

シンポジウム ⑤

組換えビフィズス菌製剤を用いた固形癌の腫瘍選択的治療剤の開発

○藤森 実¹, 藤田知之¹, 西村 基¹, 越川佳代子¹, 名倉直彌¹, 谷口俊一郎²¹東京医科大学茨城医療センター乳腺科, ²信州大学医学部分子腫瘍学

現在, 全身病となった癌患者に対する有効な治療は抗癌剤の全身投与しかない. そのため, 骨髄抑制, 心毒性などの副作用が常に問題となり, 患者への負担が大きく十分な治療ができないのが現状である. この問題を解決するためには, 腫瘍選択的治療法の開発が急務と考えられる.

固形癌はその種類にかかわらず腫瘍内が正常組織に比べて嫌気的環境であることが報告されている. 谷口らは, 1970年代にすでにこの腫瘍内が嫌気的環境であることに着目し, 嫌気性菌である *Bifidobacterium bifidum* を担癌マウスに静脈内全身投与すると, 腫瘍内に特異的に集まることを報告しているが, 最近になって欧米でもこの腫瘍内の嫌気的環境をターゲットにした固形癌の治療が注目されている. われわれは, *Bifidobacterium* 属である *Bifidobacterium longum* 菌を Bacterial vector に用いた, 癌の低酸素環境を標的にした全身投与による腫瘍選択的 gene delivery を応用した治療法の開発に取り組んでいる.

癌治療薬として古くから確立されている 5FU の前駆体である 5-fluorocytosine (5FC) と薬剤代謝酵素である Cytosine Deaminase 遺伝子を用いた Enzyme/Prodrug 遺伝子治療は以前より試みられているが, ウイルスベクターの導入効率や腫瘍細胞選択性に大きな問題がある. われわれは, *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) 菌を担癌動物に静脈内全身投与すると腫瘍組織でのみ特異的に集積・増殖することを見出し, Cytosine Deaminase 遺伝子を導入した *B. longum* 菌を作製した. ヒト乳癌細胞株 KPL1 移植ヌードマウスの全身投与による治療実験を施行した結果, 抗癌剤の前駆体 5-FC が腫瘍内局所でのみ抗癌剤 5-FU に変換され明らかな腫瘍縮小効果を示すことを証明した. さらに腫瘍 1 g 中 12.5 μg の高い腫瘍内 5FU 濃度を認めたのに対し肝組織など正常組織では 5FU は検出されないことを証明した. また, モルモットを用いた抗原性試験の結果, 陽性対象物質である卵白アルブミンでは, 感作中に 5 匹中 4 匹が死亡したのに対し, *B. longum* 菌では, 生理食塩水と同様で 5 匹とも全く無症状であった.

米国では悪性黒色腫患者に対し組換えサルモネア菌を静注する Phase I study がすでに施行されているが, 組換えビフィズス菌製剤は安全性と腫瘍特異性においてサルモネアよりも優れた細菌療法と考えられ, 2009 年 7 月に開催された米国 FDA との pre-IND (Investigational New Drug) meeting の結果 phase I study のプロトコールが認可された. 全身病となった転移性癌の新たな治療戦略として細菌療法は今後期待される治療法のひとつと考えられる.

A Novel Bacterial Anticancer Treatment Modality Targeting Hypoxic Solid Tumors as an Enzyme-prodrug Using Non-pathogenic *Bifidobacterium longum* Expressing Cytosine Deaminase

○ Minoru Fujimori¹, Tomoyuki Fujita¹, Hajime Nishimura¹,
Kayoko Koshikawa¹, Naoya Nagura¹, Shun'ichiro Taniguchi²

¹Department of Breast Surgery, Tokyo Medical University Ibaraki Medical Center,

²Department of Molecular Oncology, Institute on Aging and Adaptation,
Shinshu University Graduate School of Medicine

Solid tumors generally exhibit anaerobic or hypoxic regions compared with normal tissues, which causes a potential therapeutic problem because hypoxic tumor cells are resistant to radiotherapy and chemotherapy. Furthermore, recent studies have suggested that tumor hypoxia is associated with malignant progression, including enhanced invasiveness, angiogenesis and distant metastasis. A fundamental obstacle in systemic therapy for cancer patients is the specific targeting of therapy directly to solid tumors. A strain of the domestic bacterium, *Bifidobacterium longum* (*B. longum*), which is nonpathogenic and anaerobic showed selective localization to and proliferation within solid tumors after systemic application. Here, we propose a novel approach to cancer gene therapy in which anaerobic and non-pathogenic bacteria of the genus *B. longum* are used to achieve tumor-specific gene delivery and enzyme-prodrug therapy. We constructed a plasmid, pBLES100-S-eCD, which included the cytosine deaminase gene of *Escherichia coli* (*eCD*). Transfected *B. longum* produced cytosine deaminase (CD) in hypoxic tumors and achieved tumor site-specific conversion of 5-fluorocytosine (5-FC) to 5-fluorouracil (5-FU). Furthermore, we demonstrated antitumor efficacy in rat bearing autochthonous mammary tumors injected the transfected *B. longum* directly or intravenously.

This method was confirmed to be effective for enzyme-prodrug therapy not only by intratumoral injection but also by systemic administration. To estimate the toxicity of this bacterial vector, the systemic immunogenicity was evaluated by Active Systemic Anaphylaxis (ASA) reaction and the anaphylactic activity of IgG was evaluated by passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reaction in guinea pigs. In ASA reaction, no anaphylaxis symptoms were observed in any immunized guinea-pigs injected transfected *B. longum*. In PCA reaction, *B. longum*/S-eCD specific-PCA-induced antibody was not detected. Thus, we proposed that anaerobic bacteria of the genus *B. longum* were an attractive and safe tumor-targeting vector and transfected *B. longum* were a potential anticancer agent that could effectively and specifically treat solid tumors.