

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500427

研究課題名(和文) ボツリヌス毒素の腸管吸収機構を利用した新規薬物送達システムの開発

研究課題名(英文) The development of novel drug delivery systems based on the mechanism for intestinal absorption of botulinum toxins

研究代表者

山本 由弥子 (YAMAMOTO YUMIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20403496

研究成果の概要(和文)：ボツリヌス神経毒素(抗原性によりA-G型に分類)は、食餌性中毒を引き起こす過程において腸管より吸収されなければならない。本研究では、ボツリヌス毒素の腸管吸収機構を利用した新規の薬物送達システムを開発するために、A型ボツリヌス毒素複合体を構成する無毒成分HAを指向性リガンドとして表面に結合させた薬物内包リポソームを作製した。また、腸管吸収機構が未解明のE型ボツリヌス毒素について、神経毒素のHcドメイン(E-Hc)が腸管細胞への結合に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In food-borne botulism, the orally ingested botulinum neurotoxins, which could be classified into seven types (A to G) based on their antigenicity, must be absorbed from the small intestine. In this study, we produced the liposomes modified with HA, which is a non-toxic component of the type A botulinum toxin complex, in order to develop novel intestine-targeted drug delivery systems. On the other hand, we showed that the type E botulinum toxin might bind to the intestinal cells via the Hc domain of neurotoxin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：ボツリヌス毒素、腸管、薬物送達

1. 研究開始当初の背景

タンパク質医薬品がその市場を拡大する一方で、その投与は依然として注射により行

われており、患者さんに苦痛や負担を強いている。タンパク質医薬品の経口投与が可能になれば、患者さんのQOLが著しく向上するこ

とは言うまでもないが、それを困難にしているのは、消化管のタンパク質分解酵素の作用である。

ところで、ボツリヌス菌 *Clostridium botulinum* は極めて強力な神経毒素(7S 毒素: 抗原性により A-G 型に分類) を産生し、ヒトや家畜に食餌性中毒を引き起こす。食品中では、ボツリヌス神経毒素は無毒成分と結合して、12S 毒素 (7S 毒素に赤血球凝集活性を示さない無毒成分 NTN_H が結合)、16S 毒素 (12S 毒素に赤血球凝集素 HA が結合)、19S 毒素 (16S 毒素のダイマー) の progenitor 毒素として存在する。経口摂取された分子質量約 150 kDa のタンパク質であるボツリヌス神経毒素が血行性にシナプスや神経筋接合部に作用し麻痺を引き起こす過程において、ボツリヌス毒素は消化液の作用を免れ、腸管より吸収されなければならない。無毒成分には神経毒素の保護作用があることが古くから知られていたが、申請者の研究室では、無毒成分のうち HA1、HA3b サブコンポーネントが、(1) 小腸上皮細胞上のガラクトースやシアル酸に結合し、(2) 神経毒素の腸管吸収を亢進させるという、HA の多面的な機能などを明らかにして、HA の腸管ターゲティング薬物送達システムへの応用の可能性を示した。他方、E 型と F 型ボツリヌス菌には HA のない 12S 毒素しか存在せず、E 型と F 型ボツリヌス毒素の腸管からの吸収機構は未解明のままである。

2. 研究の目的

HA の腸管ターゲティング薬物送達能を検証するために、HA を用いたドラッグデリバリーシステムを作製し、*in vitro* および *in vivo* の系において評価することを目的とする。

また、HA を利用しない腸管へのドラッグデリバリーシステムの開発も目指して、E 型ボ

ツリヌス毒素の腸管吸収機構の一端を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 薬剤内包リポソームの作製

① A 型ボツリヌス菌 62A ΔNTN_H 変異株からの HA 複合体の精製

純度の高い HA 複合体を大量に得るため、ボツリヌス神経毒素と NTN_H の遺伝子発現が抑制された A 型ボツリヌス菌 62A ΔNTN_H 変異株から HA 複合体を精製した。

62A ΔNTN_H 変異株の培養液を酸沈殿、プロタミン処理、硫酸沈殿に供した後、SP-Toyopearl 650S 陽イオン交換カラムと HA1 がガラクトースに結合することを利用したラクトースゲルアフィニティークラムにより精製した。

② HA リコンビナントタンパク質の作製

HA は、HA1、HA2、HA3a、HA3b の 4 つのサブコンポーネントより構成される。このうち HA1 と HA3b が小腸上皮細胞への結合に重要な役割を果たしている。そこで、pGEX-6P-3 ベクターと pET-32 Ek/LIC ベクターを用いて、A-C 型 HA1 および HA3 (HA3b) リコンビナントタンパク質を発現するためのコンストラクトを作製した。大腸菌内で GST 融合または His 融合 HA タンパク質を大量発現させた後、グルタチオンアフィニティークロマトグラフィーまたは Ni-キレートアフィニティークロマトグラフィーで精製した。

