

平成 21 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591505
 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） Genetically engineered *Bifidobacterium* as a drug delivery system for systemic therapy of metastatic cancer patients

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：今回われわれは、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、新しい腫瘍選択的治療として嫌気性菌に遺伝子を導入する事を着想した。ビフィズス菌の一種 *Bifidobacterium breve* (*B. breve*) に抗がん剤の前駆物質 5FC を 5FU に変換する酵素であるサイトシンデアミナーゼ遺伝子を導入しタンパク発現を確認した。さらに、担癌マウスへ *B. breve* を全身投与した結果、腫瘍選択的成育性を証明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬系

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：腫瘍選択的治療法、嫌気性菌ベクター、Prodrug/Enzyme 療法

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篤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。研究開始までに、ヒト常在菌である *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) 菌を、担癌動物に静脈内全身投与すると腫瘍組織でのみ特異的に集積・増殖する

ことを証明している (K. Yazawa et al. *Cancer Gene Ther*, 7, 269-74 (2000).)。また、Prodrug/Enzyme 療法に用いられる *Cytosine Deaminase* (CD) 遺伝子を導入したプラスミドを保持させた *B. longum* 菌を用いた担癌ラットの治療実験において、抗癌剤前駆体 5-fluorocytosine との併用療法により、担癌ラットの腫瘍内の局所にのみ抗癌剤 5-fluorouracil が変換されて存在し、腫瘍体積の縮小効果があることを証明した (M. Fujimori et al. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 5, 200-3 (2002), T. Sasaki et al. *Cancer Sci*, 97, 649-57 (2006))。この治療法を BEST-CD (*Bifidobacterial selective*

targeting cytosine deaminase) 療法と名付けている。

欧米でも腫瘍内の嫌気的環境をターゲットにし、菌類をベクターとして用いる固形癌の遺伝子治療が注目されている。Fox ら (Fox ME et al., Gene Ther 3:173-178, 1996) は、嫌気性菌の *Clostridia* を用いた検討を進めている。また、Pawelek ら (Pawelek et al., Cancer Res. 57:4537-4544, 1997) は、栄養要求性菌の *Salmonella typhimurium* を tumor targeting に応用しており、同菌を用いた臨床試験がすでに行われている。(Cunningham C et al., Hum Gene Ther. 2001 Aug 10;12(12):1594-6) しかし、*Clostridia* などはヒトの体内において病原性を有することから、必ずしも、固形腫瘍の遺伝子治療において安全な遺伝子輸送担体とはいえない。*Salmonella typhimurium* については毒性を抑制させる mutation を起こすことで安全性を確保している一方、腫瘍特異性に関しては肝臓への集積が少なからず認められる点に問題がある。われわれの BEST-CD 療法は、非病原性で常在菌を用いるところが画期的である。

2. 研究の目的

本治療法は腫瘍内に存在する菌濃度とその菌が産生する抗癌生理活性物質の量が治療効果に直結する。腫瘍内の末梢血管や細胞の間隙等限られた空間において選択的に成育すると考えられるこれらの菌は、菌自体が占める体積も菌濃度を考慮する上で重要な因子である。すなわち、腫瘍内で成育する菌濃度を増やすためには、体積の小さな菌を用いることが有利だと考えられる。ピフィドバクテリウム属の菌の中には、ヒト常在性の非病原菌として知られている菌種が 4 種存在する (*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*)。その内、*Bifidobacterium breve* (*B. breve*) は、brief (短い) から由来するその名の通り、他のピフィドバクテリウム属と比較して短い菌形が特徴の菌である。従って、本研究の目的は *B. breve* を用いた BEST-CD の実現の可能性を検討することである。

3. 研究の方法

われわれはすでに分子生物学的な研究が遅れている *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) で複製するシャトルプラスミド (pBLES100) を開発し、また、*B. longum* で効率よく発現するプロモーター (HU プロモーター) のクローニングとその活性を示した。しかし近年、pBLES100 の構成配列である *B. longum* 由来のプラスミド pTB6 の全配列が決定され、構成核酸のアノテーションが

なされた結果、今まで不明であった *B. longum* における複製起点 (*oriV*) の配列が推定された。そこで、本研究では最初に、推定された配列を元に、*B. longum* の *oriV* を最も効率よく利用した新規の改良型シャトルプラスミド作成を目指す。*B. longum* 菌内でより効率よく複製されるシャトルプラスミドを作成することで、同じ *Bifidobacterium* 属の内、プラスミドを保持できる菌種において複製保持されるユニバーサルなシャトルプラスミドが構築できると考えられる。次に、導入したシャトルプラスミドにおいて、各菌種において、治療遺伝子 (*Cytosine Deaminase*) を高発現させることができるかどうかを検討する。また、これまでの菌種 (*B. longum*) と比較して優れているかどうかを、酵素学的に評価する。

