

オカ マサコ

氏名(本籍)	岡 雅子 (岡山県)
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	博第 28 号
学位授与年月日	平成 25 年 9 月 27 日
学位授与の条件	学位規程第 4 条第 1 項該当者
学位論文の題名	表面プラズモン共鳴法を用いた抗菌薬の脂質膜親和性 評価系構築に関する研究
論文審査委員	主 査 教 授 北川 裕之 副 査 教 授 江本 憲昭 副 査 教 授 向 高弘 副 査 准教授 小西 守周

論文内容の要旨

【序論】 脂質は生体膜成分、エネルギー源、シグナル分子という 3 つの重要な機能を果たし、生命の起源といっても過言ではない。単細胞生物から多細胞生物に至るまであらゆる生命体にとって、細胞は必須であり、細胞膜をつくる主成分は脂質である。生体膜では水溶性部分を両側に、脂溶性部分を内側に置く二重膜構造が熱力学的に最も安定した構造であり、これを脂質二重膜と呼ぶ。創薬研究において薬物動態分野では消化管からの薬物吸収や薬物の組織移行性において薬物と脂質二重膜との親和性が大きく関与すると考えられており、薬物の体内動態を反映させたデータを創薬研究の早期段階に *in vitro* 評価系で取得することは非常に有用である。

分類学上、真菌に分類されるカビ、キノコや酵母に代表される一群の微生物は、細胞質内に細胞小器官を持ち、細胞膜にエルゴステロール、細胞壁に各種多糖を持つことが特徴的である¹⁾。真菌は自然環境内に広く生息し、自然界における有機物分解者として物質循環と環境保全に重要な役割を果たしている。一方で、真菌による有害な影響も無視できず、ときに一部の真菌がヒトの組織内に侵入して引き起こす深在性真菌症が最も大きな課題として挙げられる。深在性真菌症は重篤な感染症であり、一度発症すると致命的な転帰をたどることが多い。医療の進歩とともに免疫機能の低下した患者の人口が増加し、このような深在性真菌症の問題が深刻化している。近年、病原真菌や真菌症に対する理解が進み、診断法や治療薬についても多くの研究の成果が報告されているが、深在性真菌症の制圧にはほど遠いのが現状である。

生命活動において、生体分子は単独で機能することはなく、特定の相手分子と相互作用することによりその機能を発揮する。生命活動のメカニズムを紐解くには、生体分子間相互作用を詳細に分析することが不可欠である。これまでに様々な分子間相互作用測定法が開発されてきたが、それらは静的な状態の相互作用を測定するものであった。近年、表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance, 以下 SPR と略す) を検出原理とした分子間相互作用解析により、分子の結合・解離の速さなど動的な情報、反応速度論的な情報の提供が可能になった。

本研究では、SPR を用いて抗真菌薬をはじめとする抗菌薬と脂質膜の親和性評価系を構築し、それら

の精度及び再現性を評価した後に、相互作用測定結果より作用メカニズムの解析及び温度依存的な相互作用変化や医薬品添加物の測定への影響について検討した。

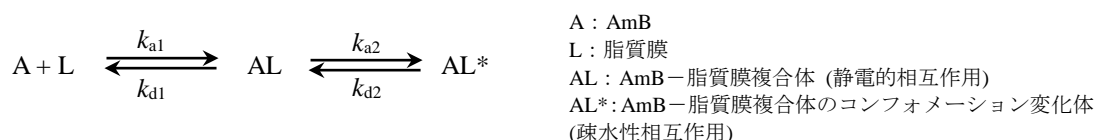
第1章 表面プラズモン共鳴法を用いた Amphotericin B 及びその他の抗菌薬のモデル脂質膜親和性評価系の構築

第1節 表面プラズモン共鳴法を用いた Amphotericin B のモデル脂質膜親和性評価系の構築²⁾

【方法】リポソームの溶液調製のために 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) 及びエルゴステロール、コレステロールをクロロホルムに溶解させ、POPC/ergosterol (4:1, v/v) 及び POPC/cholesterol (4:1, v/v) の割合で混和し、遠心エバポレータにより溶媒を留去、乾燥させた後、phosphate buffered saline (PBS) でリポソームを再溶解した。この再溶解液を 100 nm 孔径のフィルターにより 21 回ろ過した後、10% ジメチルスルホキシド (DMSO) を含んだ PBS で希釈し、0.5 mmol/L POPC/ergosterol (4:1, v/v) 溶液及び POPC/cholesterol (4:1, v/v) 溶液を調製し、センサーチップ上への固定化に用いた。

