

機関番号：17104

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790523

研究課題名 (和文)

癌細胞特異的に作用する微生物由来毒素による癌細胞認識機構の解明

研究課題名 (英文)

Mechanism of cancer cell specific recognition by microbiological toxin

研究代表者

日下 雅友 (MASATOMO KUSAKA)

九州工業大学・情報工学部・支援研究員

研究者番号：30529102

研究成果の概要 (和文)：

Parasporin-2 (PS2) は、*Bacillus thuringiensis* が封入体として産生し、特定のがん細胞に細胞障害性を示す微生物性タンパク質である。我々は、新規抗がん剤候補として PS2 の可能性を評価する為、PS2 に蛍光標識を行いマウス生体への投与を試みた。PS2 の挙動を評価する為、マウス肺癌由来細胞 KLN205 細胞を皮下移植した坦癌マウスに標識 PS2 を尾静脈から投与した。投与後 24 時間で標識 PS2 は、坦癌組織のみで観察された。このことは、PS2 が癌組織のみに集積する可能性を示す。

研究成果の概要 (英文)：

Parasporin-2 (PS2) is a *Bacillus thuringiensis* inclusion protein that intensively reacts *in vitro* with human hepatoma and colon cancer cells. Here we tried to trace for Parasporin-2 *in vivo*, using Alexa488 fluorescent labeled parasporin-2. Then, Alexa488-labeled parasporin-2 was intravenously injected to subcutaneously inoculated mice with KLN205 cell, derived from mouse lung cancer cell line. we could observe fluorescence from Alexa488-labeled parasporin-2 only from transplanted tumor tissue. Thus, our primal results on anti-tumor toxin *in vivo* may contribute to new therapeutic application by Bt toxin on medical field.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：応用薬理学

キーワード：微生物毒素、抗癌作用

1. 研究開始当初の背景

Bt 菌結晶性蛋白質である PS-2 は、培養癌細胞特異的に作用し、溶血作用を持たない新規の Cry 蛋白質が同定された。特に、Bt 菌 A1547 株から産生される新規 Cry 蛋白質である、PS-2 が単離され、立体構造が X 線構造解析により決定された。PS-2 は、細胞膜上のラフトに集積し、ラフトにおいて GPI アンカー蛋白質の関与により多量体形成を行なう。多量体 PS-2 は、細胞膜へ挿入されることで細胞膜障害を誘起する。現在、PS-2 に結合する蛋白質は報告されていない。PS-2 の癌細胞特異的細胞認識に関わる分子機構を明らかにすることは、現在未解明である PS-2 の作用機序を解明する糸口となると同時に、PS-2 を用いた抗癌剤研究の重要な基礎研究として期待されている。

2. 研究の目的

我々の研究グループは、世界に先駆けて PS-2 の抗癌剤としての可能性を見出した。標識 PS-2 は、体内の癌組織への薬剤など有用物質の正確なデリバリーと、微量癌組織検索のツールとしての開発が見込まれる。そこで、我々は、PS2 の機能を維持した標識 PS2 を作成し、生体内での挙動を明らかにすることで、ドラッグデリバリーキャリア、あるいは、分子プローブとしての可能性の評価を行った。

(1). 研究の方法

①タンパク質の精製

大腸菌 BL21 あるいは BL21-AI 株に pET28a に PS-2 を組み込んだプラスミドを形質導入し、一晚振とう培養したのち BL21 は、Lysis buffer (10mM Tris-HCl (pH7.5), 50mM KCl, 1mM EDTA, 0.1mM DTT, 1mM PMSF) に回収した。BL21-AI 株を用いる場合は、一晚培養後、10 倍量の LB 培地に希釈後 1 時間培養し、Arabinose および IPTG を加え 4 時間培養後に回収を行った。ソニケーションによる菌体破碎後、遠心し沈殿にアルカリ可溶化 buffer (10mM

