

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬学)	氏名	高井 希望
論文題目	生体内薬物分布の測定を目的とした定量的質量分析イメージング法の開発に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>創薬研究において、投与された薬物の生体内分布を把握することは、その薬物の薬効や毒性の発現メカニズムを考察し、優れた薬物動態プロファイルを持つ新薬候補化合物を選定する上で非常に重要である。</p> <p>近年開発された質量分析イメージング法 (imaging mass spectrometry, IMS) は質量分析法により組織切片上の化合物の分布状態を測定するもので、既存の薬物分布解析法であるオートラジオグラフィとは異なって放射性標識体を必要としないこと、質量分析の特性を利用して薬物とその代謝物の分布をそれぞれ選択的に可視化できることから、病理組織解析や薬物分布解析への応用が期待されている。IMSでは目的分子を効率よくイオン化させるためにマトリクス支援レーザー脱離イオン化法が用いられているが、マトリクス化合物は組織切片上で不均一な結晶を生成し目的分子のイオン化効率をばらつかせるため、定量的な解析の妨げとなる。また、IMSによって薬物濃度を絶対的に定量するためには組織切片からの目的分子の抽出過程を模した検量線用標準試料を作成する必要がある。しかし、これらの課題を克服した定量解析法は存在せず、その開発が強く望まれている。そこで本研究では、IMSによる組織切片上の特定分子の定量イメージング法を構築するとともに、その薬物分布解析法としての有用性について検討することを計画した。</p> <p>第1章 質量分析イメージング法による低分子薬物の全身分布解析</p> <p>これまでにIMSによって薬物の全身分布をイメージングすることは可能となっているが、その分布を定量的に解析することはできていなかった。そこで本研究では、低分子化合物であるドパミンD2受容体選択的アンタゴニスト、ラクロプリドを対象として、IMSによって、その全身分布を定量的に解析する手法の構築とその有効性を検討することを計画した。定量的な解析のためにはマトリクス化合物の結晶化に由来するイオン化効率のばらつきを補正する必要があると考え、ラクロプリドのイオン強度をマトリクス化合物のイオン強度によって標準化することとした。また、組織切片上でラクロプリドを選択的に検出するために、MS/MSによって得られるイオンを測定することとした。これらの手法を用いて、ラクロプリドを投与したマウスから得た凍結全身切片をIMSによって測定した結果、各臓器において、IMSによって得られたイオン強度はLC/MS/MSによって定量したラクロプリド濃度と良好に相関すること、またマウスの全身におけるラクロプリドの分布はイオン強度を指標とする定量的なイメージとして得られることを認めた。したがって、本法が薬物の全身分布を定量的に解析するために有効であることを明らかにした。</p> <p>第2章 質量分析イメージング法によるペプチド薬物の組織内分布解析</p> <p>近年、ペプチドを母体とした分子標的薬の開発が増えてきたことに伴って、その薬物動態を評価する手法の構築が望まれているが、IMSによって組織分布を定量解析する手法は確立されていない。そこで、IMSによってペプチド薬物の組織内分布を定量的に解析する手法の構築を試みることにした。ペプチド薬物としてはソマトスタチンの類縁ペプチドであるオクトレオチドを用いた。ペプチド薬物を定量的に解析するための要件として、十分</p>			

な検出感度と選択性を確保することが必要であると考え、オクトレオチドを効率よくイオン化させるためのマトリクスとして2,5-dihydroxybenzoic acidを選択することとした。また、MS/MSによって得られるイオンの中から b_7^+ イオンを測定することによって、様々な生体分子が存在する組織切片上でオクトレオチドを選択的に検出できることを見出した。さらに、この手法を用いて、オクトレオチドを投与したマウスから摘出した肝臓と腎臓の凍結切片を測定した結果、それぞれの臓器内におけるオクトレオチドの分布をイオン強度を指標とする定量的なイメージとして得ることができた。また、IMSによって得られたイオン強度は、LCMS/MSによって定量したオクトレオチド濃度と良好に相関していることを認めた。これらの結果から、本手法によって組織内に分布したペプチド薬物を高感度、高選択的、定量的に解析できることが示された。

