

令和 4 年 4 月 5 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22291

研究課題名(和文) 生細胞内における抗がん剤の生物的全合成

研究課題名(英文) Cell therapy by using engineered biosynthesis of anticancer agent in tumor cells

研究代表者

渡辺 賢二 (Watanabe, Kenji)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：50360938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：フマギロール前駆体は、酸化酵素であるFma-P450が *-trans-bergamotene*(1)を酸化することで生合成される。レトロウイルスベクターを用いて fma-P450をHeLa細胞内で発現させ、さらに基質である1を培養液に添加してLC-MSによる分析を行った。その結果、培養液抽出物から5-hydroxyl-*-trans-bergamotene*および、5-hydroxyl-*-cis-bergamotene*が検出された。さらに同細胞培養液から、dehydrodemethoxyfumagillolが還元された5-epi-demethoxyfumagillolを検出することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではがんを対象疾患としたが、天然物の特性とアイデア次第で様々な治療戦略を立てることができる。例えば、ゲノム編集技術や組織指向性アデノ随伴ウイルスベクターを用いることで、脳や筋肉など組織選択的に天然物生合成遺伝子を送達でき、神経疾患や心疾患など対象疾患の範囲を拡大することも可能かもしれない。あるいは、植物由来天然物の生合成遺伝子も本研究にコンセプトに適用できるだろう。本法は、特殊な機器・設備を必要とせず、ウイルスベクターも市販されているため、動物細胞用の培養機器・試薬があれば容易に実施可能である。本研究のコンセプトが分野を問わず広く多くの研究者に普及し、実用化に至ることを願う。

研究成果の概要(英文)：One of the hurdles in practicing gene therapy is establishing a system for functional expression of heterologous genes in human cells. Here we examined whether human cancer cells could produce antibiotics when provided with a heterologous biosynthetic gene. We focused on cytochrome P450, an inherently difficult class of enzymes to produce. Specifically, we selected Fma-P450 that plays a central role in the fumagillin antimicrobial biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* to examine fungal metabolite production by HeLa cells that express fma-P450 heterologously using a retroviral vector. Here we show that HeLa cells harboring fma-P450 can biosynthesize 5-hydroxyl-*-trans-bergamotene*, 5-hydroxyl-*-cis-bergamotene*, and cytotoxic 5-epi-demethoxyfumagillol when supplemented with the precursor *-trans-bergamotene*. In conclusion, we demonstrated the feasibility of programming human cells to auto-generate antibiotics through heterologous gene introduction.

