

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07172

研究課題名(和文) 副作用のない抗腫瘍TNF- 製剤を目指した組換えビフィズス菌を用いたDDSの開発

研究課題名(英文) The development of the drug delivery system via recombinant bifidobacteria aiming for an anti-cancer TNF-alpha preparation without adverse side effects.

研究代表者

平 郁子 (Taira, Ikuko)

帝京平成大学・薬学部・准教授

研究者番号：60453693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：TNF- は、腫瘍細胞をアポトーシスさせるサイトカインであり、抗腫瘍薬として期待されてきた。

本研究では、TNF- 分泌発現ビフィズス菌(以下M4)を抗腫瘍薬として実用化するためのデータを蓄積した。まずM4を適応可能ながん種として、新たに悪性黒色腫細胞と結腸癌細胞を見出した。また宿主免疫機能がM4の抗腫瘍効果に関与していること、ニトログリセリンがM4の抗腫瘍効果を増強することを見出した。さらに組換えビフィズス菌の注射剤への製剤化を目標として、エンドトキシン不含の輸液製剤を用いて人体に安全性の高い培地組成を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TNF- は、腫瘍細胞に対し殺細胞活性を示す一方、全身投与すると重篤な副作用が発現することも知られており、TNF- 製剤の実用化に当たっては腫瘍組織を標的とした薬物送達が必要である。我々がこれまでに作出したM4は、高い安全性をもって腫瘍組織にTNF- を送達可能な担体である。本研究の成果から、M4は幅広いがん種に適応可能であり、また宿主免疫の活性化およびニトログリセリン製剤の併用によりその効果の増強が期待できる。さらに本研究成果である培養培地組成を、ビフィズス菌の製剤化、および栄養要求性株の選択に利用し、新たなビフィズス菌製剤開発に応用していきたい。

研究成果の概要(英文)：TNF- is a cytokine that causes apoptosis in tumor cells, and has been expected to be an antitumor medicine.

In this study, we accumulated data for the practical application of TNF- -secreting recombinant bifidobacterium, named M4, as an anti-tumor drug. Initially, we identified malignant melanoma cells and colon cancer cells as applicable cancer types for M4. We also found that host immune function is involved in the antitumor effect of M4, and nitroglycerin preparation enhances the antitumor effect of M4.

Furthermore, in order to formulate the recombinant bifidobacterium as an injection, we established a culture medium composition that is safe for the human body using an endotoxin-free infusion preparation.

研究分野：薬物送達学

キーワード：嫌気性菌 遺伝子組み換え微生物 サイトカイン 抗腫瘍効果 薬物送達

### 1. 研究開始当初の背景

TNF- $\alpha$  は、腫瘍細胞にアポトーシスを誘導する作用をもつ (Nat. Biotechnol. 2002) ことから、抗腫瘍薬としての開発が行われてきた。抗腫瘍薬としての TNF- $\alpha$  製剤の開発事例において、最も開発が進んだものとして Tasonermin があるが、腫瘍が存在する四肢と体幹の血流を遮断して薬剤を灌流させるため、外科的処置が必要であった。また GenVec 社の TNFerade (J. Clin. Oncol. 2013) は、薬効を発揮するためには腫瘍組織に直接注入される必要があり、転移巣への薬剤投与が困難であったことが主な理由となって第 1 相試験で開発が中断した。

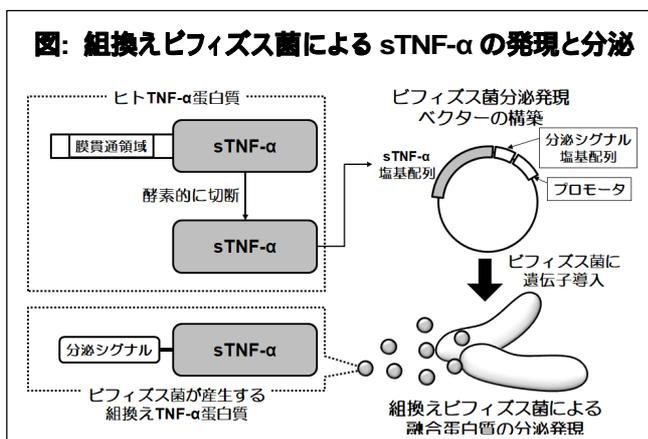
このように、TNF- $\alpha$  の患部局所への送達が必須となるのは、TNF- $\alpha$  の全身投与により重篤な副作用が発生する (Cancer Chemother. Pharmacol. 1987) ためである。また TNF- $\alpha$  阻害薬が治療に用いられる関節リウマチや乾癬などの炎症性疾患だけでなく、TNF- $\alpha$  は、がん患者にみられる悪液質 (Nature 1986、静脈経腸栄養 2008) や糖尿病患者に発生するインスリン抵抗性 (Endocrine 2004) など、様々な疾患において病態の発生に関与している。

