

## ホルマリン漬けから着想した小分子可視化法 —医薬品開発効率化につながる新たな戦略—

### 概要

京都大学大学院工学研究科の浜地 格 教授、野中 洋 同特定准教授、美野 丈晴 同博士課程学生らの研究グループは、医薬品の多くを占める小分子が実際の動物体内でどのように移動するかを明らかにする新しい方法を開発しました。

新たな医薬品や診断薬を開発するためには、候補となる分子がどのように体の中を移動するかを調べるのが重要です。医薬品候補となる分子の多くは小分子という分類に属していますが、これまで小分子が動物体内でどのように移動するかを調べる方法は限られていました。本研究グループは、医学・生理学分野で古くから用いられる「ホルマリン組織固定」の化学的原理に着目し、それを拡張することによってマウス脳内の小分子の分布を可視化することに成功しました。分子の動きを「固定」することで、これまでよりも高い解像度で分布が解析できるようになりました。この成果は、新たな医薬品開発の効率化につながると期待されます。

本研究成果は、2022年12月1日（米国東部時間）に国際学術誌「Chem」に掲載されました。

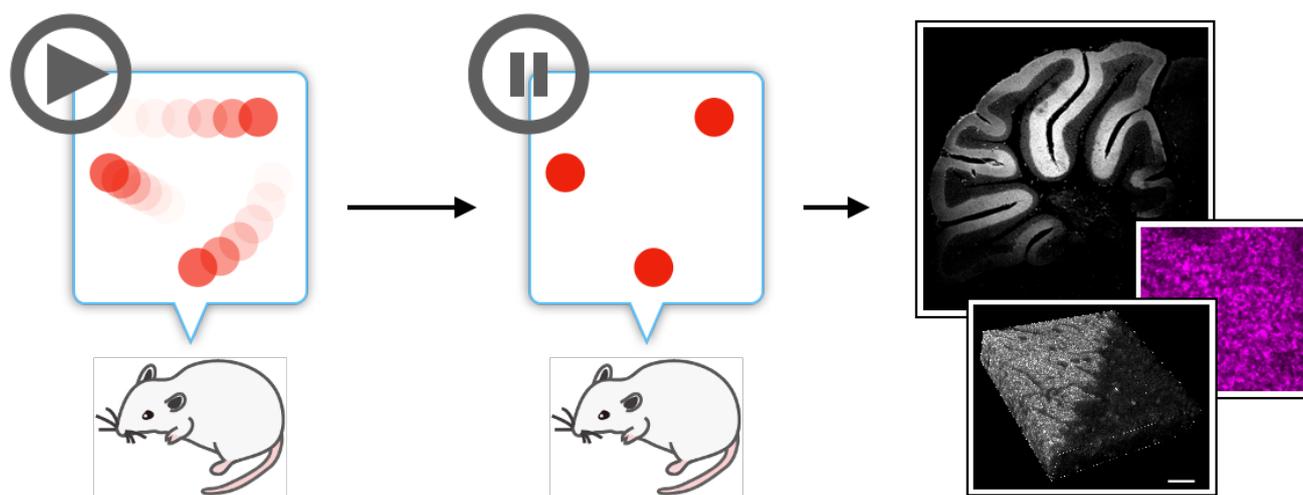


図 分子の動きを「固定」して詳しく調べる新技術。図中の赤丸は、動物体内での分布や移動を調べたい分子を表す。体内のどこに分子がいるかを、右の写真の様に画像化して調べることができる。

## 1. 背景

疾患の治療薬や診断薬としてさまざまな小分子が用いられています。薬の多くは我々の体に入ったのち、特定の組織領域に集積し、疾患に関係するタンパク質と結合することで機能を発揮します。一方で望まない組織領域への分布や、想定外のタンパク質との結合は、薬本来の機能が十分発揮できないばかりか、副作用をもたらす場合もあります。そのため新たな医薬品の開発には、候補分子が体内のどこへどのくらいの速さで移動し排出されるか（薬物動態）や、どのようなタンパク質と結合するかを調べるのが重要です。しかし、実際の動物体内で、このような性質を評価する方法は限られていました。一般的には、薬物動態を調べるために血液や回収した臓器をすりつぶした液に含まれる小分子の量を測定しますが、この手法では臓器の中でどのように小分子が分布していたかの情報が失われてしまいます。小分子の組織内での分布をより詳細に調べることができれば、よりよい医薬品の開発に貢献できると期待されます。

