

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：モダリティ別蛍光プローブ・イメージング法とがんモデルの選択及び最適化による薬物動態評価法の開発

Development of a pharmacokinetic evaluation system through selection and optimization of individual fluorescent probes, an imaging method, and an animal tumor xenograft model

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：安永 正浩

Masahiro Yasunaga

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 先端医療開発センター 新薬開発分野 分野長

Division of Developmental Therapeutics, Exploratory Oncology Research & Clinical Trial Center, National Cancer Center, Chief.

II 研究開発の概要

【背景】

固形がんにおける抗体医薬および DDS 創薬においては、腫瘍間質バリアおよび腫瘍微小環境（tumor microenvironment：TME）が薬物送達を大きく制限することが知られている。特に、線維芽細胞（CAF）や免疫細胞（マクロファージなど）により形成される物理的・機能的バリアは、抗体や核酸医薬といった高分子モダリティの腫瘍内浸透を阻害し、薬効発現の律速段階となる。一方、従来の蛍光イメージングでは、EPR 効果に基づく受動的集積（passive targeting）と抗原特異的結合による能動的集積（active targeting）を区別することが困難であり、薬物動態（PK）および作用機序（MOA）の正確な評価には限界があった。さらに、従来広く用いられてきた CDX モデルは臨床との乖離が指摘されており、がんの不均一性（cancer heterogeneity：C/He）や TME を反映したトランスレーショナル研究（TR）指向型モデルの必要性が高まっている。加えて、近年は非動物代替法（NAMs）の推進により、ヒト予測性の高い新たな非臨床評価基盤の構築が強く求められている。

【目的】

本研究では、低分子から抗体、二重特異性抗体、核酸医薬、mRNA-LNP、融合タンパク質に至る多様なモダリティに対応した蛍光プローブおよびイメージング技術を開発するとともに、がんの不均一性および腫瘍微小環境を反映した非臨床モデルと統合することで、PK/PD/MOA を高精度に評価可能な次世代創薬評価基盤の確立を目的とした。

【ねらい】

本研究では、モダリティ横断的な創薬評価基盤の確立に向けて、以下の戦略的アプローチを設定した。

(1) 低中分子モダリティ用蛍光プローブの開発

近赤外領域（650–700 nm）の蛍光色素 SiR650/680/700 を基盤とした高 S/N 比蛍光プローブを開発し、組織透過性と低バックグラウンドを両立した高感度 *in vivo* イメージングを実現する。これにより、従来困難であった微弱シグナルの検出および精密な PK 解析を可能とする。

(2) 高分子モダリティ用蛍光プローブの開発

蛍光 OFF–ON スwitching 機構を有するプローブおよび質量分析技術を組み合わせることで、passive targeting と active targeting を機序的かつ定量的に識別する評価法を確立する。これにより、抗体の「真の標的結合量」を評価可能とし、薬効との相関を明確化する。

(3) モダリティ別蛍光イメージング法と動物モデルの選択・適正化

CAF やマクロファージを含む腫瘍微小環境を反映した TR 指向型 *in vitro* / *in vivo* モデルを構築し、がんの不均一性 (C/He) を含めた現実的な薬物送達環境を再現する。これにより、モダリティごとの PK/PD 差異および治療効果の規定因子を明確にする。

(4) シーズ対応

本蛍光イメージング技術のシーズ対応展開研究として、各モダリティ別に最適な蛍光イメージング法の開発に向け、課題を抽出し、応用可能性を検討する。具体的には、華山力成教授 (金沢大学) が開発する APExo(CTL)mRNA-LNP を対象に、蛍光標識およびイメージング条件を最適化し、*in vivo* 蛍光イメージングによる薬物動態解析を行う。さらに、腫瘍集積性および体内分布を可視化・定量し、免疫応答との関連を含めた PK/PD 解析により有効性および作用機序を実証する。また、本田諒准教授 (岐阜大学) が提供する Non-G12C 変異型 RAS 標的融合タンパク質、山吉麻子教授 (東京科学大学) が開発する抗体結合型核酸医薬 (ExHijack-Oligo)、岡本晃充教授 (東京大学) が開発する化学合成短鎖ヘアピン核酸 (oHPs) に本評価基盤を適用し、各モダリティの PK/PD/MOA を統合的に解析することで、薬物動態特性および最適設計指針を体系的に明確化し、創薬研究の高度化に貢献する。

