OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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

博士論文

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

大阪大学大学院薬学研究科
創成薬学専攻 生命情報解析学分野

横井 宏之

略語一覧

DDS: drug delivery system

DMA: dimethylamine

DNA: deoxyribonucleic acid

FDA: food and drug administration

HFIP: hexafluoroisopropanol

IMS: imaging mass spectrometry

LBA: ligand binding assay

LC-MS: liquid chromatograph mass spectrometer

LNA: locked nucleic acid

MA: methylamine

MALDI: matrix assisted laser desorption/ionization

MS: mass spectrometry

RNA: ribonucleic acid

siRNA: small interfering RNA

TEA: triethylamine

TIC: total ion current

TOF: time of flight

目次

序論 1

本論 5

第一章 LC-MSを用いたLNA-A及びその代謝物の検出法の検討 5

第一節 LNA-A前処理法及び測定条件の検討 6

第二節 LNA-Aとその代謝物との同時検出の検討 10

第三節 LNA-A投与マウス血漿中のLNA-A及びその代謝物の検出 13

第四節 小括 16

第二章 MALDI-IMSを用いたLNA-Aの組織内分布評価法の開発 18

第一節 MALDI-MSによるLNA-Aの検出マトリックスの選択 19

第二節 MALDI-IMS測定に向けた前処理法の検討 21

第一項 マウス肝臓切片表面に添加したLNA-Aの検出を用いた前処理法の検討 22

第二項 マウス臓器ホモジネート中のLNA-Aの検出を用いた前処理法の検討 25

第三節 検出感度の向上を目的とした検討 31

第一項 マトリックス塗布法の検討 31

第二項 マトリックス溶液への添加物の検討 33

第四節 LNA-A投与マウス肝臓及び腎臓切片のMALDI-IMS解析 37

第五節 小括 42

総論 43

結論 45

謝辞 46

試薬及び実験器具 47

引用文献 48

序論

近年、創薬ターゲットの多様化により、創薬研究の対象となる分子は、これまでの低分子化合物から抗体医薬品に代表される高分子医薬品を経て、第3の分子系である中分子医薬品にシフトしており、その中でも核酸医薬品が非常に注目を集めている。核酸医薬品は、DNAやRNAを構成するデオキシリボ核酸、あるいはリボ核酸を基本構造として持ち、その種類には、アンチセンス・デコイ・siRNA及びアプタマーなどがある。これら核酸医薬品は、DNAやRNAの特異的な塩基配列を直接ターゲットにできることや、オリゴヌクレオチドの自身の高次構造に起因する特異性を利用できるよう設計するなど、狙った薬理作用に応じて柔軟で幅広い選択ができる点において、非常に魅力的である [1-3]。

一方で、医薬品を開発するうえで最も大切なことは、投与薬剤を標的部位に、効力発現に必要な濃度で到達させることであり、これらの動態解析技術の確立が核酸医薬品の開発を支える重要な課題であると考えられている。核酸医薬品はその構造上、ヌクレアーゼにより速やかに分解される易分解性が問題となってきた [4]。また、投与後の核酸は、肝臓や腎臓等、特定組織に集積しやすいという傾向も明らかになっている [2, 3]。そのため、分解性や集積性を考慮に入れる必要が少ない、局所投与型の核酸医薬品が先行して開発されていた。最近では、こうした核酸医薬品の弱点の解決のために、オリゴヌクレオチドの化学修飾研究が活発に行われており、それら化学修飾された核酸を配列に含む核酸医薬品の開発が進められている [5-7]。また、DDS技術としてlipid nanoparticle (以降LNP) を利用して標的部位に到達させる方法も開発されている [8]。こうした修飾核酸技術の発展により、2012年に初の全身投与可能なアンチセンス核酸医薬品であるKynamuro (mipomersen) がFDAに承認された。さらに、2018年にはLNPを用い

ることで全身投与が可能となったOnpattro (Patisiran) が初のsiRNA医薬品としてFDAに承認され、今後も全身投与可能な核酸医薬品が多く開発されると予測される [9-12]。このような背景から、開発された核酸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」を評価する解析技術の開発が必須になると予想される。しかし、これら核酸医薬品の動態解析を行う手段は、これまでに開発されてきた低分子医薬品などと比較して、まだ十分とは言えない。

低分子化合物の代謝物を含めた体内動態の解析には、主に質量分析が用いられてきた。質量分析はその名の通り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、操作性がよく適用範囲の広い、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 であるが、投与薬物の未変化体と代謝物の同時評価が可能であることからも、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。しかしこれまで、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 (以降 LBA) 法が一般的に利用されてきた。LBA 法は、感度よ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、投与された核酸医薬品と区別して検出するには不向きという欠点がある [13-17]。ターゲットの配列にハイブリダイズして薬効を発揮する核酸医薬品 (アンチセンス及び siRNA など) においては、一塩基脱離した程度の代謝物は、投与核酸と同等の薬効を有する可能性が高いほかに、ターゲットとは異なる配列にハイブリダイズすることによるオフターゲット作用の観点からも無視できない存在である [18-20]。医薬品開発において、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。これらの問題点を踏まえた上で、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 [21]。

IMS は、1997 年に Caprioli らによって、体内に存在するタンパク質を直接同定する方法の一つとして開発された。ラット膵臓の凍結切片上から直接タンパク質をマトリックス支援型レーザー脱離イオン化法 (以降 MALDI) でイオン化することで、タンパク質の組織内分布を解析することに成功した。本法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器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 [22, 23]。画像化された切片領域内で、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、抗体や染色剤を必要とせず、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。2006 年に Khatib-Shahidi らによってオランザピン投与後のラットの全身切片から、オランザピンとその代謝物の IMS 結果が報告され、生体成分のみならず薬物の組織分布評価への IMS の応用が期待された [24]。医薬品開発研究において、投与薬物のみならず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る。創薬の申請試験で利用されている放射標識体の合成には高いコストがかかるため、創薬研究の初期段階でこれらの有用なデータを得られるならば、その利用価値は高い。これまで、低分子医薬品に対して IMS を用いてアプローチしたという報告はいくつかなされている [25-27] 一方で、核酸医薬品に対して 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の一助

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を志向し、核酸医薬品の組織内分布評価法の確立を目標とし、本研究に取り組んだ。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、DDS改善のためにLNPを用いるなど、複雑なキャリア無しで、標的タンパク質の発現を抑制するが、体内動態 (特に組織移行性) に関する情報は少ない [16, 28, 29]。そこで、モデル化合物としてlocked nucleic acid を基に設計されたアンチセンス核酸 (以降LNA-A) を用いて、まずは近年核酸医薬品評価にも適用されつつあるLC-MSに着目し、LC-MSの有用性とその課題を確認した（第一章）。続いて、LC-MSでは評価できない部分を補填するため、MALDI-IMSを用いた新たな組織内分布評価法の開発を行った (第二章)。初めにMALDI-MSでLNA-Aを検出できる条件を検討し (第二章、第一節)、その条件をもとに適切な前処理法の検討を行った (第二章、第二節)。さらに、検出感度を向上させる方法の検討を行い (第二章、第三節)、確立した方法を用いて、実際にLNA-Aを投与したマウスの腎臓及び肝臓の測定を行いその有用性を評価した (第二章、第四節)。以上の結果から、今回著者が開発したMALDI-IMS法を用いることで、組織内に分布している投与LNA-A及びその代謝物の検出が可能であることを示した。加えて本手法を用いることで、投与LNA-Aとその代謝物が同じ分布を示すことが判明した。これにより、標識体の合成が困難である、創薬の初期段階から本手法が適用でき、核酸医薬品開発の一助となることが期待できる。本論文では以上の研究をそれぞれの背景を含めて順に述べる。

本論

第一章 LC-MS を用いた LNA-A 及びその代謝物の検出法の検討

質量分析による解析は、医薬品として投与された核酸やその代謝物を同時に検出できるため、薬物動態解析法の一つとして期待されている。特にLC-MSは、低分子化合物を中心とした医薬品開発における薬物動態評価にて汎用されており、多検体処理をスループットよく実施可能な測定法である。これまでに、投与核酸の代謝物分析にLC-MSが使用された報告はあるが [13,14, 30, 31]、その数は少なく、多くの実績のある低分子化合物と比較すると、十分に確立された方法とは言えないのが現状である。また、医薬品候補核酸は、医薬品として承認されるまで、開発企業からその修飾核酸情報や配列情報が公開されることはないため、詳細な測定法が明らかになることは少ない。そこで本章では、LC-MSの有用性の確認と、組織分布評価法として適用するうえでの課題を明確にすることを目的として、LC-MSを用いたLNA-Aの検出法を検討した。Table 1に本研究で使用した核酸配列と精密質量の情報を示す。

Table 1. Sequence and exact mass of LNA-A, LNA-A (14), and LNA-A (13)

Name	Length	Exact mass	Sequence
LNA-A	15-mer	4957.47	G(L)T(L)A(L)TTTGTCAATm(L)A(L)G
LNA-A (14)	14-mer	4612.44	G(L)T(L)A(L)TTTGTCAATm(L)A(L)
LNA-A (13)	13-mer	4255.41	G(L)T(L)A(L)TTTGTCAATm(L)

All phosphates are phosphorothioated
N(L): LNA
m: methylcytosine

第一節 LNA-A前処理法及び測定条件の検討

LC-MSで測定する際には、生体成分から測定対象を抽出することが必要不可欠である。核酸の抽出に古くから使われている手法は、フェノール - クロロホルム抽出 (以降Phe-Chl抽出) である [32-35]。本研究においても、Phe-Chl抽出をベースに前処理法を検討した。

＜方法＞

- マウス血漿からのLNA-Aの抽出 (Phe-Chl抽出)

マウス血漿100 μLにLNA-A溶液 (10 μg/mL) を添加混合した試料に (血漿中LNA-A濃度として1 μg/mL)、水/25%アンモニア水 (95:5, v/v) 溶液を500 μL添加混合することで塩基性条件下にてPhe-Chl溶液を200 μL添加し30秒間撹拌後遠心分離した。得られた上清にクロロホルム溶液を100 μL添加し、30秒撹拌後遠心分離し、得られた上清を窒素気流化で溶媒除去後、残渣を*移動相A/メタノール (9:1, v/v) 溶液150 μLで溶解しLC-MS測定試料とした。なお、コントロールとして、精製水に同濃度のLNA-Aを添加混合した溶液も調製し前処理した。

*移動相A：0.04%トリエチルアミン (TEA)、1%ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) 溶液

- カラムカートリッジを用いた固相抽出によるLNA-Aの精製

Phe-Chl抽出後の試料を移動相A (500 μL) で希釈後、Oasis HLBカートリッジに付した。移動相A (1 mL) で洗浄後、メタノール/移動相A (1:1, v/v) 溶液500 μLで目的画分を溶出した。窒素気流化で溶媒除去後、残渣を移動相A/メタノール (9:1, v/v) 溶液150 μLで溶解しLC-MS測定試料とした。

- 血漿及び水溶液中LNA-AのLC-MSによる分析

カラムはXbridge C18 (3.5 μm, 2.1 mm I.D. × 150 mm) をカラムオーブンを60度に設定し使用した。LNA-Aの溶出は、移動相Aと移動相Bにメタノールを用いた流速0.3 mL/minでのグラジエント溶出法にて実施した。イオン化法は陰イオン検出のESIを用いて、TICモードでの測定を実施した。本研究の測定装置には、精密質量を用いて測定対象の検出が可能なサーモサイエンティフィック社のQ Exactive plus LC-MSシステムを用いた。

＜結果＞

LC-MS測定において重要なことは、測定対象物を他の夾雑物と分離させ、明瞭なクロマトグラムを描かせることである。LC-MS測定において汎用されているのは、水・メタノール・アセトニトリルなど極性の高い溶媒を、極性の低い物質を固定相に用いたカラム (ODSカラムなど) に流し、対象化合物との疎水性相互作用を利用し目的物を分離させる、逆相系の分析方法である。しかし、核酸のように親水性の高いものを測定する場合は、疎水性相互作用が期待できないため、逆相系の分析系ではカラムに保持させることができない。したがって、このままでは夾雑物との分離ができず、明瞭なクロマトグラムを得ることができない。そこで、イオンペア試薬を用いることで、核酸が持つリン酸基が乖離して生じる陰イオンに対して、カウンターイオンを提供しイオンペアを形成させ、疎水性相互作用によりODSカラムに保持させることが可能となる [36]。本研究では、イオンペア試薬としてTEAを、またESIイオン源にて溶媒の揮発を補助する試薬としてHFIPを添加した移動相を用いて検討した。

まず、LNA-AをLC-MSで測定可能かどうかを検証した。Figure 1にLNA-Aのマススペクトルを示すが、そのマススペクトルから複数のLNA-A由来と考えられ

る多価イオンが検出された。その中で6価のイオン ([M-6H]$^{6-}$) が最も感度よく検出されていた。このイオンを拡大したところ (Figure 1 (b)) 6価のモノアイソトピックイオンである*m/z* 825.239が検出された。

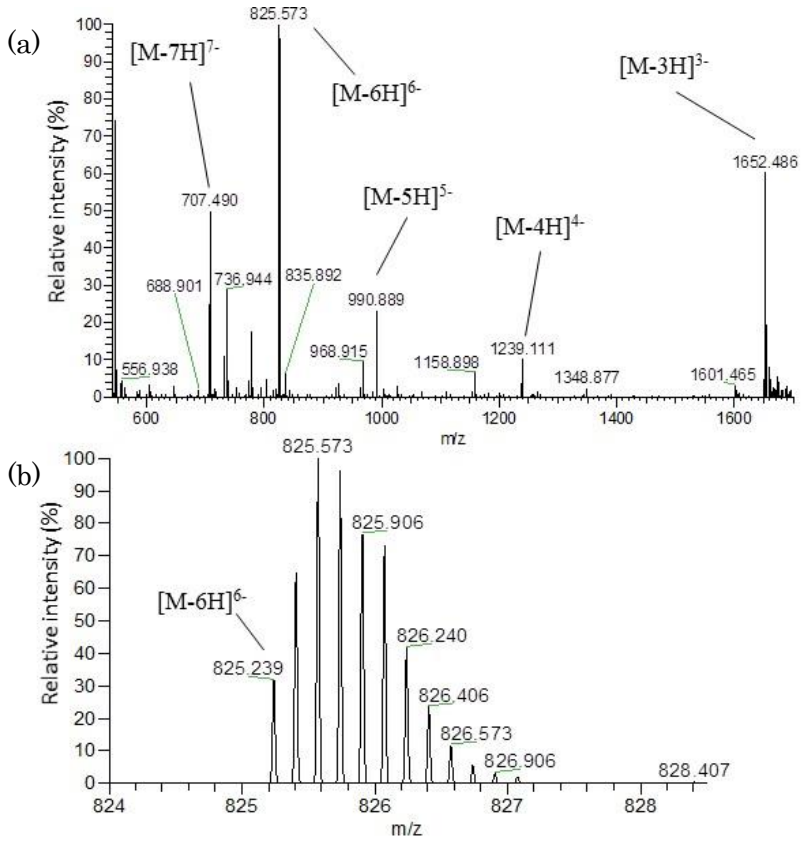


Figure 1. ESI-mass spectra of LNA-A in purified water of the mass range *m/z* 540-1700 (a) and expanding mass range of its [M-6H]$^{6-}$ group (b).