SPR を用いた分子間相互作用分析装置には Biacore S51 を使用し、センサーチップにはリポソームの固定化に有効な L1 センサーチップを、ランニング緩衝液には、10% DMSO を含んだ PBS を使用した。Amphotericin B (AmB) 測定溶液は 10% DMSO を含んだ PBS を用いて 0.25 – 20 $\mu\text{mol/L}$ の濃度を調製して測定に供した。すべての測定は、測定温度 25°C で実施した。AmB 測定溶液を注入後、解離を観察し、20 mmol/L 3-[(3-cholamidpropyl)-dimethylammonio] propanesulfonate (CHAPS) 溶液により L1 センサーチップ上のリポソームを除去した。以上の一連の測定を 3 回繰り返し実施した。

測定により得られたセンサーグラムより、1.5 – 10 $\mu\text{mol/L}$ のセンサーグラムを採用し、BIA evaluation ソフトウェア (Ver. 4.1) を用いて Two-state reaction model (conformation change) でグローバルフィッティングにより結合速度定数 (k_{a1} , k_{a2}), 解離速度定数 (k_{d1} , k_{d2}) 及び親和定数 (K) を算出した³⁻⁶⁾。



AmB は脂質膜表面の極性基部分と静電的相互作用 (Step 1) により結合した後、膜内部のアルキル鎖で構成される疎水性領域に侵入し、疎水性相互作用により結合する (Step 2)。この解析モデルにおける各 Step の親和定数は、以下に示した式により算出される。

$$dR_1/dt = k_{a1} \cdot C_A (R_{\max} - R_1 - R_2) - k_{d1} \cdot R_1 - k_2 \cdot R_1 + k_{d2} \cdot R_2$$

$$dR_2/dt = k_{a2} \cdot R_1 - k_{d2} \cdot R_2$$

R_1 : A と L の結合により形成された complex 1
 R_2 : AL のコンフォメーション変化により形成された complex 2
 R_{\max} : 最大アナライต์結合量
 C_A : アナライต์濃度

K は結合速度定数及び解離速度定数を用いて以下に示す式によって算出した。

$$K = k_{a1}/k_{d1} \cdot (k_{a2} + k_{d2})/k_{d2}$$

表 1. L1 センサーチップへのリポソーム固定化量とその繰り返し精度

Lipid type	Response units		RSD (%) ^{b)}
	Mean ($n = 24$)	SD ^{a)}	
POPC/ergosterol (4:1, v/v)	5622	29	0.5
POPC/cholesterol (4:1, v/v)	6759	96	1.4

a) Standard deviation, b) Relative standard deviation

【結果】最近の研究において SPR を用いた評価法により AmB のエルゴステロール選択性が報告された⁷⁾。しかし、この測定法は、スループット及び再現性が乏しく創薬研究に適用できなかった。今回の SPR を用いた評価系の構築では、これらの点の改良が必須であった。

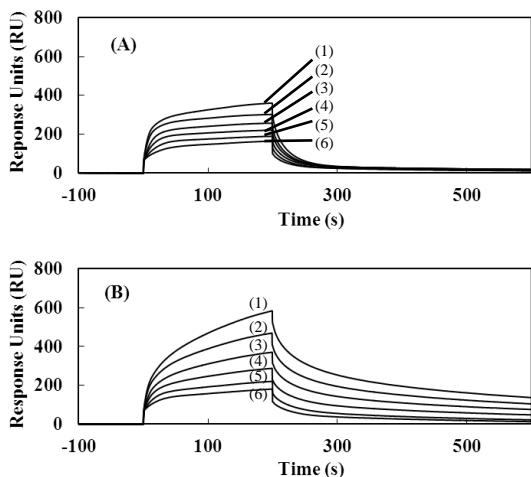


図 1. L1 センサーチップ上における AmB の 2 種のモデル脂質膜との相互作用センサーグラム
(A) POPC/cholesterol (4:1, v/v), (B) POPC/ergosterol (4:1, v/v)
AmB 濃度 (1) 10, (2) 5.0, (3) 3.5, (4) 2.5, (5) 2, (6) 1.5 $\mu\text{mol/L}$

使用したリポソーム POPC/cholesterol (4:1, v/v) は哺乳動物細胞膜モデル, POPC/ergosterol (4:1, v/v) は真菌細胞膜モデルとして用いた. 最初に, リポソーム固定化量の均一化を目的として, L1 センサーチップ表面の再生条件を最適化した. 最適化した再生条件下 (20 mmol/L CHAPS 15 μL 注入) で, L1 センサーチップ上に固定化した 2 種のモデル脂質膜の固定化量を確認した結果を表 1 に示した ($n = 24$). リポソーム固定化は良好な再現性を示し, 薬物-脂質膜相互作用解析のためのリポソーム固定化必要量基準の約 4500 RU を満たしているので³⁻⁶, 今回のリポソーム固定化量とその再現性は本評価系に適用できると判断した.

