

「マルチスケール・マルチフィジックス現象の統合シミュレーション」  
平成 18 年度採択研究代表者

三上 益弘

(独)産業技術総合研究所 計算科学研究部門・副部門長

DDS シミュレータの研究開発

## 1. 研究実施の概要

薬物を特定の患部にのみ運搬し、作用させることは、薬効を飛躍的に高める上でも、また副作用を少なくする上でも、極めて重要であり、薬剤を内包し運搬するキャリアー(薬物運搬体)の研究開発が進められている。このような薬剤運搬システム(以下、DDS と呼ぶ)の開発は、(a)薬剤分子を内包する DDS ナノ粒子(リポソームと糖鎖の複合体)を構成する脂質分子の設計から DDS ナノ粒子の形成プロセスの設計、(b)疾患部近傍の血管壁にある糖鎖認識タンパク質(レクチン)を認識する糖鎖の分子設計、(c)血管中の DDS ナノ粒子の輸送プロセスの設計まで、ナノスケールからミリスケールに及ぶマルチスケール・マルチフィジックス問題である。このため、設計技術は未だ確立されておらず、手探りで開発が進められている。そこで、本研究では、能動的標的指向性 DDS の有力な候補として注目されているリポソームシステムを対象にして、(1)DDS ナノ粒子設計、(2)糖鎖とレクチンの分子間相互作用解析、(3)血管内における DDS ナノ粒子の流動解析を可能にするマルチスケールシミュレーション技術を開発し、(4)DDS シミュレータに統合し、DDS の設計技術を確立する。

## 2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1)に対応する)

薬剤の患部指向性の向上と副作用の低減のために、薬剤をリポソームなどで包んで運ぶ薬物運搬システム(DDS) が盛んに研究されている。しかしながら、DDS は、ナノスケールの分子膜からミリスケールの血管に及ぶマルチスケール問題であるので、その開発は手探りで進められているのが現状である。そこで、我々は、この DDS の現状に挑戦するために、現在、実用化の可能性が最も高いと言われているリポソームと糖鎖からなる能動的標的指向性 DDS を対象にして、フラグメント分子軌道法・分子シミュレーション・流体力学に基

づいたマルチスケール DDS シミュレータを開発している。以下では、3 つのグループの H19 の研究成果と進捗状況について報告する。

### (1) DDS ナノ粒子設計シミュレーション技術の研究開発(G1)

リポソームのような DDS 材料の投与効果を高めるには、体内での運搬時におけるリポソームの安定性や内包する薬剤のリポソーム膜外へのリークの制御が重要となる。そこで本研究グループでは、リポソーム・脂質二重層膜の流動場での安定性や低分子の膜透過性の研究とそのための効率的サンプリング方法<sup>1)</sup>と高速高精度自由エネルギー計算法<sup>2)</sup>の開発を行っている。H19 年度は、1) 脂質二重層膜の多重相膜への流動場の影響<sup>4)</sup>、2) DDS 材料として注目されるフッ化脂質二重膜の水分子の膜透過自由エネルギー<sup>3)</sup>、また 3) 脂質二重層膜へのコレステロール添加効果に関する研究を行った。

1) 散逸粒子動力学シミュレーションを用いてモデル脂質膜のラメラ構造へのせん断流動場が与える影響について調べた。自己組織化されたラメラ構造の系を用意し、その系にせん断を加えた。弱いせん断の場合には、ラメラの法線方向はずり方向に垂直な任意の方向を向き、方向は初期条件に依存して選ばれるが、せん断率を増加させるとラメラの法線方向は、初期条件によらず渦度方向を向くというヒステリシス現象を起こすことがわかった。このヒステリシスはせん断応力でも観測された(図 1)。同様のシミュレーションをリポソーム系についても行い、リポソームの変形が比較的弱いせん断流でも引き起こされることを見出した。今後、より大規模なシミュレーションによって、リポソームの変形や内包物のリークへの影響を調べる。2) フッ化脂質二重膜を横切る水の自由エネルギー解析により、フッ化膜は通常の炭化水素膜に比べて膜透過の自由エネルギー障壁が高いことが示された。これはフッ素化膜の水漏れが低いことを示しており、実験で観測されるフッ素膜の高い疎水性と一致する結果が得られた。また詳細な膜内構造解析の結果、膜内のフッ化セグメントの高いパッキング構造がこのような高い疎水性の原因となっていることを明らかにすることができた。3) スフィンゴ脂質二重膜系へのコレステロールの効果を明らかにするために、コレステロールを含まない系とコレステロール濃度 10%, 20%, 30%, 40%, 50% の 6 種類の系で行った。図 2 にコレステロール濃度の 0% と 40% の時の平衡状態における系のスナップショットを示す。コレステロール導入により膜面積は減少し、それに伴いラメラ層の膜厚は増加する結果を得た。これはコレステロール分子のスレロール面に接近している脂質のアシル鎖のゴーシュ構造が減少し、膜圧方向に対する配向性が増加することに起因しており、実際、膜内でのコレステロール存在領域でのアシル鎖のオーダーパラメータは顕著に増加をする結果が示された。また、アシル鎖のゴーシュ構造の減少に伴い、膜内のパッキング特性が上昇する結果も示されており、実験結果との良い一致が見られた。現在、自由エネルギー解析により、コレステロール添加によって誘起される脂質膜面内でのドメイン形成のメカニズムの解明に取り組んでいる。

