

令和 4 年 7 月 11 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460173

研究課題名(和文) 一本鎖抗体VHHによる抗生物質医薬品リバイバル補助薬の開発

研究課題名(英文) Adjuvant heavy-chain antibody drug for antibiotics

研究代表者

石田 功 (ISHIDA, Isao)

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号：00415556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤排出口細胞外突出部のLoop1およびLoop2に結合する一本鎖抗体(4P94, 4P41)をファージディスプレイ法により取得し、それらの1～3量体を大腸菌で生産し、ProteinA、HisTrap、LPS除去カラムを使用して精製した。4P94、4P41の1～3量体をコリスチンと併用した場合に、緑膿菌(通常菌PAO-1、多剤耐性菌nalB、NCGM2.S1)に対するコリスチンのMIC(最小生育阻止濃度)が1/2～1/4まで低下することを見出した。コリスチンの副作用として腎障害と神経障害が知られており、これらの抗体の併用により、臨床における副作用を軽減できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、多剤耐性菌の薬剤排出システムを抑制する一本鎖VHH抗体を補助薬に使用して、病原細菌の耐性化によって使用できなくなっている抗生物質医薬品を有効な抗菌薬としてリバイバルさせようというもので、実現できれば我が国の保健医療政策に大きな経済効果を及ぼすと期待される。

研究成果の概要(英文)：Heavy chain antibodies (4P94 and 4P41) which bind with the Loop1 and Loop2 of the OprM (consisting a multi-drug resistant pump) existing outside of the outer membrane, have been isolated by using the M13-phage display method, respectively. The mono, di and trimers of the Heavy chain antibodies were designed and produced in *E. coli*. Those antibodies were purified with Protein A, His-Trap and Endotoxin-Trap columns. When *Pseudomonas aeruginosa* (drug sensitive PAO-1, multi-drug resistant nalB and NCGM2.S1) were treated with colistin together with those antibodies, MIC (minimum growth-inhibition concentration) of the colistin decreased to a half to one fourth of the MIC with colistin alone. The side effects for the colistin-treatment in the clinical setting were known to be kidney and neurological failures. Co-treatment of colistin with those antibodies is anticipated to reduce the side effects.

研究分野：分子生物学

キーワード：耐性菌 ポンプ 抗菌薬

1. 研究開始当初の背景

緑膿菌は黄色ブドウ球菌とともに臨床材料から最も高頻度に分離される細菌で、敗血症、肺炎、慢性気道感染症、胆道感染症、皮膚軟部組織感染症、眼科領域感染症など、多彩な感染症の原因となっている。腸管などに定着している緑膿菌によって抵抗力減弱患者の日和見感染、病院内での院内感染がしばしば発生する。近年、抗菌力の強い薬剤全てに耐性を示す多剤耐性緑膿菌が大きな問題となってきた。新規で有効な抗菌薬が開発されても、直ぐに耐性菌が出現して効かなくなってしまうため、製薬企業による新規抗生物質開発のモチベーションは低下している。

本研究は、多剤耐性菌の薬剤排出システムを抑制する一本鎖 VHH 抗体を補助薬に使用して、病原細菌の耐性化によって使用できなくなっている抗生物質医薬品を有効な抗菌薬としてリバイバルさせようというもので、実現できれば我が国の保健医療政策に大きな経済効果を及ぼすと期待される。

2. 研究の目的

本研究は、病原細菌の耐性化によって使用できなくなっている抗生物質医薬品に焦点を当て、一本鎖抗体を抗生物質補助薬として利用して、このような医薬品を有効な抗菌薬としてリバイバルさせる技術開発を目標とする。具体的な研究計画では、本邦において主要な院内感染の原因菌である多剤耐性緑膿菌に焦点を当て、本菌の薬剤排出システムの細胞外開口部突出ループに対する一本鎖抗体（3量体）によって薬剤排出開口部を架橋して排出機能を抑制することで既存の抗菌薬への感受性を高める抗生物質補助薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