Tris-HCl (pH8.0), 0.1mM PMSF, 50mM Na2CO3) を入れ 37°C で 1 時間インキュベーションした。再度、遠心を行い、上清を回収 (S1) し、アルカリ可溶化 buffer を再び加え同様に上清を回収した (S2)。S1 および S2 は、アルカリ可溶化 buffer で 3 倍に希釈したのち、Ni-SepharoseTM6 Fast Flow を添加し、室温で一晩攪拌した。その後、空カラムへ樹脂を詰め、Washing buffer により樹脂を洗浄し、Elution buffer を用いて、タンパク質の溶出を行った。次に、ProteinaseK を添加し、PS-2 を活性化した後、陰イオン交換カラム HiTrap Q-Sepharose FF にタンパク質を添加した。washing buffer (200mM NaCl) で洗浄後、Elution buffer (500mM NaCl) を流し、タンパク質を回収、最終精製物とした。

②細胞による細胞障害活性測定

PS-2 高感受性細胞として、ヒト肝癌由来細胞 HepG2、および、マウス肺癌由来細胞 KLN206 を用いた。PS-2 低感受性細胞としてヒト子宮頸癌由来細胞 Hela を使用した。

まず、96well plate をもちいて、1well あたり 1×10^4 細胞を $100 \mu\text{l}$ の Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) に 10% Fetal bovine Serum, Antibiotics を添加し、5% CO₂, 37°C 環境下で 24hr 培養した。PS-2 を段階希釈したのちさらに 24 時間培養した。その後、MTS 試薬を添加後、2 時間培養したのちに 490nm における吸光度を測定して細胞の生存率を算出した。

③Oligomer 化の検出

24well plate をもちいて、1well あたり 1×10^4 細胞を $100 \mu\text{l}$ の Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) に 10% Fetal bovine Serum, Antibiotics を添加し、5% CO₂, 37°C 環境下で 24hr 培養した。PS-2 を 1ng/ml 添加し、1 時間培養後、cell lysis buffer (10mM Tris-HCl (pH8), 50mM

Na2CO3, 0.1% Triton X-100)を用いて細胞を溶解後回収し、等量の SDS-page Sample buffer を加え電気泳動の試料とした。10% Acrylamide gel で電気泳動した後、PVDF 膜へ転写し、4%Skim milk で blocking 後、PS-2 抗体を一晩反応させた。TBST で洗浄したのち、HRP 標識抗ウサギ抗体を1時間反応させ、ECL を用いて検出を行った。

④PS-2 の蛍光標識

100mM PS-2 溶液を HCl を用いて pH7 付近に調整後 10mM C5Maleimide-Alexa488 を添加し、暗所にて一晩反応させた。精製には Hi trap Q-Sepharose FF を用いた。equibartion buffer (20mM Tris-HCl (pH8.0)) で平衡化した。Sample は、Loading buffer (20mM Tris-HCl (pH8.0), 100mM NaCl) を用いて5倍に希釈したのち、Q-Sepharose FF へ添加した。Loading buffer で希釈したのち、elution buffer (20mM Tris-HCl (pH8.0), 500mM NaCl) で標識蛋白質を回収した。

⑤ がん動物への蛍光標識 PS-2 投与

10cm dish を用いて、10% Fetal bovine Serum, および Antibiotics を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) で、5% CO2, 37°C 環境下で 24hr 培養した。がん作成には、一匹当たり、3x10⁶ 個の細胞を皮下移植し、約1週間の予備飼育を行い、がん組織を 5x5mm (長径 x 短径) まで成長させたのち実験に用いた。

Alexa488 標識された PS-2 10ug を PBS に溶解後、尾静脈より投与された。比較対象には PBS をもちい、投与後 24 時間飼育したのち、蛍光実体顕微鏡を用いて、蛍光観察を行った。

