

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510151

研究課題名(和文) バイオテック・マテリアルを生み出す細菌の解析と応用

研究課題名(英文) An analysis of bacteria, which produce 'Biotech-materials'

研究代表者

笠井 智成 (Kasai, Tomonari)

岡山大学・自然科学研究科・講師

研究者番号：30530191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細菌が地下水中の鉄イオンを酸化して作る、チューブ状の酸化鉄(L-BIOX)を洗浄・滅菌して、ヒト肝臓癌由来細胞株、ヒトグリオーマ由来細胞株、ヒト乳がん由来細胞株、マウスiPS細胞の培養液中に添加すると、細胞塊を効率良く形成し、細胞塊内部で壊死が生じないことが判り、三次元細胞培養基材への応用に成功した。また、薬剤送達システム(DDS)に応用するためのリガンドタンパク質や抗がん剤、リボソームを検討した。

研究成果の概要(英文)：We developed an application for 3D cell culture substrate using amorphous iron oxide (L-BIOX). This culture system should be a promising the production of proteins. On the other hand, to develop the application for drug delivery system, we studied protein ligands and anti-cancer drugs for targeting the cancer cells.

研究分野：生物工学

キーワード：三次元細胞培養 ドラッグデリバリーシステム 酸化鉄マイクロチューブ ヒト癌由来細胞株

1. 研究開始当初の背景

地下水中(中性 pH)の鉄イオンを酸化して、チューブ状の酸化鉄を作るレプトスリックス属菌やマンガンイオンを酸化してツボ状のマンガン酸化物を作るシデロカプサ属菌には、その代謝産物と考えられる金属酸化物は観察されながら菌体の単離同定に至っていない細菌が数多く存在する (Emily J. Fleming et al. PLoS ONE. 2011,6(3), e17769, Falamin A. et al. Microbiology. 2006, 75(2),180-185)。

私達は地下水浄水場からえられた金属酸化物の詳細な解析結果から、これらの金属酸化物は結晶構造を持たずに結合していることや新規セラミックス素材として利用価値が高いこと、人工合成することがほぼ不可能であることを見出した (Hashimoto H. et al. 2008, Proceedings of 2nd International Congress on Ceramics, Verona, June 29-July 4, 6-P011. Suzuki T. et al. 2011, Appl. Environ. Microbiol. 77 (9), 2877-2811)。私達は、常温常圧、中性 pH で生産されたレプトスリックス属菌が作り出す酸化鉄を「バイオジナス酸化鉄 (BIOX:Biogenous Iron Oxide)」と名付けた。

BIOX と培養細胞の親和性が高いことを見出した。接着系の培養細胞は通常、培養皿の底面に一層に付着した状態で培養するが、金属やケイ素を素材とした粒子を混合することで細胞が塊状となって成長することを促進する。細胞塊形成を促す素材の開発は多方面で行われているが、培養に適した粒子を形成するためには高温処理や pH の調整が必要である (Na Liu et al. 2011, Materials Chemistry Physics. 130, 1016-1021)。細胞塊 (spheroid) の形成(三次元培養)は細胞間シグナル伝達や細胞分化を促進するので、再生医療に向けた培養試験や組織細胞との比較試験にも重要である (Glauco R. Souza et al. 2010, Nature Nanotech. 5,291-296)。研究開始当初、細菌などの微生物が作り出す自然由来の金属酸化物を加熱などの加工なしで三次元培養に応用した例は殆ど報告されていなかった。

2. 研究の目的

(1) 新規セラミックス合成に適した細菌の単離

地下水中(中性 pH)の鉄イオンを酸化して、チューブ状の酸化鉄を作るレプトスリックス属菌やマンガンイオンを酸化してツボ状のマンガン酸化物を作るシデロカプサ属菌には、その代謝産物と考えられる金属酸化物は観察されながら菌体の単離同定に至っていない細菌が数多く存在し、また、それらの酸化物の中には、結晶構造を持たずに結合したアモルファスな構造物が存在することが判ってきた。さらに、比表面積が非常に大きいなど、新規セラミックス素材とし

て利用価値が高い物質や、人工合成することがほぼ不可能である物質が存在することが判ってきたので、それらの菌を単離することで、新規セラミックスの合成を目指すことを目的とした。

(2) 新規バイオティク・マテリアルの培養基材への応用

細胞間シグナル伝達や細胞分化を促進するの三次元培養に適した素材や培地の開発は多方面で行われてきた。培養に適した粒子を形成するためには高温処理や pH の調整が必要である。本研究では最近が産生する酸化鉄を加熱などの加工を行わずに、細胞の三次元培養基材として応用することを目的とした。

