

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659791

研究課題名(和文)組換え体乳酸菌を用いた頭頸部進行・再発癌に対する遺伝子治療の開発と臨床応用

研究課題名(英文)Development and clinical application of gene therapy of the advanced and recurrent head and neck cancer using transformed lactobacillus

研究代表者

浅田 行紀 (ASADA, Yukinori)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：70436103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：ヌードマウスに頭頸部扁平上皮癌細胞株HSC2、SASを移植し形成した腫瘍にIL2導入組換え体乳酸菌(lactobacillus casei)あるいはベクターのみの乳酸菌を5日間連続局所注入すると、SASではIL2導入乳酸菌、HSC2ではIL2導入乳酸菌とベクターのみの乳酸菌で有意に腫瘍抑制効果を示した。一部で腫瘍の消失も確認された。腫瘍抑制効果の得られた乳酸菌局所注入ヌードマウスの血清中でTNF、IL12などのインターロイキンが大幅に増加していることが明らかとなり、Th1型の免疫誘導を行うことが予想された。腫瘍内には乳酸菌を認めたが、肺、肝、腎など主要臓器に乳酸菌は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Two cell lines originated from head and neck squamous cell carcinoma, HSC2 and SAS were used to make transferred tumors on the back of nude mice. We administered two kinds of transformed lactobacillus casei into which IL2 gene and only vector plasmids were introduced. We used 5-day consecutive administration schedule. IL2-introduce lactobacillus showed significant tumor suppressive effects on SAS and HSC2. On the other hand, vector plasmid-introduce lactobacillus showed suppressive effects on HSC2. One nude mouse showed complete regression of the HSC2 tumor against IL2-introduce lactobacillus. Serum level of TNFa, IL12, and so on were significantly elevated in the lactobacillus administrated mice indicating the Th1 type immune response. Lactobacilli were observed in the tumor tissue of the mice, but was never observed in primary organs such as lung, liver, kidney.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：7309

キーワード：組換え体乳酸菌 頭頸部癌 腫瘍免疫 遺伝子治療 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療は現在のところ主にウイルスベクターを用いる方法が一般的となっている。ウイルスベクターは種々のものが開発されているがいずれも一長一短であり、致死的な副作用も出現することから臨床試験が中断されたプロジェクトもあり、一時の機運の高まりとは逆に研究が沈滞している。一方で細菌を癌の治療に用いようという考えは一世紀以上も前から存在し、丹毒などの病原菌を用いて腫瘍を消失させたという報告が1900年頃からなされている。現在の分子生物学的技術を用いれば細菌を感染病原体として用いるのではなくベクターとして治療を目的とした任意の遺伝子を癌組織内に導入することは比較的容易である。

こうした療法は進行・再発癌に対して単独で用いられるばかりでは無く、化学療法・放射線治療との併用なども可能であり、種々の癌治療への応用範囲は広いと考えられる。

国内を含めて細菌を用いた癌治療についての研究は主に *in vitro*, *in vivo* の基礎的研究が進められている。用いられる細菌としては *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Salmonella* が中心である。これまで我々は頭頸部癌組織に *Streptococcus anginosus* が感染し存在していることを明らかにしてきた (Tateda M. et al. *International Journal of Molecular Medicine* 2000, Shiga K. et al. *Oncology Reports* 2001)

乳酸菌は常在菌でもあり、感染性も低く場合によっては凍結乾燥粉末を経口で用いることも可能であると言う利点を持っている。他臓器などへの感染が明らかになれば抗生剤による駆除も可能であると言う利点もある。このようにウイルスベクターに比し有用な点の多い乳酸菌ベクターであるが、すでに国内の施設では、*Bifido-bacterium longum* 菌をベクターとして用い、この菌が静注で癌組織に選択的に集積する性質を利用した遺伝子治療の試みが始まっている。我々は静注よりもより安全性が高いと考えられる局所投与を用いた頭頸部癌の遺伝子

治療を目指している。

2. 研究の目的

乳酸菌そのもの、あるいは乳酸菌をベクターとして用いた新しい進行癌の局所治療、全身療法を開発する。これは特に頭頸部癌の最大の特徴である視・触診可能な範囲にあるという点を最大限に利用して、進行癌に対する安全で強力な治療法の確立をめざすものであるが、種々の臓器の癌にも応用可能と考えられる。

進行癌は手術療法はもちろんのこと放射線治療、化学療法の発達により予後の向上が図られてきている。しかしながらいずれの治療法にも抵抗性で残存・再発する腫瘍は必ず存在し、その治療に日々頭を悩まされる患者、主治医が多いことも事実である。進行・再発癌に対する安全で効果的な治療法が使用できるようにすることがこの研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) ヌードマウスへの頭頸部扁平上皮癌細胞の移植と腫瘍形成

