

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K19622

研究課題名（和文）がん微小環境リモデリングのためのNO産生バクテリアマシンの開発

研究課題名（英文）Cancer microenvironmental remodeling with NO-producing bacterial machine

研究代表者

向井 英史（Mukai, Hidefumi）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（薬学系）・准教授

研究者番号：60570885

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：NO産生に関わる遺伝子の変異株についてNO産生能の解析を行いつつ、細菌の腫瘍内生着・増殖とがん微小環境リモデリングの関連を調べた。また、バクテリアマシンの体内動態評価のために、ポジトロンエミッショントモグラフィーの新規な標識法を開発した。ヒト臨床に近い腫瘍でも上手く生着・増殖・機能したサルモネラの弱毒化株は、大規模なネクローシスを含むがん微小環境リモデリングを誘導した。腫瘍血管の透過性亢進以外の独自の作用を発揮している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嫌気性細菌の一部の種は、静脈内投与後、重篤な副作用なく、腫瘍で選択的に生着・増殖し、この性質を利用した、がんに対するドラッグデリバリーシステム開発が期待される。生体内の材料を使って、必要な場所で、必要な時に、必要な量だけ薬物を作る、薬物の現地生産システムは、薬物治療の新しい潮流の開拓に繋がる。本研究の成果は、がん微小環境リモデリングをトリガーとする、がん治療用デザイナー細菌開発の有用な設計指針を与えるものである。

研究成果の概要（英文）：We investigated the relationship between bacterial growth in tumors and cancer microenvironmental remodeling, while analyzing the NO-producing ability of mutants of genes involved in NO production. We also developed a novel labeling method of bacteria to evaluate their biodistribution in the body with positron emission tomography. An attenuated strain of Salmonella that successfully grew and functioned in tumors close to human clinical practice induced cancer microenvironmental remodeling, including massive necrosis. It was suggested that the strain may exert unique actions other than increasing tumor vascular permeability.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：細胞治療 合成生物学 細菌 がん治療 一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

バイオエンジニアリングの進歩に伴って、薬剤を注射等の手段で投与する従来の薬物治療からのパラダイムシフトを引き起こし得る治療戦略が提案されてきている。薬物を全身投与する現在のがん治療戦略では、十分な薬効を得ながら、正常組織への分布により引き起こされる副作用を回避する理想的な治療の実現は、現存のどんなに優れたドラッグデリバリーシステム(DDS)技術を駆使しても、本質的に困難である。一方で、我々の体ではこういった問題は生じない。これは、当たり前であるが、生理活性物質が必要な場所で、必要な時に、必要な量だけ作られているためである。このような理想的な治療戦略が実現すれば画期的であり、私が考えている薬物の現地合成システムの発想である。例えば遺伝子治療がその1つである。これは、上記のような生体内で抗がん物質を産生するアプローチの先駆的なものと捉えることができる。様々な遺伝子産物を使った治療方法が提唱されているが、哺乳類細胞のタンパク産生効率がさほど高くないことから、十分な薬理効果が得られない場合が多い。

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。現状、薬物現地合成のための最も有望なアプローチがバクテリアを活用することであり、抗がんタンパクを産生するプレビパチルス菌や大腸菌の改変体を開発し、機能解析や抗がん作用を実証して来た (Cancer Gene Therapy, 2018;25:47-57)。この戦略はバクテリアの持つ転写・翻訳という最もシンプルなシステムを活用したものである。すなわち、効率的な物質産生システムであるバクテリアごと投与することにより、従来の遺伝子治療戦略の効果の劇的な向上、および、抗がん物質の対象を遺伝子産物であるタンパク以外へ大幅に拡張し得ると考えられる。