【成果】

(1) 低中分子モダリティ用蛍光プローブの開発

近赤外領域（650–700 nm）に対応した蛍光色素 SiR650/680/700 を基盤とする蛍光プローブの開発に成功し、組織透過性の向上および自家蛍光の低減により、高感度かつ高 S/N 比の *in vivo* イメージング基盤を確立した。低分子葉酸リガンドプローブでは、葉酸受容体陽性腫瘍への選択的集積と正常組織での低バックグラウンドを両立し、早期かつ高精度な薬物動態 (PK) 解析を実現した。また、SiR680 を用いた HER2 標的ナノボディの蛍光標識により、中分子モダリティにおいても体内動態を維持したまま可視化可能であることを示し、モダリティ横断的適用性を実証した。さらに、EGFR 結合ペプチドについては、CRISPR-Cas9 により EGFR ノックアウト腫瘍がん細胞を作製し、高精度な陽性／陰性対照系を構築した上で約 25 万種のペプチドライブラリーのスクリーニングを実施した。その結果、候補ペプチドの取得と評価系の妥当性を確認するとともに、既存ペプチド GE11 の解析を通じて、短鎖ペプチドの特性と限界を明確化し、中分子設計の重要性に関する有用な知見を獲得した。

(2) 高分子モダリティ用蛍光プローブの開発

抗体を対象とした高分子モダリティにおいては、蛍光 OFF–ON スwitching 機構を有するプローブの開発により、抗原結合に依存した蛍光活性化を実現した。HaloTag 系を用いた検証により、タンパク質結合後に迅速な蛍光上昇が確認され、active targeting の高感度な可視化が可能となった。さらに、抗 EGFR 抗体を用いた評価により、EGFR 陽性細胞への選択的結合が確認され、標的特異性を保持したプローブ設計の有効性が実証された。加えて、蛍光イメージングでは識別困難であった active targeting と passive targeting を分離・定量するため、ACES (Acidic Conditions Extraction supported with Surfactant) 法を開発した。本手法では、界面活性剤存在下の酸性条件

抽出により標的抗原結合型抗体を選択的に回収し、質量分析と組み合わせることで両者を定量的に評価可能とした。これにより、抗体の真の標的結合量を評価できる新規薬物動態（PK）解析手法を確立した。

（3）モダリティ別蛍光イメージング法と動物モデルの選択・適正化

がんの不均一性および腫瘍微小環境（TME）を反映した TR 指向型評価モデルの構築により、モダリティ別 PK/PD 解析の高度化を実現した。EGFR ノックアウト細胞を用いた対照系の構築により、免疫シナプス形成およびバイスタンダー効果の可視化に成功し、二重特異性抗体（BsAb）の作用機序を定量的に解析可能な評価系を確立した。CAF を含むスフェロイドモデルでは、層状配置型とびまん型の 2 種類の間質構造を再現し、高分子抗体の浸透性が間質構造に強く依存することを明確化した。さらに、マクロファージによる抗体取り込みおよび薬効低下を確認し、免疫細胞が薬物送達および治療効果を規定する重要因子であることを示した。in vivo 解析では、CDX および PDX モデルを用いて BsAb と T 細胞の同時可視化を行い、EGFR 発現依存的な active targeting が T 細胞遊走および薬効発現に直結することを実証した。一方、膵癌 PDX モデルでは間質バリアにより抗体集積および T 細胞浸潤が制限されることを確認し、TME 依存的な薬効制限機構を明らかにした。さらに、脳腫瘍モデルにおいては、BBB/BBTB（血液脳関門／血液脳腫瘍関門）の構造的不均一性が、抗体および T 細胞の分布を規定する主要因であることを示した。

（4）シーズ対応

本評価基盤を活用し、多様な創薬シーズへの応用展開を行った。mRNA-LNP では、蛍光色素の特性に応じて in vivo と ex vivo で最適条件が異なることを明らかにし、腫瘍集積性および免疫活性化との関連を PK/PD 解析により実証した。融合タンパク質 RRSP-RBD では、免疫系依存的な抗腫瘍効果が確認され、分子標的阻害と免疫応答の協調による新規作用機序が示唆された。さらに、ExHijack-Oligo では新規蛍光色素による細胞内取り込みの可視化に成功し、核酸医薬の送達評価基盤を構築した。oHPs では核酸自体への蛍光標識により機能を保持したまま体内動態を解析可能であることを示し、新規核酸モダリティに適した PK 評価法を確立した。