## 2. 研究手法・成果

こうした背景から、本研究グループは、小分子の生体内移動とタンパク質への結合を可視化する手法として *FixEL* 法を考案しました。*FixEL* 法は小分子の生体内での分布を高い解像度で画像化する手法です。本手法では、はじめに対象とする小分子にアミノ基と蛍光色素を連結します（図 1A）。この分子を実験動物のマウスに投与したのち、ホルマリン漬けにも使われるパラホルムアルデヒド（PFA）と呼ばれる薬品を全身に処理することで、組織の固定と同時に、小分子のその瞬間の位置を蛍光色素とともに体内に固定することができると考えました（図 1B）。また、薄切りにした組織のどこから蛍光が検出されるかを共焦点レーザー顕微鏡で調べることによって、小分子のある瞬間の位置をマイクロメートル（ $\mu\text{m}$ 、 $1\ \mu\text{m}$  は 100 万分の 1 メートル）の解像度で解析できるようになると期待しました。

まず本グループはマウスの脳に豊富に存在するタンパク質に結合する小分子の分布を、*FixEL* 法によって画像化できるか調べました。具体的には、代謝型グルタミン酸受容体 1（mGlu1）と呼ばれる、脳内での情報伝達を担う重要な膜タンパク質と結合する小分子（mGlu1 リガンド）を標的として実験しました。標的小分子へアミノ基と蛍光色素を修飾した分子をマウスの脳へ投与したあと、麻酔下で全身に PFA を処理しました。薄切りにした脳組織を共焦点レーザー顕微鏡で蛍光観察した結果、脳の中でも小脳分子層と呼ばれる領域から強い蛍光が検出されました（図 2A）。小脳分子層は今回の標的小分子が結合する mGlu1 が豊富に存在することが知られる領域です。さらに、高倍率での観察を行った結果、小脳分子層のシグナルは  $\mu\text{m}$  以下のサイズの粒状の蛍光シグナルが集まっていることがわかりました（図 2B）。この小さな粒状のシグナルは、mGlu1 の分布とよく一致しました（図 2C-D）。以上の結果は、生きたマウス脳内で標的小分子が特定のタンパク質に結合していることを反映しており、その様子を *FixEL* 法によって高い解像度で解析できることを示しています。

続いて、*FixEL* 法によって標的小分子がマウス脳内で移動する様子を捉えることを試みました。*FixEL* 法では PFA を処理する瞬間に小分子の位置が体内に固定されます。そこで複数のマウスに対して、PFA 処理をそれぞれ異なるタイミングで行うことによって、各時間の分子の位置を組織へ固定できると考えました（図 3A）。実際に、標的小分子の投与から PFA 処理までの時間を変えることで、それぞれ異なる蛍光の分布が見られました（図 3B）。標的小分子は投与から 30 分後は、投与された位置の周辺に多く残っていました。その後、徐々に脳内を移動し、6 時間後には結合相手のタンパク質が豊富に存在する小脳と視床と呼ばれる領域にだけ残ることがわかりました。24 時間後には脳全体から蛍光が見られなくなったことから、標的小分子が脳の外へ排出されたことがわかりました。また興味深いことに、分子が徐々に小脳の外側から内側に向かって拡散する様子を捉えることにも成功しました（図 3C,D）。これは時間変化を捉えられるという特徴と、高い解像度での解