図 1 には AmB とモデル脂質膜との相互作用のセンサーグラムを示した. これらのセンサーグラムより, AmB

は POPC/cholesterol (4:1, v/v) からよりも POPC/ergosterol (4:1, v/v) からの解離の方が遅いことが認められたので, 以前の報告⁷⁾にある AmB のエルゴステロール選択性を再現したと判断した.

表 2 には, AmB-モデル脂質膜相互作用の反応速度論的パラメーターを解析モデル Two-state reaction model により算出した結果を示した. 反応速度論的解析の結果, AmB は POPC/cholesterol (4:1, v/v) よりも POPC/ergosterol (4:1, v/v) に約 18 倍高い K 値を示した. AmB の静電的相互作用によるモデル脂質膜への Step 1 の相互作用は, POPC/ergosterol (4:1, v/v) と POPC/cholesterol (4:1, v/v) の 2 種のモデル脂質膜に対して K_1 値が約 2 倍程度の相違であったため, 静電的相互作用は同等であると判断した. 一方, Step 2 の疎水的な結合 k_{a2} 値は 2 種のモデル脂質膜の間で大きく異なり, AmB の k_{a2} 値はエルゴステロール含

表 2. Two-state reaction model 解析により得られた AmB (1.5 – 10 $\mu\text{mol/L}$) とステロール含有 POPC リポソームとの相互作用における速度論的パラメーター及び親和定数 ($n = 3$)

Lipid type	$k_{a1}^a)$ (1/Ms)	$k_{d1}^a)$ ($\times 10^{-3}$, 1/s)	$k_{a2}^a)$ ($\times 10^{-4}$, 1/s)	$k_{d2}^a)$ ($\times 10^{-5}$, 1/s)	$K_1^a)$ ($\times 10^5$, 1/M)	$K_2^a)$	$K^a)$ ($\times 10^5$, 1/M)
POPC/ergosterol ^{b)}	1600 \pm 430	7.52 \pm 1.85	3.96 \pm 2.41	3.44 \pm 2.00	2.12 \pm 0.34	12.8 \pm 3.7	28.5 \pm 4.9
POPC/cholesterol ^{c)}	9390 \pm 400	86.6 \pm 4.7	130 \pm 9	1800 \pm 200	1.09 \pm 0.09	0.724 \pm 0.091	1.87 \pm 0.06

Mean \pm standard deviation. a) 結合速度定数 (k_{a1} , k_{a2}), 解離速度定数 (k_{d1} , k_{d2}) 及び親和定数 K_1 (k_{a1}/k_{d1}), K_2 (k_{a2}/k_{d2}), K ($K_1 + K_1K_2$). b) POPC/ergosterol (4:1, v/v). c) POPC/cholesterol (4:1, v/v)

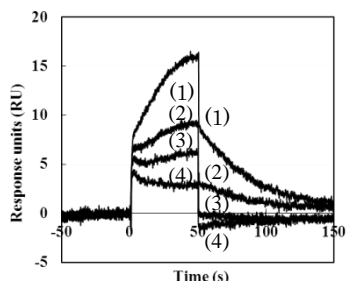


図 2. L1 センサーチップ上における AmB の固定化リポソーム POPC/ergosterol (4:1, v/v) との相互作用センサーグラム
AmB 濃度 (1) 1.5, (2) 1.0, (3) 0.50, (4) 0.25 $\mu\text{mol/L}$

有脂質膜よりもコレステロール含有脂質膜への方が約 30 倍以上高いことを示した. さらに, Step 2 の相互作用での AmB のモデル脂質膜に対する k_{d2} 値においてエルゴステロール含有脂質膜に対する k_{d2} 値がコレステロール含有脂質膜に対する k_{d2} 値の 500 分の 1 以下であった. この結果は, AmB のコレステロール含有脂質膜からの解離に比べエルゴステロール含有脂質膜からの解離の方が非常に遅いことを示唆した. この AmB のエルゴステロール含有脂質膜への高い親和性は, 脂質膜内部での AmB イオンチャネルの形成・安定化を疎水的な相互作用により促進することを示唆した^{8,9)}.

