

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640095

研究課題名(和文) 抗癌タンパク産生システムをパッケージングした治療用細菌マシンの開発

研究課題名(英文) Development of Therapeutic Bacteria Machine Packaging with the Production System of Anti-Cancer Protein

研究代表者

向井 英史 (Hidefumi, Mukai)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：60570885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：発展の著しい合成生物学や応用微生物学は、「生体内の必要な場所で、必要な時に、必要な量だけ薬物を作る」究極のDDS実現のための道標の一つを示している。中でも、遺伝子改変による機能化が容易な細菌類に、抗癌タンパク産生システムをパッケージングした治療用細菌マシンは有望な戦略の一つである。本研究では、そうした試みの端緒として、グラム陽性菌*B. choshinensis*のTNF- α 産生改変株を作製し、TNF- α 感受性腫瘍細胞株L929との共培養実験やL929移植ヌードマウスにおける腫瘍増殖抑制実験により、その抗がん効果を示した。

研究成果の概要(英文)：We successfully developed the *B. choshinensis* highly efficiently secreting murine tumor necrosis factor- α (TNF- α) and demonstrated its significant antitumor effects against the cultured TNF-sensitive L929 cells and a tendency to inhibit tumor growth in L929 bearing mice by intra-tumor injection. This is the original report showing the antitumor effects by engineered *B. choshinensis*, indicating that it is one of the potential bio-machines for synthetic biology and applied microbiology focusing on cancer therapy.

研究分野：ドラッグデリバリー、分子イメージング

キーワード：がん治療 遺伝子改変細菌 抗がんタンパク

1. 研究開始当初の背景

五十年後の癌治療を想像した時、現在の様な投薬治療から大きな進化を遂げているだろうと期待されるし、そうでなければならない。ここ 20 年程の間に、バイオテクノロジーは急速に進歩し、遺伝子治療や細胞治療などの新しい治療戦略が開発されてきた。これらは、「生体内において抗癌物質を産生するシステムの投与」へのパラダイムシフトであり、従来の薬物治療が抱える多くの問題を回避できる、極めて合理的な戦略と言える。ただ、現状では、哺乳類細胞のタンパク質産生効率の低さなどが理由で、十分な治療効果を得られない場合が多い。

こうした背景から考察し、遺伝子改変による機能化が容易で、タンパク質の大量産生に適している細菌類に、抗癌タンパク質産生システムをパッケージングし、治療用細菌マシンへ改造することを着想した。そのためには、癌環境応答性のセンサーや抗癌作用を持つ遺伝子などのビルディングブロックの開発と、それらをパッケージングして治療上有用な改変細菌を構築するアイデアの両輪が重要である。前者については、合成生物学の一分野として、人工プロモーターや人工リボスイッチなどの開発がスタートしており、ライブラリー化の試みも行われている。一方、後者の、治療上有用なシステムとしてのパッケージングに関する研究は端緒にいたばかりで、プラットフォームとして利用された実績のある宿主細菌の種類も大変限られており、トライアル&エラーを要する課題が多く存在する。

こうした合成生物学や応用微生物学の医療応用によって、遺伝子工学による生活や産業への恩恵と同規模のインパクトがもたらされると考えられる。本研究の成果として、サイトカインなどの分泌型抗癌タンパク質を利用した細菌治療開発のための、新しいプラットフォームを提供でき、重要なマイルストーンの一つをクリアできると予想される。これは、近年研究が進む、遺伝子治療や細胞治療の持つ問題点（作用機構の複雑さ、機能化や制御の難しさ、高価格）を解決した、より実用的な戦略になると考えられる。

2. 研究の目的

具体的には、タンパク質の大量分泌産生能が報告されているが、細菌治療を目的に研究されたことの無い新しい細菌種である、ブレビバチルス菌を宿主細菌の第一選択として癌治療に適した形質転換株を構築し、その有用性について検証して、癌治療用細菌マシン構築の Proof of Concept を取得する。