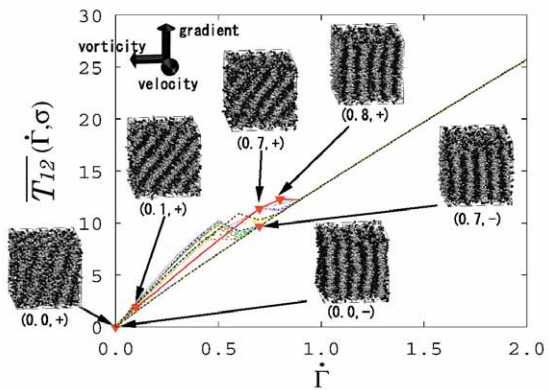


図 1. せん断応力とせん断率の関係

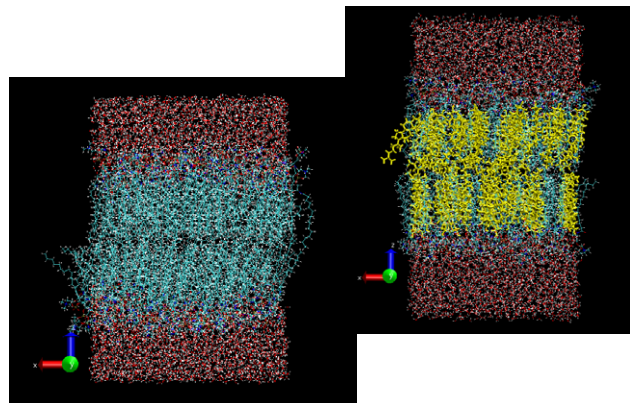


図 2. スフィンゴ脂質二重膜(左)とスフィンゴ脂質とコレステロール混合二重膜(右)

## (2) 糖鎖とレクチンの分子間相互作用解析の研究開発(G2)

糖鎖を特異的に認識して結合する糖タンパク質はレクチンと総称されるが、生物内の細胞間の分子認識、細胞接着、細胞内の物質の取り込みには C 型レクチンが重要である事が知られている。特に白血球の血管内壁への接着過程ではセレクトインが重要な役割を果たす事が良く知られ、この生理学的現象の分子論的メカニズムの解明は、リポソームと糖鎖からなる能動的標的指向性 DDS の開発には不可欠の課題となっている。セレクトインはその存在部位により E, P, L タイプに分類され、一次配列の高い相同性から3種類とも良く似た立体構造を持つが、糖鎖に対する親和性、特異性に関してはタイプにより微妙な差異がある事も知られている。そこでセレクトインの糖鎖認識機構を分子論の観点から明らかにする為に、近年明らかとなった E/P セレクトイン-シアリルルイス X 複合体の結晶構造をもとにモデル化し、一連の系統的な分子モデリングを通して、糖タンパク質セレクトイン-糖鎖間の相互作用の本質を明らかにする研究を実行した。その結果、QM/MM レベルでもフラグメント法ベースの全系量子計算でも解析結果に殆ど差の認められない事から、糖鎖の認識としては基本的に静電相互作用が本質である事が分かった。糖タンパク質の糖鎖認識機構において問題となるのは、(1)糖鎖の **Bioactive conformation** と(2)糖鎖のタンパク質に対する **Binding epitopes** である。しかし実験データをもとにした構造精密化では本質的に E, P 型の基質認識の差が明らかとならなかったため、これら2点に関して有益な情報を得る為に、更に進んで自由エネルギー空間上での糖鎖の構造をマップする事を試みた。その結果から E, P セレクトインの糖鎖認識機構を考察すると、両者とも糖鎖との結合領域は、(1)フコースが Ca 結合ドメインのアミノ酸残基とタイトに水素結合を形成している、(2)ガラクトースがループ領域近傍の極性アミノ酸残基と弱い水素結合を形成している、という2点になることが分かった。一方、タンパク質による糖鎖の認識において、アミノ酸残基側鎖の芳香環と糖鎖分子間の相互作用の重要性が指摘されている。このような相互作用の大きさや方向依存性などの特性を、量子化学計算によつて的確に見積もるべく、用いる基底関数系や計算手法について、フコースとベンゼンの会合体をモデル系として、検討を開始し

