

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：高分解能 X 線計測と高感度蛍光計測を併用した薬物動態と薬効の評価技術開発

Development of evaluation technology for pharmacokinetics and drug efficacy combining high-resolution
X-ray and high-sensitivity fluorescence measurements

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：権田 幸祐

Kohsuke Gonda

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人東北大学 大学院医学系研究科 教授

Professor, Graduate School of Medicine, Tohoku University

II 研究開発の概要

研究開発成果概要：

本研究開発課題では、低分子薬物、抗体医薬、薬物内包ポリマーなどをモデル薬物とし、癌組織内の薬物動態と薬効を、X 線と蛍光を併用した光イメージングにより、分子・細胞から組織全体にわたり、低侵襲・3 次元・経時的に可視化・解析する技術開発を目指している。具体的には、X 線吸収性の高い金原子を材料として、異なるサイズの金ナノ粒子を薬物、細胞、腫瘍血管の標識剤として開発・応用する。金標識された薬物・細胞・組織を、実験室のマイクロ X 線 CT や NanoTerasu 等の放射光（高輝度 X 線）施設の X 線 CT 装置でイメージングし、薬物や細胞の生体内分布および腫瘍血管構造の高分解能計測を行う。実験室 X 線は *in vivo* 観察が可能である点に優れているが、それよりも光子密度が格段に高い放射光計測では、光子の波動性と粒子性の特性を使い分け、位相コントラスト X 線 CT イメージングと吸収コントラスト X 線 CT イメージングを実施することで、腫瘍全体から微小環境に至るまでの可視化を試みた。また、薬物や腫瘍関連細胞の状態を、高輝度蛍光ナノ粒子による蛍光免疫染色や燐光を用いたイメージングにより高精度に解析した。さらに X 線と蛍光を融合させ、腫瘍組織内の病態や腫瘍の薬物取り込み能を定量的に評価することを目的として研究開発を進めた。

研究開発成果の詳細：

1) 金ナノ粒子を用いた薬物や腫瘍関連細胞の動態解析

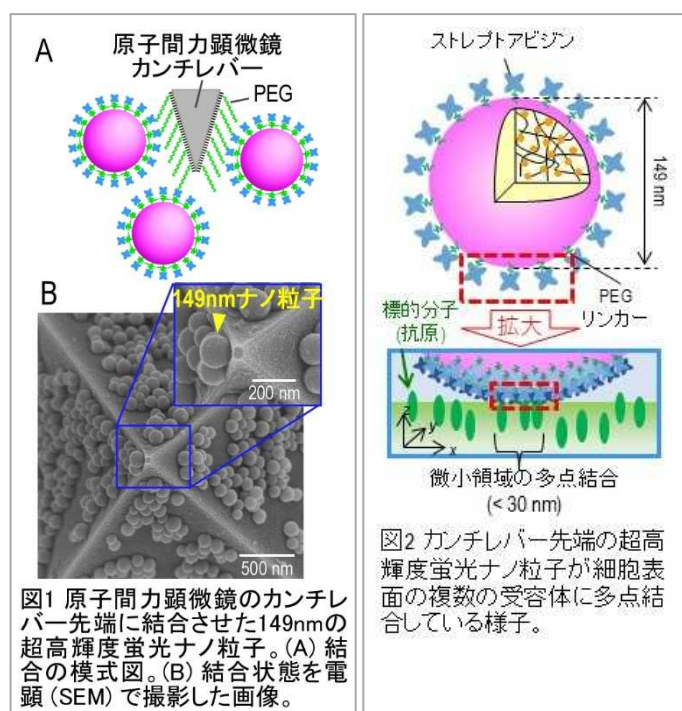
抗体医薬に関して、複数の薬物の抗原結合性を阻害することなく、金ナノ粒子で標識することに成功した。また、実験室のマイクロ X 線 CT による定量的な評価により、抗体 1 分子に対し、どの程度の個数の金ナノ粒子が結合しているかを算出することができた。さらに、生体から摘出した腫瘍組織を観察に適した大きさに調整した後、放射光を用いることにより、1mm を超えるサイズの組織において、金ナノ粒子標識した薬物の三次元分布を詳細に評価することにも成功した。

