

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32511

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15301

研究課題名(和文)腸内細菌を利用した新規抗悪性胸膜中皮腫治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of a novel anti-malignant mesothelioma agent using intestinal bacteria

研究代表者

清水 芳実 (SHIMIZU, Yoshimi)

帝京平成大学・薬学部・講師

研究者番号：70633931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：悪性胸膜中皮腫(MPM)は、予後が悪く、根治に至る治療法は開発されていない。本研究課題では、MPMで過剰発現していることが報告されているメソテリン(MSLN)に着目し、MSLNに結合する一本鎖抗体に毒素を付加させたイムノトキシンを分泌発現する組換えビフィズス菌をMPMに应用する研究を実施した。その結果、イムノトキシンは、MPMに対して細胞傷害活性を誘導することがわかった。また、組換えビフィズス菌は、中皮腫の異種移植モデルにおいて、特異的に腫瘍部位へ集積することがわかった。本研究成果は、MPMに対して、MSLN結合イムノトキシン分泌組換えビフィズス菌が有用であることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビフィズス菌は、整腸作用や免疫調整作用を期待して、医薬品や機能性食品として幅広く応用されている。遺伝子組換え技術を細菌に应用して、細菌を血管内に投与し、抗がん剤として利用する研究が進んでいる。本研究では、難治性の中皮腫に対して、偏性嫌気性細菌であるビフィズス菌の有用性を評価した。ビフィズス菌は、上皮系のがんを集積することが報告されていたが、中皮腫に対する報告はなかった。本研究成果により、中皮腫においてもビフィズス菌が集積することが明らかになった。また、遺伝子組換えビフィズス菌から分泌された分子は、中皮腫に対して傷害活性を有していた。細菌を利用したMPM治療開発の一助になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Bifidobacterium is a strain of anaerobic bacteria that selectively proliferates in solid tumors. It has served as a specific drug carrier of anticancer proteins against malignant tumors. Mesothelin (MSLN) is overexpressed in malignant cancer, including malignant pleural mesothelioma (MPM), pancreatic cancer, and ovary cancer. I evaluated the therapeutic potential of MSLN immunotoxin against MPM using cell line. MSLN immunotoxin significantly suppresses tumor growth. After intravenous injection, gene modified bifidobacterium was specifically localized in the tumor of mice bearing MPM. I suggest that gene modified bifidobacterium is a candidate for MPM treatment.

研究分野：医療薬学、分子生物学

キーワード：ビフィズス菌 薬物送達システム 抗悪性腫瘍薬 悪性胸膜中皮腫 メソテリン 遺伝子組換え技術 偏性嫌気性細菌 がん治療

1. 研究開始当初の背景

2021年、日本での死亡者数は1,439,856人で、そのうち、がんで死亡した人は381,505人(男性222,467人、女性159,038人)で死因第一位となっている。またがん患者の死亡者数は増加傾向にある。がん(悪性腫瘍)とは、腫瘍のうち、無秩序に増殖しながら周囲に浸潤、転移するものことである。男性は肺がん、大腸がん、胃がん、膵臓がん、肝臓がんの順で死亡者が多く、女性は大腸がん、肺がん、膵臓がん、乳がん、胃がんの順が多い。がんの4大療法として手術療法、化学療法、放射線療法、免疫療法が存在する。

悪性中皮腫とは、中皮細胞が悪性化した腫瘍性疾患で発症部位は胸膜が80~85%、腹膜が10~15%、その他の部位での発生は1%以下とされている。発症原因として、欧米男性の78~88%、女性では23~65%の悪性中皮腫症例においてアスベスト(石綿)曝露との関連性を指摘されているように、アスベストは主因の1つとして考えられるが、明らかなアスベスト曝露がなくても発症するという報告もある。悪性中皮腫も他のがんと同様に死亡者数は増加傾向にある。初期は無症状であるが、胸水の増加に伴い胸部圧迫感や労作時呼吸困難が出現し、胸壁に浸潤が始まると胸痛、背部痛を自覚するようになる。また、病気が進行すると体重減少、食欲不振、発熱、寝汗、貧血、血小板増多症、低アルブミン血症などを呈することがある。

