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：新しい医薬品モダリティ・ワクチンや感染症治療薬の動態評価のための PET イメージング技術の高度化に関する研究

Advancing PET imaging technologies for pharmacokinetic evaluation of emerging drug modalities, including vaccines and anti-infective therapeutics

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：向井　英史

Hidefumi Mukai

研究開発代表者　所属機関・部署・役職：

国立大学法人長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科医薬品情報学分野　准教授

Department of Pharmaceutical Informatics, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University

II 研究開発の概要

PET は齧歯類からヒトまでシームレスに活用できるイメージングモダリティであり、特にその定量性や時間分解能の高さから薬物動態研究・創薬へ応用されている。これまで不可能であったヒトでの組織中薬物濃度の直接的な評価が可能になったことは大きなブレイクスルーとなっており、薬物動態と薬効の関連を強く結びつけた、より実証的な医薬品開発の実現が期待されている。これまでの対象は低分子や抗体医薬品が主であったが、COVID-19 ワクチンで脚光を浴びている mRNA 医薬品のような新しい医薬品モダリティやその DDS 製剤には、薬物動態制御の重要性がより高いものが多く、PET イメージング活用創薬の適応の拡張が望まれる。

本研究開発では、第一に、新しい医薬品モダリティに適応可能なポジトロン放出核種標識技術の高度化を進めた。特に、mRNA 医薬とその脂質ナノ粒子（LNP）製剤、細胞医薬、小型細胞外小胞（エクソソーム）医薬などについて、ポジトロン放出核種標識や QC 技術を高度化して確立した。第二に、静脈内投与に加え、筋肉内投与後のリンパ移行、経鼻吸収による脳デリバリー、経皮吸収など多様な投与経路での PET 動態研究を実施した。PET の高い時間分解能を活かした薬物動態学的解析により、組織取り込みの律速段階や機序などについて詳細な議論を行った。第三に、長崎大学の放射線総合センター・BSL3 区画内分子イメージングエリア内に、感染モデル動物でも、高いクオリティで PET や SPECT を用いた薬物動態研究ができる環境を整え、感染症疑似病態として、急性／慢性肝炎モデルでの mRNA-LNPs の PET 動態研究を実施した。第四に、計 7 件のシーズ課題について、シーズ研究者と連携し、特殊な剤型や投与経路に対してもポジトロン放出核種標識や PET 動態研究を遂行し、共著論文が高インパクトジャーナルに掲載されるなどの成果に繋がった（Journal of Extracellular Vesicles や Nature Communications）。以下に、具体的な成果の一部を記載する。

mRNA-LNP について、ポジトロン放出核種標識技術を高度化し、各種投与経路・病態モデルにおける PET 動態研究を実施した。生体内配位安定性の高いクロスブリッジタイプの CB-TE2A キレーターを修飾した短鎖オリゴヌク

レオチドを合成し、相補鎖形成による[^{64}Cu]Cu 標識 mRNA の調製に成功した。ポジトロン放出核種が短半減期なため、細孔径の大きな透析膜を用いるなどの工夫により、標識後の粒子形成や精製に要する時間を大幅に短縮した。QC 評価として、粒子サイズや ζ 電位、mRNA 封入率、タンパク質発現の同等性を確認した。特に、培養細胞株におけるルシフェラーゼ発現も、[^{64}Cu]Cu 標識 Luc-mRNA-LNP は非標識 Luc-mRNA-LNP と同程度であり、[^{64}Cu]Cu 標識による影響はほとんど認められなかった。本標識法は、標識純度やモル放射能が高い[^{64}Cu]Cu 標識 mRNA を作製可能で、PET 研究に適しており、様々な mRNA 医薬に対しても汎用性が高く、タンパク質発現への影響も極めて少ない標識方法である。以上、COVID-19 に対するワクチンの剤形として脚光を浴び、感染症治療薬やがんワクチンとしても活発に開発が進められており、社会的ニーズの高い mRNA-LNP 製剤に対して、短時間の作製条件において品質性および再現性の高い、PET 研究に使用可能な高水準の[^{64}Cu]Cu 標識 mRNA-LNP の作製法および QC 評価法を確立した。