研究分野：天然生合成

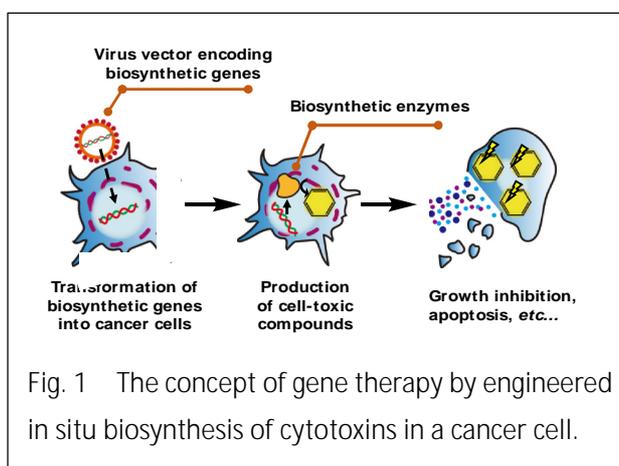
キーワード：天然物 生合成 遺伝子治療 異種宿主発現

1. 研究開始当初の背景

抗生物質や抗がん剤などの医薬品をはじめ、天然物は人類史の発展に大きく貢献してきた。バイオ医薬品が台頭する現代創薬においても天然物が重要な創薬資源であることには変わらない。微生物や植物は polyketide synthase (PKS) や non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) など様々な生合成酵素を駆使して代謝物を改変し、生物活性物質を産み出す。すなわち生合成遺伝子の変異に応じて多種多様な天然物が創出されるため、天然物は構造多様性に富み、強力な生物活性を示すものが多い。また微生物が産生する天然物は培養による大量製造が可能なことも魅力的な要素である。しかしながら、天然物は望まぬ標的に対しても作用する場合があります、副作用等により医薬開発が断念されるケースが山積している。加えて現代の医薬品開発では薬剤候補化合物は細胞への吸収性や体内動態が良いことが好ましいとされており、天然資源から生物活性のある化合物を見出して薬に仕上げるといった従来の開発戦略では、これらの要件を満たす化合物を探し当てることは極めて困難である。そのため、従来型の薬剤開発法に替わる新しい天然物活用法を構築し、副作用等の問題を解決する必要がある。

2. 研究の目的

これまでに天然物をベースに多くの医薬品が開発されてきたが、点滴など従来の服用法では薬効を最大限に発揮させることが難しく、副作用が生じた場合は安全管理にも苦慮する。そこで我々は、合成生物学の手法を応用して細胞自身に天然物を生合成させることを発案した。すなわち、天然物生合成遺伝子をヒトの疾患組織・細胞で発現させることができれば、たとえ薬物動態の悪い天然物であっても細胞内で生合成されるため高い薬効を発揮でき、直接病気を治すことが可能となる (図 1)。



具体的には、まずウイルスベクター等を用いて疾患細胞内で天然物生合成遺伝子を発現させる。生合成遺伝子の発現が引き金となり、疾患細胞は代謝産物を原料にして細胞内で天然物を生合成するようになり、自身で産生した天然物によって疾患が治癒される。天然物は疾患が根治されるまで永続的に生合成されるため、わずか一度のウイルスベクター投与で疾患の根治が可能となる。しかしながら、天然物生合成遺伝子を疾病治療に応用した前例はなく、さらに哺乳動物細胞にて発現させた例は、調べた限り我々の報告より以前には存在しなかった。一方で、薬剤耐性遺伝子や細菌由来シトシンデアミナーゼ遺伝子、オワンクラゲ由来 GFP などのように哺乳動物細胞を宿主とした異種発現の成功例はある。また近年、遺伝子工学技術の発達に伴い大腸菌や酵母、カビなどの微生物を宿主として様々な天然物の人工的な生産が可能となってきた。特に、酵母に天然物合成酵素を異種発現させてオピオイド化合物やカンナビノイドなど天然物を人為的に生合成した報告は特筆すべき例である。これらの研究から、酵母に限らず高等生物の細胞においても有用天然物の生合成が可能であることが予想され、本法の実現可能性は十分あると考えた。そこで我々は、ヒトの細胞内で天然物生合成遺伝子の機能発現が可能であるか検証した。なお、本研究では癌を対象疾患とした。その理由として、抗腫瘍効果を示す天然物が豊富にあり、また癌関連の細胞株や遺伝子発現プロモーターなど研究に必要なツールが充実しているためである。例えば、テロメラゼ特異的がん治療用

のウイルス製剤テロメラインは、ウイルスの増殖に必要な E1A 遺伝子および E1B 遺伝子を human telomerase reverse transcriptase (hTERT) プロモーター制御下に置くことでがん特異的に腫瘍溶解性 5 型アデノウイルスの発現を実現している。このように、組織・細胞選択的な発現プロモーターを導入することで天然物生合成遺伝子の発現調節ができれば、正常細胞での天然物生合成を防ぐことができ、副作用を低減させることが可能となるだろう。