AmB 濃度 0.25 – 1.5 $\mu\text{mol/L}$ と POPC/ergosterol (4:1, v/v) との結合を示したセンサーグラムを詳細に

確認した (図 2). 0.25 – 0.5 $\mu\text{mol/L}$ AmB でモデル脂質膜の親水性部への結合のみが認められ¹⁰⁾, この濃度ではエルゴステロール含有脂質膜との疎水的な相互作用による脂質膜内部への AmB の侵入は起こっていないと考えられる. 一方, 1.0 – 1.5 $\mu\text{mol/L}$ AmB では, 特に解離領域のセンサーグラムに形状変化が認められ, AmB とエルゴステロール含有脂質膜との間にわずかに疎水的な相互作用が生じ始めていることが示唆された. ヒト血漿中 AmB 薬効濃度は 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 以上と報告されていることから¹¹⁾, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 以上の AmB のエルゴステロール含有脂質膜への相互作用によるセンサーグラムの形状変化は AmB の薬効作用機序を反映している可能性が示唆された.

【考察】 AmB はその治療領域と副作用領域の血漿中濃度が近いことでも知られている¹¹⁾. 抗真菌薬の薬効の観点から考えると, エルゴステロール含有脂質膜への高い選択性が必須であり, AmB が示した約 18 倍程度のエルゴステロール含有脂質膜の膜選択性ではまだ不十分なのかもしれない. 今回の研究を通じて, 将来的に SPR を用いて構築した測定法が新薬の研究開発において薬効と毒性のバランスを評価できるツールとなると考える. また, 本評価法は抗真菌薬のみならず, 様々な薬物と脂質膜の相互作用評価に容易に適合できると考えられる.

第 2 節 表面プラズモン共鳴法を用いた Amphotericin B のモデル脂質膜親和性評価系の他剤への応用

【方法】 第 1 節参照. リポソーム組成: POPC, POPE/POPG (4:1, v/v). ランニング緩衝液, リポソーム調製用溶液, 測定試料調製溶液は 5% DMSO を含んだ PBS を使用した. 測定対象薬物にはエリスロマイシン, ムピロシン, D-シクロセリンを用い, それぞれ 12.5 – 100 $\mu\text{mol/L}$ の測定溶液を調製し, 測定に供した. 反応速度論的相互作用解析には Steady state model を使用した.

表 3. Steady State Model 解析により得られたエリスロマイシン及びムピロシン (12.5 – 100 $\mu\text{mol/L}$) とモデル脂質膜との相互作用における親和定数

Compound	Liposome type	K_A ^{b)} ($\times 10^4$, 1/M)	K_D ^{c)} ($\times 10^{-5}$, M)
Erythromycin	POPC	5.15	1.94
	PE/PG ^{a)}	6.61	1.51
Mupirocin	POPC	2.19	4.57
	PE/PG ^{a)}	3.89	2.57

a) POPE/POPG (4:1, v/v). b) 結合定数(K_A). c) 解離定数 (K_D).

【結果】 リポソームの固定化は, リポソーム組成 POPC 及び POPE/POPG (4:1, v/v) において良好な再現性を示した. エリスロマイシン, ムピロシンでは濃度依存的なセンサーグラムが得られたが, D-シクロセリンでは, 濃度依存的なセンサーグラムが得られず, 解析ができなかった. これは, D-シクロセリンの低脂質膜親和性と分子量 102 程度の低分子であることが原因と考え

られる. エリスロマイシン及びムピロシンとモデル脂質膜との相互作用を解析した結果を表 3 に示した. エリスロマイシン, ムピロシンともに POPC よりも POPE/POPG (4:1, v/v) に対して高い親和性を示した. しかしながら, これらの薬物の脂質膜との相互作用はいずれも弱く, それぞれの薬物の持つ体内動態と今回得られた結果との相関性を見出すには至らなかった.

【考察】 今回の実験に用いた抗菌薬エリスロマイシン及びムピロシンは AmB のように薬効作用機序に脂質膜との結合を必要とするものではなく, 細菌細胞のタンパク合成阻害を薬効作用機序とするものであった^{12,13)}. そのため, 脂質膜に対する相互作用は全体的に弱い結果となったと考えられる. したがって, これらの結果より, 本評価系が薬物と脂質膜との親和性の評価系として有効であることが確認できる判断材料の一つとなった.

