

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32511

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16452

研究課題名(和文) 偏性嫌気性菌を用いたトリプルネガティブ乳がん治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapy for triple negative breast cancer using anaerobic bacteria

研究代表者

清水 芳実 (Shimizu, Yoshimi)

帝京平成大学・薬学部・助教

研究者番号：70633931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：トリプルネガティブ乳がん(以下、TNBC)は、乳がんのサブタイプの中で最も予後が悪く、有効な治療法が開発されていない。本研究課題では、TNBCの一部で過剰発現していることが報告されているクローディン-4に着目し、クローディン-4に結合する蛋白質毒素を分泌発現する組換えビフィズス菌を新たに創出し、その有用性を検証した。その結果、作製した組換えビフィズス菌は、マウス担癌モデルにおいてアポトーシスを誘導することで、腫瘍の増殖を抑制した。この時、体重減少や臓器への傷害性は確認されなかった。以上の結果より、作製した組換えビフィズス菌は、TNBCに対して有望な創薬シーズであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、乳がんの中で最も治療が難しいトリプルネガティブ乳がんに対する新しい治療法の開発を目指しました。ビフィズス菌は、整腸作用や免疫調整作用を期待して、医薬品や食品として応用されています。非常に興味深いことに、ビフィズス菌を血管内に投与すると、正常な組織には定着せずに、腫瘍に集まるという性質を持っています。そこで、トリプルネガティブ乳がん、多く作られている蛋白質に結合し、腫瘍を排除するような分子を分泌するビフィズス菌を作製しました。このビフィズス菌は、動物モデルで、腫瘍が増える速度を遅らせることが分かりました。今後、作製したビフィズス菌が新しい治療薬の候補になることが期待されます。

研究成果の概要(英文)：Bifidobacterium is a nonpathogenic strain of anaerobic bacteria that selectively localizes and proliferates in tumors. It has emerged as a specific carrier of anticancer proteins against malignant tumors. Claudin-4 is overexpressed in certain epithelial malignant cancers. In this study, I successfully generated a strain of gene modified Bifidobacterium that secreted claudin-4 targeting molecules. I evaluated the therapeutic potential of this strain against triple-negative breast cancer using a mouse model. After intravenous injection, gene modified Bifidobacterium was specifically distributed in the tumors of mice bearing breast cancer tumors. Moreover, The gene modified Bifidobacterium significantly suppressed tumor growth in mice with breast cancer without serious side effects, such as weight loss or hepatic and renal damage. I suggest that gene modified Bifidobacterium is a good candidate for breast cancer treatment.

研究分野：医療薬学、分子生物学

キーワード：ビフィズス菌 薬物送達システム 抗悪性腫瘍薬 トリプルネガティブ乳がん クローディン-4 遺伝子組換え技術 偏性嫌気性細菌 がん治療

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省による我が国における主な死因別死亡数の割合調査(2017年度)では悪性新生物が1位で約28%、続いて高血圧性を除いた心疾患は約15%、脳血管疾患が約8%となっている。悪性新生物による死亡数は一貫して増加傾向である。昭和56年以降に死因1位となり、全死亡者のおよそ3.5人に1人の割合で死亡しているという状態である。また、がん罹患者数も増加し続けており2012年時点では1985年の罹患者数の2.5倍にもなっている。このがん罹患者数の増加の主な原因は日本の人口の高齢化が1つであると考えられている。男女のがん部位別罹患者数でみると男性では1985年から継続して減少傾向にあるものの胃がんが一番高く、女性では胃がんが多かったが食事の欧米化などにより乳がんが罹患者数1位となり現在も増加傾向にある。ただ、乳がんは有効な治療方法が全くないというわけではない。その証拠に2017年のがん部位別死亡者数順位で大腸がん、肺がん、膵臓がん、胃がんが続いて乳がんは5位となっており、罹患者数に比べ死亡割合はそこまで多いというわけではない。

