

「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

DOS 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 H20 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 ナノ粒子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。また、リポソームを

構成する脂質分子種とリポソームの形成条件及び物性の関係は、実際に DDS ナノ粒子の合成条件と分子種を設計する上で極めて重要である。そこで本研究グループでは、リポソーム・脂質二重層膜の形成過程と流動場での安定性や低分子の膜透過性の研究とのための粗視化モデル、効率的サンプリング方法、高速高精度自由エネルギー計算法⁴⁾の開発を行なっている。H20年度は、1)粗視化モデルの開発⁵⁾、2)リポソーム形成過程の研究¹⁰⁾、3)DDS材料として注目されるフッ化脂質二重膜の膜内流動性と水和構造^{1),6)}、4)コレステロールを含んだ脂質二重層膜の水分子の膜透過自由エネルギー特性の解析と構造安定性に関する研究を行った。

1) 原子レベルのシミュレーション結果を利用した、系統的な粗視化の方法を開発し、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)の親水性基を持つ脂質分子のモデル開発に成功した。これら脂質分子で構成される脂質膜は、膜面積、オーダーパラメータ、膜弾性といった基本的な膜物性をすべて満足するモデルであり、きわめて定量的にリポソームの挙動を追跡することが可能となった。この点は、単なる現象論的モデルとは全く異なる点であり、化学的な分子構造の違いに基づいて、その自己組織化過程や構造を予測することが可能となっている。これまで本粗視化モデルを用いて、リポソームの自発的な形成過程の観測に成功しており、より長時間の分子動力学により、リポソームの構造変化、安定性の評価に着手している。

2) 粗視化分子動力学法により、脂質分子のリポソーム形成過程を調べた。特に、鎖長・テイル数などの分子構造の違いや、親水・疎水相互作用の異なる系における構造形成過程の解析を試みた。これにより、親水セグメント数の増大により、急激に二分子膜が曲がりづらくなり、層状ラメラを形成しやすくなることがわかった。一方、2テイル系において親水セグメント数が小さくなりすぎると、脂質分子のヘッド部分が凝集したミセル内部に埋もれる形となり、二分子膜からなるリポソームは形成しづらくなることが分かった。なお、脂質分子が溶解したランダム状態からのシミュレーションでは、大きなリポソーム構造をとるための条件が限定されてくるため、これらを克服するための最適な初期条件や相互作用条件などについても探索を行った。

3) フッ化脂質二重層膜の分子動力学シミュレーションを実行し、フッ化脂質の極性基領域における水和構造解析と膜内流動性の評価を行った。その結果、フッ素化された脂質分子は通常の脂質分子に比べて低い側方拡散性を持つことが分かった。このような脂質の低い膜内流動性は、脂質膜の分子透過性の減少に寄与する特性であり、フッ化脂質膜が内包分子の膜外リークを妨げる有用な DDS 材料であることが示された。

4) コレステロールを含んだグリセロ脂質(DPPC)・スフィンゴ脂質(PSM)二重膜の水分子の膜透過特性を明らかにするために、これらの系のコレステロール濃度 0%~50%における分子動力学シミュレーションを実行し、水分子に対する膜透過自由エネルギー計算や分子間相互作用解析による構造安定性の評価を行った。その結果、DPPC 膜、PSM 膜共にコレステロール添加により水分子の膜透過性が低くなることが分かった。各コレステロール濃度における透過性の比較では、~30%まで PSM 膜の方が透過性が低いことが示された。これらの違いは2つの系の膜内パッキング密度の違いやそれに伴う水-脂質分子間の van der Waals 相互作用の増加によることが分かった。

(2) 糖鎖とレクチンの分子間相互作用解析の研究開発(G2)

