

京都大学	博士（薬学）	氏名	野村祥子
論文題目	がん治療用生菌製剤開発のための菌種選択および動態評価に関する研究		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>近年、生きた細菌を治療に応用する研究が活発に進められている。特に固形腫瘍は、嫌気性細菌の生着しやすい低酸素、宿主免疫機構の抑制、ネクロシスに伴う豊富な栄養源などの条件を呈することから主要なターゲットとされてきた。細菌の内毒素や宿主免疫賦活作用を利用したがん治療は既にヒト臨床試験にも進んでいる。また最近では、不十分な治療効果を改善する目的で、遺伝子改変を用いた細菌への積極的な機能付加が検討されている。これは、薬効タンパク質産生機構を搭載した生菌製剤が腫瘍内で自己複製しながら抗がん物質を産生する、“On-site Drug Production”の実現を目指すものである。例えば、より高度ながん免疫療法や自殺遺伝子療法などに基づいた治療戦略、遺伝子回路を改変し合成生物学的に細菌をデザインする試みが進められている。</p> <p>こうして“生きた”製剤（生菌製剤）の機能化が進むものの、安全面を考慮した薬学的視点からの評価は十分とは言い難い。使用する生菌自体の生体適合性は治療応用上欠くことのできない重要な要素であり、動態・安全性も含めた総合的評価が不可欠である。そこで申請者は、高い腫瘍内増殖能と安全性を両立する細菌種の選択肢拡大について検討すると共に、静脈内投与した細菌の全身ならびに腫瘍内動態について評価法の開発と解析を行った。これらの研究成果を2章に渡って論述する。</p> <p>第1章 腫瘍内増殖を指標とした細菌種選別法の確立と <i>Blautia coccooides</i> の有用性評価</p> <p>生菌製剤を用いたがん治療には、通常、サルモネラ菌・クロストリジウム菌・大腸菌など、内毒素による強い宿主免疫賦活化能をもつ細菌種が用いられてきた。しかし、“On-site Drug Production”を治療概念とし、外来性抗がんタンパク質を生産させる生菌製剤の開発においては、むしろ免疫原性が低く安全性の高い細菌種のほうが望ましい。候補として宿主と共生関係にある生体内常在菌などが挙げられるが、腫瘍において生着・増殖することが知られた菌種は限られており、本治療概念に即した有効な細菌種の拡大が必要と考えられる。そこで本研究では、まず、腫瘍内増殖能を指標として有用な細菌種を高効率に選別する方法を確立した。具体的には、腫瘍モデルマウスに複数の細菌種を同時に静脈内投与した後、一定期間後に腫瘍を摘出し、そのホモジネートを寒天培地上で培養した。同一寒天培地上に形成した複数細菌種のコロニーに対して16srDNA配列のダイレクトPCRを適用することで、腫瘍内に生着・増殖する細菌種を同定した。マウス由来結腸癌細胞株colon-26担がんマウスを用いた検討の結果、哺乳類の腸内最優勢菌 <i>Blautia coccooides</i> および <i>Bacteroides vulgatus</i> が静脈内投与後腫瘍内で高い増殖能を示すことを見出した。特に、<i>B. coccooides</i> は、腫瘍中心部のネクロシス部位やその辺縁部に生着し、3日間で 10^{8-9} colony forming unit/tumor まで増殖した。一方、<i>B. coccooides</i> の肝臓・肺などの主要臓器への生着は認められなかった。また、投与後の炎症性サイトカインの産生はプロバイオティクスの一つであるビフィズス菌と同程度に低く、脾臓肥大や体重減少などの副作用も認められなかった。以上の結果より、<i>B. coccooides</i> が高い腫瘍内増殖能と安全性を両立するがん治療用生菌製剤に有用な細菌種であることが示された。</p>			

第2章 静脈内投与した細菌の全身及び腫瘍内における動態評価

全身投与されたがん治療用生菌製剤は、静脈内投与後、腫瘍選択的に生着・増殖することが報告されている。しかしながら、血流を介した組織分布は非選択的であり、投与後初期の分布が免疫反応などの副作用を惹起する可能性が考えられる。これにもかかわらず、従来の生菌製剤の研究は治療的有効性の評価にのみ主眼が置かれ、動態・安全性面での情報が欠けている。生物発光や蛍光イメージングによる細菌の組織分布を検討した例外的な研究もあるが、深部組織での検出や分解能に問題を抱えている。こうした状況に鑑み、時間分解能に優れ、深さ方向への感度や定量性の高いPositron Emission Tomography (PET) を用いた評価法を開発し、静脈内投与後の細菌の初期体内動態を検討した。まず、重金属イオンが細菌膜上のタンパク質や糖鎖に吸着する生物学的特性に着目し、PETプローブとして汎用性の高い⁶⁴Cu標識法を確立した。次に、腫瘍モデルマウスでPETイメージングを行ったところ、生体内に投与された大腸菌の初期分布は数分内に完了し、主に肺や肝臓に集積することを見出した。一方、腫瘍組織にはほとんど分布が認められなかった。しかし、蛍光タンパク質ZsGreenを発現する大腸菌を作成し、腫瘍局所における動態をファイバー束型蛍光顕微内視鏡を用いて経日的に評価したところ、静脈内投与してから3日後に大腸菌が検出され、1~2週間後にも腫瘍内に活発に動く多数の大腸菌コロニーが観察された。また、腫瘍から摘出した大腸菌にはプラスミドが維持されており、ZsGreen由来の蛍光も検出されたことから、腫瘍内に生着・増殖した大腸菌は2週間以上に亘って外来性のタンパク質を発現しながら活動しうることが示された。