析ができるという特徴の両方を持つ *FixEL* 法だからこそ得られた解析結果です。

さらに、*FixEL* 法を用いることによって、mGlu1 に結合する小分子だけでなく他の小分子も同じ原理で組織内の位置を捉えられることがわかりました。AMPA 型グルタミン酸受容体に結合する小分子や、ドパミン D2 受容体へ結合する統合失調症治療薬スピペロンに対しても *FixEL* 法を適用して分布の画像化に成功しています。また小分子だけでなく、新しいタイプの医薬品として期待される小型抗体も同様のしくみで脳内分布を画像化できました。さらに組織透明化技術との組み合わせによって、小分子の組織内での位置を 3 次元的に解析することにも成功しました (図 4A-C)。

### 3. 波及効果、今後の予定

本研究グループが新たに開発した *FixEL* 法を用いることで、さまざまな小分子の動物体内での分布や移動を調べることができます。この手法を用いて、新しい医薬品や診断薬の開発を効率化できると期待されます。

今回は脳内での分布に限った解析でしたが、今後は全身への応用もできるようになると期待されます。

### 4. 研究プロジェクトについて

科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 総括実施型 (ERATO)

研究領域：「浜地ニューロ分子技術プロジェクト」 (研究総括：浜地 格 京都大学 教授)

文部科学省科学研究費助成事業 新学術領域研究

研究領域：「分子夾雑の生命化学」 (領域代表者：浜地 格 京都大学 教授)

研究課題名：「分子夾雑下での生命分子の直接修飾/機能解析を実現する有機化学」 (研究代表者：浜地 格 京都大学 教授)

文部科学省科学研究費助成事業 新学術領域研究

研究領域：「生命金属科学」分野の創成による生体内金属動態の統合的研究 (領域代表者：津本 浩平 東京大学 教授)

研究課題名：「生命金属動態の理解に向けた金属イオン Conditional プロテオミクス法の開発」 (研究代表者：田村 朋則 京都大学 講師)

文部科学省事業 科学技術イノベーション創出に向けた大学フェロシップ創設事業

関連研究機関

京都大学、名古屋大学、オックスフォード大学、MRC 分子生物学研究所、慶應義塾大学

#### <用語解説>

**小分子**：おおよそ分子量 500 以下の小さな分子を指す。

**アミノ基**：-NH<sub>2</sub>で表される官能基で、PFA と結合することができる。

**蛍光色素**：蛍光と呼ばれる、特定の波長の光を当てることで、決まった波長の光を生じる現象が見られる分子。

**共焦点レーザー顕微鏡**：固定組織上の蛍光色素の分布を μm の解像度で解析できる装置。

**AMPA 型グルタミン酸受容体**：グルタミン酸と結合する膜タンパク質。脳内で情報伝達を担っている。

**ドパミン D2 受容体：**ドパミンと結合する膜タンパク質。脳内で情報伝達を担っている。ドパミン受容体は統合失調症やパーキンソン病に関連すると考えられている。

**組織透明化技術：**組織を化学的処理することによって透明にする技術。組織を薄切りにすることなく、3次元的な蛍光の分布を解析することができるようになる。

#### <研究者のコメント>

この研究は、我々が当初進めていた小分子を用いてタンパク質を可視化するという別のプロジェクトからヒントを得て、小分子側を可視化するという逆転の発想から生まれたものです。本研究グループにとって、生きたマウスの脳での実験は未知への挑戦でしたが、慶應大学医学部の柚崎先生・掛川先生を始め、多くの共同研究者のサポートを受け、美野君（現浜地研博士後期課程2年）を中心に粘り強く研究を進め素晴らしい成果につながりました。今回開発した手法は、標的小分子の生体内分布や移動を解析するための有用な研究ツールとして、これまでにない視点から医薬品や診断薬開発などに知見を与えるものと期待されます。

#### <論文タイトルと著者>

タイトル：Revisiting PFA-mediated tissue fixation chemistry: *FixEL* enables trapping of small molecules in the brain to visualize their distribution changes (PFA 組織固定化学の再考：*FixEL* 法による脳内小分子の捕捉と分布変化の可視化)

