

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：超高感度 CE-MS 技術に基づくミクロスケール薬物動態評価プラットフォーム

Microscale PK Analysis Platform Using Ultra-sensitive CE-MS Technologies

研究開発実施期間：令和3年11月30日～令和8年3月31日

研究開発代表者 氏名：川井 隆之

Takayuki Kawai

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人九州大学 大学院理学研究院 化学部門 准教授

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyushu University

II 研究開発の概要

(1) CE-MS 分析技術開発

ペプチド医薬品・ADC 分析法の開発では、これらのモダリティに共通する性質である疎水性の高さに注目し、このような疎水性試料を対象とした「large-volume dual preconcentration by micelle collapse and sweeping (LDMS)」濃縮法を開発した。これにより 100 zmol レベルの超高感度を実現し、さらに $n =$ 数百スケールで安定的に分析可能なシステムとして完成させることを目標にした。まずモデル試料として ADC ペイロードである DXd を用いて LDMS-CE-MS 分析を行ったところ、図 1 に示すように濃縮無しの条件と比較して約 1000 倍の高感度化に成功し、検量線についても $R^2 > 0.999$ の良好な線形性を示し、定量下限は 420 fM (zmol/ μ L, S/N = 10) と極めて高感度であった。 $n =$ 数百スケールの分析では数日に分けて解析を行う必要があるが、外部標準 (quality control) 試験を毎日実施して日間誤差を補正することで、 $n = 200$ での定量再現性 (補正ピーク面積値の相対標準偏差) 9.8% を達成した。これは薬物動態解析に一般的に利用される LC-MS と遜色ない再現性であり、超高感度かつ堅牢な薬物動態分析技術の基盤を構築することに成功した。その他の薬剤として exatecan, cligosiban, cyclosporin A などについても同様に 100 zmol/ μ L レベルの感度を確認した。

続いて核酸医薬品の濃縮・検出技術開発では、100 zmol レベルの感度達成を目標として設定し、まずモデル試料として fomivirsen を用いて分離、イオン化および濃縮条件を検討した。CE-MS で利用可能な泳動液として、酢酸・ギ酸・プロピオン酸およびアンモニアの混合比を調整して分離・検出 (イオン化) を検証した結果、positive mode において安定的に高感度を実現できることが判明した。弱塩基性条件かつイオン源温度を高くするほどアダクトイオンは低減され、シグナルが主ピークに集約されるため感度が大幅に改善された。このような positive mode での高感度分析は LC-MS ではほと

