

薬物動態・代謝を可視化する 高空間分解能質量分析イメージング技術の開発

大塚 洋一^{*1} 古山 浩子^{*2}
 本田 諒^{*3} 小山 聡^{*4}

Development of High-spatial-resolution Mass Spectrometry Imaging Technique to Visualize Pharmacokinetics and Metabolism

Yoichi OTSUKA^{*1}, Hiroko KOYAMA^{*2},
 Ryo HONDA^{*3} and Satoshi OYAMA^{*4}

We developed an interdisciplinary framework for visualizing the spatial distribution of drugs and lipids, a major class of endogenous metabolites, within biological tissues. The approach integrated molecular synthesis, drug administration and tissue section preparation, high-spatial-resolution mass spectrometry imaging (MSI) based on tapping-mode scanning probe electrospray ionization (t-SPESI), and computational data analysis for spatial interpretation. We achieved regioselective synthesis and metabolic characterization of ACR-PC (a phosphatidylcholine-conjugated acyclic retinoid) and visualized ACR-PC in mouse liver as well as the antiepileptic drugs Topiramate and Zonisamide in the mouse brain. These findings demonstrate proof-of-concept for molecular-level spatial analysis of drugs and metabolites in tissues.

1. 薬物動態解析のための分析技術と質量分析イメージングへの期待

治療薬や治療法の開発において、薬剤が生体内のどの組織のどの細胞に到達し、どのように代謝されるかを理解することが、標的疾患の選定や分子設計の最適化に繋がる。特に中枢神経系疾患では、血液脳関門通過後の脳内分布および局所代謝の把握が不可欠であり、空間情報を伴う高精度な解析技術が求められている。

薬物動態解析では、陽電子放出断層撮影法 (PET)/単一光子放出断層撮影法 (SPECT)、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) などの方法が用いられてきた。PET/SPECTは生体内の薬剤分布の非侵襲的な可視化に用いられる。放射性標識体を必要とし、空間分解能はミリメートルオーダーである。LC-MS/MSは高感度かつ高精度な定量および代謝物同定に用いられる。組織の物理的な破碎工程を要するため、組織中の空間情報が平均化される。

質量分析イメージング (MSI) は、組織切片の分子分布情報を可視化する手法であり、標識を必要とせず多成分の同時解析が可能であるという特徴を有する。高空間分解能MSIを用いることで、薬剤や代謝物の局在分布を細胞レベルで可視化することが可能になれば、薬剤の作用部位の同定や代謝経路の空間的解明に資することが期待される。

2. スカラー共同研究Phase2の概要

本研究では、薬剤を投与したマウス臓器における薬剤および代謝物 (脂質) の空間分布を可視化するための、基盤技術の構築を目的とした。古山は、レチノイド関連分子の設計や同位体標識プローブの合成を担当した。本田は、マウスへの薬剤投与ならびに臓器組織切片の作製、脳疾患治療薬の選定を担当した。大塚は、高空間分解能MSIの装置開発と薬剤投与組織の計測・解析を担当した。小山は、MSIデータに対する機械学習および数理解析手法の開発を担当した (図1)。



図1 Phase2共同研究の枠組み。

2026年2月26日 受理

豊田理研スカラー共同研究Phase2

^{*1} 大阪大学大学院理学研究科物理学専攻

^{*2} 岐阜大学工学部化学・生命工学科

^{*3} 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

^{*4} 名古屋市立大学データサイエンス研究科

3. レチノイド・長鎖脂肪酸関連分子の設計と同位体標識プローブの合成（古山）

ACR（安定人工レチノイン酸誘導体、図2a）は、肝がん再発抑制を目的に開発された化合物であり、核内受容体を介した転写制御作用を有することが知られている。古山らはこれまでに、独自開発の高速C-メチル化反応を適用し、 ^{11}C 標識ACRの効率的合成法を確立し、PETイメージングへの応用を可能とした。ACRがサル脳全体へ移行・集積することを確認し、脳内出血病理モデルにおいてACRが組織保護効果を示すことを報告してきた。

