



Title	バクテリアによるナノ粒子の腫瘍移行性の改善とその併用療法への応用
Author(s)	橋場, 月
Citation	北海道大学. 博士(薬科学) 甲第14841号
Issue Date	2022-03-24
DOI	10.14943/doctoral.k14841
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/88818
Type	theses (doctoral)
File Information	Akari_Hashiba-Kato.pdf



[Instructions for use](#)

博士学位論文

バクテリアによるナノ粒子の腫瘍移行性の改善と その併用療法への応用

北海道大学大学院生命科学院
生命科学専攻 生命医薬科学コース
薬剤分子設計学研究室
橋場(加藤) 月
2022年3月

目次

略語表	2
序論	4
1. がんと医薬品開発の現在	4
2. bacteria-mediated cancer therapy (BMCT)	4
3. バクテリアへの遺伝子導入・表面修飾による治療効果の向上	9
4. 現在の治療戦略の課題	11
5. バクテリアによる動態改変と併用療法への応用可能性	12
本論	14
1. 諸言	14
1.1 バクテリアの併用療法への応用	14
1.2 低分子医薬品の欠点とリポソーム製剤の利用	14
1.3 薬物動態におけるがん種の影響	15
2. 結果	19
2.1 3種のがんにおけるVNP20009の生着および増殖量の評価	19
2.2 VNP20009投与後のリポソームの腫瘍移行量および腫瘍内分布評価	20
2.3 VNP20009投与によるがん細胞の細胞周期変化	31
2.4 VNP20009とドキソルビシン封入リポソーム (Dox-LP) の併用による 抗腫瘍効果の評価	40
3. 考察	47
結論	55
実験方法	57
1. 試薬	57
2. 試薬組成	58
3. 機器	59
4. 実験操作	60
謝辞	66
参考文献	68

略語表

5-FC	5-fluorocytosine
5-FU	5-fluorouracil
BMCT	bacteria-mediated cancer therapy
BSA	bovine serum albumin
CD	cluster of differentiation
CD	cytosine deaminase
CFU	colony forming unit
Chol	cholesterol
ClyA	Cytolysin A
DDS	drug delivery system
DDW	distilled deionized water
DIC	Differential interference contrast microscope
DNA	deoxyribonucleic acid
DOPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
Dox	doxorubicin
DSPE	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamine
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EtOH	ethanol
FBS	fetal bovine serum
FUCCI	Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator
h	hour
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HSV1-TK	herpes simplex virus type I thymidine kinase
IDO	indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN γ	interferon-gamma
LPS	Lipopolysaccharide
min	minute
mRNA	messenger RNA
NEB	nuclear envelope breakdown
NER	re-formation of the nuclear envelope
NK	natural killer
O/N	overnight

PBS	phosphate buffered saline
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
PEG	polyethyleneglycol
PFA	paraformaldehyde
RNA	ribonucleic acid
r.t.	room temperature
SDS	sodium dodecyl sulfonate
sec	second
siRNA	small interfering RNA
T3SS	Type III Secretion Systems
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TRAIL	Human TNF-related Apoptosis Inducing Ligand

序論

1. がんと医薬品開発の現在

がんは1981年から一貫して日本における死因の第一位であり、世界においてもその罹患率および死亡率は増加し続けている（1）。あらゆるがんはDNA変異に基づく無秩序かつ浸潤性の細胞増殖を示す点で共通するが、患者個人のゲノム情報の差異のみならずがんの由来組織や発生部位、免疫機能、腫瘍間/腫瘍内の不均一性を含む多くの要素に起因してその症例は多様性に富んでいる（2-4）。そのため単一の薬剤で全てのがんを治療することは難しく、個々の症例に応じた治療法を適用していく必要がある。このような背景から、がん治療薬を含む医薬品開発においては創薬モダリティの多様化が加速している。現代医療で用いられる医薬品の多くを占める低分子医薬品は分子の小ささを活かして細胞外・細胞内いずれの標的にも作用点をもちうることに加え、化学合成により大量生産が可能であるという生産段階での利点も備えており、長きに亘って医薬品の中核を担ってきた。特に20世紀前半は低分子医薬品の全盛期であったが、20世紀後半になると多くの疾患が低分子医薬品によるアプローチでは治療が難しいことが明らかになりはじめた。この頃から、生産や品質管理の難しさから開発が敬遠されがちであった抗体医薬品が、低分子医薬品では治療が困難な疾患に有効であることが次々に報告され、21世紀以降、現在に至るまでその最盛期が訪れている。抗体医薬の隆盛に続き、CAR-T療法の成功を皮切りに開発が加速している細胞医薬・新型コロナウイルスワクチンで注目を集めた核酸医薬のほか、遺伝子治療・再生医療など新たなモダリティの医薬品開発が極めて早いペースで進められており、今後はその多様性が増え高まっていくことが想定される。抗体医薬が種々の疾患に対する治療のアプローチを大きく拡大させたように、がん治療薬開発においても新たなモダリティへの挑戦およびモダリティの融合は、新たな切り口からのブレイクスルーとなることが期待される。

2. Bacteria-Mediated Cancer Therapy (BMCT)

新規モダリティの一つである細胞医薬は現在、ES細胞やiPS細胞などヒト由来幹細胞を用いるものが多いが、がん治療を標的とする細胞医薬の一つとして生きた細菌によるがん治療（Bacteria-Mediated Cancer Therapy; BMCT）も開発されている。BMCTは細胞医薬という新規モダリティであるものの、細菌と腫瘍退縮の関連性が初めて報告されたのは100年以上前に遡る（5-7）。これらの発見に続き、がん患者が化膿レンサ球菌に感染すると腫瘍の退縮が認められることを報告した外科医Coleyはがん治療における細菌利用の有用性を提唱し、化膿レンサ球菌およびセラチア菌の腫瘍内または筋肉内投与による強力な腫瘍退縮効果を報告した（8-10）。これらの報告はがん治療および癌免疫学における重要な発見であったものの、当時は癌免疫機能への理解が乏しかったために作用のメカニズムは解明されず、治療効果の再現性の担保のみならず製剤の処方も不安定であったことに加え、一部の患者においてはサイトカイン産生に伴う重篤な副作用が生じたことなどから、この治療方法ががん治療の主流となるには至らなかった（11）。1920年代以降の放

射線療法の台頭によりBMCTのさらなる臨床研究は縮小したものの、近年の免疫学をはじめとする生命科学の進展により再び注目を集めるに至っている (12, 13)。

これまでに、*Clostridium*や*Bifidobacterium*、*Listeria*、*Escherichia coli*、*Salmonella*などの一部の偏性または通性嫌気性細菌は静脈内投与後、腫瘍への受動的な分布とそれに続く能動的機序によって腫瘍組織特異的に生着し、増殖することが報告されている (14-17)。これらの細菌は静脈内に投与された後、細菌の投与に伴って増加した tumor necrosis factor- α (TNF- α) が引き起こす血流増加と血管透過性の亢進、および腫瘍内の未熟な血管構造を利用して血管外へと漏出し、腫瘍組織へと流入する (18, 19)。その後、細菌は自身の運動能および走化性により能動的に腫瘍深部まで到達し、腫瘍内における免疫抑制性の環境下で免疫細胞による排除を回避しながら増殖する (20-23)。一方、腫瘍以外の正常組織においてはこれらの細菌は数時間から数日で排除されるため、腫瘍における細菌数は正常組織の1000倍以上に達する (24, 25)。Coleyによる報告から120年以上を経て、細菌生来の腫瘍特異的な生着および増殖性を利用したがん治療手法の開発が進められている。

嫌気性細菌のうち、がん治療を目的とした開発が特に進んでいるものとして *Salmonella* が挙げられる。*Salmonella* は自然治癒疾患の原因菌として同定されたグラム陰性の通性嫌気性桿菌であり、1997年にPawelekらによって *Salmonella* が移植した腫瘍組織に生着し、腫瘍組織/正常組織比として1000:1以上に達することが見出された (26, 27)。腫瘍組織内に到達した *Salmonella* は、腫瘍内での増殖に伴う栄養成分の消費によりがん細胞の細胞死を誘導するほか、自身の免疫原性による自然免疫および獲得免疫の活性化を介して抗腫瘍効果を発揮する (図1) (28))。 *Salmonella* 外膜に存在するリポ多糖 (Lipopolysaccharide; LPS、内毒素) はCD14・Toll-like receptor (TLR) 4・MyD88を介してTNF- α の産生を増加させ、腫瘍内血管を障害し、低酸素領域の拡大に寄与する (19, 29, 30)。LPSによるTLR4シグナル伝達経路の活性化はこの他にも *Salmonella* 感染がん細胞のファゴサイトーシスを行ったマクロファージおよび樹状細胞によるIL-1 β の産生増加を誘導する (31)。LPSに加え、Flagellinも *Salmonella* による抗腫瘍効果において重要な役割を担っている。FlagellinはTLR5を介してNK細胞に作用し、産生されたパーフォリンによる細胞障害を引き起こすとともにTLR非依存的経路によるIFN γ 産生増加を誘導する (32, 33)。FlagellinによるTLR5シグナル伝達経路の活性化はNK細胞への作用に加え、がん細胞の増殖を直接的に抑制するほか、CD8⁺T細胞の活性化やCD4⁺CD25⁺制御性T細胞 (Treg) の減少など獲得免疫に対する作用も大きい (34-36)。さらに、*Salmonella* はがん細胞に直接的に作用することでconnexin 43 (Cx43) の発現増加を誘導し、がん細胞-樹状細胞間のギャップ結合形成を促進させがん抗原のクロスプレゼンテーションを誘導するとともに免疫抑制性インドールアミン酸素添加酵素 (indoleamine 2,3-dioxygenase; IDO) の発現を抑制し、CD8⁺T細胞の活性化を増強する (37-39)。これらの免疫依存的および非依存的な作用による抗腫瘍効果が期待され、特にマウスチフス菌 *Salmonella Typhimurium* を用いた治療法の開発が盛んに行われてきた。さらに、野

生型の *Salmonella* は免疫原性に由来する正常組織への強い毒性が懸念されることから種々の弱毒化を行った菌株が開発されている。特に、LPSのリピドAのミスチル基付加に寄与する *msbB* 遺伝子、およびプリン代謝に寄与する *purF* 遺伝子に変異を導入した弱毒化株であるVNP20009は、前臨床の *in vitro* および *in vivo* 試験において *Salmonella Typhimurium* によるTNF- α の発現増加を低減させるほか、腫瘍特異性を向上させつつ副作用を軽減した (40-43)。バクテリアの臨床応用における最大の課題である副作用の軽減と腫瘍特異的な増殖の両立を達成しようと期待されたVNP20009は多数の前臨床段階における検討に加え、第I相臨床試験も複数実施された。難治性／表在性固形腫瘍または切除不能な悪性腫瘍、切除不能な黒色種および腎細胞癌に対する試験が実施されたが、いずれの試験においても腫瘍の退縮は認められなかった (表1)。これらの臨床試験の失敗はヒトへの応用に際して重要な知見を残した。ヒトにおいてはVNP20009の投与により前臨床で認められたような強力な炎症反応の誘導が難しく、抗腫瘍効果の発現において免疫誘導の寄与が大きいBMCTが治療効果を発揮しにくい一方で、単純な投与量の加増は敗血症様の重篤な副作用を誘導した。これらのバクテリア由来の副作用は抗生物質の投与により制御が可能であるものの、副作用が生じる投与量においてもVNP20009単独ではがん細胞の根絶は難しく、抗生物質投与後にがんが再増殖するという課題も生じた。