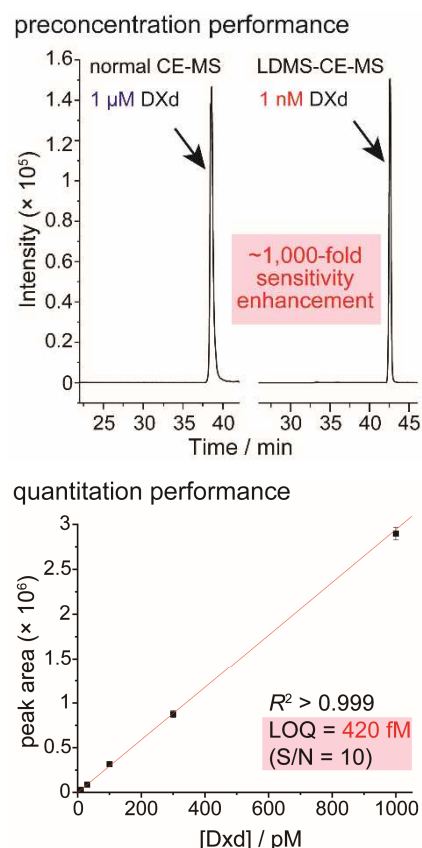


図 1. LDMS-CE-MS の分析性能。

んど報告されておらず、超高感度核酸医薬品分析の新たな標準検出法を切り拓く重要かつ汎用的な知見が得られたものと考えられる。

核酸の濃縮については、イオン性試料の濃縮に適した二重濃縮法「large-volume dual preconcentration by isotachopheresis and stacking (LDIS)」法を自動分析で適用するため、CE-MS においてアウトレット末端から泳動液を引き込む自動分析システムの開発を行った。中間報告では $n=25$ スケールで安定な分析を行えることを報告したが、濃縮効率が 100 倍程度に留まること、 $n=100$ スケールで再現性を取ることが難しかったことから、濃縮法として新たに electrokinetic supercharging (動電過給濃縮, EKS) 法を検討した。EKS 濃縮は LDIS と同じ電場増強スタッキングと等速電気泳動を組み合わせた濃縮だが、試料を圧力注入するのではなく、電気的に濃縮しながら注入する点で異なり、装置をカスタマイズすることなく $n=100$ スケールの CE-MS 自動分析を実施できる。一方、EKS で用いる mm スケール (バルクスケール) の試料バイアルの特性として、電場及び溶液対流を安定させることが難しい。その結果、濃縮効率は良いが再現性に乏しいという欠点を抱えていた。そこで本研究では、対流が起こりにくく均一な電場を印加可能なマイクロ流路を備えた試料注入デバイスを新開発した。実際にこのバイアルを用い、モデル試料として fomivirsen, patisiran の EKS-CE-MS 分析を行ったところ、濃縮無しの時と比較して最大 3000 倍の濃縮効率を実現し、検量線においても良好な線形性を確認した (図 2)。検出下限は 1.8 pM (1.8 amol/ μ L, S/N = 3) と算出され、世界最高感度のオリゴ核酸の MS 分析を達成した。

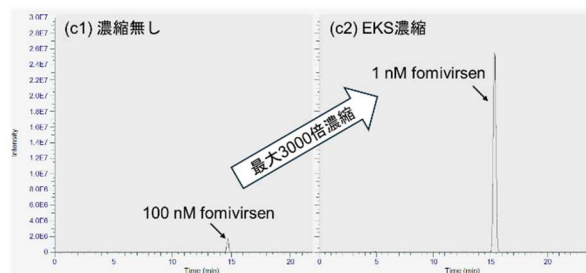


図 2. EKS 濃縮による核酸医薬品の超高感度分析. 最大 3000 倍の濃縮を実現.

(2) 動物実験

モデル動物を用い、研究開発項目 (1) で開発した CE-MS 分析技術の性能を検証した。

まず ADC ペイロードやペプチドの薬剤送達量の測定を行うため、ヒト食道癌由来細胞株である OE-19 やヒト大腸がん由来細胞株である colo320 などを皮下移植した Xenograft モデルマウスを作成した。モデル ADC として抗 HER3-DXd を 10 mg/kg で投与し、48 h 後に血液や組織ホモジネート中の DXd 濃度を LC-MS で測定したところ、2.9~14 pmol/g 濃度であることを確認し、組織の比重を 1 と仮定すると組織内濃度は 10 nM 前後と極めて低濃度であることが判明した。LC-MS は一般的な逆相モードでの分離と高感度なトリプル四重極型 MS を組み合わせたシステムであり、定量下限は 50 pM (500 amol), 検量線の $R^2 > 0.999$ と分析性能は良好であった。一方で LDMS-CE-MS の分析感度は 420 fM (420 zmol) であったことから、1200 倍少ないサンプルであっても解析できることが期待された。

そこで LDMS-CE-MS でミクロスケール PK 解析が実現できると予想し、組織微小環境の CE-MS 分析および薬物動態解析を実施した。OE-19 および colo320 の 2 種類を移植した heterograft マウスを作成し、抗 HER3-DXd を 10 mg/kg で投与し、24 時間後に組織を摘出して 10 μ m 厚の凍結切片を作製し、隣接する 2 枚以上の切片から 1 枚は HE 染色や免疫染色を行い標的細胞 (HER3 陽性領域) が多い領域を決定した。この情報をベースに非染色のもう 1 枚の切片から標的細胞領域およびそれ以外の領域をレーザーマイクロダイセクション (LMD) を用いて採取した。得られた切片からメタノールで薬剤を抽出し、LDMS-CE-MS で DXd を解析したところ 49 ~ 102 amol/ mm^2 と定量された (厚み 10 μ m, 比重 1 とすると、4.9 ~ 10.2 nM となり LC-MS のバルクスケール定量値と近い値が得られた)。濃度分布を確認したところ、HER3 陽性株である OE-19 細胞由来の領域から HER3 陰性株領域である colo320 領域にかけて濃度勾配が形成されていることが確認され、単一細胞株で得られた定量値よりも差が大きく縮まった定量値が得られたことから、ADC が細胞に取り込まれてペイロードが放出され、その後周辺の細胞へと膜透過を通じて拡散していく「bystander 効果」を世界で初めて可視化することに成功した (図 3)。最終的に生検で採取された 1 mm 幅程度の微量の臨床検体の解析にも応用することに成功し、マウスと同様の結果が得られたことから、マウスを利用した非臨床 POC 取得のための分析パイプラインをそのまま用いてヒト臨床