マウス尾静脈内投与した後の[^{64}Cu]標識 mRNA-LNP の PET 動態研究を実施した。[^{64}Cu]標識 mRNA-LNP は全身に分布し、投与 45 分後には主に肝臓や脾臓に集積した。画像解析により得た時間―活性曲線では、肝臓集積において非常に特徴的な 2 段階の集積プロファイルが認められた。投与直後に 10 %ID/g 程度までの集積で一旦プラトーになった後、10 分後から集積は急激に増加し、最終的に 30 %ID/g 程度になった。ApoE 欠損マウスの肝臓集積では 2 段階目の集積が認められなかったため、健常マウスにおいてみられたこの 2 段階目の集積には ApoE の関与が明確に示された。多くの mRNA-LNP は、血液中で PEG 脂質が脱離した後に、粒子表面に内因性 ApoE が結合したプロテインコロナを形成することで肝細胞での取り込みが促進されると考えられている。今回得られた[^{64}Cu]Cu 標識 mRNA-LNP の肝臓集積における 2 段階プロファイルは、mRNA-LNP のプロテインコロナ形成過程を反映した動態プロファイルを初めて示したものである。加えて、動態情報の乏しいニューモダリティにおいて、PET イメージングに基づく時間分解能に優れた動態解析の有用性を強調している。さらに、マウス左脚に投与した[^{64}Cu]Cu 標識 mRNA-LNP は長時間に渡って投与部位に残存し、投与 1 時間後に 78%、3 時間後に 66%、6 時間後に 57%、24 時間後に 27%が残存していた。投与部位である筋肉から漏出した[^{64}Cu]Cu 標識 mRNA-LNP は、主に肝臓や脾臓に分布した。投与部位近傍の鼠経リンパ節および膝窩リンパ節でも高い放射活性が検出され、[^{64}Cu]Cu 標識 mRNA-LNP の効率的なリンパ節移行を確認した。PET 動態イメージングによる移行性と、ルシフェラーゼレポータータンパク質の発現との比較から、静脈内投与後に ApoE によるプロテインコロナ形成を介して取り込まれた肝細胞、ならびに、筋肉内投与後にリンパ節へ移行した抗原提示細胞において、mRNA-LNPs のタンパク質発現能が著しく高いことが示唆された。静脈内投与後初期段階のデータを integration plot 解析したところ、肝臓の取り込みにおいては、投与後 5 分程度のラグタイムを経た後、約 25 分までの速度定数が大きな取り込み相に加え、25-60 分までの速度定数が小さな取り込み相が観察され、複数のプロセスが mRNA-LNP の肝臓への集積に関与していることが示唆された。apoE 欠損マウスにおける取り込みに係る速度定数は、野生型と比較して、初期相で 78%低下、後期相で 46%低下することが定量化でき、mRNA-LNP における apoE の役割が明確になった（ACS Applied Materials & Interfaces に掲載）。

また、近年脚光を浴びており、海外では臨床試験も進んでいる小型細胞外小胞（sEVs、エクソソーム）医薬については、クロスブリッジ型マクロサイクリックキレート剤（CB-TE1A1P）を用いて、その表面に[^{64}Cu]Cu を標識する方法を開発した。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄して精製した[^{64}Cu]Cu 標識 sEVs からは、20%血漿中 10 分間のインキュベーションで、約半分の[^{64}Cu]Cu が解離した。これは、CB-TE1A1P と配位していない部分的な弱い相互作用を示唆している。精製方法の精緻化が鍵であり、より強いアルブミンを用いた精製を行うことで、[^{64}Cu]Cu の血漿中の解離が大幅に減少し、放射化学的安定性は 95.7%となった。粒子径や ζ 電位、エクソソーム表面マーカー（CD63、CD9、CD81）などを QC 項目とし、一連の標識操作が sEVs の物理化学的および生物学的特性に影響を与えないことを確認した。sEVs 医薬のモデルとして、[^{64}Cu]Cu 標識 Colon-26 由来 sEVs の PET 薬物動態データを取得した。健常マウスでは、[^{64}Cu]Cu 標識 sEVs のほとんどが静脈内投与後 5 分以内に全身血液循環から速やかに排除され、主に肝臓および脾臓に集積した。マクロファージ除去マウスでは、血液中滞留時間が健常マウス