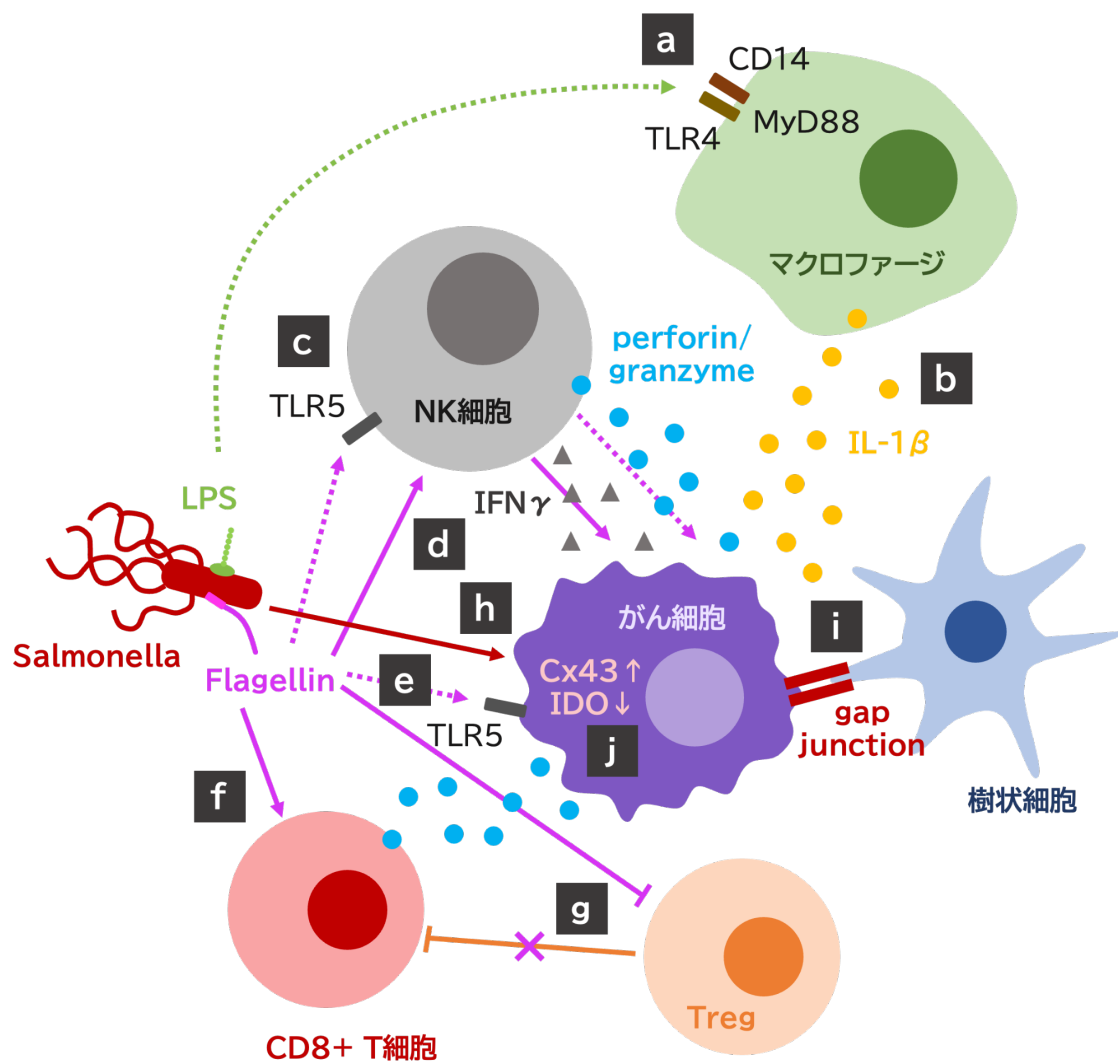


図1 *Salmonella Typhimurium*による抗腫瘍効果

(a) *Salmonella*外膜に存在するLPSはCD14・TLR4・MyD88を介してTNF- α の産生を増加させ、腫瘍内血管を障害し、低酸素領域の拡大に寄与する。(b) LPSによるTLR4シグナル伝達経路の活性化は*Salmonella*感染がん細胞のファゴサイトーシスを行ったマクロファージおよび樹状細胞によるIL-1 β の産生増加を誘導する。FlagellinはTLR5を介してNK細胞に作用し、産生されたパーフォリンによる細胞障害を引き起こす(c)とともにTLR非依存的経路によるIFN γ 産生増加を誘導する(d)。FlagellinによるTLR5シグナル伝達経路の活性化はNK細胞への作用に加え、がん細胞の増殖を直接的に抑制する(e)ほか、CD8⁺T細胞の活性化(f)やTregの減少を引き起こす(g)。*Salmonella*のがん細胞に対する直接的な作用には増殖に伴う栄養成分の消費(h)のほか、Cx43の発現増加を誘導することでがん細胞-樹状細胞間のギャップ結合形成を促進させがん抗原のクロスプレゼンテーションを誘導する(i)ほか、IDOの発現を抑制しCD8⁺T細胞の活性化を増強する(j)。

表1. *Salmonella*を用いた臨床試験

<i>Salmonella</i> strain	Phase	Cancer type	References
<i>Salmonella Typhimurium</i> VNP20009	I	切除不能なメラノーマ 切除不能な腎細胞がん	(44)
<i>Salmonella Typhimurium</i> VNP20009	I	メラノーマ	(45)
<i>Salmonella Typhimurium</i> VNP20009	I	切除不能な固形腫瘍	NCT00004216
<i>Salmonella Typhimurium</i> VNP20009	I	固形腫瘍	NCT00006254
<i>Salmonella Typhimurium</i> VNP20009	I	切除不能な固形腫瘍	NCT00004988
<i>Salmonella Typhimurium</i> expressing human IL-2	I	肝臓癌	NCT01099631
<i>Salmonella Typhimurium</i> expressing human IL-2	II	切除不能な膵臓癌	NCT04589234
<i>Salmonella Typhimurium</i> expressing CD	I	頭頸部がん 食道腺癌	(46)
<i>Salmonella Typhimurium</i> expressing L-Methioninase	I	切除不能な固形腫瘍	NCT05038150
<i>Salmonella Typhimurium</i> expressing L-Methioninase	I	切除不能な固形腫瘍	NCT05103345

(*Salmonella* strain) 使用された*Salmonella*の株および発現物質。VNP20009は*Salmonella Typhimurium*のmsbB、purI変異株。human IL-2発現株には*Salmonella Typhimurium* χ 4550 (*Salmonella Typhimurium* SR11 (gyrA1816, pStSR100+) のcrp1、asdA1、cya1変異株) が用いられている。CDおよびL-Methioninase発現株にはVNP20009が用いられている。(Phase) 臨床試験の相。(Cancer type) 対象となったがん種。(References) 結果の報告があるものは文献情報を示した。NCTから始まるコードはClinicalTrials.gov Identifier。

3. バクテリアへの遺伝子導入・表面修飾による治療効果の向上

VNP20009の単独使用による臨床試験の結果を受け、近年はさらなる治療効果の増強を目的としてバクテリア生来の抗腫瘍効果に依存しない治療戦略の開発が積極的に行われている。大腸菌に代表されるように、バクテリアは古くから人工的な核酸やタンパク質の生産に利用されてきていることを生かし、バクテリアに抗腫瘍効果を有する機能性分子を産生させることで治療効果を向上させようとする戦略が多く開発されている(47)。腫瘍選択的な生着および増殖能を有するバクテリアによる物質産生は産生物質の腫瘍内におけるいわば「現地生産」が可能であり、機能性分子の腫瘍組織内濃度を向上させるとともに正常組織への分布を抑制することで副作用の低減も実現しうる。加えて、発現プロモーターにTet On/OffシステムやL-アラビノースで誘導可能なaraBADプロモーターを採用することで物質産生の時空間的な制御の向上が可能であり、発現ベクターの機能の向上とともにさらに開発が加速することが期待される(15, 17)。初期のバクテリア単独を用いた治療戦略の延長線上に存在し、バクテリアが有する免疫誘導能を増強させることで抗腫瘍効果を向上させたものとしてZhengらによるFlagellin発現*Salmonella*やYoonらによるIFN γ 発現*Salmonella*の開発などがあり、IL-2発現*Salmonella Typhimurium*は第II相臨床試験も実施が計画されている(表1)(48-51)。機能性分子を発現しない初期のバクテリア単独使用においては免疫誘導の増強は投与量を増やす必要があり、副作用の発現要因となってきた。したがって、腫瘍組織特異的な炎症性サイトカインの分泌と免疫細胞の誘導増加は同時に副作用の低減にも有用である。同じ免疫系へのアプローチとして、がん細胞への攻撃性を高める戦略としてHPV16-E7、CEAなどのがん抗原や、抗cytotoxic T lymphocyte-associated protein-4 (CTLA4)抗体あるいは抗programmed cell death-ligand 1 (PD-L1)抗体などの免疫チェックポイント阻害剤をバクテリアに産生させる例も報告されている(52)。バクテリア単独による免疫誘導や上述したような単純な炎症反応の増強のみならず、自己免疫寛容の利用や免疫チェックポイント分子による抗腫瘍免疫応答の抑制といった腫瘍が有する免疫環境を改変するシステムを組み合わせることで、免疫細胞による治療効果を向上させると期待される(53, 54)。

免疫機能を含む腫瘍微小環境へ作用する戦略に加え、がん細胞に直接的に作用する抗がん剤などの産生への応用も盛んに行われている。TNF- α ファミリーに属するTNF- α 、TRAIL、Fasリガンドなどはがん細胞の細胞死を誘導するが、半減期が短いことに加えて肝毒性が強く、その有効性は限定的であった(55)。バクテリアにこれらの分子の発現能を搭載し腫瘍内で産生させることで生物学的利用能を向上させた報告も複数存在し、Ganaiらは放射線誘導性のrecAプロモーター下でTRAILを発現させ腫瘍成長の抑制を達成した(56-59)。また、薬物本体ではなく薬物前駆体の変換を担う酵素をバクテリアに発現させることで、薬効の発現を腫瘍内に限定させる手法も存在する(60, 61)。Nemunaitisらは5-fluorocytosine (5-FC)を5-fluorouracil (5-FU)に変換するCytosine deaminase (CD)を発現する弱毒化*Salmonella*のTAPET-CDを用いた臨床試験を実施し、TAPET-CDの腫瘍組織への生着が確認された患者において腫瘍内5-FU量が有意

に増加することを示した (46)。Tangらはganciclovirをganciclovir-3-phosphateに変換する酵素であるherpes simplex virus type I thymidine kinase (HSV1-TK)を発現する*Bifidobacterium infantis*を用い、caspase 3の発現増加を介したアポトーシス誘導によるラット膀胱癌の増殖の抑制に成功している (62)。

このようにタンパク質産生能を利用した開発が多く報告されているが、細菌は当然ながらタンパク質産生のみならず核酸送達も可能である。特に細菌によるsiRNA送達を利用した遺伝子抑制は既にSox2やStat3, IDOなど種々の標的に対して開発が進められており、今後もその応用の幅は広がっていくことが期待される (63-69)。

細菌は核酸やタンパク質の産生に加え、自身の運動能および走化性により能動的に腫瘍内を移動し腫瘍深部まで到達することが可能であるが、腫瘍深部は一般に抗がん剤を含む物質送達が難しい領域である。血中に投与された抗がん剤は血管を介して腫瘍組織に到達するが、腫瘍組織は正常組織において認められるような制御された血管形成能を有しておらず、多くの場合血管の分布が腫瘍組織の外縁部に集中することに加え、形成される血管も正常組織と比較して機能的および構造的に未熟である (70, 71)。そのため血液の腫瘍組織全域への運搬が難しく、薬剤など運動能を持たない物質は血管が乏しい腫瘍深部への分布が難しい (72)。他方、細菌はこのような血管形成による制約を受けずに分布することが可能であるため、細菌表面に抗がん剤などの機能性分子を修飾し、細菌を「運び屋」として利用することで腫瘍全域への物質送達を試みる戦略も注目を集めている。血中へと投与された薬剤などと同様に血液を介して運搬される酸素や栄養成分なども腫瘍深部への分布が難しいことから、腫瘍深部は低酸素、低pHなどの特徴を有する環境を形成する (73, 74)。これらの組織環境に反応して切断を受けるリンカーなどを介して細菌表面に機能性分子を修飾することで腫瘍組織特異的に修飾物質を分離することも可能である。Xieらは酸性不安定性リンカーである*cis*-アコニチン酸を介してプロバイオティクスである*Escherichia coli* Nissle1917 (EcN) にアントラサイクリン系の抗がん剤であるドキソルビシン (Dox) を修飾したEcN-ca-Doxを開発した。Dox単独投与では投与したほぼ全量が代謝されたのに対し、EcN-ca-Doxは投与後3日において腫瘍組織に投与量の約5%のDoxを集積させることに成功した (75)。さらに、同様に酸性不安定性リンカーを介してDox含有ポリマーをEcNに修飾することで腫瘍内酸性環境下でミセル形成を引き起こし、Dox送達の特異性および送達効率を向上させるなど戦略の高度化も試みられている (76)。細菌への修飾による腫瘍への物質送達は抗がん剤以外に、ポリドーパミンなどを用いた光温熱療法 (Photothermal therapy; PTT) への応用も試みられている。Chenらは光増感剤 (photosensitizers; PSs) であるインドシアニンググリーン (indocyanine green; ICG) を搭載したナノ粒子であるINPs (ICG-loaded nanoparticles) を*Salmonella Typhimurium*の弱毒化株であるYB1の菌体表面にアミド結合を介して修飾したYB1-INPsを開発した。YB1-INPsは近赤外線照射の後、腫瘍の退縮効果を発揮するとともに蛍光イメージング剤としても有用性を示した (77)。さらに、細菌の腫瘍組織内での活発な増殖を利用した活性酸素種の大量産生による治療効果の向上を狙った手法も複数存在す

