

令和 7 年 6 月 30 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2021～2024

課題番号：21K18310

研究課題名（和文）計算・情報科学で挑む医薬品の合理的な脳内輸送

研究課題名（英文）Transporting drugs across the blood-brain barrier through information technology

研究代表者

黒田 大祐（Kuroda, Daisuke）

国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター・主任研究官

研究者番号：60756732

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,800,000円

研究成果の概要（和文）：近年の人工知能技術の発展により、創薬分野ではin silico解析の重要性が急速に高まっている。一方で、DDSに対する情報技術応用は限定的である。本研究では、機械学習と分子シミュレーションを融合し、脳内送達を指向したナノキャリアを合理設計するための基盤技術確立することを目指した。実際のDDSで用いられるポリマー/RNA間の相互作用を模倣するようなシミュレーション系を確立し、実験データからのフィードバックによりその信頼性を検証した。また、プロトタイプながら自動化ワークフローと600件超の物性データベースを整備したことで、機械学習モデルの構築とナノキャリア設計へと円滑に移行できる体制を整えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は「アミン TPP」という単一の官能基変換で、(i) 静電相互作用、(ii) 疎水性相互作用、(iii) 多点架橋の三重効果を実現した。計算/実験の相互作用により、置換率最適化から in vivo 評価までを完了できたことは、理論駆動型DDS開発の実践例として大きな意義を持つ。計算科学の深化が実験設計を加速し、得られたミセルは in vivo での有効性と安全性を同時に示したことから、本課題の科学的・社会的波及効果は極めて大きいと言える。今後は、本研究で開発している予測モデルを活用して、ポリマーのバーチャルスクリーニングを実施し、DDSに用いるナノキャリア設計空間を拡張する。

研究成果の概要（英文）：Recent breakthroughs in artificial intelligence have rapidly heightened the importance of in silico analysis in drug discovery. Yet, compared with pharmaceutical development, the use of information technology in drug-delivery systems (DDS) remains limited. This study sought to establish a foundational platform that combines machine learning (ML) with molecular simulation to rationally design nanocarriers aimed at brain delivery. Over four years, we created a simulation pipeline that replicates interactions among polymers and RNA used in real DDS applications and validated its reliability through feedback from experimental data. Furthermore, we assembled a prototype automated workflow and a database of more than 600 physicochemical-property records, laying the groundwork for smoothly transitioning to ML-based predictive modeling and optimal nanocarrier design.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：DDS 分子設計 薬物脳内輸送 シミュレーション 機械学習 抗体

## 1. 研究開始当初の背景

近年の情報科学、特に人工知能技術の進展は目覚ましく、さまざまな分野で社会実装が急速に進んでいる。生物学や化学など多くの領域で、情報技術に基づく、実験計測の「自動化」「自律化」も始まっている。こうした背景から、「バイオ・インフォマティクス」、「ケモ・インフォマティクス」など、多くの学術分野で情報科学との融合が進んでいる。特に材料科学の分野では、データマイニングや機械学習などの情報処理技術を駆使して、新材料を効率的に探索する「マテリアルズ・インフォマティクス」という新分野も登場していた。

情報技術の応用が最も期待されている領域の1つが、「創薬」である。低分子医薬品の開発では、さまざまな情報技術が古くから活用されてきた。抗体などの生体分子と比べると低分子医薬品はその分子サイズが小さいため、分子設計にかかる計算コストは比較的低い。そのため、現在のようなスーパーコンピュータが利用できない時代でも、低分子化合物は計算対象として扱うことができたのである。近年では、創薬への機械学習の応用も盛んである。既知の医薬品から学習モデルを構築することで、新規化合物の化学構造から、その水溶性や結合親和性などの性質を予測することができる(*Nature Reviews Drug Discovery*, 18:463-477, 2019)。このように、医薬品そのものの開発では、情報技術が積極的に活用されてきた一方で、医療上極めて重要である**医薬品の標的への輸送系 (Drug Delivery System: DDS)**に関しては情報技術がほとんど活用されていないという現状があった。

