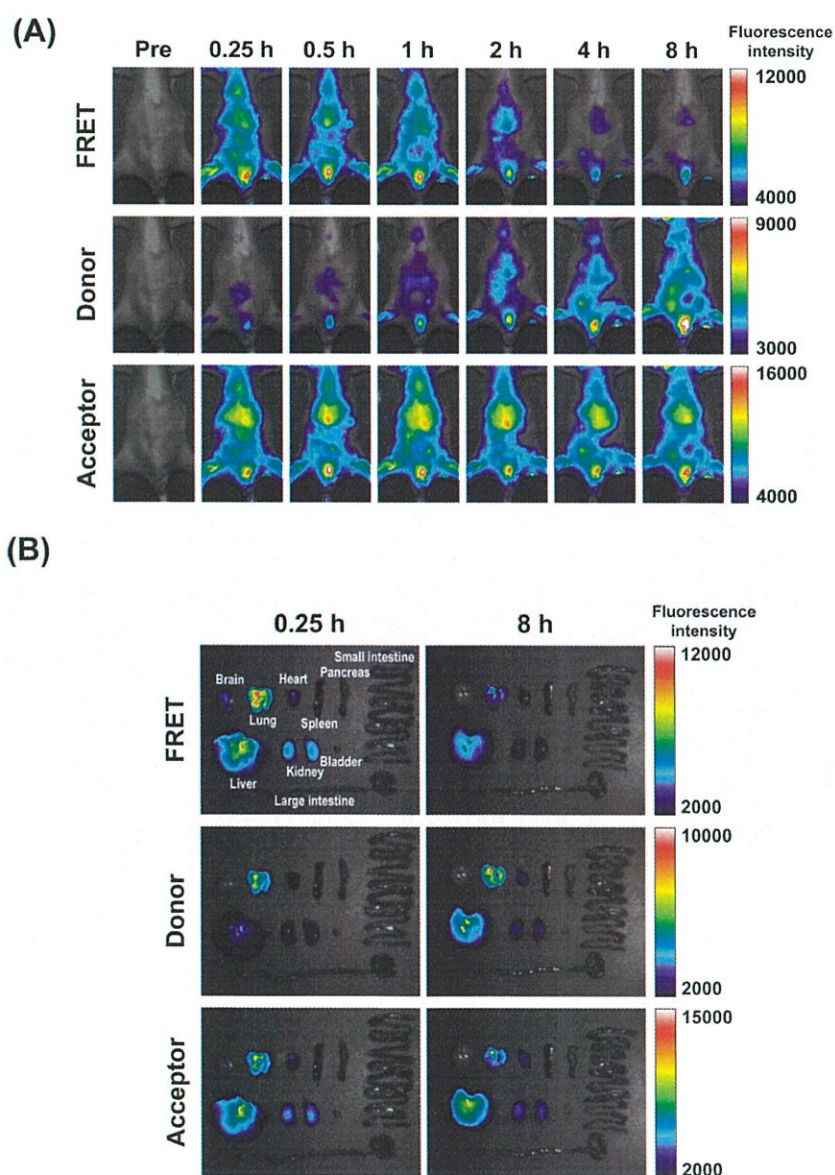
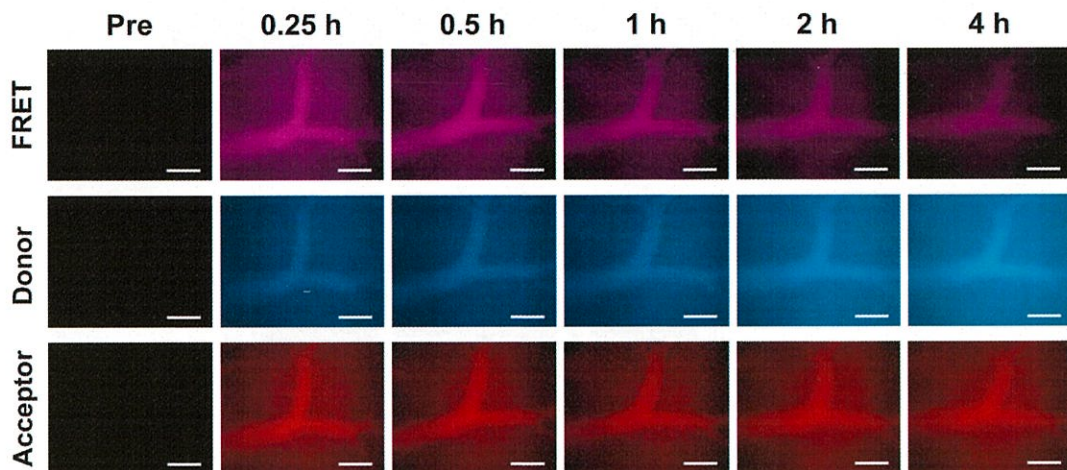


