

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05353

研究課題名（和文）腸内フローラの改良による革新的大腸がん予防法の開発

研究課題名（英文）Development of innovative colorectal cancer prevention method by improving intestinal flora

研究代表者

松永 渉（Matsunaga, Wataru）

兵庫医科大学・医学部 共同利用研究施設・助教

研究者番号：20415300

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）：近年、腸内フローラは消化吸収以外への身体機能への寄与が報告されている。そして、腸内フローラの異常は大腸がんとの関連も報告されており、その改善法の研究が注目されている。そこで我々は、腸内フローラの改善法と、遺伝子操作した大腸菌による腸内フローラを介した大腸がん予防法を研究した。

乳酸菌投与による腸内フローラ改善の実験では、ラクトバシルス属に増加傾向が見られたものの、有意な効果は観察されなかった。大腸がん予防のための大腸菌の開発では、TRAILの発現も確認できた。しかしながら、予想以上に強い非悪性細胞に対する毒性が観察されたことから、インターフェロンを発現する大腸菌も開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、腸内フローラを介した大腸がん予防を目的として、体内に導入することを前提として、がん抑制遺伝子を産生する大腸菌を開発した。腸内フローラの構成に影響を与えられるかどうかについては問題もあるが、通過菌としてこれらの遺伝子操作した大腸菌はがん予防に寄与できると考えている。

研究成果の概要（英文）：In recent years, the gut microbiota has been reported to contribute to bodily functions beyond digestion and absorption. Additionally, abnormalities in the gut microbiota have been linked to colorectal cancer, garnering attention for research on methods to improve gut microbiota. In this context, we researched methods to improve the gut microbiota and prevent colorectal cancer through genetically modified *E. coli*.

In experiments aimed at improving the gut microbiota through the administration of lactobacilli, although there was a trend of increase in *Lactobacillus* species, no significant effect was observed. In the development of *E. coli* for colorectal cancer prevention, the expression of TRAIL was confirmed. However, stronger-than-expected toxicity to non-malignant cells was observed, leading us to develop *E. coli* expressing interferon.

研究分野：がん治療

キーワード：腸内フローラ 乳酸菌 大腸菌 TRAIL インターフェロン

1. 研究開始当初の背景

ヒトの消化管内では 1000 種類、100 兆個以上に及ぶとも言われる細菌群が、腸内フローラ(腸内細菌叢)として知られる安定した生態系を形成している。腸内フローラの機能として、消化吸収の補助は古くから知られているが、近年の研究で、腸管免疫を通じた免疫機能の調節や、自律神経を介した中枢作用なども明らかになった。そして、腸内フローラの異常(dysbiosis)は、大腸がんのような深刻な消化器疾患は勿論、消化器以外の多くの疾患とも関連している。このため、dysbiosis を健全な状態に戻すことは非常に有益だと考えられ、近年の日本では腸内フローラへの社会的関心が高い。今回我々は、大腸がん予防の観点から腸内フローラ改善法開発を着想した。しかし、大きな問題として、腸内フローラは容易に変化しない。「生きた乳酸菌」で腸内フローラの改善を謳うサプリメントや健康食品も多数発売されているが、実際のところは経口摂取で生きて腸内に届く細菌は無いに等しく、腸内フローラに大きな変化を起こすためには、乳酸菌の絶対量が不足している。

その一方、糞便細菌叢移植(fecal microbiota transplantation, FMT)は、極めて効果的な腸内フローラの改善手段である。日本に紹介されてまだ 10 年ほどだが、FMT の歴史は古く、家畜の治療法として長く使われる一方、中国では既に 4 世紀から重症下痢や食中毒患者の治療に用いられており、ヨーロッパでも 16 世紀頃からヒトの治療に用いられている。19 世紀後半以降、細菌の発見と抗菌剤の登場で下火になりつつも、FMT は主に欧米で、難治性腸炎の治療に使用されていた。2013 年、van Nood らが Clostridium difficile 感染症で薬剤耐性菌を排除する方法として FMT の有効性を報告すると(New England J. Med, 2013)、消化器疾患の治療法として脚光を浴びるようになった。

