

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590203

研究課題名(和文)嫌気性菌をドラッグデリバリー担体に用いた固形がんに対する新規治療法の開発

研究課題名(英文)The development of novel therapeutic system using anaerobic bacteria as the drug delivery carrier.

研究代表者

平 裕一郎 (TAIRA, Yuichiro)

帝京平成大学・薬学部・講師

研究者番号：20581953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗EGFR抗体/緑膿菌外毒素A融合蛋白質(本イムノトキシン)を分泌する遺伝子組換えビフィズス菌(本組換え菌)について、動物モデルを用いた抗腫瘍効果の解析をおこなった。その結果、EGFRを発現するヒト癌細胞に対して、強い抗腫瘍効果が本組換え菌に見出された。その作用機序を分子・細胞レベルで解析したところ、本イムノトキシンの標的細胞特異的な細胞増殖阻害活性が立証された。このことから、本組換え菌は、実際の癌治療に応用可能であると考えている。

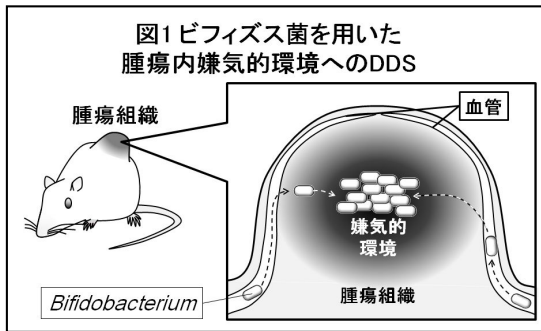
研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the anti-tumor effect of the recombinant bifidobacteria secreting the immunotoxin, anti-EGFR antibody / Pseudomonas Exotoxin A fusion protein, in animal models of human cancer. As the result, the bacteria exhibits significant anti-tumor activity on human cancer cells expressing EGFR. In addition, we demonstrated that this immunotoxin specifically inhibited the proliferation of target cancer cells both in molecular and cellular level. Taken together, we consider that this bifidobacteria can be actually utilized for the novel therapy for cancers.

研究分野：医療系薬学

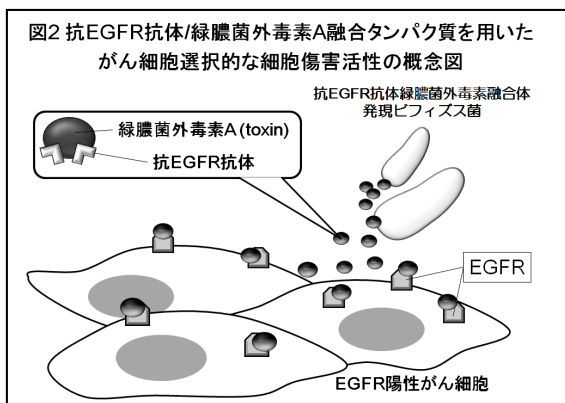
キーワード：抗腫瘍薬 DDS 嫌気性菌 ビフィズス菌 イムノトキシン 抗体薬物複合体

1. 研究開始当初の背景

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もって腫瘍でのみ増殖する (Cancer Res. 1980)。この理由としては、ビフィズス菌は酸素が存在すると生育できない偏性嫌気性菌であり、腫瘍組織の中心部には嫌气的環境 (低酸素領域) を有するためと考えられる (図 1)。このた

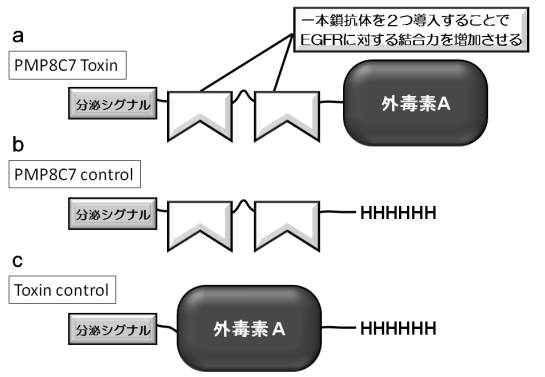


め、ビフィズス菌は腫瘍組織に対する薬剤送達担体として、大変有用な手段だと考えられ、また殺細胞活性をもつポリペプチドを分泌させることが可能であれば、副作用の少ない DDS (ドラッグデリバリーシステム) として新たながん治療法として確立できる可能性がある (図 2)。