3. 研究の方法

ヒト培養細胞における糸状菌由来天然物生合成遺伝子の異種宿主発現

3-1. レトロウイルスベクターによる遺伝子導入

Aspergillus fumigatus が産生する fumagillin (1) は methionine aminopeptidase 2 (MetAP2) を選択的に阻害することで血管内皮細胞の増殖を阻害する極めて強力な血管新生阻害剤である (図 2)。日本で開発された TNP-470 を含め、1 の誘導体はがん治療薬として有望であったが、神経毒による副作用や、半減期が短いなど臨床的な制約により開発中止を余儀なくされている。X 線結晶構造解析により、MetAP2 のヒスチジン残基に 1 のエポキシ環が共有結合することで酵素機能が阻害されることが明らかとなっている。1 の生合成酵素の一つである Fma-P450 は、同エポキシ環の形成を担う酸化酵素であり、多段階の酸化反応を経て β -trans-bergamotene (2) を dehydro-demethoxyfumagillol (3) へと変換する (図 2)。さらに 3 は還元酵素である Fma-KR によって demethoxyfumagillol (4) へ変換されるが、fma-TC 及び fma-P450 を異種発現させた *Saccharomyces cerevisiae* では、3 は宿主の内在性還元酵素によって 5-epi-demethoxyfumagillol (5) へ変換される。また、4 は *A. fumigatus* A1159 fma-C6H 株から単離した 6-demethoxyfumagillin(6) を NaOH で加水分解することも単離することが可能である。Cell counting WST-8 を用いた細胞毒性試験では、4 で 48 時間処理したヒト子宮頸がん細胞 HeLa では増殖抑制効果が認められた (図 3A)。また、2 は HeLa 細胞に対して毒性はなく、それに対し 5 は濃度依存的に HeLa 細胞の増殖を抑制した (図 3B)。すなわち、Fma-P450 は無毒の化合物 2 を細胞増殖抑制効果を有する fumagillol 前駆体へと変換するための重要な酵素である。加えて我々の研究グループは世界に先駆けて Fumagillin の生合成機構を解明し、fumagillin 関連の遺伝子や標品など研究室保有のツールが充実していたこともあり、我々はヒトの細胞に導入する天然物生合成遺伝子を fma-P450 とした。

4. 研究成果

宿主とする細胞には、増殖が比較的早く遺伝子導入効率が高い HeLa 細胞を用いた。また、天然物合成遺伝子を培養細胞に導入する方法としては、ウイルスベクターに着目した。ウイルスベクターは培養細胞だけでなく生物個体にも高効率で外来遺伝子を導入できることに加え、近年ではゲノム編集技術と組み合わせて用いられることもあり、遺伝子治療の要となっている。我々は、外来遺伝子を安定的に発現でき、増殖細胞への遺伝子導入実績が豊富なレトロウイルスベクターを選択した。まずタカラバイオ社が提供し

