

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08022

研究課題名(和文) 抗腫瘍性物質の腫瘍内持続的産生を目指す基盤研究

研究課題名(英文) Development of system for in situ and continuous production of antitumor molecules.

研究代表者

谷口 俊一郎 (Taniguchi, Shunichiro)

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：60117166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素環境を有する固形がん選択的に着床・増殖するビフィズス菌で抗HER2scFvを発現・分泌させる系を構築した。ヒトHER2陽性がんを移植したヌードマウスに抗HER2scFv分泌ビフィズス菌を静注し、同菌の選択的腫瘍内局在と抗腫瘍性を認めた。抗腫瘍性IFN-gなどのサイトカイン発現・分泌系も樹立した。一方、ビフィズス菌の安全性に着目し免疫反応解析を行った。大腸菌などのグラム陰性菌に比べ、B菌作用による樹状細胞やマクロファージからの炎症性サイトカイン産生は1/10で、自然免疫賦活作用は弱いことがわかった。一方、菌の培養上清にサイトカインを誘導する分子を見出し、その作用機序解明を進めている。

研究成果の概要(英文)： We have established gene-engineered Bifidobacterium secreting biologically active anti-HER2 scFv. When the Bifidobacterium producing anti-HER2 scFv(B/anti-HER2) was iv injected to immunodeficient nude mice bearing HER2-positive tumor with hypoxic microenvironment, we confirmed the selective localization, growth of B/anti-HER2 in the tumor and the anti-HER2 scFv production in situ, furthermore, the tumor growth being consequently suppressed. In addition to anti-HER2 scFv, we also have established Bifidobacterium secreting IFN-g.

On one hand, immunological aspects of Bifidobacterium were examined. When macrophages and dendritic cells were exposed to Bifidobacterium, induction of inflammatory cytokines was very weak as compared with other bacteria, such as E. coli. In the dialyzed fraction of Bifidobacterium culture medium, however, several proteins inducing cytokines were identified, so that the analysis on the proteins is under way.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：低酸素環境 固形がん ビフィズス菌 遺伝子組み換え 単鎖抗体 HER2 抗腫瘍性分子DDS 安全性

1. 研究開始当初の背景

近年、固形がん治療には、様々な分子標的薬の開発とその成果によって、治療効果の改善が報告されている。しかしながら、薬剤耐性による再発など、新しい治療薬の開発も必要とされている。我々はがんの微小環境に注目し、固形がん治療のためにその嫌気的環境を標的とするピフィズス(B)菌をドラッグデリバリーシステム(DDS)ツールとして開発した。

最近、抗がん剤としてがん細胞の細胞表面膜蛋白質に対する抗体や免疫抑制系分子を標的とした免疫系を活性化する抗体医薬などが注目され、顕著な成果をあげているが、両者とも薬価が高額であり、又後者は自己免疫疾患的な副反応が深刻となる場合も報告されている。これらの問題点を解決するために、がんの嫌気的環境に着目しピフィズス菌による抗体医薬の腫瘍局所での持続的発現・分泌系樹立を考えた。

これまでの前臨床での観察では安全が確かめられているが、その詳細な理由は未解明であり、安全性をさらに担保するためには免疫学的解析が重要と考えている。B菌がヒトの常在細菌の1つという事実から、免疫寛容の視点から解析し、より安全な系を目指す。

2. 研究の目的

(1) 抗腫瘍分子発現ベクターの構築

ピフィズス菌を用いた外来性遺伝子産物の発現分泌系に必要な発現ベクター構築を行う。B菌での持続的な遺伝子発現とタンパク質分泌に必要なプロモーターやシグナルペプチドを探索した結果を基に、抗腫瘍分子の発現分泌系を構築する。

(2) B菌を用いた抗腫瘍性サイトカイン、および scFv の産生

本研究課題では、これまでにすでに知られている抗腫瘍性サイトカイン(例えば TNF-) や抗腫瘍抗体(例えば抗 HER2 抗体の単鎖抗体: scFv) を発現分泌させる各発現ベクターの構築を行なう。

(3) 安定 B 菌株の作成

一般的には、トランスフォーメーション後、薬剤存在下で発現プラスミドは安定して維持できるが、非選択圧下での長期間の保持は困難である。治療薬として用いる場合は、安定した菌株の取得が必須であることから、B菌が持つ制限酵素や DNA 組換え酵素の変異体などを作成する。