核酸医薬、とりわけ mRNA 医薬は抗ウイルス療法やがん免疫療法などへの応用が急速に進んでいる。しかし mRNA は大きな負電荷と易分解性を有し、生体内では速やかに加水分解・排除されるため、**安定かつ選択的に標的組織へ運ぶドラッグ・デリバリー・システム(DDS)の開発**が不可欠である。現在主流の非ウイルス性キャリアは、ポリアミンやアミノ脂質の正電荷で mRNA を凝縮させるような設計方針が取られているが、電荷反発による構造不安定性や血中タンパク質とのイオン交換に起因する薬剤漏出など、物理的・生物学的な脆弱性が課題として残っていた。

一方、本課題では、血液脳関門 (BBB) を突破するナノキャリアの理論設計を当初目標として掲げていたが、実験と計算の初期検討から「**ポリカチオン/核酸のイオン会合そのものの強化が DDS の普遍的課題である**」との認識に至った。そこで本研究では、アミンの代替カチオンとして新たにトリフェニルホスホニウム (TPP) を導入し、計算科学を駆動力にナノキャリアの自己組織化機構と in vivo 性能を抜本的に改善することを新たな課題として設定した (図 1)。

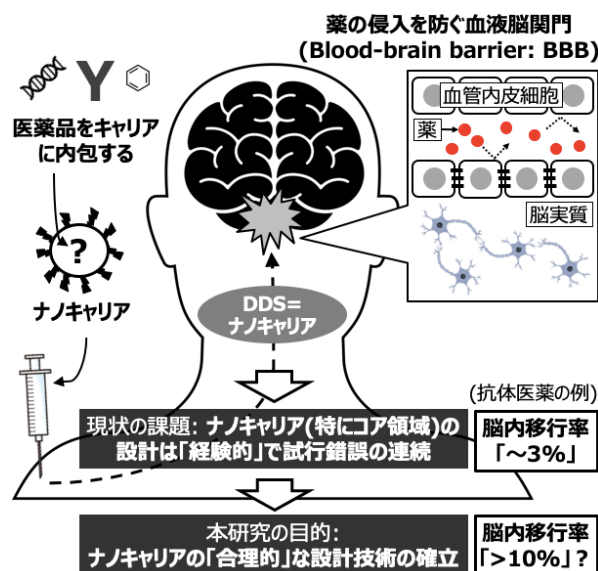


図 1: 本研究の概略

## 2. 研究の目的

1. PEG-PLys の側鎖アミンを段階的に TPP に置換し、イオン結合力と疎水相互作用を両立させた高安定ミセルを創製する。
2. 等温滴定熱測定 (ITC) ・量子化学計算 ・分子動力学 (MD) を統合し、TPP 置換がもたらす熱力学的変化と溶媒排除効果を原子レベルで解明する。
3. 得られた設計指針を用いて mRNA 搭載ミセルを実際に構築し、血中滞留性 ・細胞内発現 ・腫瘍内送達の各段階で従来型ポリアミンキャリアを凌駕することを実証する。

最終的には「**計算・情報科学に基づく DDS ナノキャリア設計戦略**」を確立し、BBB など高難度標的へ展開可能な汎用基盤技術へと昇華させることを狙った。

## 3. 研究の方法

本研究は**計算/合成/物性/生物学的評価**の4層からなる戦略で遂行した。まず精密重合で得た PEG-PLys を TPP 置換し (図 2)、NMR および SEC で構造均一性を確認した。次に DLS および TEM を用いて塩濃度依存的な自己組織化挙動と粒径分布を測定し、NaCl によるカチオン遮蔽が疎水駆動型ミセル形成を誘起するメカニズムを実証した。並行して ITC により mRNA 滴定時のエンタルピー/エントロピー項を解析し、カチオンと mRNA の結合強度を定量化した。

計算面では TPP モノマーの双極子モーメントを DFT/B3LYP で算出し極性低下を検証し、さらに現実的な時間で計算可能なモデル系として 10-mer ポリカチオンと 10-mer RNA の会合を 500 ns の全原子分子動力学計算 (MD) で複数のモデル RNA 配列について実行し、動径分布関数 (RDF) / 溶媒露出表面積 (SASA) / ポリマー間接触数を定量的に計算評価した。また、*in vitro* では mRNA 凝縮度と解離耐性を評価し、50% 血清中での RNase 保護能を qRT-PCR で定量した。*in vivo* では BALB/c マウス静注後の血中 mRNA 残存量を時間追跡し、腫瘍モデルでルシフェラーゼ発現を測定した。安全性は血漿中のバイオマーカーでモニタリングした。

