

脳内薬物濃度とバイオマーカー マイクロダイアリシスの活用

2019/12/10 第34回 日本薬物動態学会 年会 ランチョンセミナー

Axcelead Drug Discovery Partners株式会社

統合生物

村上 浩司

➤ PK/PD

- ◆ 薬物の血中濃度および脳内濃度からターゲットとなる組織での薬物量を確認
- ◆ 脳への送達を確認しつつ、ターゲットに化合物が結合し、シグナル伝達が行われているかどうかをPDマーカとして確認

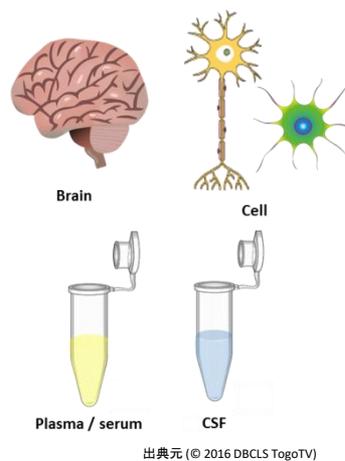
➤ 脳内での機能の検証

- ◆ ターゲットに化合物が作用した上で、機能的な作用を確認する目的でNeurotransmitterを解析することで、評価化合物のPotentialを評価

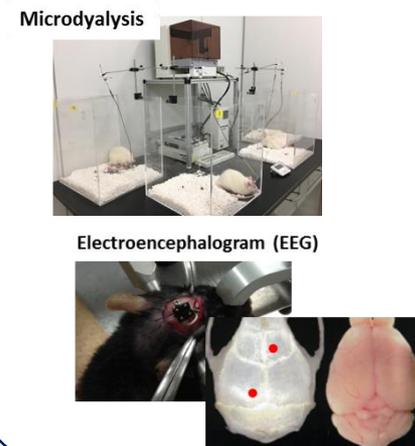
➤ 行動薬理評価

- ◆ 評価化合物のターゲットへの結合、機能的な変化を確認した上で障害を改善するかどうかを行動薬理試験を用いて評価

薬物動態・マーカの変動