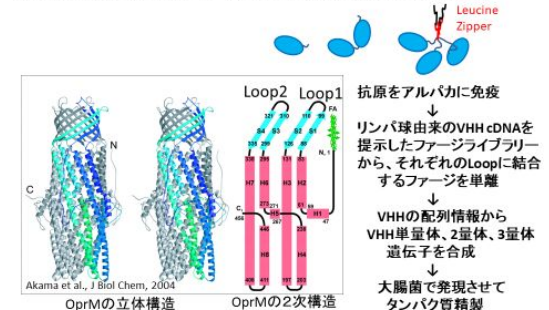
本研究では、緑膿菌の薬剤排出システ

ムの細胞外開口部突出ループに対する一本鎖 VHH 抗体（3量体）によって薬剤排出開口部を架橋して排出を抑制することで、耐性菌の既存の抗菌薬に対する感受性を高める抗生物質補助薬の開発を目指す。

(1) 排出口細胞外突出部の 2 種の部分ペプチド (Loop1、Loop2) に特異的に結合する一本鎖 VHH 抗体の取得

図 1 の Loop1、Loop2 のペプチドに前後の配列 5 アミノ酸を加えたペプチド配列の C 末に Cys を付加したペプチドを化学合成して、キャリアタンパク質のアミノ基に結合させた抗原を作製して、それぞれの抗原をアルパカに免疫して、抗体価が上昇したところでリンパ球を採取した。

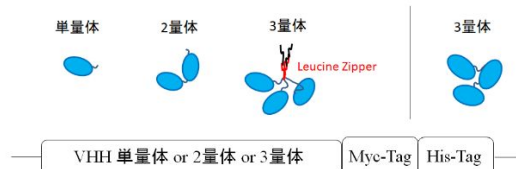
図1 抗原のデザイン
排出口のループ(10アミノ酸)に前後の配列5アミノ酸を加えたペプチドのC末にCysを付加し、キャリアタンパク質に結合させて抗原を作製



リンパ球から Total RNA を抽出して、一本鎖抗体 VHH プライマーを使って PCR 増幅を行い、pCANTAB ベクターに挿入して VHH 抗体ファージディスプレイライブラリーを作製した。ライブラリーからキャリアタンパク質のみに結合せず、ペプチドコンジュゲートに結合するファージクローンを単離した。単離したファージクローンの VHH 抗体遺伝子配列情報を基に、C 末に MycTag-HisTag を付けた VHH 抗体遺伝子配列を大腸菌発現用にデザインし化学合成した。3量体は、MycTag-HisTag の前につけた Leucine Zipper 配列を付加して作製した。2量体はグリシンセリン (GS) リンカーによって、直列に繋いだ

ものを作製した。(図2)組換えタンパク質に混入してくるエンドトキシン(LPS)は、EndoTrap カラムにより除去し、LPSのELISA法(EndLISA)で混入しているエンドトキシン量を定量した。

図2 抗Loop1(4P94)、抗Loop2(4P41)VHH抗体



(2) ELISAによる抗 Loop1 抗体、抗 Loop2 抗体の結合特異性確認

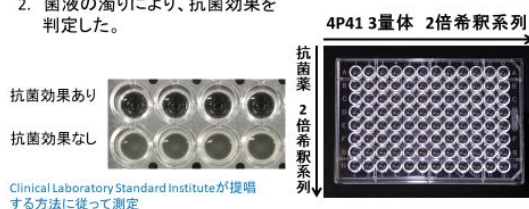
イムノプレート固相に、キャリアタンパク質、Loop ペプチド・キャリアタンパク質コンジュゲート、Loop ペプチドのみを固定して、抗 Loop1 抗体(4P94)、抗 Loop2 抗体(4P41)の結合特異性を確認した。二次抗体として、抗 Myc-Tag 抗体-HRP を使用した。

(3) 緑膿菌株に対する抗菌薬の MIC(最小生育阻止濃度)の測定と抗体併用効果による MIC 低下効果の検討

緑膿菌は、PAO-1 株(通常株)、nalB 株(OprM 高発現株多剤耐性株)、NCGM2.S1 株(高度多剤耐性株)を使用した。マイクロプレートに、段階希釈した抗菌薬と抗体、ミューラーヒントンブrossを加え、緑膿菌株を $2\sim 8 \times 10^5$ CFU 添加して、37、16 時間培養した。