3. 研究の方法

ブレビバチルス菌を、マウスやヒトの tumor necrosis factor- α (TNF- α)産生を目的に形質転換した。TNF- α 感受性腫瘍細胞株 L929 との共培養実験や L929 移植ヌードマウスにおける腫瘍増殖抑制実験により、抗がん効果を評価した。また、静脈内投与後の副作用の検証として、血中バイオマーカーおよび組織化学的な評価を行った。

併せて、静脈内投与可能な細菌種である大腸菌について、その生体内分布の経時的变化やがん微小環境への影響について検証した。

4. 研究成果

ブレビバチルス菌を、マウスやヒトの Tumor necrosis factor- α (TNF- α)産生型に改変した(Fig. 1)。作製した遺伝子改変細菌は、TNF- α を高濃度に分泌(1,000~10,000 ng/mL of medium) することが明らかとなり、この改変細菌は、TNF- α 感受性腫瘍細胞株 L929 を用いた共培養実験において、細菌自体の毒性ではなく、改変体が分泌する TNF により非常に強力な抗腫瘍効果を発揮する（最適条件では、ほぼ完全な増殖抑制）ことが分かった(Fig. 2)。

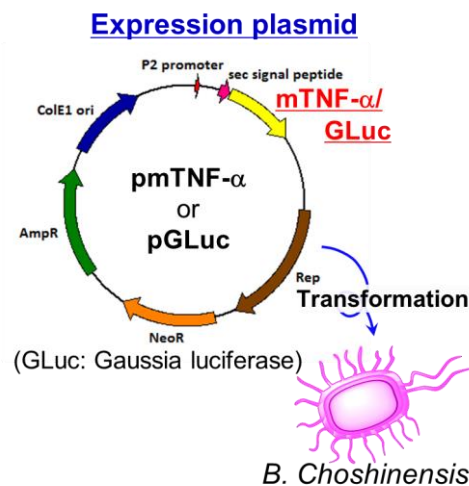


Fig. 1. Construction of *B. choshinensis* secreting mTNF- α or GLuc.

L929 移植ヌードマウスに対し、本改変細菌を腫瘍組織局所に投与した検討では、Gaussia luciferase (GLuc)を分泌する対照群においても、細菌自体に誘発されたと考えられる軽い炎症反応による抗腫瘍効果が見られたが、TNF- α 分泌改変細菌投与群では、有意に高い抗腫瘍効果が示された(Fig. 3)。

次に、*B. choshinensis*について、その静脈内投与後の副作用について検証した。ALT, AST, BUN, クレアチニンなどの血中バイオマーカーおよび組織化学的な評価において組織傷害は認められず、*B. choshinensis*の癌治療用細菌マシンとしての有用性について異なる角度から論証することが出来た。

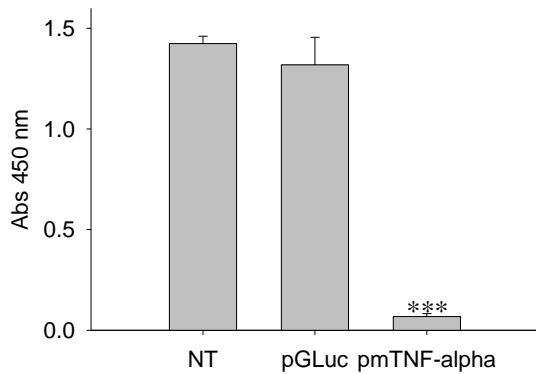


Fig. 2. Viable cell counting of L929 cells treated with *B. choshinensis* with pmTNF- α or pGLuc. Each value represents mean + SD (n = 3). *** $P < 0.001$ vs NT and pGLuc groups. This result is the representative of multiple independent studies.

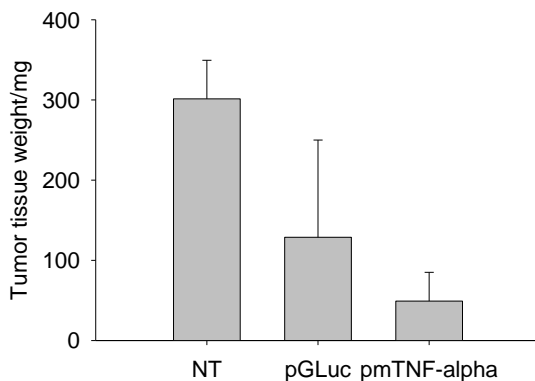


Fig. 3. Tumor tissue weight of 21 days after intra-tumor injection of *B. choshinensis* with pmTNF- α or pGLuc into L929-bearing mice. Each value represents mean + SD (n = 3-4).