そこで、我々は、ビフィズス菌において生物活性をもった有用なポリペプチドを高いレベルで分泌発現させることができるプロモーターとシグナル配列との組み合わせを見出した (Ishida et al. 特開 2010-057535)。また、殺細胞活性をもつ生理活性ペプチドとしてはイムノトキシンを用いることとした (図 3 a)。具体的には、トキシンとしては緑膿菌外毒素 A のうち、細胞接着に関与するドメインを除去した配

図3 研究に用いる融合タンパク質の構造



列を用い (Biochimica et Biophysica Acta 1994)、抗体としては 1 本鎖抗体である抗 EGFR 抗体 (特開 2008-534933) を用いた。緑膿菌外毒素 A はがん細胞内へ取り込まれ、EF-2 を ADP リボシル化し不活性化することで蛋白質合成を阻害して強い殺細胞効果を発揮する。1 本鎖抗体とはラクダ科の動物が産生する特殊な抗体である (Nature 1993)。L 鎖がなく H 鎖のみで構成される抗体で、H 鎖の先端の VHH 領域のみで抗原と結合できるため、通常の抗体の 10 分の 1 の分子量 (14kDa) で抗原と結合できる抗体が得られる。その上、一般に高親和性で、安定性 (熱安定性、酸性、塩基性耐性) が高いという性質があるため従来のイムノトキシンと比較して小さな分子量で安定性の高いイムノトキシンを構築できると予想される。我々により、遺伝子組換えビフィズス菌においてラクダ科 1 本鎖抗体 (図 3 b) が分泌発現されることが確認されており、本イムノトキシンの分泌発現宿主としてビフィズス菌が最適と考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は遺伝子組換えビフィズス菌を用いて EGFR 陽性がんに対する新規な治療法を確立することである。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もって腫瘍でのみ増殖する。我々は、ビフィズス菌に抗 EGFR 抗体/緑膿菌外毒素 A 融合蛋白質を分泌させることにより、in vivo で EGFR 陽性移植がん細胞に対し抗腫瘍活性が

現れることを見出した。これを基に具体的な研究項目として(1)種々の EGFR 陽性がん細胞に対する *in vivo* での抗腫瘍効果の解析、(2)本融合蛋白質の分子レベル、細胞レベルにおける作用機序の解析を行い、EGFR 陽性がんに対する新規治療法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

(1)種々の EGFR 陽性がん細胞に対する *in vivo* での抗腫瘍効果の解析

膵臓がん細胞由来細胞 BxPC-3 を用いた場合の抗腫瘍効果

6 週齢の雌の KSN/Slc ノードマウスに、 $2 \times 10^6$  の BxPC-3 細胞を皮下移植し、12 日後に各群 (Vehicle、8C7 toxin、Toxin control;  $n=5$ 、図 3 a, c) を約  $95\text{mm}^3$  になるように群分けした後、8C7 toxin を発現する組換えピフィズス菌及び Toxin control を発現する組換えピフィズス菌を  $1.5 \times 10^9$  個で静脈内に投与した。さらに、27 日後に  $1.5 \times 10^9$  個の組換えピフィズス菌を静脈内に再投与した。陰性対照 (Vehicle) には、組換えピフィズス菌を静脈内に投与していないノードマウスを使用した。体内の組換えピフィズス菌の栄養補助のために、全マウスに毎日 1mL の 20%ラクトコースを腹腔内に投与した。腫瘍径は、BxPC-3 細胞を皮下移植した日の 12 日、15 日、22 日、27 日、32 日、37 日後にノギスを用いて計測した。腫瘍体積は、「(短径)<sup>2</sup> × (長径)/2」の計算式で算出した。