現在の FMT は、一定の基準を満たした健康なドナーの糞便を希釈し、dysbiosis を起こした人の腸内に移植することで実施されている。しかし、現在の FMT の大きな問題点として、

- ・人の体質はそれぞれであり、他人の腸内フローラが別の人にも合うかは不確定
- ・いわゆる「悪玉菌」も必ず同時に移入される

の二点が考えられる。事実、アメリカでは薬剤耐性菌移入による死亡例も報告されており、安全性には懸念が残る。日本での FMT は、歴史が浅い上に不潔なイメージで、医療人、患者双方の拒否感は強い。これは理屈ではなく感情の問題だけに、普及への解決困難な障害となっている。そして我々は、なぜ培養した「善玉菌」のみ、もしくは「悪玉菌」を排除したバランスの良い腸内細菌群を直腸経由で投与できないのか? という当然の疑問を抱いた。

2. 研究の目的

大腸がん予防を目的として、健康なバランスを保った腸内細菌群のカクテルによって健全な腸内環境を人工的に形成する方法の開発。

積極的な手段として、がん抑制物質を合成するように遺伝子操作した大腸菌を腸内フローラに定着させ、腸内フローラを介したがんの予防/遺伝子治療の可能性を探る。

3. 研究の方法

・既存の腸内細菌との区別が容易な乳酸菌をモデル細菌としてマウスに対して経口、経直腸投与等を行い、クラスター解析から腸内細菌叢の変化を調べる。

・腸内フローラを解した大腸がん予防のため、受容体(Death Receptor 4 および 5)を介してがん細胞にアポトーシスを引き起こす TNF 関連アポトーシス誘導リガンド(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)を産生する大腸菌を開発し、その効果を検証する。

4. 研究成果

OD660 で 1 相当の乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* JCM8130 を経口、経直腸投与等を行ったが、糞のクラスター解析の結果、経口投与 60 日で Lactobacillales 目(OTU657)の増加傾向が見られたものの、有意差は見られなかった(図 1)。この結果は、どのような方法も単純な経口投与以上に外来細菌の導入効果はなく、またその場合もあくまで「通過菌」で、腸内フローラの改善には至らないとの結論に至った。

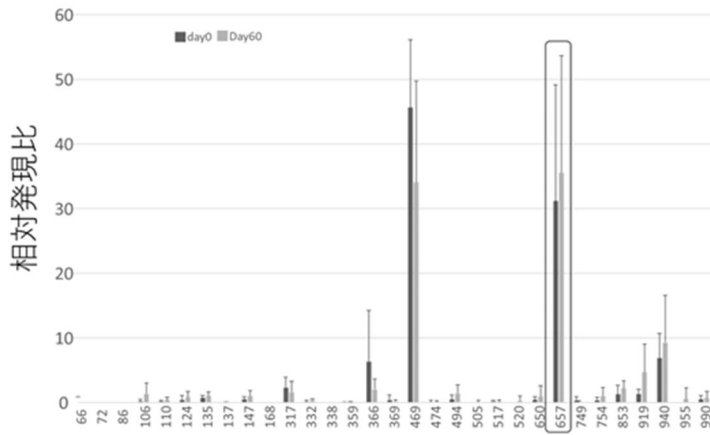


図 1 マウス腸内細菌叢の T-RFLP 解析結果

乳酸菌経口投与 60 日後、OTU657 の Lactobacillales 目 (棒内) に増加傾向が見られたが、有意差はなかった。

腸内フローラを介した大腸がん予防のための TRAIL (TNF 関連アポトーシス誘導リガンド) を産生する大腸菌の開発を行い、TRAIL の発現も確認できた。しかしながら、予想以上に強い非悪性細胞に対する毒性が観察されたことから、毒性が低いと見られている可溶性 TRAIL (配列) にも切り替えたが、毒性の点では改善が無かった (図 2)。そのため、インターフェロン 2 を発現する大腸菌も開発した (図 3)。