第 2 章 表面プラズモン共鳴法を用いた Fungizone の脂質膜親和性評価系の構築¹⁴⁾

【方法】 第 1 章第 1 節参照. ランニング緩衝液, リポソーム調製用溶液, 測定試料調製溶液はすべて

PBS を使用した。ニードル洗浄溶液には 20 mmol/L CHAPS 溶液, 再生溶液には 100 mmol/L HCl/IPA (1:1, v/v) 混液を使用した。測定温度には 37°C も追加した。測定により得られた 1.5 – 10 $\mu\text{mol/L}$ のセンサーグラムを採用し, BIA evaluation ソフトウェア (Ver. 4.1) を用いてグローバルフィッティングにより Two-state reaction model (conformation change) で反応速度論的パラメーターを算出した³⁻⁶⁾。以上の相互作用の詳細及び反応速度論的パラメーター算出法は第 1 章参照。

表 4. L1 センサーチップへのモデル脂質膜固定化の固定化量とその繰り返し精度 (測定温度 25°C)

Lipid type	Response units		RSD (%) ^b
	Mean (<i>n</i> = 18)	SD ^a	
POPC/ergosterol (4:1, v/v)	5802	302	5.2
POPC/cholesterol (4:1, v/v)	6470	467	7.2

a) Standard deviation, b) Relative standard deviation

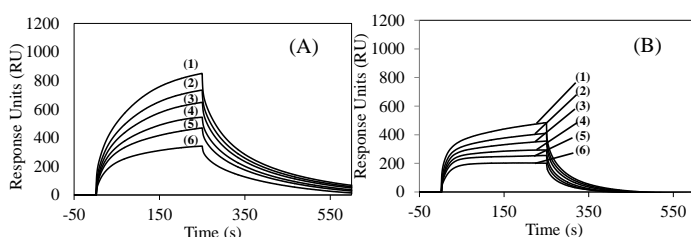


図 3. Fungizone の L1 センサーチップ上に固定化したリポソーム膜への相互作用測定センサーグラム (測定温度 25°C) (A) POPC/ergosterol (4:1, v/v), (B) POPC/cholesterol (4:1, v/v), Fungizone 濃度; (1) 10, (2) 5, (3) 3.5, (4) 2.5, (5) 2, (6) 1.5 $\mu\text{mol/L}$

測定による各パラメーターの再現性は良好であった。解析結果より, Fungizone の K 値は POPC/cholesterol (4:1, v/v) よりも POPC/ergosterol (4:1, v/v) に対して約 2 倍の高値を示し, Fungizone の Step 1 の相互作用には 2 種の脂質膜間で約 3 倍の相違が認められ, エルゴステロール含有脂質膜への親和性がわずかに強かった。

表 5. Fungizone (1.5 – 10 $\mu\text{mol/L}$) とモデル脂質膜との相互作用における反応速度論的パラメーター及び親和定数 (測定温度 25°C, *n* = 3)

Lipid type	Rate constants ^c (Two-state reaction model) (1.5 - 10 $\mu\text{mol/L}$)				
	k_{a1} (1/Ms)	k_{d1} ($\times 10^{-3}$, 1/s)	k_{a2} ($\times 10^{-5}$, 1/s)	k_{d2} ($\times 10^{-3}$, 1/s)	K ($\times 10^5$, 1/M)
POPC/ergosterol ^a	2290 \pm 150	7.43 \pm 0.30	6.16 \pm 1.30	3.36 \pm 1.20	3.12 \pm 0.22
POPC/cholesterol ^b	8310 \pm 630	88.3 \pm 6.0	1630 \pm 120	20.4 \pm 1.6	1.70 \pm 0.10

Mean \pm standard deviation. a) POPC/ergosterol (4:1, v/v), b) POPC/cholesterol (4:1, v/v), c) 結合速度定数 (k_{a1} , k_{a2}), 解離速度定数 (k_{d1} , k_{d2}) 及び親和定数 K_1 (k_{a1}/k_{d1}), K_2 (k_{a2}/k_{d2}), K ($K_1 + K_2$).