次に、マウス血漿中のLNA-AがPhe-Chl抽出によって検出できるかを検討した。Phe-Chl抽出後のLNA-A添加精製水及びマウス血漿をLC-MS測定し、得られたTICクロマトグラムから、*m/z* 825.239を中心に質量範囲10 ppmで抽出しクロマトグラムを描かせた (Figure 2)。その結果、精製水中のLNA-Aは1本の明瞭なピークとして検出されたが (溶出時間14.4分)、マウス血漿中のLNA-Aは2本のピークに分離された (12.0分及び14.4分)。すなわち、本前処理法では、精製が不十分であり、残った血漿成分がLC-MSでの測定に影響したものと考えられた。

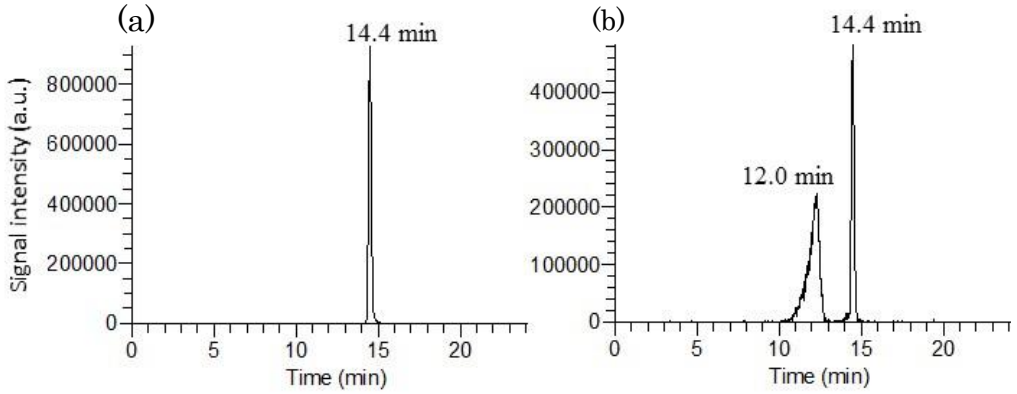


Figure 2. Detection of LNA-A in purified water or mouse plasma after Phe-Chl extraction. Extracted ion (*m/z* 825.239) chromatograms of LNA-A in water (a) and mouse plasma (b) by ion-pair LC-MS assay. a.u. arbitrary unit.

Phe-Chl抽出だけでは血漿からの精製が不十分であったため、Phe-Chl抽出後に、固相カラムを用いて精製する方法を検討した。Figure 3に、この時のクロマトグラムを示したが、この2段階の精製を用いることで、マウス血漿中のLNA-Aにおいても、精製水と同様1本の明瞭なピークとして検出された。したがって、LNA-Aの精製には、Phe-Chl抽出後に固相カラムによる精製を行う、2段階抽出法が必要であることが明らかになった。また、以降のLNA-Aのモニターイオンには、6価のモノアイソトピックイオンを選択することにした。

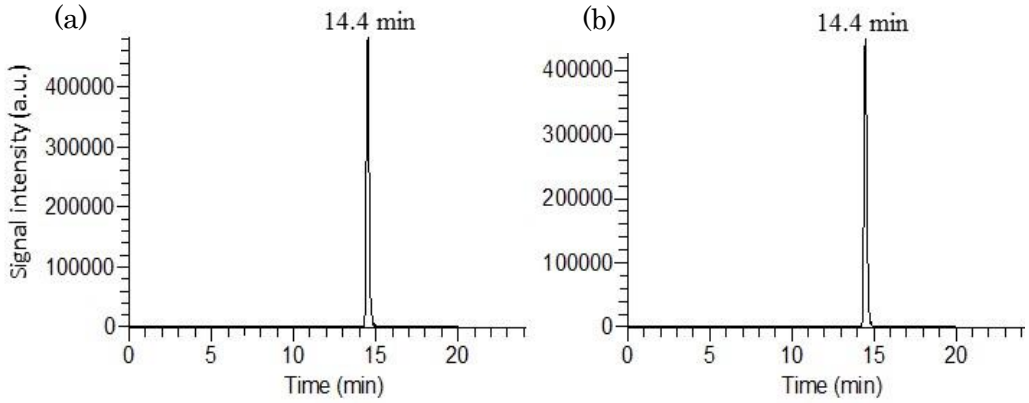


Figure 3. Detection of LNA-A in purified water or mouse plasma after two step extraction. Extracted ion (*m/z* 825.239) chromatogram of LNA-A in water (a) and mouse plasma (b) after two step extraction by ion-pair LC-MS assay. a.u. arbitrary unit.

第二節 LNA-Aとその代謝物との同時検出の検討

LC-MSで測定を行う最大の利点は、投与薬剤とその代謝物との同時検出である。そこで、本節ではLNA-Aの代謝物とLNA-Aが同時に検出可能かを確認するため、LNA-Aの代謝物として、LNA-Aの3′側から1塩基脱離したLNA-A (14) 及び2塩基脱離したLNA-A (13)を用いてLC-MSにて検討した。

＜方法＞

- **マウス血漿中のLNA-A、LNA-A (14)及びLNA-A (13)の検出**

マウス血漿100 μLにLNA-A、LNA-A (14)、及びLNA-A (13)溶液 (各10 μg/mL) をそれぞれ単独または3化合物を同時に添加したもの (それぞれの血漿中核酸濃度として1 μg/mL) を第一節で検討した検出法で測定した。

＜結果＞

最初に、LNA-A (14)及びLNA-A (13)をLC-MSにて測定した際のマススペクトルを検証した (Figure 4)。LNA-A (14)及びLNA-A (13)のマススペクトルにおいても、多数の多価イオンが認められたが、LNA-A同様に6価のイオンが感度よく検出された。

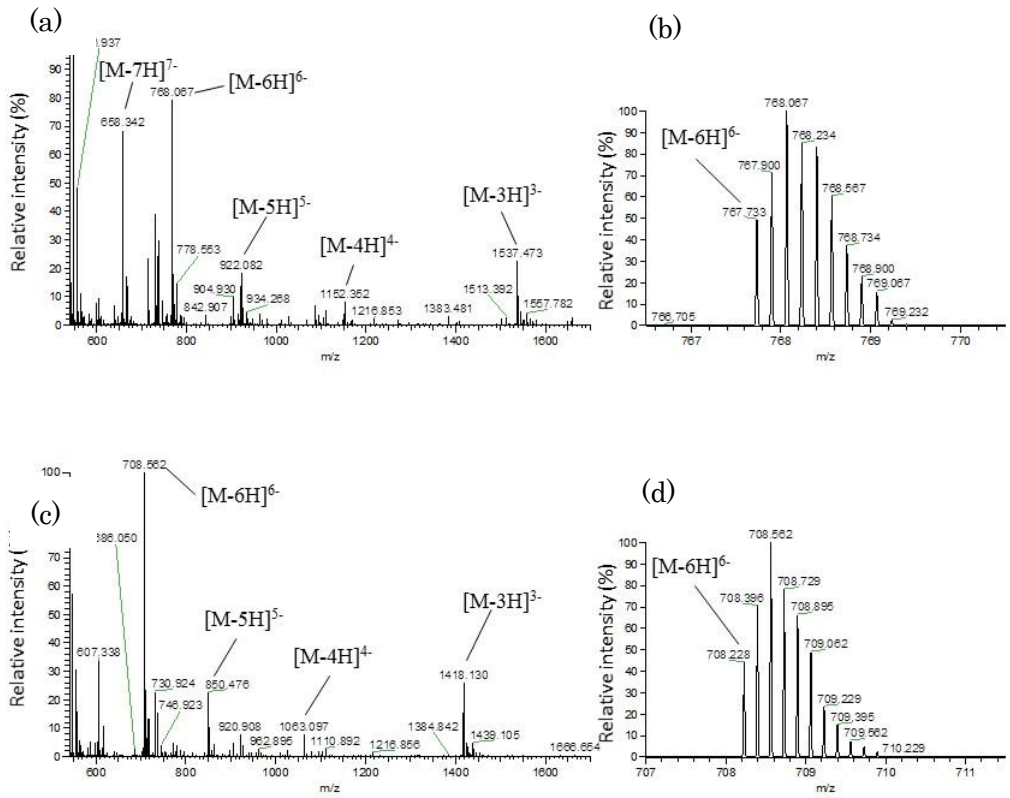


Figure 4. ESI-mass spectra of LNA-A (14) in mouse plasma of the mass range of *m/z* 540-1700 (a) and expanding mass range of its $[M-6H]^{6-}$ group (b). ESI-mass spectra of LNA-A (13) in mouse plasma of the mass range of *m/z* 540-1700 (c) and expanding mass range of its $[M-6H]^{6-}$ group (d).

続いて、LNA-A (14)及びLNA-A (13)添加血漿を第一節の方法で検出可能かを検討した。LNA-A (14)またはLNA-A (13)添加血漿から得られたTICクロマトグラムから、6価のモノアイソトピックイオンである*m/z* 767.733 (LNA-A(14)) 及び*m/z* 708.228 (LNA-A (13)) を中心に、10ppmの質量範囲で抽出しクロマトグラムを描かせた。その結果、LNA-A (14) (溶出時間14.2分) 及びLNA-A (13) (溶出時間13.8分)もLNA-A同様明瞭な1本のピークが検出された (Figure 5)。したがって、LNA-Aの代謝物においても、LNA-Aと同じ前処理で測定可能であることが示唆された。なお、これら代謝物においても6価のモノアイソトピックイオンをモニターイオンとして選択した。

一方、前処理中にLNA-Aが分解し、LNA-A (14)及びLNA-A (13)に変換される可能性が懸念された。しかし、LNA-A単独添加血漿を測定したところ、LNA-A (14)及びLNA-A (13)のモニターイオンに妨害ピークは検出されなかった (Figure 5 (a))。したがって、この前処理中にLNA-Aは分解しないものと判断した。同様にLNA-A (14)及びLNA-A (13)添加血漿からも、他の2化合物のモニターイオンへの妨害ピークの検出は認められなかった (Figure 5 (b), (c))。また、3化合物を混合添加した血漿からは、塩基鎖の短いものから順に溶出され、それぞれ明瞭なピークとして検出された。以上の結果から、一度の測定で、LNA-Aとその代謝物が同時に検出できることが確認できた (Figure 5 (d))。

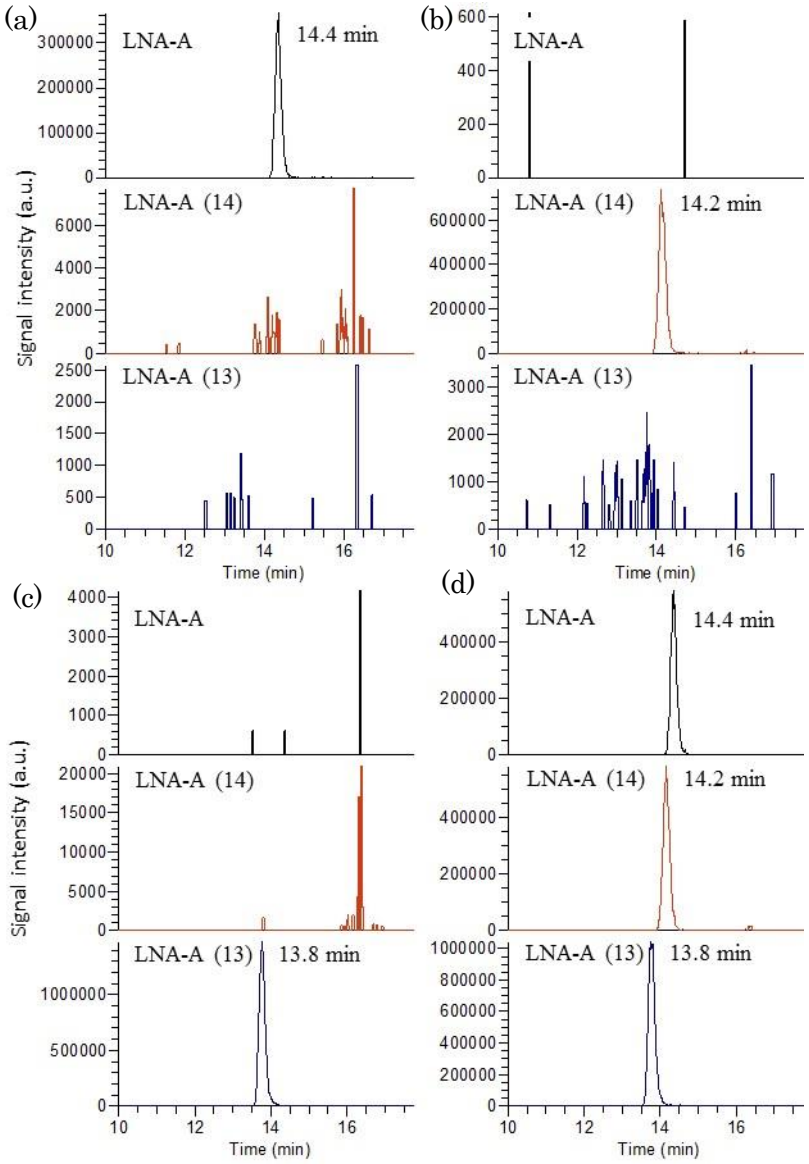


Figure 5. Detection of LNA-A, LNA-A (14), and LNA-A (13) in mouse plasma with LNA-A (*m/z* 825.239), LNA-A (14) (*m/z* 825.239), and LNA-A (13) (*m/z* 708.228) added alone or mixed. LNA-A spiked mouse plasma (a), LNA-A (14) spiked mouse plasma (b), LNA-A (13) spiked mouse plasma (c), and all spiked mouse plasma (d). a.u. arbitrary unit.