ヒト非小細胞肺癌由来細胞 PC-9 を用いた場合の抗腫瘍効果

6 週齢の雌の KSN/Slc ノードマウスに、 $1.7 \times 10^6$  の PC-9 細胞を皮下移植し、8 日後に各群 (Vehicle、8C7 toxin、Toxin control;  $n=5$ 、図 3) を約  $95\text{mm}^3$  になるように群分けした後、8C7 toxin の組換えピフィズス菌及び Toxin control の組換えピフィズス菌を  $1.5 \times 10^9$  個で静脈内に投与した。陰性対照 (Vehicle) には、組換えピフィズス菌を静脈内に投与し

ていないノードマウスを使用した。全マウスに毎日 1mL の 20%ラクトコースを腹腔内に投与した。腫瘍径は、PC-9 細胞を皮下移植した日の 9 日、10 日、11 日、14 日、17 日、21 日、24 日後にノギスを用いて計測した。

(2)抗 EGFR 抗体/緑膿菌外毒素 A 融合蛋白質の分子レベル、細胞レベルにおける作用機序の解析

分子レベルでの作用機序の解析

大腸菌で作製した 8C7 EGFP (図 3a の Toxin を EGFP にした組換え蛋白質) と EGFR 細胞外ドメイン (ECD; extracellular domain) との解離定数 ( $K_D$ ) の測定

8C7 EGFP と組換えヒト EGFR ECD との結合親和性を、Biacore 3000 を用いた表面プラズモン共鳴法にて解析した。測定手法はシングルサイクルカイネティクス法で行い、8C7 EGFP を 1.56nM (1 回目)、3.13nM (2 回目)、6.25nM (3 回目)、12.5nM (4 回目)、25nM (5 回目) の順で連続添加して測定した。

細胞レベルでの作用機序の解析

EGFR を過剰発現する A431 細胞と EGFR の発現量の少ない HT-29 細胞に対する各融合タンパク質 (8C7toxin、8C7EGFP、Toxin control) の増殖抑制作用を検討した。96 ウエル培養プレートに  $2.5 \times 10^4$  cells/50  $\mu\text{L}$  培地 (0.2%ウシ胎児血清を含む DMEM 培地)/well で細胞を加え、3 時間培養後、精製 8C7toxin、8C7EGFP、Toxin control を 400、200、100、50 及び 25ng/mL で含む培地を 50  $\mu\text{L}$  ずつ添加した。

### 4. 研究成果

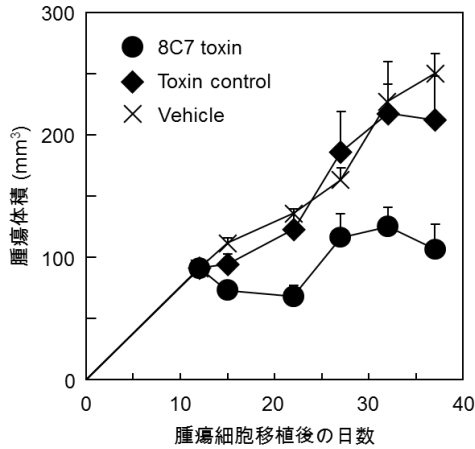
(1)種々の EGFR 陽性がん細胞に対する *in vivo* での抗腫瘍効果の解析