脳内での機能の検証

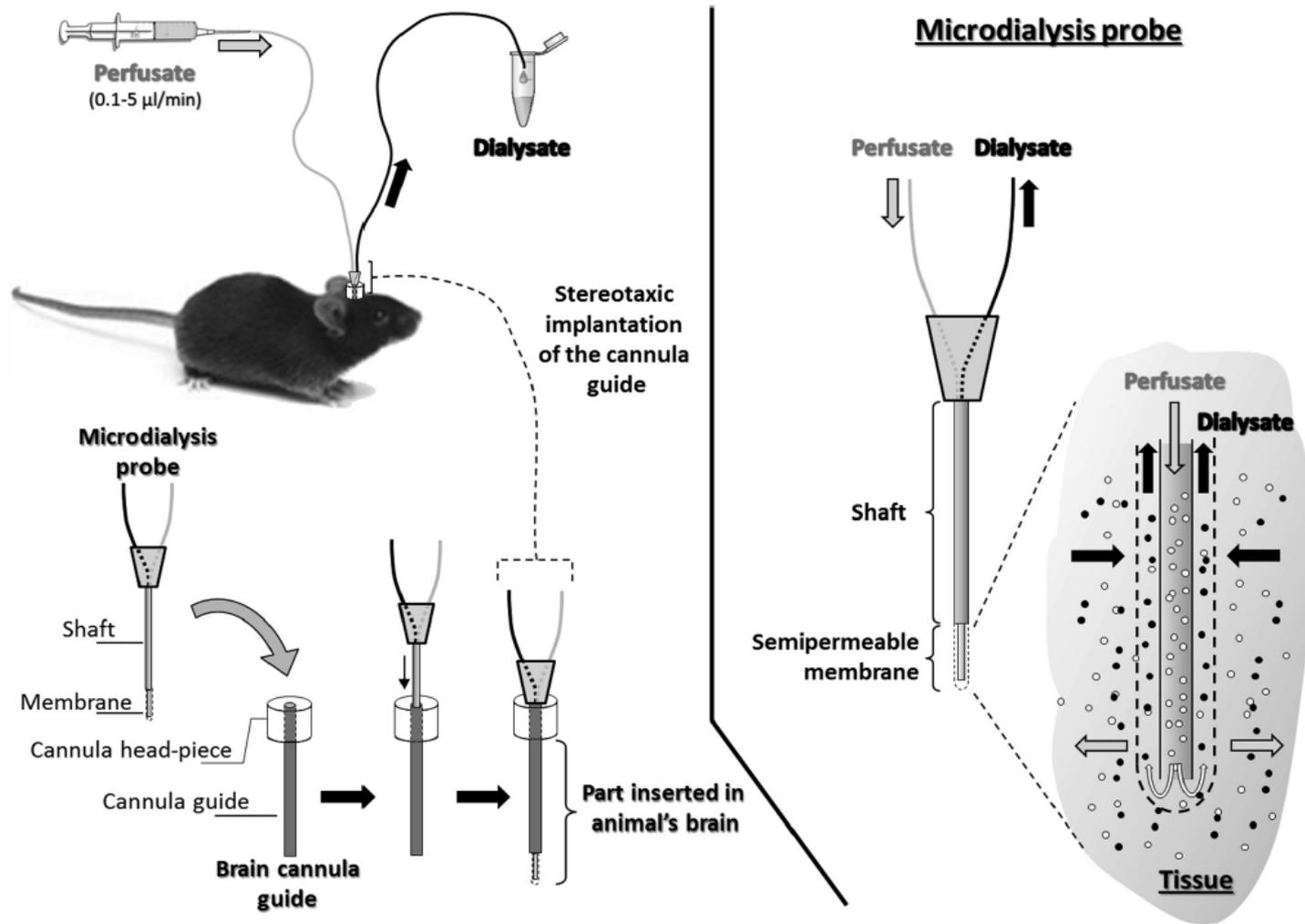


行動薬理試験

Behavioral test



マイクロダイアリシス



(Penicaud, Benani et al. 2013 Animal Models for the Study of Human Disease)

マイクロダイアリシス

● マイクロダイアリシス

・脳内に微小透析管を挿入し、細胞外モノアミン濃度を経時的に測定する試験。(フリームービングで実施可能)

脳固定装置



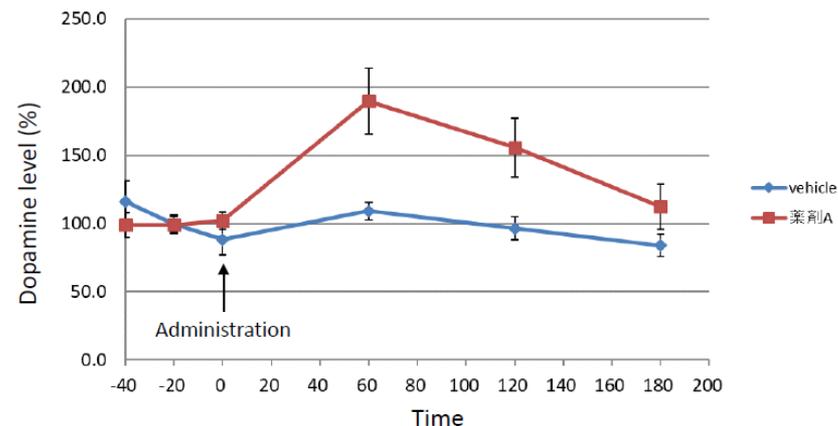
高速液体クロマトグラフ (HPLC)



【測定】

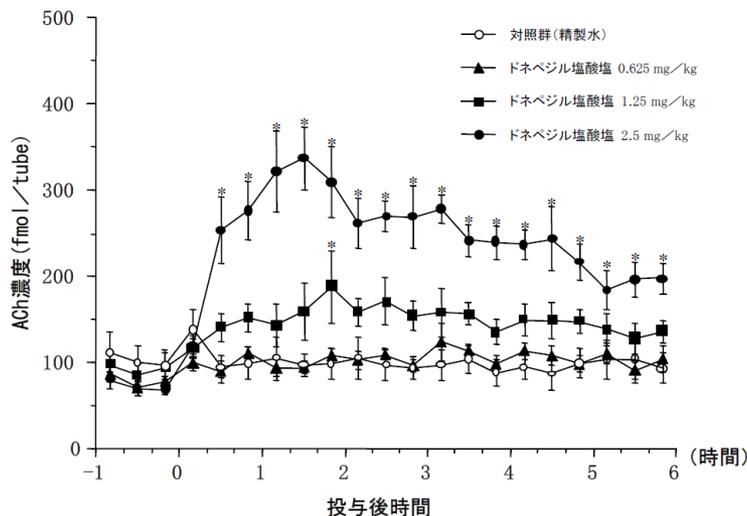
- ・ HPLCを用いて、マイクロダイアリセートの採取に並行してモノアミン・アミノ酸の測定が可能
- ・ マイクロダイアリセートを回収後に、LC-MSを用いて1サンプルから複数種類のモノアミンを評価することが可能

