

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	寺岡 佳晃
学位授与の日付	平成31年3月31日	
論文名	Development of a Protein-Based Carrier for Drug Delivery System Using Computer Simulation (計算機シミュレーションによるドラッグデリバリーシステム用蛋白質キャリアの開発)	
論文審査委員	主査	乾 隆
	副査	杉本 憲治
	副査	谷森 紳治

論文要旨

序章

医薬候補化合物の水に対する低溶解性は、創薬における主要な障壁の一つである。難水溶性化合物は、薬剤探索の初期段階である酵素、および細胞を対象とした *in vitro* の阻害試験において不正確な結果を導くだけでなく、その多くが *in vivo* 試験において低い経口バイオアベイラビリティを示す。化学修飾により化合物の水溶性を高めることは可能であるが、薬剤として必要な薬効や吸収効率などを維持して構造を改変することは難しい。一方、新規医薬候補化合物の約 65% が難水溶性を示すことが知られており、これらの難水溶性薬剤を化学修飾することなく直接的に製剤化する技術が強く望まれている。現在、この問題を解決する戦略の一つとして、ドラッグデリバリーシステム (DDS) が広く研究されている。DDS とは標的とする組織や細胞特異的に薬剤を送達する技術の総称である。難水溶性薬剤を対象とした DDS では、水溶液中で分散性の高い薬剤キャリアに薬剤分子を内包することにより、化合物の可溶化が達成される。現在、化学合成により作製されるリポソームやミセルなどの古典的な薬剤キャリアに加えて、より生体適合性の高い DDS を目指し、フェリチン、血清アルブミン、およびリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) などのヒト由来蛋白質を利用した薬剤キャリアの開発が行われている。

L-PGDS は、細胞内において PGD₂ 合成酵素として機能するだけでなく、細胞外において脂溶性低分子輸送蛋白質としての役割を担う多機能蛋白質である。先行研究において、L-PGDS が化学構造の異なる様々な疎水性低分子を結合可能であることが明らかにされており、本結合特性を利用した難水溶性薬剤に対する DDS の開発が行われてきた。これまでに、L-PGDS が複合体形成を通じて抗がん剤 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) をはじめとする難水溶性薬剤の溶解度を改善すること、およびモデル動物に対する *in vivo* 試験において薬剤/L-PGDS 複合体が優れた薬効を示すことが明らかとなっている。さらに、蛋白質である L-PGDS は、合成ポリマーを用いた DDS キャリアと比較して構造的に明確な分子骨格を有している。実際、X 線結晶構造解析、および NMR 法によって L-PGDS の三次構造が実験的に決定されており、原子レベルの立体構造情報が容易に取得可能である。

したがって本研究では、より効率的な DDS の開発を目指し、L-PGDS を用いた DDS に対して分子構造に基づいた計算機シミュレーションの適応を試みた。第一章では、ドッキングシミュレーションを利用して、L-PGDS によって結合、および可溶化される薬剤を網羅的に探索した。第二章では、L-PGDS の構造的柔軟性を考慮したドッキングを行い、本蛋白質の SN-38 に対する結合領域の推定を行った。さらに本領域に対して変異導入を行い、SN-38 と高親和性に結合する変異型 L-PGDS の作製を試みた。

第一章 In silico ドッキングによる L-PGDS と薬剤分子との網羅的な相互作用解析

L-PGDS の様々な薬剤に対する結合親和性を網羅的に調査するため、AutoDock Vina を用いてヒト由来 L-PGDS の結晶構造 (Protein Data Bank [PDB] code : 4ORR) に対して ZINC データベース上の 2892 種類の薬剤分子 (分子量 : 59.0~821, LogP : -5.97~9.84) のドッキングシミュレーションを行った。一般的な薬剤可溶化剤である 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) に対して同じ薬剤分子をドッキングした結果と比較して、約 90% の薬剤において L-PGDS が高い結合親和性を示すことが予測された。ドッキング結果と薬剤の物理化学的性質との関係性を調べたところ、L-PGDS は分子量が 500~600 程度、および高い疎水性度 (LogP > 5) を有する薬剤分子と強く結合する傾向を示した。また、ドッキング結果上位 100 位の薬剤の多くが、キナーゼ阻害剤 (抗がん剤) に特徴的な複数の芳香環からなる平面的な分子骨格を有していた。

