

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：37111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658099

研究課題名(和文) 乳酸菌によるペプチド腸管送達系の構築と炎症性腸疾患治療への応用

研究課題名(英文) Establishment of intestinal peptide delivery system based on lactic acid bacteria and the therapeutic application for inflammatory bowel disease

研究代表者

見明 史雄 (MIAKE, Fumio)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：50248522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子組換え乳酸菌は、有用なタンパク質を腸管へ運ぶことができる。一方、コレラトキシンBサブユニット(CTB)は、GM1ガングリオシドに結合し、腸管細胞内へ侵入する機能を持つ。本研究では、炎症性腸疾患(IBD)の治療薬として期待されるペプチド YVADを腸管へ運ぶために、CTBとYVADの融合タンパク質CTB-YVADを分泌する乳酸菌を作製した。そして、CTB-YVADがGM1ガングリオシドに対する結合能力、細胞内侵入機能、抗炎症作用を持つことを明らかにした。以上の結果は、乳酸菌とCTBを用いたペプチド腸管送達系の有用性とCTB-YVAD分泌乳酸菌がIBD治療薬となりうる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Recombinant lactic acid bacteria (LAB) are used as bacterial vectors to deliver functional peptides to the intestine, and cholera toxin B subunit (CTB) can translocate into intestinal epithelial cells through GM1 ganglioside. To deliver the YVAD peptide, which has potential as a therapeutic agent for inflammatory bowel disease (IBD), to the intestine, we constructed LAB secreting a recombinant fusion protein of CTB with YVAD (CTB-YVAD). The present study demonstrated that CTB-YVAD bind to GM1 ganglioside, translocate into human intestinal epithelial cell line, and show the anti-inflammatory effects. Taken together, we showed potencies of peptide delivery system to the intestine used LAB and CTB, and new therapeutic agent for IBD used LAB secreting CTB-YVAD.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：乳酸菌 CTB-YVAD融合体 抗炎症作用 炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

乳酸菌は胃酸や胆汁酸に抵抗性を持ち、生きて腸管まで届くことが知られている。この性質を利用し、遺伝子組換えにより乳酸菌に有用なタンパク質を発現・分泌させることで、乳酸菌を腸管までのタンパク質の運搬体として利用する研究が行われてきた。また、ペプチドを用いた分子標的薬剤が臨床導入されていることから、乳酸菌に低分子のペプチドを発現・分泌させる試みも行われている。しかし、100 アミノ酸以下の小さなペプチドを細菌に発現・分泌させることは困難であるため (*J Am Chem Soc*, 1994 116, 4599-607)、ペプチドの腸管への運搬体としての乳酸菌の利用は難しい状態にある。

上記の問題を解決するために、研究代表者は、コレラトキシン B サブユニット (CTB) との融合体としてペプチドを発現・分泌させることを考えた。CTB は、*Vibrio cholerae* の産生するコレラトキシン (CT) の一部であり、腸管上皮細胞上に存在する GM1 ガングリオシドを介して、細胞内に侵入する機能を持つ。また、CTB それ自体は毒性を示すことなく、細胞内侵入機能を示すことが明らかになっている。これらの知見から、有用なペプチドを CTB との融合体として乳酸菌に発現・分泌させることで、乳酸菌を腸管までのペプチドの運搬体として利用することができると同時に、CTB の細胞内侵入機能によりペプチドの細胞内侵入効率が向上することが考えられる。

本研究では、炎症性腸疾患 (IBD) の予防・治療薬として期待される YVAD ペプチド (チロシン、バリン、アラニン、アスパラギン酸) に注目した。IBD は、腸管に慢性的な炎症を引き起こす疾患であり、既存の治療法では完治させることができない。したがって、抗炎症薬の長期服用により炎症を抑える緩解維持療法が一般的に行われる。IBD の発症原因は複数あるが、その一つとして、炎症性サイトカインであるインターロイキン-1 (IL-1) の過剰発現が挙げられる。IL-1 は、前駆体として産生されたのち、caspase-1 によって活性化となり細胞外に遊離される。caspase-1 もまた、細胞内で前駆体 (pro-caspase-1) として産生され、lipopolysaccharide (LPS) 等の炎症性の刺激により活性化される。この活性化型 caspase-1 は、自己触媒的に pro-caspase-1 の活性化を起こすため、一度 caspase-1 の活性化が起こると雪崩式に caspase-1 の活性化と IL-1 の遊離が起こる。YVAD は、この caspase-1 を阻害するため、caspase-1 の活性化および IL-1 の遊離を抑制し、抗炎症作用を示すことが報告されている (*J Biol Chem*. 1998 273, 32605-13)。