第三節 LNA-A投与マウス血漿中のLNA-A及びその代謝物の検出

第二節までに検討した方法を、実際にLNA-Aを投与したマウスの血漿中LNA-AのLC-MS測定に応用した。

＜方法＞

- **LNA-Aのマウスへの投与と採血**

6週齢のICR雄性マウスに、LNA-A溶液を10 mg/kgで尾静脈へ単回投与し、投与後0.5時間、 2時間及び4時間後に下大静脈から血液を採取し、遠心分離にて血漿を調製した。なお、コントロールとして、雄性マウスに滅菌水を同様に静脈内投与した2時間後に採取した血漿を用いた。

これら得られた血漿について前節までに検討したLNA-A測定方法を用いて解析を行った。また、溶出時間確認試料として、LNA-A、LNA-A (14)及びLNA-A (13)をブランク血漿に添加混合した試料も調製した。

＜結果＞

マウス血漿の各化合物の抽出イオンクロマトグラムをFigure 6に示すが、LNA-A投与後0.5時間及び2時間のマウス血漿において、LNA-A、LNA-A (14)及びLNA-A (13)のモニターイオンに明瞭なピークが検出された (溶出時間14.4分、14.2分及び13.8分)。また投与後4時間のマウス血漿においても強度は弱いが、これら3化合物のモニターイオンにピークが検出された。これら得られたピークは、溶出時間確認試料から検出されたLNA-A、LNA-A (14)及びLNA-A (13)の溶出時間 (14.4分、14.2分及び13.8分) と一致したことから、これらのピークはLNA-A、LNA-A (14)及びLNA-A (13)と同定された。なお、滅菌水を投与したコントロールマウス血漿からは、LNA-A、LNA-A (14)及びLNA-A (13)のモニターイオンにこれらの検出に妨害を与えるようなピークは検出されなかった。本結果から、LC-MSを用いることで、LNA-A投与マウス血漿中からLNA-Aとその代謝物が同時に検出できることが確認できた。

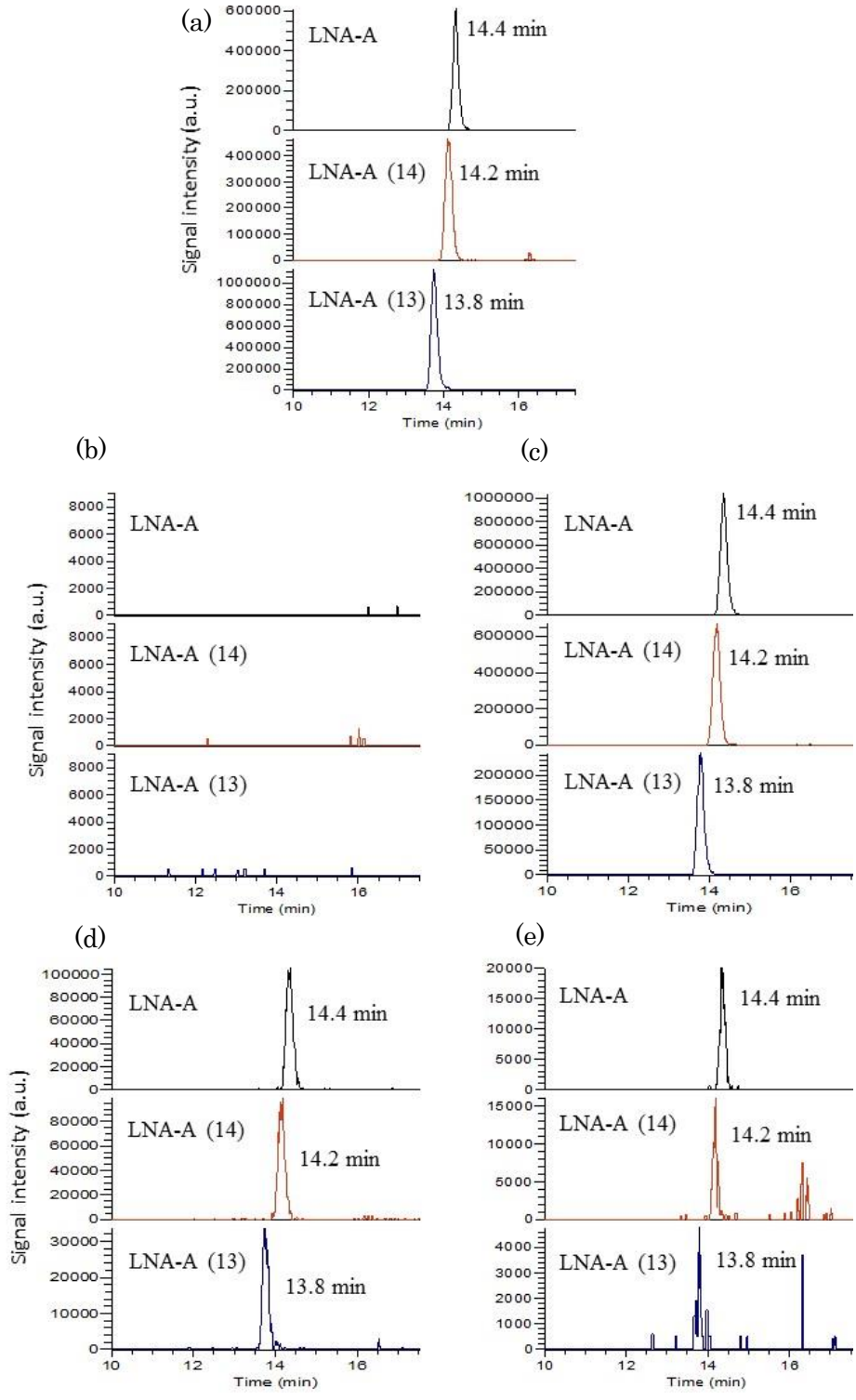


Figure 6. Measurement of mouse plasma after intravenous injection of LNA-A. Extracted ion chromatogram of LNA-A, LNA-A (14), and LNA-A (13) spiked mouse plasma (a), control mouse plasma (b), LNA-A dosed mouse plasma after 0.5 h (c), 2 h (d), and 4 h (e). a.u. arbitrary unit.

第四節 小括

本章では、質量分析を用いた核酸医薬品の動態解析を目的として、近年核酸分析への応用が広がりつつあるLC-MSの、解析技術としての有用性を確認した。血漿中に存在するLNA-Aとその代謝物をLC-MSにて測定するための、LNA-Aの抽出条件及び測定条件を検討した。LNA-A投与マウス血漿からのLNA-Aとその代謝物の抽出方法として、Phe-Chl抽出と固相カラムによる精製を組み合わせた2段階の前処理法を採用するとともに、LC-MS分析には逆相カラムとイオンペア試薬を移動相に添加した方法を採用することで、LNA-Aとその代謝物であるLNA-A(14)及びLNA-A(13)との同時検出が可能となった。これら代謝物とLNA-Aとを区別して同時に検出することは、目的核酸医薬品をハイブリダイズして検出するLBA法を用いた場合には困難である。本章における検討結果により、LC-MS法は核酸医薬品の代謝物評価として有用であることを確認することができた。一方で、このような血漿中の核酸医薬品評価を行うには、2段階の前処理操作が必要であること、また多数の多価イオンの中から適切なイオンの選択が必要であることが同時に確認できた。

本章ではLC-MSを用いることにより、核酸医薬品においても、測定対象中の投与核酸とその代謝物の解析が可能なことを示した。次に、これら検出されたものが、組織内においてどの様に分布しているかを明らかにしようと考えた。しかし、組織内分布の解析を行いたい場合は、LC-MSでは不十分である。組織中の核酸医薬品をLC-MSで評価しようとした場合、血漿と同様に、標的組織から投与核酸を抽出する必要がある [34]。その際、標的組織をホモジネートにする必要があり、そのことで組織中の核酸医薬品の分布情報は失われてしまう。また、血漿と比較し臓器等の組織では様々な生体成分が存在するため、前処理操作はさらに煩雑

になる可能性が考えられる。このような抽出操作がある以上、LC-MSで分布評価を行うことは不完全であると言わざるを得ない。したがって、投与核酸の組織内分布を解析するためには、その位置情報を保持したまま、投与核酸とその代謝物の検出が可能な新規手法の開発が必要である。次章において、その手法の開発を述べる。

第二章 MALDI-IMS を用いた LNA-A の組織内分布評価法の開発

近年、LC-MS を用いて核酸医薬品の代謝物評価を行ったという報告がなされつつあり、今後その需要は大きくなると予測される [30, 31]。しかし、前章で示したように、LC-MS で測定を行うためには測定対象から目的物を抽出する操作が必要であった。ターゲット組織の解析を行うには、最初に組織をホモジナイズにする必要があり、その際に、その組織内分布の情報が失われてしまう。

一般的に、医薬品開発において化合物の組織分布評価には、放射標識された化合物を試験動物に投与し、各組織または全身切片から得られる放射能を検出する、組織溶解法または定量的全身オートラジオグラフィー法 (以降 QWBA 法) が使用されている。QWBA 法は切片上から直接目的放射能の検出が可能なため、投与化合物由来放射能の正確な位置情報を維持したまま分布評価ができる手法である。医薬品評価においてこれらの方法は十分に実績があり、薬物動態解析における分布評価試験においては必要不可欠な手法である [37]。しかし、これら標識体を用いる方法は、①投与薬剤とその代謝物の区別ができない欠点がある。また、前章の結果から、LC-MS 法は投与薬剤と代謝物との区別はできるが、その測定には抽出操作が必要なため、②正確な位置情報が失われてしまうという欠点がある。これらの欠点を補うには、標識体を必要とせず、正確な位置情報を維持したまま切片から直接目的化合物が検出でき、さらに代謝物との同時検出も可能な手法が必要である。

その手法として本研究では MALDI-IMS に注目した。MALDI-IMS とは、対象組織切片にイオン化に必要なマトリックスを均一に塗布し、その表面にレーザーを照射すると、レーザー照射部位においてマトリックスとともにイオン化した成分のスペクトル解析が可能な技術である [21-23]。つまり、目的化合物及び

その代謝物をイオン化させることができればその位置情報を維持したまま、同時かつ分離して解析することが可能となる。これまで MALDI-IMS を用いて、タンパク質、脂質または低分子化合物について解析を行ったという報告はあるが[21-27]、核酸医薬品については成功例の報告がない。

そこで本章ではこの MALDI-IMS を用いた LNA-A とその代謝物の組織内分布評価方法の開発を行った。

第一節 MALDI-MS による LNA-A の検出マトリックスの選択

核酸に限らず、化合物を MALDI-MS にて測定する場合、その化合物をイオン化させるためのマトリックスの選択は必要不可欠であり、最初に行う検討である。現在、様々な種類の MALDI-MS 用のマトリックスが市販されているが、それらを測定対象化合物に応じて選択する必要がある [23]。Table 2 に主なマトリックスの種類と特徴を示す。近年、MALDI-IMS で使用実績の高いマトリックスは 2,5-dihydroxybenzoic acid (以降 DHB) とα-cyano-4-hydroxycinnamic acid (以降 CHCA) であるが [21-27]、これらは低分子や脂質及びタンパク質の測定に用いられる。本研究では、過去核酸に対して使用された報告がある、3-hydroxypicolinic acid (以降 3-HPA)と 9-aminoacridine (以降 9-AA) を選択し比較した [38, 39]。

Table 2. Principal matrix list

Matrix name	Application
2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)	protein, peptide, lipids, low molecule compound
9-aminoacridine (9-AA)	negative charge ion, lipids, nucleotide
α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)	protein, peptide
Sinapinic acid (SA)	protein, peptide
3-hydroxypicolinic acid (3-HPA)	oligonucleotide

