

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月22日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500428

研究課題名（和文）生体内輸送蛋白質を用いたドラッグデリバリーシステムの開発

研究課題名（英文）Development of drug delivery system using intravital transporter protein.

研究代表者

乾 隆 (TAKASHI INUI)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：80352912

研究成果の概要（和文）：リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素（L-PGDS）は、難水溶性抗不安剤であるジアゼパム（DZP）を可溶化した。DZP/L-PGDS 複合体は、マウス経口投与により、カルボキシメチルセルロース懸濁 DZP 投与と比較して、ペントバルビタール誘導麻酔時間を延長した。この結果は、L-PGDS が難水溶性薬剤に対する輸送体として利用できることを示した。本 DDS の利用により、様々な難水溶性薬剤を臨床応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) could improve the solubility of a poorly water-soluble compound, diazepam (DZP), a major anxiolytic drug in aqueous solutions. The oral administration of DZP/L-PGDS complex significantly extended the duration of loss of righting reflex in mice under a pentobarbital-induced anesthesia as compared with that of DZP in carboxymethylcellulose (CMC). These results demonstrate that L-PGDS is a beneficial delivery vehicle for poorly water-soluble compounds. This novel DDS will facilitate the pharmaceutical and clinical developments of various water-insoluble compounds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：DDS・輸送タンパク質・難水溶性薬剤

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 我々はこれまでに、疎水性低分子輸送蛋白質群であるリポカリンファミリーにおいて、L-PGDS の疎水性ポケットが最も大きく、柔軟な構造を持ち、分子量が 600 程度までの分子を非選択的、且つ高親和性に結合することを明らかにしてきた (*J. Biochem.* in press, *J.*

*Biol. Chem.* 2007, *J. Biochem.*, 2007, *Gene*, 2006, *J. Biol. Chem.* 2003)。この L-PGDS の性質を利用し、難水溶性の薬剤を L-PGDS との複合体（ナノキャリアー蛋白質）として血中投与し、標的細胞上の受容体に薬剤を輸送するシステムを構築する。

(2) 準備研究として、L-PGDS による本 DDS の概念検証を行うために、難水溶性薬剤であるジアゼパム (DZP, GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬) と L-PGDS との複合体 (解離定数  $K_d = 84 \mu\text{M}$ ) を作製し、ペントバルビタール麻酔下のマウス脳室内投与による麻酔時間延長効果を調べた。その結果、複合体の濃度依存的に麻酔時間が延長されることを確認した。さらに、脳虚血時に神経保護効果を示す難水溶性薬剤 NBQX (AMPA 型グルタミン酸受容体拮抗剤) と L-PGDS との複合体 ( $K_d = 5 \mu\text{M}$ ) を作製し、砂ネズミを用いた脳虚血モデルにおいて静脈内投与を行った結果、複合体の濃度依存的に虚血性海馬 CA1 錐体神経細胞死抑制効果が観測された (特願 2007-267395, The 33<sup>rd</sup> FEBS Congress, Athens, Greece, 2008)。以上の結果は、使用困難であった難水溶性薬剤の溶解度を L-PGDS が改善し、薬剤キャリア蛋白質として利用できることを示しており、2008 年 9 月東京で行われたイノベーションジャパン 2008 においても、蛋白質を用いた新規 DDS として高い評価を得た。

(3) 一方、L-PGDS/薬剤複合体の構造を調べるために、多次元 NMR 法、及び SPring-8 放射光を利用した X 線小角散乱実験を行った結果、L-PGDS は同属分子と同様、8 本の  $\beta$ -strand と 1 本の  $\alpha$ -helix からなる  $\beta$ -バレル構造 (樽型) を形成し、その中心に疎水性ポケットを持つことを見出した。また、ポケットの入り口が大きく開いており、様々なサイズの疎水性低分子結合に対する「非選択性」を持つことが示唆された (*J. Biol. Chem.* 2007)。また、L-PGDS は難水溶性薬剤である DZP、及び NBQX との結合により、その慣性半径を減少させる珍しい蛋白質であることも判明した (The 33<sup>rd</sup> FEBS Congress, Athens, Greece, 2008)。さらに、示差走査熱量測定法により、L-PGDS は高温条件下でも疎水性低分子に対して高い結合親和性を有することが判明し、熱安定性の高さを示した (*FEBS J.* 2008)。