腫瘍関連細胞に関しては、独自の手法で金ナノ粒子を細胞内に取り込ませ、標識することに成功した。次に、金ナノ粒子標識した細胞を腫瘍組織に注入し、*in vivo* における細胞動態の観察を試みた。その結果、手術侵襲を伴わずに3次元で経時的な観察を行い、24時間後までの細胞動態を評価することに成功した。

2) 高輝度蛍光ナノ粒子を用いた蛍光免疫染色や燐光イメージングによる癌関連細胞の病態解析

これまでに我々は、149nm 径の高輝度蛍光ナノ粒子を開発し、癌組織の蛍光免疫染色の開発と応用を行ってきた (*Sci. Rep.*, 2017; *Cancers*, 2019; *Cancers*, 2023)。高輝度ナノ粒子による染色は、従来の蛍光色素による染色に対して約 300 倍の感度を持ち、蛋白質発現量における微量な変化を捉えることができる (*Sci. Rep.*, 2017)。高感度イメージングを実現できる理由は、149nm の高輝度蛍光ナノ粒子の表層に約 2,460 個のストレプトアビジン (SA) が PEG を介して結合しており、これによりビオチン化した 2 次抗体と多数反応することが可能となり、感度を高めているためである。さらに、このナノ粒子の物性を活用することで、1 次抗体と 2 次抗体の結合を介して、癌の増殖に関わる重要な標的因子の密集度合いを評価できることに着想した。

乳癌の重要な因子として HER ファミリー (Human Epidermal Growth Factor Receptor) が挙げられる。HER ファミリーは細胞表面にある受容体型チロシンキナーゼの一種で、細胞の増殖・生存・分化などを制御する。ファミリーには HER1~4 があり、各因子がホモダイマーやヘテロダイマーを形成して、ERK 経路や PI3K-AKT 経路を活性化する。中でも HER2-HER3 ヘテロダイマーは、乳癌の増殖シグナルとして特に重要であり、近年は薬剤抵抗性への関与も示唆されている。HER2 のホモダイマー形成抑制には抗体医薬 Trastuzumab、HER2-HER3 のヘテロダイマー形成抑制には抗体医薬 Pertuzumab が利用されている。Trastuzumab は、DNA 合成阻害剤 (DXd) と複合体化させた抗体薬物複合体 (ADC) にも応用されており、最近では Pertuzumab の ADC 応用も検討されている。



これらの抗体医薬の薬効には HER2 や HER3 の発現量が重要であるが、近年は「HER2 や HER3 がどれだけ存在するか」だけでなく、「それらがホモおよびヘテロダイマーの形成において、相互作用しやすい空間配置にあるか」まで評価することが、悪性度や薬剤抵抗性の理解・予測には必要であると示唆されている。そこで本研究では、149nm の高輝度蛍光ナノ粒子を原子間力顕微鏡のカンチレバー先端に結合させ (図 1)、カンチレバーを HER2 や HER3 を発現する乳癌細胞の切片に押し当て、HER2 や HER3 のみの場合と、両者を発現している場合における密集度合いを評価した (図 2)。その結果、HER2 や HER3 が単独で存在する場合に比べ、両者を発現している方が密集度合いが高く、細胞の局所部位 (ホットスポット) から HER 由来のシグナルが細胞内に伝わりやすいことを明らかにした (*Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 2025)。この知見は、Trastuzumab や関連する抗体薬物複合体の標的因子結合や薬効に関する重要な情報となり、創薬への活用が期待できる。