これらのことから、Drug delivery system (DDS) により TNF- $\alpha$  を腫瘍組織特異的に作用させ、副作用の発現を予防できれば、TNF- $\alpha$  製剤の開発を成功させられる可能性が大幅に上昇するものと考えられた。

そして、本研究の開始までに、研究代表者らが有する組換えピフィズス菌による腫瘍組織への DDS 技術 (特許第 6025127 号、第 6176683 号、Biomed J Sci & Tech Res. 2019) をもとに、sTNF- $\alpha$  を発現分泌する組換えピフィズス菌クローン (以下、M4、右図参照) を作出した。M4 が産生した sTNF- $\alpha$  の比活性は市販の精製標品と同等であり、M4 は複数のヒト膵臓癌由来細胞に対する抗腫瘍効果を *in vivo* で示した。M4 を投与されたマウスにおいては、体重減少や皮膚症状など TNF- $\alpha$  に起因する症状は見られなかった。

一方、ピフィズス菌の培養に汎用される MRS 培地は、動物由来(牛)の肉エキスを含有しており、ピフィズス菌を注射製剤とするには不適当であると考えられた。そこでピフィズス菌の最小培地の組成 (「乳酸菌とピフィズス菌のサイエンス」京都大学学術出版会 2010) をもとに、人体に静脈投与可能な輸液製剤とエンドトキシン不含の大豆抽出物を用いて、動物由来成分およびエンドトキシンを含まない培養培地を作出し、MRS 培地と同程度の増殖効率を達成したが、培地の酸性化により増殖が停止するという問題が生じた。

以上の背景から、本研究当初における M4 の抗腫瘍薬としての実用化に向けた課題として、M4 の適応可能ながん種の探索と効果の低いがん種に対する効果増強手段の検討、および効率的な組換えピフィズス菌培養方法の確立が挙げられた。



### 2. 研究の目的

本研究の目的は、TNF- $\alpha$  を高い効率で分泌発現する遺伝子組換えピフィズス菌を、腫瘍組織に限局して作用する医薬品として開発することである。

上記の背景に基づき、以下の二つの課題を設定し、TNF- $\alpha$  分泌発現ピフィズス菌を用いた抗腫瘍療法の実用化に向けた技術の確立を目指した。

- ・ sTNF- $\alpha$  分泌発現ピフィズス菌 M4 の抗腫瘍効果の検討とその増強
- ・ ピフィズス菌製剤化に向けたピフィズス菌培養技術の確立

### 3. 研究の方法

- ・ sTNF- $\alpha$  分泌発現ピフィズス菌 M4 の抗腫瘍効果の検討とその増強

膵臓癌以外に M4 を適応可能ながん種を検討した結果、悪性黒色腫細胞と結腸癌細胞に抗腫瘍効果を示すことを見出した。マウス悪性黒色腫細胞腫瘍モデルを用い、CD8 陽性細胞を枯渇させたところ、陰性対象と比較して M4 の抗腫瘍効果は大きく減弱された (具体的なデータは後日再提出の際に公表する)。従って宿主免疫機能が M4 の抗腫瘍効果に関与しており、腫瘍免疫の活性化が M4 の効果を増強すると思われる。またマウス結腸癌細胞腫瘍モデルにおいて、EPR 効果増強剤として知られるニトログリセリン (以下 NG) が、M4 の抗腫瘍効果を増強することを見出し、NG テープ剤という簡便かつ侵襲度の低い方法で M4 の治療効果を増強できる可能性を示した (第 63 回日本薬学会関東支部大会、2019)。