2. 研究の目的

嫌気性細菌の幾つかの種は、静脈内投与後、腫瘍組織に選択的に生着することが報告されており、この性質を利用し、DDS 研究ひいては薬物治療の新しい潮流を開拓すべく、がんに対する薬物の現地合成システムの開発を目指している。本研究では、抗がん作用を持つ生理活性物質の生体内産生を試みる。一酸化窒素(NO)産生バクテリアマシンなどによるがん微小環境のリモデリングを行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 各種細菌の ^{64}Cu 標識

対数増殖期にある細菌を生理食塩水中に懸濁し、2回 6,000 g で2分間の遠心洗浄を行った。洗浄後のバクテリアを再び生理食塩水に再懸濁し、約 50 MBq の ^{64}Cu CuCl_2 と混合した後、室温で5分間インキュベートした。生理食塩水による2度の遠心洗浄の後、37°C の LB 培地中で3分間インキュベートした後、遠心する操作を5回繰り返した。標識サンプルの放射活性は、標識開始時刻を基準に減衰補正した。

(2) 血清中での標識安定性評価

^{64}Cu 標識大腸菌を生理食塩水中に再懸濁し、BALB/cCrSlc 雄性マウスから採取した、等量の血清を加えた。37°C、15分間のインキュベートの後、6,000 g で2分間遠心し上清とペレットを分離して、それぞれの放射活性を 2480 WIZARD2 自動ガンマカウンター (PerkinElmer 社) を用いて測定した。ペレット画分の回収率は、減衰補正した放射活性を用いて算出した。

(3) PET 試験

Colon-26 細胞株の皮下移植担がんマウスを、1.5% イソフルラン及び亜酸化窒素/酸素 (7/3) による深麻酔下、microPET Focus 220 (Siemens 社) の中央に伏臥位に配置した。 ^{64}Cu 標識大腸菌 (約 5 MBq, 約 1×10^8 CFU) をマウス尾静脈に留置したカテーテルより投与し、30分間のダイナミックスキャンを行った。得られたエミッションデータからサイノグラムを作成し、microPET manager 2.4.1.1. (Siemens 社) を用いて画像再構成を行った。放射能は投与時刻に合わせて減衰補正し、ピクセルごとに SUV (standardized uptake value) を用いて表示した。SUV は以下の式に従って算出した。SUV = [tissue radioactivity concentration (MBq/cm³)]/[injected radioactivity (MBq)/body weight (g)]

(4) 弱毒化サルモネラの培養と投与

弱毒化 *Salmonella typhimurium* VNP20009 株 (ATCC 202165) を ATCC より購入した。改変 LB 培地中 37°C、130 rpm で回転振とうしながら培養した。Stationary phase に達するまで一晩前培養した。1/20 に希釈し、0.5-0.8 の光学密度が得られるまで1時間再培養した後、遠心分離した (10,000 × g, 25°C, 3分)。ペレットを生理食塩水で2回洗浄し、再懸濁した。投与直前に生理食塩水

で 1/10 に希釈した。 *S. typhimurium* VNP20009 ($1-4 \times 10^6$ CFU) を 1.5% イソフルラン麻酔下で、ヒト膀胱がん細胞株 BxPC-3 皮下移植マウスの尾静脈に注入した。

(5) ヘマトキシリン・エオシン (H&E) 染色

安楽死させたマウスから腫瘍組織を切り出し、4%パラホルムアルデヒド(PFA)で一晩固定した。ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水に浸漬し、パラフィンに包埋した。組織サンプルを薄切し、標準的なプロトコルに従って H&E で染色した。ただし、*S. typhimurium* VNP20009 投与後 7 日目のサンプルは、冷凍切片を用いた。すべての腫瘍標本は、Leica SCN400 スライドスキャナー (Leica Biosystems 社) を用いてスキャンした。