Fig. 2 *In vivo* FRET imaging of DiR- and DiD-co-loaded nanoparticles in mice (A). DiR- and DiD-co-loaded nanoparticles (10 nmol of DiR and DiD each/kg) were intravenously administered. The images were obtained by *in vivo* imager. *Ex vivo* fluorescence images were obtained at 0.25 and 8 h after administration (B).

DiR 及び DiD を内封した高分子ナノ粒子をマウスに静脈内投与後、ズーム蛍光顕微鏡を用いて、開腹した状態で肝臓を経時的に蛍光観察した。投与後、肝血管内に強い FRET シグナルが認められ、経時的に減弱した。一方、donor シグナルは、肝組織全体において経時的に増強した (Fig. 3)。以上の結果から、投与されたナノ粒子は、肝臓において血管外へ漏出すると共に崩壊し、蛍光物質が放出されたことが示された。

Acceptor シグナルは FRET の影響を受けないため、単一の蛍光プローブ標識による従来行われてきたイメージングの結果と同様となる。本研究で調製したナノ粒子の蛍光イメージングにおいて、FRET シグナルと acceptor シグナルの挙動は異なった。すなわち、従来の手法では確たる評価が不可能であった DDS の挙動を正確に検出し、可視化することができた。本章において構築した FRET イメージング技術により、生体内の様々なスケールにおいて、形態を保持したドラッグキャリアと放出された物質の正確な時間的体内挙動が評価可能となった。



**Fig. 3** Intravital FRET imaging of DiR- and DiD-co-loaded nanoparticles in mouse liver tissue. DiR- and DiD-co-loaded nanoparticles (10 nmol of DiR and DiD each/kg) were intravenously administered. The images were obtained at the designated times by zoom fluorescence microscopy. Scale bar is 100  $\mu\text{m}$ .

## 2. 組織透明化手法を応用したイメージング技術の構築

種々の DDS の標的組織内への送達能は、主に組織薄切切片を観察することで評価されている。しかしながら、この手法では薄切による組織への損傷や、蛍光プローブの流出などを引き起こす可能性がある。一方で、臓器をそのまま観察しようとしても、臓器中の成分によって光が減衰するため、臓器内の蛍光検出が妨げられる。

組織透明化処理は、臓器の光透過性を向上させることにより、臓器内部の蛍光イメージングを可能にする (Fig. 4)。この技術は、主に臓器内の詳細な立体構造を明らかにする目的で開発され、高い透明度を実現する様々な手法がある。本章では、ドラッグキャリアによって送達された物質の臓器内における空間的分布を評価することを目的とし、最適な組織透明化手法について検討した。