## 2. 研究の目的

L-PGDS/難水溶性薬剤の結合親和性と薬剤/標的受容体の結合親和性差が薬効に及ぼす効果の解析、及び L-PGDS/難水溶性薬剤の複合体の構造を明らかにする。具体的な実践目標を以下に示す。

(1) 薬剤に対する結合親和性の異なる変異体 L-PGDS を遺伝子操作により作製し、最も効果的な DDS を可能にする結合親和性差を、DZP、及び NBQX を用いて決定する。また、薬剤と L-PGDS の複合体をマウス経口投与し、その効果を調べる。さらに、必要最低限の構造を有した変異体 L-PGDS を設計し、輸送蛋白質の分子量の軽減を行う。

(2) 多次元 NMR 法を用いた構造解析により、L-PGDS、及び変異体 L-PGDS と難水溶性薬剤との結合様式を決定する。また、SPring-8 を利用した X 線溶液散乱法により、溶液中での薬剤結合による L-PGDS の慣性半径の変化、及び構造変化を調べる。

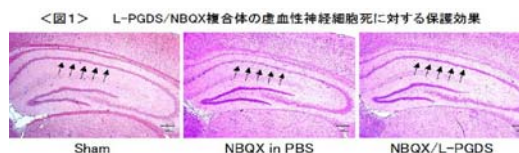
## 3. 研究の方法

(1) 薬剤に対する結合親和性の異なる変異体 L-PGDS の作製

L-PGDS がテラメド・ナノキャリア蛋白質の鋳型蛋白質として適していること、及び *in vivo* において本 DDS が有効であることを確認した (The 33<sup>rd</sup> FEBS Congress, Athens, Greece, 2008)。そこで、L-PGDS の構造情報をもとに、疎水性ポケット内部 (特に疎水性低分子結合に関与しているアミノ酸) の電気的な環境 (極性) を変える変異体 L-PGDS を作製し、その変異体 L-PGDS に対する DZP、及び NBQX の結合親和性を、蛍光消光作用の測定 (*J. Biol. Chem.*, 2003, *Gene*, 2006)、及び示差走査熱量計を用いて決定する。

(2) 変異体 L-PGDS/薬剤複合体を用いた *in vivo* における薬理的評価

*In vivo* における本 DDS の効果を調べるための簡便な方法として、L-PGDS/DZP 複合体のマウス脳室内投与による麻酔時間延長効果を成功指標にしてきた。本研究においても本方法を用い、DZP との結合親和性を変えた種々の変異体 L-PGDS と DZP との複合体の薬剤活性を確認する。また、NBQX に関しては、砂ネズミを用いた脳虚血モデルにおいて、海馬 CA1 錐体神経細胞死に対する保護効果を測定することにより、本 DDS の効果を確かめる (図 1)。種々の変異体 L-PGDS/NBQX



複合体を静脈内投与し、その薬剤活性を虚血性海馬 CA1 錐体神経細胞死抑制効果により確認する。DZP の GABA<sub>A</sub> 受容体に対する阻害定数 ( $K_i$ ) は 10-30 nM (*Mol Pharmacol.*, 2001)、NBQX の AMPA 型グルタミン酸受容体に対する  $K_i$  値は 60 nM (*J. Med. Chem.*, 1996) であることが報告されている。本実験により得られた結合親和性と薬剤効果の相関関係を調べ、上記  $K_i$  値と比較検討し、最も効果的な DDS を可能にする結合親和性比を決定する。

(3) 変異体 L-PGDS と薬剤との複合体の構造解析

難水溶性薬剤とキャリア蛋白質の複合体としての創薬を目指すためには、複合体の構

造解析は必須である。難水溶性薬剤である DZP, 及び NBQX は, L-PGDS との解離定数はそれぞれ, 84  $\mu\text{M}$ , 及び 5  $\mu\text{M}$  であり, 多次元 NMR 法による構造解析が可能な領域である。すでに多次元 NMR 法を用いて, L-PGDS の構造は明らかにしており (*J. Biol. Chem.*, 2007), 複合体の構造解析も半年から 1 年で可能であるが, 多次元 NMR 法による構造解析が困難な場合は, SPring-8 を利用した X 線溶液散乱法, 及び円偏光二色性分光法 (CD) を用いて, L-PGDS と DZP, 及び NBQX との複合体の立体構造の変化や結合様式を調べる。