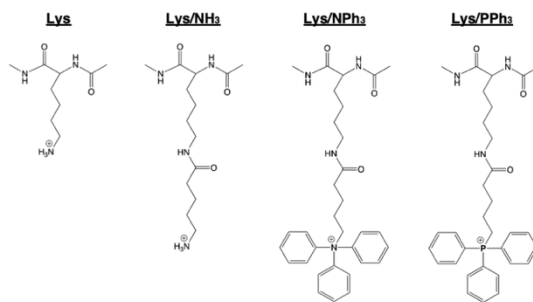


図 2: 本研究で用いた化合物。

#### 4. 研究成果

本研究の主な成果を「Triphenylphosphonium-modified cationers enhance *in vivo* mRNA delivery through stabilized polyion complexation」として学術誌にオープンアクセスで報告することができた (**Materials Horizons**, 11(19) 4711-4721 2024)。以下のその概要を記す。Figure 番号は当該論文中の番号に対応している。

##### 4.1 自己組織化と構造安定化 (Figures 1, 2)

TPP 置換率 75–97% のポリマーは 0.5 M NaCl 以上で平均径 50 nm・PDI<0.05 の高度単分散ミセルを形成し、未置換 PEG-PLys では観察されない塩応答性を示した。TEM では 20–25 nm の高密度コアと 15–20 nm の PEG シェルが確認され、疎水化に伴い染色剤の侵入が抑制される様子が可視化された。

##### 4.2 熱力学的評価 (Figure 2)

ITC では PEG-PLys が初期滴定で発熱プロファイルを示したのに対し、PEG-PLys(TPP) は置換率の増大とともに吸熱・エントロピー優位の挙動へ転換した。この結果は、電荷間クーロン結合主体の PEG-PLys と、水分子排除を伴う疎水・多点会合主体の PEG-PLys(TPP) で駆動力が質的に異なることを示唆する。

##### 4.3 計算科学による分子機序解析 (Figure 3 / 図 3)

- B3LYP/6-31G(d,p) 計算で求めた化合物モノマーの双極子モーメントは TPP=10.35 D、TPA=17.07 D となり、TPP 側鎖がより低極性であることを定量的に示した。
- N=3 で実施した 10-mer ポリカチオンと 1 本の 10-mer RNA を扱った全原子 MD 計算では、TPP 鎖が Lys 鎖よりも高頻度で RNA と原子接触を形成し、RNA との相互作用能が強化されることが確認された。
- 上記 MD 計算の水分子の RDF 解析から、RNA 近傍 3 Å 以降の水密度が TPP 系で顕著に低下し、疎水駆動の溶媒排除が実際に起きていることが示唆された。
- RNA の溶媒暴露面積 (SASA) は TPP 系で縮小しており、MD 計算においても RNA 表面が効果的にシールドされることが裏づけられた。
- ポリマーのみを 10 鎖配置した MD 計算では、TPP 間でより多くの相互接触が観測され、疎水性フェニル基による多点架橋ネットワーク形成が示された。
- 以上の QM と MD の結果を総合すると、TPP 置換は (i) 低極性による水排除、(ii) フェニル基を介したポリマー・ポリマー架橋、(iii) RNA への多点接触増大 という三つの要因で核酸会合を強化することが明らかとなった。