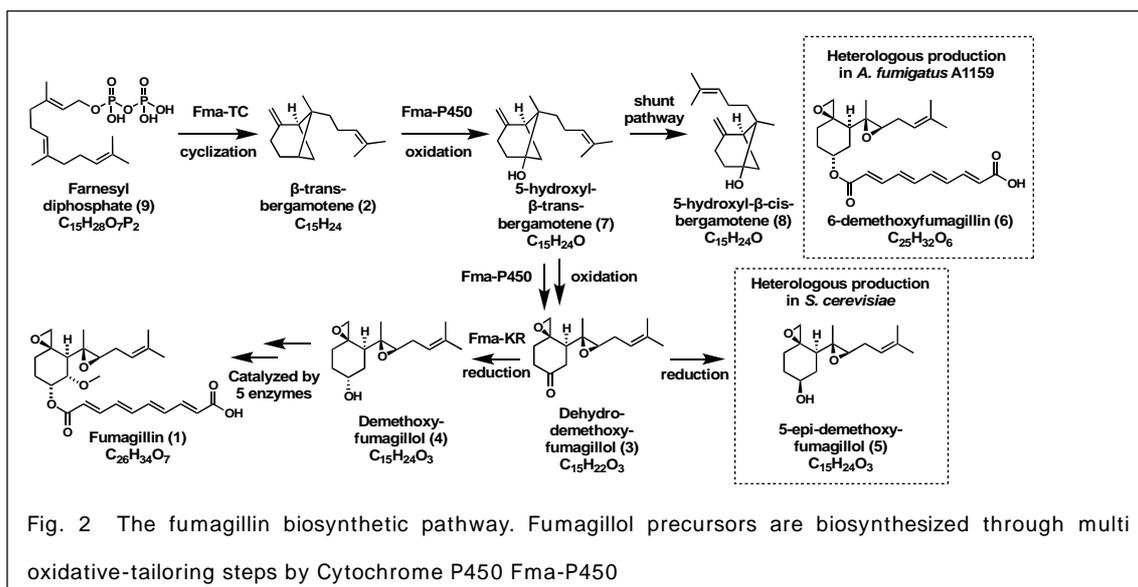


Fig. 2 The fumagillin biosynthetic pathway. Fumagillol precursors are biosynthesized through multi oxidative-tailoring steps by Cytochrome P450 Fma-P450

ている pMSCV-retro virus vector のマルチクローニングサイトにヒトサイトメガロウイルス (CMV)由来のプロモーターと *fma*-P450、SV40 由来ポリ A 付加シグナル (SV40pA)を組み込んだ (図 4A)。同ベクターをウイルス構築に必要な *gag*、*pol*、*env* 遺伝子を搭載したプラスミド (pG vector, pE vector)とともに HEK293T 細胞に導入し、ウイルスベクターを作製した(図 4B)。作製したウイルスベクターを HeLa 細胞に感染させ、G418 を用いた薬剤耐性株の選別により *fma*-P450 発現細胞を獲得した (図 4B)。同細胞株から mRNA を抽出し、RT-PCR (Reverse Transcription PCR) を行った結果、*fma*-P450 が発現していることが確認できた (図 4C)。

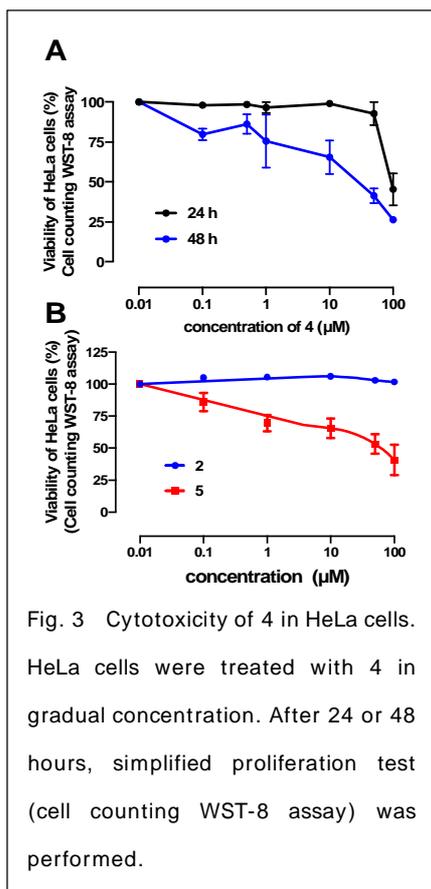


Fig. 3 Cytotoxicity of 4 in HeLa cells. HeLa cells were treated with 4 in gradual concentration. After 24 or 48 hours, simplified proliferation test (cell counting WST-8 assay) was performed.