「脳に届いたACRはどの分子形で存在し、どこで機能しているのか」という分子種レベルでの実体解明を目指すために、古山らは、ACRの脂質結合型代謝体に注目すると共に、それらの新規標品合成法を開発した。グリセロール部位の混合保護体を經由することで、ACRがPCのsn-1位に結合したsn-1-ACR-PC、およびsn-2位に結合したsn-2-ACR-PCをそれぞれ位置選択的に合成することに成功した（図2a）。これらのACR-PCを高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析した結果、sn-1-ACR-PCとsn-2-ACR-PCの間でACRの相互変換が観測された。この相互変換挙動は、リゾホスファチジルコリンのアシル基転移反応機構（Biochemistry, 1982）と類似した分子内再配置反応に基づくものと考えられた。この知見は、*in vitro*ではACR-PCが静的な安定状態ではなく、sn-2-ACR-PCからsn-1-ACR-PCへの構造変化が自発的に生じることを示した。

ACRを血中投与したマウス脳および肝臓試料のHPLC分析の結果、ACRからACR-PCへの代謝変換が生体内で生じ、sn-1-ACR-PCが優先的に産生されることを見いだした（図2b）。本結果は、遊離型分子であるACRと、脂質結合型分子であるACR-PCのそれぞれが脳内における作用機序を生じうることを示唆した。

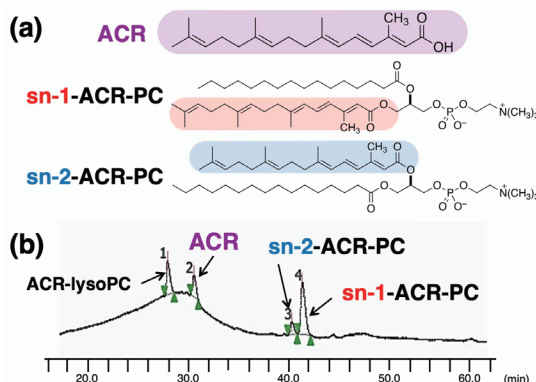


図2 (a) ACR, ACR-PCの化学構造式。

(b) ACRを投与したマウス脳のHPLC分析の結果。

4. 薬剤投与とマウスの組織切片作製と脳疾患治療薬の選定（本田）

本田らは、薬剤を投与した生体組織の高空間分解能MSIを実施するために、マウスへの薬剤投与から組織摘出、包埋、凍結切片作製に至るまでの工程を一貫して完結するためのワークフローを構築することを目指した。まず、薬剤投与条件の最適化のために、薬剤の溶解性、生体適合性および毒性の観点から溶媒種を比較検討し、薬剤の高用量投与が可能な溶媒を見いだした。次に、組織切片の作製においては、薬剤をマウス尾静脈より投与し、所定時間後に迅速な解剖を行って臓器を摘出した。摘出後は分子拡散および代謝進行を最小限に抑えるため速やかに凍結処理を施した。包埋工程で一般的に使用されるOCT compoundはMSIにおいて大きなバックグラウンド信号を生じるため、カルボキシメチルセルロース（CMC）による包埋を実施した。濃度2%のCMC溶液を用いて、クライオスタットによる組織切片作製の容易さと形態保持性を両立できるようにした。これらの検討により、再現性の高い凍結切片作製のプロトコルを構築した（図3a）。

さらに、薬剤の可視化のProof-of-concept (PoC) のために、中枢神経系薬剤の選定を行った。臨床で使用される中枢神経系薬剤を中心に50剤以上を対象とし、(1) ESIで検出しやすい化学構造であること、(2) 内因性分子との干渉が少ないこと、(3) 高用量投与が可能であること（低毒性であること）を主要基準として検討した。その結果、抗てんかん発作薬であるTopiramate (TPM) およびZonisamide (ZNS) の2剤を選定した（図3b, c）。TPMはナトリウムチャネルの抑制、GABA作用の増強、グルタミン酸作用の抑制などに関与する。ZNSはナトリウムチャネルの遮断、T型カルシウムチャネル抑制、炭酸脱水酵素阻害作用、ドパミン系調節作用などに関与する。いずれも作用機序の全容は未解明であり、脳内分布の空間情報と薬効発現との関係を検討する上で適切な候補と位置付けた。先に構築したプロトコルに基づいて、TPMおよびZNSを投与したマウスの脳組織切片を作製し、MSIに供した。