次に、L-PGDS に対して高い結合親和性を示すことが予測された薬剤から、nilotinib (慢性骨髄性白血病), telmisartan (高血圧症), lapatinib (乳がん), imatinib (慢性骨髄性白血病), および atovaquone (ニューモシスチス肺炎) について、*in vitro* における L-PGDS による可溶化試験、および L-PGDS との結合性評価を行った (括弧内に各薬剤の代表的な適応症を示した)。各薬剤について PBS (pH 7.4) における溶解度を測定したところ、nilotinib, telmisartan, および imatinib の溶解度は、それぞれ 2.7, 7.4, および 34.9 μ M であり、lapatinib, および atovaquone は不溶性であった。一方、1 mM L-PGDS 存在下において、nilotinib, telmisartan, lapatinib, imatinib, および atovaquone 濃度は、それぞれ 53.2, 1230, 233, 813, および 207 μ M まで上昇し、L-PGDS がこれらの薬剤の溶解度を顕著に改善することが示された。さらに、1 mM L-PGDS と同質量濃度の HP- β -CD (19 mg mL⁻¹) と比較して、本蛋白

質は 2.2~48 倍高い可溶化効果を示した。次に、等温滴定型熱量測定法 (ITC) により、telmisartan, および imatinib と L-PGDS との結合反応に伴う熱力学的パラメーターを決定した。解析により、L-PGDS は 2 つの独立な結合部位において、それぞれ 1 分子の telmisartan を 0.4, および 1.1 μM の解離定数 (K_d) で結合することが示された。一方、imatinib に対する ITC 測定により、L-PGDS は 1 つの独立な結合部位において、2 分子の imatinib を 40.0 μM の K_d 値で結合することが示された。また、telmisartan, および imatinib は、L-PGDS との結合に伴い負のエンタルピー変化 ($-26.2\sim-39.3 \text{ kJ mol}^{-1}$) を示したことから、これらの薬剤分子と L-PGDS との複合体形成には水素結合, および van der Waals (vdW) 相互作用が大きく寄与していることが示唆された。

以上の結果から、ドッキングシミュレーションを用いたスクリーニングにより、多数の候補薬剤から L-PGDS によって結合, および可溶化することのできる難水溶性薬剤を効率的に探索可能であることが明らかとなった。

第二章 標的薬剤分子と高親和性に結合する変異型 L-PGDS の設計

モデル薬剤として抗がん剤 SN-38 を用いて、特定の難水溶性薬剤分子と高親和性に結合し、より高い可溶化効果を示す変異型 L-PGDS の設計を試みた。はじめに、アンサンブルドッキングにより、L-PGDS の SN-38 に対する結合部位の推定を行った。アンサンブルドッキングでは、複数のコンフォメーションからなる蛋白質の構造アンサンブルに対してリガンド分子をドッキングすることにより、蛋白質の柔軟性を考慮したより正確な結合予測が可能となる。PDB から 7 種類のヒト由来 L-PGDS の結晶構造 (PDB codes: 3O2YA, 4IMN, 4IMO, 4ORR, 4ORSA, 4ORSB, および 4ORUA) を取得し、これらを L-PGDS のアンサンブル構造として用いた。AutoDock Vina を用いて各 L-PGDS 構造に対して SN-38 をドッキングし、それぞれの構造に対して合計 100 ポーズからなる SN-38 のドッキングアンサンブルを得た。AutoMap プログラムを用いて、LigPlot による相互作用解析をすべてのドッキングポーズに対して実行し、統計的に高い頻度で SN-38 分子と水素結合, および vdW 相互作用していた L-PGDS のアミノ酸残基を同定した。解析の結果、L-PGDS の β バレル構造内部の広い領域が SN-38 に対する結合部位と推定され、特に vdW 相互作用においては複数の芳香族アミノ酸残基 (Trp54, Phe83, Trp112, Tyr116, および Phe143) の関与が予測された。