図 2 可溶トレイルの遺伝子配列

```

1-ATGCGCGAACGCGGCCCGCAGCGTGTGGCGGCGCATATCACGGCACCCGTGGCCGCAGCAACACCCTGAGCAGCCCGAA
TAGCAAAAACGAAAAGCGCTGGGTCGTAATAATAGCTGGGAAAGCAGCCGCAGCGGCCATAGCTTTCTGAGCAATCTG
CACCTGCGCAATGGCGAACTGGTGATTACGAAAAAGGCTTTTACTACATTTATAGCCAGACCTATTTTCGTTTCAGGAAG
AAATTAAGAAAATACCAAGAACGATAAACAGATGGTGCAAGTATATTTACAAATATACGAGCTACCCGGATCCGATTCTGCT
GATGAAAAGCGCCCGTAAACAGCTGTTGGAGCAAAGACGCGGAATATGGCCTGTACAGCATTTATCAGGGTGGCATTTTTCAA
CTGAAAGAAAACGATCGCATTTTGTAAAGCGTGACCAACGAACATCTGATTGATATGGATCATGAAGCGAGCTTCTTTGGCG
CGTTTCTGGTGGGCTAA-507

```

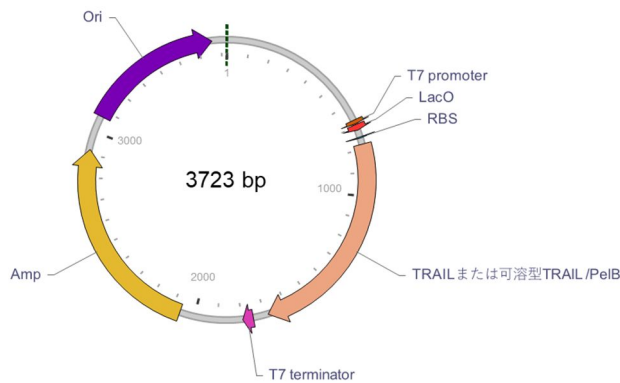
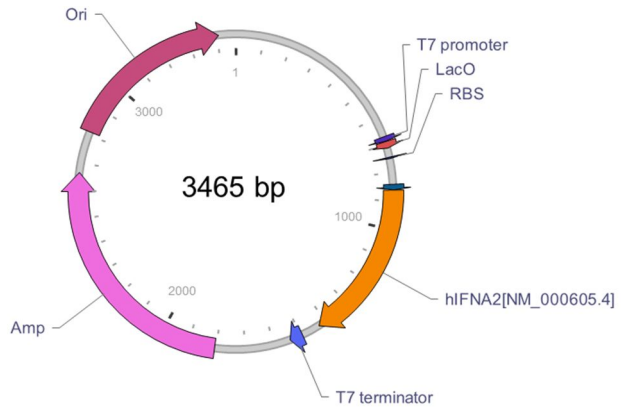


図 3 インターフェロン 2 の遺伝子配列

```

1-TGGCCTTGACCTTTGCTTTACTGGTGGCCCTCCTGGTGCCTCAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGCTGTGATCTGCCT
CAAACCCACAGCCTGGGTAGCAGGAGGACCTTGATGCTCCTGGCACAGATGAGGAGAATCTCTCTTTTCTCCTGCTTGAAGG
ACAGACATGACTTTGGATTTCCCAGGAGGAGTTTGGCAACCAGTCCAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTCCTCCATGAGAT
GATCCAGCAGATCTTCAATCTCTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGGATGAGACCCTCTAGACAAATTCTACACT
GAACTTACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTGATACAGGGGGTGGGGGTGACAGAGACTCCCCTGATGAAGGAGG
ACTCCATTCTGGCTGTGAGGAAATACTTCCAAAGAATCACTCTATCTGAAAGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCCTGGGA
GGTTGTCAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTCTTTGTCAACAAACTGCAAGAAAGTTTAAAGAAGTAAGGAATGA-567

```



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	後藤 章暢 (Gotoh Akinobu) (70283885)	兵庫医科大学・医学部 研究基盤教育学・教授 (34519)	

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