膵臓がん細胞由来細胞 BxPC-3 を用いた場合の抗腫瘍効果

結果を図 4 に示す。

8C7 toxin を発現する組換えピフィズス菌では、陰性対照の Vehicle と比較して、90%の腫瘍増殖抑制効果がみられた。一方、抗

図 4

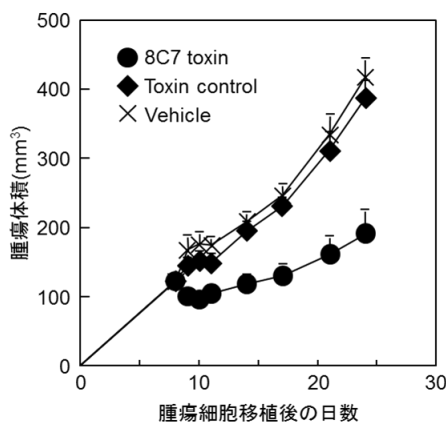


EGFR 一本鎖抗体を含まない陰性対照 Toxin control を発現する組換えピフィズス菌では、ほとんど腫瘍増殖抑制効果がみられなかった。これらの結果は、in vivo において、組換えピフィズス菌から分泌された 8C7 toxin が抗 EGFR 一本鎖抗体部分を介して A431 細胞表面の EGFR 受容体と結合し、緑膿菌外毒素 A 部分によって殺細胞効果を発揮したことを示唆している。今回得られた抗腫瘍効果は、膵臓癌の治療で使用される代謝拮抗薬ゲムシタピン、及び EGFR を標的とするモノクローナル抗体セツキシマブの併用効果よりも腫瘍増殖抑制効果が強く、腫瘍増殖抑制効果としては十分であることが明らかとなった。

ヒト非小細胞肺癌由来細胞 PC-9 を用いた場合の抗腫瘍効果

結果を図 5 に示す。

図 5



8C7 toxin を発現する組換えピフィズス菌で

は、陰性対照の Vehicle と比較して、77%の腫瘍増殖抑制効果がみられた。一方、陰性対照 Toxin control を発現する組換えピフィズス菌では、ほとんど腫瘍増殖抑制効果がみられなかった。これらの結果は、と同様に in vivo において組換えピフィズス菌から分泌された 8C7 toxin が抗 EGFR 一本鎖抗体部分を介して A431 細胞表面の EGFR 受容体と結合し、緑膿菌外毒素 A 部分によって殺細胞効果を発揮したことを示唆している。

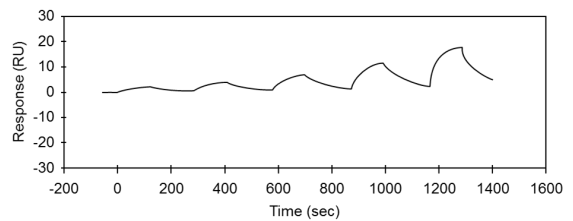
(2)抗 EGFR 抗体/緑膿菌外毒素 A 融合蛋白質の分子レベル、細胞レベルにおける作用機序の解析

分子レベルでの作用機序の解析

8C7 EGFP と EGFR 細胞外ドメイン (ECD ; extracellular domain)との解離定数 ( $K_D$ ) の測定

結果を図 6 に示す。

図 6



8C7 EGFP と組換えヒト EGFR ECD の  $K_D$  値は 11nm であり、8C7 EGFP は EGFR ECD に強く結合することがわかった。

細胞レベルでの作用機序の解析

結果を図 7 (A431)と図 8 (HT-29)に示す。

8C7 toxin は、A431 細胞について濃度依存の増殖阻害活性が検出され、 $IC_{50}$  は 0.68nmol/L(47.5ng/mL)であった。一方、陰性対照である Toxin control では増殖阻害活性が検出されなかった。したがって、8C7 toxin の標的細胞特異的な細胞増殖阻害活性が立証された。この結果は、8C7 toxin が抗 EGFR 抗体部分で EGFR に結合し、EGFR インターナライゼーションが生じて細胞内に取り込まれ、その後、外毒素部分が細胞質内にトランスロケーションし、EF-2 を ADP リボシル化

図 7(A431 細胞)