メソテリン(以下:MSLN)は分子量40kDaのGPIアンカー型の膜結合型糖蛋白質で正常組織での発現は胸膜、腹膜の中皮に限られる。ほとんどの悪性中皮腫や膵臓がんの他、卵巣がん、非小細胞肺癌、急性骨髄性白血病、時に結腸がん、食道がん、胃がんなどの細胞表面に発現する。

ナノボディーとは、標的抗原に結合する重鎖のみから成る免疫グロブリン(抗体)の可変領域を指す。低分子化抗体の一種で、単鎖抗体、単ドメイン抗体などと呼ばれることもある。アルパカやラクダ、ラマなどラクダ科の哺乳類は、生体内で軽鎖の無く、重鎖のみから成る免疫グロブリンを産生することが知られている。ナノボディーは、抗原に対しては通常の抗体と同様の親和性を有しており、耐酸性や耐熱性に優れ、変性しても生理的条件下にすれば、適切な折り畳み構造が再現され活性が戻る。分子量は12kDaから15kDa程度と小さいため、大腸菌や酵母といった微生物を用いて生産でき、タンパク質工学や化学修飾による機能改変が容易であり、イムノトキシンや抗体薬物複合体(ADC)も作製しやすいことで知られている。

イムノトキシンは、抗体またはリガンドと毒素分子が結合したターゲットトキシンである。標的細胞膜上の抗原またはレセプターを介して細胞内に取り込まれ、毒素分子によりリボソームを不活性化し、標的細胞のみに細胞死を誘導する。*in vivo* および *in vitro* で細胞の機能解析を行うための優れたツールとなっている。

緑膿菌毒素は、偏性好気性グラム陰性桿菌で、シュードモナス科(*Pseudomonadaceae*)、シュードモナス属(*Pseudomonas*)の細菌である緑膿菌が産生する毒素で分子量66.0kDaの単純タンパク質である。真核細胞のEF-2のジフタアミド残基をADPリボシル化することによりタンパク質合成を阻害する作用のある酵素として機能する。緑膿菌毒素は613残基のアミノ酸から構成される1本のポリペプチド鎖より成る。また、 α 、 β 、 γ の3つのドメインから構成される。ドメイン α はアミノ末端1から252残基までと365から404残基までのそれぞれ2つに分断されたペプチド鎖を束ねて作られている。ドメイン β は253から364までの112残基のアミノ酸から成り、連続した6つの α ヘリックス構造を形成している。一部の鎖の間にはジスルフィド結合があり、分子の安定化に役立っているものと考えられている。ドメイン γ は405から613のカルボキシ末端までの209残基アミノ酸で構成され、5個の α ヘリックス構造と6個の β シートから成る。

2. 研究の目的

MSLNに結合する一本鎖VHH抗体を利用して、組換えピフィズ菌の悪性中皮腫に対する有用性の検討を行うことを目的とした。具体的には、VHH抗体に、緑膿菌由来毒素を付加したイムノトキシンを新たに創出し、悪性胸膜中皮腫細胞株に対する感受性を評価した。また、悪性胸膜中皮腫の担癌マウスを作製し、組換えピフィズ菌の集積性を評価した。

3. 研究の方法

抗MSLN VHH抗体1A1と3C2のC末端側に緑膿菌外毒素を付加したイムノトキシン遺伝子を設計し、大腸菌発現用にコドン最適化を行い、遺伝子合成をEurofin社に合成を依頼した。合成した遺伝子を、大腸菌発現プラスミドpET47b(Merck, Kanamycin耐性)に、NdeI/NotIサイトを利用して組換えた。配列の確認は、サンガー法を利用した。

配列を確認したプラスミドを、コンピテント細胞Rosetta2-DE3(Merck)にヒートショック法により遺伝子導入を行った。Kanamycinを終濃度50 μ g/mL含むLB寒天培地に播種し、一晚培養し、コロニーを得た。Kanamycinを終濃度100 μ g/mL含むTB液体培地3mLにシングルコロニーを1クロンピックアップし、一晚培養した。翌日、培地量を500mLに拡大培養し、37 $^{\circ}$ Cで、濁度(OD=600nm)が0.2-0.5になるまで培養し、目的の濁度となったところで、タンパク質誘導試薬Isopropyl- β -D-thio galacto pyranoside(IPTG)を終濃度1mMになるように添加し、25 $^{\circ}$ Cで20時間培養した。培養後、培養液を回収し、6,000 \times gで10分遠心分離し大腸菌を集菌した。集菌したペレットをBinding Buffer(20mM Phosphate, 500mM NaCl, 10mM imidazole,