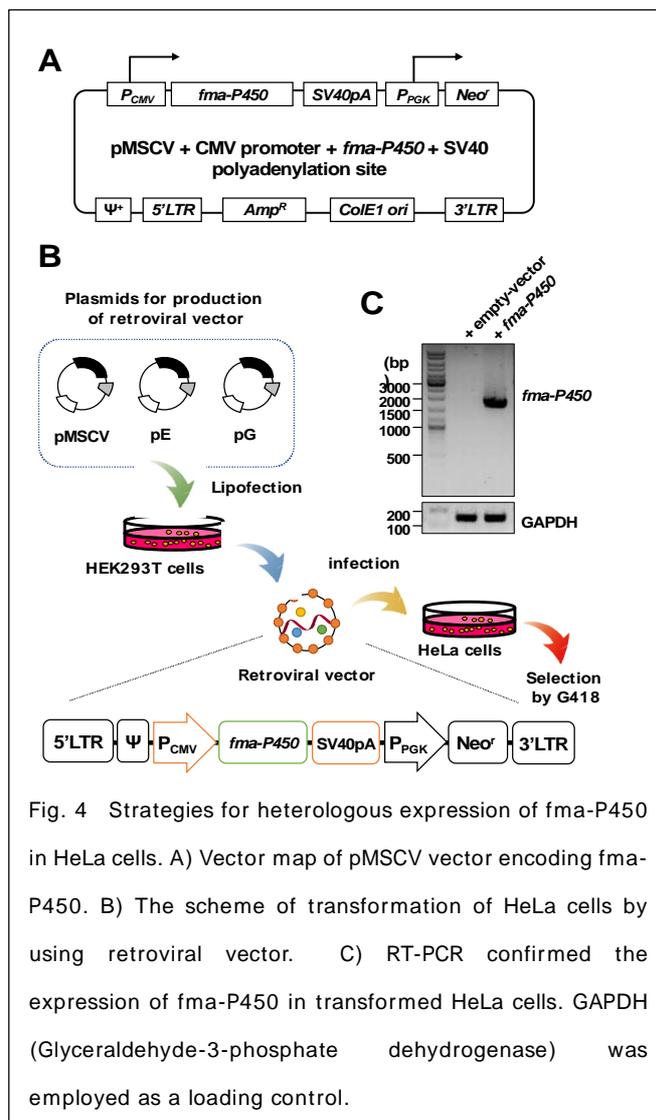


Fig. 4 Strategies for heterologous expression of *fma*-P450 in HeLa cells. A) Vector map of pMSCV vector encoding *fma*-P450. B) The scheme of transformation of HeLa cells by using retroviral vector. C) RT-PCR confirmed the expression of *fma*-P450 in transformed HeLa cells. GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was employed as a loading control.

4-1. Fma-P450 による γ -trans-bergamotene の酸化

fma-P450 を遺伝子導入した HeLa 細胞 (HeLa + *fma*-P450) および空ベクターを導入したコントロール細胞に 100 μ M 2 を添加し、12 時間後に細胞培養液を回収した。酢酸エチルを用いて同培養液から化合物を抽出し、LC-MS および Thermo Scientific Compound Discoverer によるメタボロミクス解析を行った。その結果、HeLa-*fma*-P450 細胞の培養液抽出物中から 5-hydroxyl- γ -trans-bergamotene (7) または 5-hydroxyl- γ -cis-bergamotene (8) の脱水型と予想される分子式 C₁₅H₂₂ の化合物が検出された (図 5)。一方、コントロール細胞からは 7、8 は検出されなかった。そこで、*fma*-TC および *fma*-P450 を発現させた *S. cerevisiae* から 7、8 を単離・精製し、これらを標品として LC-MS 分析を行い、HeLa + *fma*-P450 細胞培養液抽出物中から検出された化合物が 7、8 であるか検証した。その結果、2 と反応後の HeLa + *fma*-P450 細胞培養液から保持時間が異なる 2 つシグナルが観測され、それぞれ 7、8 と保持時間が一致した。(図 5 (vi))。また、大腸菌で発現・精製した *Fma*-P450 を用い、2 を基質とした *in vitro* assay を行った結果、反応液から 7 および 8 が検出され (図 5 (ii))。これらの化合物は *Fma*-P450 による生成物であることが確かめら

れた。さらに、これらの結果を裏付けるために、HeLa + fma-P450 細胞の培養液抽出物から 7 および 8 を精製し、NMR により化合物の存在を確かめることとした。まず、HeLa + fma-P450 細胞を 3 層の平行層を備えた TripleFlask (Thermo Fisher Scientific) で培養し、細胞密度がおよそ 50% に達した時点で 100 μ M 2 を添加した。同フラスコは 200 mL の培養が可能であり、本分析では 5 つのフラスコを同時に使用した。HeLa + fma-P450 細胞と 2 を 12 - 24 時間培養した後、酢酸エチルを用いて 1 L 培養液から化合物を抽出した。また、培養液を取り除いた後も、同フラスコ内には生細胞が接着し生存しているため、再度 2 を含む培地を加えることで、7 および 8 を再び生合成することが可能である。NMR 分析に必要な化合物量を確保するために、上記の手順を 10 度繰り返し、計 10 L の培養液から酢酸エチル抽出物を 1.14 g 得た。2 度のシリカゲルクロマトグラフィーを行った後、7、8 を含む粗精製画分 A 13.4 mg を 1 H NMR により分析した。

