

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19790317  
 研究課題名(和文) 腸管病原性大腸菌によって誘導される癌転移抑制作用の解析および抗転移ワクチンの創製  
 研究課題名(英文) Analysis of the tumor metastasis inhibited by *Citrobacter rodentium* infection and the investigation of bacterial anti-metastasis vaccine.

## 研究代表者

永井 武 (NAGAI TAKESHI)  
 慶應義塾大学・医学部・助教  
 研究者番号：60418655

## 研究成果の概要：

マウスに大腸炎を誘導する *Citrobacter rodentium* と癌転移の相関関係について研究を行った。一度 *C. rodentium* に感染したマウスでは、その後の黒色腫細胞移入による肺への癌転移が有意に抑制された。この抑制作用は、*C. rodentium* に対する何らかの抗体が、癌細胞の表面抗原に交差反応をして見られる現象であることを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 細菌学(含真菌学)

キーワード：細菌 感染症 癌

## 1. 研究開始当初の背景

近年、癌に対する診断や治療技術のめざましい進歩により、その生存率は格段に伸びているが、固形癌患者の多くは、診断時には全身性の転移がすでに起きており、原発巣を切除したとしても、種々の治療法に抵抗性を持った転移癌細胞の増殖により死に至るケースが多い。現在の治療法では、転移した癌に対しては治療が困難であり、癌転移に対する新しい治療法の開発が癌の撲滅にとって非常に重要である。そこで、当初、マウスに炎症性大腸炎を誘発する *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) に感染したマウスでは、肺への癌転移が有意に低下すること

を発見した。以前、癌抗原を導入した弱毒化サルモネラ属菌やリステリア菌は、自身がベクター兼アジュバントとして機能し、癌抗原特異的免疫応答を誘導することができることが報告されていた。しかしながら、菌の自然感染と癌転移との関係についてはほとんど報告がなかった。

## 2. 研究の目的

この *C. rodentium* 感染に伴う転移抑制作用を詳細に解析することで、菌を用いた新たな予防法を確立できると考え、以下の点に注目し研究を行った。① *C. rodentium* 感染によって誘導される癌の抗転移作用の細胞およ

び分子レベルでの機能解析、② *C. rodentium* の病原性を基にした抗転移生ワクチン株の創製、③ これらの知見を基にして、*C. rodentium* 感染機構と生体防御機構の関係を明らかにすることで、感染と腫瘍免疫の相互作用について明らかにする。

### 3. 研究の方法

まず、*C. rodentium* の感染と癌転移の関係を観察するため以下の方法で実験を行った。C57BL/6 マウスに対して、*C. rodentium* を経口投与すると、約1週間程度で大腸炎を引き起こす。そして、3週間後にはほぼ完全に除菌され回復する。癌転移モデルは、マウス黒色腫細胞である B16F10 細胞を、尾静脈より注入し、肺に転移したコロニーの数をカウントして定量化した。B16F10 細胞は、*C. rodentium* 投与後6週間後に移入し、さらに2週間後に解剖し、転移巣の定量を行った。この方法に従って、転移阻害がどのような因子によって起こっているかを検討した。

次に、抗転移ワクチン株を樹立するために、腸管に定着はできるものの、より病原性が低い株を候補株として考えた。*C. rodentium* は、腸管病原性大腸菌 (EPEC) と同じ病原遺伝子を有しており、*in vitro* の実験では主に EPEC を用いた。

### 4. 研究成果

(1) *C. rodentium* 感染したマウスでは癌の転移が低下する。

まず、癌の転移と *C. rodentium* の感染について検討した。*C. rodentium* を投与して6週間後に B16F10 細胞を静脈投与し、2週間後の肺に転移したコロニーの数を測定した。その結果、*C. rodentium* 感染マウスでは、非感染のマウスに対し約20%に減少していた。しかし、foot-pad に移植し腫瘍の大きさを比較したが、腫瘍組織の増殖能には影響しなかった。つまり、*C. rodentium* 感染によって、腫瘍の大きさには影響しないが、転移のみを阻害することが明らかとなった (図1)。

次に、この阻害作用がどのような機構で作用しているのかについて検討した。その結果、*C. rodentium* 感染に伴う炎症性サイトカインについて、血中 IFN $\gamma$  を ELISA によって測定したが、B16F10 細胞を投与したときには、ほぼ非感染時と同程度であった。また、B16F10 細胞に対する細胞障害活性の上昇などは関与しないことも明らかとなった (図2)。そこで、血中の *C. rodentium* に対する抗体が、B16F10 細胞に反応しているのではないかと考え、*C. rodentium* および B16F10 細胞に対する抗体反応を測定した。その結果、感染を2週間から、*C. rodentium* および B16F10 細胞両者に対する IgG や IgM が観察された (図