と比較して有意に延長し、投与後初期の肝臓および脾臓への集積は低くなった。肝臓および脾臓での集積は徐々に増加し、4 時間後には健常マウスと同等か、それを上回る値となった。本データは、有望なニューモダリティの 1 つである sEVs の体内動態を、PET を用いて初めて詳細に解析したものである。[^{64}Cu]Cu 標識 sEVs 静脈内投与時のデータを基に、肝臓・脾臓への組織取り込みにおけるマクロファージの寄与や血流への依存度を integration plot 解析により算出した。各組織の取り込みクリアランスを求め、肝臓・脾臓への取り込みにおけるマクロファージの寄与率はそれぞれ 67%、76%であると精緻に示すことができた。加えて、肝臓・脾臓における組織血流速度に対する取り込みクリアランスの比率はそれぞれ 41%、87%であり、肝臓では肝臓組織による取り込み過程に、脾臓では血流供給量に組織取り込みの律速段階があることも推定できた（International Journal of Pharmaceutics に掲載）。

その他、以下のような成果を得た。感染症疑似病態としての急性／慢性肝炎モデルでの mRNA-LNPs の PET 動態研究において、肝炎病態が ApoE との LNP プロテインコロナ形成に影響して mRNA-LNP の体内動態を変化させ、これがタンパク質発現の低下に関与することを見出した。この成果は、肝炎病態を併発する感染症に対する mRNA-LNP 創薬に大きな示唆を与えるものであり、病態に合わせたより精緻な製剤設計の必要性を示している。また、mRNA-LNP 投与によるタンパク質発現については、核医学レポーターイメージングシステムを応用した系を確立し、マウスにおいて、肝臓移行性 LNP 投与後の SPECT によるタンパク質発現の可視化に成功し、その有用性を実証した。さらに、微小組織であるリンパ節の可視化は特に小動物であるほど難しく、リポソームのリンパ節移行を PET により評価した報告はなかったが、[^{64}Cu]Cu 標識リポソームをラットに筋肉内投与して断続的に PET スキャンを行い、これに成功した。この成果は、ワクチン開発において、効率よくリンパ移行する製剤の効率的な選別、動態－活性相関研究などに有用である。加えて、接着細胞・浮遊細胞を問わず汎用できるポジトロン核種の標識プロトコルを確立し、複数の免疫系由来細胞株の PET 動態研究を行った。静脈内投与された標識細胞は、投与直後肺に一時的に分布した後、1-2 時間後には肺からクリアランスされて肝臓へ再分布し、細胞製剤特有の動態を高い時間分可能で描出することが出来た。

本課題において、PET 動態研究の対象を、現在の創薬ニーズ（社会ニーズ）に合わせて、ニューモダリティや感染症創薬へ拡張することに成功した。本課題の期間内に、長崎大学の放射線総合センター・BSL3 区画内分子イメージングエリア内の動物用 PET や SPECT を、最新・高性能モデルのものに更新することができた。ポジトロン放出核種標識や QC、PET 研究の関連実験に使用する機器類も充実しており、BSL3 相当の感染モデル動物を含む様々な病態モデルについて、高いクオリティで PET や SPECT を用いた薬物動態研究ができる環境が整った。こうした成果は学会でも評価されており、代表者は、令和 7 年度日本薬物動態学会奨励賞を、「PET を基盤としたニューモダリティの薬物動態研究と画像診断薬・DDS 開発への展開」のタイトルで受賞した。引き続き、学会や創薬コミュニティにおいて PET の動態評価技術としての重要性や、長崎大学のファシリティについて発信し、企業との共同研究なども行いながら、これら技術基盤の維持と高度化に努めていく。今後の発展・ビジョンとして、トレンドであるラジオセラノスティクス（PET 動態研究を基盤として、放射性核種を用いて診断と治療を一体とした医療）の応用拡大に繋げることも見据えている。

