

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19170

研究課題名(和文) 定量イメージング質量分析法による生体組織中の抗体医薬可視化法の開発

研究課題名(英文) Imaging mass spectrometry of antibody drugs

研究代表者

新聞 秀一 (Shimma, Shuichi)

大阪大学・工学研究科 ・准教授

研究者番号：30515896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イメージング質量分析で抗体医薬品の組織内分布可視化を行うことを目的とした。抗体医薬品であるハーセプチンを用いて、酵素消化後に得られるペプチド断片を確認したところ可変領域由来のシグナルが得られた一方、ヒト血漿とハーセプチンの混合物で同様の測定ではIgG由来のペプチドが高い強度でマススペクトル中に検出された。組織上で得られたタンパク質消化物ではIgG以外に細胞骨格タンパク質由来など量が多いタンパク質が主に検出され、目的とするペプチドを検出することができなかった。前処理法の改良を試みたが、結果は改善することなく、本研究を通して当初掲げていた目標を達成することが困難であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The main purpose of this research proposal is to visualize the distribution of an antibody drug, Herceptin. As the first step, the target protein was digested with trypsin and specific peptides were detected. However, in the mixture of human plasma and Herceptin, many peptides peaks derived from IgG were detected with high intensity. On the tissue surface, this situation was not improved. Although many peptides derived from abundant proteins such as cytoskeleton were detected, the target peptides were not detected due to ion suppression. Through this research, it is revealed that proposed methodology could not solve the problems to visualize antibody drugs. I consider completely different approaches are essential to achieve the purpose.

研究分野：分析化学

キーワード：質量分析 イメージング 抗体医薬

1. 研究開始当初の背景

抗体医薬を含む薬物の生体内分布可視化手法として、薬剤に PET プローブを結合させ検出する方法が存在する(Tamura K et al. J Nucl Med. 2013, 54, 1869-75). PET を用いた in vivo イメージングは、侵襲性が無くリアルタイムで薬物動態が可視化できる利点を有する反面、プローブからの信号を検出するために、複合体を検出しているのか、解離物を検出しているのかの判別は不可能である。また、ミリメートル程度の解像度であるため、がんの Heterogeneity を考慮したイメージングは原理的に不可能であり、位置情報精度が高いとは言い難い。一方、申請者が現在取り組んでいる薬物動態の新たな可視化手法として、IMS と呼ばれる方法がある。IMS では、試料採取という侵襲性を伴うが、採取した組織そのものを直接質量分析し、物質そのものを検出することから、高い特異性を持つ分布情報を高解像度で得ることが可能である。申請者は、顕微鏡下で IMS が可能な質量顕微鏡を駆使し、高感度測定用試料前処理手法の開発も行うことで、小分子化合物で既に多くの分子標的薬の可視化に成功している。

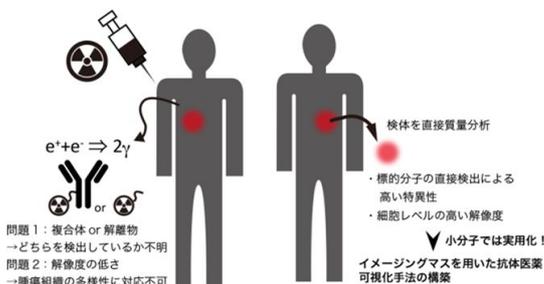


図 1. PET イメージングとイメージング MS

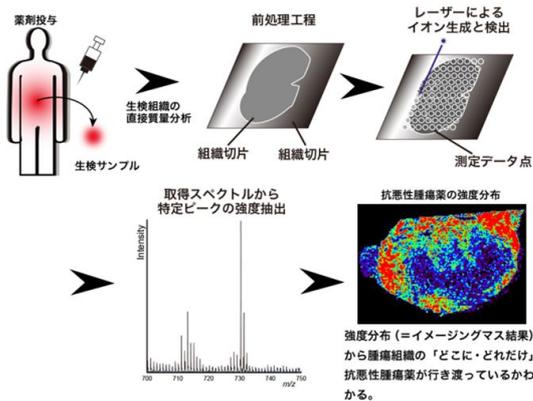


図 2. イメージング MS の流れ

2. 研究の目的

抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品において、今後の市場性も影響し質量分析技術を用いた定量手法の開発が始まって間もない状況であり、抗体医薬品そのものを IMS で検出することは野心的な試みとして認識されている。しかしながら、これまでの小分子薬剤と同様、血中濃度等の定量が行え

るようになった後には、病変部での抗体医薬の分布がどのようになっているのかという疑問が必ず出てくると考えている。

したがって、その疑問にいち早く回答するためにも、技術を確立しておくことは必須である。本研究では、質量分析技術を用いた分子可視化手法であるイメージング質量分析 (IMS) を用いて抗体医薬品の組織内分布情報を可視化することを目的とする。

