

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：高輝度蛍光標識プローブを用いた二次元から三次元への薬物動態解析による創薬技術支援の基盤構築

Study of supporting drug discovery and drug development of a new modality agent by 2-dimensional to 3-dimensional imaging pharmacokinetic analysis using high-intensity fluorescence-labeled probes

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：濱田 哲暢

Hamada Akinobu

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立研究開発法人国立がん研究センター 研究所 分子薬理研究分野 分野長

Division of Molecular Pharmacology, National Cancer Center Research Institute, Chief of division

II 研究開発の概要

1. 研究開発の背景と目的

本研究では、従来の血中薬物濃度や組織ホモジネート解析のみでは評価困難であった「組織内薬物分布の不均一性」に着目し、薬剤が実際に標的組織や細胞へどのように到達・分布・作用するかを、二次元（2D）および三次元（3D）イメージング技術を用いて可視化・定量化する創薬支援基盤の開発が進めた。特に、抗体薬物複合体（ADC）や核酸医薬など新規モダリティを対象とした薬物動態解析技術の高度化を目指し、マクロ PK（血中濃度・組織濃度）とミクロ PK（組織内空間分布）の統合解析、さらに QSP（Quantitative Systems Pharmacology）モデルとの連携による臨床外挿への応用を目指した。研究開発項目として、①蛍光イメージング技術の最適化、②組織透明化技術を用いた 3D イメージング、③QSP 解析への展開、④核酸医薬・Morpholino 型 ASO・骨 DDS などの実際の創薬シーズへの応用研究である。

2. 研究開発項目と成果

①蛍光イメージング技術の最適化

HER2 陽性 PDX モデルを用いたトラスツズマブの腫瘍内分布解析が行われた。PID imaging 法により、HER2 発現と抗体送達量は必ずしも一致せず、抗体薬は血管近傍に偏在し、腫瘍全体への均一な到達が困難であることが示された。HER2 発現部位へのトラスツズマブ到達率は約 50%程度であり、抗体医薬の分布は抗原発現だけでなく、血管構造や組織構造にも強く影響されることが明らかとなった。また、抗体薬の組織浸潤距離は 20～80 μm 程度であり、薬剤送達改善のためには血管新生阻害薬や放射線治療との併用など、集学的アプローチの必要性が示唆された。さらに、エンドサイトーシスを介した細胞内取り込みについても、細胞内小器官マーカーを用いた共局在解析が進められ、抗体薬の細胞内動態解析への応用可能性が示された。一方、レギュラトリーサイエンスの観点から、製薬企業等を対象としたアンケート調査により、蛍光イメージング技術の周知度は高いものの、測定デ

一タの検証法の確立が課題であることが浮き彫りとなり、今後の課題と考えられる。

②組織透明化技術を用いた 3D イメージング

CUBIC 法および新規開発された簡易型ライトシート顕微鏡「descSPIM」を用いて、蛍光標識トラスツズマブの腫瘍内 3D 分布解析が実施された。BT-474 乳がんモデルを用いた検討では、腫瘍内血管と薬剤分布を同時に三次元的に可視化することに成功し、薬物分布距離の 95 パーセンタイルが血管から約 70 μm であることが確認された。この値は 2D PID imaging 解析結果とも一致しており、3D 解析の妥当性が示された。また、腫瘍内部では薬剤分布が極めて不均一であり、薬剤が高濃度に到達する領域と、ほとんど到達しない領域が混在することが定量的に明らかとなった。さらに VISIUM 解析を併用し、薬剤分布に影響する腫瘍内因子の探索も進められた。

③QSP 解析への展開

ASO（アンチセンス核酸）や抗体医薬の体内動態を数理的に記述する PBPK/QSP モデルの構築が進められた。抗体医薬については、血管透過、腫瘍内拡散、標的タンパクとの結合・乖離、内在化などを含む数理モデルを MATLAB 上に実装し、HER2 発現量や内在化速度などをパラメータとして濃度推移計算が可能な解析環境を構築した。また、Cluster Gauss Newton 法（CGNM）を導入することで、実験データを説明可能な複数のパラメータセット抽出が可能となり、QSP 解析の実用化に向けた基盤が整備された。

