

日本医療研究開発機構 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 生体組織イメージングに基づいたバイオ医薬品の新規評価基盤技術の開発
(英語) Development of a novel evaluation system for biopharmaceuticals based on
intravital imaging

研究開発実施期間: 令和元年10月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 石井 優
(英語) Masaru Ishii

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・創薬イメージングプロジェクト・招へいプロジェクトリーダー
(英語) Project Leader, Laboratory of Bioimaging and Drug Discovery, National Institutes of Biomedical
Innovation, Health and Nutrition

II 研究開発の概要

(和文)

近年のバイオ医薬品の登場により、創薬開発や臨床の現場に劇的な変化が訪れた。何百万種におよぶ天然化合物や合成化合物をスクリーニングすることで治療薬を探索してきた時代と異なり、いまや豊富な分子生物学的研究に基づき病態の中心となる分子を同定し、その分子を阻害するモノクローナル抗体といった生体高分子を作出し治療薬とする時代である。関節リウマチにおける抗 TNF α 抗体や抗 IL-6 受容体抗体、腫瘍における免疫チェックポイント阻害剤など生体高分子を用いたバイオ医薬品は、その特異性かつ有効性の高さにより、自己免疫疾患や腫瘍の治療戦略に革命をもたらした。最近では、患者自身の T 細胞を遺伝子改変し、がん細胞を攻撃させる CAR-T 療法も登場し、バイオ医薬品の発展性は留まるところを知らない。一方で、これらバイオ医薬品は疾患モデルや治験・臨床研究から薬効評価にかかわる情報の多くが得られているが、実際の生きた臓器・組織で、どのようにその薬理作用を発揮するかに関しては十分な評価がおこなわれていない。すなわち、これらバイオ医薬品はその標的となる分子は明らかであるが、どの組織・細胞をターゲットとして、どういった作用機序を示すのか、その“薬理的”解析が課題といえる。バイオ医薬品開発が加速度的に進み、治療の選択肢が増加する状況をうけ、各薬剤の生体内での薬理作用を正確に把握したうえで、特徴に応じた選択を行っていくことが必須になる。したがって、バイオ医薬品における薬効・薬物動態評価系の確立が社会的に求められている。

我々はこれまでに、組織深部を高解像度かつ低侵襲で観察する多光子励起顕微鏡を駆使した「生体イメージング」研究に取り組んできた。特に、イメージングが困難であるとされてきた硬い骨組織内を観察することに世界に先駆けて成功し、破骨細胞による骨吸収メカニズムを解明した。骨以外にも、肝臓・腸管など様々な組織における生体多光子励起イメージング系を独自に確立し、細胞動態という観点から細胞機能を制御する基本原理を解明するとともに、バイオ医薬品など種々の薬剤の *in vivo* での作用機序についても検討を行い、薬効評価系としての生体イメージングの有用性も示してきた。しかしながら、この生体イメージングを真の薬効評価系として確立するためには、再現可能でバイアスフリーなイメージング系やその定量的解析系といった新たな基盤技術の開発が急務である。

本研究では、我々がこれまでに独自に開発してきた生体多光子励起イメージング系を発展し、バイオ医薬品の真の薬理作用を評価し、次世代創薬のための新規 *in vivo* 薬効評価・創薬スクリーニング基盤技術の確立を目指した。すなわち、各種バイオ医薬品の *in vivo* 薬効評価のために最適化した生体イメージング技術の開発、生体イメージング薬効評価系の自動定量解析技術とスクリーニング系の構築を実施した。具体的には、皮膚における乾癬炎症モデル、気道におけるアレルギー性炎症モデル、脊髄における神経炎症モデルなど各臓器・組織の免疫細胞を中心に可視化する生体イメージング系と安定的なイメージングを実現するデバイスを開発した。特に、これまで長時間のイメージングが困難であった肺のイメージング系の確立に大きな進展があり、これまで 10 分程度の観察が限界であったデバイスを改良することで、1 時間以上の長時間にわたり安定的な観察が可能な肺のイメージング系を構築した。この進展により、肺線維症や気道炎症といった肺組織内における病態の経時的な変化を評価することが可能となった。