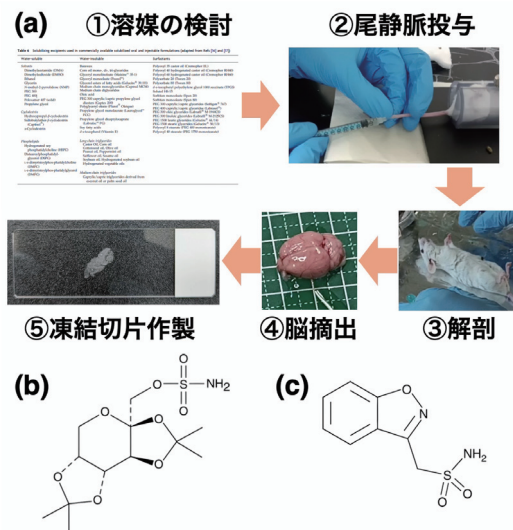


図3 (a) マウスへの薬剤投与から脳組織切片までのワークフロー。(b) TPM, (c) ZNSの化学構造式。

5. 高空間分解能MSIの装置開発と薬剤投与マウス組織への応用（大塚）

大塚はこれまでに、t-SPESI（タッピングモード走査型プローブエレクトロスプレーイオン化法）の開発を主導してきた。t-SPESIは、振動するキャピラリープローブから、高電圧を印加した溶媒を試料表面の局所領域に付与することで、試料成分の抽出とエレクトロスプレーイオン化（ESI）を行うことを可能にする（図4a）。ESIは分子を壊すことなくイオン化するため、生体分子の質量分析に広く活用されている。他のレーザー光やイオンビームを用いるイオン化技術と比較して、t-SPESIの優位性は、サブピコリットルの微量溶媒で、マイクロ領域の成分抽出とイオン化を高速に実施できる点、試料の表面形状による抽出-イオン化への影響を抑制できる点、特別な前処理を必要とせず測定後に同一の組織切片を染色可能である点が挙げられる。

生体組織の高空間分解能MSIの実現には、イオンの検出感度の向上と長時間計測の安定化の両立が必要である。大塚らは、新型計測システムと化学修飾プローブを開発した。計測システム開発では、試料裏面側に対物レンズを配置し、計測中にプローブ先端を直接観察できるようにした。また、t-SPESIで生成されるイオンを、質量分析装置へ効率的に導入するためのイオン輸送管と、プローブの相対位置を調整する機構を開発し、イオンの輸送効率と測定再現性を向上させた。MSIのピクセルサイズを微小化するには、プローブ先端開口径の微小化および溶媒送液量の低減が必要となる。これまでは、長時間測定において抽出物がプローブ先端に付着し、送液が不安定化する課題があった。そこで、プローブ表面にフッ素含有分子膜を形成する化学修飾法を開発し、付着を抑制することで長時間安定計測を実現した。

生体組織中の薬剤を同定するためには、同一質量を有する同重体や構造異性体の存在を考慮する必要がある。タンデム質量分析（MS/MS）が有効となる。本研究では、酸素付着解離（Oxygen Attachment Dissociation, OAD）を質量分析装置に導入し、t-SPESIと組み合わせることで、t-SPESI-OAD-MS/MSシステムを構築した。OADは質量分析装置内で、分子の二重結合を特異的に切断し、構造特異的なフラグメントイオンを生成する手法である。ACR-PC膜を対象としたOAD-MS/MS解析では、ACR-PCに特異的なフラグメントイオンの生成が確認された。t-SPESI-OAD-MS/MSイメージングにより、ACR-PC膜の分布を構造情報付きで可視化することに成功した。

ACRを投与したマウス脳組織切片のMSIでは、ACRおよびACR-PCのイオン像について明瞭な分布を認めることが困難であった。これは、内因性脂質がACRおよびACR-PCと類似した質量を有し、更に脳中の薬剤量が少ないことが原因と考えられた。一方、ACR-PCを投与したマウス肝臓では、t-SPESI-OAD-MS/MSイメージングにより、ACR-PC分布が可視化された（図4b: 水色文字のイオン像）。本結果は、臓器の薬剤濃度の違いがt-SPESI-MSIでの可視化の可否を決めることを示唆した。