フラクションコレクター



ドネペジルによるアセチルコリン遊離量と行動評価

アセチルコリンの変動 (マイクロダイアリシス)

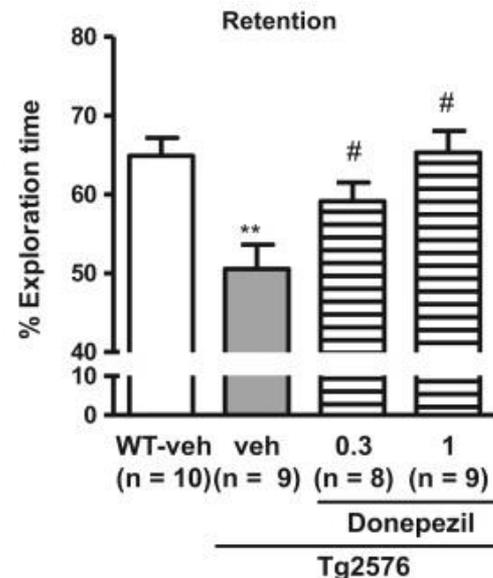


ラット海馬細胞外 ACh 量に対するドネペジル塩酸塩の効果

(ドネペジル インタビューフォームより)

化合物の脳内濃度と相関して、細胞間隙中のアセチルコリン濃度が増加

薬効評価 (新奇物体認知試験)



(Murakami et al., Brain Res. 2016)

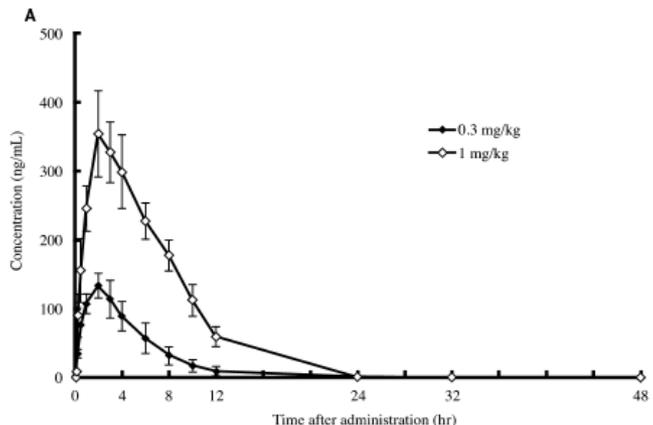
アセチルコリンの増加がみられるタイミングで実施した認知機能試験において、アルツハイマー病モデルマウスである Tg2576 マウスの認知機能を改善