- ・ ピフィズス菌製剤化に向けたピフィズス菌培養技術の確立

M4 作出に用いたピフィズス菌 *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) の生育至適 pH は 5.5

(Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002)であるが、本菌を 24 時間培養すると培養液の pH は 4 付近にまで低下し、増殖が停止する。これを防止するため、pH 調整剤として NaHCO<sub>3</sub> を検討したが、*B. longum* 生育の至適浸透圧が制限となり pH 調整に必要な濃度まで添加できなかった。本研究においては、より緩衝能が高く *B. longum* の増殖に適し、人体に対して安全性の高い pH 調整剤としてトロメタモールを見出し、培養条件の最適化を達成した。また輸液バッグを用いた簡易的な低酸素条件での大量培養に成功した（日本薬学会第 143 年会）。

#### 4 . 研究成果

本研究により、M4 は難治性の膵臓癌に加え、悪性度の高い悪性黒色腫および本邦における罹患率の高い結腸癌の細胞に対する抗腫瘍効果を示した。また M4 の効果を増強する手段として、簡便な NG テープ剤が有効であることが示唆された。さらに、免疫チェックポイント阻害剤の併用に代表される宿主免疫機能の活性化が M4 の作用を増強する可能性を見出した。以上の結果から、M4 は広範ながん種に適応可能な抗腫瘍薬となりうると考えている。

また、本研究で確立した培地組成は、MRS 培地など既存の培地と異なり蛋白質や核酸などの生体高分子をほとんど含まない。従ってこの培地組成は、組換えビフィズス菌分泌物の生化学的解析および栄養要求性ビフィズス菌株の選択に利用可能であり、M4 の製剤化のための大量培養だけでなく、TNF- $\alpha$  以外の抗腫瘍蛋白質を分泌発現する新たな組換えビフィズス菌株の作出において有用であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|                                                                                                                                            |                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Yoshimi Shimizu, Katsuhiko Isoda, Yuichiro Taira, Ikuko Taira, Masuo Kondoh, Isao Ishida                                         | 4. 巻<br>887                 |
| 2. 論文標題<br>Anti-tumor effect of a recombinant Bifidobacterium strain secreting a claudin-targeting molecule in a mouse breast cancer model | 5. 発行年<br>2020年             |
| 3. 雑誌名<br>Eur J Pharmacol .                                                                                                                | 6. 最初と最後の頁<br>173596-173596 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.ejphar.2020.173596                                                                                    | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難                                                                                                     | 国際共著<br>-                   |

|                                                                                                                                                                          |                       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Isoda Katsuhiko, Tanaka Anju, Fuzimori Chisaki, Echigoya Miyuki, Taira Yuichiro, Taira Ikuko, Shimizu Yoshimi, Akimoto Yoshihiro, Kawakami Hayato, Ishida Isao | 4. 巻<br>15            |
| 2. 論文標題<br>Toxicity of Gold Nanoparticles in Mice due to Nanoparticle/Drug Interaction Induces Acute Kidney Damage                                                       | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Nanoscale Research Letters                                                                                                                                     | 6. 最初と最後の頁<br>141-141 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1186/s11671-020-03371-4                                                                                                                    | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|                                              |
|----------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>平 郁子、平 裕一郎、斎藤 浩美、磯田 勝広、清水 芳実、石田 功 |
| 2. 発表標題<br>人体への安全性を考慮したビフィズス菌培養法             |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会 第143年会（札幌） 2023年3月27日（月）    |
| 4. 発表年<br>2023年                              |

|                                                    |
|----------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>清水 芳実、常行 航平、古川 祥平、磯田 勝広、平 裕一郎、平 郁子、石田 功 |
| 2. 発表標題<br>抗メソテリン-VHH抗体の性状解析とがん細胞株を用いた評価           |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会 第143年会（札幌） 2023年3月26日（日）          |
| 4. 発表年<br>2023年                                    |

|                                                          |
|----------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>清水 芳実、中山 未希、篠原 華穂、磯田 勝広、平 裕一郎、平 郁子、斎藤 浩美、石田 功 |
| 2. 発表標題<br>偏性嫌気性細菌を用いたトリプルネガティブ乳がん治療薬の開発                 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会 第141年会（広島）                              |
| 4. 発表年<br>2020年                                          |