図3 抗Loop2(4P41)VHH 3量体と抗菌薬の併用による緑膿菌の増殖抑制効果(微量液体希釈法)

1. マイクロプレートに、段階希釈した抗体と抗菌薬、ミューラーヒントンブrossを加え、多剤耐性緑膿菌(NCGM2.S1株、nalB株)及び通常の緑膿菌(PAO-1株)を $2\sim 8 \times 10^5$ CFU/ml 加えて、37°Cで16~20時間培養した。
2. 菌液の濁りにより、抗菌効果を判定した。



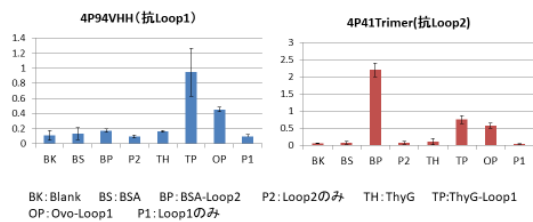
nalB 株、NCGM2.S1 株はそれぞれ、研究協力者である良原栄策准教授(東海大工)

切替照雄教授(元国立国際医療センター研究所、現順天堂大医)から譲渡された。図3に示すように、菌の濁りの目視により、MIC 値を測定した。

4. 研究成果

大腸菌可溶性画分から、それぞれ HisTrap、ProteinA カラムによって精製した抗 Loop1 抗体(4P94-単量体)と抗 Loop(4P41-3 量体)を使って、ELISA で抗体の結合特異性を調べた。(図4)

図4 抗Loop1(4P94)、抗Loop2(4P41)VHH抗体のELISA



4P94 VHH抗体はLoop1ペプチドに、4P41 VHH抗体はLoop2ペプチドに結合した。

4P94 VHH 抗体は Loop1 ペプチドに、4P41 VHH 抗体は Loop2 ペプチドに特異的に結合した。

抗 Loop2 抗体(4P41-3 量体)を使って、各種抗菌薬の併用による緑膿菌増殖抑制効果を図3に示す微量液体希釈法を用いて行った。

テスト抗菌薬として、ペニシリン系、モノバクタム系、ニューキノロン系、カルバペネム系、アミノグリコシド系、ペプチド系薬を使用した。(表1)

表1に各種抗菌薬と4P41-3 量体との併用による MIC 低下効果を示した。

表1 抗Loop2(4P41) VHH 3量体と抗菌薬の併用による緑膿菌の増殖抑制効果(微量液体希釈法)

株	4P41 3量体 (10μg/ml)	最小発育阻止濃度MIC(μg/ml)						
		アミカシン	ゲンタマイシン	オフロキサシン	スルベシリン	アストレオナム	コリスチン	
多剤耐性緑膿菌	NCGM2.S1	-	128	32	64	>256	64	1.6
	+	128	32	64	ND	64	0.8→0.2 (1/4)	
	nalB	-	2	2	2	64	8	1.6
通常の緑膿菌	PAO-1	-	ND	ND	0.5→0.5	ND	ND	0.8→0.4 (1/2)
	+	-	1	16			1.6	

4P41 VHH 3量体はコリスチン以外の抗菌薬のMICを低下させなかった。

4P41-3量体とペプチド系薬コリスチンの併用時のみ、コリスチンの MIC (最小発育阻止濃度 μg/ml) のみが低下した。OprM 高発現株の nalB では、PAO-1 株、NCGM2.S1 株に比べて低下効果が弱かった。組換え大腸菌から生産・精製した組換えタンパク質には、多量のエンドトキシン (LPS) が混入している可能性があり、混入している LPS がコリスチンの効果に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。4P41-3 量体サンプルを EndoTrap カラムを用いて、エンドトキシンを除去し、EndLISA (LPS の ELISA 定量法) によって、検出限界以下になっていることを確認した。