4. 研究成果

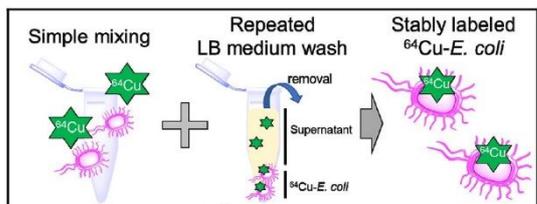
(1) NO 産生に関わる遺伝子の変異株の NO 産生能

バクテリアの細胞内で、NO は主として、アルギニンを材料に一酸化窒素合成酵素 (NOS) によって合成され、また、亜硝酸還元酵素 (Nrf) 反応により産生される。一方で、一酸化窒素ジオキシゲナーゼ活性を持つ Hmp により NO は硝酸イオンへと代謝される。フリーラジカルアナライザーにより log phase 後期時点の NO 濃度を評価したところ、Hmp 欠損大腸菌株 (Hmp 株) の培養系では 30nM 程度であり、通常の大腸菌株 (20nM 程度) と比較して顕著に高かった。Log phase では培養液の濁度の上昇に伴って NO 濃度も上昇するが、stationary phase 以降は逆に NO 濃度が低下することが明らかとなった。これらの結果は、大腸菌細胞内の代謝調節により細胞外の NO 濃度を制御可能であること、また、大腸菌の周辺環境変化によって NO 関連の代謝経路も影響を受けることを示唆している。

(2) 細菌の新規なポジトロン放出核種標識法の開発と PET 動態研究

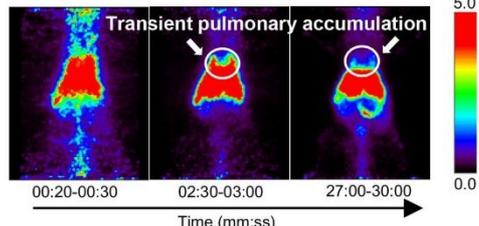
バイオソープションに基づく細菌の ^{64}Cu 標識化とその薬物動態学的陽電子放射断層撮影 (PET) への応用を検討した (下図)。グラム陽性菌とグラム陰性菌のいずれも、生理食塩水中で 5 分以内に ^{64}Cu 標識 Cu^{2+} イオンを効率よく標識することができた。大腸菌の標識率は、トリプシン前処理と過剰な Cu^{2+} イオンの共存により急激に低下し、大腸菌細胞表面に特異的な Cu^{2+} 結合部位が存在することが示された。 ^{64}Cu 標識大腸菌の精製には、LB 培地での洗浄が有効であり、血清中 15 分間インキュベートした後の標識安定性は約 90% であった。Colon-26 腫瘍担癌マウスを用いた動的 PET イメージングによると、 ^{64}Cu 標識大腸菌は直ちに血液循環から消失し、主に肝臓に蓄積した。さらに、一過性の肺分布が観察され、用量依存的に加速されることが確認された。遺伝子組み換えを伴わないバイオソープションに基づく細菌の ^{64}Cu 標識の簡便性と汎用性を考慮すると、 ^{64}Cu 標識細菌を用いた初期段階の薬物動態 PET は、細菌を介したがん治療の毒性面や、感染症における様々な細菌の病原性の評価に有望である。

Biosorption-based ^{64}Cu -labeling of bacteria



- Quick
- High efficient
- Without genetic modification
- With a wide scope of bacteria (Gram positive and negative)