る。Zhengらは一酸化窒素 (NO) 生成酵素を有する *Escherichia coli* MG1655 に窒化炭素を修飾した CCN@*E. coli* を作製した。*E. coli* MG1655 は外部電子の存在下で細胞内反応を駆動し代謝活性を高めることができるため、光照射により窒化炭素から生成された豊富な外部電子を用いて腫瘍内 NO 量を 37 倍まで増加させ、70% 以上の腫瘍成長抑制効果を示した (78)。加えて、Fanらは呼吸鎖酵素 NDH-2 を過剰発現させた *E. coli* 表面に四酸化三鉄を修飾し、*E. coli* が産生する過酸化水素により連続的なヒドロキシラジカルの生成を引き起こすことでがん細胞のアポトーシスを増加させるなど、前述したバクテリアへの遺伝子導入と組み合わせた戦略も考案されており、がん治療におけるバクテリア利用の可能性が広がりがつつある (79)。

4. 現在の治療戦略の課題

バクテリアの物質産生能および物質送達能を生かした戦略のうち、弱毒化 *Salmonella Typhimurium* に CD や IL-2、L-Methioninase を発現させたものに関して第 I 相および第 II 相の臨床試験が行われるなど、臨床応用に向けた開発が今後も加速することが予想される。一方、これらの戦略はバクテリアを治療の主体として用いることに由来する課題を有している。バクテリア単独を用いた治療と同様に治療効果の向上にはバクテリアの投与量を増やす必要があるため、治療効果と副作用の発現の難しいコントロールが必要である。また、バクテリアによる物質産生を目的として導入された組換え遺伝子はバクテリアの投与後、生体内において遺伝子の水平伝播や欠失、変異などを受け治療効果の減退や副作用の増強を引き起こしうる (80, 81)。菌体表面への修飾による腫瘍への物質送達においては、全身循環中においては菌体との安定した結合を維持したうえで腫瘍組織内では速やかに放出されることが必要である。静電的相互作用による修飾は簡便な方法であるが、結合の安定性が低く全身循環において機能性分子の脱落が懸念される。他方、アミド結合をはじめとする共有結合を介した修飾は修飾の安定性が向上する反面、腫瘍組織内における機能性分子の放出速度の低下が生じうる。加えて、バクテリアによる物質産生および菌体表面への修飾のいずれにおいても目的とする物質ごとに遺伝子導入あるいは修飾方法の開発を行う必要がある。バクテリア生菌を用いるため産生物質および修飾物質はバクテリアの増殖に影響がないものである必要があることに加え、遺伝子導入および修飾過程においても加熱や有機溶媒の使用ができないなどの制約が生じる。このような現状を打開する方法として、バクテリアに産生あるいは修飾する新たな機能性分子の開拓、あるいは低 pH や低酸素環境など腫瘍組織に特徴的な組織環境に応答して切断を受けるリンカーなどの細胞工学的な手法の開発がまず挙げられる。加えて、これまでに開発が進められてきた免疫誘導能や物質産生能といったバクテリアの機能のみに依存しない治療戦略への展開も有力なアプローチとして注目されつつある。

5. バクテリアによる動態改変と併用療法への応用可能性

遺伝子導入による物質産生能、および菌体表面への修飾による腫瘍組織への物質送達能は免疫誘導などと同様にバクテリアが生来有している機能を利用し、バクテリアを治療の主体として用いる戦略である（図 2a, b）。これらの作用によりバクテリアは直接的に腫瘍の増殖を抑制する。他方、生体内においてバクテリアが発現する作用はこのような腫瘍に対する直接的な機能にとどまらない。前述したように、生体内に投与されたバクテリアはTNF- α の増加を伴う全身性の炎症反応を誘導し、血流増加および血管透過性の亢進を引き起こすことが報告されている（19）。加えて、腫瘍深部におけるバクテリアの増殖は腫瘍内のネクロシスエリアを増加させるなど、バクテリアの投与は全身および腫瘍組織の環境を大きく変化する。これらの効果はバクテリアの投与に伴う副産物であり、それ自体のみによって治療効果を大きく向上させることは難しい。しかしながら、血流を介した物質送達においてはこれらの作用は極めて大きな動態改善効果をもたらすと考えられる。抗がん剤などの薬剤は投与後、血流を介して腫瘍組織へと運搬される。したがって、バクテリアによる血流増加および血管透過性の亢進は投与された抗がん剤の腫瘍への移行性を向上させる。また、一般に腫瘍深部は抗がん剤などの物質送達が難しい領域であることから、ネクロシスを誘導するバクテリアの特性は、抗がん剤の弱点を補い、より高い治療効果を実現する可能性がある（図 2c）。しかしながら、バクテリアと他の薬剤の併用療法に関する報告は少なく、特に薬物動態への影響はほとんど明らかにされていない。

本研究ではバクテリアと併用した薬剤の動態評価および併用療法のがん治療における有用性の評価を目的とした。具体的には、バクテリアと併用する薬剤として生体適合性の高い薬物送達を可能とするリポソーム製剤を選択し、異なる腫瘍組織構造を有する複数のがん種に対してバクテリアとリポソーム製剤の併用投与を行った際のリポソーム製剤の動態変化と両者による治療効果の検証として、はじめに、*Salmonella Typhimurium*の弱毒化株であるVNP20009と併用した際のリポソーム製剤の腫瘍移行量および腫瘍内分布を評価した。次に、多くの低分子医薬品の抗がん剤は細胞周期依存的に治療効果を発現することから、抗がん剤を内包したリポソーム製剤の使用を想定し、VNP20009の投与によるがん細胞の細胞周期変化の観察を行った。最後に、VNP20009と抗がん剤封入リポソームを併用した際の抗腫瘍効果の評価を行った。

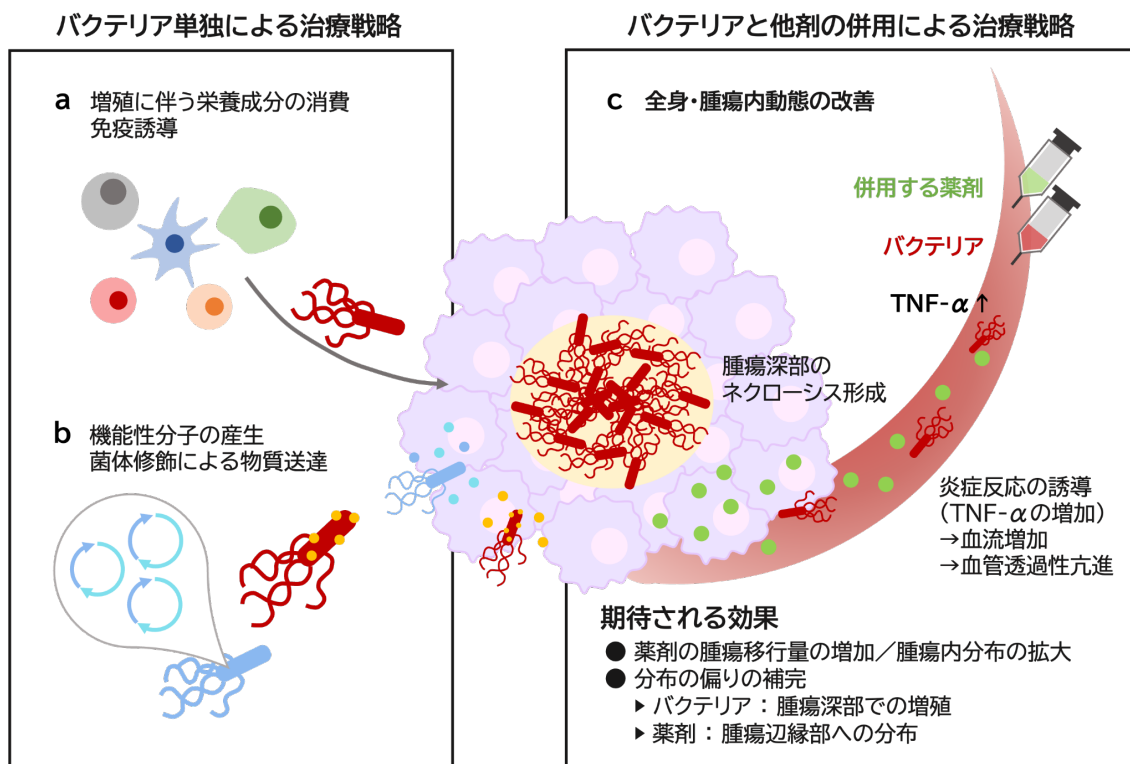


図 2 がん治療におけるバクテリアの利用方法

(a) 最も初期に開発が試みられた戦略。一部の偏性または通性嫌気性のバクテリアが腫瘍選択的に生着し、腫瘍組織内で増殖することで栄養成分を消費し、同時にバクテリア自身の免疫原性に基づく免疫誘導を引き起こすことで抗腫瘍効果を示す特性に基づいた戦略である。

(b) 現在多くの開発が進められている戦略。バクテリアの腫瘍選択的な増殖能と物質産生能を利用した戦略であり、主としてバクテリアに遺伝子導入を行うことで各種サイトカイン・酵素・がん抗原などを腫瘍内で産生させる形式、もしくはバクテリア表面に抗がん剤や光増感剤などの機能性分子を修飾し、腫瘍組織内へと運ばせる形式がある。(a)と同様に作用機序はバクテリア本体に由来する。

(c) 本研究で有用性を検証した戦略。(a) および (b) の戦略で利用されてきた特性に加え、バクテリアの投与により他の薬剤の全身および腫瘍内動態の改善を試みる戦略である。バクテリアの投与は炎症反応の誘導を介した血流増加および血管透過性の亢進により、併用した薬剤の腫瘍移行量および腫瘍内分布を改善する。また、バクテリアは他の薬剤の拡散が難しい腫瘍深部領域において活発に増殖しネクローシスを形成することから、他の薬剤との併用により双方の分布の偏りを補完し、腫瘍全域のがん細胞を標的とした治療が実現する可能性がある。

本論

1. 諸言

1.1 バクテリアの併用療法への応用

バクテリアの投与による全身性の血流増加および血管透過性の亢進と腫瘍組織深部のネクロシス形成により、動態および薬効の改善が期待される薬剤は多岐にわたる。バクテリアと他の薬剤との併用療法は、低分子医薬品を用いた報告がこれまでもいくつか存在する(82-88)。抗がん剤による治療効果により、それぞれの単剤と比較して強力な抗腫瘍効果を示す結果が報告されていることに加え、併用に伴う投与量の抑制により副作用を軽減したとする報告もあり、バクテリアの他の薬剤との併用における有用性が伺える。低分子医薬品は一般に、血中に投与された後、速やかに肝臓あるいは腎臓での代謝および排泄を受ける。上述した報告においても多くはバクテリアと薬剤を同時に投与し、その後バクテリアと薬剤の同時投与または薬剤のみの投与を繰り返す投与計画が用いられている。したがって、これらの治療効果の向上は薬剤およびバクテリアそれぞれの治療効果の相加効果であることが想定される。

1.2 低分子医薬品の欠点とリポソーム製剤の利用

低分子医薬品は、比較的安価であることに加え、さまざまな投与手法が開発されており臨床使用の歴史も長い。加えてその分子サイズの小ささから抗体医薬などと比較して組織内における拡散性にも優れており、細胞外のみならず細胞内の標的にもアクセス可能であるなどの長所がある。一方で、前述したように投与後の半減期が短いことに加え、標的特異性が低く正常組織にも容易に分布し副作用を引き起こしうることから、作用と副作用のコントロールが難しいバクテリアとの併用において、治療効果の相加効果を得ると同時に新たな副作用の懸念が生じる。

半減期の短さや正常組織への移行性などの低分子医薬品が有する課題に対して有効な戦略の一つがリポソームなどのナノ粒子製剤である。リポソームは脂質二重膜から成り、抗がん剤をはじめとする機能性分子を内包する、一般に100 nm程度の中性の粒子である。正常組織へ移行しにくいため副作用を低減するほか、特にポリエチレングリコール(PEG)修飾を行ったリポソームは血中滞留性を有し、機能性分子を保護するとともに標的組織への送達率を向上させる。構成分子や表面修飾の自由度も高く、がん治療においても有望視されている技術である。リポソーム製剤を用いることでバクテリアとの併用においても副作用の懸念の小さい薬効の相加効果が得られると考えられる。一方で、リポソーム製剤のがん治療への使用における課題の一つがその全身および腫瘍内動態である。腫瘍組織内では過剰な血管新生が亢進しており、正常血管と比較して機能的および構造的に極めて脆弱な血管が形成される(70, 71)。正常血管は血管内皮細胞同士の接着に加え、血管平滑筋やペリサイトによる裏打ちを伴う構造を有し、血管透過性は低く制御されている。腫瘍組織内における過剰な血管新生により形成される血管はこのような裏打ち構造が乏しく、リポソーム等の100 nm程