検体を用いた臨床 POC を取得できることが示された (*Br. J. Pharmacol.* **2023**, *180*, 762)。

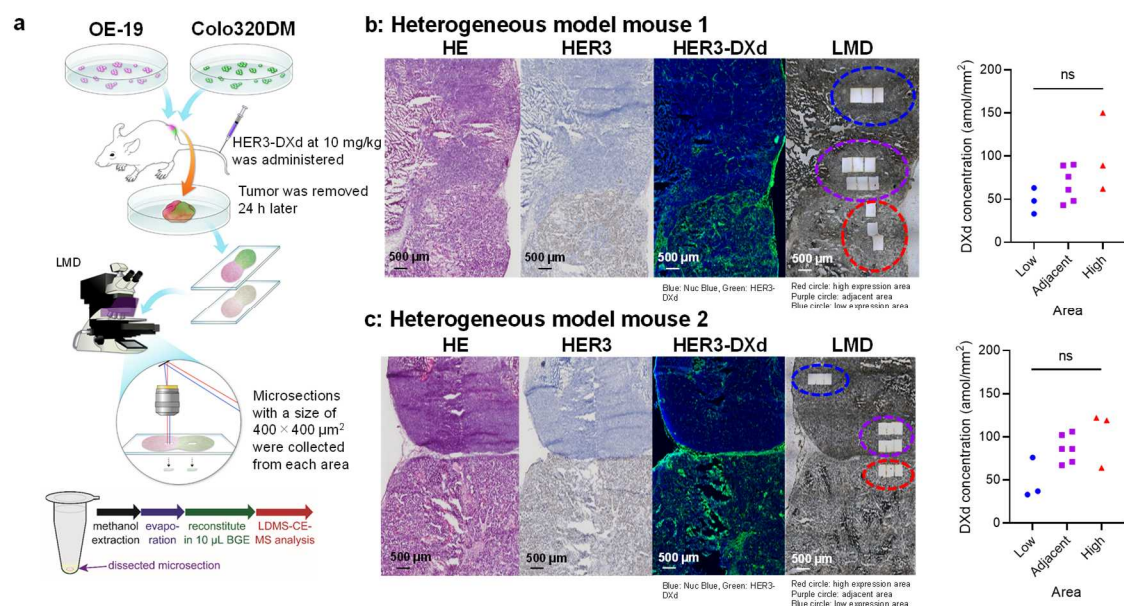


図 3. Heterograft モデルマウスを用いた HER3-DXd の薬物動態解析結果. ヒト検体への外挿にも成功した.

続いて組織中の核酸解析パイプラインを開発した。核酸は細胞内部の核酸・タンパク質に強く結合しているため、有機溶媒だけでは抽出できない。そこで近年の核酸医薬品の解析で頻繁に利用される市販キットを利用して核酸の回収を検証したところ、培養細胞からは十分に抽出・回収が可能であるが、組織からは回収効率が低くまた安定性も低いことが示唆された。そこで本研究では、より強力な TRI 試薬を用いて組織を破碎し、その後 1-bromo-3-chloropropane (BCP) を用いて液液抽出を行うことで、安定的に組織中の核酸を抽出することに成功した。続いて CE-MS 分析が可能なレベルまで核酸を精製するため、本研究では微量分析に適した固相マイクロ抽出カラム (stage tip) を用いた回収を検討した。C18 担体を利用したイオンペア逆相固相抽出を採用したところ、fomivirsen などの骨格が全て PS 化された RNA については 90%程度 の良好な回収率を実現したが、研究で多用される 3',5'両端のみが PS 化された RNA については 20%程度の回収率しか得られなかった。これは PS 化によって疎水性が上昇するためである。そこで PS 化率の低い (疎水性の低い) RNA を効率的にトラップするため、疎水性の高い styrene-divinylbenzene (SDB) 担体を検討したところ、同様の条件で 90-100%の回収率を実現し、また EKS 濃縮に直接利用できるレベルまで夾雑物を除去することにも成功した。実際に本手法を利用し、マウスの組織切片に標準添加した 1 nM の微量核酸を測定したところ、十分な感度で検出することに成功し、組織中の微量核酸医薬品の超高感度 CE-MS 分析を実現するためのパイプラインが完成した。

(3) シーズ対応

(1), (2) で開発したプラットフォームを外部のシーズ研究者のニーズに合わせて調整し、依頼のあった各モデルの解析法の開発およびその薬物動態解析を推進した。連携においては、分担の国立がん研究センターと連携して対応する体制を構築した。初期の連携体制 1 として、分析方法の確立のためにシーズ研究者から薬剤や細胞検体を受領し、これを CE-MS および LC-MS の 2 つの方法で解析することで、定量信頼性を確保する。続く連携体制 2 では、組織薬物動態解析のためにがんセンターにおいて組織薄切の作成・病理解析および LC-MS バルク解析を行い、続いて九州大学にて薄切の LMD サンプルングと超高感度 CE-MS 薬物動態解析を行う体制を構築し、合計 7 件のシーズ対応研究を推進した。