以上の観点から、CTB と YVAD の融合体 (CTB-YVAD) を発現・分泌する乳酸菌を作製し、その作用を評価することで、腸管までのペプチド送達系の構築と新たな IBD 予防・治

療薬の創出が可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト腸管内に多く存在する乳酸菌の一種 *Lactobacillus casei* を遺伝子工学的に改変し、CTB-YVAD を発現・分泌する *L. casei* の作製を試みた。この *L. casei* に分泌させた CTB-YVAD が CTB と同様の能力を持つことを確認するために、CTB-YVAD の GM1 ガングリオシドに対する結合活性およびヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞への細胞内侵入作用を検討した。さらに、LPS により炎症を誘発させた Caco-2 細胞を用いて、CTB-YVAD の caspase-1 阻害作用および IL-1 遊離抑制作用を検討することで、その抗炎症作用を評価した。

3. 研究の方法

(1) CTB-YVAD を分泌する *L. casei* の構築
Lactobacillus 属と大腸菌のシャトルベクター pHIL253 に *L. casei* 由来乳酸脱水素酵素遺伝子のプロモーター領域 (LDH)、*L. casei* 由来 *-N-acetylglucosaminidase* 遺伝子のシグナル配列 (SS)、*V. cholerae* 由来の CTB 遺伝子、6 個のヒスチジン (His-tag) をコードする遺伝子、*L. casei* 由来 *-N-acetylglucosaminidase* 遺伝子のターミネーター配列 (Term) を挿入し、*L. casei* 分泌ベクター pSCTB を作製した。さらに、CTB の C 末端側に YVAD をコードする遺伝子を挿入し、CTB-YVAD 分泌ベクター pSCTB-YVAD を作製した。これらのプラスミドは、エレクトロポレーション法を用いて、*L. casei* に導入した。pSCTB および pSCTB-YVAD を導入した *L. casei* は、MRS/K 培地 (MRS 培地を 0.2M リン酸 buffer で調整) 中、30 °C で 600nm の吸光度 (OD₆₀₀) が 2.0 となるまで培養した。培養上清中の CTB-YVAD および CTB の分泌は、培養上清を Amicon Ultra Centrifugal Filter (10 kDa) を用いて 10 倍に濃縮し、抗 CT 抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した。

(2) *L. casei* に分泌させた CTB-YVAD の GM1 ガングリオシドへの結合

CTB-YVAD および CTB の GM1 ガングリオシドに対する結合活性は、GM1-enzyme linked immunosorbent assay (GM1-ELISA) を用いて評価した。具体的には、monosialoganglioside GM1 を 96-well プレートに定着させた後、濃縮した培養上清、抗 CT 抗体、アルカリホスファターゼ (AP) 標識抗ウサギ IgG、発色用 AP 基質を順にインキュベートした。そして、450nm の吸光度 (OD₄₀₅) を測定し、GM1 ガングリオシドに対する結合活性を評価した。

(3) 培養上清中からの CTB-YVAD の精製

pSCTB および pSCTB-YVAD を導入した *L. casei* を MRS/K 培地中、OD₆₀₀ が 2.0 となるま

で培養した後、培養上清を回収し、水酸化ナトリウムを用いて pH7.0 に調整した。そして、Ni 樹脂を添加し、4 で一晚混合した。樹脂をオープンカラムに回収したのち、20mM イミダゾールを含むリン酸 buffer で洗浄後、500mM イミダゾールを含むリン酸 buffer で CTB および CTB-YVAD を抽出した。抽出した CTB および CTB-YVAD は、Amicon Ultra Centrifugal Filter (10kDa) を用いて PBS に置換後、濃縮した。CTB および CTB-YVAD の精製は、SDS-PAGE 後、CBB 染色および抗 CT 抗体を用いたウエスタンブロットを行うことで確認した。また、GM1-ELISA により、精製した CTB および CTB-YVAD (50ng) の GM1 ガングリオシドに対する結合活性を評価した。

(4) CTB-YVAD の細胞内侵入作用

Caco-2 細胞を 7×10^5 cells/well で 6-well プレートに播種し、LPS (10 μ g/ml) および CTB、CTB-YVAD (50 μ M) を 6 時間添加した。そして、Caco-2 細胞内のタンパク質を抽出し、抗 CT 抗体を用いたウエスタンブロットにより CTB および CTB-YVAD の細胞内侵入作用を評価した。また、内標準として β -actin の発現量を測定した。