(2) E 型ボツリヌス毒素の Caco-2 細胞に対する結合性の解析

① 毒素の精製

E 型ボツリヌス菌 E-岩内株より、E 型 12S 毒素を精製した。次いで、12 毒素をアルカリ条件 (pH 8.0) におくことにより 7S 毒素と NTN_H に解離させて、DEAE-陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで 7S 毒素と NTN_H を精製した。

また、A型ボツリヌス菌 62A 株より、A型 16S/19S 毒素と 12S 毒素を精製した。次いで、16S/19S 毒素をアルカリ条件 (pH8.0) におくことにより 7S 毒素と無毒成分を解離させた後、ラクトースゲルカラムクロマトグラフィーで 7S 毒素を精製した。

② Caco-2 細胞への結合実験

24-well プレートに培養した Caco-2 細胞 (ヒト結腸癌由来) に、各毒素を添加して、4°C で 1 時間反応させた。細胞を PBS (pH 6.5) で洗浄した後、SDS-PAGE サンプルバッファーに溶解して、SDS-PAGE と western 解析により細胞に結合した毒素を検出した。検出されたバンドは、Image Gauge Ver. 4.0 で定量化された。

4. 研究成果

(1) 薬剤内包リポソームの作製

指向性リガンドとして A 型ボツリヌス菌 62A Δ NTNH 変異株から精製した HA 複合体 (HA1, HA2, HA3a, HA3b) または A 型 HA1 リコンビナントタンパク質を HSA (ヒト血清アルブミン) を介して表面に結合させた薬物 (シスプラチン) 内包リポソームを作製した。平均粒子径 195 nm のリポソーム表面に HA 複合体または HA1 が結合していること、リポソームから薬物の流出がないことを確認したので、今後は、これらのリポソームをマウスに経口投与して、HA 結合リポソームの腸管への集積、リポソーム上の HA の小腸上皮細胞への結合、薬剤の血中移行性等を解析して、HA の腸管ターゲティング薬物送達能を検証する予定である。また、トランスウェルに培養した Caco-2 細胞を用いた *in vitro* の系でも HA の薬物送達能を評価するとともに、HA や薬物の細胞内吸収後の動態を解析する予定である。さらに、今回精製した他の血清型の HA サブコンポーネントについてもリポソームを作製して、腸管ターゲッテ

ィング能を比較検討したい。

(2) E 型ボツリヌス毒素の Caco-2 細胞に対する結合性の解析

E 型ボツリヌス毒素の Caco-2 細胞への結合性を解析するにあたり、先ず、対照として A 型 7S 毒素、12S 毒素、16S/19S 毒素の Caco-2 細胞への結合性を調べた。HA が毒素の腸管吸収に重要であるというこれまでの結果と一致して、HA-positive の 16S/19S 毒素のみが Caco-2 細胞に結合、7S 毒素と 12S 毒素では細胞への結合を検出できなかった。神経毒素重鎖のバンドの濃さから算出された 16S/19S 毒素の結合量は、最終濃度 50、100、200 nM でそれぞれ 1.74 pmol、2.55 pmol、4.38 pmol であった。

次いで、A 型と同様の条件で E 型 7S 毒素と 12S 毒素の結合性を解析したところ、両毒素とも Caco-2 細胞に結合できるが、7S 毒素の方が 12S 毒素よりも約 5 倍高い結合性を示すことが明らかとなった。そして、無毒成分 NTNH 単独では Caco-2 細胞に結合しないことも明らかとなった。さらに、それぞれの毒素を E 型 7S 毒素神経細胞結合ドメイン (E-Hc) に対する抗体とプレインキュベーションしたところ、7S 毒素の Caco-2 細胞への結合は約 50% 阻害されたが、12S 毒素の結合は全く阻害されなかった。これらのことから、E 型では、7S 毒素の Hc ドメインが腸管細胞への結合に重要な役割を果たしており、7S 毒素が NTNH と複合体を形成することにより、結合ドメインの一部が覆われる可能性が示唆された。ところで、E 型 7S 毒素は、トリプシンの作用により 50kDa の軽鎖と 100kDa の重鎖に切断されて (ただし両鎖は S-S 結合により連結)、活性が数百倍上昇する。そこで、トリプシン処理を行った 7S 毒素と 12S 毒素についても Caco-2 細胞に対する結合性を解析したが、未処理の場合と同様、7S 毒素の方が

12S 毒素よりも高い結合性を示した。

今後は、腸管細胞上の E 型毒素のレセプターの同定を行うとともに、NTNH の役割、腸管細胞吸収後の毒素の動態などを解析して、E 型ボツリヌス毒素の腸管吸収機構の全貌を明らかにしたい。

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 11 件)