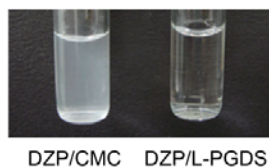
#### (4) DZP と L-PGDS 複合体のマウス経口投与における効果

これまでの薬理実験により, DDS 効果を確認している DZP と L-PGDS 複合体のマウス経口投与による, ペントバルビタール麻酔時間への影響を調べる。また, DZP に対する結合親和性の異なる変異型 L-PGDS を部位特異的変異の導入により作製し, 薬剤複合体の静脈内投与による薬剤活性を評価する。

#### 4. 研究成果

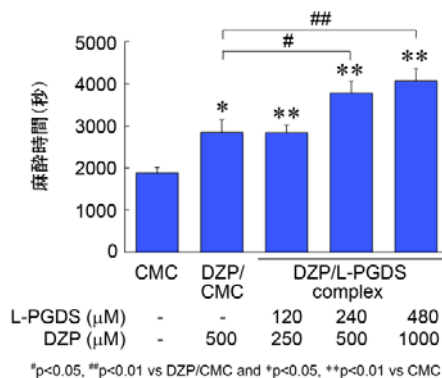
DZP は疎水性化合物であり, 水系溶媒には極めて溶けにくく, 動物へ適用するにはセルロース溶媒に懸濁させて使用されている。一方, 等量の DZP でも, L-PGDS 溶液を用いると, 完全に可溶化することができる (図 1)。DZP の薬理活性はペントバル

図1 DZP/CMC 懸濁液と DZP/L-PGDS 複合体の写真



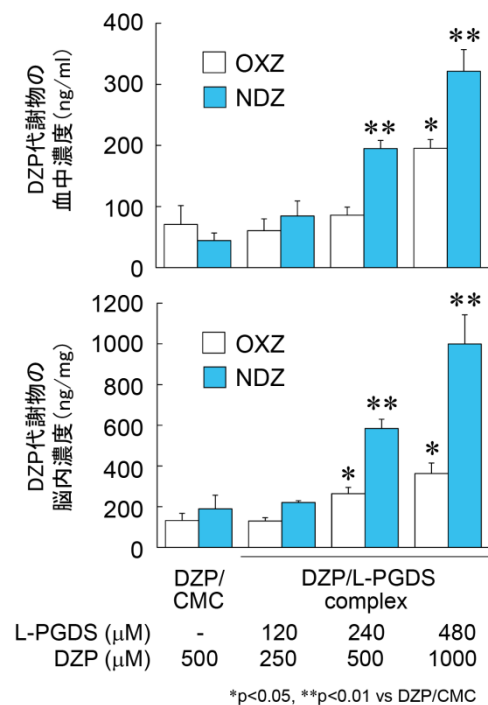
ビタール麻酔時間延長作用として検出できるので, DZP/L-PGDS 複合体のマウス経口投与による, ペントバルビタール麻酔時間への影響を調べた。その結果, DZP とカル

図2 DZP/L-PGDS 複合体の経口投与による麻酔延長効果



ボキシメチルセルロース (CMC) の懸濁液投与群と比較して, DZP/L-PGDS 複合体投与群は, L-PGDS の濃度依存的に麻酔時間が延長された (図 2)。また, DZP/L-PGDS 複合体を投与してから 1 時間後にマウスの血液を採取し, 血漿中, 及び脳内の DZP 代謝物濃度を HPLC により分析した。その結果, DZP/L-PGDS 複合体の投与群は, DZP の主な活性代謝物であるオキサゼパムとノルジアゼパムの濃度が, DZP/CMC 懸濁液投与群と比較して有意に増加した (図 3)。以上の結果から, L-PGDS 存在下において DZP