著者：Hiroshi Nonaka, Takeharu Mino, Seiji Sakamoto, Jae Hoon Oh, Yu Watanabe, Mamoru Ishikawa, Akihiro Tsushima, Kazuma Amaike, Shigeki Kiyonaka, Tomonori Tamura, A. Radu Aricescu, Wataru Kakegawa, Eriko Miura, Michisuke Yuzaki, Itaru Hamachi

掲載誌：Chem

DOI：10.1016/j.chempr.2022.11.005

<参考図表>

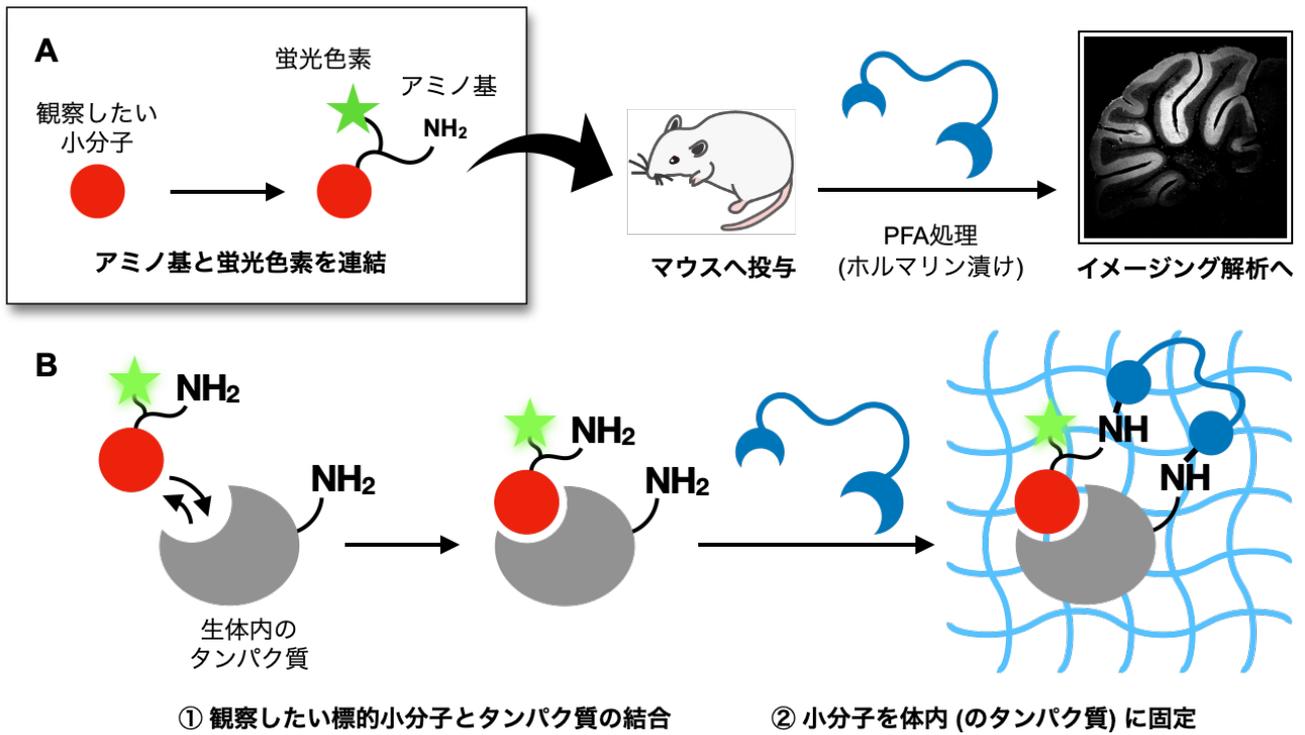


