

ヒト生体内輸送蛋白質を用いた新規ドラッグデリバリーシステムの開発

Development of a new drug delivery system by the use of extracellular transporter proteins in human.

乾 隆^a, 福原彩乃^a, 宮本優也^a, 別所知明^a, 山崎文恵^a, 井上勝晶^b, 八木直人^b

Takashi Inui^a, Ayano Fukuhara^a, Yuya Miyamoto^a, Tomoaki Bessho^a, Ayae Yamasaki^a

Katsuaki Inoue^b, Naoto Yagi^b

^a大阪府立大学, ^b高輝度光科学研究センター

^aOsaka Prefecture University, ^bJASRI

X線小角散乱法を用いて、難水溶性薬剤であり抗不安薬であるジアゼパム(DZP)の結合に伴う、ヒト組換え型リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素(L-PGDS)のコンフォメーション変化を調査した。その結果、L-PGDS、およびL-PGDS/DZP複合体の慣性半径はそれぞれ、20.8 Å、および18.4 Åとなり、難水性薬剤の結合に伴い、L-PGDS分子がコンパクトになることが判明した。L-PGDSのこのような柔軟性は、難水性低分子に対するL-PGDSの「非選択性」を示すものであり、テーラメードDDSの開発につながると確信する。

We measured small-angle x-ray scattering (SAXS) of human lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) to clarify their conformational changes induced by the binding of diazepam (DZP), a hydrophobic and antianxiety drug. The radius of gyration was estimated to be 20.8 Å for L-PGDS, and 18.4 Å for L-PGDS/DZP complexes. These results indicated that human L-PGDS became compact after binding of the hydrophobic drug and such structural flexibility of the L-PGDS molecule was responsible for the broad ligand selectivity of L-PGDS. We hope the character of L-PGDS lead to the development of a new drug delivery system (DDS).

キーワード：X線小角散乱，リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素，難水溶性薬剤，DDS

背景と研究目的：リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素(L-PGDS)は、脳脊髄液中に多く存在し、疎水性リガンド輸送蛋白質群であるリポカリンファミリーに属する蛋白質であるとともに、PGH₂を基質として、脳内における睡眠誘発物質であるPGD₂を合成する酵素としての機能を併せ持つ多機能蛋白質である。これまでに、SPRING-8放射光施設におけるX線溶液散乱法を用いた構造解析により、L-PGDSは結合するリガンドの大きさによってその構造を変化させる珍しい蛋白質である

ことを見出している。一方、L-PGDS内因性Trp蛍光消光作用を利用することにより、L-PGDSと疎水性リガンドとの結合親和性を調べた結果、解離定数が70 - 140 nMであることを見出し、各リガンドともL-PGDSに対して、高い結合親和性を持つことを示した¹⁾。以上の結果は、L-PGDSの驚くべき構造的柔軟性を示し、他の同属分子にはない疎水性リガンドに対する「非選択性」を有することの証明である。さらに、ヒト組換え型L-PGDSをイヌの血中に投与した後に薬物動態を調べた結果、

半減期46 minで速やかに尿中に代謝されることが分かった²⁾。

我々は、L-PGDSが有するリガンド非選択性、及び高代謝効率を利用し、難水溶性であるがゆえに薬剤開発が困難で、薬剤候補からドロップアウトしていた薬に脚光を当て、それぞれの薬剤構造に適したナノキャリアー蛋白質を設計・開発し、ドラッグデリバリーシステム (DDS) に利用することを目指す。

実験：単色化されたX線を集光ミラーによって集光した後、スリットで整形し、試料に入射した。X線の波長は1.0 Åを用いた。検出器は、ビームラインに設置されている自動読み取り型イメージングプレート (R-AXIS IV⁺⁺ system)を用いた。散乱測定は、蛋白質濃度依存性、コントラストバリエーション法などの各種条件下で行った。分子量決定のためのリファレンスとして、ovalbumin (M_r : 45,000, Sigma)と lysozyme (M_r : 14,307, Sigma)を用いた。大過剰のジアゼパム(DZP, M_r : 284.7)と 12.0 mg ml⁻¹のL-PGDSを混合後、不溶画分を遠心除去した後、L-PGDSを2.5 mg ml⁻¹, 5.0 mg ml⁻¹, 8.0 mg ml⁻¹, および12.0 mg ml⁻¹の濃度に調整し実験に用いた。

結果と考察：2008A期では、DDSに用いるL-PGDSの低抗原性を目指すために、特にヒト組換え型L-PGDSを用いた。溶液中におけるL-PGDS, およびL-PGDS/DZP複合体は、2007A期に測定したマウス組換え型L-PGDSとほぼ同様の散乱パターンを示した。

これらの散乱曲線より、ヒトL-PGDSも球状蛋白質であることが判明した。また、薬剤結合に伴い小角領域 ($S < 0.02 \text{ \AA}^{-1}$)に変化があることが確認された。さらに、得られた散乱

曲線を用いてギニエ・プロット解析を行い、蛋白質濃度に対する $R_g(C)^2$ (R_g : 慣性半径)の変化を得た(図 1)。濃度ゼロで得られたL-PGDSの慣性半径は、20.8 Åであり、L-PGDS/DZP複合体は18.4 Åとなり、L-PGDSは薬剤との複合体形成に伴い、慣性半径を減少させることが判明した。この傾向は、マウス組換え型L-PGDS複合体から得られた結果と一致する。

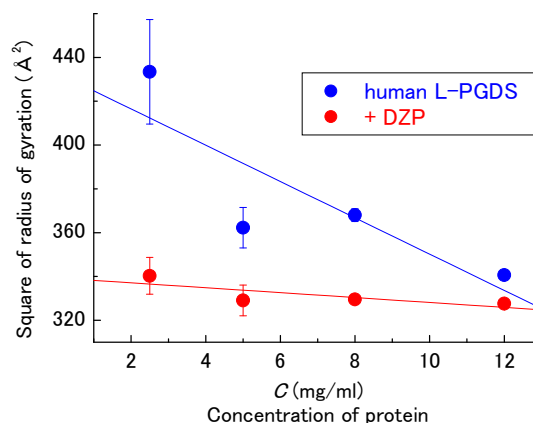


Fig. 1 Concentration dependence of R_g^2 of human L-PGDS with or without DZP. Samples used were human L-PGDS (blue circles) and L-PGDS/DZP (red circles), respectively. Data are expressed as the mean \pm S.D. of 3 independent experiments.

以上の結果より、ヒト組換え型L-PGDSも、分子量が300前後の難水性薬剤の結合に伴い、全体の構造がコンパクトになることが判明した。L-PGDSのこの柔軟性は、L-PGDSの難水性薬剤に対する「非選択性」を示すものであり、L-PGDSを用いた様々な難水溶性薬剤に対するテーラメードナノキャリアー蛋白質を用いたDDSの可能性を示唆するとともに、ヒト型の蛋白質を用いることによる低抗原性を実現できると考えられる。

参考文献

- 1) T. Inui *et al.*, J. Biol. Chem. **278** (2003) 2845-2852.
- 2) W. Li *et al.* Neurosci. Res. **61** (2008) 289-2