

三上 益弘

(独)産業技術総合研究所ナノシステム研究部門・グループ長

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てきた。今後は、典型的な脂質分子を対象として、分子シミュレーションと流体力学を連携した統合検証研究を実験グループの協力の下、実施し、最終目標である DDS シミュレーション技術を完成させる。

§2. 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ナノシステム研究部門, グループ長)

②研究項目

- DDS ナノ粒子設計シミュレーション技術の研究開発
- 糖鎖とレクチンの分子間相互作用解析の研究開発
- DDS シミュレータのシステム開発

(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工学研究科, 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(株式会社東芝 研究開発センター, 研究主幹)
- ②研究項目
 - DDS シミュレータの高速化技術の研究開発

(4)「京都大学」グループ

- ①研究分担グループ長:北浦 和夫(京都大学大学院薬学研究科, 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(金沢大学理工研究域数物科学系, 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

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(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、三つのグループの H22 年度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¹⁾の開発を行ってきた。H22 年度は、生体分子を含む系の温度制御に最適な数値計算方法の開発²⁾、リポソームの付着と融合の研究^{2,7)}、リポソームの局所圧力解析、糖脂質膜の構造の研究を行った。

リポソームの付着や融合に対する安定性の自由エネルギー解析を行い、リポソームが一度閉じた構造を完成させると融合への高いエネルギー障壁を示すことが判明した。融合を観測することはシミュレーションの時間的に困難であり、その代わりにリポソーム間の付着自由エネルギーの測定を行った。その結果、図 1 に示すように脂質種によってリポソームの付着性が著しく変わることが判明し、負の自発曲率を持つ脂質のリポソームは付着を強く示すことが示唆された。また、リポソームの変形自由エネルギーを見積もることにも成功し、異種脂質の混合により、変形に対する自由エネルギー的な安定性が高くなることが判明している。また、リポソームの力学特性の特徴付けのためリポソームの局所圧力解析に着手し、動径方向における圧力分布の解析に成功した。これにより曲率を持った脂質膜の弾性係数の解析を行うことができ、G3 の連続体モデルへの橋渡しとなる情報を粒子モデルから提供することが可能となった。また、脂質膜からリポソームを形成するプロセスにおいて、膜の弾性率のコントロールと同時に、曲げ変形に対する膜の構造保持の安定性についても考慮する必要がある。粗視化モデルを用いて、分岐構造の異なる脂質分子に対して、膜の曲げ弾性率の評価及び破壊歪を見積もることにより、分岐構造が膜の安定性に大きく寄与していることが示唆された。原子モデルに関しては、新しい CHARMM 力場を使用し、コレステロールの混合による DPPC 膜と DOPC 膜への影響を調べた。コレステロールに関して、エネルギー表示法による自由エネルギー解析に着手した。また、糖鎖をヘッドグループに持つ GM1 を混入した DPPC 脂質膜系の計算において、GM1 が周辺の DPPC や他の GM1 と、ヘッドグループ間で強く相互作用を起こすことによって、ラフトのようなドメイン構造を形成することが示唆された。

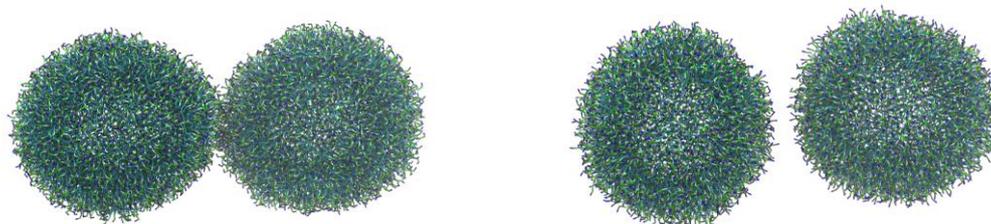


図 1. 脂質分子種の違いによるリポソーム間付着特性の変化. 左図は負の自発曲率を持つホスファチジルエタノールアミン脂質分子からなるリポソーム(付着), 右図はホスファチジルコリン脂質分子からなるリポソーム(反発).

