

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14415

研究課題名(和文) 合成生物学的戦略によるがん治療用細胞傷害性T細胞インスパイアード細菌マシンの創製

研究課題名(英文) Discovery of Cytotoxic T Lymphocyte-inspired Bacteria Machine for Cancer Therapeutic Use Based on Synthetic Biological Approach

研究代表者

向井 英史 (Mukai, Hidefumi)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：60570885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：応用微生物学や合成生物学における研究成果の医療応用は安全性の観点からハードルが高く、環境問題や食糧問題などが主たる応用の対象であった。しかし、高価なバイオ医薬品の登場や高齢化社会の到来による医療費の高騰に対し、遺伝子改変細菌などを利用した診断や治療は、非常に安価な医療を提供できると考えられる。本研究では、標的細胞親和性リガンドや細胞傷害性タンパクなどの遺伝子で大腸菌を形質転換することで、治療用細菌マシンを作製し、その生体内・細胞内分布や機能を評価した。こうした知見は、安全で治療効果の高いがん治療用細菌マシンの開発戦略の一つになるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Bacterial cancer therapy, where bacteria are used as a gene expression system for exogenous protein of interest in bodies, starts to attract attention. The reports demonstrating the selective survival and growth of some anaerobes in tumor opened up the current trend of bacterial cancer therapy. Their transformants expressing different cytokines and suicide genes such as cytosine deaminase and herpes simplex virus-thymidine kinase were generated and evaluated on their anticancer effects as well as safety. In this study, we constructed cytotoxic T lymphocyte-inspired bacteria machine using cancer cell-selective ligands, etc.

研究分野：ドラッグデリバリー、分子イメージング

キーワード：細胞治療 合成生物学 細菌 がん治療

1. 研究開始当初の背景

未来のがん治療ブレイクスルーのヒントは、現在隆興しつつある科学基盤技術の中にある。バイオテクノロジーの進歩が抗体医薬や遺伝子治療、細胞治療に結びついたように、進展著しい合成生物学や応用微生物学のがん治療への応用は、社会に革新的な変化をもたらすと期待される興味深い研究課題である。

これまでは、応用微生物学や合成生物学における研究成果の医療応用は安全性の観点からハードルが高く、環境問題や食糧問題などが主たる応用の対象であった。しかし、高価なバイオ医薬品の登場や高齢化社会の到来による医療費の高騰に対し、遺伝子改変細菌などを利用した診断や治療は、非常に安価な医療を提供できると考えられる。こうした研究分野は端緒に付いたばかりであるが、医療応用を見据えた明確な機能集積戦略を提示・蓄積していくことで、研究においても産業においても大きなチャンスが広がるものと期待される。

2. 研究の目的

合成生物学的アプローチに基づく、免疫系の中でも特に高度に進化したエフェクター細胞である細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) を模倣・高機能化したがん治療用細菌マシンの創製を着想した。CTL は、選択的な細胞の捕捉、パーフォリンによる細胞膜孔の形成、グランザイムなどのアポトーシス誘導物質の注入により、標的細胞を破壊する特長を持つ。そこで、本研究では、標的がん細胞捕捉素子などを細菌類へ適切にパッケージングすることで、がん治療用 CTL インスパイアード細菌マシンの構築を目指す。

3. 研究の方法

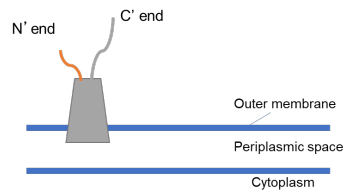
標的細胞親和性リガンドや細胞傷害性タンパクなどの遺伝子で大腸菌を形質転換することで、治療用細菌マシンを作製し、その生体内・細胞内分布や機能を評価した。

4. 研究成果

がん治療用細菌マシンを目的とした RGD ペプチド提示大腸菌の作製とがん細胞に対する相互作用の評価

多くのがん細胞表面に高発現し内在化機構を持つインテグリンに対して高親和性をもつ RGD ペプチドを表面に提示した細菌を作製し、がん細胞との相互作用について評価を行った。具体的には、Enhanced circularly permuted outer membrane proteinX (eCPX) を足場タンパクとする RGD 提示大腸菌について、蛍光顕微鏡観察やフローサイトメトリーにより、ペプチドの表面提示やインテグリンを高発現するがん細胞 (U87MG) との相互作用などについて評価した。eCPX による菌表面へのペプチドの提示は、対数増殖期や静止期