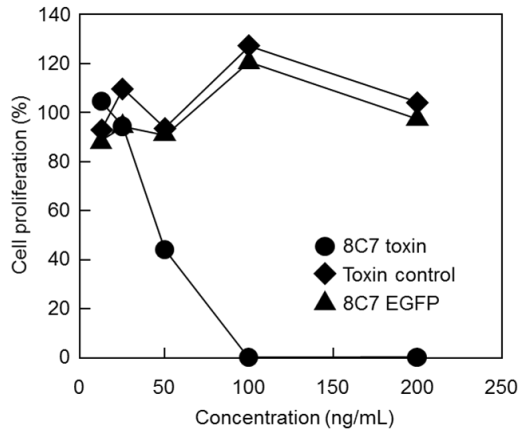
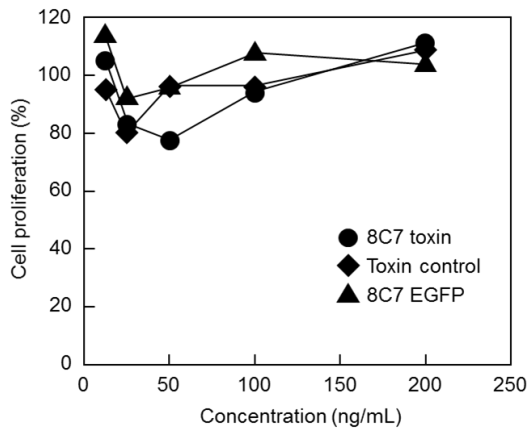


図 8 (HT-29 細胞)

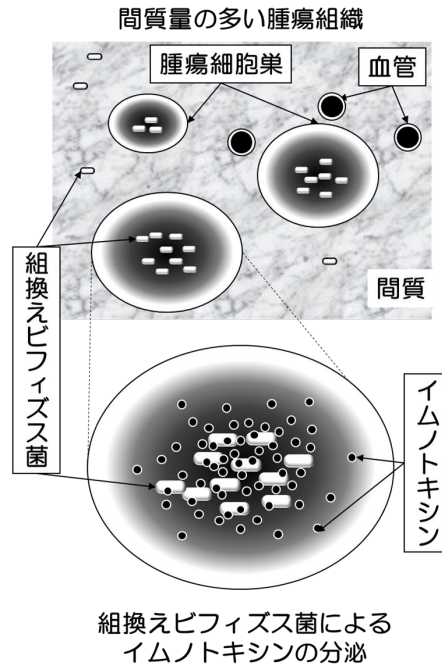


して不活性化することによって、A431 細胞のタンパク質合成が阻害されたことを示唆している。また、陰性対照である 8C7 EGFP で細胞増殖阻害活性が検出されなかったことは、8C7 EGFP が抗 EGFR 抗体部分で EGFR に結合しても外毒素部分がないことで EGFR のシグナル伝達を阻害できず、細胞増殖に影響を及ぼさないことが示唆された。また、EGFR の発現量の少ない HT-29 細胞では増殖阻害活性は検出されず、8C7 toxin の細胞増殖阻害活性には EGFR の発現量が重要であることが示唆された。

イムノトキシンを用いた治療法は、分子ターゲットを狙い撃ちできる弾頭部分と、細胞殺傷部分である爆薬部分があるために、ミサイル療法とも呼ばれている。このミサイル療法剤はリンパ腫などでは有効であるが、固形がんである膵臓がん代表される間質が豊

富で血管が乏しい難治性がんには有効性を示すことができていない。これは血中に投与されたイムノトキシンが、間質を越えて腫瘍組織に分布できないからだと考えられる。組換えピフィズス菌を用いたがん治療においては図 9 に示すように腫瘍内部でイムノト

図 9



キシンを発現・分泌することが可能となる。さらに間質が豊富で血管が乏しいという難治性がんの特徴は、腫瘍組織内の酸素分圧の低さ（嫌氣的環境の増大）につながると考えられる。この酸素分圧の低さは嫌気性菌のピフィズス菌にとっては生息領域の増大をもたらし、組換えピフィズス菌を用いたがん治療においては利点となり得ると考えられる。

さらに、過去イムノトキシンを用いた治療で良い結果が得られなかった理由として、体内でイムノトキシンに対する中和抗体が産生され、繰り返し投与すると効果が出にくくなる点や、生物毒素であるため代謝（肝臓）・排泄（腎臓）に障害がおきやすくなる点が考えられる。これらの点についても、組換えピフィズス菌を用いたがん治療においては腫瘍内部でイムノトキシンを発現分泌するため、その発現量は上記の問題が発生しないよ