中枢神経系薬剤であるTPMおよびZNSを投与したマウス脳では、脳内における分布が可視化された。[TPM+K]⁺のイオン像では投与脳で明瞭な信号が観測され、未投与脳では検出されなかった（図4c）。同様に、[ZNS-H]⁻のイオン像も投与脳で特異的に検出された。さらに、薬剤投与脳において内因性脂質の分布が変化することを見いだした。[TPM+K]⁺の高空間分解能イメージでは、神経細胞体が密集する領域で相対的に低いシグナルが観測され、TPMが細胞体よりも軸索、樹状突起、あるいはシナプス周辺に偏在している可能性が示唆された（図4d）。今後、ピクセルサイズのさらなる微小化を進めることで、神経細胞およびグリア細胞レベルでの薬剤局在と脂質動態変化の統合解析が可能となり、作用機序の解明や併用療法設計の最適化に資する空間分子科学的基盤へと発展することが期待される。

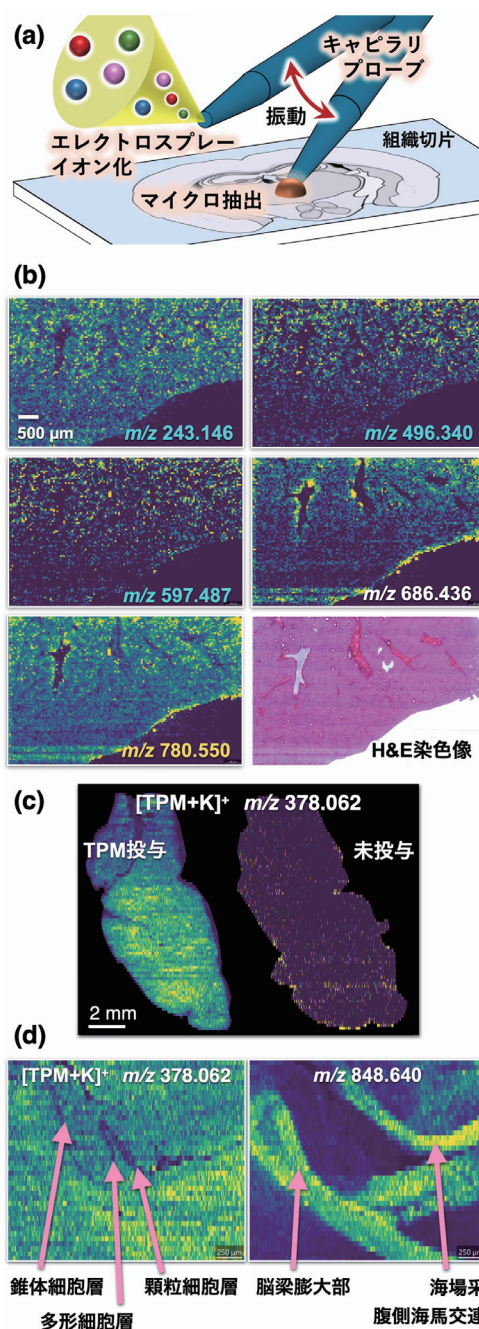


図4 (a) t-SPESIの模式図。(b) ACR-PCを投与したマウス肝臓組織のt-SPESI-OAD-MS/MSイメージング結果。(c) TPMのイオン像の比較。(d) 高空間分解能イメージングの結果。

6. MSI データに対する機械学習および数理解析手法の開発（小山）

薬物動態解析では、生体内をいくつかの仮想的な区画に分割し、区画間の移行や滞留を数学的に記述し、薬剤の動きをモデル化する解析手法が必要である。小山は、脳の領域を区画化し、信号強度を統計的に評価可能な解析基盤の構築を目指した。脳の区画化では、2次元切片を3次元脳アトラス座標へ対応付ける手法が必要であるため、DeepSlice (Renierらにより開発) の適用可能性を検討した。DeepSliceは深層学習ベースのツールであり、マウス脳の染色切片画像および人工的に変形させた画像で訓練された、畳み込みニューラルネットワーク (CNN) を用いて、入力画像から切片の位置および傾きを推定する。これにより、各切片を3D脳アトラス空間内に埋め込み、解剖学的領域との対応付けを可能とする。