また、生体内における細菌マシンの追跡を目的として lux オペロンや各種蛍光タンパク遺伝子を導入した、*B. choshinensis* や嫌気性菌である *E. coli* の改変株を取得した。発光/蛍光イメージングの結果、*E. coli* は静脈内投与後一旦大きく減少するが、約 2 週間後をピークとして腫瘍組織において選択的に再増殖することが確認された(Fig. 4 and 5)。これは、*B. choshinensis* で必要であった頻回投与を回避可能であることを意味している。

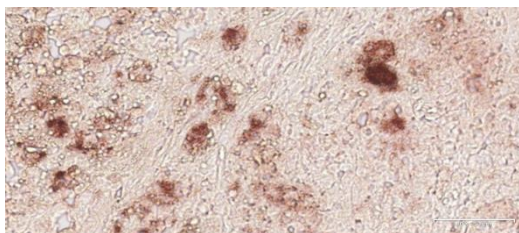


Fig. 4. Immunostaining of the tumor of mice injected with *E. coli*.

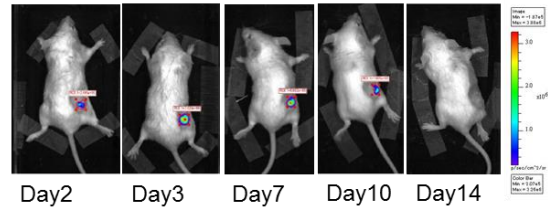


Fig. 5. Selective growth of *E. coli* in the tumor (luminescence imaging, tumor-bearing mice, *E. coli*/pXen13(lux))

そこで、*E. coli* で機能すると考えられる 4 種類の異なる分泌シグナル配列を有する TNF- α 発現株を作製し、最適な分泌発現系をスクリーニングした後、抗癌効果について検証を進めた。その過程で、抗がんタンパクを産生しない大腸菌(無毒性の株)の静脈内投与によって顕著な抗腫瘍効果が認められた。そこで、摘出した腫瘍組織の切片を作製し、免疫組織染色を行ったところ、特にリンパ管マーカーの発現の増加などが認められ、大腸菌の投与により、がん微小環境が大きく変化していることが示唆された。この結果は、静脈内投与が可能な大腸菌を宿主とした治療用細菌マシンの開発において、適切な分泌抗がんタンパクの選択により、大腸菌自体によるがん微小環境改変との相乗効果を期待させるものであり、大腸菌とがん組織の相互作用についてより詳細な研究の蓄積の必要性を示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 向井英史、高橋麻衣子、渡辺恭良、遺伝子改変 *B. choshinensis* のがん治療における有用性、平成 26 年度がん若手研究者ワークショップ、蓼科グランドホテル滝の湯(長野県 茅野市)、2014 年 9 月 5 日
- ② 向井英史、高橋麻衣子、渡辺恭良、腫瘍組織内抗癌タンパク産生 *B. choshinensis* の作製と抗腫瘍効果、第 30 回日本 DDS 学会学術集会、慶應義塾大学薬学部 芝共立キャンパス(東京都 港区)、2014 年 7 月 31 日
- ③ Hidefumi Mukai, Maiko Takahashi, Yasuyoshi Watanabe, Potential use of engineered *B. choshinensis* in *in situ* TNF- α production machine in the tumor of xenograft mice and its antitumor effects, 41st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Chicago, USA, July 16, 2014
- ④ 向井英史、バクテリア+がん+イメージ

ング+DDS=?、第8回「長野ミーティング：生物資源の有効利用を目指して」、ラフォーレ倶楽部白馬八方（長野県 白馬村）、2014年3月3日

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向井 英史 (MUKAI, Hidefumi)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：60570885