

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 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591678

研究課題名（和文） 固形癌の低酸素環境を標的とした新規分子標的治療法の開発研究

研究課題名（英文） Development of novel molecular targeted therapeutics that target the hypoxic environment of solid tumors

研究代表者

藤森 実 (FUJIMORI MINORU)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：00262725

研究成果の概要（和文）：抗癌剤の全身投与は重得な副作用を有しており、腫瘍選択的治療法の開発が急務である。われわれは固形癌の腫瘍内が正常組織に比べて嫌気的環境であることに着目し、乳酸菌の 1 種であるラクトバチルス・カゼイを用いて固形腫瘍への集積性と増殖抑制効果を検討した。その結果、偏性嫌気性菌である KJ686 菌は固形腫瘍に特異的に集積し正常組織では排除されていた。KJ686 菌は腫瘍選択的デリバリーシステムとして有用であり高い治療効果が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Systemic administration of anticancer drugs may have serious side effects, and development of tumor-selective therapy is urgently needed. We investigated the clustering and antiproliferative effects of *Lactobacillus casei*, a lactobacillus, on solid tumors, based on the inside of a solid tumor being an aerobic environment compared with normal tissues. Bacterial strain KJ686, an obligate anaerobe, specifically clustered in solid tumors, but was eliminated from normal tissues. This strain may be useful as a tumor-selective delivery system that may have high therapeutic efficacy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：腫瘍選択的治療・嫌気性菌ベクター・ラクトバチルス

1. 研究開始当初の背景

わが国における死因の第一位である癌は、その直接原因は癌の遠隔転移が大部分を占めている。しかしながら、現在常用されている抗癌剤の全身投与は重得な副作用の問題を有しており、腫瘍選択的治療法の開発が急務である。われわれは、固形癌は、その腫瘍内

が正常組織に比べて嫌気的環境であることに着目し、嫌気性菌を用いて、新しいドラッグデリバリーシステムとして遺伝子を導入する事を着想した。

2. 研究の目的

今回われわれは、通性嫌気性菌であるラクト

バチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) を変異原物質、例えば、MNNG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、以下MNNGという) を用いて化学的変異化によるランダム変異化を行い、この変異化菌を通常の嫌気性条件下と好気性条件下で培養して、好気性条件下では成育せず、且つ、嫌気性条件下で良好に生育する偏性嫌気性菌のラクトバチルス・カゼイを選別し、次いで、偏性嫌気性変異化菌のラクトバチルス・カゼイが、プラスミドベクターによる形質転換が可能であるかを確認するために、偏性嫌気性変異化菌のラクトバチルス・カゼイを、親株のラクトバチルス・カゼイで機能し、適当な薬物耐性マーカーを導入した発現ベクター、例えば、アンピシリン耐性遺伝子を導入した大腸菌由来のプラスミドとエリスロマイシン耐性遺伝子を導入したラクトバチルス菌由来のプラスミドから作製したシャトルベクターを用いて形質転換を行って偏性嫌気性菌ラクトバチルス・カゼイを作製することを目的とした。さらに偏性嫌気性菌にした変異株である *L. casei* KJ686 を用いて担がんマウスに尾静注し、腫瘍への局在性およびそれ自身の持つ抗腫瘍効果を検討した。

3. 研究の方法

3.1 供試菌株

グラム陽性桿菌でヒト常在性偏性嫌気性乳酸菌 *Lactobacillus casei* (*L. casei*) KJ686 株を使用した。これは、国立医薬品食品衛生研究所の五十君静信博士によって提供された菌種で、*Lactobacillus casei* KK378 を偏性嫌気性菌に変異させ、エリスロマイシン耐性を獲得した菌である。

3.2 *L. casei* KJ686 の培養

培地は、寒天培養用として MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) 寒天培地 (Oxoid, Cambridge, UK)、液体培養用として MRS 液体培地 (Oxoid) を用いた。また、抗生剤としてエリスロマイシン (和光純薬株式会社) を用いた。