(5) CTB-YVAD の caspase-1 阻害作用

Caco-2 細胞を 1×10^7 cells で 90mm ディッシュに播種し、LPS (10 μ g/ml) を 12 時間添加した。そして、細胞を buffer W (20mM HEPES、10mM KCl、1.5mM MgCl₂、1mM EDTA、1mM EGTA、10mM DTT、pH7.4) に懸濁し、23G の針を 20 回通すことにより、タンパク質を抽出した。10 μ g/ml に調整したタンパク質抽出物に CTB および CTB-YVAD (50 μ M) を添加し、30、2 時間インキュベートした。最後に、Caspase-1 Assay Kit (Calbiochem) を用いて、caspase-1 活性を測定した。

(6) CTB-YVAD の IL-1 遊離抑制作用

Caco-2 細胞を 7×10^5 cells/well で 6-well プレートに播種し、LPS (10 μ g/ml) および CTB、CTB-YVAD (50 μ M) を添加した。48 時間後、培養上清を回収し、ELISA により、IL-1 の遊離量を測定した。

4. 研究成果

(1) CTB-YVAD を分泌する *L. casei* の構築

pSCTB-YVAD および pSCTB を作製し (図 1)、これらのプラスミドを導入した *L. casei* の培養上清中への CTB-YVAD、CTB の分泌を確認した。その結果、pSCTB-YVAD、pSCTB を導入した *L. casei* の培養上清中に、12-14kDa のバンドが検出された (図 2)。一方、野生型 (wild-type) の *L. casei* と空ベクターである pHIL253 を導入した *L. casei* では、バンドは検出されなかった。予想される CTB-YVAD、CTB の分子量は、それぞれ、13,231、12,783 であることから、この結果は、pSCTB-YVAD、

pSCTB を導入した *L. casei* が CTB-YVAD、CTB を分泌することを示した。

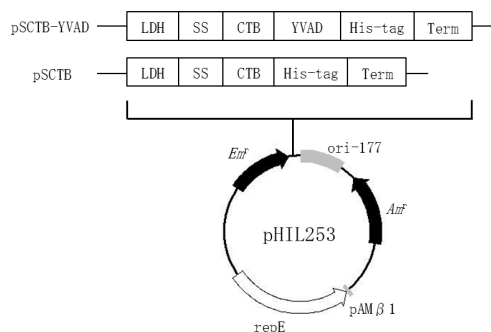


図 1. pSCTB-YVAD および pSCTB のプラスミドマップ

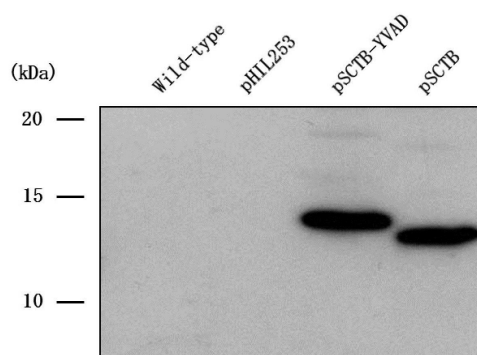


図 2. CTB-YVAD および CTB の分泌の確認

(2) *L. casei* に分泌させた CTB-YVAD の GM-1 ガングリオシドへの結合

pSCTB-YVAD、pSCTB を導入した *L. casei* の培養上清は、wild-type の *L. casei* および空ベクターである pHIL253 を導入した *L. casei* と比較し、GM1 ガングリオシドに強く結合した (図 3)。この結果は、*L. casei* に分泌させた CTB-YVAD が CTB と同様に GM1 ガングリオシドに結合することを示した。また、*L. casei* に分泌させた CTB の C 末端側への YVAD の融合が、CTB の GM1 ガングリオシドに対する結合活性に影響を与えないことを示した。

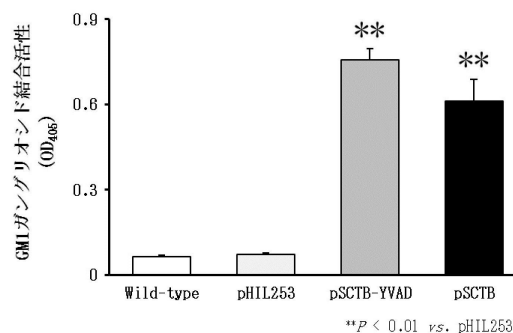


図 3. *L. casei* に分泌させた CTB-YVAD の GM-1 ガングリオシドに対する結合活性

(3) 培養上清中からの CTB-YVAD の精製

L. casei に分泌させた CTB-YVAD の抗炎症

作用を評価するために、pSCTB-YVAD および pSCTB を導入した *L. casei* の培養上清中から、CTB-YVAD、CTB を精製した。精製した CTB-YVAD および CTB は、CBB 染色および抗 CT 抗体を用いたウエスタンブロットにより、1本のバンドであることを確認した。また、GM1-ELISA の結果、精製した CTB-YVAD と CTB は、同程度の GM1 ガングリオシドに対する結合活性を持つことが明らかとなった(図4)。