(3) バイオティク・マテリアルのドラッグデリバリーシステム (DDS) への応用に向けた検討

BIOX の表面にがん細胞を能動的にターゲティングする分子を呈示することでドラッグデリバリーシステムへの応用が可能となると考えた。がんを標的する分子の設計や探索と評価、がん細胞の応答などを調べ、DDS への応用可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新規セラミックス合成に適した細菌の単離

金属の酸化を指標に、保存している菌マットおよび、地下水を利用した培養槽から希釈平板法やトランスウェルを利用した培養法による単離を進めた。単離した菌が生産する BIOX は結晶性 (TEM 観察)、表面構造 (SEM 観察)、元素分析 (EDX 解析) によって構造の特徴を解析して、菌を選抜した。

(2) 新規バイオティク・マテリアルの培養基材への応用

細胞塊を形成させて培養することで、細胞分化シグナルやタンパク質分泌を促進する培養法を検討した。タンパク質の分泌量をウエスタンブロット法や ELISA 法によって確認、定量し、細胞とバイオティク・マテリアルの量を最適化した。また分化促進シグナルについてマイクロアレイ解析によって、細胞接着の機構解析を試みた。さらに、加熱処理した BIOX を用いることで、細胞接着性の向上を期待した。

(3) バイオティク・マテリアルの DDS への応用に向けた検討

セラミックス上にタンパク質や化合物を呈示する方法としては、シランカップリング剤を用いて結合させることを予定した。予備試験の結果から、ポルフィリンを結合させた BIOX では in vivo イメージングが

可能であることが判ってきた。

新規ナリガンドタンパク質を設計して、がんを特異的に効率良く標的し、増殖を抑制する方法を検討した。さらに、がんが抗体薬に耐性を持つ仕組みの一部を解明して、抗体薬に耐性の有無に関わらず、がんを攻撃できるDDSを考察して、BIOXを用いたがん治療薬開発に向けた足がかりを得ることを目的とした。

4. 研究成果

(1) 新規セラミックス合成に適した細菌の単離

細菌が生成する酸化鉄を SEM, STEM, EDX を用いて解析したところ、中空でナノメートルサイズのカプセル状粒子やマイクロメートルサイズのチューブ状物質が観察され、これらを効率的に生産する細菌を単離した。この内、チューブ状酸化鉄を生産する1種類の菌を新たに単離できたため、16S rDNA 解析や、大量培養法の検討、チューブ状酸化鉄の構造解析を進めている。この菌が生産する酸化鉄は集積培養系のBIOXと同様に表面が滑らかで、直線状のチューブ構造を形成していた。今後、この菌を用いて純粋培養系での安定した材料供給が期待できる。

(2) 新規バイオティク・マテリアルの培養基材への応用

ヒト肝臓がん由来細胞株 HepG2 細胞をチューブ状酸化鉄 L-BIOX の存在下で培養した場合、培養 10 日後には非常に大きな細胞塊を形成することを明らかにした。さらに、大きな細胞塊形成によって肝臓細胞の分化マーカーの一つである血清アルブミンの分泌量が顕著に亢進し、通常の接着培養と比較して3倍以上に達することを明らかにした。また、L-BIOX の用量依存性を試験した結果から、1 mg/ml の濃度での添加が最適であることが判った。

加熱処理(300 °C, 500 °C, 700 °C, 800 °C)をした L-BIOX を 1mg/ml の濃度で培地に添加して、HepG2 細胞を培養すると、700 °C で細胞塊直径が最大となった。一方、人工の 2-line ferrihydrite、および L-BIOX から鉄を除去した L-シリカチューブでは細胞塊の形成が認められなかった。800 °C で加熱処理した L-BIOX では細胞塊形成を全く促進しなかったことから、チューブ状構造、表面のシリカ、多孔質構造、の3点が細胞親和性と巨大な細胞塊形成に非常に重要な要素であることが強く示唆された。

L-BIOX を添加して細胞塊を形成した場合の細胞の応答を調べるために、通常の接着培養、非接着培養(L-BIOX 非添加)、L-BIOX を添加した非接着培養の各条件で HepG2 細胞を2週間培養して、RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。細胞および細胞間接着、酸化ストレスなどに着目して、それぞ

れに関わると報告されているタンパク質をコードする遺伝子の発現を調べると、L-BIOX を添加した場合には、接着培養と非接着培養(L-BIOX 非添加)の間であることが判った。L-BIOX を用いた三次元培養は細胞へのストレスを低減できると考えられるので、L-BIOX を基軸として様々な用途に適応した培養基材を開発する可能性が広がった。