乳がんの治療としては、手術によってがんをとり除く外科療法、分子標的治療薬やホルモン療法を含む薬物療法やがん縮小効果を発揮する放射線治療があげられる。薬物療法は根治を目指した治療のほかに、手術や他の治療の効果を補う、術前にかんを縮小させる、その他の治療法の実施が困難であり延命や生活の質向上を目的として実施される。乳がんにはルミノアルA型、B型、HER2(human epithelial growth factor receptor type2)型、トリプルネガティブ型(以下、TNBC)といったサブタイプが存在し、それぞれに適した薬物が選択される必要がある。TNBCは乳がん全体の10~15%を占めており、エストロゲンとプロゲステロンといった女性ホルモン依存的に増殖するといった性質はなく、がん細胞の増殖にかかわるHER2蛋白質を発現していないまたはHER2遺伝子を過剰に持っていないという特徴を持った乳がんである。エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、HER2の3つの分子が陰性であるためトリプルネガティブ型といわれている。その性質故にホルモン療法やHER2を標的とした治療効果が高い分子標的薬は使用しても効果は得られないため、治療方針としては古典的な化学療法を行うこととなる。さらにTNBCは、がんとしての悪性度も高い傾向にあり、治療が難渋するサブタイプであるともいえる。また、一定の治療成績は得られているものの抗がん剤による吐気、腎障害などの副作用は避けられず治療を進める上で大きな問題となっている。

乳がんを遺伝子レベルで解析するとそれぞれ特徴を持っていることが確認されている。従来の薬物療法は、数多く存在する抗がん剤の中から統計的にがん種に対して効きやすい抗がん剤を投与する、平均値の医療が提供されてきていたが、近年では、遺伝子レベルでがんの解析を行い、そのがんにあった治療を提供するという考え方が広まってきている。このような医療のことをプレジジョンメディスン(Precision medicine)という。がん遺伝子は治療の過程においても変化する可能性があるため治療中であるが効果が不十分であり、初めてがんが発見され最適な抗がん剤を選択するとき、再発・転移癌の治療を行うときなどに用いることが有効である。がんに合わせて治療法開発のためにも、既存の標的以外の治療法の確立がTNBC治療において求められていた。

2. 研究の目的

Claudin(CL)は、上皮細胞間のシール機構である密着結合(タイトジャンクション)における主要な接着蛋白質であり、1998年にFuruseらによって初めて報告された4回膜貫通型蛋白質で、分子量は20-27kDaである。現在、ヒトのCLファミリーは27種類報告されており、上皮毎に異なる組み合わせで発現し、各臓器や細胞の特性に関与している。このうち、CL-4についてTNBCで高発現しているという報告が複数なされている。C-CPEは、ウェルシュ菌下痢毒素の毒素領域を欠損した分子であり、細胞毒性を有さない。C-CPEのC末端側に毒素分子を融合させたイムノトキシンは、様々な腫瘍由来の細胞株に対して強い抗腫瘍効果を発揮することが示されている。しかしながら、これらのイムノトキシンは少量で肝障害を引き起こしてしまい、直接腫瘍内へ投与しないと効果を発揮しない。C-CPEを利用したイムノトキシンを臨床応用するためには、選択的な腫瘍内デリバリーツールが必要である。

ビフィズス菌は、静脈内に投与した場合、非常に高い選択性を持って腫瘍部位で増殖する。所属する研究ユニットでは、ビフィズス菌に腫瘍細胞に細胞死を誘導する抗体を分泌させることにより、腫瘍組織を退縮させることに成功している。ビフィズス菌を薬剤キャリアーとして考えた場合、腫瘍組織以外で増殖することがないので非特異的な分布による副作用の発現防止や腫瘍効果を発揮する蛋白質を分泌するビフィズス菌を導入することで単回投与でのガン治療が可能となるという利点がある。

以上の背景を踏まえ、腫瘍集積性がよいビフィズス菌に、CL-4を標的としたC-CPEをベースとしたイムノトキシンを分泌させ、難治性のTNBCに対して有効かを細胞レベルと動物実験モデルで評価することを研究目的とした。