1. Development of CE-MS Analytical Technologies

We developed ultrasensitive capillary electrophoresis–mass spectrometry (CE-MS) platforms for peptide drugs, antibody–drug conjugates (ADCs), and oligonucleotide therapeutics. For peptide drugs and ADC payloads, we focused on their high hydrophobicity and developed large-volume dual preconcentration by micelle collapse and sweeping (LDMS). Using DXd as a model ADC payload, LDMS-CE-MS achieved approximately 1,000-fold sensitivity enhancement compared with non-preconcentrated CE-MS. The method showed excellent linearity ($R^2 > 0.999$) and a lower limit of quantification of 420 fM (420 zmol/ μ L, S/N = 10). By applying daily quality-control correction, stable large-scale analysis was achieved with 9.8% RSD for $n = 200$, demonstrating robustness comparable to conventional LC-MS. Similar 100-zmol/ μ L-level sensitivity was confirmed for exatecan, cligosiban, and cyclosporin A.

For oligonucleotide therapeutics, separation, ionization, and preconcentration conditions were optimized using fomivirsen. We found that positive-ion mode CE-MS under mildly basic conditions, combined with elevated ion-source temperature, reduced adduct formation and greatly improved sensitivity. This finding provides a new detection strategy for ultrasensitive oligonucleotide analysis. For preconcentration, we developed an electrokinetic supercharging (EKS)-CE-MS system using a newly designed microchannel-based sample-injection device that suppresses convection and stabilizes the electric field. Using fomivirsen and patisiran, this system achieved up to 3,000-fold enrichment, good calibration linearity, and a detection limit of 1.8 pM (1.8 amol/ μ L), representing world-leading sensitivity for MS-based oligonucleotide analysis.

2. Validation Using Animal Models and Tissue Pharmacokinetic Analysis

The developed CE-MS technologies were validated using mouse models. Xenograft mice bearing OE-19 human esophageal cancer cells or colo320 human colorectal cancer cells were treated with anti-HER3-DXd at 10 mg/kg. Conventional LC-MS analysis of blood and tissue homogenates showed DXd concentrations of 2.9–14 pmol/g, corresponding to approximately 10 nM in tissue. Although LC-MS showed good performance with a lower limit of quantification of 50 pM, LDMS-CE-MS offered much higher sensitivity (420 fM), enabling analysis with approximately 1,200-fold less sample.

We therefore applied LDMS-CE-MS to microscale tissue pharmacokinetic analysis. In heterograft mice bearing both OE-19 and colo320 tumors, 10- μ m frozen sections were prepared after anti-HER3-DXd administration. HER3-positive and HER3-negative regions were identified by staining of adjacent sections and collected by laser microdissection. DXd extracted from these regions was quantified at 49–102 amol/mm², corresponding to 4.9–10.2 nM, consistent with bulk LC-MS results. Spatial analysis revealed a concentration gradient from HER3-positive OE-19 regions to HER3-negative colo320 regions, directly visualizing the ADC bystander effect. The same workflow was successfully applied to biopsy-scale human clinical specimens, demonstrating its applicability to clinical proof-of-concept studies.

We also established a tissue-analysis pipeline for oligonucleotide therapeutics. Because oligonucleotides strongly interact with intracellular biomolecules, we introduced TRI reagent-based tissue homogenization followed by 1-bromo-3-chloropropane extraction. For CE-MS-compatible purification, a stage-tip solid-phase extraction method was optimized. While C18 extraction efficiently recovered fully phosphorothioated RNA, styrene–divinylbenzene sorbent enabled 90–100% recovery even for less hydrophobic partially phosphorothioated RNA and sufficiently removed matrix components for direct EKS-CE-MS analysis. Using this workflow, 1 nM oligonucleotide spiked into mouse tissue sections was successfully detected.

3. Application to External Seed Projects

The developed platforms were adapted to external seed projects in collaboration with the National Cancer Center. Drugs and cell samples were first analyzed by both CE-MS and LC-MS to ensure quantitative reliability. For tissue pharmacokinetic studies, the National Cancer Center performed tissue sectioning, pathological evaluation, and bulk LC-MS analysis, while Kyushu University conducted laser microdissection sampling and ultrasensitive CE-MS analysis. Through this framework, we supported seven seed projects involving multiple therapeutic modalities.