- ① Fatmawati NN, Sakaguchi Y, Suzuki T, Oda M, Shimizu K, Yamamoto Y, Sukurai J, Matsushita O, and Oguma K. Phospholipase C produced by *Clostridium botulinum* type C and D: comparison of gene, enzymatic, and biological activities with those of *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Acta Med. Okayama* 67: 9-18, 2013. 査読有
- ② Zhang K, Yamamoto Y, Suzuki T, Yokota K, Ma S, Fatmawati NN, and Oguma K. *Clostridium botulinum* type E toxins bind to Caco-2 cells by a different mechanism from that of type A toxins. *Acta Med. Okayama* 66: 253-261, 2012. 査読有
- ③ Yokoyama T, Yamamoto Y, Suzuki T, Oguma K, and Nagai, A. Intraprostatic botulinum neurotoxin type A injection for benign prostatic hyperplasia: preliminary results with a newly purified neurotoxin. *Acta Med. Okayama* 66: 291-297, 2012. 査読有
- ④ Kumada A, Matsuka Y, Spigelman I, Maruhama K, Yamamoto Y, Neubert JK, Nolan TA, Watanabe K, Maekawa K, Kamioka H, Yamashiro T, Kuboki T, and Oguma K. Intradermal injection of Botulinum toxin type A alleviates infraorbital nerve constriction-induced thermal hyperalgesia in an operant assay. *J. Oral Rehabil.* 39: 63-72, 2012. 査読有
- ⑤ Viriyawattana N, Chongthaleong A, Oguma K, Yamamoto Y, Poonsuk K, and Chalermchaikit T. The Prevalence and phylogenetic analysis of *Clostridium botulinum* in soil at Nan Province of Thailand. *Asian Biomedicine (Research Reviews and News)*, February 4th, 2012. 査読有
- ⑥ Yokoyama T, Chancellor MB, Oguma K, Yamamoto Y, Suzuki T, Kumon H, and Nagai A. Botulinum toxin type A for the treatment of lower urinary tract disorders. *Int. J. Urol.* 19: 206-215, 2012. 査読有
- ⑦ Matsuka Y, Yokoyama T, Yamamoto Y, Suzuki T, Fatmawati NN, Nishikawa A, Ohyama T, Watanabe T, Kuboki T, Nagai A, and Oguma K. Application of purified botulinum type A neurotoxin to treat experimental trigeminal neuropathy in rats and patient with urinary incontinence and prostatic hyperplasia. *J. Toxicol.*, 648384, 2012. 査読有
- ⑧ 小熊恵二, 山本由弥子, 鈴木智典. ボツリヌス症: ボツリヌス毒素の構造と機能と、その臨床応用. *日本臨床* 70: 1329-1337, 2012. 査読無
- ⑨ 小熊恵二, 山本由弥子, 鈴木智典, 中嶋洋. ボツリヌス症. *臨床と微生物* 39: 170-176, 2012. 査読無
- ⑩ 鈴木智典, 山本由弥子, 小熊恵二. ボツリ

ヌス毒素の構造・機能. *日本医事新報* 4607: 60-61, 2012. 査読無

- ⑪ 小熊恵二, 山本由弥子, 鈴木智典, 門間千枝. ボツリヌス中毒-歴史, 現状とその問題点-. *Modern Physician* 31: 783-792, 2011. 査読無

[学会発表] (計 11 件)

- ① 山本由弥子, 鈴木智典, 美間健彦, 藤田久美子, 横田憲治, 松下治, 小熊恵二. E型ボツリヌス毒素は、A型ボツリヌス毒素と異なるメカニズムによりCaco-2細胞に結合する, 第 86 回日本細菌学会総会, 2013 年 3 月 18 日-20 日, 幕張メッセ (千葉).
- ② 張凱, 山本由弥子, 鈴木智典, 横田憲治, 藤田久美子, 西田菜々, 馬少博, Ni Nengah Dwi Fatmawati, 長町榮子, 小熊恵二. ボツリヌスE型毒素のCaco-2細胞に対する結合性について, 第 64 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2011 年 10 月 23 日, 岡山大学 (岡山).
- ③ 馬少博, 鈴木智典, 張凱, Ni Nengah Dwi Fatmawati, 山本由弥子, 藤田久美子, 西田菜々, 横田憲治, 小熊恵二. ボツリヌス菌A型菌変異株が産生するHA複合体の構造に関する研究, 第 64 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2011 年 10 月 23 日, 岡山大学 (岡山).
- ④ Oguma K, Yamamoto Y, Suzuki T, Yokoyama T, Matsuka Y, Arimitsu H, Kuboki T. Medical application of Clostridium toxins; 1) *Clostridium botulinum* neurotoxin. International Union Microbiological Societies 2011 Congress, Sep 9, 2011, Sapporo Convention Center (Sapporo).
- ⑤ 山本由弥子, 張凱, Ni Nengah Dwi Fatmawati, 申蓮花, 馬少博, 阪口義彦,

鈴木智典, 小熊恵二. A型ボツリヌス神経毒素の三叉神経節培養細胞への結合と取り込み, 第 63 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2010 年 10 月 17 日, 岡山大学 (岡山).

[図書] (計 1 件)

- ① 小熊恵二, 山本由弥子, 鈴木智典, 武士甲一. 医薬ジャーナル社, 改訂版人獣共通感染症 (ボツリヌス症), 256-269, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 由弥子 (YAMAMOTO YUMIKO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 20403496

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

小熊 恵二 (OGUMA KEIJI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・特命教授