ヌードマウスにヒト頭頸部扁平上皮癌の細胞株 (SAS、HSC2、HSQ89、RPMI2650) を側背部皮下に移植し、ノギスで経時的に腫瘍体積を測定する。

腫瘍体積は以下の式を用いて算出する。

$$\text{腫瘍体積(mm}^3\text{)} = \text{長径(mm)} \times [\text{短径(mm)}]^2 \times 0.4$$

(2) 腫瘍内への乳酸菌の局所注入

腫瘍体積が目的の大きさに達したところで、腫瘍体積がほぼ均等になるように 3-4 匹ずつ 3 群に分け、乳酸菌組換え体 (以下 IL-2 産生菌、IL-2(+)菌) 注入群、乳酸菌非組換え体 (以下 IL-2 非産生菌、IL-2(-)菌) 注入群、対照群とする。乳酸菌は 5 日間連続投与実験では 1 回あたり 1.0×10^8 cfu 注入し、対照群には PBS を注入する。腫瘍の大きさを計時的に

測定する。

(3) 乳酸菌とその培養

乳酸菌は共同研究者である国立医薬品食品衛生研究所 五十君静信先生より供与された次の2種を用いる。

組換え体 KJ474 株：
Lactobacillus casei
KK378(pLP:hIL2) EM^r

非組換え体（空ベクター）：
Lactobacillus casei
KK378(pLP:Empty) EM^r

乳酸菌の培養はまずグリセリンストックを、MRS 寒天平板培地を用いて画線培養する。培養は三菱ガス化学(株)のアネロパウチ・ケンキと専用パウチ袋を用いて、嫌気下 37 °Cで行う。48 時間後、出現したコロニーのうち平均的な大きさのものを数個採取し、MRS 寒天平板培地を用いて嫌気下で画線培養する。48 時間後、出現したコロニーのうち、大きいものを 1 個採取し、MRS 液体培地を用いて嫌気下で液体培養する。液体培養にはスクリーキャップ付き 15mL の遠沈管を使用し、MRS 液体培地を 5mL 入れる。コロニーを懸濁後、スクリーキャップを半分程度締め、パウチ袋内で立てたまま 37 °Cで嫌気培養を行う。

(4) 5 日間連続投与による腫瘍抑制効果の検討

これまで我々が行ってきたのと同様の手法で頭頸部扁平上皮癌移植ヌードマウスを 3 群に分け、それぞれ形成された腫瘍に乳酸菌組換え体 (IL-2(+)) 菌)、乳酸菌非組換え体 (IL-2(-)) 菌)、対照の PBS を局所注入する。注入は臨床応用を考え、5 日間の連続投与とする。

腫瘍抑制効果の判定

その後、動物実験施設で飼育を続け、腫瘍体積、体重、摂食量などを観察する。腫瘍体積を計算し、その腫瘍抑制

効果を検討する。

安全性の検討

同時に、死亡したヌードマウスの腫瘍組織、肺、肝臓、腎臓、脾臓、心臓などを摘出し、一部を冷凍保存、一部をホルマリン固定する。組織中の変性など病変の有無を検討する。

免疫組織化学的検討

腫瘍免疫の検討のため、組織を種々のサイトカイン抗体で染色し、その関与を検討する。

血清中サイトカインの検討

ヌードマウスの一部を経時的に sacrifice し、血液を採取する。血液中のサイトカイン、IL2、IL4、IL5、IL10、IL12、GM-CSF、IFN- γ 、TNF- α を測定し、どのような免疫系の賦活化が惹起されているかを検討する。

グラム染色でマウスの組織を染色し、組織中の乳酸菌の有無を検討する。

(5) 長期実験

同様の手法で頭頸部扁平上皮癌移植ヌードマウスを 3 群に分け、それぞれ形成された腫瘍に乳酸菌組換え体 (IL-2(+)) 菌)、乳酸菌非組換え体 (IL-2(-)) 菌)、対照の PBS を局所注入する。注入は臨床応用を考え、5 日間の連続投与とする。これを等間隔で 2 週間ごとに行って腫瘍抑制効果の増強や生存率を検討する。

腫瘍抑制効果の判定

安全性の検討

免疫組織化学的検討

血清中サイトカインの検討

グラム染色

以上は短期実験と同様に行う。

4. 研究成果

ヌードマウスに頭頸部扁平上皮癌細胞株 HSC2 を移植し形成した腫瘍に組換え体乳酸菌 (lactobacillus casei) を 5 日間連続局所注入した。IL2 導入乳酸菌は明らかに 14 日目でコントロール (PBS 注入群) に比し、有意に腫