(2) 糖鎖とレクチンの分子間相互作用解析の研究開発(G2)

フラグメント分子軌道(FMO)法の拡張機能の開発

FMO法で、溶媒効果を高精度に扱うことができる有効ポテンシャル EFP(Effective Fragment Potential)をFMO法に組み込み、多体分極を含むFMO/EFPのエネルギー計算を可能にした⁸⁾。

糖鎖とレクチンの分子間相互作用解析の研究開発

糖の疎水面と水の相互作用の強さは、糖の水和エネルギーに影響を与えており、相互作用ポテンシャルの詳細を明らかにできれば、レクチンなどによる糖の認識のより精密なシミュレーションが可能となる。糖の疎水面と水の間にはCH/O相互作用が働いていると考えられるが、相互作用の強さや方向依存性といった相互作用の詳細は明らかではない。

そこで、フコースの疎水面と水の相互作用を高精度のab initio分子軌道法で計算した。その結果、フコースの疎水面と水の間には2kcal/molを超える引力の働いていることが分かった。また、シクロヘキサンと水の相互作用ポテンシャルと比較したところ、フコースのCH/O相互作用は、飽和炭化水素のCH/O相互作用よりもかなり大きかった。これは水と相互作用しているフコースのC-H結合の炭素原子に水酸基が結合していることで、C-H結合が活性化する(水素の極性が強くなる)ことが原因ではないかと考えられる。また、先に提案した分子モデリング手順を用いて、レクチン

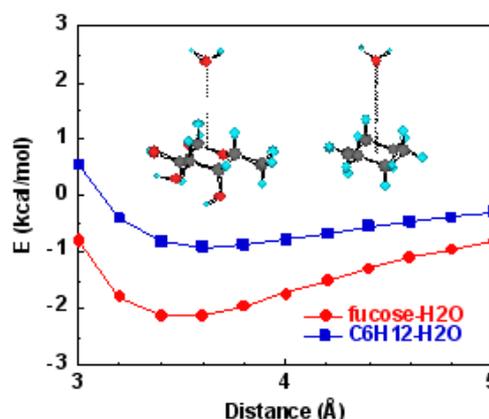


図2 MP2/cc-pVTZレベルで計算したフコース水、シクロヘキサン-水の相互作用エネルギー

糖鎖の分子認識機構を明らかにするため、白血球の毛管浸潤過程において鍵となる、一連のセレクトイン-シアリルルイスX複合体の解析を引き続き行った。昨年報告したE-selectinに加えてP-selectinも計算対象とし、それぞれ糖鎖認識部位に位置するシアル酸の荷電状態を変化させた複合体を考慮する事で、合計4種類のタンパク質-糖鎖複合体に対して、糖鎖認識を記述する自由エネルギー面を計算した。この場合の自由エネルギー面は、QM/MM計算と分子動力学計算を組合わせた複合モデリング手法によって定義される量である。この様な計算負荷の高い手法を用いても定量的に結合自由エネルギー差を比較する事は困難である事が分かったので、自由エネルギー空間の最小エネルギー領域にマップされた安定構造集団を解析する事で、E/P-selectin間に見られる糖鎖認識パターンの差異を議論した。両者ともカルシウム結合サイトに存在するフコースとは強い水素結合パターンを持つのに対して、ガラクトースとセレクトイン間の相互作用において僅かな糖鎖認識の違いが認められた。

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

多価相互作用を解析するために、強毒性トリ型インフルエンザVN1194 HA H5 HA1三量体とヒト型シアロ糖脂質の複合体モデルのMD計算を行い、扇状分布を得て、先行研究の定性的結論(傘状分布)が正しくないことを示した。また、多価相互作用の静的効果をFMO法で検討した。

図3に示すように、HA 三量体—シアロ糖鎖複合体を FMO- MP2/ PCM/ 6-31G* でシングルポイントエネルギー計算した結果、HA 三量体に対する一つ目のシアロ糖鎖結合は、二つ目及び三つ目のシアロ糖鎖結合に影響しなかった。すなわち、HA 三量体が有する三つのシアロ糖鎖結合サイトは等価であることを解明した。本結果は、HA 三量体とシアロ糖鎖の相互作用にアロステリック効果がないことを示しており、既存の実験結果を説明した⁹⁾。従って、HA 単量体—シアロ糖鎖複合体というモデル系を計算化学で解析することは本質的に重要であり、H3 亜型のシアロ糖鎖結合親和性は定性的に説明できた¹⁰⁾。

ΔG (kcal/mol) -18.9 -18.9 -18.9 -18.9

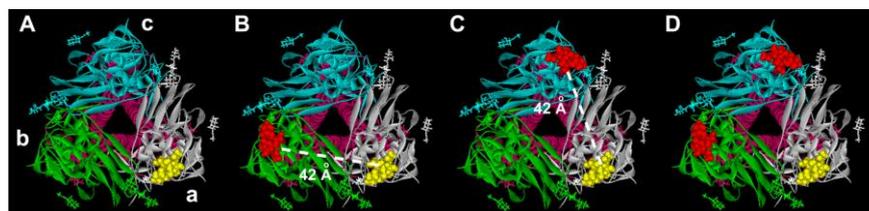


図3. 複合体モデル(A-D)とシアロ糖鎖(黄)の結合自由エネルギー. 右図は複合体モデルを横から見た構造図. このモデルは約 24000 原子を含む.