(4) B 菌由来免疫制御分子の同定

腸内細菌叢を形成する B 菌は、外来の病原性細菌に比べ、宿主免疫刺激能は弱いことが想定される。しかしながら、その分子機構については明らかになっていない。B 菌を抗腫瘍分子の DDS として用いる場合、その投与経

路は本来菌が存在する腸管への投与ではなく、静脈注射など異所性に投与する必要がある。その際、宿主免疫細胞が B 菌もしくは B 菌由来成分を認識することが考えられる。実際、動物を用いた投与試験では、複数回反復投与で、少量ながら B 菌に対する抗体が検出された。この抗体によってアレルギー反応などの重篤な症状が起こっているわけではないが、宿主抗体が認識する B 菌抗原や自然免疫活性化分子を同定する。B 菌を相同組換え技術で、免疫刺激分子をロックアウトすることが可能であれば、安全性の向上が期待できる。このような作業を通して、より安全な菌株樹立を試みる。

3. 研究の方法

がんの嫌気的環境を標的としたピフィズス菌(B菌)を用いた DDS の有用性と安全性向上のために必要な技術の構築と宿主免疫に対する分子機構の解析のために以下の研究を行った。

(1) 抗腫瘍分子発現ベクターの構築

B 菌で生物医薬品が安定して高産生するための、発現ベクターを作成するために、B 菌や乳酸菌内で遺伝子を発現させるプロモーターのクローニング、分泌タンパク質として機能させるためのシグナル配列、その他、シグナル配列直下に分泌タンパク質を高発現させる配列の検索を行った。

(2) B 菌を用いた抗腫瘍性サイトカイン、および scFv の産生

抗腫瘍作用を持つサイトカイン、例えば、TNF-、IFN- などの遺伝子をクローニングし、(1)で作成したベクターを用いて発現させる。

近年、リウマチなどの自己免疫疾患や腫瘍に対する抗体医薬が承認され、顕著な臨床効果が出ていることが報告されている。そこで既に乳がんの治療で使用されている抗 HER2 抗体について、scFv を作成し、(1)のベクターを用いて、B 菌に産生させる系を構築する。さらに全身性に投与すると重篤な副作用のため、大量に投与できなかったサイトカインや scFv を in vivo で腫瘍局所で、発現させることで、生理活性と抗腫瘍効果についても検証する。

(3) 安定 B 菌株の作成

B 菌発現系の構築において、発現プラスミドの非選択圧下で保持の安定性について検証する。遺伝子保持の不安定な菌株については、B 菌の有する制限酵素や DNA 組換え酵素などを相同組換えでロックアウトしてみるなど、プラスミドの安定性増強の工夫を行なう。または相同組換えでゲノム DNA 内に発現ベクターをロックインし、その無選択圧条件下でその安定性、発現能などを明らかにする。

(4) B 菌由来免疫制御分子の同定

B 菌は腸内細菌叢を形成する常在細菌であり、本研究課題の抗腫瘍治療薬の DDS として体内投与を考える上で、宿主側の免疫反応と安全性の確保が重要な課題である。すでにマウスなどの前臨床の研究では、顕著な全身性のサイトカインストームやアレルギー炎症は観察されていない。そこで B 菌に対する免疫応答について、マウス免疫細胞を用いて *in vitro* で検証をおこなった。また、B 菌の遺伝子データベースから、シグナルペプチドを持つ分泌性のタンパク質および膜表面に存在する可能性が高い分子群について、リコンビナントタンパク質を作成し、*in vitro* で免疫反応の有無を検討した。

4. 研究成果

(1) 抗腫瘍分子発現ベクターの構築

pUC57 プラスミドに目的遺伝子をクローニングしたのち、大腸菌 - ビフィズス菌シャトルベクターに乗せ変えた。このシャトルベクターに PHu もしくは P30 を発現する遺伝子の上位に組み込み、その下流にシグナルペプチド - 遺伝子 - His-tag という配列でベクターを構築した。

さらに標的タンパク質の分泌・発現量を増強させるために、シグナルペプチドの下流に B 菌の細胞壁結合性加水分解酵素の配列の一部を挿入した。特定のプロモーター配列やシグナルペプチドでは、すべての遺伝子の発現・分泌をすることができないため、その他、発現分子ごとにシグナルペプチドについて様々な組み合わせを工夫することで、安定な発現ベクターの構築ができた。

