



Title	核酸医薬の薬物動態解析・組織内分布イメージングに資する質量分析法の展開
Author(s)	横井, 宏之
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72330
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 （ 横 井 宏 之 ）

論文題名

核酸医薬の薬物動態解析・組織内分布イメージングに資する質量分析法の展開

論文内容の要旨

現在、医薬品開発の場において、アンチセンス、siRNA、アプタマー等の核酸医薬品は、次世代医薬品として多大な注目を集めつつある。これまで主流であった低分子医薬品や、バイオ医薬品として注目されている抗体医薬品が一般的に発現タンパク質を創薬標的するのに対し、核酸医薬品はRNAやDNA等の遺伝子を直接ターゲットにできる点において非常に魅力的である。しかしながら核酸医薬品は、生体内における安定性や体内動態特性に問題点があり、開発当初は局所投与での応用のみが進められていた。近年、核酸工学技術の発展に伴い、生体内での安定性に優れた修飾核酸が開発され、局所投与だけでなく全身投与可能な核酸医薬品が開発されつつあることから、開発された医薬品の体内動態特性、すなわち「何処に、どのような形で、どのくらい存在するのか」を評価する解析基盤技術の開発が必須になると予想される。

核酸医薬品の体内動態評価としては、目的核酸医薬品をハイブリダイズして検出させるLigand binding assay (LBA) 法が一般的に利用されてきた。LBA法は、感度良く核酸医薬品の濃度が測定できるという利点を持つ一方で、その測定原理上、一塩基脱離した核酸医薬品や生体内で修飾をうけた核酸医薬品などの代謝物を、投与された未変化体と区別して検出するには不向きという欠点がある。核酸医薬品の開発において、これら代謝物や分解物の評価は必要不可欠であり、代謝物の構造予測も含めた定性・定量法の確立が必要である。一方で、低分子化合物の代謝物を含めた体内動態評価には、主に質量分析 (MS) が用いられてきた。MSは測定対象の質量数が得られるため、投与薬剤とその代謝物の区別が可能となる。医薬品開発現場で最も利用されているものは、高速液体クロマトグラフィーと質量分析を組み合わせたLC-MSであり、投与薬物の未変化体と代謝物の同時評価が可能であるLC-MSによる解析は、医薬品の動態解析の手法として最適といえる。これらを踏まえた上で、近年イメージング質量分析 (IMS) という新たな手法が、薬物動態の分野で注目を集めつつある。

IMSは、組織切片上に直接レーザーを照射し、それによって生じたイオン化分子を検出機にて読み取るとともに、予め取得した組織のイメージ像と重ね合わせることで、レーザーが照射された部分の位置情報と、スペクトルパターンから、組織中のイオン化分子の分布情報を一挙に取得する技術である。画像化された組織切片領域内で、多数のスペクトルの中から、注目するシグナルのみを抽出することで、目的分子の局在解析が可能になる。また、一度の測定で、一枚の切片から、標識体を必要とせず、複数の標的物質群の局在を解析できることも利点の一つに挙げられる。創薬研究において、投与薬物やその代謝物の組織内分布は、薬効評価および毒性評価の観点で重要な情報であり、標識体の合成には高いコストがかかるため、創薬初期段階でこれらの情報が得られると利用価値は高い。しかしながらこれまで、核酸医薬品を投与した組織切片からIMSに成功したという報告はなく、核酸医薬品のIMSによる評価法の開発は、今後増加すると考えられる核酸医薬品開発において、非常に有用な解析手段になるものと期待できる。

そこで著者は、核酸医薬品の新たな薬物動態解析法の確立に向け、核酸医薬品の組織内分布評価法の開発に取り組んだ。本研究では、核酸医薬品の中で最も開発研究が進められているアンチセンス核酸に着目した。アンチセンス核酸は、mRNAやmiRNA等をターゲットとしているが、体内動態（特に組織移行性）に関する情報は少ない。そこで、モデル核酸医薬品候補分子として、体内安定性に優れたlocked nucleic acid を基に設計されたアンチセンス核酸 (LNA-A) を用いて、核酸医薬品の体内動態解析におけるLC-MSの有用性を確認した。続いて、LC-MSでは困難である組織内分布の評価を行うために、MALDI-IMSを用いた新たな組織内分布評価法の開発を行った。