図1 (A) 観察したい小分子へのアミノ基導入。(B) アミノ基と PFA との結合を利用した小分子の体内への固定。

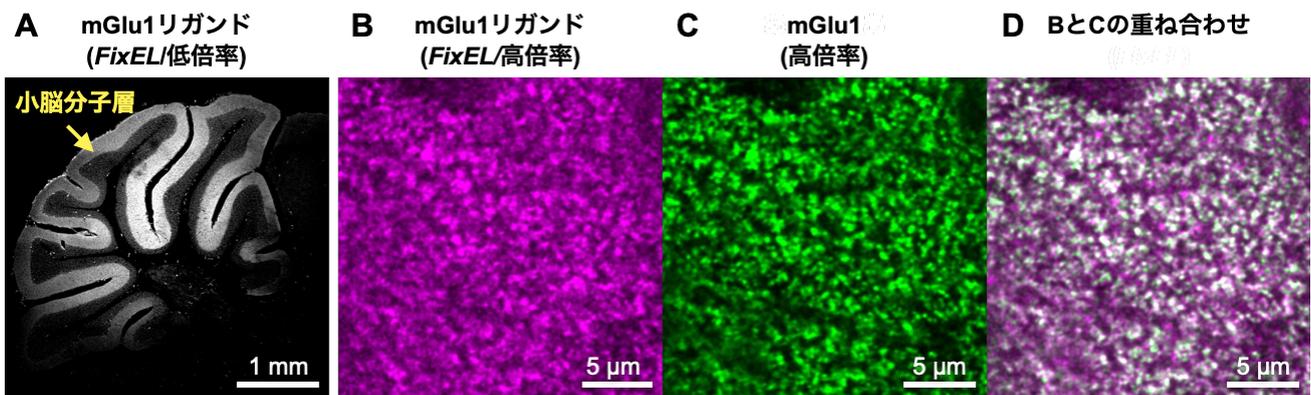
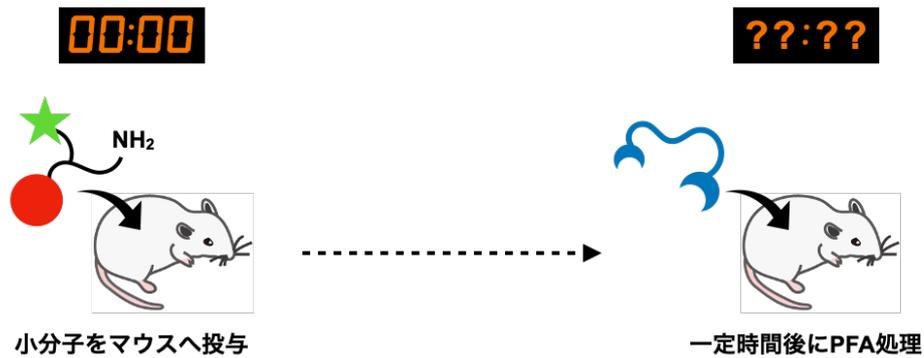
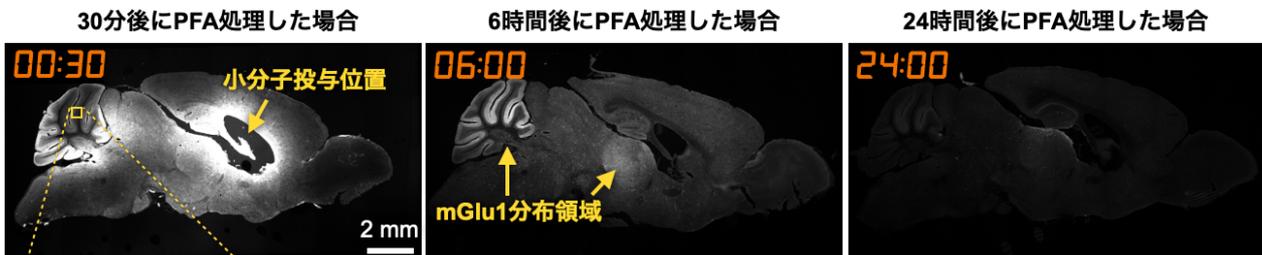


図2 (A) mGlu1 リガンドを FixEL 法で固定したマウス小脳の蛍光観察画像。(B) 小脳分子層を拡大した観察結果。(C) Bと同じ領域の mGlu1 タンパク質分布。(D) BとCの画像の重ね合わせ。白くなっているほどよく分布が一致していることを示す。