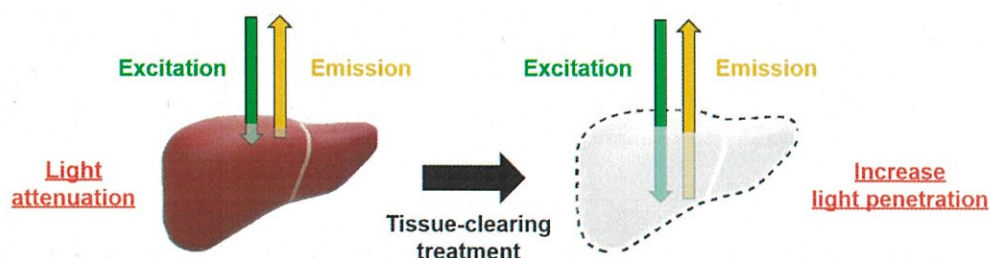


Fig. 4 Advantage of tissue-clearing technique

高い透明度を実現するものの、ドラッグキャリアの分布評価には不適と考えられる多量の界面活性剤を含む clear unobstructed brain/body imaging cocktails and computational analysis (CUBIC)法をベースに、処理液の組成及び処理時間を改変した Modified CUBIC 法を開発した。蛍光プローブとして DiI を内封した高分子ナノ粒子をマウスに静脈内投与後、摘出した肝臓を Modified CUBIC 法にて透明化処理し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光観察した。