うなごく少量でよいと考えられる。実際に、本イムノトキシンを発現・分泌するピフィズス菌を投与したマウスで中和抗体は検出できず、肝障害も発生しない。また、イムノトキシンとして抗 EGFR 抗体と細胞内に取り込まれるのに必要な細胞結合ドメインを欠失させた緑膿菌外毒素 A を融合させたものを用いるため、殺細胞活性は EGFR 発現細胞に限定されると考えられることから、EGFR のチロシンキナーゼ阻害薬にしばしばみられる下痢や発疹も限定的なものになる可能性がある。これらの利点も、組換えピフィズス菌を用いたイムノトキシン療法にはあると考えている。

組換えピフィズス菌を用いたがん治療は、ピフィズス菌の偏性嫌気性菌としての特性から生じる 好气的環境である正常組織では増殖せず、嫌气的環境をもつ腫瘍組織のみで増殖すること（腫瘍選択的集積性）による副作用の軽減、従来の抗腫瘍薬にはない、腫瘍組織内部の低酸素領域からの殺細胞効果のある薬剤（イムノトキシン、抗体など）の放出による効率の良い抗腫瘍効果の発現、などの利点があるため、がん治療において一定の役割を果たせる存在となりえると考えている。

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計9件)

平裕一郎、平郁子、大野まき、西川毅、磯田勝広、池本守、斎藤浩美、石田功 嫌気性菌をドラッグデリバリー担体に用いた固形がんに対する新規治療法の開発---in vivo レベルでの解析 第 57 回日本薬学会関東支部大会 平成 25 年 10 月 26 日 帝京大学(東京都板橋区)

西川毅、平裕一郎、平郁子、大野まき、磯田勝広、池本守、斎藤浩美、石田功 嫌気性菌をドラッグデリバリー担体に用いた固形がんに対する新規治療法の開発---細胞・分子レベルでの解析 第 57 回日本薬学会関東支部大会 平成 25 年 10 月 26 日 帝京大学(東京都板橋区)

平裕一郎 遺伝子組換え嫌気性菌によるがん治療(招待講演) 第 58 回日本薬学会

関東支部大会 2014 年 10 月 4 日 昭和薬科大学(東京都町田市)

〔図書〕(計1件)

平裕一郎 他、シーエムシー出版、抗体薬物合体(ADC)の設計開発、2016、119-128

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称:組換え偏性嫌気性グラム陽性菌  
発明者:西川毅、平裕一郎、平郁子、石田功

権利者:帝京平成大学

種類:特許

番号:WO/2015/104994

出願年月日:2014.12.24

国内外の別:国外

名称:抗腫瘍剤、腫瘍検出用マーカー及び経口ワクチン

発明者:平裕一郎、石田功

権利者:帝京平成大学

種類:特許

番号:WO/2014/010758

出願年月日:2013.7.12

国内外の別:国外

取得状況(計1件)

名称:リポソーム、リポソームの製造方法、及び医薬組成物

発明者:丸山一雄、鈴木亮、平裕一郎

権利者:丸山一雄、鈴木亮

種類:特許

番号:第5491067号

取得年月日:2014.3.7

国内外の別:国内

〔その他〕

報道関連情報

日経産業新聞 平成 28 年 2 月 9 日 朝刊

「抗がん剤候補 共同研究 シンバイオ、帝京平成大と」9 面

ホームページ等

帝京平成大学 薬学部特設サイト 研究ユニット紹介 抗体・DDS ユニット

<http://pharm.thu.ac.jp/research/unit/dd.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

平裕一郎(TAIRA, Yuichiro)

帝京平成大学・薬学部・講師

研究者番号:20581953

(2)研究分担者

帝京平成大学・薬学部・教授

石田功(ISHIDA, Isao)

研究者番号:00415556