その結果、H 5.17、4.66、4.62 ppm に 5 の 11、1、1 位の二重結合に由来するシグナルが検出された。また、7 の 6、7、13、15 位に由来するシグナルおよび、3、4、9、14 位のシグナルの一部も観測された。さらに、粗精製画分 A には H 4.84、0.62、1.15 ppm に 8 の 1、6、15 位と一致する 1 H NMR シグナルも観測された。すなわち、NMR 分析の結果から HeLa + fma-P450 細胞培養液抽出物には 7 および 8 が存在することが確かめられ、ヒトの細胞において天然物生合成遺伝子の機能発現が可能であることが明らかとなった。

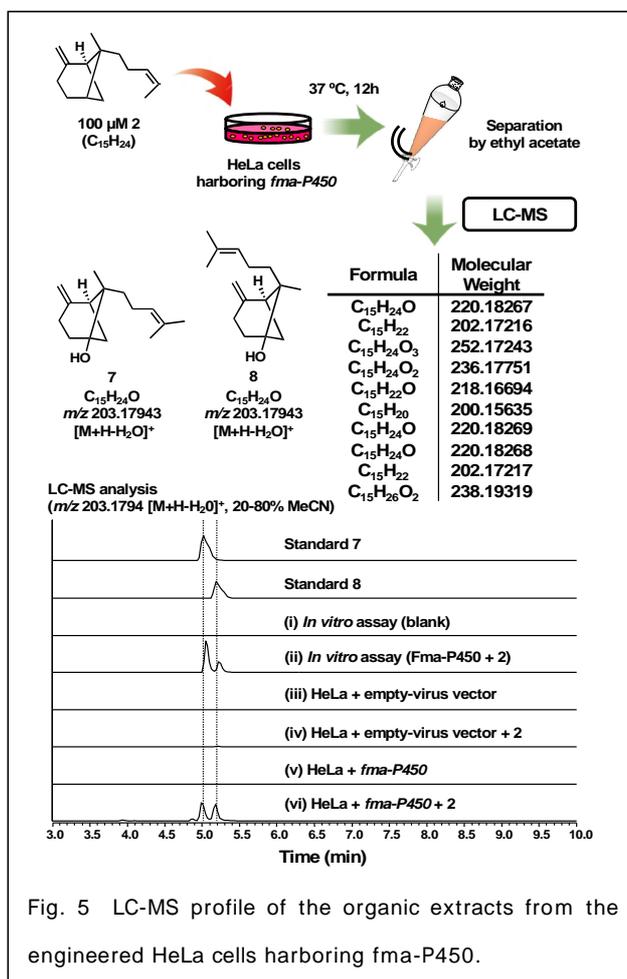


Fig. 5 LC-MS profile of the organic extracts from the engineered HeLa cells harboring fma-P450.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuda Shinya, Tsunematsu Yuta, Matsushita Takuma, Ogata Yuji, Hachiya Shihomi, Kishimoto Shinji, Miyoshi Noriyuki, Watanabe Kenji	4. 巻 23
2. 論文標題 Toward Engineered Biosynthesis of Drugs in Human Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.202100645	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松田真弥、恒松雄太、松下拓磨、尾形勇二、蜂矢志保実、岸本真治、三好規之、渡辺賢二
2. 発表標題 ヒトがん培養細胞における天然物生合成遺伝子の機能発現
3. 学会等名 第23回天然薬物の開発と応用シンポジウム
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 松田真弥
2. 発表標題 ヒト培養細胞を宿主とした抗生物質の生産
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2020年～2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------