4. 研究成果

(1) PS-2 部分欠失体の癌細胞への影響

① 変異導入

PS-2 に存在する唯一の Cysteine は、その立体構造上内部へもぐりこんでいる。そこで、Cysteine と側鎖が異なるだけの Serine に置

き換えた。標識効率の向上を期待し、蛋白表

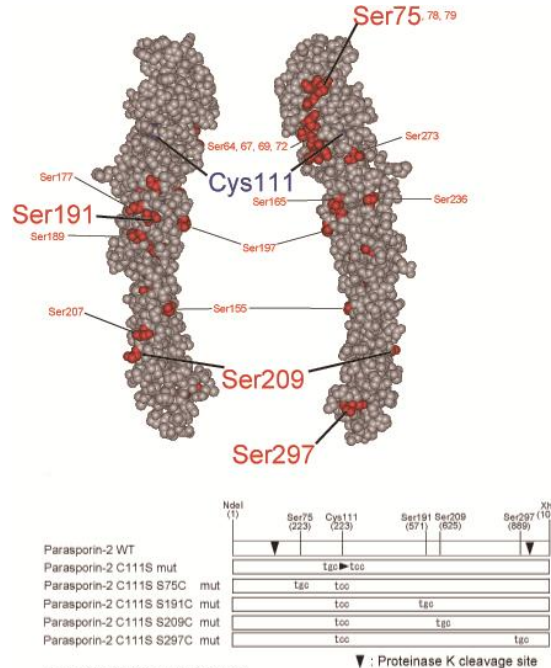


Fig.1 Parasporin-2 への変異導入

面に露出している Ser75、Ser191、Ser209、Ser297 の4か所を新たに Cysteine へ置き換えた。これにより、Cysteine のチオール残基へ蛍光色素のマレイミド基を結合させ蛋白の標識を試みた。(Fig.1)

② PS-2 の変異導入による抗腫瘍効果の確認

PS-2 感受性細胞である肝臓癌由来細胞 HepG2 へ各変異体を作用させ、膜への結合への影響を確認した。その結果、S191C、及び S209C 変異体は HepG2 細胞膜上で Oligomer 形成が低下していた。その他の変異体は野生型と同様に Oligomer 形成が観察された。(Fig.2)

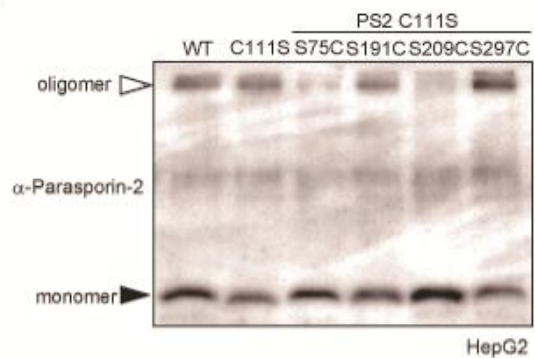


Fig.2 変異型 Parasporin-2 の HepG2 細胞への作用

次に、PS-2 の細胞毒性活性を見るために、HepG2 細胞へ変異体 PS-2 を作用させたのち、ミトコンドリアの呼吸活性を測定し、細胞の生存率として比較した。(Fig3) その結果、変異体 PS-2 は、野生型と比較して、細胞毒性に著しい変化は認められなかった。

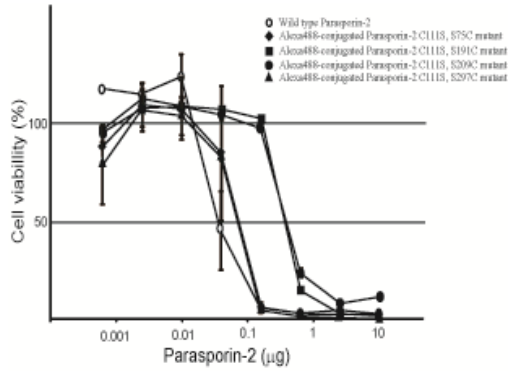


Fig.3 Parasporin-2 の HepG2 細胞に対する細胞毒性
これらの結果から、分子表面の Ser の Cys への置換は、PS-2 の生理活性に影響を与えなかった。そこで、これらの変異体に蛍光標識をこころみた。