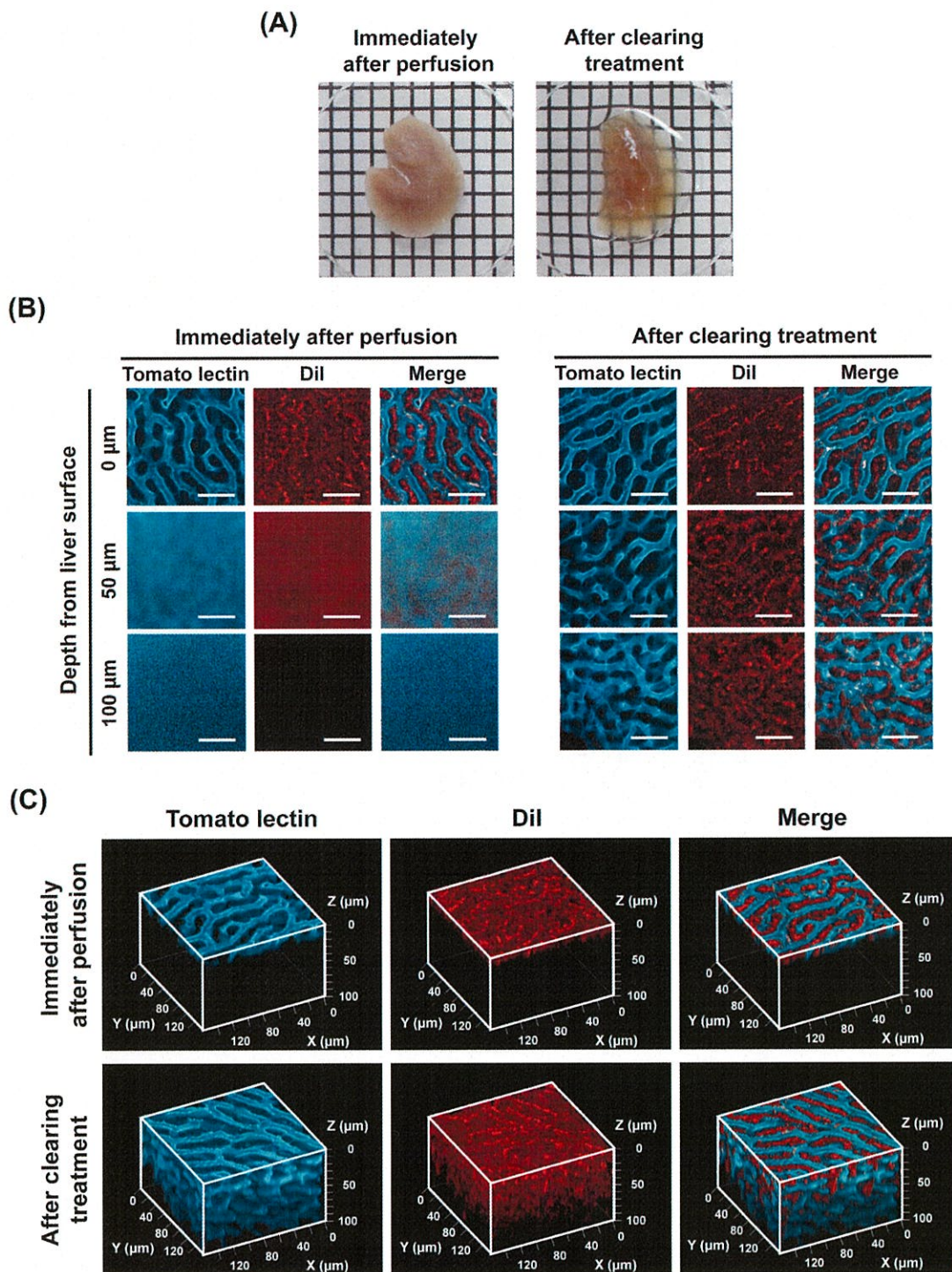


Fig. 5 Appearance of liver after the tissue-clearing treatment (A). DiI distribution and tomato-lectin labeled sinusoidal structures of mouse liver after tissue-clearing treatment (B). DiI loaded nanoparticles (333 nmol/kg for DiI) was administered intravenously to mice. At 4 h after administration, the liver was perfused for fixation and excised. DyLight 649-conjugated tomato lectin (3.3 mg/kg) was administered intravenously ten minutes before perfusion. Each fluorescent image at 0, 50, and 100  $\mu\text{m}$  below the liver surface was individually analyzed at the respective depth. Scale bar is 50  $\mu\text{m}$ . Three-dimensional images reconstructed from single-plane fluorescent images of the liver (C).

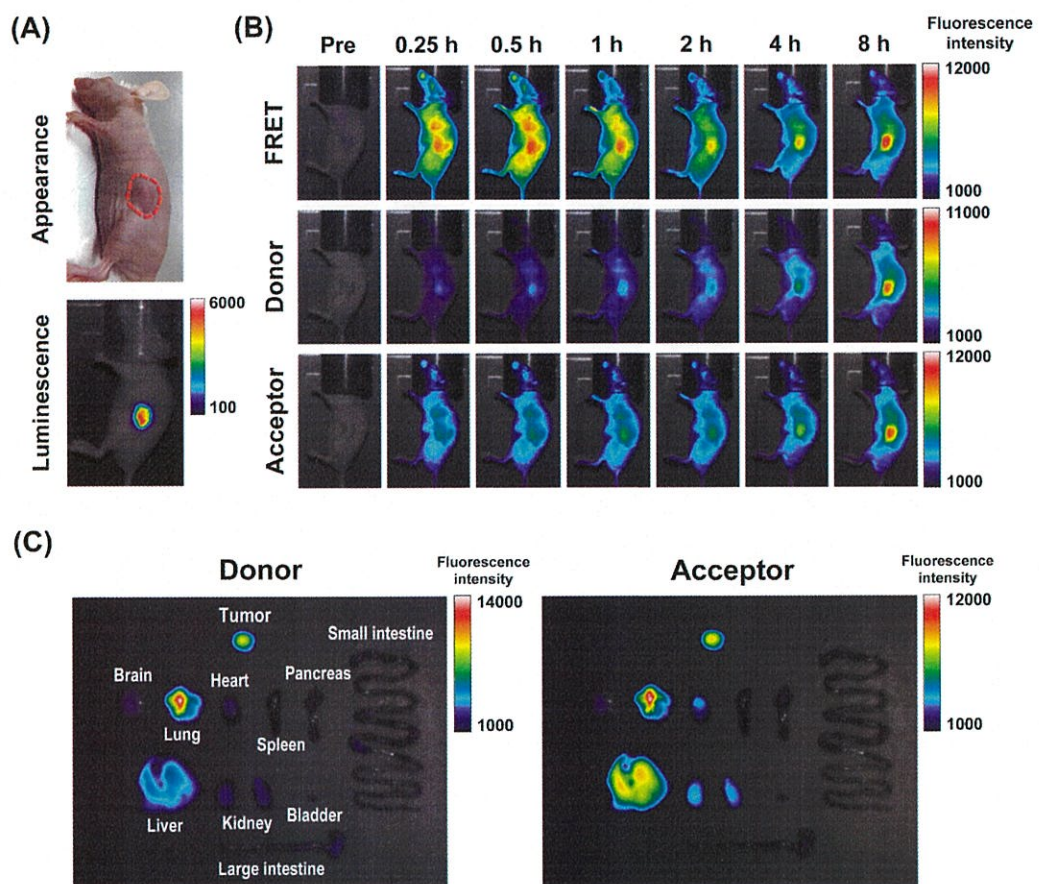
Modified CUBIC 法により透明化处理することで (Fig. 5A)、肝臓深部まで蛍光観察が可能となった (Fig. 5B)。その結果、ナノ粒子に内封した DiI は、蛍光標識トマトレクチンによって染色された肝血管の領域外に分布していることが示された (Fig. 5B 及び C)。蛍光標識トマトレクチンは他の組織の血管や上皮細胞などを染色可能であることから、本手法は様々な組織への応用が可能であると考えられる。本章において構築した Modified CUBIC 法を用いた 3 次元イメージング技術により、ドラッグキャリアによって送達された物質の組織内における精密な空間的分布が評価可能となった。