などの培養状態に影響を受けにくく、90% 程度の提示率を維持した。また U87MG 細胞との共培養実験では、RGD 提示菌は、対照群の Streptavidin binding peptide 提示菌に比べて、U87MG 細胞に対して顕著に高い接着性を示し、インテグリン - RGD 相互作用の関与が示唆された。さらに、高解像度蛍光顕微鏡観察によると興味深いことに RGD 提示菌は U87MG 細胞に内在化していた。これらの結果は、細菌モリボソームなどの微粒子と同様の戦略で細胞内への移行を促進可能であることを示唆しており、がん細胞内に侵入し、薬物産生する治療用大腸菌マシンの開発に有用な知見である。



- Biterminal peptide display
- Improved efficiency of membrane localization

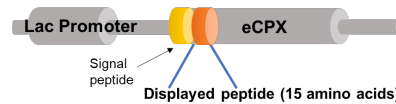


図 1. 足場タンパクとして eCPX を用いた標的細胞親和性リガンドの提示

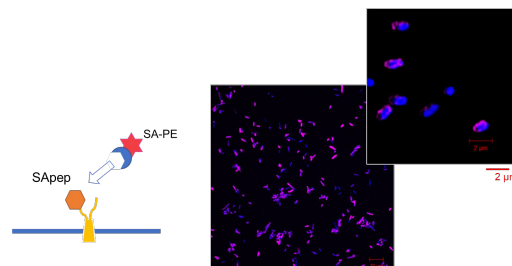


図 2. Streptavidin binding peptide を用いた表面提示効率の評価 (共焦点顕微鏡画像)

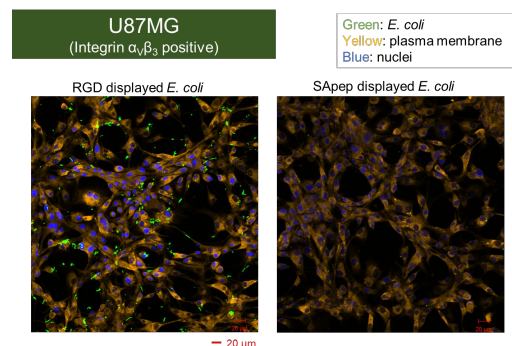


図 3. RGD ペプチドを提示した大腸菌とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 高発現 U87MG 細胞との相互作用 (共焦点顕微鏡画像)