脳内における薬物濃度、薬物による作用及び薬効が相関

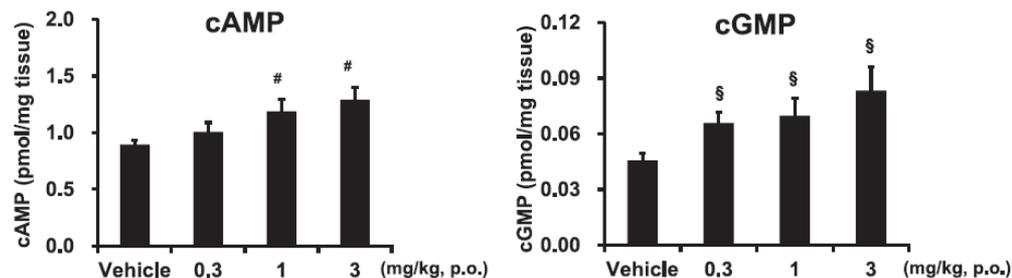
PDE10A inhibitor

無断転載禁止

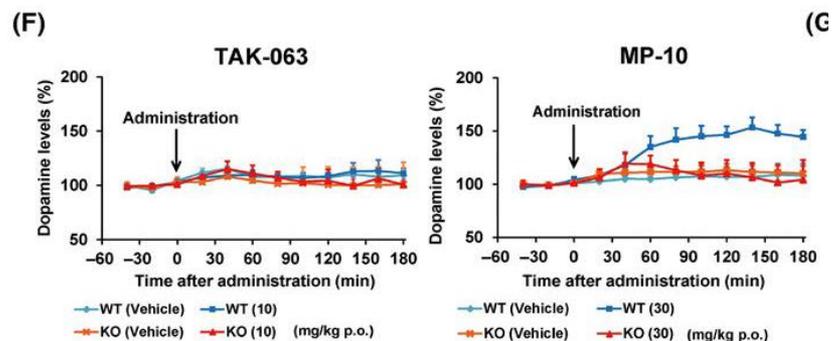
PKデータ (血中濃度)



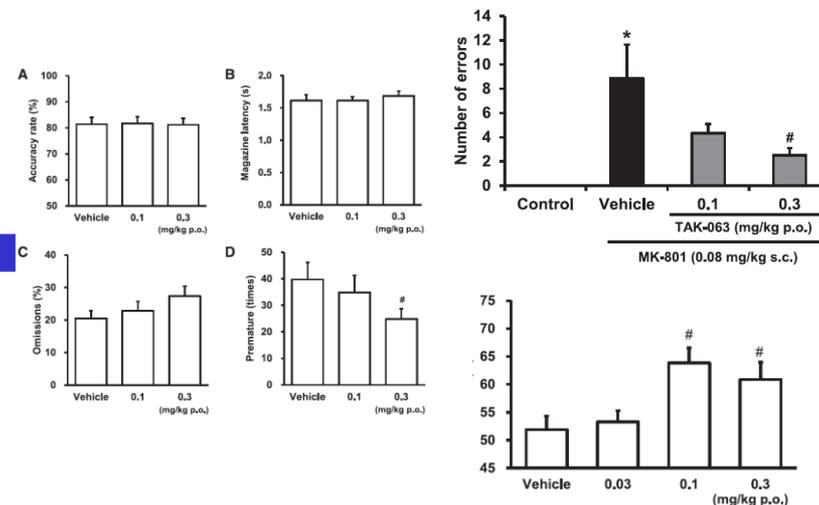
PDデータ (PDE直下のマーカ)



ドパミンの遊離促進(マーカの変動; 差別化)

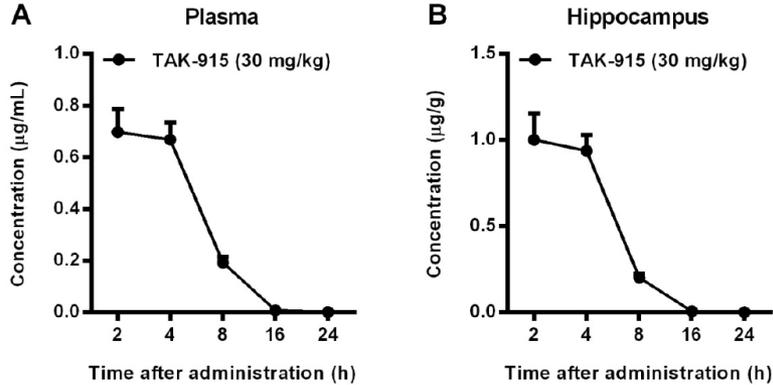


薬効評価 (目的に即した行動評価)

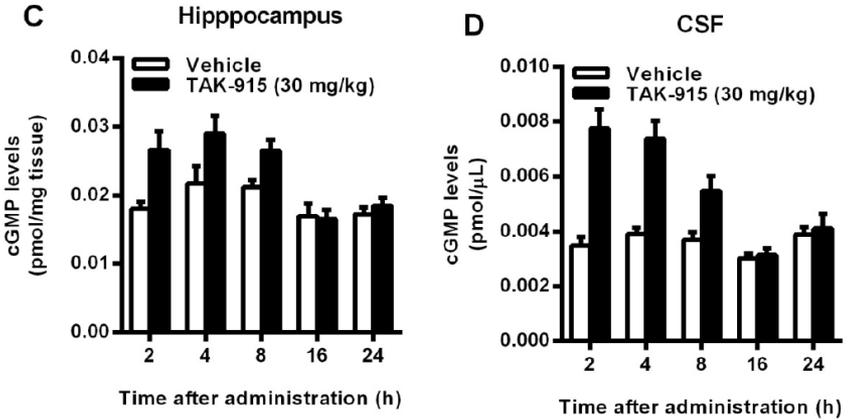


PDE2A inhibitor (認知機能改善作用のメカニズム探索)

