

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06781

研究課題名(和文)ピフィズス菌を用いた固形がん選択的抗がん分子産生系の効率・安全性改善

研究課題名(英文)Improvement of efficiency and safety of solid cancer selective anticancer molecule production system using Bifidobacterium

研究代表者

谷口 俊一郎(Taniguchi, Shun'ichiro)

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：60117166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ピフィズス(B)菌を用いたDDSの臨床応用において、免疫的安全性基盤を作るためマクロファージや樹状細胞を用いて、B菌種に対する免疫応答を検討した。B菌はIL-6, TNF- $\alpha$ などのサイトカイン産生を誘導し主にTLR2により認識される結果を得た。一方、死菌は、サイトカイン産生、抗B菌IgG抗体産生は顕著に減少した。免疫活性化の関与候補として菌細胞壁の多糖類や蛋白質を得た。B菌でサイトカインやsvFcなどの発現系を作り、抗PD1抗体とシトシンデアミナーゼ産生B菌/5FCとの併用で、腫瘍増殖抑制と生存延長の亢進を観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん分子標的薬は、特定がんに対し効果を示し、副作用も減少するが、薬剤耐性細胞出現が懸念材料である。また抗体医薬等の有効性は、数多く報告されているが、その薬価は高額で自己免疫疾患的な副反応が深刻な場合が報告されている。蛋白質製剤は、その製造コストが高く、高薬価となる。副作用に関しても分子標的が腫瘍非特異的で、全身投与では副反応が生じる。これらの問題点を改善するために、固形がんの低酸素微小環境に着目し、ピフィズス菌による抗体医薬の腫瘍局所での持続的発現・分泌系の樹立は、比較的安価で低副作用の医薬品を開発できる。さらに副作用の問題で開発が断念された医薬品についても、利用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the clinical application of DDS using bifidobacterium (B), we investigated the immune response against B using macrophages and dendritic cells to create an immune safety basis. B induced the production of cytokines such as IL-6 and TNF- $\alpha$ , and we found the reaction was caused through TLR2. On the other hand, in killed B, cytokine production and anti-B IgG antibody production were significantly reduced. Some polysaccharides and proteins on the wall of B were identified as candidates for involvement in immune activation. An expression system for cytokines and svFc was established with B, and the combined use of anti-PD1 antibody and cytosine deaminase-producing B / 5FC was observed to suppress tumor growth and enhance the survival.

研究分野：DDS, がん治療、分子腫瘍学

キーワード：固形がん 腫瘍微小環境 低酸素 DDS ピフィズス菌 抗腫瘍性抗体医薬 がん分子標的薬 がん化学療法

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

抗がん剤は、これまでの低分子化合物に加え、分子標的薬、特に抗体医薬品などの生物製剤の開発が抗がん剤として注目されている。抗 HER2 抗体などのがん細胞の膜蛋白質に対するヒト抗体や抗 PD-1 抗体などの免疫制御分子の阻害作用をもつ抗体医薬などが顕著な臨床効果を上げている。しかしながら、これらの抗体医薬品は全てのガンに有効という訳ではない。さらに薬価が高額であり、また抗 PD-1 抗体は自己免疫疾患的な副反応が深刻となる場合も報告されている。タンパク質製剤は、その医薬品開発、維持、製造コストが高く、そのために高薬価となることや繰り返し投与することで中和抗体などができて有効性が低下することもある。また、がんの分子標的ではあるが、必ずしも腫瘍特異的ではなく更に薬剤のデリバリーシステム(DDS)が腫瘍選択的ではないことから、全身投与の際に副作用が生じると考えられる。これらの複数の問題点を改善するために、がんの微小環境に着目し、ビフィズス菌による抗体医薬の腫瘍局所での持続的発現・分泌系樹立を考えた。申請者はこれまでに固形がん治療の標的として、嫌気的環境に着目し、偏性嫌気性共生細菌ビフィズス菌を DDS ツールとして開発し、現在 5FU を腫瘍選択的に産生する生物製剤の第 I/II 相臨床試験が進捗している。

## 2. 研究の目的

げっ歯類、中型動物、小型霊長類にビフィズス菌を繰り返し反復静注した場合でも、アレルギーなどの顕著な副反応や敗血症などで誘導される炎症性サイトカインの産生は観察されなかった。このような安全性の観察がありながら、宿主免疫応答との相互作用を証明できる分子機構は明らかになっていない。グラム陰性菌である大腸菌は、外膜に存在するリポ多糖(LPS)などが toll 様受容体 4 (TLR4)を介して免疫細胞を活性化することが知られている。一方、黄色ブドウ球菌やビフィズス菌などのグラム陽性菌は厚いペプチドグリカン層を持ち、グラム陰性菌とは構造が異なっている。本研究では偏性嫌気性グラム陽性菌であるビフィズス菌と宿主免疫細胞との相互作用を理解すること、分子機構を明らかにすることを主要な目的としている。今後、ビフィズス菌を用いた様々な慢性疾患で臨床応用を行うことを想定した場合、免疫細胞との相互作用の分子機構の解明は、DDS の有効性の向上と安全性を担保するためにも重要と考えている。ビフィズス菌がヒトの主菌叢という事実から、何らかの免疫寛容が存在するという視点から解析し、より有効で安全な菌の確立と治療方法の樹立を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) ビフィズス菌由来免疫制御分子の同定