|                                             |
|---------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>迫田凌太、平裕一郎、平郁子、清水芳実、磯田勝広、斎藤浩美、石田功 |
| 2. 発表標題<br>EPR効果増強剤がピフィズス菌の抗腫瘍効果に与える影響      |
| 3. 学会等名<br>第63回日本薬学会関東支部大会                  |
| 4. 発表年<br>2019年                             |

|                                                     |
|-----------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>木下 結賀、佐藤 梨花子、平 裕一郎、平 郁子、清水 芳実、石田 功、磯田 勝広 |
| 2. 発表標題<br>銀ナノワイヤーの薬物相互作用に関する検討                     |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会 第140年会（京都）                         |
| 4. 発表年<br>2020年                                     |

|                                                            |
|------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>清水 芳実、島岡 真理亜、藤岡 野々花、磯田 勝広、平 裕一郎、平 郁子、斎藤 浩美、石田 功 |
| 2. 発表標題<br>組換えピフィズス菌を用いた乳がん治療薬開発に向けた検討                     |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会 第140年会（京都）                                |
| 4. 発表年<br>2020年                                            |

|                                              |
|----------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>清水芳実, 古川祥平, 氏家文瑠, 平郁子, 磯田勝広, 平裕一郎 |
| 2. 発表標題<br>膵臓がん細胞株に対する抗MSLN VHHイムノトキシンの有用性評価 |
| 3. 学会等名<br>日本生化学会大会(Web) 96th                |
| 4. 発表年<br>2023年                              |

|                                                          |
|----------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>清水 芳実, 菊本 裕子, 古川 祥平, 磯田 勝広, 平 裕一郎, 平 郁子, 石田 功 |
| 2. 発表標題<br>抗メソテリン-VHH抗体のイムノトキシニン化と中皮細胞株に対する細胞傷害活性の評価     |
| 3. 学会等名<br>日本生化学会大会 95th                                 |
| 4. 発表年<br>2022年                                          |

|                                                          |
|----------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>清水 芳実, 篠原 華穂, 佐藤 泰成, 磯田 勝広, 平 裕一郎, 平 郁子, 石田 功 |
| 2. 発表標題<br>メソテリンの立体構造を認識する抗メソテリン-VHH抗体の精製と性状解析           |
| 3. 学会等名<br>日本生化学会大会 94th                                 |
| 4. 発表年<br>2021年                                          |

|                                                                  |
|------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>清水 芳実, 島岡 真理亜, 中山 未希, 磯田 勝広, 平 裕一郎, 平 郁子, 斎藤 浩美, 石田 功 |
| 2. 発表標題<br>乳がんに対する組換えピフィズス菌の腫瘍集積性と抗腫瘍効果の評価                       |
| 3. 学会等名<br>日本DDS学会学術集会 36回                                       |
| 4. 発表年<br>2020年                                                  |

〔図書〕 計1件

|                                                                                                                                      |                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>清水芳実・平郁子・平裕一郎・石田功・神谷恵理子・辻丸光一郎・矢野嘉宏・秋葉恵一郎・角淵由英・篠田淳郎・永次史・南野研人・喜多村徳昭・三橋規樹・北出幸夫・駒谷剛志・内藤瑞・小原有弘・宮田完二郎・小此木孝仁・青木一晃・飯田雅人・淀谷幸平・清水京 他 | 4. 発行年<br>2019年 |
| 2. 出版社<br>技術情報協会                                                                                                                     | 5. 総ページ数<br>676 |
| 3. 書名<br>医薬品モダリティの特許戦略と技術開発動向                                                                                                        |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

|                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 帝京平成大学薬学部薬学科 生体防御教育研究部門 抗体DDSユニット ユニット紹介<br><a href="https://pharm.thu.ac.jp/research/unit/dds.html">https://pharm.thu.ac.jp/research/unit/dds.html</a> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|-------|-------------------------------------------------|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 石田 功<br><br>(Ishida Isao)<br><br>(00415556)     | 帝京平成大学・薬学部・教授<br><br><br><br>(32511) |    |
| 研究分担者 | 平 裕一郎<br><br>(Taira Yuichiro)<br><br>(20581953) | 帝京平成大学・薬学部・教授<br><br><br><br>(32511) |    |

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 |
|---------|---------|