博　士　論　文　の　内　容　の　要　旨

氏名	生井　楓
学位名	博士（農学）
学位授与年月日	令和３年９月 30 日
論文題目	乳酸菌組換え体による炎症および腫瘍免疫の制御に関する研究

（博士論文の内容の要旨）

人類の長い歴史の中で、微生物は感染症や様々な疾患の原因として扱われてきた。一方で、近年次世代シーケンサーの急速な発展により腸内細菌叢の重要性が再認識されたとともに、様々な遺伝子工学ツールの発達により、遺伝子組換え微生物の利用が期待されている。腸内細菌叢はもはや宿主における新たな臓器として位置づけられており、腸内細菌の恒常性の維持は様々な疾患の治療における標的となっている。微生物はさらに発酵という形で人類の生活に密接に関連しており、その中で宿主に好影響を与える微生物として、プロバイオティクスが知られている。プロバイオティクスは腸内細菌叢の恒常性に貢献するだけでなく、宿主の免疫機能を調節したり、代謝促進効果を示したりと健康の維持・増進における有用なツールとして広く研究されている。このように、人類の敵とみなされてきた微生物はだんだんと人々の身近な存在となっている。さらに、これら有用微生物を単に保健機能のツールとして用いるだけではなく、疾患の予防や治療といった医療的な利用を目指し、現在様々な研究が進められている。このような微生物は Microbial therapeutics や Next-generation probiotics(NGPs)と呼ばれ、実際にいくつかの研究においてはその有効性が示されている。微生物を使用した疾患の治療として糞便移植（fecal microbiota transplant; FMT）が挙げられる。*Clostridium difficile* 感染に対する FMT は一定の有効性を示しており、Microbial therapeutics の一つとして認識されている。さらに、プロバイオティクスとして知られる乳酸菌に遺伝子工学の技術を用いることで、様々なタンパク質を産生可能となった乳酸菌組換え体（Genetically modified lactic acid bacteria; gmLAB）もまた Microbial therapeutics や NGPs としての利用が期待されている。gmLAB は安価に有用タンパク質を産生することができるだけでなく、そのまま経口的に摂取が可能であるため、タンパク質を精製することなく利用することができる。さらに、乳酸菌が胃酸や胆汁酸に対する抵抗性を有していることも Microbial therapeutics として利用する利点といえるだろう。本研究では、Microbial therapeutics 研究への基礎的知見の提供を目的として、炎症性腸疾患及びがんを標的とした gmLAB を構築した。

1.　インターロイキン１受容体アンタゴニスト（IL-1Ra）を高分泌する gmLAB の構築と急性大腸炎モデルマウスにおける抗炎症効果の検証

西欧および急速に西欧化のすすむ発展途上国における炎症性腸疾患（IBD）の発生率の増加が問題となっており、IBD の世界的なパンデミックの可能性が懸念されている。そのため、従来の IBD 治療薬だけでなく、世界中で IBD を治療するためのより安価な薬剤の開発は重要な課題である。Microbial therapeutics としての gmLAB は、腸管粘膜へ目的タンパク質を直接届ける安価な運搬体としての利用が期待されている。さらに、腸管への局所的な治療タンパク質の運搬はより効率的な治療効果だけでなく、副作用の低減も期待できる。ここでは、IBD の悪化に関与しているインターロイキン１に対する拮抗剤である IL-1Ra を分泌する gmLAB を構築した。構築した gmLAB の経口投与は、急性大腸炎のマウスの体重減少と腸炎の症状スコアの悪化を抑制し、腸間膜リンパ節の CD4+ IL-17A+細胞の数を減少させた。これらの結果は、gmLAB が IL-1Ra を結腸に送達し、その場で IL-1 シグナル伝達を阻害することを示唆している。

2.　生理活性を有する抗 CTLA-4 低分子抗体を産生する gmLAB の構築

がんは自律的な細胞分裂から逸脱し、異常増殖を繰り返すことで引き起こされる疾患であり、世界的な死因としても知られている。がんに対する治療法として様々な戦略が研究されているが、近年免疫チェックポイント阻害剤（Immune Checkpoint Inhibitor; ICI）に注目が集まっている。通常は T 細胞に発現した免疫チェックポイント分子が過剰な免疫反応を抑制し、宿主の恒常性を維持している。がん細胞はこのシステムを利用し、免疫チェックポイント分子を誘導、刺激、も

しくは自身の周りに集積させることとで、抗腫瘍免疫からの逃避を行っている。そこで、ICI を用いて再度免疫を活性化させることで、強力な抗腫瘍効果が得られるとして、免疫チェックポイント分子である cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4（CTLA-4）に対する抗体医薬、イピリムマブが開発された。ここでは、gmLAB を用いた抗腫瘍 Microbial therapeutics の開発を目的として、抗 CTLA-4 低分子抗体（CTLA4scFv）を生成する gmLAB を構築した。この研究では、イピリムマブの配列に基づき CTLA4scFv を設計し、遺伝子発現ベクター（pNZ8148#2）の PnisA プロモーターの下流に挿入することで、CTLA4scFv 発現ベクター（pNZ8148#2-CTLA4scFv）を構築した。さらに、gmLAB における組換え CTLA4scFv の発現を Western blot にて確認し、組換え CTLA4scFv のヒト CTLA-4 タンパク質に対する免疫反応性を、ELISA を用いて明らかにした。以上のことから、CTLA4scFv 産生 gmLAB ががんに対する Microbial therapeutics としてさらなる研究が進められることが期待される。