腸内細菌叢を形成するビフィズス菌は、外来の病原性細菌に比べ、宿主免疫刺激能は弱いことが想定される。しかしながら、その分子機構については明らかになっていない。ビフィズス菌を抗腫瘍分子の DDS として用いる場合、その投与経路は本来菌が存在する腸管への投与ではなく、静脈注射など異所性に投与する必要がある。その際、宿主免疫細胞がビフィズス菌もしくはビフィズス菌由来成分を認識することが考えられる。

ビフィズス菌で発現が強い蛋白質、および菌外に分泌される蛋白質を電気泳動法や質量分析法で同定し、免疫制御作用を持つ分子を探索する。また、菌体よりゲノムをとり、LPS(-)の大腸菌を用いたりコンピナント菌体由来の分泌タンパク質や細胞表層由来タンパク質を作成し、マウス骨髄由来樹状細胞やマクロファージ、ヒト単球系細胞株を刺激する。これらの免疫細胞からの、炎症性サイトカイン産生、mRNA の発現について解析した。

### (2) ビフィズス菌を認識する分子

ビフィズス菌は偏性嫌気性であることから、腫瘍が縮小することで自動的に消滅するが、菌体に対する生体防御反応もおこる。実際、予備の実験では自然免疫細胞である好中球の浸潤と菌体の貪食が観察される。より効果的な持続的発現の検証のために、種々の遺伝子欠損マウスによって、宿主免疫細胞との相互作用についても評価した。また、菌体を振り替えし投与することで産生される抗ビフィズス菌抗体についても検討した。

### (3) 抗腫瘍分子発現ベクターの構築

作製した発現菌のうち不安定なものあるいは将来製剤として有効と考えられる遺伝子について作成を試みた。また、ビフィズス菌を用いた外来性遺伝子産物の発現分泌系に必要な発現ベクター構築を行う。ビフィズス菌での持続的な遺伝子発現とタンパク質分泌に必要なプロモーター

やシグナルペプチドを探索した結果を基に、抗腫瘍分子の発現分泌系を構築する。

#### (4) ビフィズス菌と抗体医薬との併用作用の検討

臨床試験進行中のシトシンデアミナーゼの発現系を用いて、免疫チェックポイント阻害剤との併用効果について *in vivo* の担がんモデルを作成し検討した。今後、多様化する治療薬との併用効果について観察できる。

### 4. 研究成果

#### (1) ビフィズス菌由来分子の同定

ビフィズス菌を細菌培養用の培地で増殖させた後、RPMI で 24 時間低酸素状態で培養し、培養上清に含まれる分子について調べた。培養上清を透析後、アセトン沈殿を行って含まれている分子について質量分析を用いて同定を行った。およそ 30 種類のタンパク質分子が同定できた。今回同定できた分子には酵素やチャペロンなどの分子が含まれていた。発現量の多い分子について、LPS を含まない大腸菌を用いて、リコンビナントタンパク質を作成し、自然免疫細胞への作用を調べたところ、炎症性サイトカインを誘導する分子が存在した。抑制性の分子については、現在解析中である。ビフィズス菌を相同組換え技術で、免疫刺激分子をロックアウトすることが可能であれば、安全性の向上が期待できる。このような作業を通して、より安全な菌株樹立を試みる。

#### (2) ビフィズス菌を認識する分子

ビフィズス菌を *in vivo* で腹腔内や静注投与すると、好中球などの自然免疫細胞の浸潤が認められる。少なくとも、免疫細胞を活性化することは確認された。そこで TLR2 もしくは TLR4 遺伝子欠損マウスの骨髄由来樹状細胞 (BMDC) や骨髄由来マクロファージ (BMM)、骨髄由来マスト細胞などを刺激してサイトカインの発現を調べた。その結果、野生型マウスおよび TLR4<sup>-/-</sup>マウス由来の上記自然免疫細胞は IL-6, TNF- $\alpha$  などのサイトカインを産生した。しかし TLR2<sup>-/-</sup>遺伝子欠損マウス由来の自然免疫細胞は、炎症性サイトカインを産生しなかった。これらの結果は、ビフィズス菌は TLR2 を介して免疫細胞を活性化することが考えられた。