-80°C凍結保存ストックより供試菌株を MRS 液体培地に添加後、嫌気ボックス

(AnaeroPack 角型ジャー、三菱ガス化学株式会社、東京) および AnaeroPack・Anaero (三菱ガス化学株式会社) を用いて嫌気的環境にして 37°C で培養を行った。培養開始後、増殖曲線の傾きが最大となる 24 時間後の菌を実験に使用した。

3.3 菌の投与

L. casei KJ686 菌液を、遠沈 (3000rpm, 1 時間, 4°C) し、PBS(-) で 2 回洗浄した。PBS(-) で懸濁して 5×10^8 cfu/100 μ l にしてマウスに尾静注した。高密度の菌浮遊液の投与は、菌塊による肺塞栓症を発症させ致死状況におちいる。そこで予備実験として菌を投与してから 24 時間観察し、マウスが死亡しな

い投与量は 1×10^9 cfu/100 μ l と判明した。本研究ではその 1/2 を安全域と考え、投与菌数を既述の如く定めた。

3.4 細胞培養

マウス肺がん由来 LLC 細胞は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) に 10% fetal bovine serum (FBS) と、ペニシリン G100 U/ml とストレプトマイシン 100 μ g/ml を加えた培地を用い、37°C 5% CO₂ の条件下で培養した。

3.5 *L. casei* の腫瘍局在性および抗腫瘍効果

8 週齢の雄性 C57BL/6 マウス (日本エスエルシー株式会社) に、LLC 細胞を 1×10^6 cells/50 μ l を鼠径部に皮下移植した。腫瘍長径が 5mm になったところで、*L. casei* KJ686 を菌濃度 5×10^8 cfu/100 μ l、1 日 1 回、2 日間連続尾静注した。

腫瘍長径を A、短径を B にし $1/2 \times A \times B^2$ を腫瘍の大きさとして連日測定した。

腫瘍長径が 17mm になったところで屠殺した。採取した臓器を 10 倍量の嫌気希釈液に入れホモジナイズし 100 μ l を MRS 寒天培地に塗布し嫌気的環境で培養した。

3.6 グラム染色

摘出した腫瘍をグラム染色した。染色液は、neo-B&M ワコー (和光純薬株式会社) を用いた。染色後、顕微鏡で観察した。

3.7 in vitro における検討

3.7.1 colony forming assay

LLC 細胞を 6 well plate (Falcon) に 500 cells/well 播種した。翌日、菌培養上清を 10% 量にして添加した。8 日後、10% ホルマリン液 (和光純薬株式会社) とクリスタルバイオレット液 (和光純薬株式会社) で固定染色した。

3.7.2 上清の回収

L. casei KJ686 を MRS 液体培地で嫌気的環境で培養し、遠沈 (3000rpm, 1 時間, 4°C) し、上清を除去した。PBS(-) で 2 回洗浄して、菌濃度

1×10^6 - 1×10^8 cfu/100 μ l になるように DMEM を加え嫌気的環境で培養した。24 時間後、遠沈 (12000rpm, 10 時間, 4°C) し上清を回収した。

3.7.3 分子量別で分離

回収上清は、限外濾過フィルター (日本ミリポア株式会社) を用いて分子量の違いにより 6 つの分画に分離した (100KDa 以上、100K-50KDa、50K-10KDa、10K-3KDa、3K-1KDa、1KDa 以下)。分画上清は DMEM で volume を統一した。colony forming assay で活性を評価した。

3.7.4 水溶性と脂溶性の分離

活性が認められた 1KDa 以下の上清 1ml と酢酸エチル (和光純薬株式会社) 1ml を加えてよく混合した後遠沈した。水層と有機層を別

の容器に分けて、ドラフトチャンバに2日間入れ乾燥した。有機層分画として得られた物質については、DMEM 90 μ l と DMSO (和光純薬株式会社) 10 μ l を加え1時間 voltex し DMEM 900 μ l を加えた。各分画の溶液は、colony forming assay に用いた。