＜方法＞

- 測定試料の調製

滅菌水に 100 μg/mL の濃度になるように希釈した LNA-A 溶液 2 μL にイオン交換樹脂を添加し、混合撹拌することで脱塩した。脱塩後の LNA-A 溶液 1 μL を 3-HPA 溶液 (3-HPA 10 mg/mL, クエン酸 1 mg/mL 濃度で 60%アセトニトリルに溶解) または、9-AA 溶液 (5 mg/mL, クエン酸 1 mg/mL 濃度で 60%アセトニトリルに溶解) 2 μL と混合し、その 1 μL を MALDI-MS 測定専用プレートであるアンカーチップ上にて室温で乾燥させた。

- MALDI-MS による測定

MALDI-MS 測定はリニアモードで行い、陰イオン検出のスキャン範囲 *m/z* 3000-9000 を選択し、レーザー強度を 85%に設定した。スペクトルデータは、300 ショットを積算したものを取得した。

なお、本研究ではブルカーダルトニクス社の MALDI-TOF/TOF-MS である Ultraflex II を用いたが、本装置の分解能に制限があるため、モノアイソトピックイオンのみを選択し検出させることができない。そこで、モノアイソトピックイオンと他 LNA-A の同位体イオンを含むイオン群 (*m/z* 4959±2) を LNA-A の$[M-H]^-$として検出した。

＜結果＞

3-HPA をマトリックスとして用いた場合、LNA-A 由来の$[M-H]^-$スペクトルである *m/z* 4959 のスペクトルが検出されたが (Figure 7 (a))、9-AA を用いた場合は LNA-A 由来のスペクトルが全く検出されなかった (Figure 7 (b))。同濃度の LNA-A を用いて検討したが、マトリックスを適切に選択しなければ、目的化合物が全くイオン化しなくなることが判明した。したがって本研究では 3-HPA を LNA-A

の検出のマトリックスとして選択した。

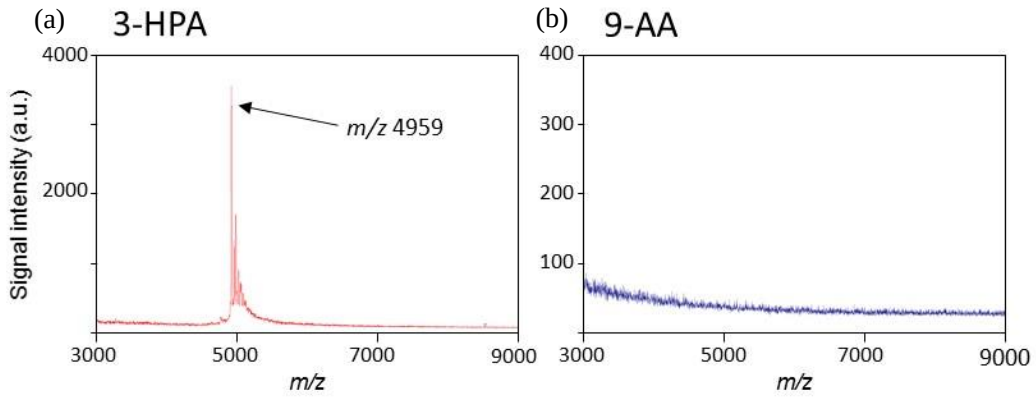


Figure 7. MALDI mass spectra of LNA-A using 3-HPA (a) or 9-AA (b) as matrix. a.u. arbitrary unit.

第二節 MALDI-IMS 測定に向けた前処理法の検討

核酸を MALDI-MS で測定する際に、明瞭なスペクトルを検出するためには、たとえ HPLC で精製した高純度な合成標準品であっても、測定前に核酸溶液をイオン交換樹脂などで丁寧に脱塩精製してから、マトリックスと混合させる必要がある [40]。さらに、生体成分中から目的とする核酸を検出する場合、生体成分由来の夾雑物の影響を可能な限り低くするための処理をする必要がある。それに加えて、IMS 解析を行う場合は、組織切片などの複雑なサンプルに対して直接レーザーを照射するために、抽出操作やイオン交換樹脂による精製は適用できず、組織中に存在する薬物の分布情報を維持したまま、極力 LNA-A 検出に影響を与える成分を除去する方法の構築が必要となる。一方で IMS の実験操作は、①測定対象の切片を調製する、②調製切片にマトリックスを均一に塗布する、③MALDI-MS 装置で測定する、以上の 3 ステップしかないなかで、測定可能な

条件を見出さなくてはならない。核酸の標準品をイオン交換樹脂で精製するのは、マトリックスとの混合前であることを考慮すると、LNA-A 検出に影響を与える成分を除去するポイントは、切片調製後、マトリックスを塗布する前に行うことが最適であると考えられる。切片上のタンパク質やペプチドの IMS 解析の際に、脱塩を目的に切片を洗浄することがある [41, 42]。本節では、切片を様々な溶液で洗浄し、最適な前処理法を検討した。

第一項 マウス肝臓切片表面に添加した LNA-A の検出を用いた前処理法の検討

最初に、表面に LNA-A を添加したマウス肝臓切片を用いて洗浄条件を検討した。本研究で検討した洗浄溶液は、タンパク質やペプチドを MALDI-IMS 解析する際に行う洗浄方法を参考に選択した [41, 42]。この時の洗浄条件を Table 3 に示す。

Table 3. Overview of washing methods

Washing method	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
A	70% EtOH	EtOH	Carnoy's solution	Acetone
B	70% EtOH	EtOH	Carnoy's solution	
C	no washing			
D	70% EtOH	EtOH		
E	70% EtOH	EtOH	Aceton	

The samples were immersed each solution for 60s.

EtOH: ethanol
Carnoy's solution: EtOH-chloroform-acetic acid (6/3/1, v/v/v)

＜方法＞

- マウス肝臓切片上の LNA-A の IMS 検出試料の調製

ライカ社製のクライオスタット (CM1860) を用いて、チャンバー内温度を-20 度に設定し、凍結した ICR マウスの肝臓を切片厚 12 μm にて酸化インジウムスズでコーティングしたスライドガラス (以降 ITO-slide glass) に調製した。調製した切片を室温でデシケーター中にて乾燥させ、LNA-A (100 μg/mL) 溶液 0.5 μL を切片上に添加し、再度デシケーター中にて乾燥させた。

- 調製切片の洗浄

切片の洗浄は、Table 3 に示した 5 パターンの洗浄方法を用いた。ITO-slide glass 上に調製した切片を Table 3 に示した各洗浄溶液にスライドガラスごと 60 秒間浸した。60 秒間浸した後は速やかに次の洗浄溶液に浸した。洗浄過程終了後は、室温にてデシケーター中で表面に付着した溶媒を乾燥させた。

- マトリックスの塗布

3-HPA マトリックス溶液 3 mL を、前処理が完了した切片に、自動マトリックス塗布装置であるブルカーダルトニクス社の ImagePrep を用いて均一に塗布した。

- MALDI-IMS 測定

MALDI-IMS 測定はリニアモードで行い、陰イオン検出のスキャン範囲 *m/z* 3500-7500 を選択し、レーザー強度を 90%に設定した。レーザーを 1 スポット 600 回、200 μm 間隔で照射し、得られたデータの画像解析及びスペクトル解析は、ブルカーダルトニクス社の flexImaging 4.0 を用いて TIC モードで補正し行った。なお、各 Figure 中の LNA-A のスペクトルは、IMS 測定にて得られた LNA-A 画像中の全スペクトルの平均を示す。以降、同様に解析した。

＜結果＞

LNA-A 溶液を表面に添加したマウス肝臓切片に対して、Table 3 に示す各洗浄方法を適用し、IMS 測定した結果を Figure 8 に示した。洗浄操作を行わなかった場合、LNA-A のスペクトルは検出されなかったが、洗浄を行うことによって、LNA-A のスペクトルが検出された (Figure 8 (a))。この時の LNA-A の$[M-H]^-$である m/z 4959 を抽出し解析すると、LNA-A 添加部位を画像化させることができた (Figure 8 (b))。洗浄操作によって添加した LNA-A が組織中に滲み出し、その位置情報を消失してしまう可能性が懸念されたが、洗浄後に画像化された組織切片解析の結果において、LNA-A の添加部位と検出部位が一致していた。したがって、本検討にて実施した洗浄作業では、LNA-A の組織への滲み出しがないことが明らかになった。本結果から、洗浄条件を最適化することで、位置情報を失うことなく、LNA-A の検出を妨害する成分を除去できることが示唆された。なお、切片上のタンパク質の IMS 解析を行う際は、水を用いて洗浄することがあるが [42]、核酸は水に溶解し、位置情報が失われてしまう可能性が示唆されたため、不適と考え、水による洗浄は実施しなかった。

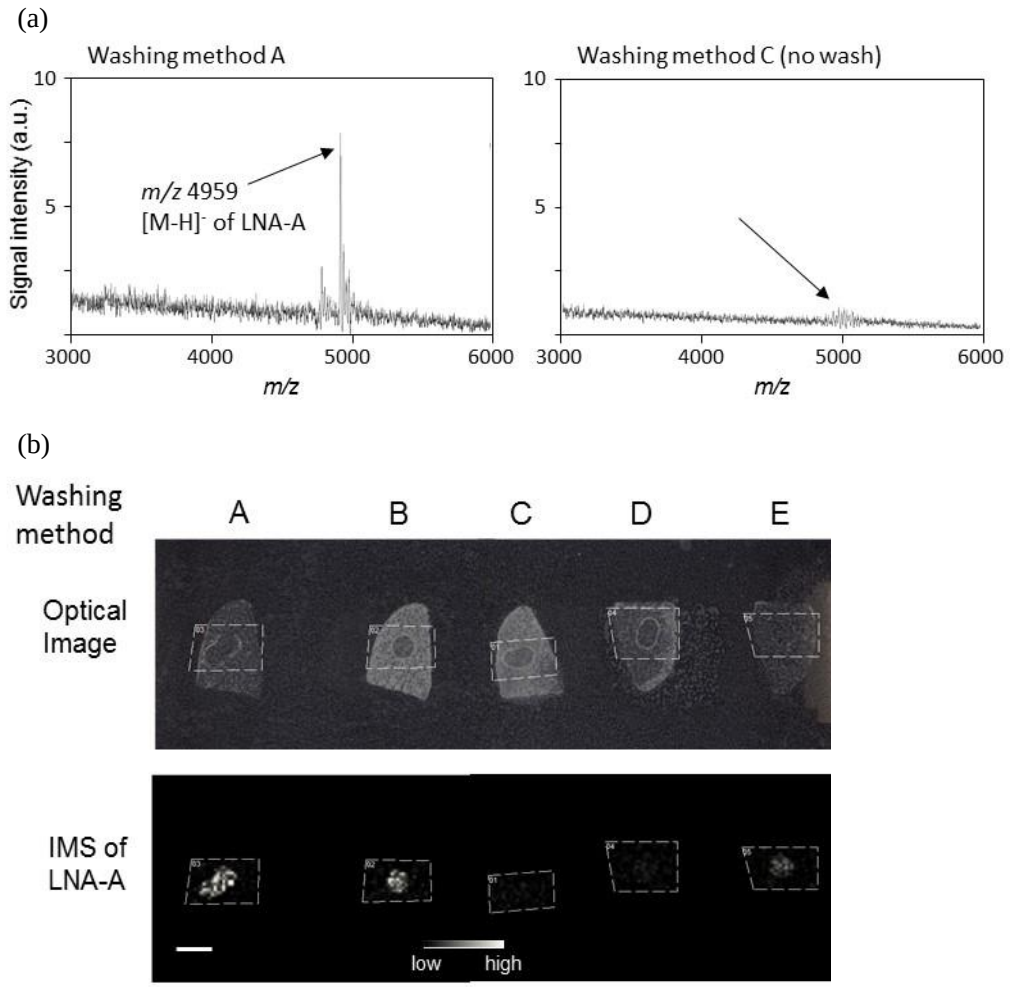


Figure 8. Relationship between washing methods and detection sensitivity of LNA-A on liver section. Applied washing methods A-E are indicated in Table 3. (a) Typical mass spectra of liver sections applied washing method A and method C (no wash). (b) Images of liver sections with LNA-A on the surface (optical image) and IMS of LNA-A by extracting *m/z* 4959. The part surrounded by the white broken line is the measurement site. a.u. arbitrary unit. Scale bar: 2.5 mm.