一方, Step 2 における k_{a2} 値は 2 種の脂質膜間で大きく異なり, コレステロール含有脂質膜に対する k_{a2} 値が約 265 倍高値であった。さらに, Step 2 における Fungizone のエルゴステロール含有脂質膜に対する k_{d2} 値はコレステロール含有脂質膜よりも約 1/6 の低値を示した。この結果より, Fungizone はコレステロール含有脂質膜に対して速い結合と解離を示し, エルゴステロール含有脂質膜に対しては結合と解離が共に遅いことがわかった。Fungizone と 2 種のモデル脂質膜に対する K 値はほぼ同程度の親和性であった。Fungizone は AmB の溶解度を改善するためにデオキシコール酸ナトリウムのミセルに AmB を組み込み製剤化された医薬品である。SPR を用いた相互作用解析において医薬品をアナライトとする

【結果】 L1 センサーチップ上へのリポソームの固定化量とその繰り返し精度を確認した結果を表 4 に示した。L1 センサーチップ上へのリポソーム固定化レスポンスは良好な再現性を示した。

AmB の抗菌活性は真菌のエルゴステロールへの高い親和性を示すことにより発揮される¹⁵⁻¹⁸⁾。

図 3 には測定温度 25°C でのモデル脂質膜と Fungizone との相互作用センサーグラムを示した。センサーグラムのレスポンスを比較してみると, POPC/cholesterol (4:1, v/v) よりも POPC/ergosterol (4:1, v/v) に高い親和性を示した。測定温度 25°C で測定した結果を Two-state reaction model で解析した各パラメーターを表 5 に示した。繰り返し

際、医薬品添加物の特性を考慮する必要があると考えられる。仮に相互作用に変化が認められた場合であっても、その変化が薬物に由来する変化であるのか、医薬品添加物に起因するものであるのかを明確にしなければならない。Fungizone の場合、デオキシコール酸ナトリウムが主な医薬品添加物として配合されているため、SPR を用いた Fungizone の脂質膜相互作用評価におけるデオキシコール酸ナトリウムの影響を考慮しなければならない。また、医薬品の脂質膜相互作用は、*in vivo* で薬効または毒性が発現する生理条件下に近い測定条件でも評価すべきと考え、測定温度を 37°C での実験も実施した。薬物-脂質膜相互作用に対するデオキシコール酸ナトリウムの影響を調べるため、1.5 – 10 $\mu\text{mol/L}$ Fungizone 測定溶液中に含まれるデオキシコール酸ナトリウム濃度である 2.7–18 $\mu\text{mol/L}$ デオキシコール酸ナトリウム測定溶液を調製し、測定温度 25°C と 37°C でモデル脂質膜との相互作用測定を実施した結果、デオキシコール酸ナトリウムのモデル脂質膜に対する親和性に、選択性及び測定温度による相互作用変化は認められなかった。また、デオキシコール酸ナトリウムとモデル脂質膜との相互作用は Fungizone に比べて非常に弱かった。よって、Fungizone の脂質膜親和性評価において、デオキシコール酸ナトリウムの影響はないと判断した。

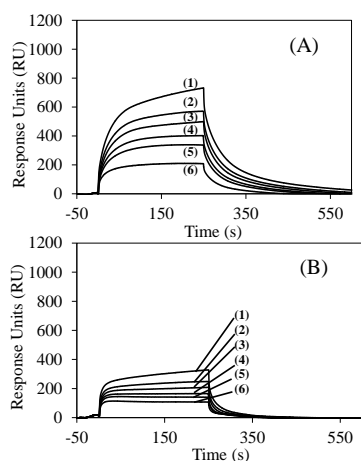


図4. Fungizone の L1 センサーチップ上に固定化したリポソーム膜への相互作用測定センサーグラム (測定温度 37°C)

(A) POPC/ergosterol (4:1, v/v), (B) POPC/cholesterol (4:1, v/v), Fungizone 濃度; (1) 10, (2) 5, (3) 3.5, (4) 2.5, (5) 2, (6) 1.5 $\mu\text{mol/L}$

次に、測定温度 37°C での Fungizone の脂質膜親和性を評価した。

まず、37°C での L1 センサーチップ上への POPC/ergosterol (4:1, v/v) 及び POPC/cholesterol (4:1, v/v) の固定化の再現性を確認した結果、いずれも良好な再現性を示した。図 4 には、測定温度 37°C での Fungizone のモデル脂質膜との相互作用のセンサーグラムを示した。測定温度 25°C で得られたセンサーグラムと比較すると、特に POPC/ergosterol (4:1, v/v) のセンサーグラムの形状に変化が認められた。測定温度 37°C のセンサーグラムを Two-state reaction model で解析した結果を表 6 に示した。繰り返し測定による各パラメーターの再現性はいずれも良好であった。測定温度 37°C での Fungizone とモデル脂質膜との K 値は、2 種のモデル脂質膜ともに減少したが、エルゴステロール含有膜への選択性は約 2 倍から約 3 倍へとわずかに上昇した。Fungizone の POPC/ergosterol (4:1, v/v) に対する Step 2 の相互作用において、測定温度を 25°C から 37°C にすることで k_{a2} 値が劇的に増加した。これは、デオキシコール酸ナ