pH=7.4)10mL 加え、懸濁後、-80 で保存した。凍結した懸濁液を 37 で溶解し、半溶解状態になったのを確認し、ソニケーターBioruptor (BM Bio)で破碎した。この時の出力は「High」で、On/Off をそれぞれ 30 秒、10 サイクル行った。ソニケーションした液を 12,000 × g、10 分間遠心した。上清を回収し、0.45µm PVDF フィルター (Merck, Millex-HV フィルター) でろ過し、Profinia システム(BioRAD)を使い、Ni affinity 精製を行った。精製には、HisTrap HP カラム (Cytiva) と脱塩カートリッジ Bio-Scale Mini Bio-Gel P-6 (BioRAD) を使用した。タンパク質濃度は、超微量紫外可視分光光度計 NanoDrop1000 ND-1000 (ThermoFisherScientific) を用いて測定した。アクリルアミドゲル電気泳動は、ラピダス ミニスラブ電気泳動槽 (AE-6530) を用いて実施した。目的の濃度になるように、PBS (-) で希釈し、2-メルカプトエタノールと NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X) (ThermoFisherScientific) がそれぞれ 10%と 1× なるように加えた。70 で 10 分加温した後、サンプル溶液とした。サンプルをアプライし、マーカーは、タンパク質プレスティンラダーマーカー EzProtein Ladder (ATTO、WSE-7020) を用いた。泳動後、MilliQ 水で一回リンスした後、CBB 染色液 (BioRAD) で 10 分間染色し、脱色液 (5% メタノール/7% 酢酸水溶液) で十分脱色し、ゲルを撮影した。

ELISA プレート (Nunc MaxiSorp, ThermoFisherScientific) 上に、精製したヒト MSLN-his 希釈液 (終濃度 2.0µg/mL) を、100µL/well 添加し、4 で一晩インキュベーションし、プレートに固相化した。溶液を取り除き、ブロッキング溶液として、5.0% skim milk in PBS を 100µL/well 加え、室温で 30 分間静置した。ブロッキング溶液を取り除き、5.0% skim milk in PBS を希釈液として調製したイムノトキシン溶液を、100µL/well 加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、PBS で 1 回洗浄し、5.0% skim milk in PBS で 4,000 倍に希釈した Anti-DDDDK-tag mAb-HRP-DirecT (MBL、M185-7、別名: HRP 標識抗 FLAG 抗体) または、Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Alpaca IgG, VHH domain (Jackson ImmunoResearch, 128-035-232、別名: HRP 標識抗 FLAG 抗体) を 1 時間反応させた。PBS で 4 回洗浄後、1-Step TMB ELISA Substrate Solutions (ThermoFisherScientific) を 100µL/well 加え、発色反応が十分に進行した段階で、反応停止液として 2 M H₂SO₄ を加え、450nm の吸光度をコロナマルチグレーティングマイクロプレートリーダー SH-9000Lab (Corona) で測定した。実験は、N=3 で実施した。

胸膜中皮腫細胞株として、Meso-4 細胞、H226 細胞、211H 細胞を利用した。陰性対照として正常中皮細胞 Met5A を用いた。培地を加えた 100mm dish に各細胞株を播種した。100mm dish の底面一杯になるまで 37 に設定した CO₂ インキュベーターで培養した。培地を取り除き、PBS で 2 回洗浄し、トリプシン/EDTA を用いて細胞を Dish からはがして、回収した。がん細胞数が、50,000cells/tube になるように、1.5mL tube に分取した。イムノトキシンを添加、攪拌し、氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 1 回洗浄後、1.0% BSA-PBS にて希釈した Mouse 抗 His-tag 抗体 (MBL) を添加し、攪拌し氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 1 回洗浄後、1.0% BSA-PBS で希釈した AlexaFluor488 標識 Goat anti-Mouse IgG 抗体を添加、攪拌し、氷上で遮光し、30 分間静置した。0.2% BSA-PBS にて 2 回洗浄後、0.2% BSA-PBS で懸濁した。測定サンプルについて FACS VERSE (BD) にて測定し、FACSuite ソフトウェアにて解析を行った。