初めに、LC-MSを用いてLNA-Aの検出法の検討したところ、LNA-A投与マウス血漿から、LNA-AとLNA-Aの3'側から1塩基及び2塩基脱離した代謝物の同時かつ分離検出が可能であることが明らかになった。本結果から、核酸医薬品

においてもこれまでの低分子医薬品と同様に、LC-MSが代謝物解析に有用であることが示された。一方で、その検出には十分な精製操作が必要であり、組織内分布の評価に応用するには不十分であることも確認できた。

続いて、MALDI-IMSを用いたLNA-Aの組織内分布評価法の開発を行った。組織切片内からLNA-Aを検出するためには、組織切片中からLNA-Aの検出を妨害する成分の除去が必要であった。そのための前処理法を開発し、本法を適用することで、組織切片中のLNA-Aの検出が可能となった。次に、MALDI-IMSでのLNA-Aの検出感度の向上のため、アミン添加マトリックスを測定対象切片に前塗布し、その後アミンを添加していない通常のマトリックスを塗布する新しいマトリックス塗布法を考案した。開発した方法を用いて、LNA-A投与マウスの肝臓及び腎臓のIMS解析を行ったところ、LNA-AとLNA-Aの3'側から1塩基脱離した代謝物が検出され、それらが肝臓では一様に、腎臓では皮質部分に分布している様子が示された。これらの代謝物の解析は、開発した前処理法と、高感度のマトリックス塗布法によってはじめて検出可能になったものであり、極めて有用な解析技術として期待される。

従来、開発医薬品の分布評価には放射標識体を用いた試験が実施されてきた。しかし、この方法の問題点の一つは投与薬剤と代謝物の区別ができないことにある。本研究にて開発した方法を用いれば、実際に組織内に分布している代謝物の分子量情報が得られ、そこから代謝物がどのような形を持っているかという点まで考察できる。また、本研究ではマウスに10 mg/kgの用量でLNA-Aを投与したが、既承認アンチセンス核酸医薬品であるKynamroの非臨床安全性試験において、用いられた最大用量は75 mg/kgであったことを考慮すると、本法は実際の医薬品開発の場においても、使用可能な検出感度が得られていると考えられる。したがって、本研究にて開発したMALDI-IMSによる組織内分布評価は核酸医薬の開発評価に有用であると結論付けた。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (横 井 宏 之)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	土井 健史
	副 査	教授	小比賀 聡
	副 査	教授	鎌田 春彦

論文審査の結果の要旨

横井さんは、核酸医薬品の薬物動態評価に質量分析法 (MS法) を導入することを目的として本研究に取り組んだ。MS法として、最も汎用されている liquid chromatograph mass spectrometer (LC-MS)、医薬品開発現場でも応用されつつある matrix assisted laser desorption/ionization - イメージングMS (MALDI-IMS) を選び、モデル核酸医薬品として locked nucleic acid を含むアンチセンス核酸 (LNA-A) を選んで研究を行った結果、以下の優れた成果を得ることができた。

- 1) LC-MSを用いたLNA-Aの評価では、生体成分からの抽出操作を行うことによって、投与LNA-Aとその代謝物の検出が可能であることが明らかになった。本結果から、核酸医薬品においてもこれまでの低分子医薬品同様に、LC-MSが代謝物解析に有用であることを示すことができた。
- 2) MALDI-IMSを用いた新規の核酸医薬品評価法の開発を目的に、対象組織から検出を妨害する成分の除去を目的とした前処理法、及び検出感度の向上のための新規マトリックス塗布法を開発した。
- 3) 開発した方法を用いて、LNA-A投与マウスの肝臓及び腎臓切片の解析を行ったところ、投与LNA-Aとその代謝物が肝臓では一様に、腎臓では皮質部分に分布している様子が検出された。これらは既存の標識体を用いた方法では得られない情報であり、本研究にて開発したIMS法が、核酸医薬品の組織内分布の評価法に非常に有用であることを示すことができた。

以上の成果は、核酸医薬品の動態解析に貢献することが大いに期待されることより、博士 (薬科学) の学位論文に値するものと認める。