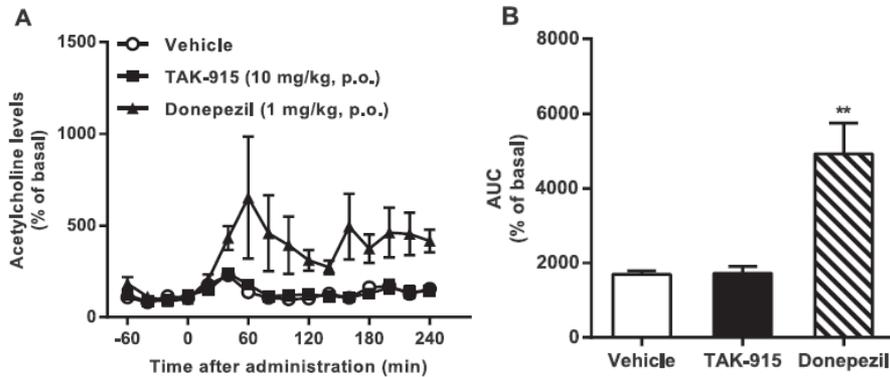
PKデータ (血中濃度)



PDデータ (PDE直下のマーカ)

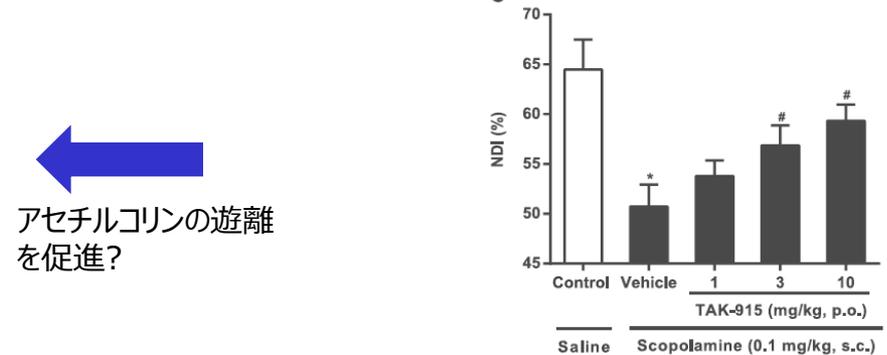


マイクロダイアリシス (マーカの変動)



新奇物体認知試験 (薬効評価)

スコポラミンによる認知機能障害モデルにおいて認知機能の改善が見られた



アセチルコリンの遊離を促進?

この化合物による認知機能改善作用はアセチルコリンの遊離作用によるものではないことが示唆された

(Nakashima et al., Behav Brain Res., 2019, Nakashima et al., JPET 2018)