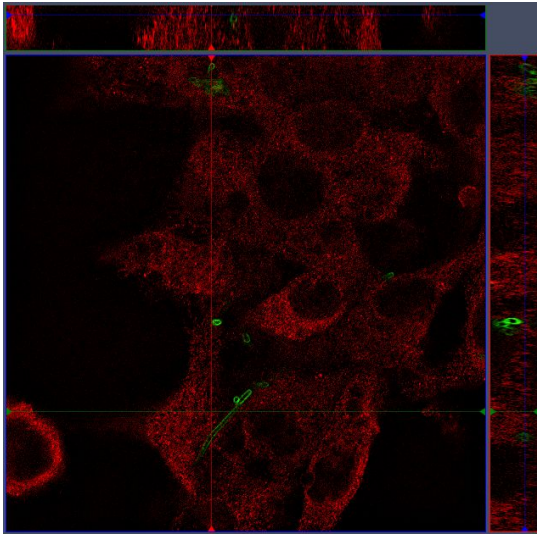


図 4. RGD ペプチドを提示した大腸菌の細胞内取り込みの様子

細胞内での抗がんタンパクなどの放出を目的に、Escherichia phage phiX174 E gene をアラビノース誘導下に発現する大腸菌を作製した。この改変大腸菌は、アラビノース添加により溶菌し、共発現した蛍光レポータータンパクや抗がんタンパクを放出した。また、液胞選択的に作用する抗生物質であるクロロキンをを用いた実験により、細胞内に取り込まれた大腸菌が液胞内に隔離されることを確認した。そのため、さらに、リステリアの液胞脱出に寄与する Listeriolysin O を OmpA 分泌シグナルペプチド下に恒常発現する大腸菌を作製し、その液胞脱出能を評価した。このような大腸菌の細胞内分布の制御は、がん細胞傷害と共に、炎症などの副反応の抑制にも応用できると考えられる。静脈内投与した大腸菌の大部分は肝臓や脾臓などに移行し、マクロファージなどに貪食され、炎症反応などの全身的な副作用を惹起すると考えられる。そのため、臨床で使用するバクテリアは弱毒化することが求められ、その結果十分な抗がん効果が得られていない。そこで、さらに、マクロファージに取り込まれた後の炎症応答を抑制するようにデザインした改変大腸菌を作製した。こうした知見は、安全で治療効果の高いがん治療用細菌マシンの開発戦略の一つになるものと期待される。

静脈内投与後腫瘍組織に生着した大腸菌のプラスミド維持の評価

嫌気性菌が静脈内投与後腫瘍組織に選択的に生着する特性を活かし、がん治療を目的とした遺伝子改変株の開発が進んでいる。高いコピー数が得られる利点から、プラスミドを用いて形質転換を行うことが多いが、抗生物質等によるセレクションを行うことが出来ない腫瘍内で形質が維持される必要がある。本研究では、腫瘍での大腸菌の継時的な増殖とプラスミド維持について評価した。アンピシリン耐性遺伝子と lux オペロンを持つ

プラスミドで形質転換した大腸菌を colon26 皮下移植マウスに静脈内投与した。腫瘍内大腸菌は投与後 7 日で、コロニー形成単位として約 106 倍、約 20 回分裂相当まで増加し、その後 3 週間菌体数は維持された。腫瘍における発光強度は 1 週間でピークに減少したが、抗生物質耐性は 3 週間後も維持された。更に、hok/sok 配列及び actin-like protein 7A を搭載したプラスミドを作製し、これらのプラスミド維持機構の腫瘍内における有効性を評価し、このシステムがプラスミドのハイコピーでの維持には不向きであることが明らかになった。

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 1 件)

Hidefumi Mukai, Maiko Takahashi, Yasuyoshi Watanabe, Potential usefulness of *Brevibacillus* for bacterial cancer therapy: intratumoral provision of tumor necrosis factor- α and anticancer effects. *Cancer Gene Therapy*, 査読有, 25, 2018, 47-57
doi:10.1038/s41417-017-0009-7

[学会発表](計 6 件)

野村祥子、Erike Sukowati、高橋麻衣子、渡辺恭良、向井英史、静脈内投与後腫瘍組織に生着した大腸菌のプラスミド維持の評価、第 34 回日本 DDS 学会学術集会、長崎ブリックホール(長崎県長崎市) 2018 年 6 月 22 日

向井英史、PET 分子イメージングを活用した創薬・医療と DDS 研究、金沢大学がん進展制御研究所 / 金沢大学新学術創成研究機構 異分野融合セミナー、金沢大学がん進展制御研究所(石川県金沢市) 2018 年 3 月 26 日

高橋麻衣子、向井英史、大腸菌からの刺激誘導型溶菌によるタンパク放出の検討、第 12 回 長野ミーティング 生物資源の有効利用を目指して、ラフォーレ倶楽部白馬八方セミナーホール(長野県北安曇郡白馬村) 2018 年 1 月 22 日~24 日

向井英史、イメージング活用創薬とバクテリアを使ったがん治療、第 10 回関西バイオ創薬研究会、グランフロントタワー B(大阪府大阪市) 2017 年 12 月 22 日

Hidefumi Mukai, Advanced drug delivery systems for medical innovation, The 4th RIKEN / Karolinska Institutet / SciLifeLab Joint Symposium, 神戸大学 先端融合研究環境統合研究拠点 コンベンションホール(兵庫県神戸市) 2017 年 11 月 17 日

高橋麻衣子、渡辺恭良、向井英史、がん治療用細菌マシンの目的とした RGD ペプチド提示大腸菌の作製とがん細胞に対する相互作用の評価、日本薬学会 第 137 年会、仙

台国際センター(宮城県仙台市) 2017年3月24日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向井 英史 (MUKAI, Hidefumi)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・ユニット

リーダー

研究者番号：60570885