(3) バイオティク・マテリアルの DDS への応用に向けた検討

リガンド分子として、がん細胞を標的とする目的で、クロロトキシタンパク質にヒト IgG の Fc ドメインを融合したタンパク質(CTX-Fc)の単量体と二量体をそれぞれ作成して精製し、ヒトグリオーマ由来細胞(A172)を用いて標的効果を確かめると、単量体は標的分子特異的に細胞内へと取り込まれることが明らかとなった。さらに、ヒト膵臓がん由来細胞(PANC-1)に対する効果を調べた。CTX-Fc は PANC-1 の遊走や浸潤を阻害すること、細胞内に取り込まれること等が明らかとなった。

また、多くの乳がん細胞表面に発現している ErbB2 を標的分子とする抗体医薬品であるトラスツズマブに耐性となる機構の一つを明らかにした。さらに、リガンド分子を多価で提示することで、細胞内に取り込ませる薬剤を作成できる可能性を示した。

今後の L-BIOX を用いた DDS 開発に向けて、意義が大きい結果を得られた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計13件)

Nair N, Kasai T, Seno M. Bacteria: prospective savior in battle against cancer. *Anticancer Res.* 2014 Nov;34(11):6289-96. Review. 査読有

Shigehiro T, Kasai T, Murakami M, Sekhar SC, Tominaga Y, Okada M, Kudoh T, Mizutani A, Murakami H, Salomon DS, Mikuni K, Mandai T, Hamada H, Seno M. Efficient drug delivery of Paclitaxel glycoside: a novel solubility gradient encapsulation into liposomes coupled with immunoliposomes preparation. *PLoS One.* 2014 Sep 29;9(9):e107976. doi: 10.1371/journal.pone.0107976. eCollection 2014. 査読有

El-Aarag BY, Kasai T, Zahran MA, Zakhary NI, Shigehiro T, Sekhar SC, Agwa HS, Mizutani A, Murakami H, Kakuta H, Seno M. In vitro anti-proliferative and anti-angiogenic activities of thalidomide dithiocarbamate analogs. *Int Immunopharmacol.* 2014 May

21;21(2):283-292. doi:
10.1016/j.intimp.2014.05.007. 査読有
El-Ghlban S, Kasai T, Shigehiro T, Yin HX,
Sekhar S, Ida M, Sanchez A, Mizutani A,
Kudoh T, Murakami H, Seno M.
Chlorotoxin-Fc Fusion Inhibits Release of
MMP-2 from Pancreatic Cancer Cells.
Biomed Res Int. 2014;2014:152659. doi:
10.1155/2014/152659. Epub 2014 Jan 6. 査
読有
Sekhar SC, Kasai T, Satoh A, Shigehiro T,
Mizutani A, Murakami H, El-Aarag BY,
Salomon DS, Massaguer A, de Llorens R,
Seno M. Identification of caveolin-1 as a
potential causative factor in the generation
of trastuzumab resistance in breast cancer
cells. J Cancer. 2013 Jun 21;4(5):391-401.
doi: 10.7150/jca.6470. Print 2013. 査読有
Kasai T, Nakamura K, Vaidyanath A,
Chen L, Sekhar S, El-Ghlban S, Okada M,
Mizutani A, Kudoh T, Murakami H, Seno
M. Chlorotoxin Fused to IgG-Fc Inhibits
Glioblastoma Cell Motility via
Receptor-Mediated Endocytosis. J Drug
Deliv. 2012;2012:975763. doi:
10.1155/2012/975763. 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

Shigehiro T, Kasai T, Mizutani A,
Murakami H, Mikuni K, Mandai T,
Hamada H, Seno M. Anti-cancer activity of
immunoliposomes encapsulated effective
amount of glycosylated paclitaxel with
novel loading strategy. American
Association for Cancer Research Annual
Meeting 2014. San Diego, CA. USA, 2014.
04. 5-9. (査読有、ポスター発表)
EL-Ghlban S., Kasai T., Kanao S.,
Mizutani A., Murakami H., Seno M.
Chlorotoxin-Fc fusion inhibits release of
MMP-2 from pancreatic cancer cells
(PANC-1). 第 36 回 日本分子生物学会年会、
2013 年 12 月 3 日 ~ 2013 年 12 月 6 日、神戸
(査読有、ポスター発表)
Tomoda Y., Kasai T., Miyawaki Y.,
Hashimoto H., Suzuki T., Kudoh T.,
Takada, J. Seno M. A new three
dimensional culturing system to obtain
scarce proteins and peptides. 第 35 回日本
分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日 ~
2012 年 12 月 14 日、福岡(査読有、ポスタ
ー発表)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cyber.biotech.okayama-u.ac.jp/senolab/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

笠井 智成 (KASAI, Tomonari)

岡山大学・大学院自然科学研究科・講師

研究者番号 : 30530191

(2)研究分担者

2013 年 ~ 2015 年

妹尾 昌治 (SENO, Masaharu)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号 : 90243493

2012 年 ~ 2013 年

橋本 英樹 (HASHIMOTO, Hideki)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号 : 60579556