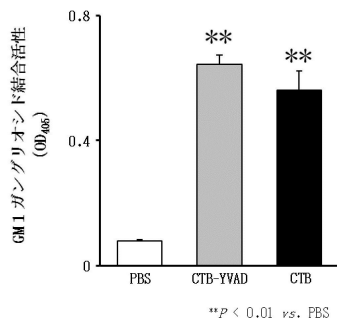


図4. 精製した CTB-YVAD、CTB の GM1 ガングリオシドに対する結合活性

(4) CTB-YVAD の細胞内侵入作用

精製した CTB-YVAD および CTB を Caco-2 細胞へ添加した結果、LPS の存在下および非存在下の両方で、細胞内に CTB-YVAD および CTB が検出された(図5)。この結果は、CTB-YVAD および CTB が、炎症の有無に関わらず、上皮細胞内に侵入できることを示唆した。また、CTB の C 末端側への YVAD の融合が CTB の細胞内侵入作用に影響を与えないことを示した。

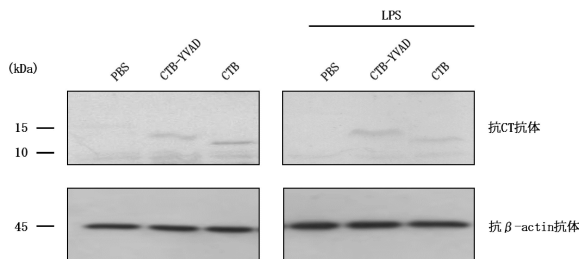


図5. CTB-YVAD および CTB の Caco-2 細胞内侵入作用

(5) CTB-YVAD の caspase-1 阻害作用および IL-1 遊離抑制作用

LPS により炎症を誘発させた Caco-2 細胞を用いて、精製した CTB-YVAD の caspase-1 阻害作用および IL-1 遊離抑制作用を評価した。その結果、CTB-YVAD は LPS による caspase-1 の活性化を阻害し(図6)、IL-1 の遊離を抑制した(図7)。また、これらの作用は、CTB には見られなかった。この結果は、*L. casei* に分泌させた YVAD が抗炎症作用を示すこと、YVAD の N 末端側への CTB の融合が YVAD の抗炎症作用に影響を与えないことを示した。

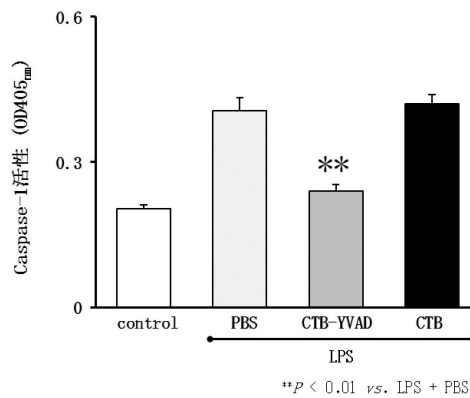


図6. CTB-YVAD の caspase-1 阻害作用

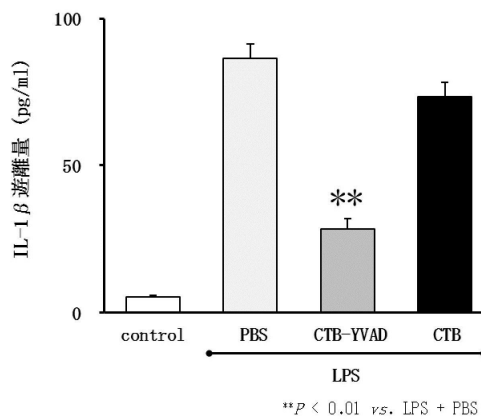


図7. CTB-YVAD の IL-1 遊離抑制作用

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 3 件)