3. 研究の方法

ヒト乳がん細胞におけるCL-4を標的とした治療戦略の有効性評価を行うため、細胞バンクか

ら入手した5種のヒト乳癌細胞株(HCC1937,MDA-MB-231,MDA-MB-468,BT-20)とマウス乳がん細胞株(4T1)について、CL-4結合ペプチドプローブC-CPE-PE23による細胞障害活性を評価した。

ビフィズス菌の乳がん組織の集積性を評価するために、7週齢の雌性マウス(Balb/cCr-Slc)を日本SLC社より購入した。一週間馴化した後、腫瘍を移植する部分である背中の中毛をそった。赤色蛍光蛋白質iRFP670発現マウス乳がん細胞4T1/iRFP670を 1×10^7 cells/mlにPBSで懸濁し、マウス1匹当たり100 μ l/miceを皮下注射した。移植後、がん細胞の増殖の程度を観察しながら適切なサイズにがんが成長したタイミング(皮下注射後7日経過時)でIVIS(SPI社)を用いて蛍光を測定した。Excitationフィルターは640nm、EmissionフィルターはRFPを使用した。露光時間は1秒とした。マウスは、イソフルランの吸入麻酔で麻酔下においた。撮影は、背部、側臥位及び腹部の3点について行い、明視野の画像とマージ(MERGE)を行った。腫瘍の生着を確認できたマウスについて、発光遺伝子を組換えたビフィズス菌を尾静脈内投与により 3×10^8 cells/miceで投与した。

C-CPE-PE23組換えビフィズス菌のTNBCに対する有用性を、マウス担癌モデル(syngeneic modelとxenograft model)で評価した。マウス(Balb/cCr-Slc)またはヌードマウスKSN-Slc(雌性、8週齢)に、4T1/iRFP670細胞またはMDA-MB-468細胞を 1×10^6 cells/mouseとなるように調製し皮下投与することで担癌マウスを作製した。腫瘍移植7日後に群分けを実施した。PBSの投与を行う第1群(6匹)、ビフィズス菌(pKKT427ベクターを組み込んだmock)単独投与の第2群(5匹)、ルシフェラーゼ発現ビフィズス菌の第3群(5匹)、C-CPE-PE23分泌ビフィズス菌投与群(6匹)の第4群にグループ分けした。組換えビフィズス菌についてそれぞれを移植初日と7日後に投与し、その投与量はマウス1匹当たり 2×10^8 cellsで行った。また、栄養補助剤としてマルトースを毎日1mlずつ計3週間腹腔内投与した。さらに、3日に1回腫瘍径の測定を実施した。また、抗腫瘍効果の解析に、最終日に腫瘍を摘出し、アポトーシス細胞を検出するTdT-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL)染色を実施した。副作用の評価として、体重測定を実施し、21日目に心採血を行い、Alanine transaminase(ALT)活性測定、Blood urea nitrogen(BUN)値の測定を実施することで副作用評価を行った。

4. 研究成果

TNBCに対してCL-4を標的とした治療戦略が有効かを評価することを目的にし、新たにCL-4結合イムノトキシンの作製を行った。CL-4結合イムノトキシンの毒素を融合させたC-CPE-PE23を創出した。ビフィズス菌及び大腸菌で産生されたC-CPE-PE23は、他のCLファミリーには結合せず、ヒト及びマウスCL-4に強く結合することを、フローサイトメーターを用いた解析で明らかにした。TNBC細胞株であるHCC1937,BT-20,MDA-MB-231,MDA-MB-468の IC_{50} 値はそれぞれ、16.08、14.20、774、3.30 ng/mlであった。HCC1937,MDA-MB-468及びBT-20で強い細胞障害活性が見られた。一方、MDA-MB-231の IC_{50} 値は774ng/mlであり、他と比較すると低めの活性であることが分かった。また、マウスTNBC由来細胞株である4T1細胞についても、C-CPE-PE23は濃度依存的に細胞傷害活性を示した。合わせて、ビフィズス菌と大腸菌で産生されたC-CPE-PE23の殺細胞活性における比活性を求めたところ、ほぼ同等であることが分かった。