LPS を除去前と除去後の 4P41-3 量体を用いて、併用時のコリスチンの MIC 低下効果を見た。(表 2)

表2 抗Loop2 (4P41) VHH 3量体による緑膿菌のコリスチンMIC 低下とLPSの影響(液体培地)希釈法

抗体	抗体濃度	LPS濃度	コリスチンMIC
4P41 3量体	10μg/ml	1845.2 EU/ml	0.8μg/ml→0.2μg/ml (1/4)
4P41 3量体	10μg/ml	検出限界以下	0.8μg/ml→0.2μg/ml (1/4)

・多剤耐性緑膿菌 (NCGM2.S1株) とコリスチン、抗体を用いて微量液体希釈法を行った。

LPSを除去した抗体併用時にも、コリスチンMICは1/4低下した。

抗体サンプルに混入している LPS はコリスチンに結合して、コリスチンの効果を低下させる可能性があったが、影響するほどの量はなかったと判断された。

4P41-単量体、-2 量体のコリスチン MIC 低下効果も調べた。(表 3)

表3 抗Loop2 (4P41) VHH抗体とコリスチンの併用による多剤耐性緑膿菌(NCGM2.S1株)の増殖抑制効果(微量液体希釈法)

抗体	抗体濃度	コリスチンMIC
4P41 単量体	10μg/ml	0.8μg/ml→0.4μg/ml (1/2)
4P41 2量体	10μg/ml	0.8μg/ml→0.4μg/ml (1/2)
4P41 3量体	10μg/ml	0.8μg/ml→0.2μg/ml (1/4)

4P41 VHH 3量体とコリスチンの併用で、コリスチンMICが0.8μg/ml から0.2μg/mlに低下した。

→臨床におけるコリスチンの副作用低減(腎毒性)に役立つ可能性

単量体、2 量体では、コリスチン MIC 低下効果は弱かった。

次に、抗 Loop1 抗体 (4P94-単量体、3 量体) の併用時におけるコリスチン MIC 低下効果を調べた。(表 4)

本実験でも、エンドトキシン除去操作を行った。

表4 4P94VHHとコリスチンの併用による多剤耐性緑膿菌 (NCGM2.S1株)の増殖抑制効果の測定

抗体	抗体濃度	コリスチンMIC
4P94 単量体 4P94 3量体	0.31~1.25μg/ml	1.6μg/ml→0.8μg/ml (1/2)
	2.5~5μg/ml	1.6μg/ml→0.4μg/ml (1/4)
	10~20μg/ml	0.8μg/ml→0.4μg/ml (1/2)

4P94 VHH抗体とコリスチンの併用で、コリスチンMICが最大で1/4低下した。単量体と3量体では差が見られなかった。

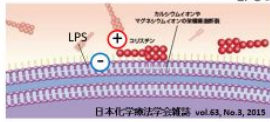
抗 Loop1 抗体の 4P94 では、単量体、3 量体で併用時におけるコリスチン MIC 低下効果に差がなかった。

また、他の抗菌薬との 4P94 の併用効果は、4P41 と同様に効果はなかった。(データ未表示)

考察と今後の展開

ペプチド系抗菌薬のコリスチンは、緑膿菌外膜にあるエンドトキシン (LPS) に結合して、外膜を不安定化して殺菌作用を示す。(図 5)

図5 抗Loop2 (4P41) VHH 3量体による緑膿菌のコリスチンMIC低下とLPSの影響



- ・ コリスチンは、エンドトキシン(LPS)との親和性が高い
→LPSの作用を中和
- ・ 大腸菌で精製した抗体に含まれるLPSがコリスチンの抗菌活性に影響を及ぼす可能性がある。

抗体中のLPS濃度

・ 抗体中のLPSをEndoTrap®で除去後、LPS濃度をEndoZyme®で測定した。

	LPS除去前	LPS除去1回	LPS除去2回
4P41 3量体 (ProteinA カラム)	1845.2 EU/ml	0.048 EU/ml	検出限界以下
4P41 単量体 (ProteinA カラム)	344.9 EU/ml	1.7 EU/ml	
4P94 単量体 (HisTrap カラム)	1638.8 EU/ml	検出限界以下	
4P94 3量体 (HisTrap カラム)	15503.7 EU/ml	0.765 EU/ml	