第二項 マウス臓器ホモジネート中の LNA-A の検出を用いた前処理法の検討

第一項の検討は、予め調製しておいた組織切片上に、LNA-A を添加した試料を用いた。しかし、レーザーによって切片表面からイオン化されている LNA-A を検出しているに過ぎない可能性もあることから、組織内部に含まれる核酸分

子の検出が可能かを検討する必要があると考えた。そこで、LNA-A を添加した組織ホモジネートを調製し、それを切片にしたものをから LNA-A を検出させることで、実際の臓器切片に近い状態で評価できると考えた。

＜方法＞

- マウス組織ホモジネート中の LNA-A の IMS 検出試料の調製

ICR マウスの腎臓または肝臓に組織重量の 0.5 倍量の生理食塩水を添加しホモジネート状にした。調製したホモジネートに LNA-A 溶液を添加混合し LNA-A 添加ホモジネートを調製 (LNA-A 濃度 100 μg/mL) した。腎臓ホモジネートに LNA-A 溶液の代わりに精製水を添加したコントロールホモジネートも調製した。調製した各ホモジネートを型に流し込み-80 度で凍結させ、ホモジネートブロックとした。各ホモジネートブロックをクライオスタットにて厚さ 12 μm で切り出し、ITO-slide glass 上にホモジネート切片として調製した。調製したホモジネート切片は室温でデシケーター中にて乾燥させた。

- 調製切片の洗浄、マトリックスの塗布及び MALDI-IMS 測定

前項と同じ方法にて実施した。

＜結果＞

最初に LNA-A 添加マウス腎ホモジネート切片を用いて Table 3 の洗浄効果を検討した。その結果、マウス腎ホモジネート中の LNA-A においても、洗浄操作を行うことによって、そのスペクトルの検出が可能となった (Figure 9 (a))。検出された LNA-A のスペクトルで画像解析を行うと、洗浄方法の違いによって強度の異なる画像が得られた (Figure 9 (b))。各洗浄操作を行ったときの LNA-A の検出感度を比較するため、m/z 4959 のシグナル強度をグラフ化したものを Figure 9

(c) に示すが、洗浄条件 A を適用した場合の検出感度が最も高かった。70%エタノールの洗浄後、再度 100% エタノールで洗浄する過程は、切片の固定と脱塩効果があることが知られている。またカルノア溶液 (エタノール/クロロホルム/酢酸，6:3:1, v/v/v) は切片からの脂質物質除去に優れており、アセトンは最後に表面に残留した洗浄溶媒を洗い流すことができる [42]。すなわち、これらの洗浄を行うことによって、ホモジネート切片中の LNA-A の検出を阻害する塩・脂質等の除去が可能となることが判明した。したがって洗浄条件 A を、前処理の洗浄方法として選定した。また、LNA-A のスペクトルから *m/z* 4959 のほかに $[M+22]^-$、$[M+38]^-$などのスペクトルが検出されていた (Figure 9 (a))。これらのイオンは前処理によって除去できなかった塩などが、LNA-A にアダクトして生成されたと考えられるが、より効果的な前処理法の開発ができればこのようなアダクトイオンが$[M-H]^-$ (*m/z* 4959) に集積され、LNA-A の検出感度の更なる向上も考えられる。

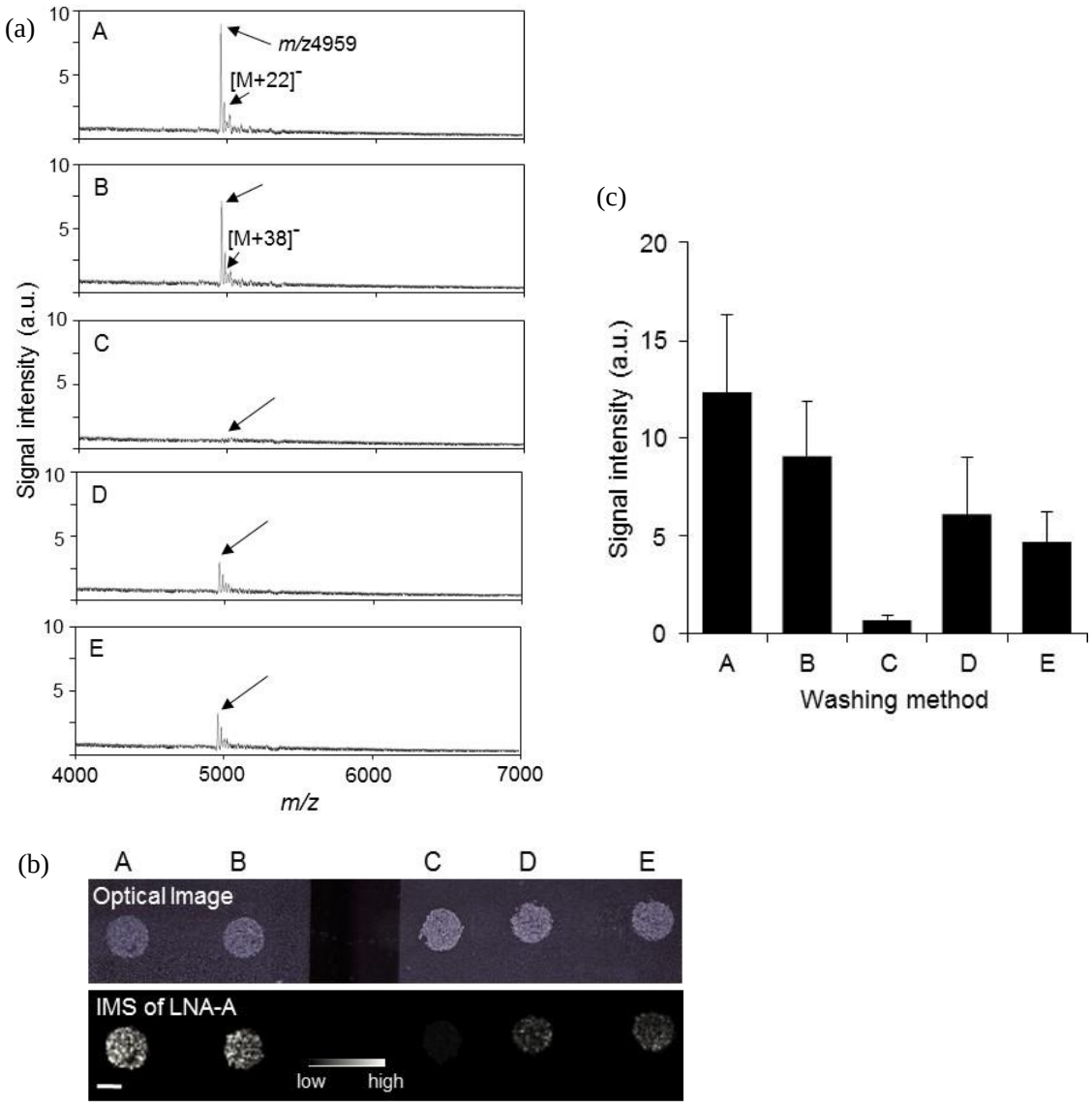
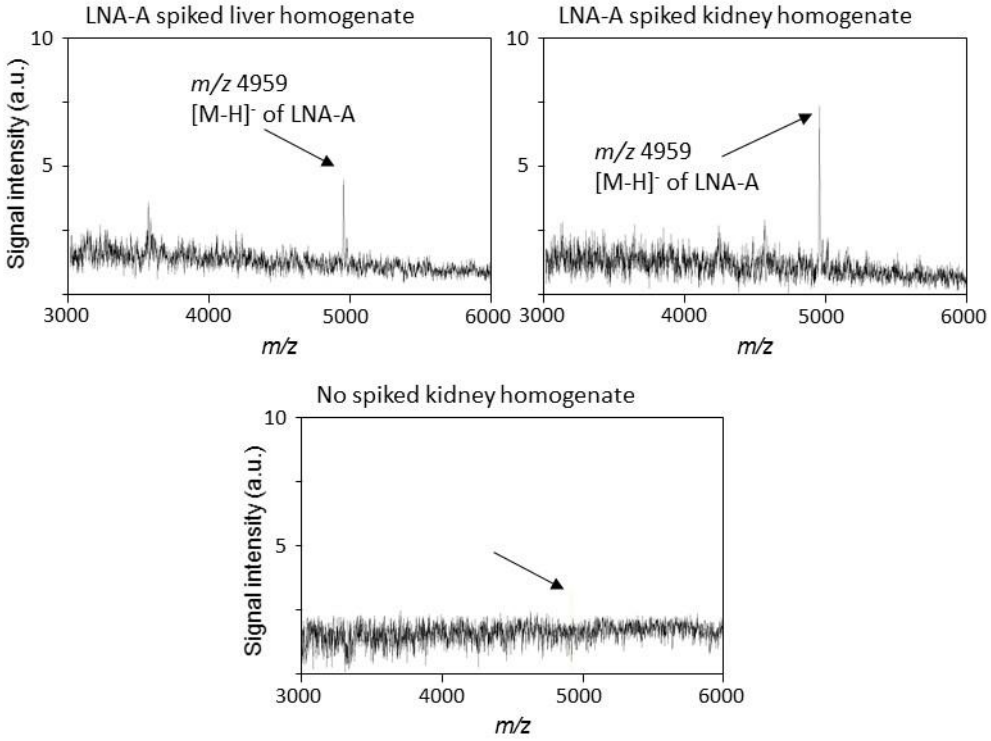


Figure 9. Relationship between washing methods and detection sensitivity of LNA-A in kidney homogenate section. Applied washing methods A-E are indicated in Table 3. (a) Typical mass spectra of homogenate sections applying each washing method. (b) Typical images of homogenate sections (optical image) and IMS of LNA-A by extracting *m/z* 4959. (c) Bar diagram of signal intensity of LNA-A for the five applied washing methods. All error bars derive from four times measurements for each washing method. Data represent mean values ± SD. a.u. arbitrary unit. Scale bar: 2.5 mm.

続いて、本処理法の臓器による検出感度の違いを検討した。その結果、LNA-A 添加肝ホモジネートからも腎ホモジネート同様 LNA-A のスペクトルが認められ、LNA-A を添加していないホモジネート部分には検出を妨害するようなスペクトルは検出されなかった (Figure 10 (a))。また、肝ホモジネート中の LNA-A の検出感度は、腎ホモジネートと比較して低い傾向が認められた。これは、肝臓と腎臓の構成成分の違いによるイオンサプレッションの差と考えられる。検出された *m/z* 4959 を選択し画像を描かせると、測定切片中の LNA-A 添加肝ホモジネート及び LNA-A 添加腎ホモジネート部位のみに LNA-A が分布している画像が得られた (Figure 10 (b))。この結果から、本節で開発した前処理法は、肝ホモジネート中の LNA-A に対しても腎ホモジネートと同様に適用でき、LNA-A 分布解析が可能であることが判明した。

(a)



(b)

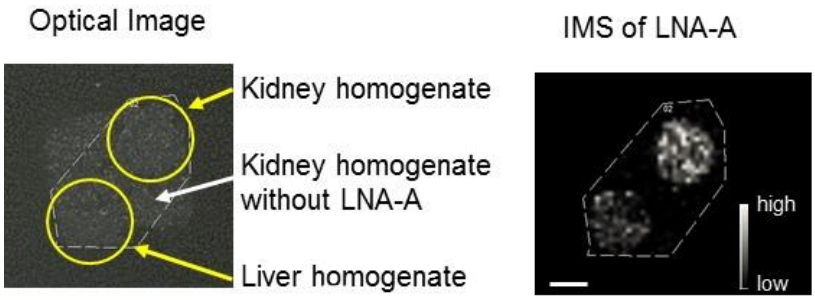


Figure 10. Comparison of LNA-A detection in kidney homogenate section and liver homogenate section. (a) Typical mass spectra of LNA-A spiked liver and kidney homogenate section and kidney homogenate section without LNA-A. (b) Images of frozen homogenate sections (optical image) and IMS of LNA-A by extracting *m/z* 4959. The part surrounded by the white broken line is the measurement site. a.u. arbitrary unit. Scale bar: 2.5 mm.

第三節 検出感度の向上を目的とした検討

MALDI-IMS に限らず、どのような測定法の開発を行うにしても、その検出感度は高ければ高いほど、得られる情報量が多くなり、それだけ有益なデータを得られる可能性が広がる。本節では前節までに開発してきた方法から、更なる検出感度の向上を目指した方法を検討した。

第二節では、組織中の LNA-A 検出を妨害する可能性のある成分の除去方法を検討した。MALDI-IMS 操作において、次に検出感度を向上させるために手を加えられるポイントは、マトリックス塗布操作の部分である。MALDI-MS の検出感度に直接影響を与える要因はマトリックスの結晶状態であるため [43]、この部分の改善は検出感度に大きく貢献すると考えられる。そこで本節では、マトリックス塗布方法の改善及びマトリックス溶液への添加物を検討した。

第一項 マトリックス塗布法の検討

MALDI-IMS 測定のマトリックス塗布操作として 2 段階の塗布法を用いることで、目的物の検出感度が向上するという報告がある [43, 44]。近年用いられている 2 段階マトリックス塗布法とは、まず、蒸着装置を用いて昇華させた微細なマトリックスを、切片の表面に付着させ、その上にエアブラシを用いてマトリックスを塗布する方法である。先に付着した微細なマトリックス粒子が核となり、後から塗布されたマトリックスの結晶の形成を補助し、質の良い均一な結晶の形成が可能となる。マトリックスの結晶状態は直接検出感度に影響を与えるため、本法を応用すれば、検出感度の向上が期待できると考えた。

＜方法＞

- 2 段階マトリックス塗布法の検討試料の調製

Table 3 の洗浄方法 A にて洗浄した測定対象切片に、3-HPA 溶液 0.5 mL をエアブラシを用いて均一に噴霧後 (切片からの距離 30 cm から、0.5 mL をスライドガラス全体に 10 分かけてすべて塗布できるスピードに調節)、ImagePrep を用いて 3-HPA 溶液を塗布した。

- MALDI-IMS 測定

MALDI-IMS 測定は、第二節で用いた条件を使用し測定を行った。

＜結果＞

最初に、先に報告がある蒸着装置を用いた 2 段階マトリックス塗布法の適用を考えたが [44]、本研究で使用したマトリックスである 3-HPA は、蒸着装置を用いて昇華させることができない。2 段階マトリックス塗布法の原理は、切片表面に細かい結晶の核を形成させ、その核が後のマトリックス結晶の形成を補助すると考察される。したがって、1 段階目に粒子の小さな結晶を、2 段階目にそれよりも粒子の大きな結晶を形成させることができれば、同様の効果が得られると考えられる。そこで、ImagePrep でのマトリックス結晶よりも微細なマトリックス結晶の調製が可能な、エアブラシを用いることにした。エアブラシにてマトリックスを塗布し、まず結晶の核を形成させ、そこに ImagePrep を用いてマトリックスを塗布する、新たな 2 段階マトリックス塗布法を考案した。