度の粒子は腫瘍血管内皮細胞の間隙を通過することで腫瘍組織へとアクセスすることが可能である。このような正常組織と腫瘍組織の差異により、リポソーム製剤は腫瘍組織への移行特異性の向上に成功している。しかしながら、腫瘍組織へと到達するリポソームは投与したうちの数%程度である(89)。また、内包した機能性分子による薬効の発現には腫瘍組織へ到達した後、標的となるがん細胞にアクセスする必要がある。正常組織においては全ての正常細胞に十分な酸素や栄養成分が供給されるように正常血管が組織全体に満遍なく分布するが、腫瘍内血管はその機能および構造のみならず、その分布も正常組織には程遠い。多くの腫瘍組織は腫瘍体積が一定以上大きくなると酸素や栄養成分を求めて周囲の正常組織から腫瘍組織内へと血管を誘引する。その際にも腫瘍組織構造や成長速度を考慮せずに血管を形成するため、多くのがん種において腫瘍内血管の多くは腫瘍組織の外縁部に集中する(72)。したがって、血管を介して腫瘍組織へと到達したリポソーム製剤は腫瘍辺縁部のがん細胞にはアクセス可能な一方で腫瘍深部まで到達することが難しく、単剤での使用においては辺縁部のがん細胞への効果により一度は腫瘍が退縮するものの、その後残存する深部の細胞の再増殖により再度腫瘍成長が生じうる。これらの課題を克服するため、粒子組成や粒子径の制御による改良が試みられている。このようなりポソーム製剤の課題に対し、序論で述べた通りバクテリアは併用した薬剤の動態を変化させうる。したがって、バクテリアとリポソーム製剤の併用はバクテリアの増殖によるがん細胞死の誘導に加え、バクテリアによる動態改善を受けたりポソーム製剤による安全性を備えた治療効果の発現により、多様ながんに対して作用の向上と副作用の低減を両立した治療を実現しうる戦略となると仮説を立てた。

1.3 薬物動態におけるがん種の影響

腫瘍組織への薬物送達には上述した腫瘍血管構造に加え、腫瘍組織構造や免疫状態などを含む腫瘍微小環境の影響を強く受けることが知られている。リポソームの腫瘍内分布はがん細胞や豊富な細胞外基質による間質液圧の高さ、線維構造などに影響される。バクテリアはリポソームとは異なり自身の運動能および走化性によって腫瘍深部へと能動的に移動することが可能であるが、腫瘍組織内では特に深部領域において活発な増殖が認められるほか、生着および増殖量はがん種により異なる可能性があるなど、リポソームと同様に腫瘍微小環境の影響を受けることが想定された。具体的な例として、Suhらはヒトまたはマウス由来細胞を用いて作製したスフェロイドにおけるPEG修飾 *Salmonella Typhimurium* の拡散性を比較しており、由来細胞によって *Salmonella* の拡散性が異なることを示した。スフェロイドは血管を包含しないため内部への拡散はバクテリアの運動能に依存する。実際の腫瘍組織内においても血管新生が行われていない領域が多く存在することから、同様の拡散性の差異が生じる可能性が高い(図 1.1a)(90)。Frahmらはマウス由来癌細胞から作製した複数種の担がんモデルマウスに対し、*Salmonella Typhimurium* SL7207 を静脈内投与した際の腫瘍成長への影響を比較した。同一投与量での投与においてもがん種によって腫瘍成長に与える効果は異なったことはヒト腫瘍と比較して均質性の高いマウスがんにおいても腫瘍組織内におけるバクテリアの挙動が異なることが示唆している(図 1.1b)(91)。

Leventhalらは複数のマウス由来がん細胞それぞれから作製した担がんモデルマウスに対し、同一投与量のEcNを投与した72 h後の腫瘍組織において、増殖可能な細菌数を表す指標であるコロニー形成単位 (colony forming unit; CFU) を比較した。がん種によって得られたCFUに10倍程度の差が生じており、Frahmらの結果と同様に腫瘍組織内における細菌の増殖性が異なることを示唆している (図 1.1c) (92)。腫瘍微小環境は動物種やがんの由来組織、発生部位、病態の進行の程度などによって大きく異なる。前臨床において多く用いられる担がんモデルマウスにおいて形成される腫瘍組織構造は、免疫不全マウスを用いたヒト由来がん細胞の移植モデルにおいても多くはヒトにおいて形成される腫瘍組織と大きく乖離していることが知られている (93)。ヒト腫瘍においてはコラーゲンなどからなる線維構造が極めて豊富である一方でマウスモデルにおいて形成される腫瘍組織は線維構造が少ない (94, 95)。このような背景から、動態評価を行ううえで評価に用いるがん種の実験は極めて重要になると考えられたため、本研究では各種評価に腫瘍微小環境が異なる3種のがん (ヒト神経膠芽腫由来U87MG細胞、ヒト肺癌由来A549細胞、ヒト膵臓癌由来BxPC3細胞) を用いた。特に、ヒトにおいても抗がん剤の送達性の悪さなどから難治性がんの代表とされている膵臓癌由来のBxPC3細胞を移植して得られる腫瘍組織は豊富な線維構造を有し、一般的なヒト腫瘍に近い構造を形成する (図1.1d)。

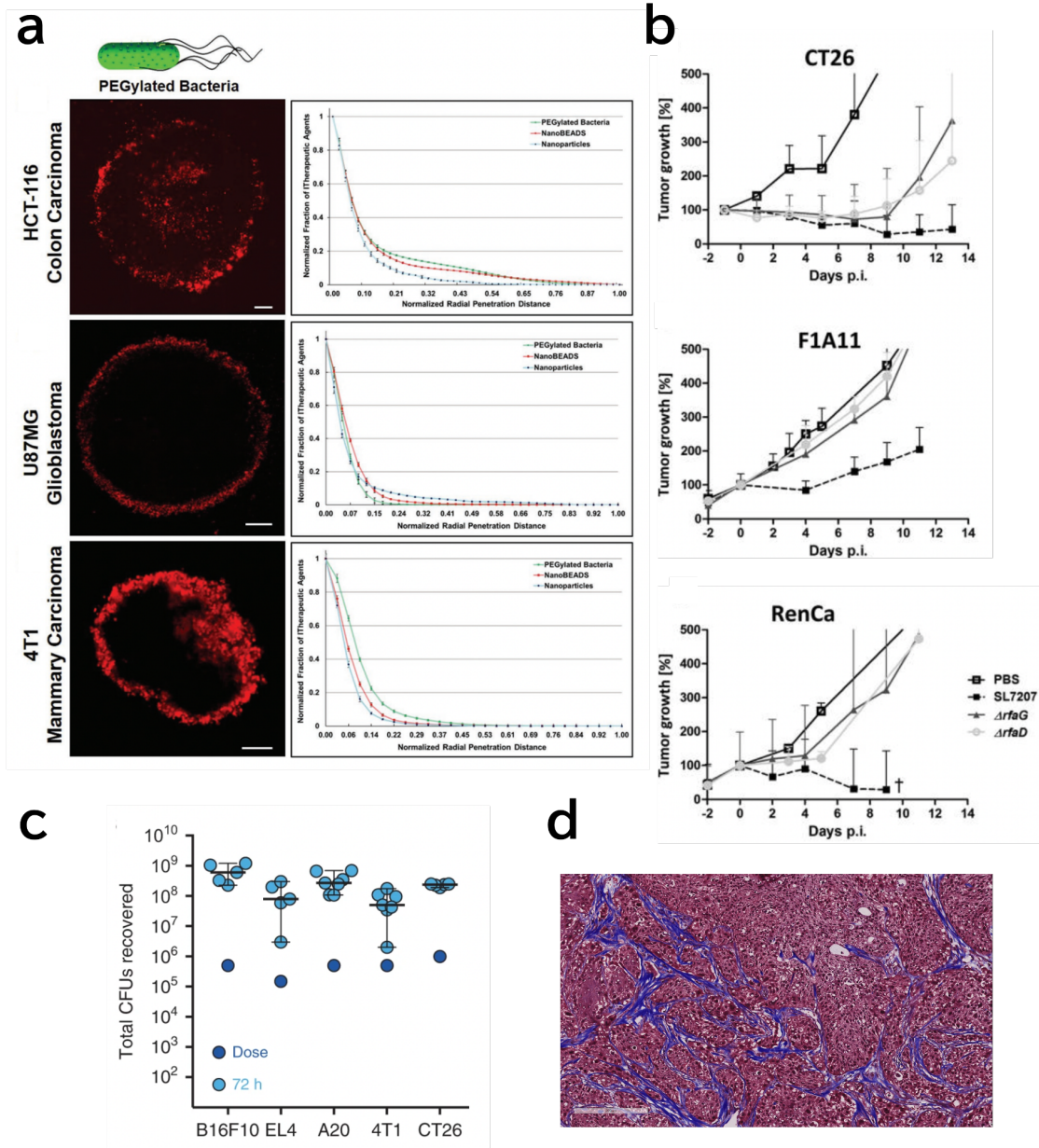


図 1.1 がん種によるバクテリアの動態の違い

(a) ヒト大腸癌由来HCT-116細胞、ヒト神経膠芽腫由来U87MG細胞、マウス乳がん由来4T1細胞それぞれから作成したスフェロイドにおけるPEG修飾を施した*Salmonella Typhimurium* VNP20009の浸透性。HCT-116細胞のスフェロイドでは内部までPEG化VNPが侵入している一方で、U87MG細胞および4T1細胞のスフェロイドではほとんどのVNP20009がスフェロイド表面付近に分布した。U87MGおよび4T1細胞間においても、スフェロイド内に侵入したVNP20009の量には差がある。(SB Suh et al., *Adv Sci (Weinh)*, 6(3):1801309 (2018) (90))

(b) マウス大腸癌由来CT26細胞、マウス線維肉腫由来F1A11細胞、マウス腎腺癌由来RenCa細胞それぞれの担がんモデルマウスに対し、 5×10^6 CFUの*Salmonella Typhimurium* SL7207またはLPSに変異を導入した種々の*Salmonella Typhimurium*を静脈内投与した際の腫瘍成長曲線。同じ菌株および投与量の投与においてもがん種によって腫瘍成長に与える効果が大きく異なる。(M Frahm et al., *mBio.*, 6(2):e00254-15 (2015) (91))(Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0)

(c) マウスメラノーマ由来B16F10細胞、マウスリンパ腫由来EL4細胞およびA20細胞、マウス乳がん由来4T1細胞、マウス大腸癌由来CT26細胞それぞれの担がんモデルマウスに対し、 1×10^6 CFUのEcNを腫瘍内投与後72 hにおける腫瘍内のEcN数。線維質が比較的少なく均質な腫瘍組織を形成しやすいマウス腫瘍のモデルかつ腫瘍内投与においても72 h後には腫瘍内菌体数に差が生じている。(DS Leventhal et al., *Nat Commun.*, 11(1):2739 (2020) (92))(Creative Commons Attribution 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ja>, Leventhal et al., 2020よりFig.1aを抜粋)

(d) ヒト膵臓癌由来BxPC3細胞をマウス皮下に移植して形成される腫瘍組織のトリクローム染色像。腫瘍組織内に線維構造が張り巡らされた構造を有し、血管も線維構造内部に存在する。スケールバーは200 μ mを表す。青:aniline blue (膠原繊維)、赤:Biebrich Scarlet / Acid Fuchsin (細胞質)

2. 結果

通性嫌気性細菌の *Salmonella Typhimurium* の弱毒化株である VNP20009 を用い、バクテリアの投与がリポソーム製剤の動態に与える影響を評価した。選定した3種のがん細胞（U87MG細胞、A549細胞、BxPC3細胞）をそれぞれ移植することで作製した担がんモデルマウスを用い、VNP20009の投与が蛍光標識リポソームの動態に与える影響と両者の併用の各がんの治療効果における有効性を検証した。