図3 DZP 代謝物の血中及び脳内濃度



の溶液中の濃度を上昇させることにより, bioavailability が上昇したことが示唆された。

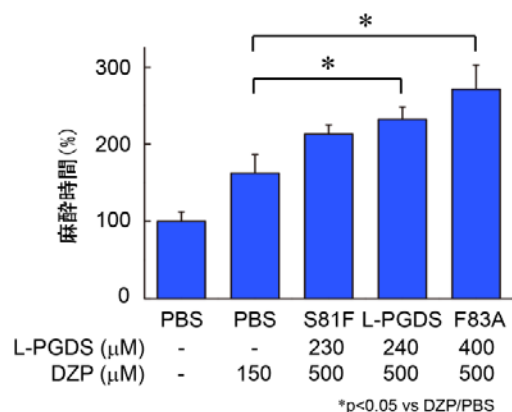
さらに, L-PGDS と DZP の結合親和性と薬効との関係を調べるために, DZP/変異型 L-PGDS 複合体マウス静脈内投与の影響を調べた。まず, NMR 法を用いた L-PGDS に対する DZP の滴定実験の結果から, DZP と相互作用すると考えられるアミノ酸残基を選択し, 部位特異的アミノ酸置換法により, それらのアミノ酸残基に変異を導入し, 21 種類の変異型 L-PGDS を作製した。各変異型 L-PGDS と DZP との結合親和性を調べるために, L-PGDS の内因性トリプトファン蛍光消光実験を行い ( $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 334 \text{ nm}$ ), 解離定数 ( $K_d$ ) を求めた。その結果, L-PGDS と DZP の  $K_d$  値は 83.8  $\mu\text{M}$  であるのに対して, 作製した 21 種類の変異体の中で, 83 番目の Phe 残基を Ala 残基に置



換した F83A 変異体は最も低い結合親和性を示し ( $K_d = 340 \mu\text{M}$ ), 81 番目の Ser 残基を Phe 残基に置換した S81F 変異体は最も高い結合親和性を示した ( $K_d = 2.1 \mu\text{M}$ ).

これらの変異体を用い, ペントバルビタール麻酔時間に対する, DZP/変異型 L-PGDS 複合体の静脈内投与の影響を調べた。DZP の濃度を  $500 \mu\text{M}$  に統一したところ, DZP/L-PGDS, DZP/F83A 変異体複合体の投与群は, DZP/PBS 投与群と比較して, 麻酔時間がそれぞれ, 1.4 倍, 1.7 倍に延長

図4 DZP/L-PGDS 変異体複合体の麻酔延長効果



された (図 4)。一方, S81F 変異体複合体の投与群は, 有意な差が見られなかった。

この結果から, DZP に対する  $K_d$  値が高いほど, 薬効が上昇することが判明した。これらの結果から, L-PGDS に変異を導入することにより, 薬剤に応じたテーラメードキャリアタンパク質の作製が可能であることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Fukuhara, A., Nakajima, H., Miyamoto, Y., Inoue, K., Kume, S., Lee, YH., Noda, M., Uchiyama, S., Shimamoto, S., Nishimura, S., Ohkubo, T., Goto, Y., Takeuchi, T., and Inui, T. (correspondence author) Drug delivery system for poorly water-soluble compounds using lipocalin-type prostaglandin D synthase. *J. Control. Release*, 159 巻, 143 頁-150 頁, 2012 年. 査読有
- ② Fukuhara, A., Yamada, M., Fujimori, K., Kusumoto, T., Nakajima, H. and Inui, T. (correspondence author) Lipocalin-type prostaglandin D synthase protects against oxidative stress-induced neuronal cell death. *Biochem. J.*, 443 巻, 75 頁-84 頁, 2012 年. 査読有

- ③ Miyamoto, Y., Noda, Y., Iida, T., Yamaguchi, K., Nishimura, S., Tanaka, A., Segawa, S., and Inui, T. (correspondence author) NMR and CD analysis of an intermediate state in the thermal unfolding process of mouse lipocalin-type prostaglandin D synthase. *J. Biochem.*, 151 巻, 335 頁-342 頁, 2012 年. 査読有
- ④ Fujimori, K., Fukuhara, A., Inui, T., and Allhorn, M. Prevention of paraquat-induced apoptosis in human neuronal SH-SY5Y cells by lipocalin-type prostaglandin D synthase. *J. Neurochem.*, 120 巻, 279 頁-291 頁, 2012 年. 査読有
- ⑤ Miyamoto, Y., Nishimura, S., Inoue, K., Shimamoto, S., Yoshida, T., Fukuhara, A., Yamada, M., Urade, Y., Yagi, N., Ohkubo, T., and Inui, T. (correspondence author) Structural analysis of lipocalin-type prostaglandin D synthase complexed with biliverdin by small-angle X-ray scattering and multi-dimensional NMR. *J. Struct. Biol.*, 169 巻, 209 頁-218 頁, 2010 年. 査読有

[学会発表] (計 45 件)