蛍光に準ずる発光プローブとして、低酸素に反応し、残光性に優れた燐光剤 (Ir(ppy)_3) がある (図 3)。本研究では、細胞内の酸素濃度や酸素需要を評価するため、難水溶性の Ir(ppy)_3 を生体適合性の高い MPC ポリマーミセルに封入した新規酸素センサーを開発した。ミセル化により、 Ir(ppy)_3 の水中分散性と細胞内導入性が向上し、特に 6 nmol/mg polymer の条件で強いリン光と優れた酸素応答性が得られた。このセンサーを乳癌細胞に導入したところ、低酸素環境下でリン光強度が増加した。KPL-4 細胞と MDA-MB231 細胞ではリン光変化のタイムコース

が異なることから、細胞種ごとの酸素消費特性の違いを評価できる可能性が示された。さらに、NK 細胞の培養細胞である NK92-CD16 細胞では、通常グルコース条件では低酸素に伴うリン光増強が明瞭に観察された一方、高グルコース条件ではその応答が抑制され、免疫細胞の代謝的酸素需要が低下することが示唆された (*Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2026)。本研究で開発した MPC ミセル型酸素センサーは、細胞質内に安定に保持されるため、細胞内酸素動態や免疫細胞代謝を簡便に評価できる有用なプラットフォームになると考えられる。

3) 金ナノ粒子を用いた腫瘍の薬物取込み能の解析

血管新生阻害剤は、血管新生に多くの因子 (VEGF, PDGF, FGF など) が関与するため、開発当初の目的であった「血管形成阻害による直接的な抗腫瘍効果」の実現には至らなかった。しかし、急速で無秩序な血管新生を抑制することで「腫瘍血管の構造正常化」を促進し、これが癌治療や薬剤送達において以下に挙げるメリットをもたらすことが判明している。

- 血流回復による低酸素状態の改善
- 腫瘍組織圧の変化
- 免疫細胞の腫瘍浸潤性の向上

本研究では、これらの影響を検討するため、金ナノ粒子や蛍光ナノ粒子を用い、血管新生阻害剤が腫瘍の薬物取込み能や癌免疫療法へ及ぼす効果について、放射光を用いた位相コントラスト X 線 CT や吸収コントラスト X 線 CT の技術も利用し検討を行った。その結果、血管新生阻害剤の利用に関して新たな病態メカニズムを見出すことに成功し、血管新生阻害剤の開発や併用療法に有用な知見を得ることができた。

以上、(1)～(3)の項目において、意義深い多くのデータを得ることができた。現在、これらの項目を統合する解析をさらに進めており、創薬支援に資するイメージング技術のさらなる向上に取り組んでいる。