2.1 3種のがんにおけるVNP20009の生着および増殖量の評価

VNP20009の生着および増殖ががん種の違いによる影響を受けるか検証するため、対象とした3種のがんにおけるVNP20009の生着および増殖量を、CFUを用いて評価した。各がん細胞をそれぞれ皮下移植したマウスにVNP20009 ($2-4 \times 10^6$ CFU) を尾静脈内投与し、4日後に腫瘍組織を回収した。各腫瘍組織におけるVNP20009のCFUを測定した結果、いずれの腫瘍においてもVNP20009は 10^8-10^9 CFU/g tumorを示した（図2.1.1）。腫瘍組織に到達したVNP20009は投与後1-3日において急激に増殖し、投与後4日程度で 10^9 程度のCFUに達した後CFUは横ばいとなることが報告されている（96）。したがって、本研究で選定した3種のがんにおいてはその組織構造を含む腫瘍内環境の差異がVNP20009の生着および増殖に与える影響は小さく、VNP20009はいずれのがん種においても高い生着および増殖性を示すことが明らかとなった。

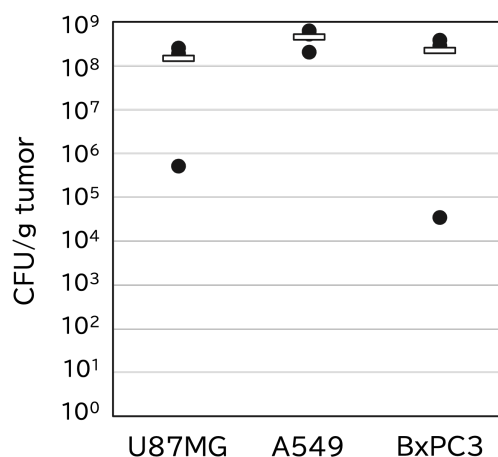


図 2.1.1 選定した3種のがんにおけるVNP20009量

VNP20009 ($2-4 \times 10^6$ CFU) をU87MG腫瘍・A549腫瘍・BxPC3腫瘍それぞれの担がんマウスの尾静脈内より投与した。投与4日後に各腫瘍組織を回収し、modified-LB寒天培地に組織破砕液を塗布することで各腫瘍組織中のVNP20009のCFUを測定した。各腫瘍組織ごとの測定値（●）および平均値（□）を示した。

2.2 VNP20009投与後のリポソームの腫瘍移行量および腫瘍内分布評価

VNP20009は選定したいずれのがんにおいても生着および増殖することが示されたが、バクテリアの生着がリポソームの動態に与える影響を評価した報告は極めて少ないことに加え、がん種による差異についてもほとんど報告されていない。本研究では次に、VNP20009はリポソームと併用した際にその腫瘍移行性を改善しうるかを検証した。

静脈内投与されたバクテリアは血中TNF- α 量の増加を介して腫瘍組織への血液流入を増加させる(19)。バクテリア投与直後から生じるTNF- α の増加に伴い血流増加および血管透過性の亢進が生じ、バクテリア投与の約12 h後にピークに達するため、VNP20009の投与直後にリポソームを投与することで腫瘍移行量が増加すると想定された。また、投与されたバクテリアは投与後1-3日で生着した腫瘍組織内において活発に増殖しがん細胞の細胞死を誘導するが、これらの腫瘍内環境の変化がリポソームの腫瘍移行量および腫瘍内分布へ与える影響は明らかになっていない。そこで、VNP20009投与直後および投与3日後にリポソームを投与した際の腫瘍移行量および腫瘍内分布を測定または観察した。

腫瘍移行量の測定および腫瘍内分布の観察には、腎クリアランスおよび細網内皮系による排除を回避し血中滞留性を向上させるため、粒子径100 nm程度かつポリエチレングリコール(PEG)を修飾した中性のリポソームを用いた。脂質組成は1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DOPC)/Cholesterol/mPEG(2000)-1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamine(DSPE)(60/40/5, mol%)とし、カルボンアニン色素の一種である蛍光色素DiD(励起波長/蛍光波長:645 nm/663 nm)を標識した。

リポソームの腫瘍移行量を評価するため、VNP20009の尾静脈内投与直後または3日後にDiD標識リポソームを投与した。それぞれDiD標識リポソーム投与1日後に腫瘍組織を回収し、腫瘍組織中におけるDiDの蛍光強度からリポソームの腫瘍移行量を算出した。その結果、U87MG腫瘍においてはVNP20009非投与群と比較してVNP20009との同時投与および3日後投与のいずれにおいても腫瘍移行量に差は認められず、全て投与量のうち2-3%の移行を示した(図 2.2.1a)。A549腫瘍においてはU87MG腫瘍とは異なり、VNP20009非投与群と比較してVNP20009との同時投与群においてリポソームの腫瘍移行量が有意に増加し、投与量のうち1%程度の移行を示した。一方で3日後投与群においては同時投与群で認められた腫瘍移行量の増加は認められなかった(図 2.2.1b)。A549腫瘍と同様に、BxPC3腫瘍においてはVNP20009非投与群と比較してVNP20009との同時投与群において腫瘍移行量の有意な増加が認められた。また、3日後投与群においてもA549腫瘍と同様に腫瘍移行量の増加は認められなかった(図 2.2.1c)。U87MG腫瘍と比較してA549およびBxPC3腫瘍においてはVNP20009非投与群におけるリポソームの腫瘍移行量は投与量のうち0.5%程度であり、2.5%程度の移行量を示したU87MG腫瘍のVNP20009非投与群と比較して有意に低い値を示した。以上の結果から、VNP20009の投与は比較的リポソームの移行が難しいがん種において、同時投与したりリポソームの腫瘍への移行を増加させることが示唆された。また、VNP20009投与3日後にリポソームを投与

した場合はいずれの腫瘍においても腫瘍移行量の増加は認められなかったことに加え、U87MG腫瘍およびBxPC3腫瘍においてはVNP20009非投与群と比較してわずかに低い値を示した。

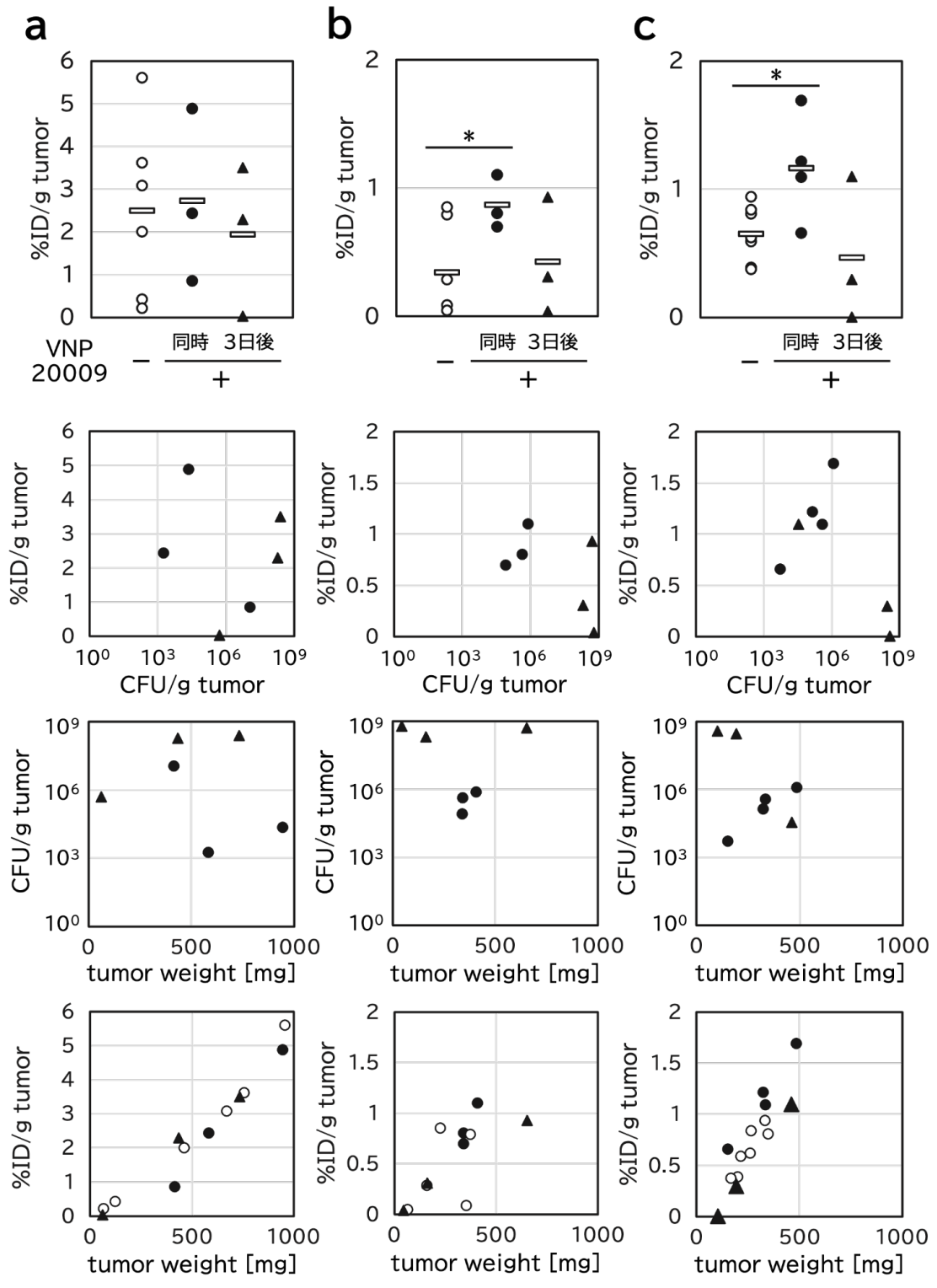


図 2.2.1 VNP20009と同時投与したリポソームの腫瘍組織への移行量

蛍光標識したリポソームをVNP20009投与直後に (a) U87MG腫瘍、(b) A549腫瘍、(c) BxPC3腫瘍の担がんモデルマウス尾静脈内より投与し、24 h後に破碎した各腫瘍組織の蛍光強度を測定することで各腫瘍へのリポソームの移行量を算出した (n=3-6)。各腫瘍組織ごとの測定値 (VNP20009非投与:○、VNP20009との同時投与:●、または3日後投与:▲) および平均値 (□) を示した。(* $p < 0.05$, nrANOVA followed by SNK test)

VNP20009との同時投与によってリポソームの腫瘍移行量の増加が認められたことから、VNP20009投与直後において血流増加および血管透過性の亢進が生じていると考えられる。VNP20009の投与による炎症反応は腫瘍組織内のみならず全身性に生じることが想定されるため、正常組織の血管への影響が懸念された。前述した通り、リポソームは粒子化することで内包した機能性分子の正常組織への移行を抑え、副作用の発現の抑制に寄与する。VNP20009との同時投与によってリポソームの正常組織への移行量が増加した場合、腫瘍組織における治療効果の向上と同時に副作用も増加することが予想されたことから、VNP20009投与と同時投与した際のDiD標識リポソームの正常組織への移行量を測定した。尾静脈内投与された細菌は一部が短期的に肺および脾臓に分布するものの、投与量の50%程度は肝臓、次いで腎臓に分布する(97)。そのため本検討においてはこれらの組織を中心として、肝臓・脾臓・腎臓・肺および心臓を評価対象とした。腫瘍への移行量の測定と同様に、VNP20009とDiD標識リポソームを同時投与後1日において各組織を回収し、DiDの蛍光強度からリポソームの移行量を測定した。その結果、いずれの組織においてもVNP20009の投与の有無によってリポソームの移行量に差は認められなかった(図 2.2.2)。

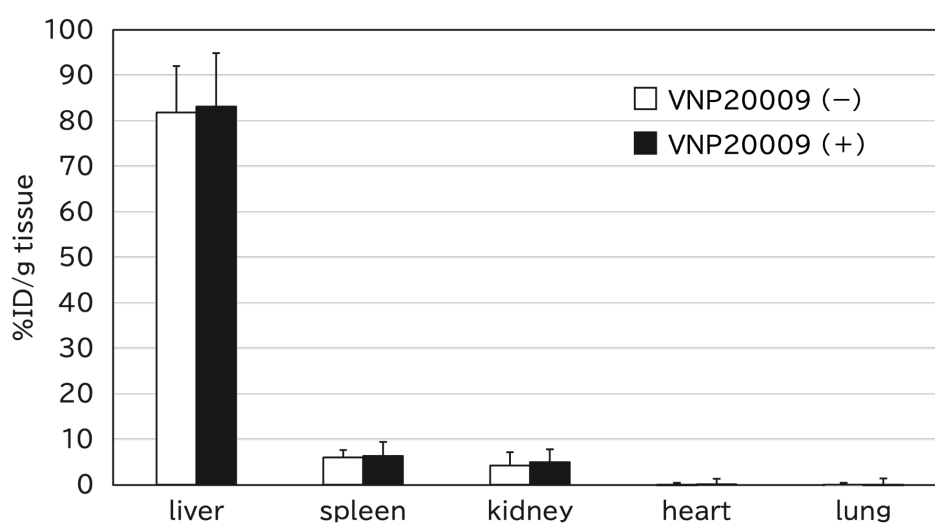


図 2.2.2 VNP20009と同時投与したリポソームの正常組織への移行量

蛍光標識したリポソームをVNP20009投与直後にマウス尾静脈内より投与し、24 h後に破碎した各正常臓器の蛍光強度を測定することで各組織へのリポソームの移行量を算出した (n=3-6)。データは平均±SDとして表した。