### 3. 腫瘍病巣における DDS の精密な生体内挙動の時空間的イメージング

がんに対する薬物治療においては、抗悪性腫瘍薬の多くが強い細胞毒性を有しているため、腫瘍病巣に選択的に薬物を送達する DDS の開発が望まれている。がん治療を指向した DDS の開発に際しては、ドラッグキャリアが腫瘍病巣に到達するまで薬物を内封したまま形態を保持し、がん細胞周辺又は細胞内で内封していた薬物を放出することが、安全性・有効性の観点から重要である。したがって、ドラッグキャリア自体の正確な時間的体内挙動と、腫瘍病巣における精密な空間的薬物分布を評価できることが必要となる。

本章では、ドラッグキャリア自体及び内封した物質の全身から腫瘍病巣への到達性を精密に評価するために、第 1 章及び第 2 章で構築したイメージング技術を応用し、腫瘍病巣における DDS の生体内挙動を時空間的に可視化した。

腫瘍病巣モデルとして、ヒト膵臓癌細胞株 (BxPC3-Red-Fluc) を BALB/c マウスに皮下投与し、7日間飼育して腫瘍組織を形成させた (Fig. 6A)。PEG-PDLLA (PEG = 2 kDa, PDLLA = 2 kDa) を構成成分とする高分子ナノ粒子を調製し、DiR 及び DiD を内封した。腫瘍病巣モデルマウスにナノ粒子を静脈内投与し、経時的に蛍光 *in vivo* imaging を行った。投与後1時間までに、腫瘍病巣部位に強い FRET シグナルが認められた (Fig. 6B)。一方、時間の経過とともに、腫瘍病巣部位における donor シグナルの増強が認められた。また、摘出した腫瘍組織において、donor 及び acceptor の強いシグナルが検出された (Fig. 6C)。したがって、投与されたナノ粒子は、腫瘍組織に集積した後に時間経過と共に崩壊し、内封されていた蛍光物質が放出されたことが示された。