この新規 2 段階塗布法により LNA-A 検出感度が向上するかを、肝臓切片上の LNA-A 及び LNA-A 添加腎ホモジネート切片を用いて検討した。ImagePrep のみの 1 段階で塗布し IMS 測定した結果と、新規 2 段階塗布法適用後、IMS 測定した結果を比較すると、肝臓切片上に添加した LNA-A 及び腎ホモジネート中の

LNA-A の両方において明らかな検出感度の向上が認められた (Figure 11)。この結果から、本研究で考案した新規 2 段階マトリックス塗布法でも検出感度が向上することが示された。

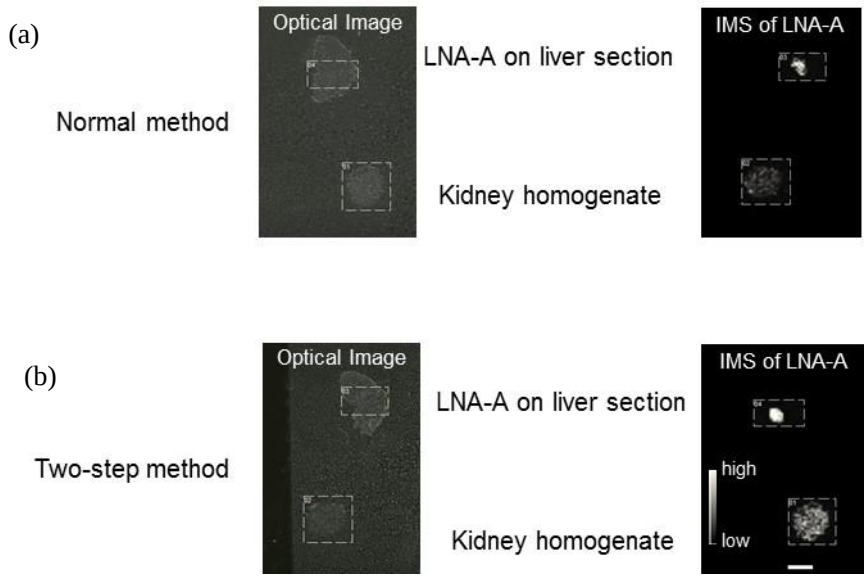


Figure 11. Improvement of detection sensitivity of LNA-A by two-step method developed in this study. Images of liver section and kidney homogenate sections (optical image) and IMS of LNA-A by extracting *m/z* 4959 applying normal method (a) and two-step method (b). The part surrounded by the white broken line is the measurement site. a.u. arbitrary unit. Scale bar: 2.5 mm.

第二項 マトリックス溶液への添加物の検討

検出感度の向上が期待されるもう一つの方法として、マトリックス溶液への添加物について検討した。すでに 3-HPA 溶液にクエン酸を添加しているが、MALDI-MS で核酸を測定する際、クエン酸の添加によってその検出感度が劇的に改善することは古くから報告がある [45]。LC-MS で核酸を測定する際、移動相に TEA を添加することにより、検出感度が上昇することはよく知られている [36]。MALDI-IMS 測定においても、このようなアミンを添加することで検出感

度が向上するのではと考え、TEA、 ジメチルアミン (以降 DMA) またはメチルアミン (以降 MA) を 3-HPA 溶液に添加し LNA-A の検出感度の改善効果を検討した。

＜方法＞

- アミン類添加マトリックスの評価試料の調製

3-HPA 溶液に最終濃度が 1%となるように TEA、DMA または MA を添加し調製したアミン添加 3-HPA 溶液 0.5 mL を、前処置が完了した測定対象切片にエアブラシを用いて均一に噴霧した。アミン添加濃度検討用として、TEA 濃度を 0.1-10%まで添加した 3-HPA 溶液も調製し、測定対象切片にエアブラシにて噴霧した。エアブラシ操作完了後、ImagePrep を用いて 3-HPA 溶液を塗布した。

- MALDI-IMS 測定

MALDI-IMS 測定は、第二節で用いた条件を使用し測定を行った。

＜結果＞

最初に、本節で考案した 2 段階マトリックス塗布法の、エアブラシと ImagePrep に使用する 3-HPA 溶液の両方にアミン類を添加し、測定切片に塗布した。しかし、アミン類を添加したことにより、塗布した溶媒が全く蒸発せず、3-HPA の結晶が形成されなかった。そこで、第 1 段階目のエアブラシで塗布する 3-HPA 溶液にのみアミン類を添加し、第 2 段階目の ImagePrep には通常の 3-HPA 溶液を用いて噴霧する方法を検討した。この方法を用いた場合、切片表面に 3-HPA の結晶は形成されており、MALDI-IMS 測定が可能となった。Figure 12 にアミン類添加による検出感度の向上の検討結果を示す。ImagePrep 操作のみで測定した場合と比較してアミンの添加により 2 倍程度 LNA-A の検出感度が改善した

(Figure 12 (c))。この時、添加するアミンの種類 (TEA、DMA または MA) によって LNA-A の検出感度に差は認められなかった。また、アミン類を添加していない 3-HPA 溶液をエアブラシで塗布した結果と比較しても、検出感度の向上が認められ、アミン添加による検出感度の改善が示された。アミン類添加によって得られた LNA-A 由来のスペクトルと、添加していないときの LNA-A 由来のスペクトルと比較すると、そのスペクトルパターンは、アミン類添加の有無によって変化しなかった (Figure 12 (a))。ステロイドを IMS 解析する際、ジラール T 試薬というマトリックスとは異なる物質を切片に噴霧し、測定対象ステロイドと添加試薬との誘導体を形成させ、検出感度を向上させる手法がある [46]。アミン類を添加することによって、このような誘導体が形成 ($[M+TEA]^-$など) され、検出感度が向上したのではと考えたが、本結果はそれを否定するものであった。本節の初めにも述べたが、マトリックスの結晶の状態は検出感度に直接影響する。エアブラシを用いてアミン類添加マトリックスを塗布した際、切片表面上に付着したマトリックス溶液は完全には蒸発せず、表面に残留する。ここに、ImagePrep によって新たな 3-HPA 溶液が塗布され、3-HPA の結晶が形成される。つまり、このような通常とは異なる結晶形成の過程が、3-HPA の結晶を LNA-A の検出に適した状態に改善し、検出感度の向上という結果につながったと考えられる。しかし、この感度改善のメカニズムは不明であり、更なる検討が必要である。

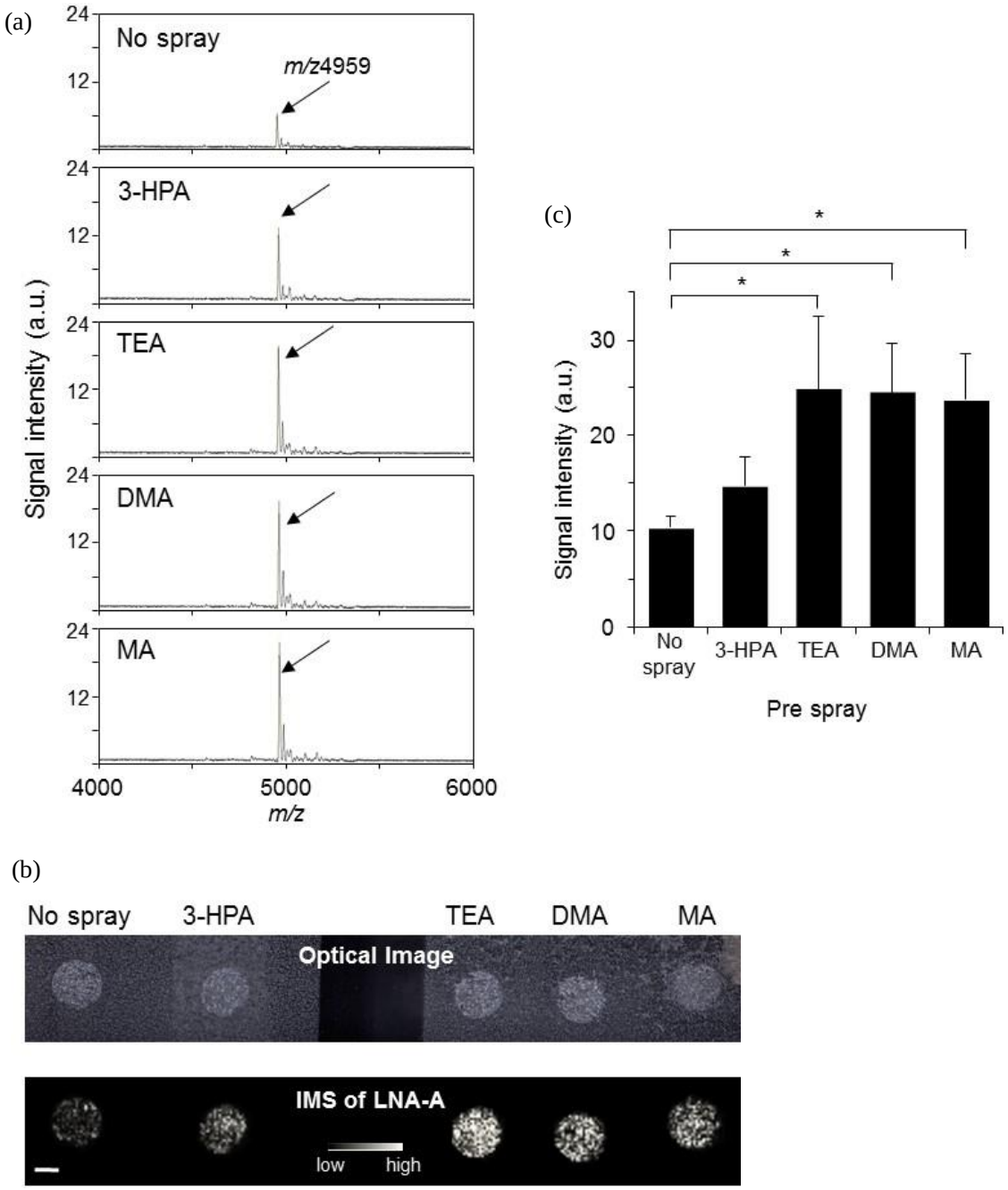


Figure 12. Improvement of detection sensitivity of LNA-A by addition of amines to 3-HPA solution. (a) Typical mass spectra of kidney homogenate sections applying each additive. (b) Typical images of kidney homogenate sections (optical image) and IMS of LNA-A by extracting *m/z* 4959. (c) Bar diagram of signal intensity of LNA-A for the comparison of additives effect. No spray represents normal method (ImagePrep only). Pre-sprayed 3-HPA, TEA, DMA, and MA with an airbrush. All error bars derive from four times measurements for each method. Data represent mean values ± SD. *$p < 0.05$, a.u. arbitrary unit. Scale bar: 2.5 mm.

次に、添加するアミン類の添加濃度を検討した。TEA の濃度を 0.1%から 10%まで変動させたときの LNA-A の検出感度を比較したところ、TEA 濃度 1%までは検出感度の上昇が認められたが、それ以上の濃度では感度に差は認められなかった。したがって、これ以降の検討ではアミン添加濃度を 1%とした。

以上から､本研究では切片中の LNA-A 感度改善のマトリックス塗布法として、まず、1%TEA を添加した 3-HPA をエアブラシにて噴霧し、次に、ImagePrep を用いて 3-HPA を塗布する新たな 2 段階マトリックス塗布法を開発した。

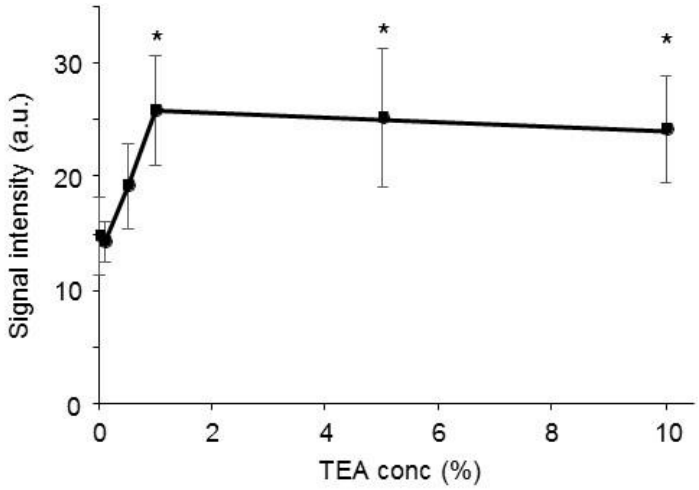


Figure 13. Signal intensity profiles of LNA-A dependent on TEA concentrations in matrix solution. All error bars derive from four times measurements for each concentration. Data represent mean values ± SD. *$p < 0.05$, a.u. arbitrary unit.