以上申請者は、生体内投与時の安全性を高める有用細菌種拡大のための細菌種選別法を確立し、新規有用細菌として*B. coccoides*を提示するとともに、静脈内投与した細菌の全身・腫瘍局所での新しい動態評価法を確立して有効性・安全性の両面からの検討を実施した。本研究は、がん治療用生菌製剤の開発を進める上での有益な指針を提供するものと期待される。

(論文審査の結果の要旨)

近年、生きた細菌を治療に応用する研究が活発に進められ、細菌の内毒素や宿主免疫賦活作用を利用したがん治療はヒト臨床試験にも進んでいる。一方、遺伝子改変技術を用いて薬効タンパク質産生機構を付与することにより、腫瘍内に生着した細菌に抗がん物質を産生することも試みられている。こうした生菌製剤の機能化が進むものの、安全面を考慮した評価は十分とは言い難い。そこで申請者は、高い腫瘍内増殖能と安全性を両立する細菌種の選択肢拡大について検討すると共に、静脈内投与した細菌の全身ならびに腫瘍内動態について評価法の開発と解析を行った。

第1章 腫瘍内増殖を指標とした細菌種選別法の確立と *Blautia coccooides* の有用性評価

外来性抗がんタンパク質を生産させる生菌製剤の開発では、免疫原性が低く安全性の高い細菌種のほうが望ましい。宿主と共生関係にある生体内常在菌などが候補となるが、腫瘍において生着・増殖することが知られた菌種は限られている。そこで申請者は、腫瘍内増殖能を指標として有用な細菌種を高効率に選別する方法を確立した。腫瘍モデルマウスに複数の細菌種を静脈注射後、腫瘍を摘出し、そのホモジネートを培養後にコロニーダイレクトPCRを適用する方法を考案した。colon-26担がんマウスを用いた検討の結果、哺乳類の腸内最優勢菌である *Blautia coccooides* (*B. coccooides*) および *Bacteroides vulgatus* が腫瘍内で高い増殖能を示し、特に *B. coccooides* は、腫瘍中心部のネクローシス部位やその辺縁部に生着することを見出した。また、*B. coccooides* は、肝臓・肺などの主要臓器に生着せず、高い腫瘍内増殖能と安全性を両立するがん治療用生菌製剤に有用な細菌種であることが示された。

第2章 静脈内投与した細菌の全身及び腫瘍内における動態評価

全身投与されたがん治療用生菌製剤は、静脈内投与後、腫瘍選択的に生着・増殖することが報告されているが、投与後初期の分布は血流に基づくため非選択的であり、免疫反応などの副作用の原因にもなり得る。これまでに細菌の初期体内分布を生物発光や蛍光イメージングによって評価した研究が報告されているが、深部組織での検出や分解能に問題を抱えていた。そこで申請者は、時間分解能に優れ、深さ方向への感度や定量性の高い Positron Emission Tomography (PET) を用いた動態評価法を開発した。重金属イオンが細菌膜上のタンパク質や糖鎖に吸着する生物学的特性に着目し、⁶⁴Cuを用いた細菌のPET標識法を確立した。腫瘍モデルマウスでのPETイメージング解析の結果、静脈投与された大腸菌は速やかに血中から消失し、主に肺や肝臓に集積することを見出した。さらに、蛍光タンパク質 ZsGreen を発現する大腸菌を作成し、ファイバー束型蛍光顕微内視鏡を用いて腫瘍局所での動態を経日的に評価した。その結果、静脈内投与してから3日後に大腸菌が腫瘍内で検出され、1~

2週間後でも多数の大腸菌が活発に活動することを見出した。また、腫瘍から摘出した大腸菌は2週間以上に亘ってプラスミドを維持していることも確認した。

以上、申請者は、腫瘍内で増殖する細菌種選別法を確立し、安全性の高い新規有用細菌として*B. coccoides*を提示するとともに、静脈内投与した細菌の全身・腫瘍局所での新しい動態評価法を確立して有効性・安全性の両面から検討した。これは、がん治療用生菌製剤の開発を進める上での有益な指針を提供するものであり、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和3年2月9日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、（令和6年3月19日までの間）当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降