(2) PS-2 の蛍光標識

マウス生体内での PS-2 の挙動を明らかにするために、PS-2 への蛍光標識を行い PS-2 の生理活性に対する影響を調べた。

変異型 PS-2 の分子表面上への蛍光標識は、Fig. 4 に示すように期待通り標識が行われた。

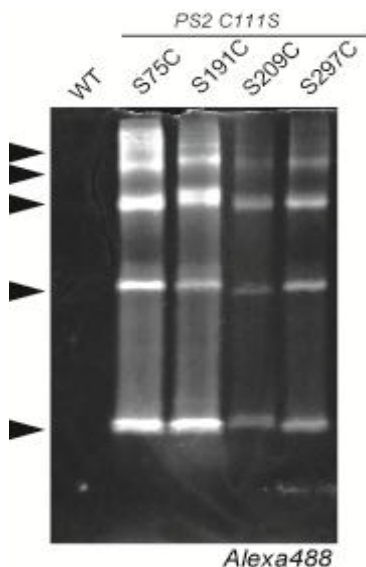


Fig.4 蛍光標識された Parasporin-2 の確認
黒矢頭は、自己凝集した Parasporin-2 を示している。

これらの標識 PS-2 の蛍光標識による生理活性の影響がないかを未標識 PS-2 と同様に調べてみた。その結果、標識された PS-2 は、野生型と同様の生理活性を持っていることが示された。

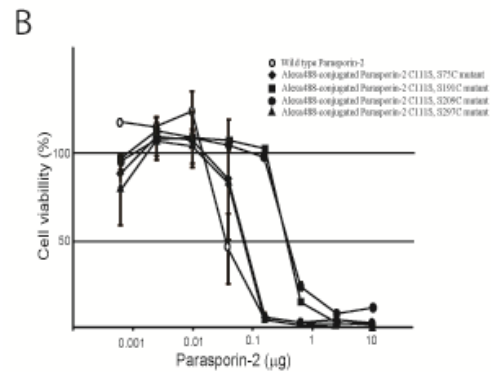
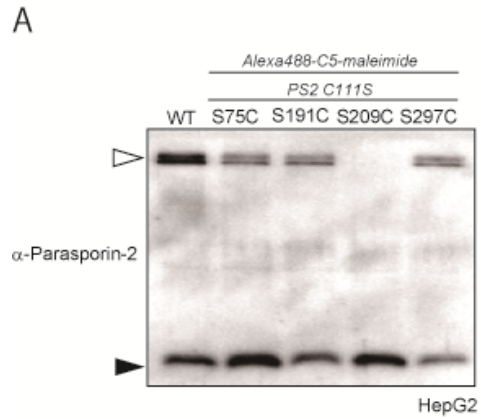


Fig.5 蛍光標識 Parasporin-2 の HepG2 への影響
A:HepG2 細胞へ蛍光標識 Parasporin-2 を作用させ、細胞膜への結合性を調べた。B:HepG2 へ蛍光標識 Parasporin-2 を作用させたのち、MTS アッセイを用いて細胞の生存率を調べた。

(3) 細胞膜へ結合した PS-2 の細胞選択性と蛍光強度の確認

蛍光標識された PS-2 が結合した細胞において、野生型で見られる癌細胞選択性が維持されているかを感受性細胞 HepG2 細胞および、低感受性細胞である HeLa 細胞を用いて検討してみた。(Fig. 6) その結果、HepG2 細胞の細胞表面に明らかな蛍光が十分な蛍光強度で観察された。それに対し、低感受性細胞である HeLa 細胞では、PS-2 の蛍光はほとんど観察されなかった。これらの一連の予備実験の結果より、蛍光標識 PS-2 は、野生