トリウムで形成されたミセルとエルゴステロール含有脂質膜の疎水的な相互作用により形成された複合体を通して AmB の脂質膜への侵入を速やかにしたためではないかと考えられる^{18,19}。また、Fungizone と POPC/ergosterol (4:1, v/v) との相互作用において k_{d1} 値及び k_{d2} 値が大幅に増加した。これは、Fungizone のエルゴステロール含有脂質膜に対する結合力が温度の上昇によって減弱し、解離しやすくなることを

表 6. Fungizone (1.5 – 10 $\mu\text{mol/L}$) とモデル脂質膜との相互作用における反応速度論的パラメーター及び親和定数 (測定温度 37°C, $n = 3$)

Lipid type	Rate constants ^c (Two-state reaction model) (1.5 – 10 $\mu\text{mol/L}$)				
	k_{a1} (1/Ms)	k_{d1} ($\times 10^{-2}$, 1/s)	k_{a2} ($\times 10^{-3}$, 1/s)	k_{d2} ($\times 10^{-2}$, 1/s)	K ($\times 10^5$, 1/M)
POPC/ergosterol ^a	4380 \pm 90	3.59 \pm 0.60	6.88 \pm 1.58	1.46 \pm 0.09	1.83 \pm 0.09
POPC/cholesterol ^b	6550 \pm 1220	14.6 \pm 4.51	5.72 \pm 2.81	1.70 \pm 0.73	0.619 \pm 0.135

Mean \pm standard deviation. a) POPC/ergosterol (4:1, v/v), b) POPC/cholesterol (4:1, v/v), c) 結合速度定数 (k_{a1} , k_{a2}), 解離速度定数 (k_{d1} , k_{d2}) 及び親和定数 K_1 (k_{a1}/k_{d1}), K_2 (k_{a2}/k_{d2}), K ($K_1 + K_1K_2$).

示唆した。Fungizone-モデル脂質膜相互作用を K 値のみで見た場合、測定温度の変化によって Fungizone とモデル脂質膜との親和性に顕著な変化は認められなかったが、相互作用の各 Step での各パラメーターには温度依存的な変化が認められた。以上の結果より、これまで ELISA などによって評価されてきた平衡状態での相互作用解析に加え、SPR を用いた反応速度論的な相互作用解析を活用することは、これまでに解明されなかった相互作用メカニズムの解析の一助となり、創薬開発に有益な情報を提供できると考えられる。

【考察】 第1章の結果より AmB はエルゴステロール含有脂質膜に対して約 18 倍の選択性を示したが、Fungizone のエルゴステロール含有脂質膜に対する選択性は、コレステロール含有脂質膜に比べて測定温度 25°C の時、わずか 2 倍であった。 K 値を比較してみると、Fungizone のエルゴステロール含有脂質膜に対する K 値は AmB のエルゴステロール含有脂質膜に対する K 値よりも約 1/9 に減少していた。これは AmB とモデル脂質膜の相互作用が、AmB がデオキシコール酸ミセル内に取り込まれることによって減弱する可能性を示唆していると考えられる。以上の評価結果より、AmB の脂質膜選択性は Fungizone へと製剤化されることにより低下していることがわかった。仮に AmB が本来有する約 18 倍のエルゴステロール含有脂質膜選択性が Fungizone でも維持すれば、重篤な副作用の発現は軽減したと予想される。しかし、実際は Fungizone には重篤な副作用が報告されており、これはエルゴステロール含有脂質膜選択性の低下が副作用発現の原因の 1 つであると考えられる。以上より、SPR を用いた相互作用解析による Fungizone とモデル脂質膜の親和性変化はその副作用発現や薬効に関連する現象を反映している可能性が示唆された。

【結論】 SPR を用いて高感度かつ再現性の良好な AmB 及び Fungizone の脂質膜親和性評価系を構築した。本法は、従来法の約 20 倍の高感度化と 1 日に 10 化合物の測定が可能なスループットを達成した。また、評価法の高感度化により治療領域付近の血漿中 AmB 濃度と同じ濃度のセンサーグラムの形状変化を捉えられたことで、センサーグラムの形状が薬効の作用機序を反映して変化していることが示唆された。Fungizone の脂質膜親和性では、温度依存的に相互作用様式が変化していることがわかった。また、AmB の脂質膜選択性は、製剤化することによって低下し、この脂質膜選択性低下は Fungizone の副作用発現の原因の 1 つである可能性を指摘した。