Early-phase pharmacokinetic PET



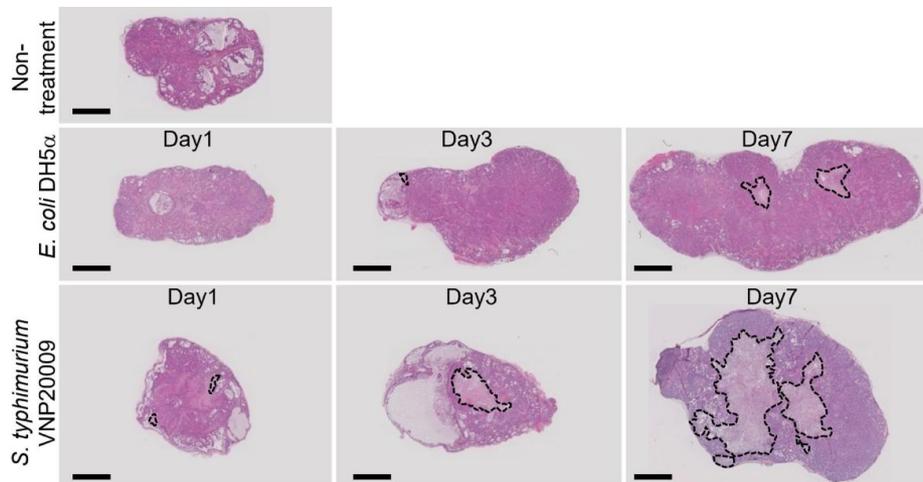
Potential application

- Investigation of bacterial pathogenicities in infectious diseases
- Assessment of toxicological aspects of bacteria-mediated cancer therapy

(International Journal of Pharmaceutics. 2020;590:119950 から許可を得て、Graphic abstract を転載)

(3) ヒト臨床に近い腫瘍モデルでの生菌製剤の生着・増殖とがん微小環境リモデリング

ヒト膀胱がん細胞株 BxPC-3 のマウス皮下移植腫瘍のような、ヒト臨床に近い腫瘍 (豊富な間質、壁細胞により裏打ちされた血管構造、島状に分画されたがん細胞分布といった構造的特徴を持つ) では、大腸菌が上手く生着・増殖・機能しないことが明らかになった。弱毒化サルモネラがその代替として利用できる可能性を見出し、およそ半分の確率で BxPC-3 皮下腫瘍で生着・増殖できることが分かった。興味深いことに、弱毒化サルモネラの生着・増殖が認められた腫瘍では大規模なネクローシスが誘導され (下図)、両者の間に正の相関関係があった。しかし、全身性の炎症の指標であり、一般的に腫瘍血管の透過性亢進を引き起こすとされている、血清中腫瘍壊死因子は、弱毒化サルモネラ投与後の方が、大腸菌投与後よりむしろ濃度が低く、この弱毒化サルモネラが腫瘍組織において、独自の作用を発揮している可能性が示唆された。また、こうした効果の誘導確率がおおよそ半分であるため、腫瘍組織の構造の多様性も寄与している可能性がある。このような腫瘍構造のリモデリングは、投与された弱毒化サルモネラの腫瘍内での効率的な生着・増殖にも寄与しているようである。



(Journal of Drug Targeting. 2023;31:194–205 から転載)