④創薬シーズへの応用研究

核酸医薬ヌシネルセンおよび Morpholino 型 ASO の薬物動態解析法構築が実施された。高分解能 Orbitrap 質量分析装置を用いることで、fragmentation を用いない高選択的定量法を確立し、血中濃度および組織内濃度測定法を構築した。Morpholino 型 ASO やデンドリマー修飾核酸についても、抽出・定量法の最適化が行われ、in vivo マウス試験による薬物動態評価が完遂された。

骨 DDS 研究として、低分子ヘパリン（LMWH）と BMP-2 を用いた人工骨移植モデルに対する PID imaging 解析が行われた。LMWH-D8 を用いた BMP-2 保持効果により、人工骨周囲での BMP-2 シグナル増強と骨癒合促進が示唆され、DDS 製剤評価への PID imaging 応用可能性が示された。

3. 課題終了後の展望と産業応用

本研究全体を通じて、2D/3D 空間薬物動態解析技術の有用性が確認され、抗体医薬や核酸医薬など新規モダリティに対する創薬支援基盤としての発展性が示された。一方で、定量性評価、解析標準化、バリデーション方法、レギュラトリーサイエンス上の整理など、実用化に向けた課題も明確化された。研究終了後は、DDS 製剤評価、新規がん治療戦略、QSP を用いた有効性・安全性予測、さらには製薬企業・CRO との産業応用・技術導出を視野に研究が計画されている。すなわち、薬剤分布の不均一性の背景にあるメカニズムをマルチオミクス解析で解明し、分布を改善させる新たな創薬・治療戦略への展開を目指す。

This study aimed to establish a drug discovery support platform capable of visualizing and quantifying the heterogeneous intratumoral distribution of therapeutics, which cannot be sufficiently evaluated by conventional plasma pharmacokinetics or tissue homogenate analyses alone. Using two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) imaging technologies, we investigated how drugs are delivered, distributed, and exert their effects within target tissues and cells.

In fluorescence imaging analyses, the intratumoral distribution of trastuzumab was evaluated using HER2-positive patient-derived xenograft (PDX) models. PID imaging demonstrated that antibody distribution was not uniformly correlated with HER2 expression and was preferentially localized near the tumor vasculature. The estimated delivery efficiency of trastuzumab to HER2-positive regions was approximately 50%, indicating that antibody delivery is strongly influenced not only by antigen expression but also by vascular and tissue architecture. The penetration distance of antibody therapeutics was estimated to be approximately 20–80 μm , suggesting that combination strategies such as anti-angiogenic therapy or radiotherapy may be required to improve drug delivery. In addition, co-localization analyses using intracellular organelle markers demonstrated the feasibility of evaluating intracellular trafficking and endocytosis of antibody therapeutics.

For 3D imaging analyses, tissue clearing using the CUBIC method combined with the newly developed compact light-sheet microscope “descSPIM” enabled three-dimensional visualization of tumor vasculature and antibody distribution. The 95th percentile of drug distribution distance from blood vessels was approximately 70 μm , which was consistent with the 2D PID imaging results. Importantly, highly heterogeneous intratumoral drug distribution was quantitatively demonstrated, with regions of high accumulation coexisting alongside areas with minimal drug distribution.

In the QSP studies, physiologically based pharmacokinetic (PBPK)/QSP models were developed for antisense oligonucleotides (ASOs) and antibody therapeutics. Mathematical models incorporating vascular permeability, intratumoral diffusion, target binding, dissociation, and internalization were implemented. Furthermore, the Cluster Gauss-Newton Method (CGNM) was introduced to identify multiple parameter sets capable of explaining the experimental data.

In addition, highly selective analytical methods using high-resolution Orbitrap mass spectrometry were established for nusinersen and Morpholino-type ASOs, enabling *in vivo* pharmacokinetic evaluation. In bone DDS studies using low-molecular-weight heparin (LMWH) and BMP-2, PID imaging demonstrated enhanced BMP-2 retention and suggested enhanced bone regeneration.

Overall, this study demonstrated that 2D/3D spatial pharmacokinetic imaging technologies can serve as a valuable drug discovery support platform for novel therapeutic modalities. At the same time, challenges related to quantitative validation, standardization, and regulatory science considerations were identified. Future studies will focus on elucidating the mechanisms underlying heterogeneous drug distribution using multi-omics approaches and translating these findings into novel DDS strategies, innovative therapeutic approaches, and industrial applications in collaboration with pharmaceutical companies and CROs.