3)。つまり、*C. rodentium* 感染によって誘導された抗 *C. rodentium* 抗体

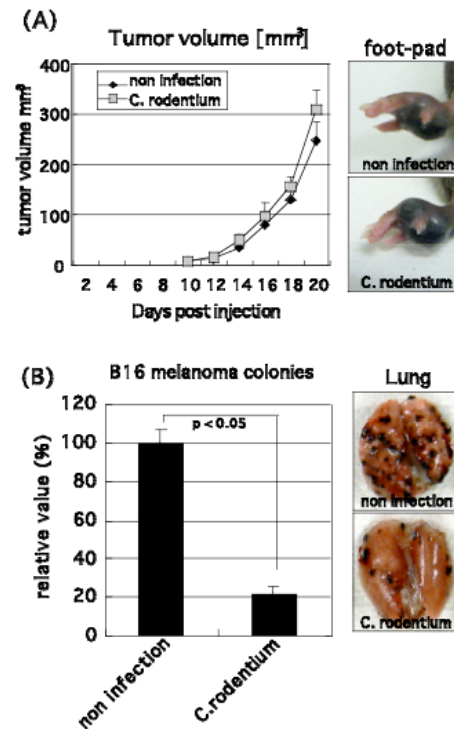


図1 *C. rodentium* 感染と B16F10 細胞の転移

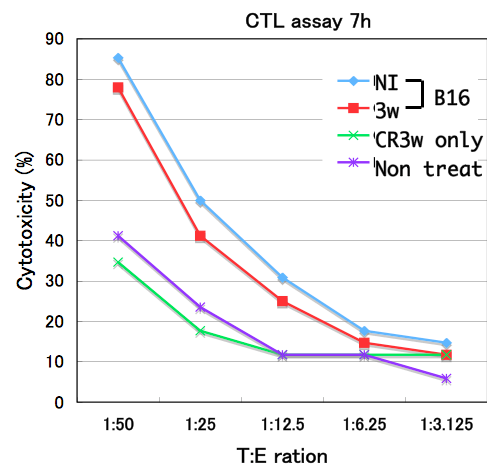


図2 *C. rodentium* 感染マウスでも B16F10 細胞に対する細胞障害活性は変わらない。

が B16F10 細胞にも交差反応した結果、転移の阻害が起きていることが考えられる。これを確かめるため、抗 *C. rodentium* 抗体を含む血清を精製し、B16F10 細胞を投与するときに同時に血清を静脈投与した。その結果、*C. rodentium* に感染したマウスから精製した血清を投与したマウスでは、B16F10 細胞の肺へ

の転移が有意に低下した。しかし、この血清中から IgG および IgM を抗 IgG および IgM 抗体結合ビーズを用いて除去した血清を投与すると、転移の阻害作用が低下した (図 4)。