(2) B 菌を用いた抗腫瘍性サイトカイン、および scFv の産生

本研究課題では、抗腫瘍性を示すサイトカインの一つである TNF- α 、IFN- γ 分子を産生する B 菌の樹立を試みた。これまでに発現細胞の樹立であり、前臨床や臨床研究に必要な B 菌にするためにより安定的分泌量を増加させる菌株の樹立を行っている。

また、既に乳がん治療薬として使用されている抗 HER2 抗体をモデルに、scFv を作成することを試みた。本来、抗体は H 鎖 2 と L 鎖 2 本がジスルフィド結合でできた高分子であり、大腸菌などでは産生することが困難である。我々は、抗原結合部位を形成する H 鎖と L 鎖の V 領域をリンカーペプチドで結合させた単鎖抗体 scFv を作成し、B 菌に産生する系の樹立を試みた。(1)での組み合わせの検討し、抗 HER2 scFv の安定産生株を樹立した。プロモーターは H30 を使用することで発現が高い株が得られた。

in vitro で抗 HER2-scFv を産生させ、培養上

清中から scFv を精製し、その活性を確認した。HER2 を発現している BT-474 や SK-BR-3 細胞では、この抗 HER2-scFv が結合することが、蛍光顕微鏡やフローサイトメトリで確認できた。逆に HER2 を発現していない SK-MEL-28 細胞では、コントロールと同様に結合が認められなかった。

また、抗腫瘍効果を明らかにするために、HER2 陽性 BT474 細胞を用いて、*in vitro* で増殖抑制効果を調べた。その結果、ドーズ依存性の増殖効果が確認できた。また、*in vivo* の担癌モデル動物を用いた実験で評価を行った。PBS 投与やコントロール scFv をマウスに投与した場合と比較して、抗 HER2-scFv を投与した群では、腫瘍サイズの縮小や消滅には至らなかったが、明らかに腫瘍増殖が抑制がされた。本来、抗 HER2 抗体は、ADCC(抗体依存性細胞傷害活性)による抗腫瘍効果があるが、scFv では Fc 領域が欠如しているため、ADCC 効果が得られず市販の抗体医薬とは異なると考えられる。

(3) 安定 B 菌株の作成

プラスミドベクターを用いた場合には、抗菌剤のない非選択圧下では、安定して維持できない場合がある。DDS として将来臨床応用を考えた場合、安定した発現菌株の樹立が重要であると考えている。そこで我々は、発現ベクタープラスミドが除去されるメカニズムとして、制限酵素を考えた。B 菌における遺伝子標的技術で制限酵素欠損菌を樹立した場合、予備的にプラスミドの保持効果が上昇したが、不十分であった(未発表)。また、近年のゲノム編集方法を用いて、発現遺伝子を B 菌のゲノムに挿入する技術は今後の課題として残っている。将来、臨床治験を行う場合を考慮して、プラスミドによる安定株とゲノムに挿入型の菌体のどちらがよりよいか検証と検討が必要と考えている。

(4) B 菌由来免疫制御分子の同定

これまでマウス、犬、サルを用いた前臨床試験で B 菌を静脈投与した場合、サイトカインストームなどの全身性の炎症症状は確認できなかった。しかしながら、反復投与による抗体の出現やアレルギー症状はないとはいえない。そこで B 菌由来の分泌成分についてマウス骨髄由来のマクロファージや樹状細胞などの自然免疫細胞を用いて免疫細胞活性化について評価した。

$10^6 \sim 10^7$ CFU/ml の刺激で大腸菌などのグラム陰性菌に比べ、B 菌自体による樹状細胞やマクロファージからの炎症性サイトカイン(IL-1, IL-6)産生は、1/10 程度であった。黄色ブドウ球菌や大腸菌と比較して、明らかに自然免疫細胞に対する免疫賦活作用は弱いことが示された。しかし、B 菌は全く免疫反応を惹起しないわけではない。菌の培養上清を PBS(-)で透析し、同様にマクロファージを