VNP20009の投与が同時投与したリポソームの腫瘍移行量を増加させうることが示されたが、前述した通りリポソームは腫瘍内での拡散性についても課題を有している。リポソームに搭載した抗がん剤をはじめとする機能性分子ががん細胞に対する薬効を発現するためにはリポソームを腫瘍組織全域へと分布させ、多くのがん細胞へアクセスさせることが必要である。腫瘍への移行量の増加は治療効果の向上に寄与することが期待される一方、増加した粒子が腫瘍組織内のごく一部に局在する場合は得られる治療効果の向上は限定的であることが想定される。反対に、リポソームの腫瘍への移行量の増加が認められない場合においても腫瘍組織内分布が拡大した場合には効果の向上が期待されることから、次に、VNP20009と併用した場合のリポソームの腫瘍内分布を観察した。腫瘍移行量の測定と同様にU87MG細胞、A549細胞、BxPC3細胞それぞれの皮下移植担がんモデルマウスに対し、VNP20009と同時またはVNP20009投与3日後にDiD標識を行ったリポソームの投与を行った。リポソームの投与1日後に腫瘍組織を回収し、300 μm の厚さに薄切した後Hoechst 33342を用いて核染色を行った腫瘍切片を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

U87MG腫瘍においては、VNP20009非投与群ではほとんどのリポソームが腫瘍辺縁部に分布し、腫瘍深部まで拡散している粒子はごくわずかであった（図 2.2.3a）。一方で、VNP20009投与群においては同時投与および3日後投与のいずれにおいてもリポソームが腫瘍深部まで拡散している様子が観察された（図 2.2.3b）。また、3日後投与群においてはVNP20009非投与群および同時投与群と比較して腫瘍内のネクロシスエリアが拡大している様子が観察された（図 2.2.3c）。

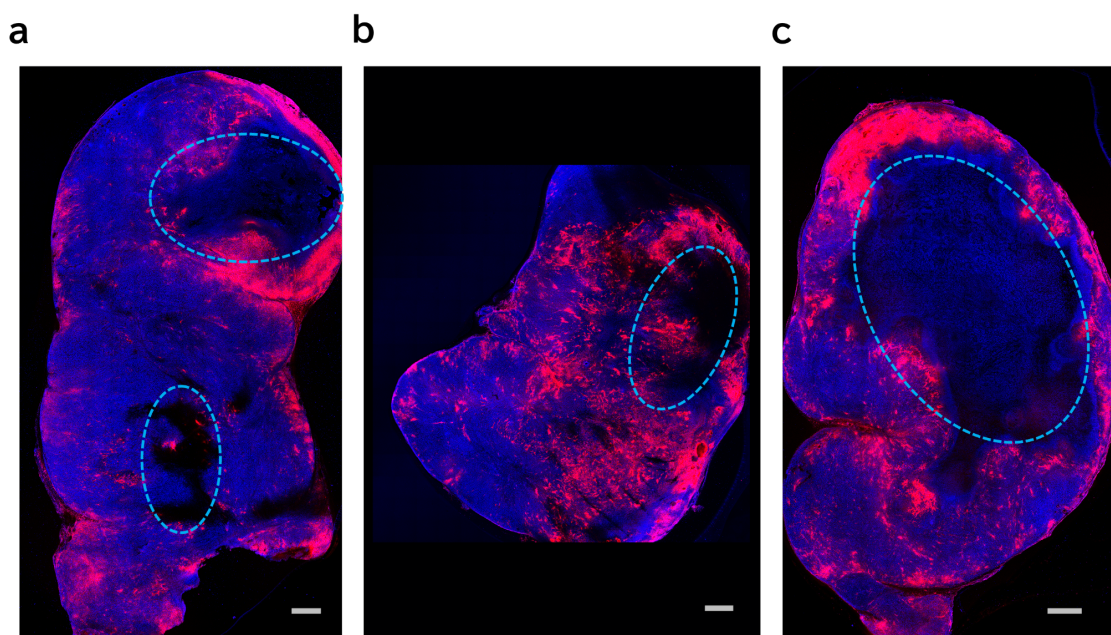


図 2.2.3 蛍光標識リポソームのU87MG腫瘍組織内分布

U87MG細胞を皮下移植することで作成した担がんモデルマウス尾静脈内よりVNP20009 ($2-4 \times 10^6$ CFU) を投与し、VNP20009投与直後 (b) または3日後 (c) に蛍光標識リポソームを尾静脈内より投与した。蛍光標識リポソームの投与24 h後において各腫瘍組織を回収および固定後、 $300 \mu\text{m}$ に薄切したうえで蛍光標識リポソームの腫瘍組織内分布をVNP20009非投与 (a) 腫瘍とともに共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。スケールバーは1 mmを表す。青:Hoechst 33342 (細胞核)、赤:DiD (蛍光標識リポソーム)

次に、A549腫瘍においてはU87MG腫瘍と同様にVNP20009非投与群ではリポソームのほとんどは腫瘍辺縁部に分布した（図 2.2.4a）。一方で、VNP20009との同時投与群においてはリポソームが腫瘍全域へと拡散している様子が観察された。このとき、リポソームの蛍光が顕著に強く観察された（図 2.2.4b）。これは前述の腫瘍移行量測定においてVNP20009との同時投与によって腫瘍移行量が増加した結果を反映していると考えられる。一方、VNP20009投与3日後にリポソームを投与した場合においては、同時投与群で観察されたような顕著な分布範囲の拡大は認められなかった。ただし、U87MG腫瘍と同様に腫瘍組織内のネクロシスエリアが拡大している様子が観察された（図 2.2.4c）。

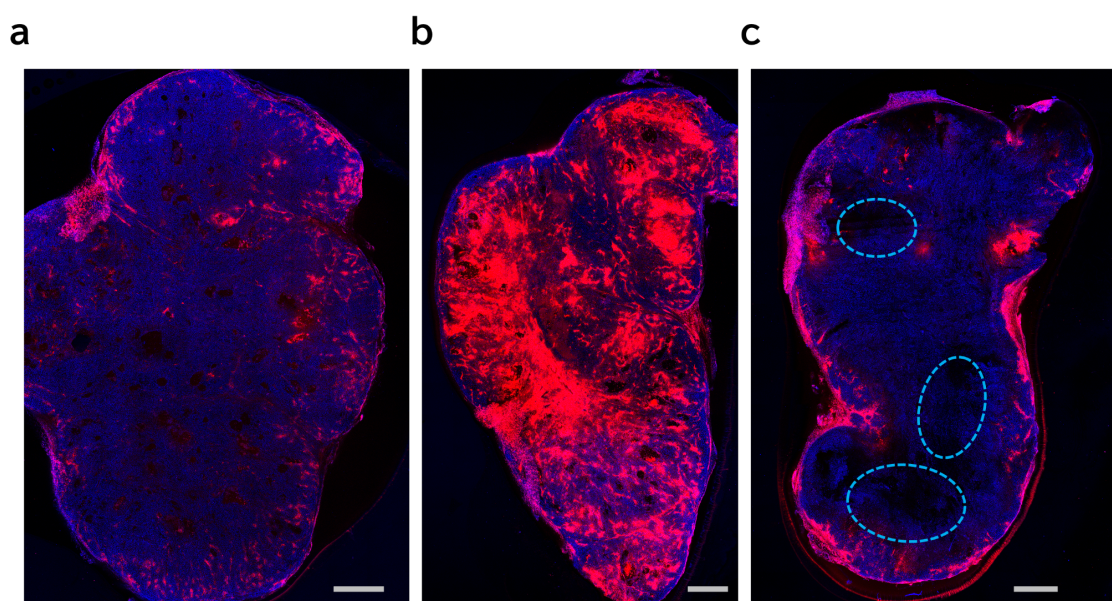


図 2.2.4 蛍光標識リポソームのA549腫瘍組織内分布

A549細胞を皮下移植することで作成した担がんモデルマウス尾静脈内よりVNP20009 ($2-4 \times 10^6$ CFU) を投与し、VNP20009投与直後 (b) または3日後 (c) に蛍光標識リポソームを尾静脈内より投与した。蛍光標識リポソームの投与24 h後において各腫瘍組織を回収および固定後、300 μ mに薄切したうえで蛍光標識リポソームの腫瘍組織内分布をVNP20009非投与 (a) 腫瘍とともに共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。スケールバーは1 mmを表す。青:Hoechst 33342 (細胞核)、赤:DiD (蛍光標識リポソーム)

膵臓癌由来のBxPC3腫瘍は線維質が豊富であり、組織全体に線維構造が張り巡らされた構造を有している。さらに、血管がこれらの線維質の内部に存在しているため、血流によって運ばれるリポソームは血管および線維構造に沿って腫瘍全域へと分布しているように観察されるが、より詳細に観察を行うと粒子の分布が少ない領域が複数認められる（**図 2.2.5 a**）。このような組織構造を有するBxPC3腫瘍に対してVNP20009投与を行った結果、同時投与および3日後投与のいずれにおいてもVNP20009非投与群で観察されたような粒子の分布が少ない領域が減少した（**図 2.2.5b, c**）。また、3日後投与群においてはU87MG腫瘍およびA549腫瘍と同様にネクロシスエリアの増加が観察された。U87MG腫瘍およびA549腫瘍と比較してネクロシスエリアが分散して存在していたことも腫瘍組織内が線維質によって分断されていることに由来すると考えられる。

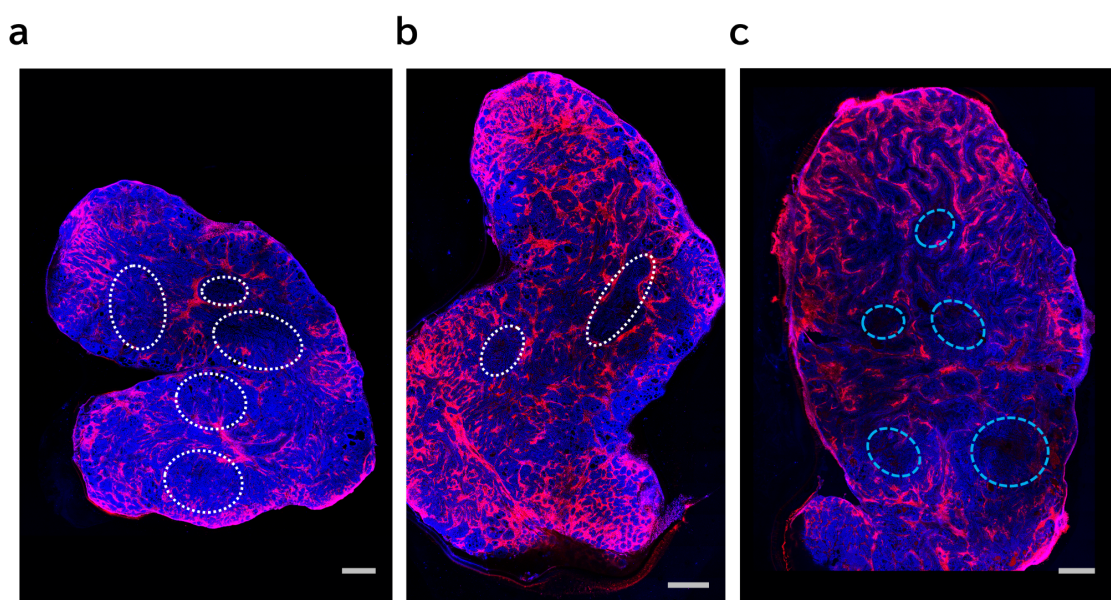


図 2.2.5 蛍光標識リポソームのBxPC3腫瘍組織内分布

BxPC3細胞を皮下移植することで作成した担がんモデルマウス尾静脈内よりVNP20009 ($2-4 \times 10^6$ CFU) を投与し、VNP20009投与直後 (b) または3日後 (c) に蛍光標識リポソームを尾静脈内より投与した。蛍光標識リポソームの投与24 h後において各腫瘍組織を回収および固定後、 $300 \mu\text{m}$ に薄切したうえで蛍光標識リポソームの腫瘍組織内分布をVNP20009非投与 (a) 腫瘍とともに共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。スケールバーは1 mmを表す。青:Hoechst 33342 (細胞核)、赤:DiD (蛍光標識リポソーム)