第3章 質量分析イメージング法による組織内薬物濃度定量法の開発

薬効発現や毒性回避の観点から理想的な組織分布プロファイルをもつ薬物を選定するためには、各薬物の組織内濃度を測定し候補薬物間で比較することが重要である。しかし、現在のところIMSでは特定の薬物のイオン強度を組織間で相対的に比較することどまっており、IMSによって薬物の組織内濃度の絶対値を求めるという方法は確立されていない。そこで、IMSによって薬物の組織内濃度を定量する手法を構築するために、組織切片から薬物を抽出する過程を模した標準試料を作成し検量線として利用することが必要であると考え、肝臓ホモジネートに種々の濃度の薬物を添加した試料の凍結切片を用いて検量線を作成することとした。また、組織切片上での薬物のイオン化効率のばらつきを補正するために、その薬物の構造類縁体を内部標準物質として組織切片に塗布することとした。これらの方法をカンナビノイド2受容体選択的アゴニストであるS-777469 (1-((6-ethyl-1-(4-fluorobenzyl)-5-methyl-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carbonyl)amino)-cyclohexanecarboxylic acid) およびラクロプリドに適用した結果、測定の再現性、検量線の直線性が良好であることを認めた。さらに、S-777469およびラクロプリドを投与したマウスから摘出した各組織切片中の各薬物の濃度を本法によって測定した結果、LCMS/MSによって定量した値とよく一致することを認めた。これらの結果から、本法がIMSによって組織内の薬物濃度を定量するための汎用的な手法として利用できることが示された。

以上、本研究はIMSによって薬物の組織内分布を定量的に解析する手法の開発に成果を収めたものであり、これらの知見は創薬探索段階の薬物動態研究に有益な情報を与えるものと考えられる。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

近年開発された質量分析イメージング法 (IMS) は質量分析法により組織切片上の化合物の分布状態を測定するもので、病理組織解析や薬物分布解析への応用が期待されている。しかし、IMSを定量イメージング法として用いるには、イオン化法として用いるマトリクス支援レーザー脱離イオン化法ではマトリクス化合物が組織切片上で不均一な結晶を生成するために目的分子のイオン化効率がばらつくこと、組織切片からの目的分子の抽出過程を模した適切な検量線用標準試料を作成する必要があることなどの問題がある。そこで本論文は、これらの課題を克服して、IMSによる組織切片上の特定分子の定量イメージング法を構築し、その薬物分布解析法としての有用性について検討することを計画したものである。

著者は、先ず、低分子化合物であるラクロプリドを対象として、組織切片から薬物を抽出する過程を模して、肝臓ホモジネートに種々の濃度の薬物を添加したものの凍結切片を作成し、これにラクロプリドの構造類縁体を内部標準物質として塗布して標準試料とし、IMS測定して検量線を作成した。これを用いて、ラクロプリドを投与したマウスから得た凍結全身切片をIMS測定した結果、種々の臓器において、IMSによって得られたイオン強度はLC/MS/MS定量したラクロプリド濃度と良好に相関すること、またマウスの全身におけるラクロプリドの分布はイオン強度を指標とする定量的なイメージとして得られることを認めた。

また、これまでIMS定量測定が難しいと言われているペプチドについても、オクトレオチドを対象として、組織内分布を定量的に解析する手法の構築を試みた。この場合、対象ペプチドに対する十分な検出感度と選択性を確保することが課題解決には必要であると考え、効率よくイオン化させるためのマトリクスとして2,5-dihydroxybenzoic acid、またオクトレオチドを選択的に検出するためにMS/MSによって得られるイオンの中から b_7^+ イオンの測定をそれぞれ選択し、マウスの肝臓と腎臓の凍結切片を測定した結果、オクトレオチドの分布をイオン強度を指標とする定量的なイメージとして得ることを見出し、組織内に分布したペプチド薬物を高感度、高選択的、定量的に解析できる方法を構築した。

さらに、上記の結果をもとに、複数の薬物を対象として、薬物間で組織内濃度を比較するために、IMSによって各薬物の組織内の絶対濃度を定量する手法を構築することを計画した。そこで、まず、組織切片から薬物を抽出する過程を模した肝臓ホモジネートに種々の濃度の薬物を添加したものの凍結切片を作成し、これに対象薬物の構造類縁体を内部標準物質として塗布したものをを用いて検量線を作成した。次いで、これを用いて、2種の薬物 (S-777 469、ラクロプリド) を投与したマウスから作成した各組織切片中の各薬物の組織内濃度を本法によって測定した結果、LC/MS/MSによる定量値とよく一致することを認めた。これらの結果から、本法がIMSによって組織内の薬物濃度を定量するための汎用的な手法として利用できることを明らかにした。

以上、本研究はIMSによって薬物の組織内分布を定量的に解析する手法の開発に成果を収めたものであり、これらの知見は創薬探索段階の薬物動態研究に有益な情報を与えるものと評価される。

よって本論文は博士 (薬学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成26年7月1日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降