現時点で散見される、IMS を用いた医薬品以外の抗体可視化例の報告は、抗体を直接検出しているのではなく、抗体に小分子ラベル (マスタグ) や金属を結合させ、ラベル由来のシグナルを検出することで、間接的に抗体の可視化を行っている (Angelo M et al. Nat Med. 2014, 20, 436; Thierry G et al. J Am Soc Mass Spec. 2012, 23, 1689). 検出に質量分析を使う点で新規性があり、ラベルを質量分析で検出することから、蛍光検出時に見られた蛍光波長の重なりの問題はなくなる。したがって、多重染色像を得る点では非常に有用な方法であると期待される一方、ラベル由来シグナルを検出することを考えると、既存手法の原理的な問題は解決されていない。さらに、抗体へのタグ導入や金属付加などのラベル化自体の開発や多重染色を行った場合のラベル化効率の検討も求められる。もし、ラベル由来シグナルではなく、タンパク質そのもの、もしくはその一部を直接 IMS で検出することができるならば、抗体医薬をはじめとする様々なタンパク質の可視化が期待できる。その応用範囲は薬物評価手法に留まらず、生化学や分子生物学においても大きなインパクトがあると考えられる。

3. 研究の方法

IMS を用いたタンパク質の直接検出は、IMS の研究が開始された 1990 年代後半から 2000 年代前半にかけて精力的に行われていたが、前処理が非常に困難であり検出感度も低かった。このような背景から、タンパク質の検出において、既に述べたラベル化体がいられるようになった。一方、申請者は、IMS を用いたタンパク質の検出において試料組織上で分子の位置情報を保ったままタンパク質の変成・消化を行う on-tissue digestion 法を考案し、消化ペプチドの IMS ならびにそのペプチドの同定が可能であることを示した (Shimma S. et al. Anal. Chem. 2008, 80, 878; Shimma S. et al. Surf Int Anal. 2006, 38, 1712). 申請者は、抗体医薬の検出に特化した on-tissue digestion 法の最適化を行い、抗体医薬の可変領域由来のペプチドを検出することで、抗体医薬の可視化が可能であると考えた。また、高感度検出には前処理の中で特にイオン化補助剤であるマトリックスの供給法が重要であるため (Sugiura Y and Shimma S. et al. Anal. Chem. 2006, 78,

8227; Shimma S. et al. J Mass Spectrom. 2013, 48, 1285), ペプチド検出に最適なマトリックスとその供給法を検討する.

4. 研究成果

今回ターゲットとしたハーセプチンの構造において、目的となるペプチドの部位を以下に示した.

Amino Acid Sequence	Peptide region	Transition (m/z and charge)	Role
LLIYSASFLYSGVPSR	Light chain 46-61 CDR	887.0 (2+) > 765.4 (1+, y7)	Confirmation
		887.0 (2+) > 359.2 (1+, y3)	Quantification
DSTYLSSTLTLSK	Light chain 170-183 Fc	751.9 (2+) > 347.2 (1+, y3)	Quantification
		751.9 (2+) > 234.1 (1+, y2)	Confirmation

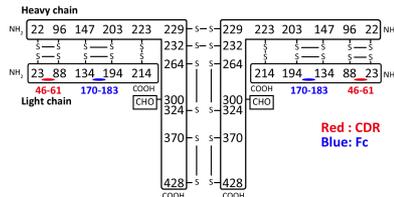


図 3. ハーセプチン模式図

ハーセプチンをトリプシンで消化し、MALDI-MS による分析を行うと、以下に示す通り可変領域由来の様々なペプチドが検出されることが確認できた.

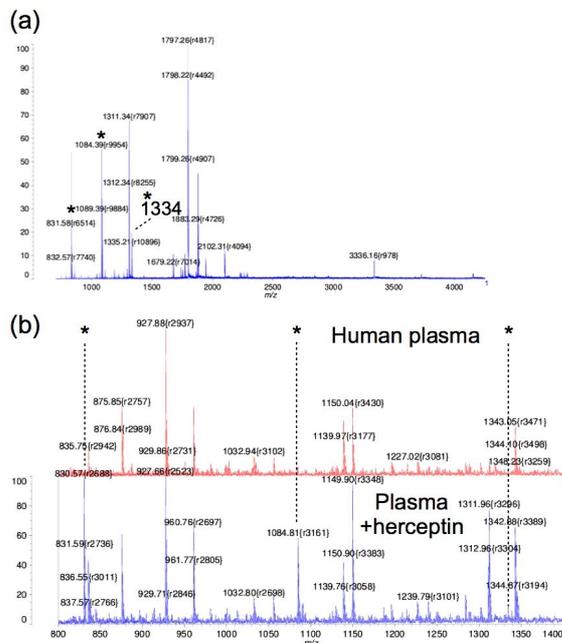


図 4. ハーセプチン消化物マススペクトル. (a)ハーセプチン標準品, (b)ハーセプチン標準品とヒト血漿の混合物.

