

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20819

研究課題名（和文）有機酸分泌細菌を基盤とした新規がん治療用デザイナー細菌の開発

研究課題名（英文）Development of novel designer bacteria for cancer therapy based on organic acid-secreting bacteria

研究代表者

野村 祥子（Nomura, Shoko）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（薬学系）・助教

研究者番号：40911178

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、哺乳動物の腸内細菌叢優勢細菌の中から、がん治療に有用な有機酸分泌細菌を開拓し、それらに外来遺伝子発現系を導入した新規のデザイナー細菌の開発を目指した。ヒト腸内細菌叢最優勢菌であり代謝産物として酢酸・乳酸などを分泌する *Blautia coccoides* や、*Bacteroides vulgatus* は、静脈内投与後、腫瘍内での生着・増殖を示した。特に *B. coccoides* は腫瘍に生着してから2週間で100万倍も増殖する一方で、主要な臓器には生着せず、投与時の宿主免疫原性も低いことから、腫瘍内増殖と低い生体内作用を両立する点で新規のがん治療用生菌製剤の候補細菌種であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生菌製剤を用いたがん治療において、有用な細菌種を開拓し、新規のデザイナー細菌を開発することを目的としている。生菌製剤として前例のない、ヒト腸内細菌叢最優勢の有機酸分泌細菌が、腫瘍内増殖・投与時の安全性を両立する新たな候補細菌種であることを明らかにできた。本研究の成果は、がん治療用生菌製剤の開発において、治療効果と生体適合性の両方を高めたデザイナー細菌の候補細菌種の裾野の拡張に繋がると期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to investigate organic acid-secreting bacteria useful for cancer therapy from among the predominant bacteria of the mammalian intestinal microbiota and to develop new designer bacteria by introducing a foreign gene expression system to these bacteria. Intravenously administered *Blautia coccoides* secreting acetic acid and lactic acid as metabolites, and *Bacteroides vulgatus*, which are the most dominant bacteria in the human intestinal microbiota, showed growth and proliferation in tumors. Particularly, *B. coccoides* showed one-million-fold growth in two weeks in tumors, but did not survive in major organs and showed low host immunogenicity. This indicates that *B. coccoides* is a promising candidate for live bacterial therapeutics for cancer treatment showing both tumor-selective growth and low immunostimulatory activity.

研究分野：薬物動態学、腫瘍治療学

キーワード：生菌製剤 デザイナー細菌 がん治療 *Blautia coccoides*

1. 研究開始当初の背景

近年、CAR-T 細胞に代表されるように、遺伝子改変により機能修飾を施したデザイナー細胞による治療が注目を集めている。本手法は細菌にも有効であり、薬効を持つタンパク質産生機構のパッケージングにより治療機能を付加した“デザイナー細菌”は、細菌の医療応用につながるとして期待されている。なかでも固形腫瘍は、低酸素かつ免疫寛容という特殊な微小環境から、嫌気性細菌の生着・増殖に有利であり、がん治療用デザイナー細菌の開発が進められてきた。

従来のがん治療用デザイナー細菌の開発は、その大部分が弱毒化したサルモネラ菌や大腸菌を用いて進められてきた。これらの細菌はリポ多糖や鞭毛を有するため、生着に伴って腫瘍内の宿主免疫を賦活する。従って、遺伝子組み換えによって付加した治療機能に加え、がん免疫療法に似た抗腫瘍効果を相乗的に発揮することが期待できる。しかしながら、内毒素などによる免疫賦活作用は、全身における急性免疫応答に繋がる諸刃の剣ともいえる。特にデザイナー細菌は、生きたままの細菌を薬剤として使用するため、安全性向上の観点から、細菌の生体適合性は高いことが望まれる。従って、生体作用の低さと治療効果を両立する細菌種の開拓が急務であった。

これに対して研究代表者は、細菌の分泌する有機酸（乳酸・酪酸）が抗腫瘍効果をもつこと、これらの有機酸分泌細菌には内毒素を持たないグラム陽性菌が存在することから、有機酸分泌細菌を基盤としたがん治療用デザイナー細菌を開発することを着想した。