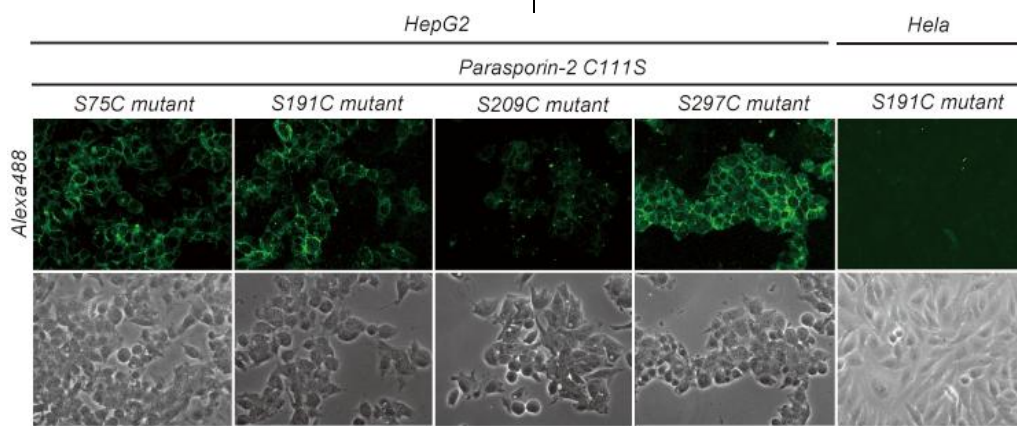


Fig.6 蛍光標識 Parasporin-2 による細胞認識

各標識 Parasporin-2 を感受性細胞である HepG2 および低感受性細胞 Hela 細胞に作用させ蛍光顕微鏡を用いて直接蛍光の観察を行った。

型同様の生理活性と細胞認識性を維持していることが確認された。また、標識 PS-2 による蛍光の強さは十分に実験に使用できる程度の強度であることも明らかになった。

(4) PS-2 のマウス生体内における挙動

PS-2 は、培養細胞を用いた実験から、特定の癌細胞に選択的に結合し、正常な組織由来の細胞には作用しないことが分かっている。そこで、実際の生体内において同様の性状を示すかを検討する為に、今回作成した蛍光標識 PS-2 を HepG2 同様、PS-2 感受性であることが分かっている KLN205 細胞を移植した肝癌マウスに尾静脈投与しその挙動を観察してみた。

マウスに癌細胞を移植後 1 週間程度維持し、確実に癌組織が定着した肝癌マウスを実験に用いている。蛍光標識 PS-2 を尾静脈より投与した後、24 時間後にマウスを実体蛍光顕微鏡を用いて観察してみた。(Fig. 7) その結果、蛍光標識 PS-2 は、24 時間で肝癌組織への集積が確認された。その際、周辺組織での蛍光が観察されなかったことは、蛍光標識 PS-2 は、マウス生体内においても癌組織への選択性を維持していることを示している。次に、他の臓器への集積を確認する為に、主要な臓器における PS-2 による蛍光を観察してみた。(Fig. 8) その結果、他の臓器における PS-2 による蛍光は実体顕微鏡を用いた観察では認められなかった。詳細に検討する