次に、複数の環構造からなる平面的な SN-38 分子に対して、芳香族スタッキング相互作用を介して強く結合する変異型 L-PGDS の設計を試みた。AutoMap 解析により推定された SN-38 結合領域において、対角に存在する Met94, および Met145 をトリプトファンに置換した変異体, M94W/M145W-L-PGDS を作製した。L-PGDS, および M94W/M145W-L-PGDS について遠紫外円偏光二色性測定を行ったところ、両蛋白質ともに β シート構造に特徴的なスペクトルを示し、本変異導入が L-PGDS の二次構造に影響を与えないことが示唆された。さらに、変異導入による結合親和性への影響を調べるために、トリプトファン蛍光消光実験を行った。SN-38 濃度を変化させて L-PGDS, および M94W/M145W-L-PGDS の蛍光スペクトルを測定したところ、両蛋白質ともに SN-38 濃度の上昇に伴う内因性トリプトフ

アン由来蛍光の消光が観察された。最大濃度（50 μM ）の SN-38 存在化において、M94W/M145W-L-PGDS の蛍光強度が 10%以下まで低下したことから、天然に存在するトリプトファン残基に加えて、変異導入した Trp94, および Trp145 も SN-38 との相互作用に関与していることが示唆された。また、解析により L-PGDS, および M94W/M145W-L-PGDS の SN-38 に対する K_d 値は、それぞれ 13.1, および 2.1 μM と求まり、本変異導入が SN-38 に対する結合親和性を向上させることが示された。次に、各蛋白質による SN-38 の可溶化試験を行った。PBS において SN-38 は難水溶性を示し、その溶解度は 5.4 μM であった。一方、1 mM L-PGDS, および 1 mM M94W/M145W-L-PGDS 存在化において、SN-38 濃度はそれぞれ 230, および 452 μM まで上昇し、本変異体が L-PGDS と比較して 2.0 倍高い SN-38 可溶化能を有することが示された。

以上の結果から、アンサンブルドッキングによる結合部位の推定に基づいた変異導入により、SN-38 に対して高い結合親和性、および優れた可溶化効果を示す L-PGDS 変異体の作製に成功した。

結論

本研究において、ドッキングシミュレーションを用いることにより、L-PGDS によって結合、および可溶化される薬剤をスクリーニングすることに成功した。さらに、アンサンブルドッキングを用いて L-PGDS の標的薬剤に対する結合部位を推定し、推定領域に変異導入を施すことによって、高い結合親和性を伴って標的薬剤を効果的に可溶化する L-PGDS 変異体の作製に成功した。以上の結果より、分子の構造情報に基づいた計算機シミュレーションは、L-PGDS を用いた難水溶性薬剤に対する DDS の開発において極めて有効な戦略となり得ることが明らかとなった。

審査結果の要旨

医薬候補化合物の水に対する低溶解性は、創薬における主要な障壁の一つである。化学修飾により化合物の水溶性を高めることは可能であるが、薬効や吸収効率などを維持して構造を改変することは難しい。一方、新規医薬候補化合物の多くが難水溶性を示すことが知られており、これらの難水溶性薬剤を化学修飾することなく直接的に製剤化する技術が強く望まれている。現在、この問題を解決する戦略の一つとして、ドラッグデリバリーシステム（DDS）が広く研究されており、化学合成ポリマー、およびヒト由来蛋白質などを利用した様々な薬剤キャリアが開発されている。生体内において脂溶性低分子の輸送を担うリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素（L-PGDS）は、様々な疎水性低分子との結合が可能である。これまでに、本結合特性を利用した DDS が、抗がん剤