Yukihiro Hiramatsu, Masatatsu Yamamoto, Tomomitsu Satho, Keiichi Irie, Akiko Kai, Saori Uyeda, Yuki Fukumitsu, Akihisa Toda, Takeshi Miyata, Fumio Miake, Takeshi Arakawa, Nobuhiro Kashige. Recombinant fusion protein of cholera toxin B subunit with YVAD secreted by *Lactobacillus casei* inhibits lipopolysaccharide-induced caspase-1 activation and subsequent IL-1 beta secretion in Caco-2 cells. *BMC Biotechnology*. (In press)
 Takahiro Okuno, Nobuhiro Kashige, Tomomitsu Satho, Keiichi Irie, Yukihiro Hiramatsu, Tanjina Sharmin, Yuki Fukumitsu, Saori Uyeda, Seitaro Yamada, Tetsuya Harakuni, Takeshi Miyata, Takeshi Arakawa, Masumi Imoto, Akihisa Toda, Yukihiro Nakashima, Fumio Miake. Expression and secretion of cholera toxin B subunit in lactobacilli. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. 36(6):952-958 (2013), 査読有

https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/36/6/36_b12-01021/_article
Yukihiro Hiramatsu, Tomomitsu Satho, Keiichi Irie, Shota Shiimura, Takahiro Okuno, Tanjina Sharmin, Yuki Fukumitsu, Saori Uyeda, Yukihiro Nakashima, Fumio Miake, Nobuhiro Kashige. Differences in TLR9-dependent inhibitory effects of H₂O₂-induced IL-8 secretion and NF-kappa B/I kappa B-alpha system activation by genomic DNA from five *Lactobacillus* species. *Microbes and Infection*. 15(2):96-104 (2013), 査読有
DOI:10.1016/j.micinf.2012.11.003

〔学会発表〕(計 8 件)

平松征洋、佐藤朝光、入江圭一、百武美香、見明史雄、鹿志毛信広、乳酸菌由来 DNA の腸管における抗炎症作用、第 30 回日本薬学会九州支部大会、2013 年 12 月 7 日、長崎国際大学

江川さおり、百武美香、中村智美、平松征洋、上田紗織、入江圭一、佐藤朝光、中島幸彦、三島健一、鹿志毛信広、見明史雄、マウスにおける DSS 誘導性大腸炎の病態と TREM-1/TREM-2 の発現量比の一致、第 86 回日本生化学会、2013 年 9 月 11 日、パシフィコ横浜

Yukihiro Hiramatsu, Tomomitsu Satho, Keiichi Irie, Shota Shiimura, Yukihiro Nakashima, Fumio Miake, Nick Carpino, Nobuhiro Kashige,

Oligodeoxynucleotide 5'- TTTTGCCG- 3' inhibits intestinal inflammation, World Biotechnology Congress (WBC) 2013, 2013 年 6 月 4 日、Boston, USA

百武美香、田村幸恵、江川さおり、入江圭一、佐藤朝光、平松征洋、上田紗織、福光由起、中島幸彦、三島健一、藤原道弘、鹿志毛信広、見明史雄、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)投与により発症するマウス大腸炎の病態に関する性差、日本薬学会 第 133 年会、2013 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜

平松征洋、佐藤朝光、入江圭一、椎村翔太、中島幸彦、見明史雄、鹿志毛信広、*Lactobacillus casei* のゲノム DNA に含まれる抗炎症作用を持つオリゴデオキシヌクレオチドの特定と作用機構の解明、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 25 日、東北大学

椎村翔太、平松征洋、佐藤朝光、入江圭一、宇高彩奈、上田紗織、中島幸彦、鹿志毛信広、見明史雄、乳酸菌ゲノム DNA 由来の抗炎症作用を持つオリゴデオキシヌクレオチドの特定、第 29 回日本薬学会九州支部大会、2012 年 12 月 8 日、熊本大学
宇高彩奈、平松征洋、佐藤朝光、椎村翔

太、入江圭一、古川歩、三島健一、藤原道弘、中島幸彦、鹿志毛信広、見明史雄、ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞における炎症誘発時の Progranulin 発現と分泌、第 29 回日本薬学会九州支部大会、2012 年 12 月 8 日、熊本大学

平松征洋、佐藤朝光、入江圭一、椎村翔太、中島幸彦、見明史雄、鹿志毛信広、5 種類の *Lactobacillus* 属乳酸菌由来ゲノム DNA の抗炎症作用機構に関する研究、第 16 回腸内細菌学会、2012 年 6 月 14 日、神戸市産業振興センター

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.fukuoka-u.ac.jp/user/microbiology/web/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

見明史雄 (MIAKE, Fumio)
福岡大学・薬学部・教授
研究者番号：50248522

(2) 研究分担者

鹿志毛信広 (KASHIGE, Nobuhiro)
福岡大学・薬学部・教授
研究者番号：80185751

佐藤朝光 (SATHO, Tomomitsu)
福岡大学・薬学部・助教
研究者番号：90369025

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

平松征洋 (HIRAMATSU, Yukihiro)
福岡大学大学院・薬学研究科・大学院生