生体内の材料を使って、必要な場所で、必要な時に、必要な量だけ薬物を作る、薬物の現地生産システムは、薬物治療の新しい潮流の開拓に繋がる。本研究の成果は、がん微小環境リモデリングをトリガーとする、がん治療用デザイナー細菌開発の有用な設計指針を与えるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nomura Shoko, Takahashi Maiko, Kato Akari Hashiba, Wada Yasuhiro, Watanabe Yasuyoshi, Yamashita Fumiyoshi, Mukai Hidefumi	4. 巻 590
2. 論文標題 Biosorption-based 64Cu-labeling of bacteria for pharmacokinetic positron-emission tomography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 119950 ~ 119950
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijpharm.2020.119950	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 野村祥子, 橋場(加藤)月, 向井英史	4. 巻 38
2. 論文標題 がん治療用デザイン細菌開発の動向と展望	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学増刊	6. 最初と最後の頁 2992-2998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Nomura Shoko, Sukowati Erike W., Shigeno Yuko, Takahashi Maiko, Kato Akari, Benno Yoshimi, Yamashita Fumiyoshi, Mukai Hidefumi	4. 巻 15
2. 論文標題 Blautia coccoides JCM1395T Achieved Intratumoral Growth with Minimal Inflammation: Evidence for Live Bacterial Therapeutic Potential by an Optimized Sample Preparation and Colony PCR Method	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 989 ~ 989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics15030989	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Takahashi Maiko, Sukowati Erike Widyasari, Nomura Shoko, Kato Akari, Mizuseki Kenji, Watanabe Yasuyoshi, Mukai Hidefumi	4. 巻 31
2. 論文標題 Impact of tumoral structure and bacterial species on growth and biodistribution of live bacterial therapeutics in xenografted tumours	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Drug Targeting	6. 最初と最後の頁 194 ~ 205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/1061186X.2022.2122477	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野村祥子、高橋麻衣子、橋場月、和田康弘、渡辺恭良、向井英史
2. 発表標題 生物学的吸着特性を応用した細菌 ⁶⁴ Cu標識の適応範囲と機序
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hidefumi Mukai, Shigeru Kawakami
2. 発表標題 Pharmacokinetic evaluation methods for the nanoparticle formulations of nucleic acid and mRNA-based therapeutics
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向井英史
2. 発表標題 PET分子イメージング活用創薬・DDS研究の現状と展望
3. 学会等名 日本製薬工業協会 第3回DDSコンソーシアム研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 向井英史
2. 発表標題 がん標的分子への集積性や排泄特性を制御したPETイメージング剤の開発とナノ粒子DDS製剤のADME研究
3. 学会等名 第60回日本核医学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向井英史
2. 発表標題 PET分子イメージング活用診断・創薬と、バクテリアがん治療へ向けた基礎薬学的研究
3. 学会等名 第15回理研「バイオものづくり」シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向井英史
2. 発表標題 PET分子イメージングとDDS技術の双方向利活用による創薬・画像診断法開発の進展
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野村祥子、高橋麻衣子、橋場月、和田康弘、渡辺恭良、向井英史
2. 発表標題 生物学的吸着に基づくバクテリア64Cu標識法の菌種適用範囲の検討
3. 学会等名 第60回日本核医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野村祥子、高橋麻衣子、橋場月、和田康弘、渡辺恭良、向井英史
2. 発表標題 生物学的吸着を応用して64Cu標識した大腸菌の静脈内投与後の体内動態評価
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野村祥子、高橋麻衣子、橋場月、和田康弘、渡辺恭良、向井英史
2. 発表標題 銅(II)イオンの生物学的吸着を利用した細菌の64Cu標識
3. 学会等名 日本分子イメージング学会web開催臨時大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野村祥子、Sukowat i W. Er ike、高橋麻衣子、渡辺恭良、向井英史
2. 発表標題 腫瘍選択的増殖と低い生体作用を両立するBlautia coccoides
3. 学会等名 日本DDS学会第35回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村祥子、Sukowat i W. Er ike、高橋麻衣子、渡辺恭良、向井英史
2. 発表標題 バクテリアがん治療における遺伝子改変大腸菌のプラスミド維持の評価と、新規候補株としてのBlautia coccoides
3. 学会等名 2019 年度若手支援技術講習会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村祥子、Erike Sukowati、高橋麻衣子、渡辺恭良、向井英史
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第34回日本DDS学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野村祥子, Erike Widyasari Sukowati, 重野佑布子, 高橋麻衣子, 辨野義己, 山下富義, 向井英史
2. 発表標題 Blautia coccoides JCM1295Tの生体内分布と生菌製剤としての有用性評価のためのコロニーPCR法の最適化
3. 学会等名 第3回超分子薬剤学FGシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 向井英史
2. 発表標題 超分子医薬のPET動態研究とDDS開発
3. 学会等名 第3回超分子薬剤学FGシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 向井英史
2. 発表標題 PETイメージング技術の薬物動態・DDS研究への応用と課題
3. 学会等名 第26回薬物動態談話会セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 悪性腫瘍を治療するための組み合わせ医薬	発明者 向井 英史・橋場 月	権利者 国立研究開発法人 理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-047596	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 悪性腫瘍を治療するための組み合わせ医薬	発明者 向井 英史・橋場 月・野村 祥子	権利者 国立研究開発法人 理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/093366	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------