7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) 等の難水溶性薬剤に適応され、L-PGDS が複合体形成を通じて薬剤の溶解度を改善すること、および薬剤/L-PGDS 複合体が *in vivo* 試験において優れた薬効を示すことが明らかとなっている。さらに、L-PGDS は他の薬剤キャリアと比較して構造的に明確な分子骨格を有しており、複数の研究グループによって原子レベルの三次構造が決定されている。本学位申請者は、L-PGDS の立体構造情報に着目し、分子構造に基づいた計算機シミュレーションを活用した効率的な DDS 開発戦略の構築を試みた。

第一章では、ドッキングシミュレーションを利用して、L-PGDS によって結合、および可溶化される薬剤を網羅的に探索し、選抜した薬剤について L-PGDS による可溶化試験、および L-PGDS との結合性評価を行った。まず、L-PGDS の結晶構造に対して 2892 種類の薬剤分子をドッキングし、本蛋白質に対して高い結合親和性を示すことが予測された薬剤から、5 種類の難水溶性薬剤 (nilotinib, telmisartan, lapatinib, imatinib, および atovaquone) を選抜した。各薬剤について PBS (pH 7.4) における溶解度を測定したところ、nilotinib, telmisartan, および imatinib は難溶性 (2.7~34.9 μM) を示し、lapatinib, および atovaquone は不溶性を示した。一方、1 mM L-PGDS 存在下において、nilotinib, telmisartan, lapatinib, imatinib, および atovaquone 濃度は、それぞれ 53.2, 1230, 233, 813, および 207 μM まで上昇し、L-PGDS がこれらの薬剤の水系溶媒における溶解度を顕著に改善することが示された。さらに、等温滴定型熱量測定の結果、L-PGDS の telmisartan, および imatinib に対する解離定数 (K_d) は、0.4, および 40.0 μM となり、選抜した薬剤分子が L-PGDS と確かに結合することが示された。以上の結果から、*in silico* ドッキングを用いることで、L-PGDS により可溶化可能な難水溶性化合物を、医薬候補化合物ライブラリーより抽出できることが判明した。

第二章では、L-PGDS の構造的柔軟性を考慮したドッキングシミュレーションを利用して、標的難水溶性薬剤分子と高親和性に結合し、且つ高い可溶化効果を示す変異型 L-PGDS の設計を試みた。まず、標的薬剤として抗がん剤 SN-38 を設定し、これまでに報告されている 7 種類の L-PGDS 構造を用いたアンサンブルドッキングにより、L-PGDS の SN-38 結合領域を予測した。次に、複数の環構造からなる SN-38 分子に対する芳香族スタッキング相互作用を期待して、予測結合部位に 2 つの Trp 残基を導入した変異体 M94W/M145W-L-PGDS を作製した。L-PGDS, および M94W/M145W-L-PGDS に対して、SN-38 による内因性 Trp 蛍光消光実験を行い、結合親和性を求めたところ、 K_d 値はそれぞれ 13.1, および 2.1 μM となり、本変異導入により SN-38 に対する結合親和性が上昇することが示された。さらに、L-PGDS 変異体による SN-38 の可溶化試験を行ったところ、PBS 中では難溶性 (5.4 μM) を示したが、1 mM L-PGDS, および 1 mM M94W/M145W-L-PGDS 存在下において、SN-38 濃度はそれぞれ 230, および 452 μM まで上昇し、本変異体が L-PGDS と比較して 2 倍程度高い SN-38 可溶化能を有することが示された。以上の結果から、*in silico* ドッキングによる薬剤結合部位の予測に基づいた芳香族アミノ酸の導入により、SN-38 に対して高い結合親和性、および優れた可溶化効果を示す L-PGDS 変異体の作製に成功した。

本申請論文は、計算機シミュレーションを用いて、L-PGDS により可溶化可能な医薬候

補化合物を化合物ライブラリーから容易に抽出可能であることを示すとともに、薬剤結合部位予測により、内包薬剤に対して高い結合親和性を有する L-PGDS 変異体の作製が可能であることを示した画期的な研究である。これらの知見は、難水溶性が故に臨床応用が困難である医薬候補化合物の開発や、同理由で開発中止された医薬候補化合物の再開発の可能性を示すものであり、創薬科学研究における計算科学、および薬剤送達学に大きく貢献するものである。したがって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。