VNP20009投与3日後にリポソームを投与すると同時投与と比較して腫瘍移行量の増加は少なく、特にA549腫瘍においては腫瘍内分布の改善効果も小さかった。また、評価に用いた全ての腫瘍において腫瘍内のネクロシスエリアは拡大した。リポソームを腫瘍組織まで運搬する血流は、がん細胞の生存および増殖に必要な栄養成分や酸素の運搬も担っている。*Salmonella*の投与は血流増加および血管透過性の亢進に加えて、腫瘍内血管を減少させることも報告されている(98)。以上のことから、VNP20009の投与が腫瘍内血管に作用したことがリポソームの腫瘍移行量の増加効果の低減およびネクロシスエリアの拡大に寄与したと仮定し、VNP20009投与後の腫瘍内血管を観察した。VNP20009投与1日後および4日後に腫瘍組織を回収し、血管内皮細胞に高発現するCD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule; PECAM-1、血小板内皮細胞接着分子-1) を染色したうえで共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。血管量および血管構造はがん種によって差が大きく、U87MG腫瘍は細かい血管を豊富に有する一方でBxPC3腫瘍はU87MG腫瘍と比較して血管径が大きい少量の血管を有していた(図 2.2.6a, c)。A549腫瘍は両者の中間程度の血管量および構造を有していた(図 2.2.6b)。これらの腫瘍に対してVNP20009投与を行ったところ、いずれの腫瘍においてもVNP20009非投与群と比較して明瞭な血管構造が減少し、血管構造が崩壊している様子が観察された。VNP20009投与1日後と4日後の血管構造を比較すると4日後において構造の崩壊がより進行していた。リポソームの腫瘍移行量の測定および腫瘍内分布の観察において、同時投与ではVNP20009投与直後にリポソームを投与したことからVNP20009投与による血管構造の崩壊がリポソームの動態に与える影響は小さいことが想定されるが、VNP20009投与3日後にリポソームを投与した場合においては既に血管構造が一定以上崩壊した環境下に粒子が投与されるため、血管構造の崩壊による影響は3日後投与群においてより強く現れたと考えられる。同時に、VNP20009投与1日後には既に血管構造の崩壊が観察されたことから、VNP20009投与3日または4日後においては酸素および栄養素の腫瘍深部への供給への影響も大きいことが示唆された。

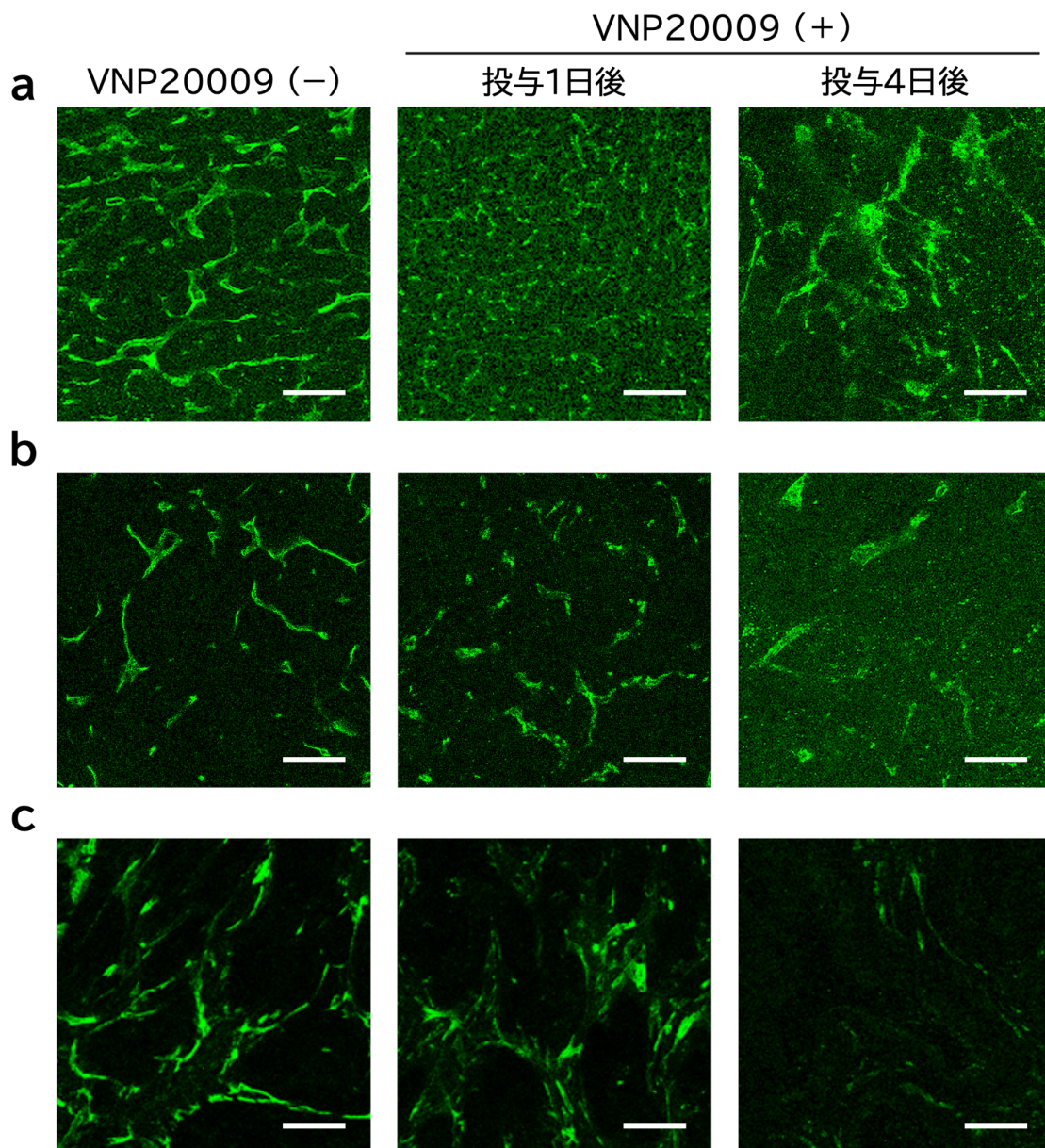


図 2.2.6 VNP20009投与後の腫瘍内血管構造

VNP20009 ($2-4 \times 10^6$ CFU) をU87MG細胞 (a)、A549細胞(b)、BxPC3細胞 (c) を皮下移植することで作成した担がんモデルマウス尾静脈内より投与した。VNP20009の投与1日または4日後において各腫瘍組織を回収および固定後、 $300 \mu\text{m}$ に薄切したうえで抗mouse CD31抗体 (armenian hamster IgG) および抗armenian hamster IgG抗体 (goat IgG) を用いて血管構造を可視化した。観察には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。スケールバーは $200 \mu\text{m}$ を表す。緑: CD31 (血管内皮細胞)

2.3 VNP20009投与によるがん細胞の細胞周期変化

ここまでの検討では、*Salmonella*が全身または腫瘍に与える影響のうち、炎症反応に伴う血流増加および血管透過性の亢進に着目してきた。リポソーム製剤が有する動態における課題に対して有効であるこれらの効果に加え、*Salmonella*は薬物の効果の向上に対しても有益な効果を与えうる。多くの抗がん剤は細胞周期依存的に効果を発現するが、腫瘍内の多くのがん細胞、特に腫瘍内部に存在するがん細胞は、その80–90%が増殖期であるS/G2/M期ではなく静止期であるG1/G0期に留まっていることが報告されている(99–101)。G1/G0期のがん細胞は運動性を示し転移に寄与することに加え、抗がん剤への抵抗性を示す(102)。このようながんに対し、*Salmonella*の弱毒化株である*Salmonella Typhimurium* A1-Rの投与はがん細胞の細胞周期をG1/G0期からS/G2/M期にシフトさせ、抗がん剤への感受性を向上させることが報告されている(100, 103, 104)。VNP20009とリポソームの併用において、使用するリポソームは既に市販されているリポソーム製剤から開発中のものまで幅広い種類を想定しているが、最も基本的なものとしては低分子医薬品の抗がん剤を封入したリポソームの使用が想定される。細胞周期の変化は低分子医薬品の抗がん剤を封入したリポソームの使用においてその薬効に大きく影響することが予想されることに加え、異なるリポソーム製剤の使用に際してもその薬効や投与レジメンを事前に検討する際の指標の一つとなることが期待される。このような背景から、VNP20009を投与した際のがん細胞の細胞周期の変化を評価した。

VNP20009は静脈内投与後1–3日で腫瘍組織内において急激に増殖し、投与後4日程度でCFUが頭打ちになる(96)。この間、腫瘍組織内のがん細胞の細胞周期変化がVNP20009投与後何日程度で生じるか、または生じないかは明らかになっていない。腫瘍微小環境は個体によって異なるため、細胞周期変化の評価においても同一マウスを用いて経時変化を追跡することが望ましいが、フローサイトメーターなどによる評価では腫瘍組織を回収する必要があるため不可能である。そこで、本研究ではがん細胞の細胞周期をFluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator (FUCCI) システムを用いて可視化したうえで低侵襲な組織観察が可能な顕微内視鏡による観察を行った。FUCCIシステムは標的とするがん細胞に対して遺伝子導入を行うことで、細胞周期に応じて異なる蛍光を発現させるものである(図 2.3.1a, d)。G1期には存在せず、S/G2/M期を通して蓄積した後には有糸分裂の中期から後期に移行する際に分解されるGeminin、およびG1期に高発現し、S期にユビキチン依存的な分解を受けるCdt1それぞれと異なる蛍光タンパク質を複合タンパク質化させる。現在は用いるプラスミドや蛍光タンパク質によって複数のプラスミドベクターが開発されている。本検討ではGemininと緑色蛍光タンパク質であるh2-3 (Ex 506 nm, Em 516 nm)、Cdt1と赤色蛍光タンパク質であるAzaleaB5 (Ex 574 nm, Em 596 nm) の複合タンパク質を同一ベクターに搭載したtFucci (CA) 5を用いた(図 2.3.1b, c)。

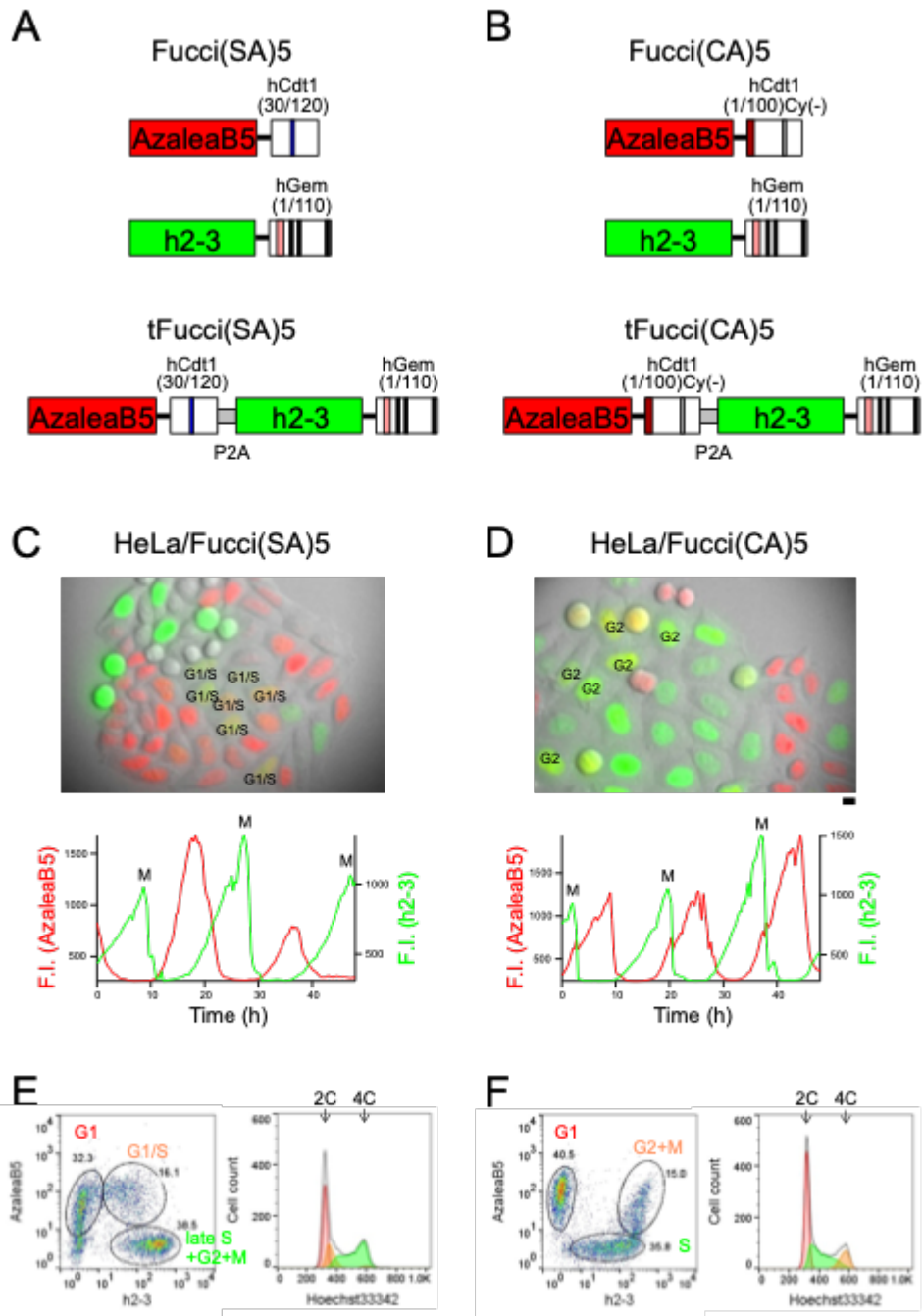


図 2.3.1 Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator (FUCCI) システムによる細胞周期の可視化 (105)