【総括・意義】

本研究により、低分子から高分子、核酸医薬に至るモダリティ横断的な薬物動態評価基盤が確立された。特に、active targeting の定量化、TME を反映した TR モデルの構築、多モダリティ対応評価系の統合により、従来困難であった創薬評価を可能とした点に大きな独創性がある。本成果は、ADC、BsAb、核酸医薬など次世代モダリティの非臨床評価精度を飛躍的に向上させるのみならず、標的結合に基づく薬効発現の本質的理解を可能とする新たな評価パラダイムを提示するものである。さらに、モダリティ横断的に PK/PD/MOA を統合解析できる点において、従来の創薬プロセスを根本から高度化・効率化し、臨床予測性の高い創薬研究への転換を加速する基盤技術としても意義深い。

【展望】

今後は、構築した評価基盤を基に PDX モデルやヒト由来検体との統合を進め、臨床予測性の高いトランスレーショナル評価系へと発展させる。さらに、光イメージングと分子解析技術を融合し、PK/PD/免疫応答を統合的に解析する「セラノスティクス型 DDS 評価系」の確立を目指す。加えて、AI やマルチオミクス解析との連携により、高精度な創薬予測モデルの構築へと展開する。本技術は、ADC、T 細胞エンゲージャー（TCE）、核酸医薬など多様なモダリティの最適設計指針を提供し、創薬研究の高度化を牽引することが期待される。さらに、産学連携および技術導出を通じて社会実装を加速し、非臨床から臨床へのトランスレーションを推進する中核基盤として、創薬研究および産業応用への広範な波及効果が見込まれる。

【Background】

In solid tumors, stromal barriers and the tumor microenvironment (TME) critically limit drug delivery, particularly for macromodalities such as antibodies and nucleic acid therapeutics. Cancer-associated fibroblasts (CAFs) and immune cells create both physical and functional barriers that hinder tumor penetration and represent a major rate-limiting step in therapeutic efficacy. Conventional fluorescence imaging cannot distinguish passive targeting via the enhanced permeability and retention (EPR) effect from antigen-specific active targeting, limiting accurate evaluation of pharmacokinetics (PK) and mechanisms of action (MOA). In addition, conventional CDX models lack clinical relevance, highlighting the need for translational research (TR)-oriented models that reflect cancer heterogeneity (C/He) and TME.

【Objective】

This study aimed to establish a next-generation drug evaluation platform capable of high-precision PK/PD/MOA analysis by integrating fluorescence imaging technologies with TME-reflective nonclinical models across diverse modalities, including small molecules, antibodies, bispecific antibodies (BsAbs), nucleic acids, mRNA-LNPs, and fusion proteins.

【Strategy】

We developed near-infrared (650–700 nm) fluorescence probes based on SiR dyes for high-sensitivity in vivo imaging. For macromolecules, OFF–ON switching probes combined with mass spectrometry enabled quantitative discrimination of active and passive targeting. TR-oriented in vitro and in vivo models incorporating CAFs and immune components were constructed, and the platform was applied to multiple therapeutic seeds, including mRNA-LNPs, fusion proteins, and nucleic acid modalities.

【Results】

We successfully established a high-signal-to-noise in vivo imaging platform using SiR-based probes, enabling precise PK analysis in small- and mid-sized modalities. OFF–ON probes enabled antigen-dependent fluorescence activation, while the newly developed ACES method allowed quantitative separation of active and passive targeting, providing a novel PK evaluation approach.

TR-oriented models revealed that antibody penetration is strongly dependent on stromal architecture and that macrophages significantly influence drug distribution and efficacy. In vivo imaging demonstrated that active targeting directly regulates T-cell recruitment and therapeutic outcomes, whereas stromal barriers and BBB/BBTB heterogeneity critically restrict drug delivery.

Applications across multiple modalities demonstrated the platform's versatility: mRNA-LNP showed modality-specific PK/PD characteristics linked to immune activation, fusion proteins revealed immune-dependent antitumor mechanisms, and nucleic acid therapeutics (ExHijack-Oligo and oHPs) were successfully visualized without compromising function.

【Significance】

This study establishes a modality-agnostic PK/PD evaluation platform that quantitatively defines active targeting and integrates TME-aware models. It introduces a new paradigm for understanding drug efficacy based on target engagement and enables a fundamental shift toward predictive, efficient drug development.

【Outlook】

Future work will integrate this platform with PDX models and human-derived samples to further enhance clinical predictability. By combining optical imaging with molecular and multi-omics analyses, we aim to develop a theranostic DDS evaluation system capable of integrated PK/PD/immune profiling. This platform is expected to guide optimal design across modalities, accelerate translational research, and drive industrial implementation, ultimately contributing to next-generation precision medicine.