PET is an imaging modality that can be seamlessly applied across species, from rodents to humans, and is widely used in pharmacokinetic research and drug discovery because of its high quantitative accuracy and temporal resolution. The ability to directly quantify drug concentrations in human tissues—previously not feasible—represents a major breakthrough. This capability is expected to facilitate more evidence-based drug development by strengthening the linkage between pharmacokinetics and pharmacodynamics. To date, PET applications have focused mainly on small-molecule and antibody therapeutics. However, for emerging modalities such as mRNA therapeutics, which gained prominence through COVID-19 vaccines, and their associated drug-delivery system (DDS) formulations, pharmacokinetic control is often even more critical. Accordingly, expanding the use of PET imaging in drug discovery is highly desirable.

In this research and development project, we first advanced positron-emitting radiolabeling techniques applicable to emerging pharmaceutical modalities. Specifically, for mRNA therapeutics and their lipid nanoparticle (LNP) formulations, cell therapies, and small extracellular vesicle (exosome) therapeutics, we established advanced methods for positron-emitting radiolabeling and quality control (QC). Second, in addition to intravenous administration, we conducted PET pharmacokinetic studies across multiple administration routes, including lymphatic transport following intramuscular injection, brain delivery via intranasal absorption, and transdermal absorption. Leveraging the high temporal resolution of PET, we performed pharmacokinetic analyses to elucidate rate-limiting steps and mechanisms of tissue uptake. Third, within the BSL-3 zone of the Center for Radiation Research and Education at Nagasaki University, we established an experimental environment that enables high-quality PET- and SPECT-based pharmacokinetic studies using infectious disease animal models. Using acute and chronic hepatitis models as simulated infectious disease conditions, we performed PET pharmacokinetic studies of mRNA–LNP formulations. Fourth, across a total of seven seed projects, we collaborated with seed investigators to conduct positron-emitting radiolabeling and PET pharmacokinetic studies of specialized formulations and administration routes. These efforts led to outcomes including co-authored publications in high-impact journals, such as the Journal of Extracellular Vesicles and Nature Communications.

In this project, we successfully expanded the scope of PET-based pharmacokinetic studies to emerging modalities and anti-infective drug discovery to address current pharmaceutical development and societal needs. During the project period, we upgraded the small-animal PET and SPECT systems in the BSL-3 zone of the Center for Radiation Research and Education at Nagasaki University to state-of-the-art, high-performance platforms. The facility is also fully equipped with the instrumentation needed for positron-emitting radiolabeling, quality control (QC), and PET-related experimental work. This environment enables high-quality pharmacokinetic research using PET and SPECT across a wide range of disease models, including BSL-3 infectious disease animal models. These achievements have been recognized by the academic community. In FY2025, the principal investigator received the Japanese Society for the Study of Xenobiotics (JSSX) Young Scientists Award for “PET-based pharmacokinetic studies of new modalities and their application to the development of diagnostic imaging agents and DDSs.” We will continue to communicate the importance of PET-based pharmacokinetic evaluation and the capabilities of Nagasaki University’s facilities to academic societies and the drug discovery community, and will strive to maintain and further advance this technological infrastructure through collaborative research with industry. Looking ahead, we also envision expanding our applications to the rapidly growing field of radiotheranostics—integrated radionuclide-based diagnostics and therapy—supported by PET pharmacokinetic studies.