瘍抑制効果を示した。さらにこの8日後(22日目)には1匹で腫瘍の消失を確認した。HSC2では空ベクターを導入した乳酸菌でも同様な腫瘍抑制効果を認めた。SASでは同様にIL2導入組換え体乳酸菌で有意な腫瘍抑制効果を認めたが、HSC2で認められた空ベクター導入乳酸菌による腫瘍抑制効果は認めなかった。これらの結果からIL2導入組換え体乳酸菌は腫瘍抑制効果を持つことが確認された。さらに乳酸菌自体にも腫瘍抑制効果がある可能性が示唆された。今後は乳酸菌の成分分画で腫瘍抑制効果を検討する予定である。

組換え体乳酸菌を注入したマウスでは血清中のサイトカインの中でIL2、IL4は微増、IL5、IL10、IFN- γ は増加していた。また、TNF α 、IL12は大きく増加を示していた。このことから組換え体乳酸菌はマウスに腫瘍免疫を誘導する可能性が示唆された。増加しているサイトカインのタイプからTh2型の腫瘍免疫賦活作用が示唆された。

注入したマウスの腫瘍内には乳酸菌が確認されたが、肺、肝、腎などの腫瘍臓器には乳酸菌は認められなかった。

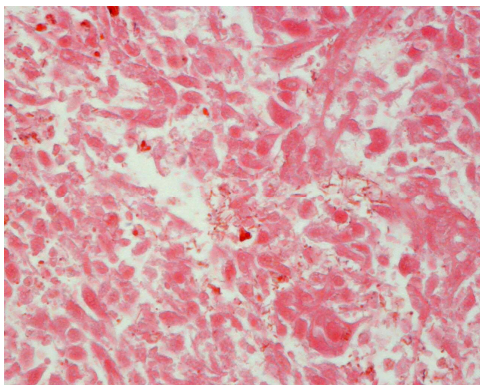


図1.腫瘍組織内の乳酸菌

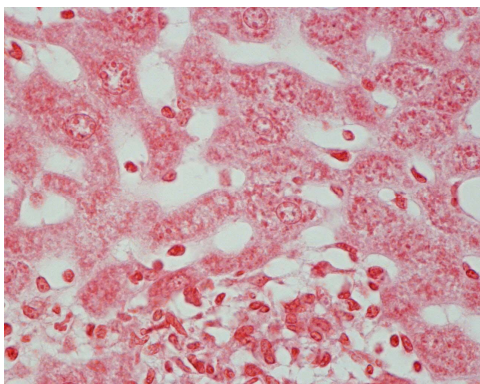


図2.肝臓

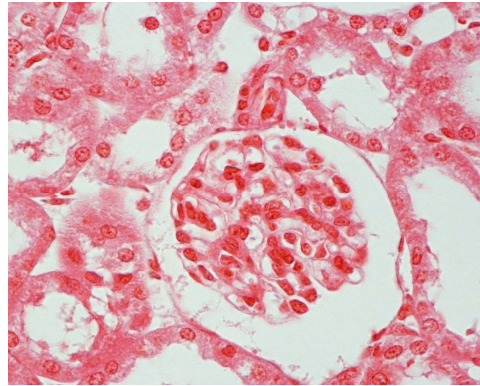


図3.腎臓

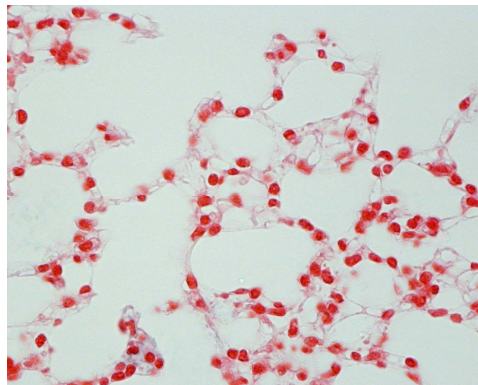


図4.肺

短期実験に続いて長期実験を行ったが、短期実験同様に組換え体乳酸菌注入群では腫瘍抑制効果を示し、腫瘍の体積に差はあるものの乳酸菌注入群がコントロール群と比較して生存率が著名に延長する現象は認めなかった。これは腫瘍が大きくなると歩行などの腫瘍以外の要因が関わって来て、摂食が自由にできなくなるなどで死亡する可能性が考えられた。

【結論と考察】

これまで行って来た研究で腫瘍に直移注入することによりIL2組換え体乳酸菌、あるいは乳酸菌そのものに腫瘍抑制効果が認められることが確かめられた。また、この治療法は安全である事の傍証が得られた。さらに乳酸菌による腫瘍免疫誘導の可能性が示唆された。今後はいかなる成分が関連しているかが焦点となる。現在これらの成果を論文にまとめる作業中である。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅田 行紀 (ASADA YUKINORI)
東北大学・医学系研究科・非常勤講師
研究者番号：70436103

(2)研究分担者

志賀 清人 (SHIGA KIYOTO)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：10187338

(3)連携研究者

()

研究者番号：