3.7.5 疎水性樹脂を用いた分離

疎水性樹脂 ダイイオン HP20 (三菱化学株式会社) をカラムに充填し、既述した通り抗腫瘍効果をもつ上清 (1KDa 以下、水溶性) を 20ml 加え、滴下液 20ml を回収した。濃度が異なるメタノール液 (20%、40%、60%、80%、100%) 20ml をカラムに順次加え、滴下液を 20ml 回収する。デシケータ (三商株式会社) を用いて濃縮し、凍結乾燥した。各分画の final volume が 5ml になるように滅菌純水を加えた。各分画の溶液は、colony forming assay に用いた。

4. 研究成果

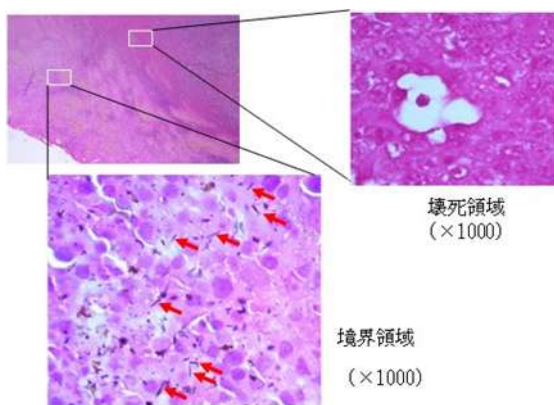
4.1 in vivo における検討

4.1.1 菌の局在性

L. casei KJ686 を担がんマウスに尾静注し、正常組織とがん組織で菌の局在性を検討した。がん組織では菌が認められ、正常組織 (肺、肝) では菌が認められなかった (図1)。



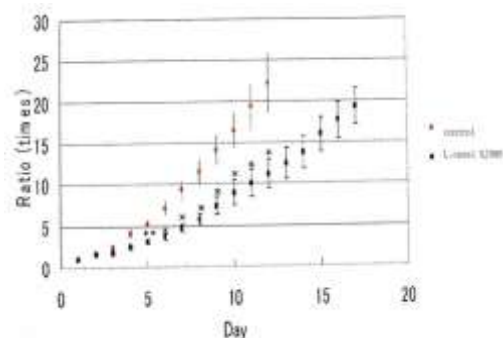
また、菌投与9日目に腫瘍組織をグラム染色した。その結果、壊死している領域との境界域で菌の局在が認められた。一方、壊死領域内では菌の局在が認められなかった (図2)。



4.1.2 腫瘍増大率

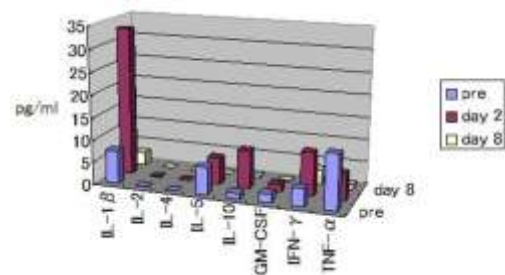
担がんマウスに L. casei KJ686 を尾静注し、腫瘍増大率を投与群 (n=25) と非投与群 (n=36) で比較した。L. casei KJ686 投与群では5日目から非投与群と比べ腫瘍増殖抑制効

果が認められその体積に差があらわれ始めた。その差は徐々に増大した (図3)。



4.1.3 サイトカインの推移

腫瘍組織の境界領域でサイトカイン (IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、GM-CSF、IFN- γ 、TNF- α) のRNA発現量を検討した。その結果一過性に多少の上昇を示すものもあったが恒常的な有意差は認められなかった (図4)。