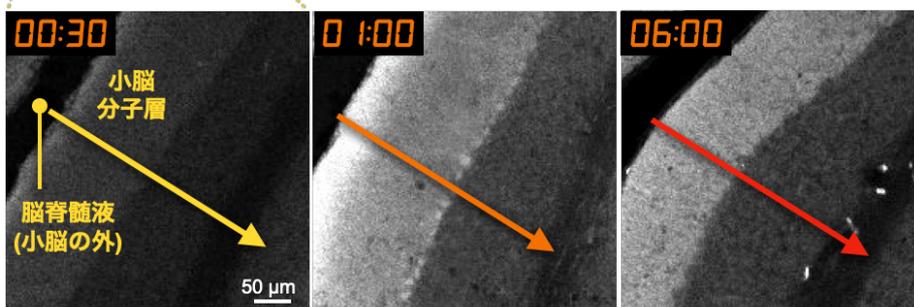
A



B



C



D

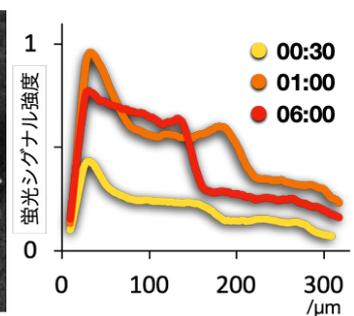


図3 (A) 小分子の体内分布の時間変化を調べる実験の手順。(B) mGlu1 リガンドを投与したマウスの全脳スライス蛍光観察画像。投与からそれぞれ30分、6時間、24時間後にPFAで固定処理した。(C) 小脳の一部を拡大した蛍光観察画像。mGlu1 リガンドの投与から30分～6時間後にPFA処理した。(D) Cの画像上の矢印上の蛍光シグナル強度をグラフ化したもの。30分や1時間の時点で、小脳分子層の中でも特に脳脊髄液に触れている領域の蛍光シグナル強度が高いことがわかる。これはmGlu1 リガンドが脳脊髄液側から小脳分子層へ浸透していることを反映している。

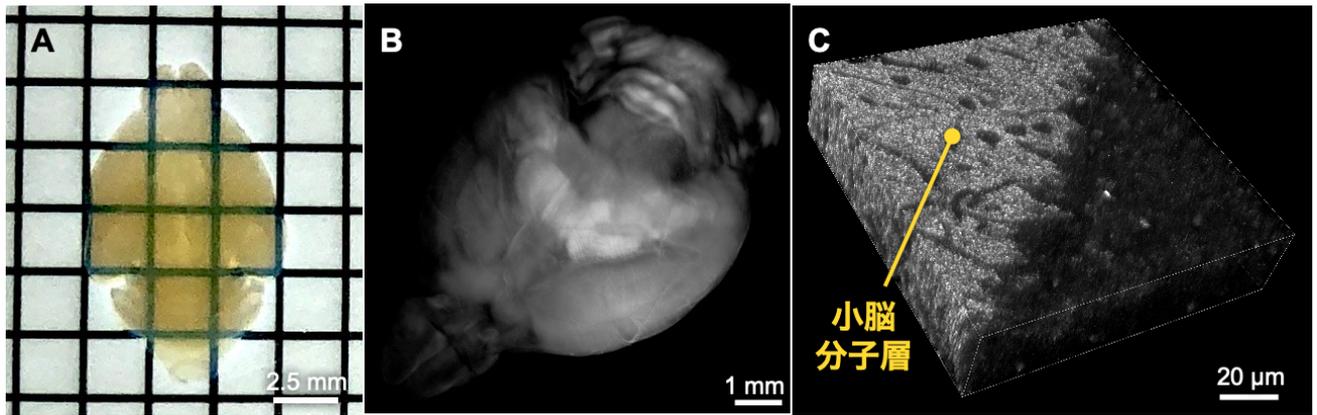


図 4 (A) 透明化処理したマウスの全脳。(B) mGlu1 リガンドのマウス全脳 3D 分布。(C) 小脳のみ拡大した 3D 分布。