CL-4結合イムノトキシンのC-CPE-PE23を分泌発現する組換えビフィズス菌について、TNBCに対する有効性及び安全性を、マウスを用いた研究で評価した。初めに、腫瘍内への集積性を評価したところ、ビフィズス菌投与14日目においては、正常な組織には分布せず、腫瘍に選択的に集積することを、明らかにした。腫瘍体積の変化については、3日に1度行った腫瘍径の測定では、どの投与群とも腫瘍サイズは増加傾向であった。ただ、イムノトキシンのC-CPE-PE23を発現している組換えビフィズス菌の投与群の第4群では増加傾向にあるものの他の投与群と比較すると増加の程度は穏やかで、投与開始の6日間はほとんど変動が認められなかった。また、統計的に解析したところ、有意差があることが分かった。ビフィズス菌投与21日後に摘出した腫瘍の蛍光強度を観察した結果を示した。腫瘍サイズだけでなく、蛍光強度もpKKT427-mockに比べて40%程度低下した。このことは、移植した細胞の増殖だけでなく、細胞死を誘導して蛍光分子の発現が低下していることを示唆している。また、TUNEL染色の結果より、C-CPE-PE23分泌組換えビフィズス菌投与群では、他の投与群と比べて、明らかに、アポトーシス細胞が多かった。副作用の評価には、肝障害マーカーであるALT活性、腎障害マーカーBUN値、体重の測定を行った。ALT活性とBUN値とも、どの群も障害が認められるような数値は示さなかった。体重もほぼ変化しなかった。

以上の結果より、C-CPE-PE23分泌組換えビフィズス菌は、TNBC担癌モデルマウスにおいて、肝障害、腎障害や体重変化の有害事象を引き起こさず、抗腫瘍効果を発揮することが分かった。当初の研究のコンセプトより、投与された組換えビフィズス菌が嫌気性条件下である腫瘍内に集積し、イムノトキシンのC-CPE-PE23を分泌することで、腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することで抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。また本研究の結果から、TNBCの細胞株ではTJ関連分子のCL-4発現が高いことから確認され、さらにC-CPE-PE23の有効性が示されたことで、CL-4はTNBC治療において新たな創薬ターゲットになると考えられ、C-CPE-PE23分泌組換えビフィズス菌は有望な創薬シーズとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimizu Yoshimi, Isoda Katsuhiko, Taira Yuichiro, Taira Ikuko, Kondoh Masuo, Ishida Isao	4. 巻 887
2. 論文標題 Anti-tumor effect of a recombinant Bifidobacterium strain secreting a claudin-targeting molecule in a mouse breast cancer model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 173596 ~ 173596
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2020.173596	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水 芳実、島岡 真理亜、藤岡 野々花、磯田 勝広、平 裕一郎、平 郁子、斎藤 浩美、石田 功
2. 発表標題 組換えピフィズ菌を用いた乳がん治療薬開発に向けた検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（京都）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 清水 芳実、島岡 真理亜、中山 未希、磯田 勝広、平 裕一郎、平 郁子、斎藤 浩美、石田 功
2. 発表標題 乳がんに対する組換えピフィズ菌の腫瘍集積性と抗腫瘍効果の評価
3. 学会等名 日本DDS学会 第36回（神戸）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 清水 芳実、中山 未希、篠原 華穂、磯田 勝広、平 裕一郎、平 郁子、斎藤 浩美、石田 功
2. 発表標題 偏性嫌気性細菌を用いたトリプルネガティブ乳がん治療薬の開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（広島）
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 清水 芳実、平 裕一郎、平 郁子、石田 功	4. 発行年 2019年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 676
3. 書名 医薬品モダリティの特許戦略と技術開発動向	

〔産業財産権〕

〔その他〕

帝京平成大学薬学部ユニット紹介 抗体・DDSユニット https://pharm.thu.ac.jp/research/unit/dds.html

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