また、得られたピークを MS/MS 測定に供したところ、配列解析の結果 m/z 830.5: GLEWVAR, m/z 1084.5: IYPTNGYTR, m/z 1334.5: AEDTAVYYCSR であることが確認された. 図 5-図 7 に得られたスペクトルを示す.

図 4(b)においてハーセプチンと血漿の混合物を酵素消化して分析した結果からわかる通り、生体試料中で酵素消化を行うと IgG 由来で共通するペプチドが大量に検出されることがわかった.

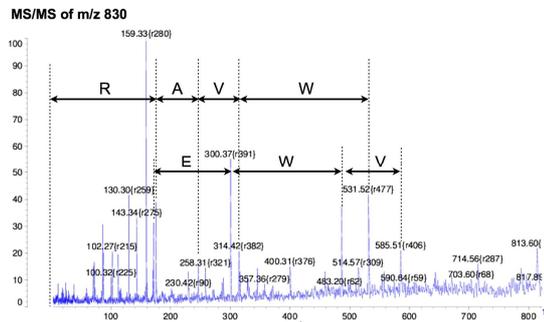


図 5. m/z 830 の MS/MS スペクトル

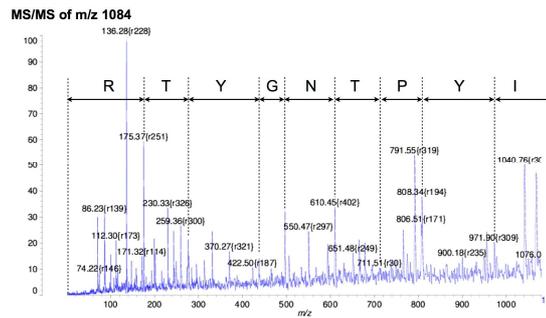


図 6. m/z 1084 の MS/MS スペクトル

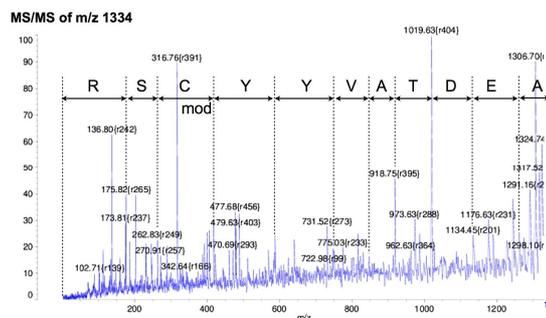


図 7. m/z 1334 の MS/MS スペクトル

この状況は、組織上でも改善することがなかった. すなわち、申請者は試料組織上で分子の位置情報を保ったままタンパク質の変成・消化を行い、得られた消化産物の IMS を行うことで目的を達成を試みたが、量が多い、いわゆるアバンドントなタンパク質が主に検出されるため当初想定されていた目的の達成に至らなかった. 一方、隣接切片上に抗体医薬を滴下した模擬試料から抽出したタンパク質の場合、液中消化を行い、三連四重極型質量分析計(QMS)を用いた液体クロマトグラフトンデム質量分析計(LC-MS/MS)で対象となるペプチドを検出することは可能であった. この場合は、分離マルチプルリアクションモニタリングを用いたため、LC 内部での分離と QMS でのノイズの排除によりシグナルノイズ比が向上するため検出可能である. 一方、IMS では組織上で直接イオン化しそれをイオントラップに全量導入するため、分離精製す

る工程はないため、ダイナミックレンジが狭くアバダントなペプチドが導入された場合、対象となる消化ペプチドの検出が困難になることが組織上でシグナルが得られない1つの要因であると考えられる。組織上消化酵素法の検討を行ったが、今回対象としたハーセプチンに関して顕著な改善が見られなかったため、提案手法（組織上消化法とイメージング質量顕微鏡を組み合わせた手法）ではIgGを改変することで製作された抗体医薬品の可視化は非常に困難であると考えられる。マウス肝臓切片上に滴下した抗体医薬品であってもシグナルを得ることができなかったため、臨床検体で検討するまで至らなかった。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

新聞秀二、「イメージング質量分析の臨床薬理学での活用」、日本質量分析学会北海道談話会、2015年7月24日、北海道大学（北海道・札幌市）

Shuichi Shimma, “Development of iMScope and Applications in Medical Field”, AOHUPO2016, 2016 Sep. 22-23, Fleur De Chine Hotel (Nantou, Taiwan)

6. 研究組織

(1)研究代表者

新聞秀一（SHIMMA, Shuichi）

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：30515896