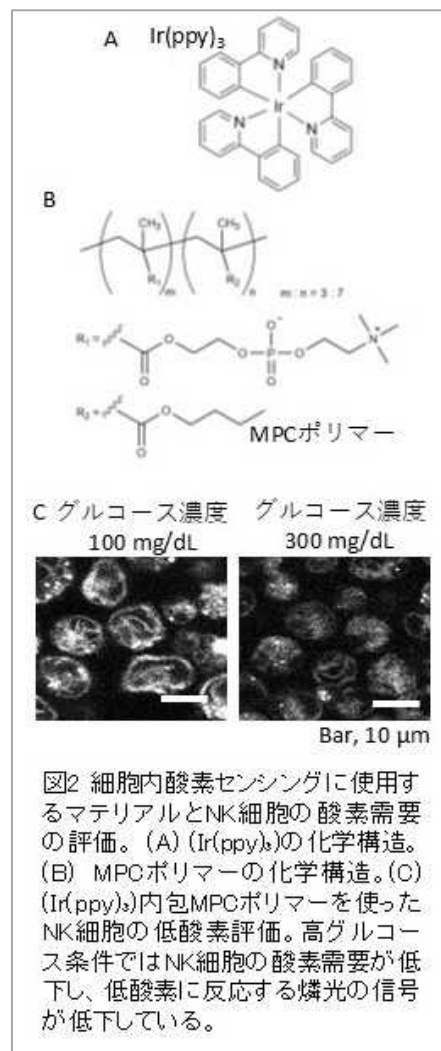


図2 細胞内酸素センシングに使用する材料とNK細胞の酸素需要の評価。(A) Ir(ppy)₃の化学構造。(B) MPCポリマーの化学構造。(C) Ir(ppy)₃内包MPCポリマーを使ったNK細胞の低酸素評価。高グルコース条件ではNK細胞の酸素需要が低下し、低酸素に反応する蛍光の信号が低下している。

Summary of Research and Development (R&D)

Project Overview

This research project aims to develop a platform for the low-invasive, 3D, and chronological visualization of pharmacokinetics and drug efficacy within tumor tissues. By utilizing small-molecule drugs, antibody drugs, and drug-encapsulating polymers, we integrated X-ray and fluorescence imaging to bridge the gap between molecular-level observations and whole-tissue analysis. Specifically, we applied gold nanoparticles (AuNPs) of various sizes as labeling agents. Using both laboratory micro-X-ray CT for in vivo observation and synchrotron radiation (high-brightness X-ray) CT at facilities like NanoTerasu, we performed phase-contrast and absorption-contrast imaging. This approach allowed for high-resolution measurements of biodistribution and tumor vascular architecture from the macro scale down to the microenvironment.

Details of R&D Results

1. Kinetic Analysis Using Gold Nanoparticles (AuNPs)

We successfully labeled multiple therapeutic antibody drugs with AuNPs without compromising their antigen-binding affinity. Using laboratory micro-X-ray CT, we established a method to calculate the specific number of AuNPs conjugated per antibody molecule. Furthermore, by optimizing tissue size and utilizing synchrotron radiation, we achieved detailed 3D evaluations of drug distribution within tissues exceeding 1 mm. For cellular analysis, a proprietary method was used to internalize AuNPs, allowing for the chronological 3D observation of in vivo cellular dynamics for up to 24 hours without the need for surgical intervention.

2. Pathological Analysis via High-Brightness Nanoparticles and Phosphorescence

We developed high-brightness fluorescent nanoparticles (149 nm) providing 300 times higher sensitivity than conventional dyes. This sensitivity is achieved by conjugating approximately 2,460 streptavidin molecules onto the particle surface via PEG linkers.

HER2/HER3 Analysis: Using these particles with Atomic Force Microscopy (AFM), we evaluated the microregional density of HER family receptors. We discovered that co-expression of HER2 and HER3 (as seen in AU565 cells) actually interferes with receptor clustering compared to single-receptor overexpressing cells (SKOV3 or MCF7). This provides critical data for predicting the efficacy of Trastuzumab and related ADCs.

Oxygen Sensing: We developed a novel oxygen sensor by encapsulating phosphorescent Ir(ppy)₃ within biocompatible MPC polymer micelles. This sensor revealed that high-glucose environments suppress the metabolic oxygen demand of immune cells (NK92-CD16), offering a platform to evaluate intracellular oxygen dynamics and metabolism.

3. Analysis of Tumor Drug Uptake Capacity

We investigated how angiogenesis inhibitors promote "change of vascular structure " rather than just inhibiting vessel formation. Using synchrotron X-ray CT and fluorescent nanoparticles, we confirmed that suppressing disordered angiogenesis improves blood flow, modulates interstitial fluid pressure, and enhances immune cell infiltration. These findings identified new pathological mechanisms that are valuable for the development of more effective inhibitor-based combination therapies.

Conclusion

This research has yielded substantial data through the integration of X-ray and fluorescence methodologies. These results provide a quantitative framework for evaluating pathological conditions and drug uptake, and we are currently advancing these integrated analyses to further enhance imaging technologies that support the drug discovery process.