薬剤排出システムの排出口の細胞外ループに抗体が結合すると、外膜の流動性が変化して、コリスチンの効果が向上するのかもしれない。

組換え大腸菌から生産・精製した抗 Loop 抗体には、多量のエンドトキシン (LPS) が含まれ、コリスチンの抗菌作用に何らかの影響を与える可能性が考えられたが、エンドトキシン除去の有無で、抗体によるコリスチン MIC の低下効果に差がなかったことから、混入している LPS 量ではコリスチンの抗菌作用に影響するほどの量ではなかったと判断された。

コリスチンは緑膿菌、大腸菌、アシネトバクター属、クレブシエラなどのグラム陰性菌に殺菌作用を示す。主な副作用は腎障害と神経障害で、腎障害は用量依存的に発現頻度が高まることが知られており、発現頻度は20%とする文献もある。OprMの細胞外ループに結合する一本鎖抗体の併用療法は、臨床におけるコリスチンの副作用(腎毒性)を軽減できる可能性がある。

今後、マウス、カイコでの緑膿菌感染モデルを用いて、インビボでの効果を示したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Ohno KM, Kirikae T, Yoshihara E, Kirikae F, Ishida I.

Addition of L-cysteine to the N- or C-terminus of the all-d-enantiomer [D(KLAKLAK)₂] increases antimicrobial activities against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli*. Peer J. Nov.30, 2020. 査読有

Taira Y, Taira I, Ishida I. Development of the anti-cancer drug with the recombinant Bifidobacteria as the drug delivery system(DDS). Yakugaku-Zasshi, 138, 923-930, 2018. 査読有

Isoda K, Daibo T, Yushina K, Yoshikoba Y, Tsutsumi Y, Akimoto Y, Kawakami H, Taira Y, Taira I, Yanoshita R, Nishimura T, Ishida, I. Hepatotoxicity, nephrotoxicity, and drug/chemical interaction toxicity of platinum in mice. Pharmazie 72, 10-16, 2017. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

加藤雅和、平裕一郎、平郁子、清水芳実、磯田勝広、斎藤浩美、石田功「TNF-発現・分泌組換えビフィズス菌のマウス悪性黒色腫モデルを用いたがん免疫療法への応用検討」日本薬学会第138年会、金沢、2018年3月。

清水芳実、榎本健太、磯田勝広、平裕一郎、平郁子、斎藤浩美、石田功「ビフィズス菌の蛋白質発現向上に向けたプロモーターの探索と体内動態解析」日本薬学会第138年会、金沢、2018年3月。

西川毅、平裕一郎、平郁子、斎藤浩美、磯田勝広、石田功「TRAIL-R1を標的とした新規3価VHHを分泌するビフィズス菌によるがん治療」日本薬学会第136年会、横浜、2016年3月。

平裕一郎、西川毅、平郁子、Akter Jesmin、磯田勝広、斎藤浩美、石田功「抗 TRAIL 受容体アゴニスト一本鎖抗体 発現・分泌ビフィズス菌の抗腫瘍効果の解析」日本DDS学会第31回、東京、2015年7月。

西川毅、平裕一郎、平郁子、斎藤浩美、磯田勝広、石田功「細胞死誘導抗体を分泌するビフィズス菌を利用したがん治療」日本薬学会第135年会、神戸、

2015年3月.

〔図書〕(計 1件)

平裕一郎、平郁子、石田功「先端バイオ医薬品への応用開発～ナノDDS、リポソーム、表面修飾、プロドラッグなどの最新技術への具体的応用」技術情報協会、2017年6月.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：VHH抗体

発明者：大野まき、石田功、切替照雄

権利者：帝京平成大学、順天堂大学

種類：特許

番号：特願 2021-203699

出願年月日：2021.12.15.

国内外の別：国内

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://pharm.thu.ac.jp/research/unit/dds.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田功 (ISHIDA, Isao)

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号：00415556