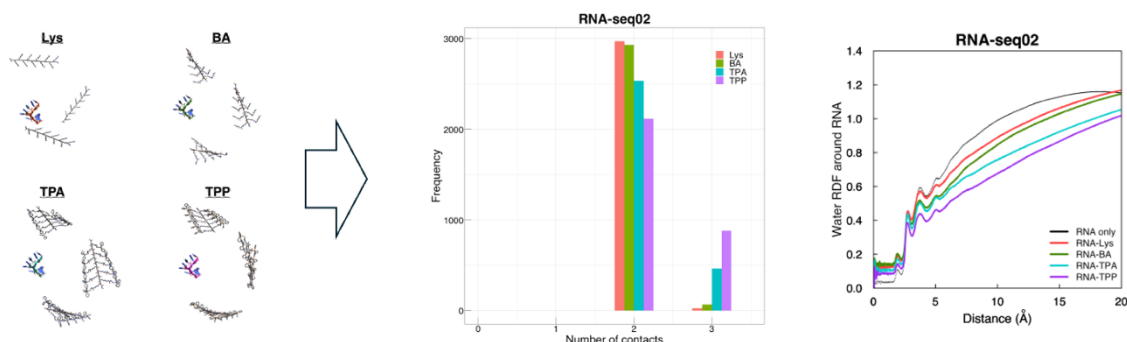


図 3: 本研究で用いたシミュレーション系と計算結果 (一部抜粋)。

#### 4.4 生物学的評価 (Figure 4)

PEG-PLys(TPP)ミセルは、生体内で mRNA を保護しつつ目的組織へ届ける性能において、従来型の PEG-PLys キャリアを質的に凌駕した。まず ポリアニオン交換耐性について、デキストラン硫酸存在下で Cy3/Cy5 二重標識 mRNA を封入したミセルの FRET シグナルを追跡した結果、TPP 置換率の増大に伴ってシグナル保持率が高まり、97% 置換系ではフリー mRNA と比較して顕著に高い構造安定性を維持した。次にヌクレアーゼ耐性として 50% 血清中で残存 mRNA を定量すると、TPP 含有量が高いほど分解抑制効果が強く、PEG-PLys(97% TPP) で最大の保護効果が得られた。

細胞内発現能の評価では、CT26 細胞に 24 h 投与した際、PEG-PLys(97% TPP)ミセルが PEG-PLys 系の一桁上のルシフェラーゼ発現を示し、蛍光イメージングでも細胞内 mRNA 取り込み量の増加が確認された。なお、ポリマー単独の細胞毒性は全系で濃度依存的に現れたが、TPP 導入による毒性増強は見られず、むしろ抑制傾向を示した。

*in vivo* 持続性に関しては、BALB/c マウス静脈投与後の循環血中 mRNA 残存量が PEG-PLys(97% TPP)で長時間維持され、PEG-PLys 系より明確に延伸した。この血中安定化は、

(i) 多点疎水会合によるミセルコアの解離抑制、(ii) 水分子排除による RNase アクセス遮断、の双方が寄与すると考えられる。さらに、CT26 腫瘍モデルでは 24 h 後の腫瘍内ルシフェラーゼ発現が PEG-PLys 系と比べ増強され、組織分布解析でも intact mRNA の臓器レベルでの保持量が広範に増加した。血中酵素・サイトカインを指標にした安全性評価では有意な変動が認められず、生体適合性も担保された。

以上より、TPP 置換による電荷維持と疎水性付与の両立が、ミセル安定化、細胞内取り込み促進、血中滞留延伸、さらには腫瘍内タンパク質発現向上へと連続的に寄与することが実証された。これらの成果は、mRNA DDS の重要要件である「物理的・生物学的安定性」と「送達効率」を単一高分子設計で同時に満たし得ることを示し、今後の中枢疾患標的治療への応用展開を強く後押しするものである。

#### 4.5 学術的重要性および展望

本研究は「アミン → TPP」という単一の官能基変換で、(i) 静電相互作用、(ii) 疎水性相互作用、(iii) 多点架橋の三重効果を引き出し、従来は複雑な多成分系でしか達成できなかった“高凝縮・高安定・低毒性”を一挙に実現した。計算/実験の相互作用により、置換率最適化から *in vivo* 評価までを完了できたことは、理論駆動型 DDS 開発の実践例として大きな意義を持つ。得られた設計指針は脂質ナノ粒子や BBB 標的キャリアにも水平展開可能である。さらに、上記以外にも臨界ミセル濃度に関する実験値 600 件超の化合物データベースを整備することができたため、機械学習に基づく予測モデルの構築と最適ナノキャリア設計へと円滑に移行できる体制を整えることができた。