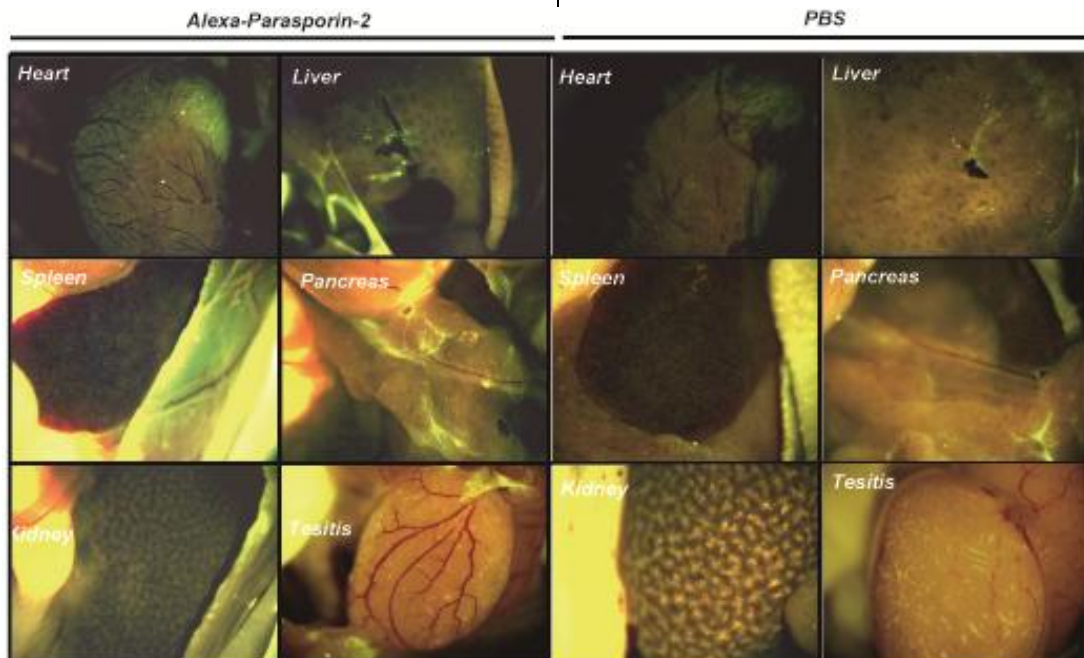


Fig.8 蛍光標識 Parasporin-2 の肝癌以外の組織への影響

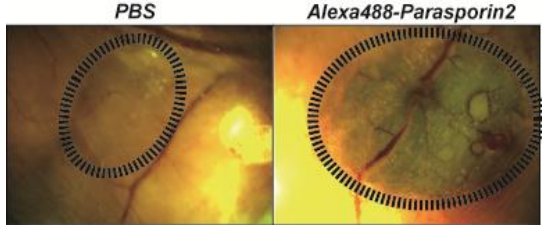


Fig.7 蛍光標識 Parasporin-2 の坦癌組織への集積
破線は、坦癌部位を示している。

為に薄切片を作成し比較を行ったが、坦癌組織と同様の蛍光を示す組織は確認できなかった。(data not shown)

この観察により、蛍光標識 PS-2 の培養組織で観察された特定のがん細胞への選択性が、マウス生体内でも同様に観察された。主要な臓器における顕著な Parasporin-2 の集積が認められないことから生体内においても癌組織特異的な認識が行われていると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 4 件)

① 日下雅友、北田有美子、北田栄., 抗癌性微生物毒素 Parasporin-2 の KLN206 坦癌移植マウスにおける生体内挙動., 第 4 回パラスポリン研究会、2010 年 11 月 27 日、岡山

② 大林隆志、北田有美子、日下雅友、北田栄., パラスポリン-2 の結腸がん細胞移植マウスに対する抗腫瘍効果., 第 4 回パラスポリン研究会、2010 年 11 月 27 日、岡山

③ Masatomo Kusaka, Yumiko Kitada, and Sakae Kitada, In vivo localization of antitumorigenic toxin parasporin-2 labeled with a fluorochrome in tumorous implantation model mice., 第 82 回 日本生化学会 2009 年 10 月 24 日、神戸

④ Takashi Obayashi, Yumiko Kitada, Masatomo Kusaka, and Sakae Kitada., Anti-tumor effect of bacterial toxin parasporin-2 for model mice implanted colon cancer cells., 第 82 回 日本生化学

会 2009 年 10 月 24 日、神戸

〔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

6. 研究組織

研究代表者

日下 雅友 (Kusaka Masatomo)

九州工業大学 情報工学部 支援研究員

研究者番号 : 30529102