今回の研究で、SPR を用いた分子間相互作用解析が *in vivo* での薬効と毒性のバランスを *in vitro* で評価できる可能性を見出した。今後、さらに様々な分子間相互作用解析データを積み上げることにより、この SPR を用いた評価系は、新薬開発成功率を向上させる有用なツールの 1 つとなることが期待される。

【参考文献】

- 1) 山口英世. 2007 病原真菌と真菌症 改訂 4 版. 南山堂.
- 2) Onishi, M., Kamimori, H. 2013 Biol. Pharm. Bull. 36: 658 – 663.
- 3) Kamimori, H., Hall, K., Craik DJ., and Aguilar, MI. 2005 Anal. Biochem. 337: 149 – 153.
- 4) Kamimori, H., Blazyk, J., and Aguilar, MI. 2005 Biol. Pharm. Bull. 28: 148 – 150.
- 5) Kamimori, H., Unabia, S., Thomas, WG., and Aguilar, MI. 2005 Anal. Sci. 25: 171 – 174.
- 6) Lerch, M., Kamimori, H., Folkers, G., Aguilar, MI., Beck-Sickinger, AG., and Zerbe, O. 2005 Biochemistry 44: 9255 – 9264.
- 7) Mouri, R., Konoki, K., Matsumori, N., Oishi, T., and Murata, M. 2008 Biochemistry 47: 7807 – 7815.
- 8) De Kruijff, B. and Demel, RA. 1974 Biochim. Biophys. Acta 339: 57 – 70.

- 9) Baginski, M., Resat, H., and Borowski, E. 2002 *Biochim. Biophys. Acta* 1567: 63 – 78.
- 10) Mozsolits, H., Wirth, HJ., Werkmeister, J., and Aguilar, MI. 2001 *Biochim. Biophys. Acta* 1512: 64 – 76.
- 11) Hiemenz, JW. and Walsh, TJ. 1996 *Clin. Infect. Dis.* 22: Suppl. S133 – S144.
- 12) Mao, JC. 1967 *Biochem. Pharmacol.* 12: 2441 – 2443.
- 13) Hughes, J. and Mellows, G. 1978 *Biochem. J.* 176: 305 – 318.
- 14) Oka, M. and Kamimori, H. 2013 *Anal. Sci.* 29: 697 – 702.
- 15) Readio, JD. and Bittman, R. 1982 *Biochim. Biophys. Acta* 685: 219 – 224
- 16) Vertut-Croquin, A., Bolard, J., Chabbert, M., and Gary-Bobo, C. 1983 *Biochemistry* 22: 2939 – 2944.
- 17) Milhaud, J., Hartmann, M., and Bolard, J. 1989 *Biochimie* 71: 49 – 56.
- 18) Vertut-Croquin, A., Bolard, J., and Gary-Bobo, CM. 1984 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125: 360 – 366.
- 19) Heerklotz, H. 2008 *Q. Rev. Biophys.* 41: 205 – 264.

論文審査の結果の要旨

古くから深在性真菌症の特効薬としてポリエンマクロライド系抗真菌薬である Amphotericin B (AmB) が知られているが、副作用として重篤な腎毒性が報告されている。AmB の薬効作用機序は真菌細胞膜上のエルゴステロールと結合することによる細胞膜の破壊と考えられており、より有効な抗真菌薬の開発には AmB よりもエルゴステロールに高い選択性を示すことが必須と考えられる。

本研究では、表面プラズモン共鳴法 (Surface Plasmon Resonance, SPR) を用いた良好な再現性をもつ抗真菌薬と脂質膜の親和性評価系を構築し、AmB 及び抗真菌薬以外の抗菌薬の脂質膜親和性を評価することにより作用メカニズムの解明及び温度依存的な相互作用変化や医薬品添加物の測定への影響について検討した。

その結果、再現性の高いハイスループットな AmB-脂質膜親和性評価系が構築でき、評価に用いる脂質膜成分を変更することで、本評価系は AmB 以外の抗菌薬にも適用できることが確認できた。また、AmB を主成分とする医薬品 Fungizone の脂質膜親和性を評価することで、エルゴステロール含有脂質膜への選択性の低下が認められ、これが副作用発現に寄与している可能性を見出した。今後、本研究の評価系構築技術は医薬品開発における様々な薬物と脂質膜親和性評価への活用が期待される

上記の論文は博士（薬学）論文として適当であると判断する。