1)FMO 法の拡張機能の開発

フラグメント分割による基底関数の重ね合わせ誤差(BSSE)の検討を行い、2 体のみならず 3 体

補正が必要なことが明らかとなった。この結果に基づいて、フラグメント分子軌道法(FMO)で用いることのできる効率の良いBSSE補正法について検討を行った。また、溶媒分子を有効フラグメントポテンシャル(EFP)で扱い、溶質分子をFMO法で計算できる量子・古典融合法(FMO/EFP)を開発した。さらに、FMOと連続誘電体モデル(PCM)の融合法(FMO/PCM)のエネルギー勾配法を開発した。これを用いてオリゴ糖の水溶液中の構造計算を行い、良い精度でab initioの結果を再現することを確認し、合わせて、糖鎖の古典力場(GLYCAM)との比較を行い幾つかの改良すべき点を見出した。

2)糖鎖とレクチンの分子間相互作用の解析

糖鎖とタンパク質(レクチン)の相互作用は生体内分子認識過程の鍵となる基本的分子間相互作用であるが、原子レベルで見た場合、分子科学的観点からの理解はあまり進んでいない。そこで我々は、古典分子動力学計算から量子化学計算までを併用した階層的なモデリング手法³⁾を提案し、とくにセレクチン-糖鎖複合体に適用する事で、糖鎖認識機構の微視的情報を得る事を目標とした。具体的には、「溶液中でレクチンが糖鎖を結合した状態を自由エネルギー空間上での安定構造間の構造遷移」だととらえ、自由エネルギー面上で糖鎖の安定構造をマップする事を試みた。実験結果との比較を考慮しEセレクチン-シアリルルイスX複合体に適用して結果を解析した所、糖鎖結合ドメイン内での構造パラメータや糖鎖の配座を規定するグリコシド結合の分布に関して、計算結果はNMR測定などの実験値とよい一致を示すことが分かり、我々の提案する階層的モデリング手法の有効性、妥当性が確認された。また、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が重要であるとの指摘がしばしばなされている。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、昨年度の解析に引き続き、糖(フコース)と芳香環の相互作用のab initio分子軌道法による精密解析を行った。その結果、フコースの疎水面(C-H結合)とベンゼンの間にはかなり強い引力(約4 kcal/mol)の働いていること、この引力の大部分は分散力であることが明らかになった⁸⁾。また、フコースの疎水面とベンゼンが接する配置では、エネルギー差の非常に小さい複数の局所安定構造が存在することが分かり、このCH/ π 型の相互作用の方向依存性は小さいことが示唆された。また、CH/ π 型の配置でのフコースとベンゼンの相互作用は、フコースのO-H結合とベンゼン環が接する配置(OH/ π 水素結合)での相互作用(約5 kcal/mol)よりもわずかに小さいだけであった。さらにフコースのフェノールやインドールとの相互作用の解析を行ったところ、ベンゼンの場合よりも強い相互作用が存在することが明らかになった。

3)インフルエンザHAとシアロ糖鎖受容体の結合親和性予測

強毒性トリ型インフルエンザH5N1は、レクチン的一种である赤血球凝集素(HA)H5亜型的作用によって、宿主細胞膜表面に発現したシアロ糖鎖に結合して細胞感染する。H5とシアロ糖鎖の結合はレクチン-糖鎖相互作用であり、その結合特異性は、本研究でターゲットとしているDDSナノ粒子の糖鎖と血管壁のレクチンの相互作用と同じであるため、本プロジェクトの計算手法の適用研究として、本年度より本テーマを開始した。HAは、レクチン活性があるHA1ドメインと、ウイルス

と宿主細胞の膜融合時に機能する HA2ドメインから成る。強毒性トリ型インフルエンザ VN1194 の H5 HA1 において 192 番目の Gln が Arg に変異すると、そのトリ型 H5 は、ヒト細胞が発現する alpha2-6 シアロ糖鎖受容体(alpha2-6 糖鎖と略す)に強く結合する。オリジナルの VN1194 H5 HA1 及びその変異体 Gln192Arg H5 HA1 と alpha2-6 糖鎖の相互作用を解析するために、VN1194 H5 と alpha2-6 糖鎖の複合体モデルを作成した⁷⁾。今後、本モデルを用いて H5 と alpha2-6 糖鎖の相互作用エネルギーを FMO 法で算出して比較する予定である。

(3) DDS ナノ粒子の血管内における流動解析の研究開発(G3)