4. 研究成果

今回われわれは、*Bifidobacterium breve* (*B. breve*) を用いた BEST-CD 療法実現の可能性を検討する目的で *B. breve* 1-53-8w 株にプラスミド pAV001-HU-eCD を導入 (図 1)。ウェスタンブロット解析にて組換え菌 Bbr11-eCD の CD タンパク発現を確認した (図 2)。さらに、プラスミド安定性試験で、50 世代培養後も組換え *B. longum* 菌に比べ Bbr11-eCD におけるプラスミド保持率が 100% であることを証明した (図 3)。さらに担癌マウスへ *B. breve* を全身投与した結果、腫瘍選択的成育性を証明した (図 4)。本治療法は腫瘍内に存在する菌濃度とその菌が産生する抗癌生理活性物質の量が治療効果に直結する。腫瘍内の末梢血管や細胞の間隙等限られた空間において選択的に成育すると考えられるこれらの菌は、菌自体が占める体積も菌濃度を考慮する上で重要な因子である。*B. breve* は、他のピフィドバクテリウム属と比較して短い菌形が特徴の菌であり、BEST-CD 療法の安全性を向上させる意義が高いと考えられる。

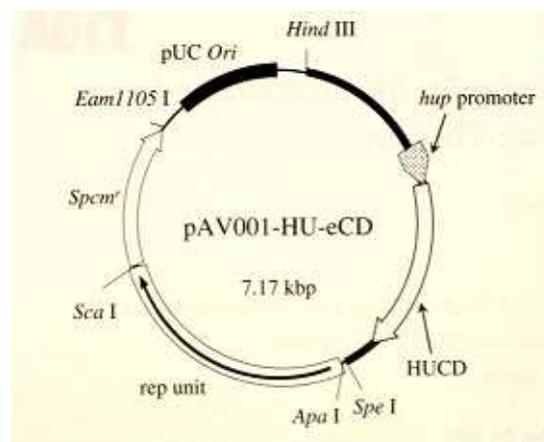


図 1 プラスミド pAV001-HU-eCD

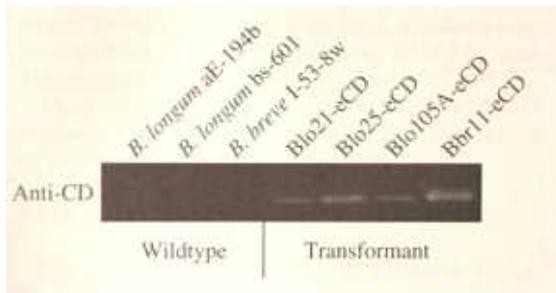


図2 ウェスタンブロット

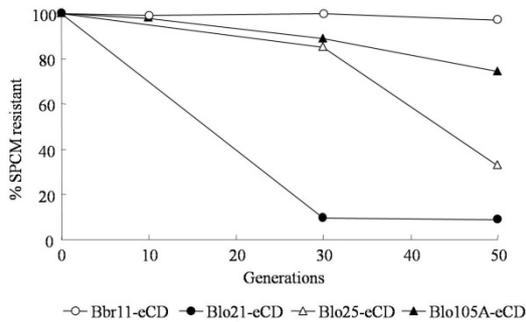


図3 プラスミド保持率

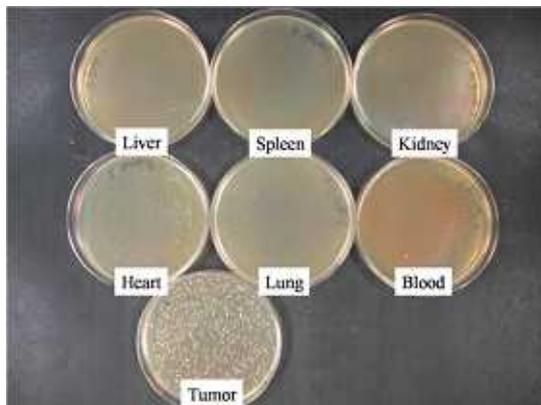


図4 腫瘍選択的成育性

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)

藤森 実、組換えピフィズス菌製剤を用いた固形がんの嫌氣的環境を標的とした腫瘍選択的治療、Drug Delivery System、23-5、560-566、2008、査読無
藤森 実、組換えピフィズス菌製剤を用

いた乳癌の腫瘍選択的治療、日本臨床、66、1211-1218、2008、査読無
 Hidaka A, Hamaji Y, Sasaki T, Taniguchi S, Fujimori M、
 Exogeneous Cytosine Deaminase Gene Expression in Bifidobacterium breve I-53-8w for Tumor-Targeting Enzyme/Prodrug Therapy、
 Biosci. Biotechnol. Biochem、71、2921-2926、2007、査読有

[学会発表](計 4件)

Fujimori M、Genetically engineered *Bifidobacterium* as a drug delivery system for systemic therapy of metastatic breast cancer patients

Second JCA-AACR Special Joint Conference

The Latest Advances in Breast Cancer Research From Basic Science to Therapeutics 2008.7.15

The Westin Hotel

Awaji Island Hyogo, Japan

藤森 実、嫌氣的環境を標的とした転移性乳癌の腫瘍選択的治療

第16回 日本乳癌学会総会 2008.09.27
 大阪国際会議場

藤森 実、Hypoxia を分子標的とした腫瘍選択的治療薬：APS001 における

Translational research の現状

第15回日本乳癌学会学術総会 2007.6.30
 パシフィコ横浜

Hamaji Y, Fujimori M

Strong enhancement of

recombinant cytosine deaminase activity in *Bifidobacterium longum* for

tumor-targeting enzyme/prodrug therapy

American Association for Cancer

Research Annual Meeting 2007 2007.4.15
 Los Angeles convention center

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

なし

(3)連携研究者

なし