実際、動物を用いた投与試験では、複数回反復投与で、少量ながら B 菌に対する抗体が検出された。ビフィズス菌を超音波などで粉碎した抗原を用いた場合に最も多くの IgG 抗体ができた。その一方で、熱処理、もしくは UV 照射によって死滅させた死菌 (菌体の大きさなどの構造は変化なし) を用いた場合は、ビフィズス菌を認識する IgG の量は顕著に減少していた。In vitro においても、生菌と死菌で樹状細胞やマクロファージからのサイトカイン産生量を比較したところ、生菌に比較して、死菌で刺激した場合は、明らかにサイトカイン産生が減少していた。培養上清の影響は限定的であり、菌体表面上の変化による可能性も示唆された。ビフィズス菌と同じ病原性のないグラム陽性菌でも類似の結果が認められた。

#### (3) 抗腫瘍分子発現ベクターの構築

pUC57 プラスミドに目的遺伝子をクローニングしたのち、大腸菌 - ビフィズス菌シャトルベクターに乗せ変えた。さらに標的タンパク質の分泌・発現量を増強させるために、シグナルペプチドの下流に B 菌の細胞壁結合性加水分解酵素の配列の一部を挿入した。特定のプロモーター配列やシグナルペプチドでは、すべての遺伝子の発現・分泌をすることができなかった。さらに安定な高発現ベクターの検討が必要である。これまでに抗腫瘍作用が期待できる IFN- $\gamma$  などのサイトカイン産生系も樹立できた。また、既に乳がん治療薬として使用されている抗 HER2 抗体をモデルに、scFv を作成することを試みた。本来、抗体は H 鎖 2 と L 鎖 2 本がジスルフィド結合でできた高分子であり、大腸菌などでは産生することが困難である。我々は、抗原結合部位を形成する H 鎖と L 鎖の V 領域をリンカーペプチドで結合させた単鎖抗体 scFv を作成し、ビフィズス菌に産生する抗 HER2 scFv の安定産生株を樹立した。in vitro で抗 HER2-scFv を産生させ、培養上清中から scFv を精製し、その活性を確認した。HER2 を発現している BT-474 や SK-BR-3 細胞では、この抗 HER2-scFv が結合することが、蛍光顕微鏡やフローサイトメトリで確認できた。さらに発現量を上げて、安定株を樹立するための伝子改変について検討する必要がある。scFv の場合、Fc 領域がないため、ADCC 活性がない。今後は Avidity の高い、さらに ADCC に類似した機能を付加した分子の開発が必要と考えている。

#### (4) 抗 PD1 抗体ビフィズス菌 DDS を用いた併用効果の検討

シトシンデアミナーゼを発現するように遺伝子改変したビフィズス菌株は、腫瘍組織特異的に 5-フルオロシトシン (5FC) から 5-フルオロウラシル (5FU) を発現することで抗腫瘍効果を誘導する。本研究課題では、抗 PD-1 モノクローナル抗体とこのシトシンデアミナーゼ発現ビフ

イズス菌との併用による、CT26 - 担がんマウスモデルを用いて治療効果を検討した。抗 PD1 抗体、シトシンデアミナーゼ発現ビフィズス菌/5-FC のそれぞれの単独投与で、がんの退縮が観察された。さらに併用時には顕著ながんの縮小とマウスの生存の延長が認められた。