解剖学的境界が明瞭な染色画像で訓練されたDeepSliceが、境界があいまいになり得るMSIデータに対しても自動マッピングを実行できるかを検証した。MSI画像と解剖学的境界を重ね合わせた結果、切断位置や切断方向は概ね特定できていることが確認されたが、局所的にはズレが残ることが明らかとなった(図5)。この結果を踏まえ、今後はMSI取得後に染色した同一切片画像を用いてマッピング精度を向上させる方法を検証する。また、その対応データを新たな訓練データとしてDeepSliceへ追加学習させることで、MSIデータのみからでも高精度に3Dアトラスへマッピング可能な解析系の構築を目指す。

区画化後の統計解析に向けては、イオン信号強度と区画情報を対応付けたデータテーブルを作成し、区画ごとの信号強度の平均および分散を算出するワークフローを構築した。これにより、薬剤や内因性分子の局在を区画単位で定量比較するための基盤が整備された。一方で、領域によって含まれるピクセル数に大きな差が生じ、統計量の信頼性に課題があることが明らかとなった。今後は、解剖領域の階層性を利用した領域統合と、階層サイズの補正を導入することで、ピクセル数の不均衡を考慮したより頑健な推定および比較を可能とする解析枠組みを検討する。

7. まとめ

我々はスカラー共同研究Phase2において、生体組織の薬物動態を可視化し、統合解析を行うための基盤技術を構築した。分子設計から空間解析までを有機的に結び付ける連携体制を構築するために、2年間の研究期間に、16回のオンラインミーティングと2回のオンサイトミーティングを実施し、実験系の構築状況、計測条件の最適化、解析手法の高度化などの進捗を共有し、薬剤分布の可視化の意義や評価指標について議論を深めた。知識融合と相互理解の深化をはかり、研究全体を一体的に推進できる体制を構築した。

分子設計では、ACR-PCの位置選択的合成法を確立し、可逆的分子内再配置および生体内でのACRからACR-PCへの代謝を明らかにした。動物実験基盤としては、薬剤投与から凍結切片作製までの標準手順を確立し、中枢神経系薬剤を検証用モデル薬剤として選定し、マウス脳を用いた実証実験系を構築した。計測技術では、高度化したt-SPESI計測システムをOAD-MS/MSと融合することで、試料成分の空間分布と構造同定を実施する技術基盤を構築した。肝臓におけるACR-PCの分布や、脳における中枢神経系薬剤の分布を可視化した。解析面では、DeepSliceを用いた脳アトラスマッピングと区画統計解析法を検討し、MSIデータを定量比較するワークフローを構築した。

本共同研究「薬物動態・代謝を可視化する高空間分解能質量分析イメージング技術の開発」では、原理検証として一定の成果を得た。我々が開発した基盤技術は、薬剤と生体分子ネットワークの空間的相互作用を解析するための新たな枠組みを提示した。今後は、薬剤の作用機序解明や創薬研究の高度化への貢献を目指して、更なる異分野融合研究を展開する。

研究発表

- 1) 鈴木智晴, 古山浩子, 波多野翔太, 奥野顕昇, 大塚洋一, 周陽, 小山聡, 本田諒, 野村禎子, 鈴木正昭, 第56回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 2025.
- 2) Y. Zhou, Y. Otsuka, T. Yasuda, H. Koyama, S. Hatano, R. Honda, N. Yamahara, T. Nomura, S. Oyama and M. Toyoda, *The International Symposium on Mass Spectrometry Imaging 2025*, 2025.

Signal image with region boundaries

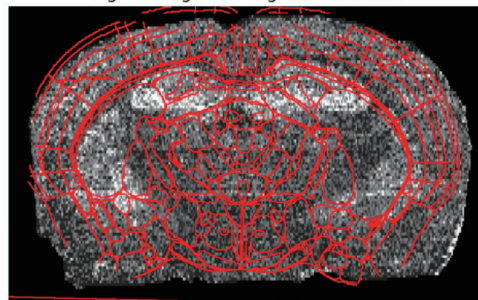


図5 t-SPESI-MSIで取得したマウス脳組織のイオン像を用いて、区画情報をマッピングした結果。