第四節 LNA-A 投与マウス肝臓及び腎臓切片の MALDI-IMS 解析

前節までに、組織切片を MALDI-IMS 解析するための前処理法及びマトリックス塗布法を開発することができた。本節では、開発した方法を用いて、LNA-A をマウスに投与後に採取した臓器（肝臓及び腎臓）切片の、MALDI-IMS 解析を実施した。

＜方法＞

- **LNA-A のマウスへの投与と組織採取**

6週齢のICR雄性マウスに、LNA-A溶液を10 mg/kgで尾静脈へ単回投与し、投与後0.5時間、2時間及び4時間後に脱血後肝臓及び腎臓を採取した。採取した組織は、パウダードライアイスを用いて凍結させ、切片調製まで-80度で保管した。コントロール試料として、雄性マウスに滅菌水
を同様に静脈内投与した2時間後に採取した肝臓及び腎臓を用いた。

- MALDI-IMS 解析

組織をクライオスタットで 12 μm で ITO-slide glass 上に調製し、開発した前処理法 (Table 3, washing method A) で洗浄し、新規 2 段階マトリックス塗布法によってマトリックスを塗布した後、MALDI-IMS 測定を実施した。MALDI-IMS 測定はリニアモードで行い、陰イオン検出のスキャン範囲を *m/z* 3500-7500 とし、レーザー強度を 90%に設定した。レーザーを 1 スポット 600 回、150 μm 間隔で照射し、得られたデータの画像解析及びスペクトル解析は、ブルカーダルトニクス社の flexImaging 4.0 を用いて TIC モードで補正し行った。

＜結果＞

前節までに開発した方法を用いて、LNA-A 投与マウス肝臓及び腎臓切片の IMS 解析を実施した。その結果、LNA-A 投与肝臓及び腎臓切片において、経時的に採取したすべての切片から LNA-A の$[M-H]^-$である *m/z* 4959 が検出された (Figure 14 (a) 及び Figure 15 (a))。さらに、*m/z* 4614 のスペクトルが同様にすべての LNA-A 投与後の切片から検出された。この$[M-H]^-$は LNA-A のそれよりも 345Da 小さく、この分子量は LNA-A の 3’側から 1 塩基脱離した代謝物である LNA-A (14)と一致した。この LNA-A (14)は投与切片の前処理中に LNA-A が分解

して生成した可能性も懸念された。しかし、前節までの LNA-A 添加ホモジネートからは検出されていなかったこと、さらに、第 1 章で LNA-A 投与血漿中の解析においても検出されていたことから、各切片から検出された LNA-A (14) は LNA-A 投与後に生体内で生成した分解物と結論付けられる。LNA-A 及び LNA-A (14)の[M-H]$^-$で IMS 解析を実施すると、両化合物とも、肝臓では一様に分布している様子が、腎臓においては皮質部位に分布している様子が示された (Figure 14 (b) 及び Figure 15 (b))。投与後 0.5 時間に採取した組織においても LNA-A (14) が検出されているため、投与された LNA-A は速やかに代謝され、組織に移行したと推測される。また、生体内に投与された核酸医薬品は、肝臓や腎臓に分布することが知られているが [13, 14]、本研究に用いた LNA-A においても、同様な生体反応が関与していることが示唆された。なお、コントロール組織切片からは、LNA-A やその代謝物の検出を妨害するようなスペクトルは検出されなかった。

また、LNA-A 投与後の全時点の腎臓切片の MS スペクトルから、LNA-A (14) のスペクトルのほかに、*m/z* 4257 のスペクトルが検出された (Figure 15 (a))。この質量は、3’側から 2 塩基脱離した代謝物である LNA-A (13) のものと一致した。このスペクトル強度は弱かったため、本研究にて開発した高感度検出法でなければ検出されなかった可能性が考えられる。今後更なる検出感度の向上が達成できれば、より多くの代謝物の検出が可能となることが期待される。

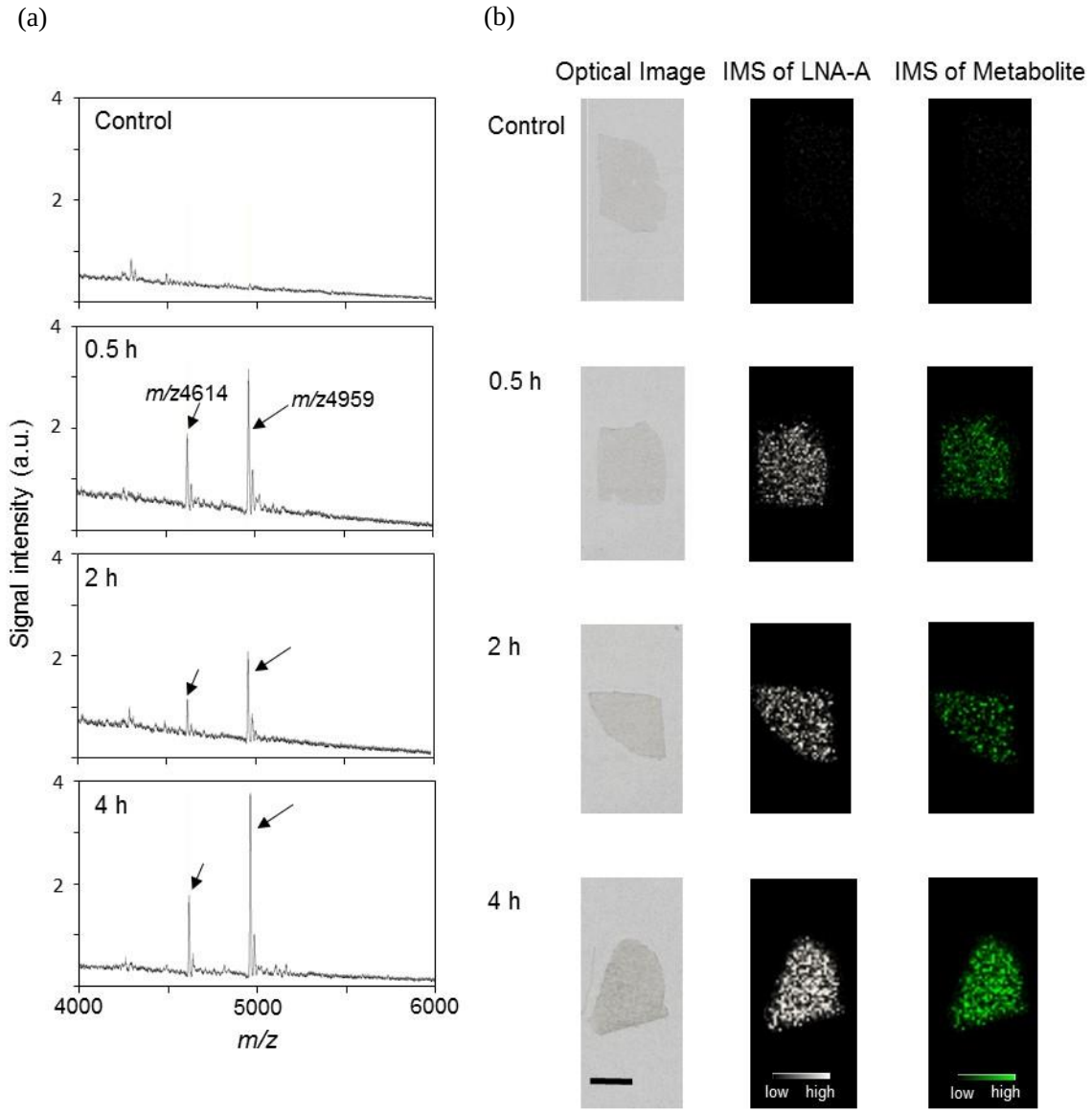


Figure 14. Measurement of mouse liver section after administration of LNA-A. (a) Typical mass spectra of control liver section and 0.5, 2, and 4 h post-dose liver sections. (b) Images of mouse liver section (optical image) and IMS of LNA-A (extracting *m/z* 4959) and its metabolite (extracting *m/z* 4614). a.u. arbitrary unit. Scale bar: 5 mm.

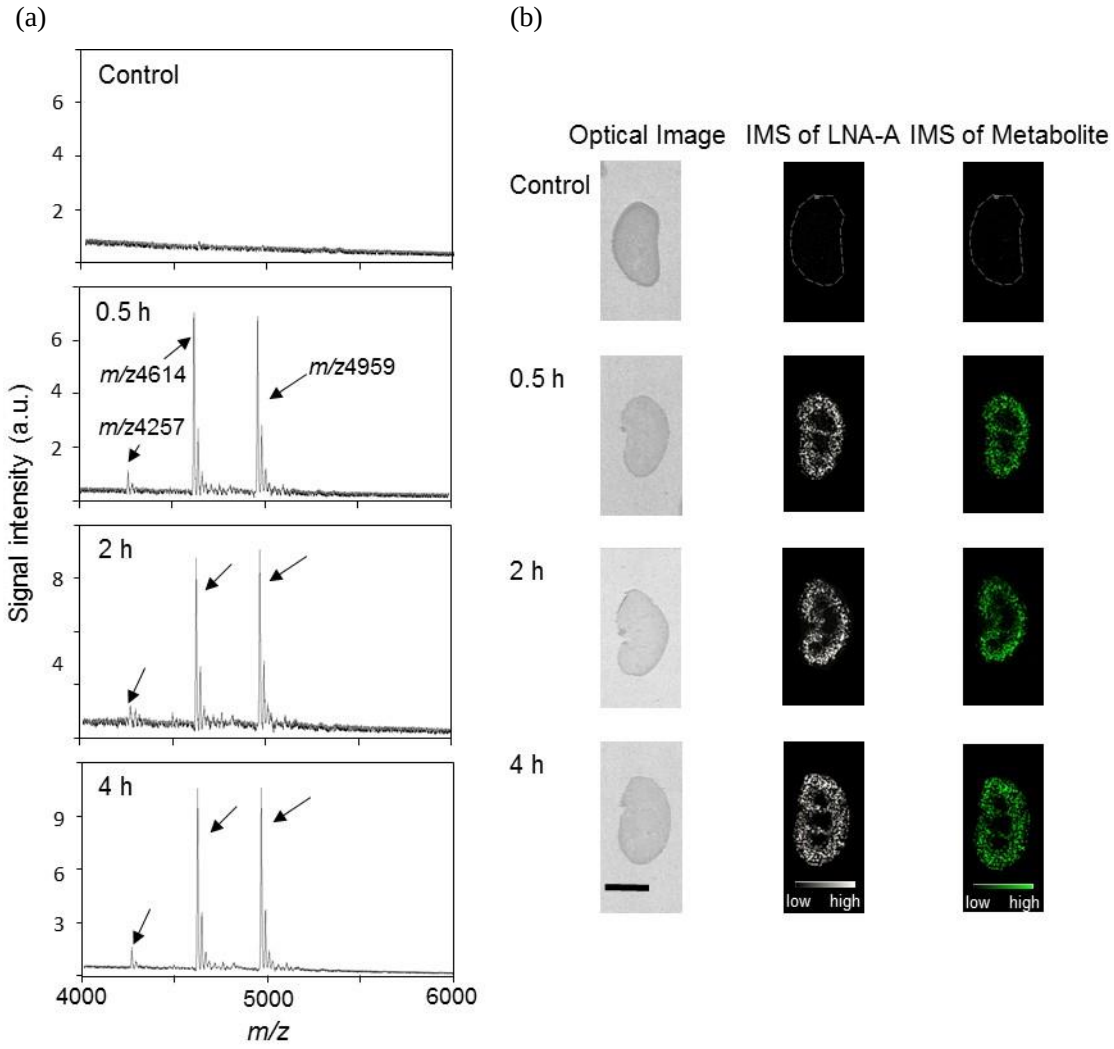


Figure 15. Measurement of mouse kidney section after administration of LNA-A. (a) Typical mass spectra of control kidney section and 0.5, 2, and 4 h post-dose kidney sections. (b) Images of mouse kidney section (optical image) and IMS of LNA-A (extracting *m/z* 4959) and its metabolite (extracting *m/z* 4614). a.u. arbitrary unit. Scale bar: 5 mm.

第五節 小括

本章では、投与核酸の組織内分布解析の新しい手法として、MALDI-IMS を用いたマウス組織中の LNA-A 検出法を開発した。まず、様々な生体成分が存在する組織切片から、LNA-A の位置情報を維持したまま、夾雑成分を除去する方法として、切片の洗浄法を開発した。次に、LNA-A を高感度に検出する方法として、新規 2 段階マトリックス塗布法と TEA を用いた新しいマトリックス塗布法を開発した。これら開発した方法を用いて、LNA-A 投与マウス肝臓及び腎臓切片の MALDI-IMS 解析を実施したところ、投与 LNA-A とその代謝物が検出された。肝臓では、LNA-A と LNA-A (14)は一様に分布している様子が、腎臓では両化合物とも皮質部分に分布している様子が確認できた。すでに承認されている、アンチセンス核酸医薬品の放射標識体を用いた分布評価においても、投与核酸は肝臓および腎臓に集積している [13, 14]。放射標識体を用いた既存の方法では、投与核酸の代謝物までを解析できないが、本研究にて開発した方法を用いれば、実際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 [47]、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。以上の結果から、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品開発に有用であると結論付けた。

総括

本研究では、核酸医薬品の質量分析法を用いた薬物動態評価法の開発を目的に、動物に投与した LNA-A の、体内における検出法の最適化を行った。

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。本方法は、古くから利用されてきた十分な実績のある手法であり、医薬品の申請試験においても、未だ必要不可欠な方法であるが、この方法の最大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。現在、医薬品の開発における薬物動態評価のうち、その代謝物評価に最も使用されている質量分析法は LC-MS 法であり、投与核酸においても代謝物解析が可能であることが第 1 章で確認できた。しかしながら、測定対象からの抽出が必要であり、代謝物を含めた組織内分布を評価したい場合は別の方法が必要である。そこで第 2 章では、投与核酸とその代謝物の両者の分布評価が可能となる MALDI-IMS を用いた組織内分布評価法を開発した。組織切片から分布情報を維持したまま、イオン化やアダクトイオン等の検出を妨害する成分を除去できる洗浄方法を見出すとともに、測定対象の検出感度を向上させる新しいマトリックスの塗布方法を開発することで、LNA-A を投与したマウス肝臓及び腎臓切片から LNA-A とその代謝物の分布評価が同時に可能となった。