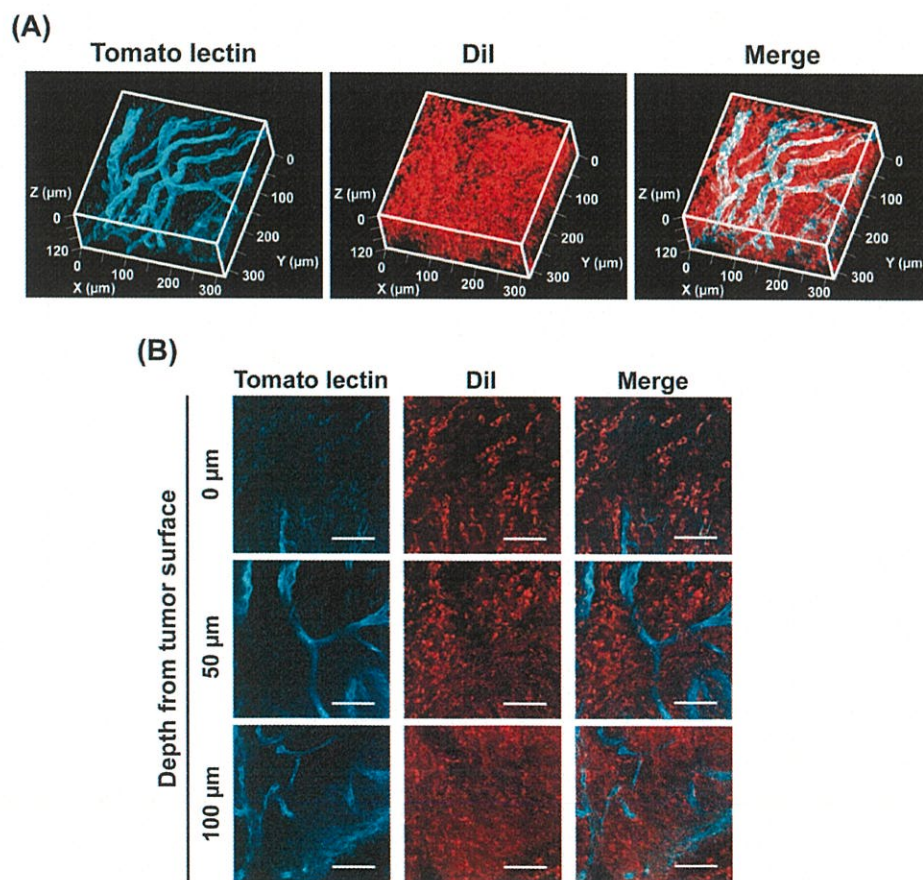


**Fig. 6** Appearance of tumor region and luminescence imaging in tumor-bearing mice (A). Alkaline hydrochloride (3.3 mg/kg) was administered intraperitoneally to tumor-bearing mice at 7 days after injection of BxPC3-Red-Fluc cells. The luminescence images were obtained by *in vivo* imager. *In vivo* FRET imaging of DiR- and DiD-co-loaded polymeric nanoparticles in tumor-bearing mice (B). DiR- and DiD-co-loaded nanoparticles (10 nmol of DiR and DiD each/kg) were intravenously administered. The images were obtained by *in vivo* imager. *Ex vivo* fluorescence images were obtained at 8 h after administration (C).



DiI を内封した高分子ナノ粒子を腫瘍病巣モデルマウスに静脈内投与後、摘出した腫瘍組織を Modified CUBIC 法にて透明化处理し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光観察した。腫瘍組織において、DiI が血管から離れた部位まで分布することが示された (Fig. 7 A 及び B)。したがって、本研究で調製したナノ粒子は腫瘍組織に到達後、血管外へ漏出し、がん細胞周辺で崩壊することが示唆された。

以上の結果から、調製された高分子ナノ粒子が形態を保持した状態で腫瘍病巣へ移行し、腫瘍病巣内部まで薬物を送達することが可能であることが明らかとなった。本章において、FRET 現象及び Modified CUBIC 法を応用したイメージング技術により、腫瘍病巣における DDS の精確な生体内挙動を時空間的に可視化することができた。



**Fig. 7** Three-dimensional images (A) and single-plane fluorescent images (B) of DiI distribution and tomato-lectin labeled vascular structures of tumor tissue after tissue-clearing treatments. DiI loaded nanoparticles (333 nmol/kg for DiI) was administered intravenously to tumor-bearing mice. At 8 h after administration, the tumor was perfused for fixation and excised. DyLight 649-conjugated tomato lectin (3.3 mg/kg) was administered intravenously ten minutes before perfusion. After tissue-clearing treatment using Modified CUBIC technique, the tissues were observed with confocal laser microscopy. Scale bar is 100  $\mu\text{m}$ . Each 2- $\mu\text{m}$  stack is obtained from 0 to 120  $\mu\text{m}$  below the tumor surface.

## 総括

本研究では、形態を保持したドラッグキャリアと放出された物質の体内挙動を可視化するために FRET 現象を、送達された物質の組織内分布を可視化するために組織透明化手法をそれぞれ応用した時空間イメージング技術を創出した。本研究の成果は、ドラッグキャリアによる病巣への薬物送達を全身から細胞レベルまでの幅広いスケールにおいて精確かつ視覚的に評価する技術として有用であり、DDS 研究の学術的基盤をより一層強固なものにすると共に、様々な DDS を実用化に導くうえで有益な情報を提供するものである。