神経伝達物質

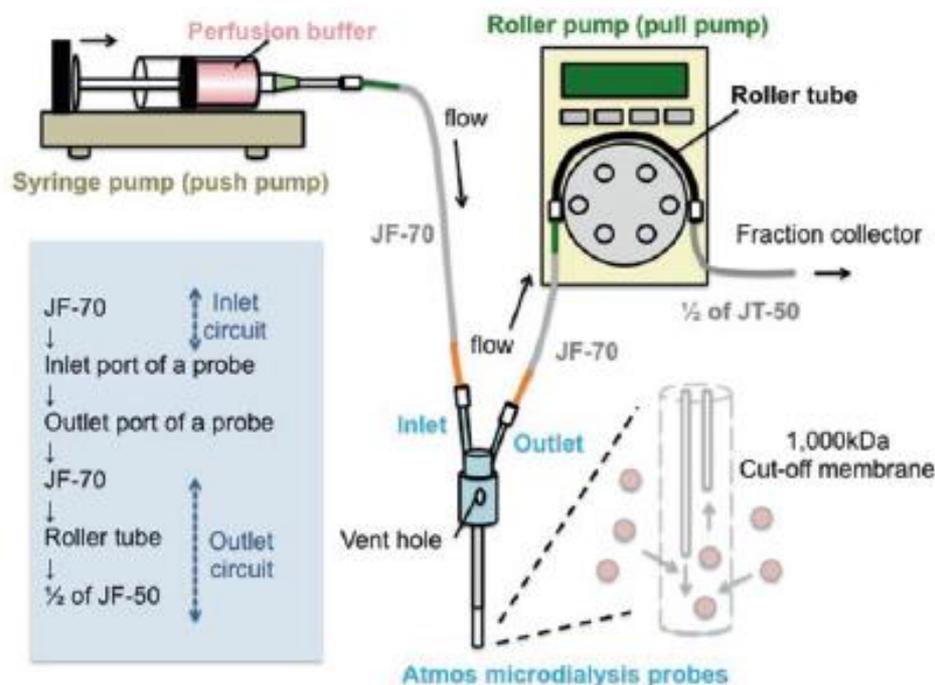
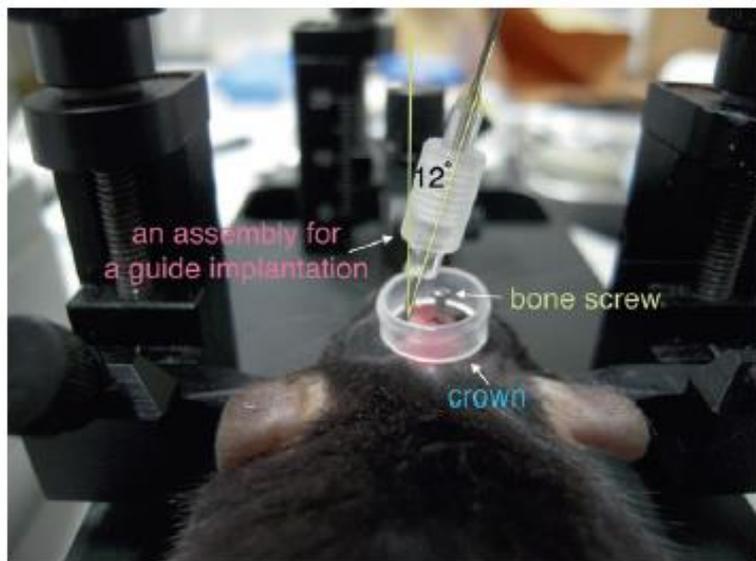
AXL Name	Group Name	hCSF
Glutamic acid	Ala/Asp/Glu pathway	Yes
4-Aminobutyric acid(GABA)	Ala/Asp/Glu pathway	Yes
Tyrosine	Tyr pathway	Yes
4-Hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid (HVA)	Tyr pathway	Yes
Tyramine	Tyr pathway	Yes
DOPA	Tyr pathway	Yes
Dopamine(DA)	Tyr pathway	Yes
Epinephrine(E)	Tyr pathway	Yes
Norepinephrine(NE)	Tyr pathway	Yes
Octopamine	Tyr pathway	Yes
Tryptophan	Trp pathway	Yes
5-OH tryptophan	Trp pathway	Yes
5-HIAA	Trp pathway	Yes
Histamine	His pathway	Yes
Melatonin	Trp pathway	No
Serotonin(5-HT)	Trp pathway	Yes
Tryptamine	Trp pathway	Yes
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC)	Tyr pathway	Yes
(±)-4-Hydroxy-3-methoxymandelic Acid(VMA)	Tyr pathway	Yes
rac 4-Hydroxy-3-methoxyphenylethylene Glycol(MHPG)	Tyr pathway	Yes
DL-3,4-Dihydroxyphenyl glycol(DHPG)	Tyr pathway	Yes
3-Methoxytyramine(3MT)	Tyr pathway	Yes
Glycine	Gly/Ser/Thr pathway	?
Aspartic acid	Ala/Asp/Glu pathway	?
Acetylcholine	-	?

ヒトCSF 100 μLを使用時の測定結果

ペプチドダイアリシス

1,000kDa cutoffのマイクロダイアリシスプローブにより、無麻酔・無拘束死下で細胞間隙中の1,000kDa以下のペプチド・タンパクの回収が可能

- ➔ 薬物によるペプチド・タンパク質の細胞からの放出に対する作用
- ペプチド・タンパク質の細胞からの概日リズムの解析
- 細胞外に放出されたペプチド・タンパク質のみを解析できるため、細胞内外totalの解析では見られない変動をとらえることができる