これまで核酸医薬品の定量は主に LBA 法が使われてきた。この方法は 1 ng/mL 以下の対象核酸でも定量することが可能であるが[13]、代謝物との同時かつ分離定量はできないという欠点がある。本研究で示したように、LC-MS を用いれば、代謝物の解析が可能であるが、一方で核酸医薬品の検出感度は 10 ng/mL 程度が限界である [33]。MALDI-IMS を用いれば、これらの組織内分布の解析が可能となるが、定性的な解析が主目的である。したがって、求める情報

に対して適切な測定法の選択は必要不可欠である。本研究で開発した MALDI-IMS は、薬効や毒性発現部位に分布している核酸医薬品が未変化体なのか、代謝物なのかを位置情報を維持したまま解析することが可能である。代謝物も活性を持つ可能性が高い核酸医薬品においては、このような情報は薬効発現のメカニズムの詳細な解析や、毒性発現の原因究明解析にも役立つと期待できる。特に、毒性に関与しているものが、代謝物であった場合、新たな修飾核酸を導入し代謝物の生成を抑えることで、毒性発現を回避するといったアプローチも可能となる。

MALDI-IMS は 2018 年に「医薬品開発における質量分析イメージング技術利用に関するリフレクションペーパー (案)」が医薬品医療機器総合機構から公開され [48]、医薬品開発研究においてもその応用が注目されつつある技術である。また、核酸医薬研究も活発に行われており、より活性の強いものが開発されると、その用量も現在より低いものになると予想される。このような新規核酸医薬品へ MALDI-IMS 解析を応用するためには、より高感度な方法が求められる。装置などのハードウェアの開発は日進月歩であり、今後より高感度に高解像度な測定が可能な装置が開発されると期待される。本研究にて開発した方法は、そういった装置の性能を最大限に活用するために有用であり、今後ますます増加すると思われる核酸医薬品開発の一助となることを期待したい。

結論

核酸医薬品の新たな薬物動態解析法の開発を目的に、質量分析を用いた核酸医薬品の組織内分布評価法の開発に取り組み、以下の結果を得た。

1) LC-MS を用いた LNA-A の評価では、血漿からの抽出を前提として、投与核酸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同様 LC-MS が代謝物解析に有用であることが示された。

2) MALDI-IMS を用いた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の開発を行った。本法を適用することで、動態解析において有用な、組織内の LNA-A とその代謝物の検出が同時に可能となった。

3) MALDI-IMS での LNA-A の検出感度の向上のため、新しいマトリックス塗布法を考案した。本法を用いることで、検出感度の上昇が認められた。

4) 開発した方法を用いて、モデル核酸投与マウスの肝臓及び腎臓内の解析を行ったところ、投与核酸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知りえない情報であり、本研究にて開発した方法が核酸医薬品の組織内分布の評価法に有用であることを示した。

謝辞

本研究において終始御指導、御鞭撻を賜りました、大阪大学大学院 薬学研究科 土井 健史 教授に謹んで感謝いたします。

本研究において終始御指導、御助言を賜りました、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 鎌田 春彦 先生に謹んで感謝いたします。

本論文の指導及び審査をしていただきました、大阪大学大学院 薬学研究科 小比賀 聡 教授に謹んで感謝いたします。

本研究においてご協力いただきました、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所バイオ創薬プロジェクトの皆様、人工核酸スクリーニングプロジェクトの皆様に心から感謝いたします。

本論文作成において、御指導、御助言をいただきました大塚製薬株式会社 鈴木 智樹 研究員に心から感謝いたします。

最後に、著者の大学院生活を常日頃からご支援いただきました、家族、友人に心から感謝いたします。

試薬及び実験器具

試薬

エタノール、アセトニトリル、アセトン、クエン酸二アンモニウム、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール溶液、クロロホルム、25%アンモニア水、及び酢酸は和光純薬工業から、HFIPはシグマアルドリッジから、メタノールはメルク株式会社から購入し用いた。9-AA、3HPA、MA、DMA、及びTEAは東京化成株式会社から購入し、滅菌水はナカライテスク株式会社から購入し用いた。陽イオン交換樹脂は三菱ケミカルから購入し用いた。LNA-A、LNA-A (14)及びLNA-A (13)は株式会社ジーンデザインから購入し用いた。

実験器具

Oasis HLB カートリッジ (10 mg)及び XBridge C18 (3.5 μm, 150×2.1 mm) カラムは日本ウォーターズ株式会社から購入し用いた。アンカーチップ及び ITO-slide glass はブルカージャパン株式会社から購入し用いた。エアブラシは MR HOBBY (株式会社 GSI クレオス) の Procon Boy を購入して用いた。

引用文献

1. Opalinska, J. B. and Gewirtz, A. M. Nucleic-acid therapeutics: Basic principles and recent applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002; 1**:** 503–514.

2. 井上貴雄. 核酸医薬品開発の現状. *Drug Delivery System*. 2015; 31-1: 10-23.

3. Lundin K. E., Gissberg O, and Smith C. I. Oligonucleotide Therapies: The Past and the Present. *Hum. Gene Ther*.2015; 26: 475-485.

4. Dowdy S. F. Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics. *Nat. Biotechnol.* 2017; 35: 222–229.

5. Eckstein F. Phosphorothioates, Essential Components of Therapeutic Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther*. 2014; 24: 374-387.

6. Grunweller A. and Hartmann R. K. Locked nucleic acid oligonucleotides: the next generation of antisense agents? *Biodrugs* 2007; 21, 235–243.

7. Kurreck J, Wyszko E, Gillen C, et al. Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 2002; 30 (9): 1911-1918.

8. Semple S. C., Akinc A, Chen J, et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol.* 2010; 28(2): 172-176.

9. Straarup E. M., Fisker N, Hedtjärn M, et al. Short locked nucleic acid antisense oligonucleotides potently reduce apolipoprotein B mRNA and serum cholesterol in mice and non-human primates. *Nucleic Acids Res* 2010; 38 (20): 7100-7111.

10. Fitzgerald K, White S, Borodovsky A, et al. A highly durable RNAi therapeutic inhibitor of PCSK9. *N. Engl. J. Med.* 2017; 376: 41–51.

11. Stain C. A. and Castanotto D. FDA-approved oligonucleotide therapies in 2017. *Mol Ther.* 2017; 3 (25): 1069-1075.

12. Hoy S. M. Patisiran: First Global Approval. *Drugs*. 2018; 78 (15): 1625-1631.

13. Geary R. S., Yu R. Z., Watanabe T. A., et al. Pharmacokinetics of a tumor necrosis factor-alpha phosphorothioate 2'-O-(2-methoxyl) modified antisense oligonucleotide: comparison across species. *Drug Metab Dispos.* 2003; 31: 1419-1428.

14. Yu R. Z., Kim T. W., Hong A, Watanabe T. A., Gaus H. J., and Geary R. S. Cross species pharmacokinetic comparison from mouse to man of a second generation antisense oligonucleotide, ISIS301012, targeting human apolipoprotein B-100. *Drug Metab Dispos.* 2007; 35: 460-468.

15. Zanardi T. A., Han S. C., Jeong E. J., et al. Pharmacodynamics and subchronic toxicity in mice and monkeys of ISIS 388626, a second-generation antisense oligonucleotide that targets human sodium glucose cotransporter 2. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012; 343 (2): 489-496.

16. Chiriboga C. A., Swoboda K. J., Darras B. T., et al. Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMN(Rx)) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology*, 2016; 86: 890–897.

17. Yu R. Z., Baker B, Chappell A, Geary R. S., Cheung E, and Levin A. A. Development of an ultrasensitive noncompetitive hybridization–ligation enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of phosphorothioate oligodeoxynucleotide in plasma. *Anal Biochem*, 2002; 304: 19-25.

18. Saxena S, Jónsson Z. O., and Dutta A. Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J Biol Chem*. 2003; 278 (45): 44312-44319.

19. Jackson A. L., Bartz S. R., Schelter J, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol.* 2003; 21 (6): 635-637.

20. ICH S6 研究班. 核酸医薬品のオフターゲット作用の評価. PMDRS. 2015; 46 (10): 681-686

21. Stoeckli M, Chaurand P, Hallahan D. E., Caprioli R. M. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat Med.* 2001; 7(4): 493-496.

22. Caprioli R. M., Farmer T. B., and Gile J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem*, 1997; 69 (23): 4751-4760.

23. Reyzer M. L., Chaurand P, Angel P. M., and Caprioli R. M. Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by MALDI imaging mass spectrometry. *Methods Mol Biol*. 2010; 656: 285-301.

24. Khatib-Shahidi S, Andersson M, Herman JL, Gillespie T. A., Caprioli R. M. Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by imaging maldi mass spectrometry. *Anal Chem*, 2006; 78: 6448-6456.

25. Cornett D. S., Frappier S. L., and Caprioli R. M. MALDI-FTICR imaging mass spectrometry of drugs and metabolites in tissue. *Anal Chem*, 2008; 80 (14): 5648-5653.

26. Prideaux B, Dartois V, and Staab D, et al. High-sensitivity MALDI-MRM-MS imaging of moxifloxacin distribution in tuberculosis-infected rabbit lungs and granulomatous lesions. *Anal Chem*, 2011; 83 (6): 2112-2118.

27. Takai N, Tanaka Y, Inazawa K, and Saji H. Quantitative analysis of pharmaceutical drug distribution in multiple organs by imaging mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2012; 26(13): 1549-1556.

28. Rinaldi C and Wood M. J. A. Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders. *Nat Rev Neurol*, 2018; 14 (1): 9-21.

29. Beierlein J. M., McNamee L. M., and Ledley F. D. As technologies for nucleotide therapeutics mature, products emerge. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017; 9: 379-386.

30. Lin Z. J., Li W, and Dai G. Application of LC–MS for quantitative analysis and metabolite identification of therapeutic oligonucleotides. *J Pham Biomed Anal*, 2007; 44 (2): 330-341.

31. Studzińska S. Review on investigations of antisense oligonucleotides with the use of mass spectrometry. *Talanta*, 2018; 176: 329-343.

32. McGinnis A. C., Chen B, and Bartlett M.G. Chromatographic methods for the determination of therapeutic oligonucleotides. *J Chromatogr B*, 2012; 883: 76-94.

33. Franzoni S, Vezzelli A, Turtoro A, et al. Development and validation of a bioanalytical method for quantification of LNA-i-miR-221, a 13-mer oligonucleotide, in rat plasma using LC–MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*. 2018; 150: 300-307.

34. Murphy A. T., Brown-Augsburger P, Yu R. Z., Geary R. S., Thibodeaux S, Ackermann B. L. Development of an ion-pair reverse-phase liquid chromatographic/tandem mass spectrometry method for the determination of an 18-mer phosphorothioate oligonucleotide in mouse liver tissue. *Eur J Mass Spectrom (Chichester).* 2005; 11 (2): 209-215.

35. Griffey R. H., Greig M. J., Gaus H. J., et al. Characterization of oligonucleotide metabolism in vivo via liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry with a quadrupole ion trap mass spectrometer. *J Mass Spectrom*. 1997; 32 (3): 305-313.

36. Zhang G, Lin J, Srinivasan K, Kavetskaia O and Duncan J. N. Strategies for bioanalysis of an oligonucleotide class macromolecule from rat plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2007; 79 (9): 3416-3424.

37. 進藤英世. 全身オートラジオグラフィとガイドラインの歩み.

RADIOISOTOPES. 1999; 48: 216-226.

38. Hattori K, Kajimura M, Hishiki T., et al. Paradoxical ATP elevation in ischemic penumbra revealed by quantitative imaging mass spectrometry. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 13 (8): 1157-1167.

39. Wu K. J., Steding A, Becker C. H. Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1993; 7 (2): 142-146.

40. Nordhoff E, Cramer R, Karas M. Ion stability of nucleic acids in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Nucleic Acids Res*. 1993; 21 (15): 3347-3357.

41. Kakuda N, Miyasaka T, Iwasaki N, et al. Distinct deposition of amyloid-β species in brains with Alzheimer's disease pathology visualized with MALDI imaging mass spectrometry. *Acta Neuropathol Commun*, 2017; 5 (1): 73.

42. Yang J and Caprioli R. M. Matrix sublimation/recrystallization for imaging proteins by mass spectrometry at high spatial resolution. *Anal Chem*, 2011; 83 (14): 5728–5734.

43. Sugiura Y, Shimma S, and Setou M. Two-step matrix application technique to improve ionization efficiency for matrix-assisted laser desorption/ionization in imaging mass spectrometry. *Anal Chem.* 2006; 78(24): 8227-8235.

44. Shimma S, Takashima Y, Hashimoto J, Yonemori K, Tamura K, and Hamada A. Alternative two-stepmatrix application method for imaging mass spectrometry to avoid tissue shrinkage and improve ionization efficiency. *J Mass Spectrom.* 2013; 48(12): 1285-1290.

45. Pieles U, Zürcher W, Schär M, and Moser H. E. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence

analysis of natural and modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21: 3191-3196.

46. Cobice D. F., Mackay C. L., Goodwin R. J. Mass spectrometry imaging for dissecting steroid intracrinology within target tissues. *Anal Chem*. 2013; 85 (23): 11576-11584.

47. FDA. Center for drug evaluation and research. *Application number:* 203568Orig1s000, Pharmacology review(s).

48. 医薬品医療機器総合機構. 医薬品開発における質量分析イメージング技術利用に関するリフレクションペーパー (案) 2018年