た. さらに, アミノ酸残基側鎖の代表的な芳香環であるフェノールやインドールとフコースの相互作用の大きさについても, 予備的な計算を行った. これらの解析結果から, CH/ $\pi$  あるいは OH/ $\pi$  相互作用に分類されるような相互作用が, アミノ酸残基側鎖の芳香環と糖鎖分子の間にも存在することが示唆された.

### (3) DDS ナノ粒子の血管内における流動解析の研究開発(G3)

これまでの調査研究の結果, 薬剤を内包したリポソームを患部に搬送させる際には, その対象により2種類の課題があることが明らかになってきた. その一つは, 毛細血管が延びている組織での DDS で, 血管内を流れてきたリポソームが血管外に流出して患部に到達するタイプである. 細胞レベルに関する解剖学的な文献調査により, 血管内皮細胞に存在する糖鎖分子の林立した特異な構造(糖衣構造) と異常増殖細胞の近傍での細胞間隙拡大が明らかになってきた. これまでのところ, 2次元のモデルで糖衣層の厚さや細胞間隙の大きさが流れに与える影響を計算し, リポソームの標的細胞への接近や細胞間隙の透過にこれらの構造が決定的な重要性をもつ(EPR 効果)との知見を得, 学会で発表した. これと平行して, 糖鎖の形状やその配置を考慮した流れの解析, リポソームとの相互作用についての予備計算を行っている. 他の一つは肝臓のように細胞集合体の間隙を血液が流れる場合の DDS で, 間隙の不均一性が血液流を変化させリポソームの搬送に支配的な影響を及ぼすタイプである. 急速に増殖する細胞近傍での間隙の粗大化と血流の増加, 腫瘍細胞に流入する血液の流路形成(血管新生)およびそれを利用した DDS リポソーム輸送の可能性をシミュレーションにより明らかにし, 学会で公表した. 現在は, これらを3次元領域の計算や組織の変形を取込む方法の開発に向け, また本プロジェクト内の他のグループ(G1 および G2)との密な連携をはかりながら, 実用に耐え得るシステムに拡張する方向で研究開発を進めている.

## 3. 研究実施体制

### (1)「三上」グループ

① 研究分担グループ長: 三上 益弘(産業技術総合研究所計算科学研究部門 副部門長)

### ② 研究項目

(a) DDS ナノ粒子設計シミュレーション技術の研究開発

(b) 糖鎖とレクチンの分子間相互作用解析の研究開発

### (2)「佐野」グループ

① 研究分担グループ長: 佐野 理(東京農工大学大学院共生科学技術研究院、教授)

### ② 研究項目

(a) DDS ナノ粒子の流動解析技術の研究開発

(3)「東芝」グループ

① 研究分担グループ長:伊藤 聡(株式会社東芝 研究開発センター 研究主幹)

② 研究項目

(a) DDS ナノ粒子の流動解析技術の研究開発

(4)「北浦」グループ

① 研究分担グループ長:北浦 和夫(京都大学 教授)

② 研究項目

(a) 糖鎖とレクチンの分子間相互作用解析の研究開発

#### 4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

1. T. Morishita and M. Mikami, “Enhanced sampling via strong coupling to a heat bath: Relationship between Tsallis and multicanonical algorithms”, *J. Chem. Phys.* **127**, 034104 (2007).

2. K. Shinoda, W. Shinoda, and M. Mikami, “Efficient free energy calculation of water across lipid membranes”, *J. Comput. Chem.* in press.

3. H. Saito, W. Shinoda, and M. Mikami, “Enhanced Hydrophobicity of Fluorinated Lipid Bilayer: A Molecular Dynamics Study”, submitted to *J. Phys. Chem. B*

4. T. Nakamura, W. Shinoda, and M. Mikami, “The shear hysteresis in lamellar structure of surfactant-water binary system”, submitted to *J. Chem. Phys.*