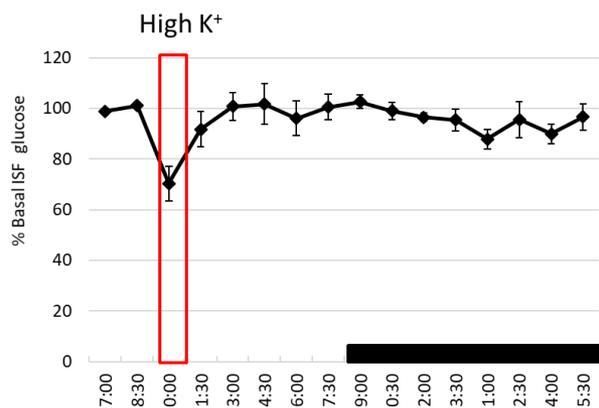
Yamada K. Tau Protein. Methods in Molecular Biology 2017

ペプチドダイアリシス

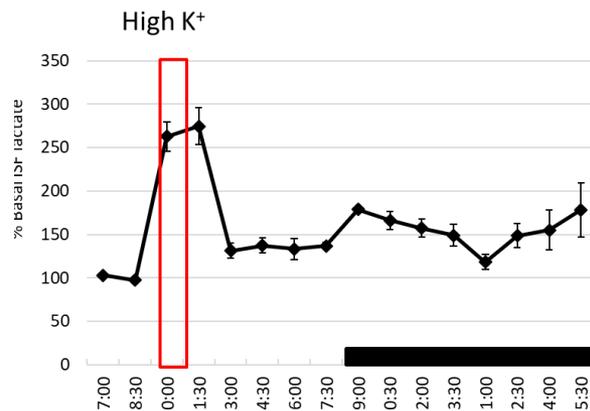
- Eicom社のシステムおよびAtmosLM マイクロダイアリシスプローブを用いてペプチドダイアリシスの評価系を構築中。
- 24時間以上の間、無麻酔・無拘束下でサンプリングが可能
- 細胞間隙中のtauについては測定可能

【マウス海馬における高カリウム処置によるISF中tau量の変動 (reverse microdialysis法)】

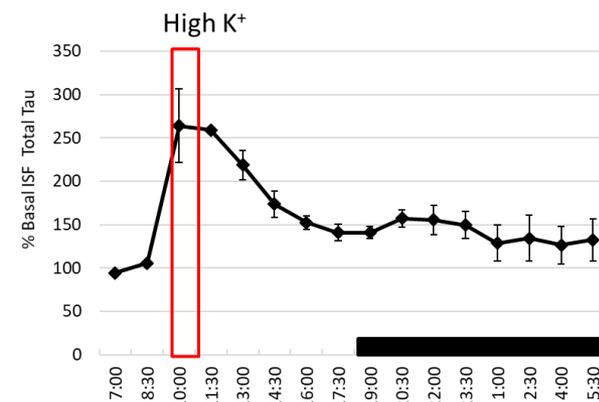
Glucose



Lactate



Total Tau



(Yamada K et al., J Exp Med 2014を再現性)

マイクロダイアリシスの有用性

- ◆ 脳全体やCSFを用いた解析でも捉えられない神経機能をとらえることができる
- ◆ 無麻酔・無拘束下で経時的にサンプルを回収し、変動を追うことができる
- ◆ 今まで主に神経伝達物質の解析に使用されてきたが、高分子を回収できるようになり、神経変性疾患との関与が示唆されるタンパクの変動を調べられる
- ◆ 脳の特定部位にプローブを留置できることから、特定部位でのマーカの変動を捉えられる

薬理試験、中枢疾患領域

in vitro試験

- ▶ 中枢性細胞の初代培養を用いたタンパク質・遺伝子発現解析

in vivo試験

- ▶ 行動薬理試験(精神疾患関連の評価系)
 - ・プレパルスインヒビション試験
 - ・社会性試験
 - ・精神刺激剤誘発の過活動
- ▶ 行動薬理試験(運動機能の評価系)
 - ・握力測定
 - ・ロタロッド試験
 - ・ランニングホイールテスト
- ▶ 行動薬理試験(認知機能の評価系)
 - ・新奇物体認知試験
 - ・8-方向放射状迷路試験
- ▶ ターゲットエンゲージメント、PK/PD解析
 - ・マイクロダイアリシス
 - ・睡眠脳波の測定・解析
 - ・薬効病理解析
 - ・脳脊髄液(CSF)の採取
- ▶ 動物モデル
 - ・認知機能障害モデル(スコポラミン、MK-801)
 - ・バルプロ酸誘発自閉症モデル
 - ・脳内局所投与による動物モデルの作製