96 穴プレートに細胞を 10,000cells/well となるように播種し、一晩培養した。その後、培地を取り除き、希釈したイムノトキシン溶液を添加し、2 日間培養した。培養後、cell counting kit-8 (Dojindo) を加え、十分発色したことを確認した後、プレートリーダーで 450nm の吸光度を測定した。実験は、N=3 で実施した。

ヌードマウス KSN-Slc (雌性) に、Meso-4 細胞をマトリゲル (Corning) に懸濁し、皮下に移植した。腫瘍が十分な大きさになったことを確認した後、蛍光タンパク質 Luciferase 発現組換えピフィズス菌を尾静脈内投与にて投与を行った。投与量は 1.0 × 10⁸ cells/mice とした。投与 4 日後に、*In vivo* イメージング装置 IVIS-Lumina で発光を検出した。

4. 研究成果

本研究を通して、MSLN に対する C 末毒素型 PE23 付加イムノトキシン (1A1-PE23、3C2-PE23) を精製することができた。ELISA による結合性評価では精製した C 末毒素型 PE23 付加イムノトキシンにおいて抗 FLAG タグ抗体、抗 VHH 抗体で結合性を確認できた。また、イムノトキシンの胸膜中皮腫細胞株に対する結合性を FACS 解析で評価したところ、イムノトキシン高結合株 (Meso-4、H226) とイムノトキシン低結合株 (211H と Met5A) があることが分かった。細胞毒性試験では MSLN が高発現している H226 細胞、Meso-4 細胞に対して作製した C 末毒素型 PE23 付加イムノトキシンが高い細胞障害性を持つこと、MSLN の発現のない 211H 細胞や正常中皮細胞である Met5A 細胞に対しては細胞障害性を持たないことを確認することができた。今回作製した C 末毒素型 PE23 付加イムノトキシンは、予備検討で作製したジフテリア毒素を用いたイムノトキシンと比べて、MSLN に対する結合力の差はなかったが、細胞傷害活性は大きく向上していた。また、組換えピフィズス菌は、異種移植モデルマウスにおいて、腫瘍部位に特異的に集積することを明らかにした。結論として本研究で作製した C 末毒素型 PE23 付加イムノトキシンは、中皮腫に対する有用な創薬シーズ分子となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水 芳実、菊本 裕子、古川 祥平、磯田 勝広、平 裕一郎、平 郁子、石田 功
2. 発表標題 抗メソテリン-VHH抗体のイムノトキシン化と中皮細胞株に対する細胞傷害活性の評価
3. 学会等名 第95回日本生化学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水 芳実、常行 航平、古川 祥平、磯田 勝広、平 裕一郎、平 郁子、石田 功
2. 発表標題 抗メソテリン-VHH抗体の性状解析とがん細胞株を用いた評価
3. 学会等名 第143年回日本薬学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水 芳実、篠原 華穂、佐藤 泰成、磯田 勝広、平 裕一郎、平 郁子、石田 功
2. 発表標題 メソテリンの立体構造を認識する抗メソテリン-VHH抗体の精製と性状解析
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水 芳実、古川 祥平、氏家 丈瑠、平 郁子、磯田 勝広、平 裕一郎
2. 発表標題 膵臓がん細胞株に対する抗MSLN VHHイムノトキシンの有用性評価
3. 学会等名 第96回日本生化学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水 芳実、平 裕一郎
2. 発表標題 組換えピフィズス菌を利用した抗がん剤開発
3. 学会等名 第2回日本抗体学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 清水芳実、深澤征義、執筆他99名、技術情報協会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 602
3. 書名 創薬研究者がこれだけは知っておきたい最新のウイルス学	

1. 著者名 清水 芳実、平 裕一郎	4. 発行年 2023年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 88
3. 書名 BIO Clinica 2023年 11月臨時増刊号 遺伝子診療ホットトピックス	

〔産業財産権〕

〔その他〕

帝京平成大学 抗体DDSユニット https://pharm.thu.ac.jp/research/unit/dds.html

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