併用投与における抗 PD1 抗体とビフィズスの投与順などプロトコールを変えた場合も類似の抗腫瘍効果を示した。単剤療法と比較して、併用療法では、腫瘍組織内に浸潤した CD4+ T 細胞の増加、制御性 T 細胞 (Treg) の減少が観察された。今後、様々な抗がん効果を示す医薬品との併用について相乗効果が期待できる。将来の新しい治療方針の指針を確立できる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Matoba H, Takamoto M, Fujii C, Kawakubo M, Kasuga E, Matsumura T, Natori T, Misawa K, Taniguchi S, Nakayama J.	4. 巻 190
2. 論文標題 Cecal Tumorigenesis in Aryl Hydrocarbon Receptor-Deficient Mice Depends on Cecum-Specific Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Activation and Inflammation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 453-468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/hr.2016.158.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Naoko Matsushita 1 2, Nanae Ishida 1, Miho Ibi 1, Maki Saito 1, Masafumi Takahashi 3, Shunichiro Taniguchi 4, Yoichiro Iwakura 5, Yoshihiro Morino 2, Eiichi Taira 4, Yohei Sawa 2, Masamichi Hirose	4. 巻 42
2. 論文標題 IL-1 Plays an Important Role in Pressure Overload-Induced Atrial Fibrillation in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 543-546
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b18-00363.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takao Sakaizawa, Tomio Matsumura, Chifumi Fujii, Shigeaki Hida, Masayuki Toishi, Takayuki Shiina, Kazuo Yoshida, Kazutoshi Hamanaka, Ken-ichi Ito and Shun'ichiro Taniguchi	4. 巻 244
2. 論文標題 Potential Role of ASC, a Proapoptotic Protein, for Determining the Cisplatin Susceptibility of Lung Cancer Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tohoku J. Exp. Med.	6. 最初と最後の頁 133-144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1620/tjem.244.133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tomio Matsumura Shigeaki Hida Masato Kitazawa Chifumi Fujii Akira Kobayashi Michiko Takeoka Shun'ichiro Taniguchi, and Shin-ichi Miyagawa	4. 巻 293
2. 論文標題 Fascin1 suppresses RIG-I like receptor signaling and interferon-	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 6326-6336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.M117.819201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Tomohiko Murakami, Lerdluck Ruengsinpinya, Eriko Nakamura, Yoshifumi Takahata, Kenji Hata, Hiroaki Okae, Shun'ichiro Taniguchi, Masafumi Takahashi and Riko Nishimura	4. 巻 202
2. 論文標題 Cutting Edge: G Protein Subunit b 1 Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1942-1947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1801388.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yuji Sogawa, Hajime Nagasu, Seiji Itano, Kengo Kidokoro, Shun'ichiro Taniguchi, Masafumi Takahashi, Hiroyuki Kadoya, Minoru Satoh, Tamaki Sasaki, Naoki Kashihara	4. 巻 13
2. 論文標題 The eNOS-NO pathway attenuates kidney dysfunction via suppression of inflammasome activation in aldosterone-induced renal injury model mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ProS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0203823	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 hioya K, Matsumura T, Seki Y, Shimizu H, Nakamura T, Taniguchi S.	4. 巻 85
2. 論文標題 Potentiated antitumor effects of APS001F/5-FC combined with anti-PD-1 antibody in a CT26 syngeneic mouse model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem.	6. 最初と最後の頁 324-331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbaa057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Satoshi KOBAYASHI, Yuji SEKI, Koichiro SHIOYA, Shiro KATAOKA, Li WANG, 1231 Yuko SHIMATANI, Minoru FUJIMORI, Shun'ichiro TANIGUCHI, Takaaki NAKAMURA
2. 発表標題 Enhanced Anti-tumor Effects of IFN- Producing Bifidobacterium in Combination with PD-1 Antibody in a Syngeneic Murine Model
3. 学会等名 5th International Symposium for Medicinal Sciences (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoto Fujioka, Yuma Itoh, Shungo Sasaki, Saotomo Itoh, Shun'ichiro Taniguchi, Shigeaki Hida
2. 発表標題 Immune modulation by Bifidobacteria-derived molecules
3. 学会等名 日本免疫学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomio Matsumura, Koichiro Shioya, Yasuyoshi Kanari, Yuko Shimatani, Shiro Kataoka, Shun'ichiro Taniguchi, Takaaki Nakamura
2. 発表標題 Engineered bacterial cancer therapy using Bifidobacterium secreting agonistic anti-4-1BB scFv in the mouse model
3. 学会等名 5th International Symposium for Medicinal Sciences (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shiro Kataoka, Satoshi Kobayashi, Yuji Seki, Koichiro Shioya, Li Wang, Yuko Shimatani, Takaaki Nakamura, Shun'ichiro Taniguchi
2. 発表標題 Bifidobacterium producing interferon- induced tumor shrinkage in combination with anti-PD-1 blockade in syngeneic mouse model
3. 学会等名 Keystone Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matoba, H. Fujii, C. Taniguchi, S. Nakayama, J.
2. 発表標題 Cecal tumorigenesis in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice and the effects of gut microbiota
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsumura, T.; Shioya, K.; Kanari, Y.; Shimatani, Y.; Kataoka, S.; Taniguchi, S.; Nakamura, T.
2. 発表標題 Cancer immunotherapy with agonistic anti-4-1-BB scFv producing and secreting Bifidobacterium in syngeneic mouse model.
3. 学会等名 AACR Annual Meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Noguchi, Takuro Miyagawa, Mariko Sekiguchi, Nodoka Gomi, Daisuke Fukushima, Toshiro Ozawa, Takesumi Kobayashi, Takashi Taniguchi, Shun'ichiro Koizumi, Tomon
2. 発表標題 A single institute analysis of cell-free DNA concentrations in plasma of patients with various cancer types,
3. 学会等名 Annual Meeting of the Japanese-Society-of-Medical-Oncology (JSMO)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	肥田 重明  (Hida Shigeaki)  (10345762)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授    (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------