次に、開発した各種疾患モデルの生体イメージング系を用いて、バイオ医薬品を中心に各種薬剤の *in vivo* 薬効評価を行った。我々はこれまでに、関節リウマチ治療薬として使用されているバイオ医薬品（抗 TNF α 抗体や抗 IL-6 受容体抗体、T 細胞選択的共刺激調節剤）の *in vivo* 薬効評価を行い、抗 TNF α 抗体および抗 IL-6 受容体抗体は主に成熟破骨細胞、T 細胞選択的共刺激調節剤は破骨前駆細胞に強く作用し、それぞれ異なる作用機序で炎症性骨破壊を抑制することを報告したが（Matsuura Y, et al., *Ann Rheum Dis*, 2018）、本研究では関節リウマチの新規治療薬として近年注目されている JAK 阻害剤の *in vivo* 薬効評価を行った。成熟破骨細胞や破骨前駆細胞をそれぞれ蛍光標識したマウスを用いて炎症性骨破壊モデルを作製し、炎症によって誘導された破骨細胞に対する JAK 阻害剤の薬効を評価した結果、JAK 阻害剤は、成熟破骨細胞の骨吸収能と破骨前駆細胞の骨表面

への遊走の両方を阻害することで、炎症性骨破壊を抑制することが明らかとなった (Yari S, et al., *Inflamm Regen*, 2023)。このように、生体イメージングを用いた *in vivo* 薬効評価系は、各種バイオ医薬品の生体内における薬理作用を正確に把握することができるので、臨床現場において各々の特徴に応じた適切な薬剤選択にも役立つと考えられる。

さらに、これまでに開発した生体イメージング系を用いて、副甲状腺ホルモン (PTH) 製剤の *in vivo* 薬効評価を行った。生体内のミネラル代謝を制御する PTH は、骨吸収から骨形成への移行を促進することで骨量を増やすことが知られており、PTH 製剤は既存の骨粗鬆症治療薬の中で唯一の骨形成促進薬として広く世界で使われている。我々はこれまでに、破骨細胞と骨芽細胞の両方を同時に可視化できるマウスを用いて生体イメージングを行い、PTH 製剤が破骨細胞と骨芽細胞の細胞間相互作用を増加させ、破骨細胞による骨吸収を抑制することを報告したが (Furuya M, et al., *Nat Commun*, 2018)、PTH 製剤がどのようにして骨吸収と骨形成を同時に制御しているのか、その詳細な分子メカニズムはよく分かっていなかった。本研究では、破骨細胞と骨芽細胞の細胞間相互作用に関わる分子メカニズムを解明するため、PTH 製剤を投与したマウスから骨芽細胞を単離し、網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、PTH 製剤によって発現変動する遺伝子の中で、セリンプロテアーゼ阻害作用をもつ低分子タンパク質 SLPI (Secretory leukocyte protease inhibitor) の発現が最も顕著に増加していることが分かった。また、SLPI 遺伝子欠損マウスを用いて生体イメージングを行った結果、野生型マウスと比較して、PTH 製剤の投与による破骨細胞と骨芽細胞の細胞間相互作用の増加が認められず、PTH 製剤による骨量増加作用が減少していた。さらに、SLPI を過剰に発現させた骨芽細胞は、細胞分裂を盛んに行うほか、骨芽細胞の機能に必須のタンパク質 (Runx2, Osterix) の発現が高いこと、破骨細胞との細胞間接着能が高く細胞間相互作用により骨吸収を抑制することが分かった。以上より、PTH 製剤は骨芽細胞に発現する PTH 受容体に作用して SLPI の発現を増加させること、さらに SLPI は骨芽細胞に直接的に作用して骨形成を促進させるほか、破骨細胞と骨芽細胞の細胞間相互作用を増加させることで、骨吸収と骨形成の両面を制御していることが明らかとなった (Morimoto A, et al., *Nat Commun*, 2021)。

抗体製剤をはじめとしたバイオ医薬品は蛍光色素で標識可能なものが多く、蛍光イメージングと相性が良い。生体イメージング系を用いて、蛍光標識したバイオ医薬品の *in vivo* 薬効評価を行うことで、生体内における薬物動態の解析や薬剤が作用する標的細胞の同定も可能である。本研究では、関節炎を誘導したマウスに蛍光標識したバイオ医薬品 (T 細胞選択的共刺激調節剤) を投与し、炎症関節内部を生体二光子励起顕微鏡で観察し、薬剤の生体内動態を解析した。その結果、薬剤投与直後から炎症滑膜に薬剤の強い集積を認め、特に CX₃CR1 陽性の単球・マクロファージ系細胞への強い結合が認められた (Hasegawa T, et al., *Sci Rep*, 2020)。このように、生体イメージングを用いた *in vivo* 薬効評価系は、蛍光標識したバイオ医薬品の生体内における実際の分布を解析することができるので、生体内におけるバイオ医薬品の薬物動態・局在解析にきわめて有用であることが示された。