刺激したところ、同様に IL-6 などのサイトカイン産生が観察された。そこで B 菌ゲノムデータベースより、分泌性タンパク質と細胞膜や細胞壁に発現している分子に注目し、大腸菌やプレバチルスを用いてリコンビナントタンパク質を作成した。エンドトキシンなどの免疫活性化物質が含まれないように、変異大腸菌(ClearColi)を用いて、さらに界面活性剤などを用いて精製することでリポ多糖などが顕著に減少した。約 20 のタンパク質を分離精製し、刺激を行った。数個のトランスポーターや酵素分子が炎症サイトカインの産生を誘導した。LPS とは異なり、98 30 分の熱処理で失活することから、タンパク質であることが示唆される。また、TLR4(-/-)や TLR2(-/-)などの遺伝子欠損マウス由来の樹状細胞やマクロファージで、部分的にサイトカイン誘導作用が減弱することが観察された。一方、培養上清や作成したリコンビナントタンパク分子を用いて免疫抑制効果についても検討を加えている。

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 6 件)

Kohno K, Itoh S, Hanai A, Takii T, Fujiwara T, Onozaki K, Tsuji T, Hida S.; Identification of matrix metallo-proteinase 9-interacting sequences in staphylococcal superantigen-like protein 5., *Biochem Biophys Res Commun.* 査読あり, 497(2), 2018:713-718
doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.138.

Itoh S, Takii T, Onozaki K, Tsuji T, Hida S.; Identification of the blood coagulation factor interacting sequences in staphylococcal superantigen-like protein 10., *Biochem Biophys Res Commun.* 査読あり, 485(1), 2017:201-208
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.053.

Kikuchi T, Shimizu H, Akiyama Y, Taniguchi S.; In situ delivery and production system of trastuzumab scFv with Bifidobacterium. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読あり, 493(1), 2017:306-312.
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.026.

Kitazawa M, Hida S, Fujii C, Taniguchi S, Ito K, Matsumura T, Okada N,

Sakaizawa T, Kobayashi A, Takeoka M, Miyagawa SI.; ASC Induces Apoptosis via Activation of Caspase-9 by Enhancing Gap Junction-Mediated Intercellular Communication. *Pros One.* 査読あり, 12(1):e0169340.
doi: 10.1371/journal.pone.0169340.
eCollection 2017.

Okada N, Fujii C, Matsumura T, Kitazawa M, Okuyama R, Taniguchi S, Hida S.; Novel role of ASC as a regulator of metastatic phenotype. *Cancer Med.* 査読あり, 5(9):2487-2500.
doi: 10.1002/cam4.800.

Sakaizawa T, Matsumura T, Fujii C, Hida S, Toishi M, Shiina T, Yoshida K, Hamanaka K, Ito KI, Taniguchi S.; Potential Role of ASC, a Proapoptotic Protein, for Determining the Cisplatin Susceptibility of Lung Cancer Cells. *Tohoku J Exp Med.* 査読あり, 244(2):133-144. doi: 10.1620/tjem.244.133. 2018.

[学会発表](計 2 件)

Kobayashi S, Shioya K, Kataoka S, Wang L, Shimatani Y, Fujimori Y, Taniguchi S.; Enhanced antitumor effects by a combination approach of interferon-g producing recombinant Bifidobacterium and anti-mPD-1 antibody in CT26 syngeneic mouse model; *AACR* 2017

Kataoka S, Kobayashi S, Seki Y, Shioya K¹, Wang L, Shimatani Y, Nakamura T, Taniguchi S.; Bifidobacterium producing interferon-g induces tumor shrinkage in combination with anti-PD-1 blockade in syngeneic mouse model; Keystone Symposia on Cancer Immunotherapy: Combination, 2018

[図書](計 1 件)

Taniguchi S, Shimatani Y, Fujimori M; Tumor-targeting therapy using gene-engineered anaerobic-nonpathogenic Bifidobacterium longum. *Bacterial*

Therapy of Cancer Methods and Protocols
edited by R. M. Hoffman
186(49-60) Humana Press,2016

なし

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：抗体遺伝子の発現・分泌システム

発明者：谷口 俊一郎他

権利者：信州大学

種類：特許、

PCT/JP2015/002133

番号：PCT/JP2015/002133

出願年月日：2015 年 04 月 17 日

国内外の別：外国

取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷口 俊一郎 (TANIGUCHI Shun' ichiro)

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：6 0 1 1 7 1 6 6

(2)研究分担者

肥田 重明 (HIDA Shigeaki)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：1 0 3 4 5 7 6 2

(3)連携研究者

なし

研究者番号：

(4)研究協力者