そこで、L. casei KJ686 の直接的な作用と考え、抗腫瘍効果のある物質を特定するため in vitro で検討した。

4.2 in vitro における検討

4.2.1 分子量による分離

L. casei KJ686 の上清を分子量別に6分画 (100KDa 以上、100K-50KDa、50K-10KDa、10K-3KDa、3K-1KDa、1KDa 以下) に分離し colony forming 阻害効果で評価した。control 群として DMEM を同様の方法で分子量別に分け比較した。その結果菌培養液上清 1KDa 以下の分画で活性が認められ、他の分画にはほとんど活性が認められなかった。

4.2.2 熱処理

1KDa 以下の L. casei KJ686 の上清分画を 100°C 10 分間で熱処理し colony forming 阻害効果を評価した。その結果熱処理に拘わらず同等の活性が認められた。

4.2.3 極性による分離

活性が認められた 1KDa 以下の上清を、酢酸エチルを用いて水溶性と不溶性の2分画に分離し colony forming 阻害効果で評価した。control 群として DMEM を同様の方法で分離し比較した。その結果水溶性の分画に活性が認められ、不溶性の分画にはほとんど活性が認

められなかった。

4.2.4 疎水性樹脂による分離

活性が認められた 1kDa 以下で水溶性の上清を、疎水性樹脂に流し込み滴下液を回収した。さらに濃度が異なるメタノールを加え滴下液を回収し colony forming 阻害効果を評価した。control 群として DMEM を同様の方法で分離し比較した。その結果、どの分画にも有意な活性が認められなかった。

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 4 件)

①藤森 実、腫瘍をめぐる Q&A Question31 転移性乳癌における新規 drug delivery system—組換えビフィズス菌製剤の開発—について教えてください、Surgery Frontier、査読無、Vol.18(2)、2011、69-71

②Fujita T, Murayama K, Hanamura T, Okada T, Ito T, Harada M, Komatsu A, Koyama H, Kanai T, Maeno K, Mochizuki Y, Hama Y, Ito K, Amano J, Fujimori M, CSLEX (Sialy Lewis X) is a useful tumor marker for monitoring of breast cancer patients、Jpn J Clin Oncol、査読有、41 巻、2011、394-399
DOI:10.1093/jjco/hyq190

③Taniguchi S, Fujimori M, Sasaki T, Tsutsui H, Shimatani Y, Seki K, Amano J、Targeting solid tumors with non-pathogenic obligate anaerobic bacteria、Cancer Sci、査読有、101巻、2010、1925-1932
DOI:10.1111/j.1349-7006.2010.01628.x.

④藤森 実、組換えビフィズス菌製剤を用いたヒト癌治療、乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス、査読無、日本乳酸菌学会編、2010、576-580

[学会発表] (計 7 件)

①藤森実、転移性乳癌治療における新規 Drug Delivery System—組換えビフィズス菌製剤の開発—、第111回日本外科学会定期学術集会、2011年5月26日、誌上発表(震災の為紙上開催)

②藤森実、組換えビフィズス菌製剤による腫瘍選択的治療—米国におけるphase-1 study—、第18回日本乳癌学会学術総会、2010年6月25日、さっぽろ芸術文化の館(札幌)

③藤森実、組換えビフィズス菌製剤を用いた固形癌の腫瘍選択的治療剤の開発、第14回腸内細菌学会(招待講演)、2010年6月18日、京都大学(京都府)

④藤森実、新規Drug Delivery Systemとベバシズマブ併用による転移再発乳癌の治療戦略、第17回日本乳癌学会学術総会、2009年7

月4日、ホテル日航東京(東京)

⑤藤森実、組換えビフィズス菌製剤を用いた固形癌の嫌氣的環境を標的とした腫瘍選択的治療、第109回日本外科学会定期学術集会、2009年4月2日、福岡国際会議場(福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤森 実 (FUJIMORI MINORU)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：00262725

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：