(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プロジェクトで過去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。そこで本年度も引き続き、DDS 粒子と糖鎖の流体力学的相互作用を、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の知見を国内外の学会で発表した。現在、これをさらに発展させ、細胞間隙透過にともなうリポソームや液滴の変形についての3次元計算も進めている。後者の計算との比較の意味で、粘性流体中での液滴や気泡の細孔透過のモデル実験を進めており、学会発表および論文^{11,12)}での公表を行った。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と実験により明らかにした。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。

(4)DDS シミュレータのシステム開発

H22 年度は、リポソーム, DDS ナノ粒子ビルダーを改良すると共に, システム全体のユーザーインターフェースの改善を行った. また, DDS シミュレータの高速化技術の内, ナノ流体解析シミュレータの設計と実装を進めた. とくに高効率シミュレーションのために解析エンジンの分散計算(必要に応じてMPI化)に着手し, 将来のヘテロ計算環境対応を進めた.

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. T. Morishita, "From Nose-Hoover chain to Nose-Hoover network: Design of non-Hamiltonian equations of motion for molecular-dynamics with multiple thermostats", *Mol. Phys.* **108** 1337-1347 (2010). (DOI: 10.1080/00268971003689923)
2. W. Shinoda, R. DeVane, M. L. Klein, "Zwitterionic lipid assemblies: Molecular dynamics studies of monolayers, bilayers, and vesicles using a new coarse grain force field" *J. Phys. Chem. B* 114, 6836-6849 (2010). (DOI: 10.1021/jp9107206)
3. R. DeVane, M. L. Klein, C. C. Chiu, S. O. Nielsen, W. Shinoda, P. B. Moore, "Coarse-Grained Potential Models for Phenyl-Based Molecules: I. Parametrization Using Experimental Data" *J. Phys. Chem. B* 114, 6386-6393 (2010). (DOI: 10.1021/jp9117369)
4. C. C. Chiu, R. DeVane, M. L. Klein, W. Shinoda, P. B. Moore, S. O. Nielsen, "Coars -Grained Potential Models for Phenyl-Based Molecules: II. Application to Fullerenes" *J. Phys. Chem. B* 114, 6394-6400 (2010). (DOI:10.1021/jp9117375)
5. X. He, W. Shinoda, R. DeVane, M. L. Klein, "Exploring the utility of coarse-grained water models for computational studies of interfacial systems" *Mol. Phys.* 108 2007-2020 (2010). (DOI: 10.1080/00268976.2010.503197)
6. R. DeVane, A. Jusufi, W. Shinoda, C. C. Chiu, S. O. Nielsen, "Parameterization and application of a coarse grained forcefield for benzene/fullerene interactions with lipids" *J. Phys. Chem. B* 114 16364-16372 (2010). (DOI: 10.1021/jp1070264)
7. A. Jusufi, R. H. DeVane, W. Shinoda and M. L. Klein, "Nanoscale carbon particles and the stability of lipid bilayers", *Soft Matter*, 7, 1139-1146 (2011). (DOI: 10.1039/C0SM00963F)
8. T. Nagata, Dmitri G. Fedorov , T. Sawada , K. Kitaura , Mark S. Gordon, "A

- combined effective fragment potential - fragment molecular orbital method. II. Analytic gradient and application to the geometry optimization of solvated tetraglycine and chignolin." *J. Chem. Phys.*, **134**, 034110 (2011). (doi:10.1063/1.3568010)
9. T. Sawada, D. G. Fedorov, K. Kitaura, "Binding of influenza A virus hemagglutinin to sialoside receptor is not controlled by the homotropic allosteric effect." *J. Phys. Chem. B*, **114** (47) 15700–15705 (2010). (DOI: 10.1021/jp1068895)
 10. T. Sawada, D. G. Fedorov, K. Kitaura, "Role of the key mutation in the selective binding of avian and human influenza hemagglutinin to sialosides revealed by quantum-mechanical calculations." *J. Am. Chem. Soc.* **132**, (47) 16862–16872 (2010). (DOI: 10.1021/ja105051e)
 11. Y. Oguro, M. Makino, and O. Sano, "Passage of a Small Air Bubble through a Circular Pore across the Plate of Finite Thickness", *J. Phys. Soc. Jpn.* **79**, 084402_1-7 (2010). (DOI: 10.1143/JPSJ.79.084402)
 12. O. Sano, "Flow-induced waterway in a heterogeneous granular material", *Computer Physics Communications*, (In press). (DOI: 10.1016/j.cpc.2010.12.001)
 13. T. Ishida, "Effects of Point Mutation on Enzymatic Activity: Correlation between Protein Electronic Structure and Motion in Chorismate Mutase Reaction", *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 7104-7118(2010). (DOI: 10.1021/ja100744h)