薬剤を内包したリポソームを効率よく患部に搬送させるために、主として以下の2種類の課題について研究を進めている。その第一の課題は、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内皮細胞間隙から血管外に流出し患部に到達する過程の解析である。細胞レベルに関する解剖学的な文献調査や本年度に開催した国際会議に招聘した研究者との情報交換から、血管内皮細胞上に存在する糖鎖分子層(糖衣構造)や異常増殖細胞の近傍で生じる細胞間隙拡大の効果(EPR 効果)の重要性がより明確になってきた。そこで本年度は、DDS 粒子と糖鎖の流体力学的相互作用⁹⁾を、その形状や配置および変形能を考慮して計算し、粒子の細胞間隙透過に及ぼすこれらの構造の効果について国内外の学会で発表した。これを発展させ、リポソームの細胞間隙透過にともなう変形についての3次元計算の予備計算も進めている。また、数値計算との比較の意味で、粘性流体中で液滴の細孔透過のモデル実験も計画し、装置の試作を行った。細胞間隙透過と比肩すべき第二の課題は、肝臓のような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 DDS ナノ粒子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空隙の再配置や血流の増加、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 ナノ粒子輸送の可能性を2次元シミュレーションにより明らかにした¹¹⁾。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)「産総研」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、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)「農工大」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、教授)

② 研究項目

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)東芝、研究主幹)

②研究項目

DDS ナノ粒子の流動解析技術の研究開発

(4)「京都大学」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

糖鎖とレクチンの分子間相互作用解析の研究開発

(5)金沢大グループ

①研究分担グループ長:齋藤 大明(金沢大学、助教)

②研究項目

脂質二重膜の分子シミュレーション技術の研究開発

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. H. Saito, W. Shinoda, and M. Mikami, "Enhanced Hydrophobicity of Fluorinated Lipid Bilayer: A Molecular Dynamics Study", *J. Phys. Chem. B.* **112**, 11305-11309(2008).
2. Masato Makino, Leo Arai and Masao Doi "Shear Migration of Chiral Particle in Parallel-disk" *J. Phys. Soc. Jpn.* **77**, 064404 (2008).
3. T. Ishida, "Probing protein environment in an enzymatic process: all-electron quantum chemical analysis combined with ab initio quantum mechanical/molecular mechanical modeling of Chorismate Mutase", *J. Chem. Phys.* **129**, 125105 (14 pages) (2008). [This paper was selected in "Virtual Journal of Biological Physics Research" 16 (7) 2008.]
4. K. Shinoda, W. Shinoda, and M. Mikami, "Efficient free energy calculation of water across lipid membranes", *J. Comput. Chem.* **29**, 1912 (2008).
5. S. Tsuzuki, K. Honda, A. Fujii, T. Uchimaru, M. Mikami, "CH/ π interactions in methane clusters with polycyclic aromatic hydrocarbons", *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 2860 (2008).
6. H. Saito, W. Shinoda, and M. Mikami, "Fluorination Effects on Structure and Dynamics of Phospholipid Bilayer: A Molecular Dynamics Study", *Chem. Phys. Lett.* 468, 260 (2009).
7. T. Sawada, D. G. Fedorov, K. Kitaura, "Structural and interaction analysis of helical heparin oligosaccharides with the fragment molecular orbital method", *Int. J. Quant. Chem.* in press.
8. S. Tsuzuki, T. Uchimaru and M. Mikami, "Magnitude and Nature of Carbohydrate-Aromatic Interactions: Ab Initio Calculations of Fucose-Benzene Complex", *J. Phys. Chem. B*, in press.
9. O.Sano, "General solution of the Stokes equation in terms of harmonic functions",

Theoretical Methods for micro scale viscous flows, eds. F. Feuillebois and A. Sellier (Research Signpost, Trivandrum, 2009) in press.

10. T. Nakamura, W. Shinoda, and M. Mikami, “The shear hysteresis in lamellar structure of surfactant-water binary system”, submitted to *Chem. Phys.*
11. S. Koizumi, Y. Shirahashi & O. Sano, “Critical Velocity on the Collapse of a Cavity Region in a Granular Material and Its Size Dependence”, submitted to *J. Phys. Soc. Jpn.*

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)