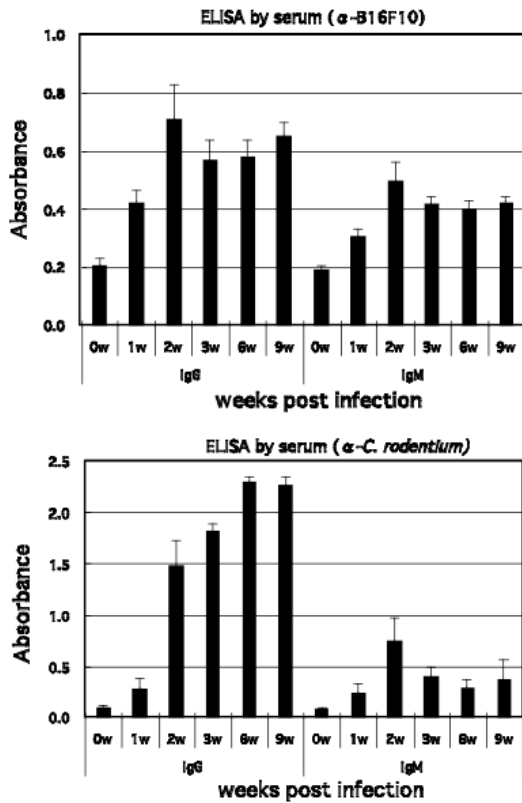


図3 抗 *C. rodentium* は B16F10 細胞にも結合する

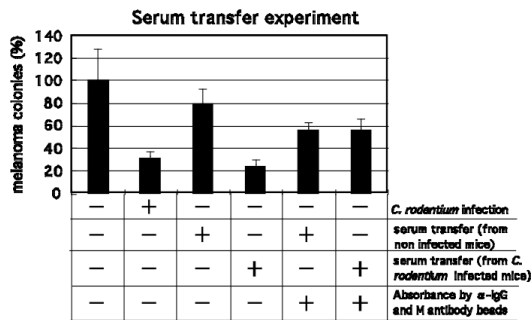


図4 *C. rodentium* 感染による癌転移阻害は、血中 IgG や IgM が重要である

それでは、この交差反応している抗体は、B16F10 細胞のどのような抗原をターゲットとして認識しているのかを検討した。まず、B16F10 細胞の表面をタンパク質分解酵素であるトリプシンで消化し、フローサイトメーターによって抗体の交差反応を観察した。その結果、トリプシンで表面のタンパク質を分解すると、交差反応がほとんど見られなくなった (図 5)。

また、B16 細胞の表面から各種糖鎖分解酵

素で処理したが、交差反応は依然として保たれていたことから、おそらく細胞表面に露出するタンパク質抗原を認識しているものと考えられる。

そこで、B16F10 細胞をポッター型ホモジナイザーで破碎し、遠心分離法および密度勾配遠心法によって、細胞膜タンパク質を精製し、

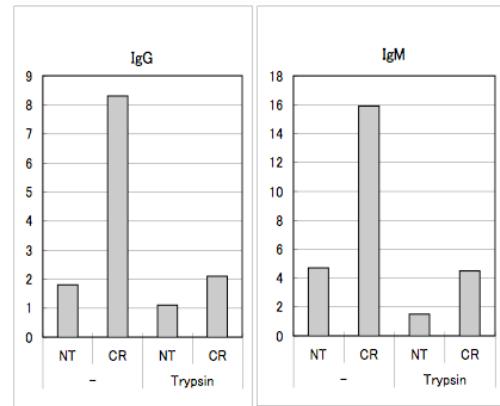


図5 交差反応する抗体が、細胞表面のタンパク質抗原を認識している。

SDS-PAGE を行った。これをメンブレンに転写したのち、非感染のマウス血清および抗 *C. rodentium* 抗体を含む血清を用いてウェスタンブロットを行って比較検討した。その結果、*C. rodentium* 抗体を含む血清を用いた時に特異的なバンドが数カ所検出された。そして、これらを、TOF-MS/MS 質量分析計を用いて、タンパク質の同定を行った。これらのバンドにはいくつかの癌転移に重要なタンパク質が含まれていた。つまり、*C. rodentium* 抗体が、B16F10 細胞の転移に関わるタンパク質を認識および阻害することで、肺への転移を阻害しているのではないかと考えられる。

一方、より宿主傷害性の低い癌転移ワクチンとしての候補株を探索するため、約 20 種類の病原遺伝子の変異株を作成した。しかしながら、どの変異株も野生株と同等の細胞障害活性を有していたため、今後さらなる探索をしていきたいと考えている。

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 3 件)

1. Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, Fujikado N, Tanahashi Y, Akitsu A, Kotaki H, Sudo K, Nakae S, Sasakawa C, Iwakura Y. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucosal bacterial infection and allergic responses. (2009) **Immunity** 30, 108-116 (査読有)

2. Iizumi, Y., Sagara H, Kabe Y, Azuma M, Kume K, Ogawa M, Nagai T, Gillespie PG, Sasakawa C, Handa H. The enteropathogenic *E. coli*-effector EspB facilitates microvilli effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function. (2007) **Cell Host Microbe** 2, 383-392 (査読有)

3. Mimuro H, Suzuki T, Nagai S, Rieder G, Suzuki M, Nagai T, Fujita Y, Nagamatsu K, Ishijima N, Koyasu S, Haas R, Sasakawa C. *Helicobacter pylori* Dampens Gut Epithelial Self-Renewal by Inhibiting Apoptosis, a Bacterial Strategy to Enhance Colonization of the Stomach. (2007) **Cell Host and Microbe**, 4 : 255-263 (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

永井 武、三室 仁美、石亀 晴道、角田 茂、岩倉 洋一郎、笹川 千尋 “*Citrobacter rodentium* の感染によって癌の転移が抑制される (平成 20 年 3 月 25 日) 第 81 回 日本細菌学会総会 (京都) 平成 20 年 3 月 25 日 (oral and poster)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 武 (NAGAI TAKESHI)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号 : 60418655

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者