- ① 河野正樹, 福原彩乃, 山田晃平, 井上遥, 久米慧嗣, 城田涼子, 李映昊, 後藤祐児, 乾 隆, 「癌ターゲット機能有するインテリジェント型薬剤輸送蛋白質を用いた SN-38 のドラッグデリバリーシステム」 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 22 & 23 日, 国立京都国際会館 (京都)
- ② Fukuhara, A., Nakajima, H., Miyamoto, Y., Kume, S., Lee, YH., Noda, M., Uchiyama, S., Ohkubo, T., Goto, Y. and Inui, T. Drug Delivery System for Poorly Water-soluble Compounds Using Lipocalin Protein. The 25th Annual Symposium of The Protein Society, 2011 年 7 月 25 日, Boston Marriott Copley Place (Boston, USA)
- ③ 福原彩乃, 久米慧嗣, 河野正樹, 人見麻衣, 李映昊, 後藤祐児, 中嶋秀満, 乾 隆, 「難水溶性薬物の経口投与におけるリポカリン蛋白質の効果」第 27 回日本 DDS 学会学術集会, 2011 年 6 月 9 日, 東京大学本郷キャンパス (東京)
- ④ 福原彩乃, 中嶋秀満, 宮本優也, 久米慧嗣, 李映昊, 野田勝紀, 内山進, 西村重徳, 大久保忠恭, 後藤祐児, 乾 隆, 「リポカリン蛋白質を用いた難水溶性薬剤に対するドラッグ・デリバリー・システムの開発」第 11 回日本蛋白質科学会年会, 2011 年 6 月 8 日, ホテル阪急エキスポパーク (大阪)
- ⑤ 乾 隆 「リポカリン蛋白質を用いた難水溶性薬剤に対する新規 DDS」, 近畿バイ

オインダストリー振興会議, 第 25 回 技術シーズ公開会, 2010 年 12 月 6 日, 大阪科学技術センター (大阪)

- ⑥ 乾 隆「輸送蛋白質を用いた難水溶性薬剤に対する DDS の開発-X 線小角散乱による蛋白質・薬剤複合体の構造解析」, SPring-8 利用推進協議会 第 11 回蛋白質企業研究会, 2010 年 11 月 16 日, 大型放射光施設 (SPring-8) 普及棟 (兵庫)
- ⑦ 乾 隆「生体内輸送蛋白質を用いた難水溶性薬剤に対する新規ドラッグデリバリーシステムの開発」, 大阪大学蛋白質研究所セミナー, 2010 年 10 月 21 日, 大阪大学 (大阪)
- ⑧ 乾 隆「生体内輸送蛋白質のドラッグデリバリーシステムへの応用」, 第 46 回熱測定討論会, 2010 年 9 月 27-29 日, 三重大学 (三重)
- ⑨ Fukuhara, A., Nakajima, H., Inoue, K., Miyamoto, Y., Shimamoto, S., Nishimura, S., Ohkubo, T., Takeuchi, T., Inui, T. Drug Delivery System for Poorly Water-soluble Drugs by Lipocalin-type Prostaglandin D Synthase. The 24<sup>th</sup> Annual Symposium of The Protein Society, 2010 年 8 月 1-5 日, California, USA
- ⑩ Fukuhara, A., Nakajima, H., Inoue, K., Miyamoto, Y., Nishimura, S., Yagi, N., Takeuchi, T., Inui, T. Protective effect of lipocalin-type prostaglandin D synthase/NBQX complex on neuronal cell death induced by cerebral ischemia, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 21-24 日, 神戸ポートアイランド (兵庫)
- ⑪ 乾 隆, 「生体内輸送蛋白質を用いた難水溶性薬剤に対する新規 DDS の開発」, 第 8 回国際バイオフォーラム, 2009 年 7 月 1-3 日, 東京ビックサイト (東京)
- ⑫ Fukuhara, A., Yamada, M., Kusumoto, T., Nakajima, H., Nishimura, S., and Inui, T. Protective effect of lipocalin-type prostaglandin D synthase on oxidative stress-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. VIII European Symposium of The Protein Society, 2009 年 6 月 14-18 日, Zurich, Switzerland

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: DDS カプセル用蛋白質およびそれを用いた薬剤とその調整方法

発明者: 乾 隆

権利者: 大阪府立大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-027389 号  
出願年月日: 2012 年 2 月 10 日  
国内外の別: 国内

名称: 標的結合部を有する薬剤運搬体

発明者: 乾 隆

権利者: 大阪府立大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-078300 号

出願年月日: 2010 年 3 月 30 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ情報

<http://www.bioinfo.osakafu-u.ac.jp/~inuit/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乾 隆 (INUI TAKASHI)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号: 80352912

(2) 研究分担者

中嶋 秀満 (NAKAJIMA HIDEMITSU)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号: 30405360