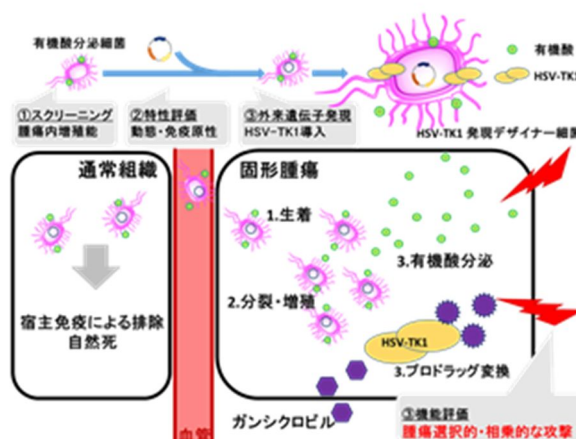


図1. 本研究の概要と、新規デザイナー細菌の治療戦略

2. 研究の目的

本研究では、がん治療に有用な有機酸分泌細菌を、腫瘍内増殖能を指標として開拓することを目的とした。候補細菌は、生体作用の低さを期待し、哺乳動物の腸内細菌叢の優勢菌から選出した。加えて、開拓した細菌種に外来遺伝子発現系を導入し、新規のデザイナー細菌を開発することを目指した。

(図 1)

3. 研究の方法

細菌の腫瘍内増殖評価

Blautia coccoides (JCM1395^T)と、*Bacteroides vulgatus* (JCM5826^T)の両細菌を colon26 担癌マウスに尾静脈内投与し、各タイムポイントで腫瘍を回収・ホモジナイズした。腫瘍からの細菌単離後、colony PCR に基づく新規の手法（図 2）で細菌数を定量した。

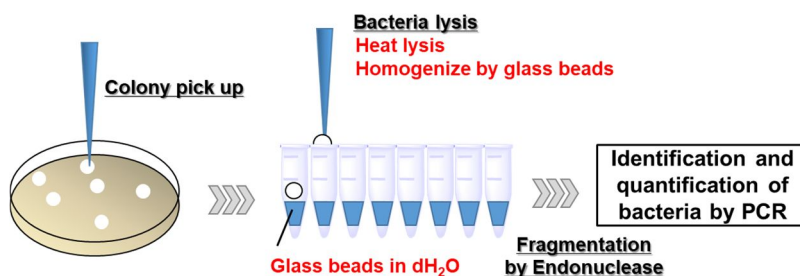


図 2) colony PCR に基づく腫瘍内細菌数の定量方法

細菌投与時の生体作用の評価

各種細菌を投与後、マウスの体重変動と脾臓肥大を継続的に測定することで評価した。また、投与時のサイトカイン産生はマウス血清の ELISA より評価した。

4. 研究成果

Blautia coccoides (JCM1395^T)と *Bacteroides vulgatus* (JCM5826^T)の腫瘍内増殖評価

評価対象の細菌種として、哺乳動物の腸内細菌叢最優勢菌であり、乳酸・酢酸といった有機酸を分泌する *Blautia coccoides* (JCM1395^T)と、同じく最優勢菌の *Bacteroides vulgatus* (JCM5826^T) を選択した。両菌をカクテルとして colon-26 担癌マウスに静脈内投与し、一週間後に腫瘍内から検出される菌を定量したところ、*B. coccoides*、*B. vulgatus* 共に 10 万倍以上の増殖が確認された。そこで、有機酸を分泌する *B. coccoides* について詳細に評価

を行った。本菌を 10^7 cfu/mouse で投与した際、腫瘍選択的に増殖を示し、その細菌数は投与から 1-2 週間で約 100 万倍となった。肝臓や肺、脾臓、腎臓といったその他の主要臓器では増殖を示さなかった。また投与細菌数を Low dose (10^5 cfu/mouse) から High dose (10^8 cfu/mouse) まで検討すると、低投与量では腫瘍内増殖を示すものの、バラつきが大きい事が明らかになった。また、腫瘍内に生着した *B. coccoides* の周囲は広範なネクロシスエリアが観察された。これらのことから、*B. coccoides* と *B. vulgatus* を腫瘍選択的な増殖を示す新規の細菌種として開拓できた。特に *B. coccoides* はバラつきがありながらも低用量でも腫瘍内に生着できるなど、腫瘍内増殖能が高いことを明らかにできた。