本研究では、CAR-T 細胞の免疫応答の可視化にも取り組んだ。これまでに開発してきた生体骨髄内での T 細胞による抗白血病免疫応答のイメージング系を改良し、薬効評価が可能な再現性・定量性の高い生体イメージング系の開発を行った。これにより、CAR-T 細胞が実際にどのようにがん細胞を排除するのか、その *in vivo* 薬理作用を評価することが可能となった。

このように、本研究で確立した各種疾患モデルの生体イメージングによるバイオ医薬品の薬効評価系を用いて、各種薬剤の *in vivo* 薬理作用点を同定した。今後、本研究で確立した新規評価技術を用いた「*in vivo* での薬理作用検証ステップ」が、次世代バイオ創薬のデファクトスタンダードとなることが期待される。

(英文)

Recent advances in biopharmaceuticals have brought dramatic changes to drug discovery and clinical practice. Biopharmaceuticals, such as anti-TNF α antibodies in rheumatoid arthritis and immune checkpoint inhibitors in oncology, have revolutionized treatment strategies for autoimmune diseases and tumors due to their specificity and efficacy. Although the target molecules of these biopharmaceuticals are clear, it is still difficult to analyze pharmacologically which tissues and types of cells are targeted *in vivo* and what molecular mechanisms are at work *in vivo*. Therefore, it is necessary to establish a novel system to evaluate the efficacy and pharmacokinetics of biopharmaceuticals. We have recently developed an intravital imaging system using a multiphoton excitation microscopy. By means of this imaging system, we have investigated the *in vivo* mechanisms of action and kinetics of various drugs including biopharmaceuticals and demonstrated the potential of intravital imaging as a drug efficacy evaluation system. However, it is urgent to develop novel fundamental technologies, such as a reproducible, unbiased and quantitative imaging system for a true drug efficacy evaluation system. In this research project, we optimized our intravital imaging technology for *in vivo* efficacy evaluation of various biopharmaceuticals, and also developed an automated quantitative analysis and screening system for the intravital imaging-based drug evaluation. We have established several *in vivo* imaging models for drug efficacy evaluation and have also developed devices for stable imaging. Especially, we have great progress in establishing an imaging system for the lung tissue, which was difficult to observe stably over a long period of time. The new imaging system with improved device enables us to perform intravital lung imaging for more than one hour.

Using a novel evaluation system for biopharmaceuticals based on intravital imaging, we evaluated the *in vivo* efficacy of several drugs. First, we evaluated the *in vivo* efficacy of JAK inhibitors, which have recently attracted attention as novel therapeutic agents for rheumatoid arthritis. We showed that JAK inhibitors suppress inflammatory bone destruction by inhibiting both the bone resorption ability of mature osteoclasts and the migration of osteoclast precursor cells to the bone surface (Yari S, et al., *Inflamm Regen*, 2023). In addition, we evaluated the *in vivo* efficacy of parathyroid hormone (PTH), which is the only bone formation stimulants among existing osteoporosis drugs. We found that PTH induces the expression of SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor) through PTH receptors expressed on osteoblasts and promotes bone formation via SLPI. SLPI promotes osteoblast differentiation and inhibits bone resorption activity of osteoclasts by attracting osteoclasts around osteoblasts (Morimoto A, et al., *Nat Commun*, 2021). Because biopharmaceuticals such as antibody drugs can be labeled with fluorescent dyes, analysis of the dynamics of biopharmaceuticals is ideal for fluorescence imaging. We analyzed the actual distribution of fluorescent-labeled biopharmaceuticals *in vivo* using the intravital imaging and demonstrated that intravital imaging is useful for the pharmacokinetic analysis of biopharmaceuticals (Hasegawa T., et al. *Sci Rep*, 2020).

In conclusion, we identified the *in vivo* pharmacological action points of various drugs using a novel evaluation system for biopharmaceuticals based on intravital imaging. We believe that the "*in vivo* pharmacological action verification step" using the novel evaluation system established in this study would become the de facto standard for next-generation biopharmaceutical drug discovery.