以上により、本課題は当初申請書で掲げた「情報科学による DDS 理論設計基盤の確立」という目標を、TPP 置換キャリアという具体的成果をもって達成した。計算科学の深化が実験設計を加速し、得られたミセルは *in vivo* での有効性と安全性を同時に示したことから、本課題の科学的・社会的波及効果は極めて大きいと言える。今後は、本研究で開発している予測モデルを活用して、ポリマーのバーチャルスクリーニングを実施し、DDS に用いるナノキャリア設計空間を拡張する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Paul Rimpa, Kasahara Keisuke, Sasaki Jiei, Perez Jorge Fernandez, Matsunaga Ryo, Hashiguchi Takao, Kuroda Daisuke, Tsumoto Kouhei	4. 巻 10
2. 論文標題 Unveiling the affinity-stability relationship in anti-measles virus antibodies: a computational approach for hotspots prediction	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmolb.2023.1302737	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Norimatsu Jumpei, Mizuno Hayato L., Watanabe Takayoshi, Obara Takumi, Nakakido Makoto, Tsumoto Kouhei, Cabral Horacio, Kuroda Daisuke, Anraku Yasutaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Triphenylphosphonium-modified cationomers enhance <i>in vivo</i> mRNA delivery through stabilized polyion complexation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Materials Horizons	6. 最初と最後の頁 4711 ~ 4721
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d4mh00325j	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 血液脳関門を効率的に通過するナノマシンの開発
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 乗松純平、水野隼斗、渡邊隆義、小原巧、塚田智晴、追立真孝、Cabral Horacio、安楽泰孝
2. 発表標題 mRNA の効率的な生体内送達を指向した疎水性カチオン導入高分子ミセルの構築
3. 学会等名 第72 回高分子年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jumpei Norimatsu, Hayato Mizuno, Takayoshi Watanabe, Takumi Obara, Horacio Cabral, Daisuke Kuroda, Yasutaka Anraku
2. 発表標題 Rational incorporation of hydrophobic cation moieties into polymeric micelle core for efficient mRNA delivery in vivo
3. 学会等名 ACS Fall 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 乗松純平、水野隼斗、渡邊隆義、小原巧、塚田智晴、追立真孝、Cabral Horacio、安楽泰孝
2. 発表標題 全身投与によるmRNAの生体内送達を実現する疎水性カチオン導 入高分子ミセルの構築
3. 学会等名 第17回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橋口隆生
2. 発表標題 原子の世界でウイルスを視る、制御する
3. 学会等名 京都大学医生物学研究所 第17回公開講演会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤裕真、永樂元次、橋口隆生
2. 発表標題 麻疹ウイルス中枢神経感染に対する新規薬効評価系
3. 学会等名 第70回ウイルス学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Rimpa Paul, Keisuke Kasahara, Jiei Sasaki, Jorge Fernandez, Ryo Matsunaga, Takao Hashiguchi, Daisuke Kuroda, Kouhei Tsumoto
2. 発表標題 Computational design reveals residues in CDR-L3 responsible for maintaining affinity of an anti-measles antibody to Hemagglutinin
3. 学会等名 Antibody Engineering & Therapeutics (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中川優奈, 川口祥正, 広瀬久昭, 橋口隆生, 二木史朗
2. 発表標題 SARS-CoV-2 Spike Protein搭載細胞外小胞による細胞選択的かつ高効率な細胞内送達
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 橋口隆生
2. 発表標題 モルビリウイルス・ヘマグルチニンによる膜融合トリガーの構造基盤
3. 学会等名 第37回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐々木慈英, 岡部伊織, 佐藤彰彦, 児玉 耕太, 乙黒聡子, 佐々木道仁, 大場靖子, 澤洋文, 前仲勝実, 柳雄介, 橋口隆生
2. 発表標題 X-206はSARS-CoV-2変異株および薬剤耐性株を含むベータコロナウイルスに対し広域な抗ウイルス活性を示す
3. 学会等名 第2回新型コロナウイルス研究集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐藤裕真, 鎌水修欄, 橋口隆生
2. 発表標題 Analysis of novel host factors promoting cell-to-cell fusion by measles virus
3. 学会等名 第22回あわじ感染と免疫国際フォーラム
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 乗松純平, 水野ローレンス隼斗, 中木戸誠, 津本浩平, Cabral Horacio, 黒田大祐, 安楽泰孝
2. 発表標題 トリフェニルホスホニウムをベースとした新規カチオン性ポリマーによる効率的な mRNA の生体内送達
3. 学会等名 第19回ナノ・バイオメディカル学会大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	安楽 泰孝  (Anraku Yasutaka)  (60581585)	東京科学大学・物質理工学院・准教授   (12608)	
研究 分担者	橋口 隆生  (Hashiguchi Takao)  (50632098)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授   (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------