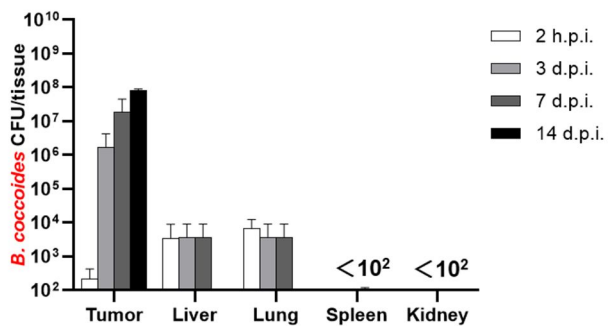


図 3) 各臓器より検出された *B. coccoides* 菌体数

Blautia coccoides (JCM1395^T) の抗腫瘍効果

細菌の分泌する有機酸（酪酸・乳酸など）が、がん治療に有用であることが報告されている。*B. coccoides* も代謝産物として乳酸・酪酸を分泌するため、本菌が腫瘍内で増殖した際の抗腫瘍効果を評価した。しかしながら、本菌の生着に伴う腫瘍退縮等は確認されず、*B. coccoides* 単独では抗腫瘍効果を示さないことが示唆された。

Blautia coccoides (JCM1395^T) の免疫原性評価

まず、本菌投与時の急性免疫応答の評価として、 10^7 cfu/mouse で *B. coccoides* を投与してから 1.5 時間後の血中 TNF- α 濃度、6 時間後の IL-6、IFN- γ 濃度を ELISA にて測定した。がん治療用生菌製剤の開発において、投与時の生体作用が低く安全性の高い細菌種として、ビフィズス菌が研究されている。*B. coccoides* 投与時のサイトカイン産生は、このビフィズス菌投与時と比べて有意差のない程度に低く、同じく先行研究の多い大腸菌と比較して有意に低い結果となった。

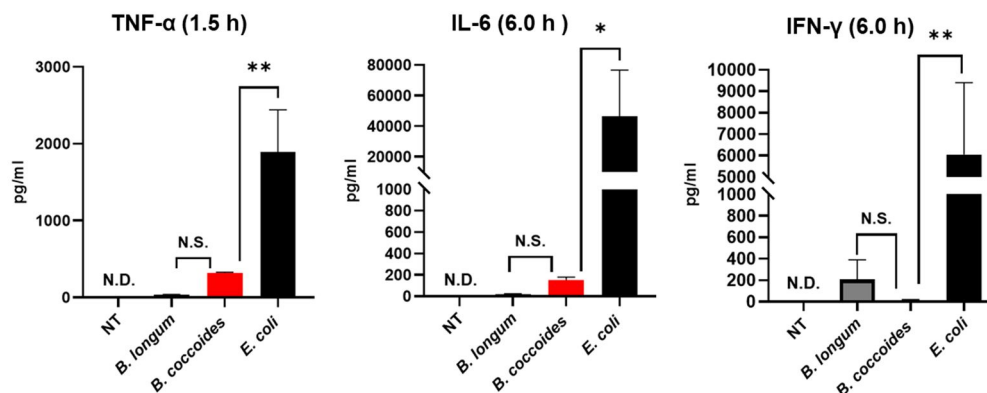


図 4) 各細菌静脈内投与時の炎症性サイトカイン血中濃度

さらに、投与後の長期的な免疫原性の評価として、Low dose (10^5 cfu/mouse)、Middle dose (10^7 cfu/mouse)、High dose (10^8 cfu/mouse) の 3 段階の投与量におけるマウス体重変動と脾臓の肥大について、2 週間に亘って評価した。その結果、特に High dose 処置群においては一時的な体重減少や脾臓肥大が確認されたものの、2 週間後には、諸症状は細菌非投与群と同程度まで緩和された。

機能発現評価用イメージングプローブ ¹³¹I-FIAU の合成

外来遺伝子として導入予定の HSV-TK1 の発現評価イメージングプローブとして、¹³¹I-FIAU の合成を行った。前駆体 FAU を IODO-GEN 存在下で ¹³¹I と混合し、HPLC 精製によって ¹³¹I-FIAU を得た。放射性科学的純度は 95% 以上であり、イメージング評価に十分なクオリティのプローブが得られた。

以上の結果から、本研究では、*B. coccoides* が高い腫瘍内増殖能と低い宿主免疫賦活作用を両立する、がん治療用生菌製剤の有用な候補細菌種であることを明らかとした。それに加えて、本菌を HSV-TK1 デザイナー細菌へと改変後の機能評価に向けたプローブ合成等の準備を整えることが出来た。

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 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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 野村 祥子、Erike Sukowati、高橋 麻衣子、重野 佑布子、辨野 義己、山下 富義、向井 英史
2 . 発表標題 Blautia coccoides JCM1395T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 第三回 超分子薬剤学FGシンポジウム
4 . 発表年 2022年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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