Ando et al. 2020 Fig 5 のうち本研究で使用したtFucci(CA)5に関連するB, D, Fについて記載する。Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs

(B) tFucci(CA)5のドメイン構造。hCdt1(1/100)Cy(-)中の濃赤色および灰色部分はそれぞれPIPボックスおよびCDKの認識部位であるCy部位に変異を導入したCyモチーフを示す。hGem(1/110)中のピンク色および黒色部分はそれぞれ破壊 (Destruction(D)) ボックスおよび核局在化シグナルを示す。

(D) 上:tFucci(CA)5を導入したヒト子宮頸がん由来HeLa細胞のFucci蛍光画像およびDIC画像。画像は指数増殖期の細胞を示し、スケールバーは10 μ mを表す。下:同HeLa細胞の時間経過 (細胞周期変化) 依存的な発現蛍光タンパク質の変化。M:mitosis

(F) tFucci(CA)5を導入したHeLa細胞のフローサイトメトリーによる解析結果。左:赤色 (Azalea B5(+) $h2-3(-)$)・黄色 (AzaleaB5(+) $h2-3(+)$)・緑色 (AzaleaB5(-) $h2-3(+)$) それぞれの蛍光を発現する細胞毎に作成したゲート。右:ゲーティングおよび核染色試薬であるHoechst33342による染色に基づいたDNA量。

(R Ando et al., *BioRxiv* (2020), <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.015156>)

FUCCIシステムを導入した腫瘍組織の観察には顕微内視鏡を用いた（図 2.3.2）。顕微内視鏡は理化学研究所 生命機能科学研究センター 細胞機能評価研究チームによって開発された機器であり、観察には内視鏡として使用可能な光ファイバーの束を用いる。皮下移植した腫瘍組織に対して皮膚表面から光ファイバーを刺入することで腫瘍組織内の蛍光タンパク質等を観察することが可能であり、低侵襲であることから同一マウスに対して複数回の観察が可能である。

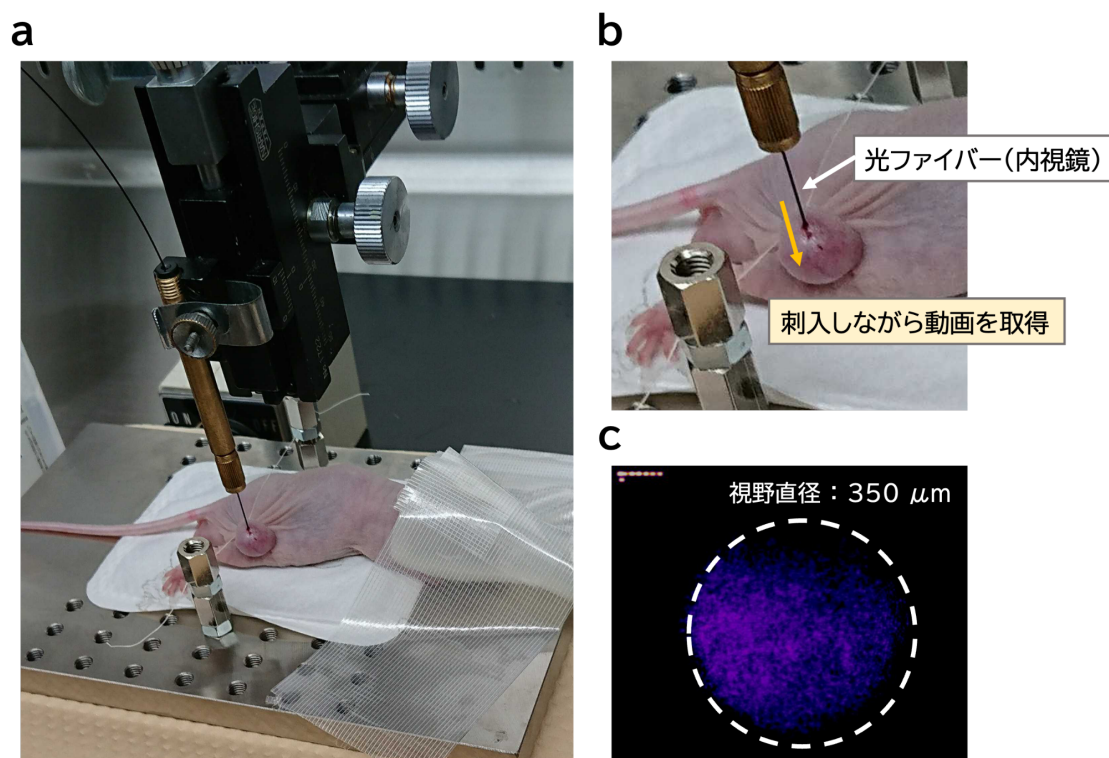


図 2.3.2 顕微内視鏡による観察

(a) 顕微内視鏡観察時の様子。左上のファイバーがレーザーに接続されている。観察はイソフルラン麻酔下で行い、腫瘍組織は縫合糸を用いて両端の金属バー間で位置を固定する。刺入する際は上部のハンドルを使用する。

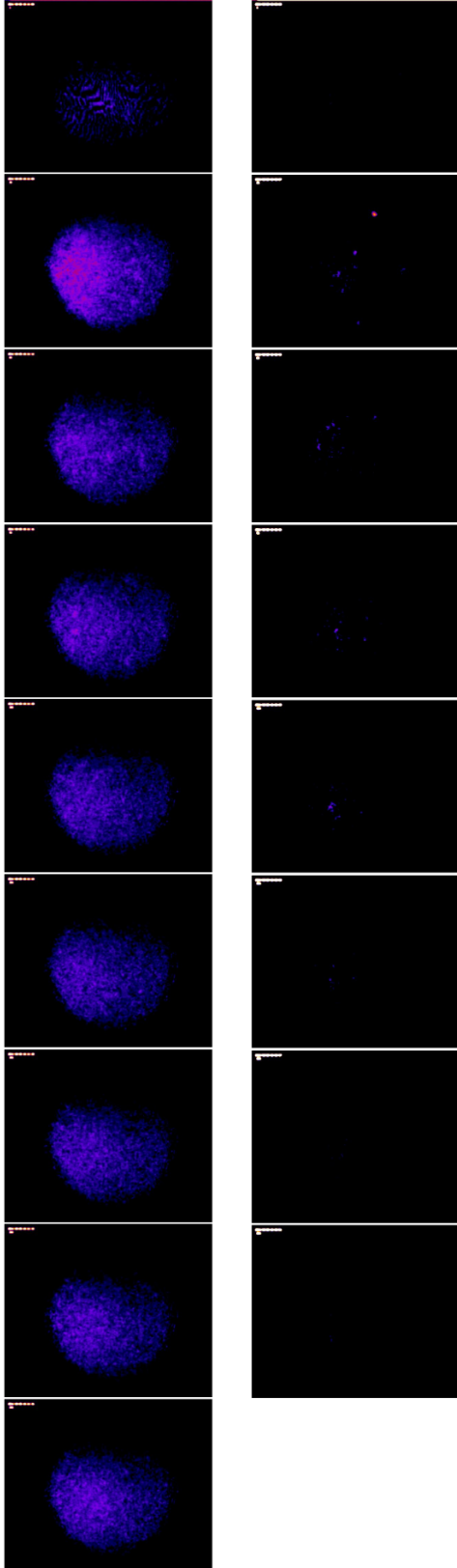
(b) (a) の拡大写真。光ファイバーを腫瘍組織表面から内部、反対側の表面まで刺入しながら動画を撮影する。

(c) 撮影した動画のスナップショット。視野の直径は350 μm であり、488 nmレーザーを用いてS/G2/M期の細胞が発現する緑色蛍光であるh2-3を観察した。緑色蛍光は視認性が低いため蛍光強度に応じた明暗で表示している。

FUCCIシステムを導入したヒト神経膠芽腫由来U87MG細胞を用いて担がんモデルマウスを作製した。腫瘍体積が200–300 mm³に達したマウスに対し、VNP20009 (5 × 10⁵ CFU) 投与1日前、VNP20009投与後1, 5, 8日後に顕微内視鏡を用いてS/G2/M期の細胞が発現する緑色蛍光タンパク質の観察を行った。VNP20009投与1日前においてはS/G2/M期の細胞は体表面付近にまばらに観察される程度であり、特に腫瘍深部においてはほとんどの細胞が静止期であるG1/G0期にとどまっていることが示唆された (図 2.3.3a)。VNP20009投与群において、投与後1および5日においてはVNP20009非投与群と比較してS/G2/M期の細胞数の顕著な増減は観察されなかった (図 2.3.3b, c)。一方、VNP20009投与8日後の観察においてVNP20009投与群では非投与群と比較してS/G2/M期の細胞が顕著に多く観察された (図 2.3.3d)。

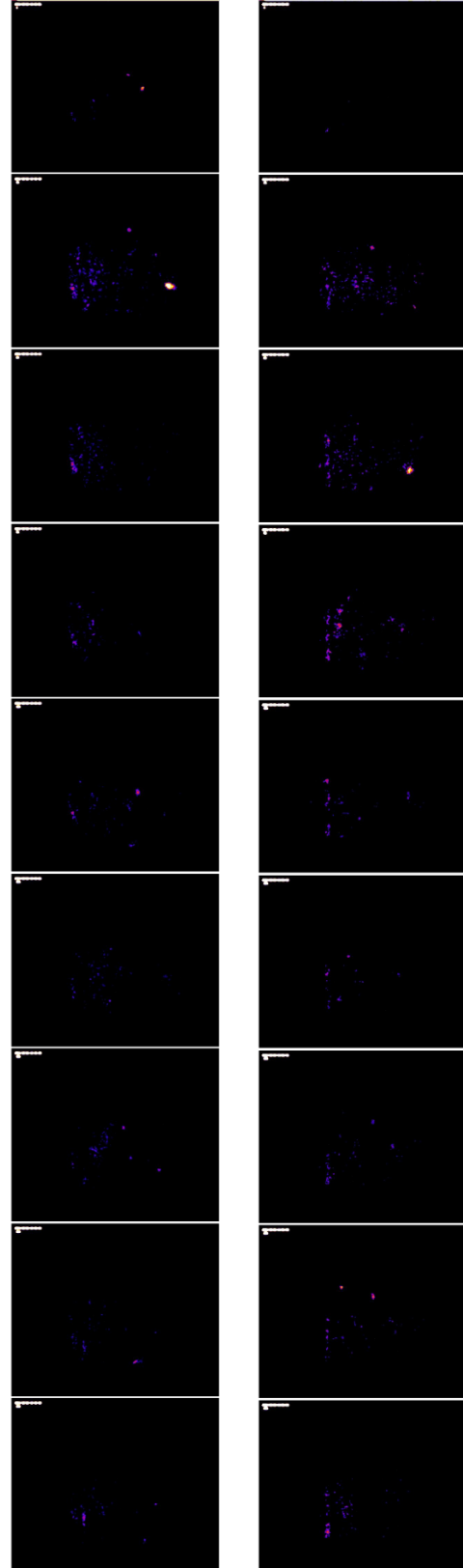
a

VNP20009 (-) VNP20009 (+)



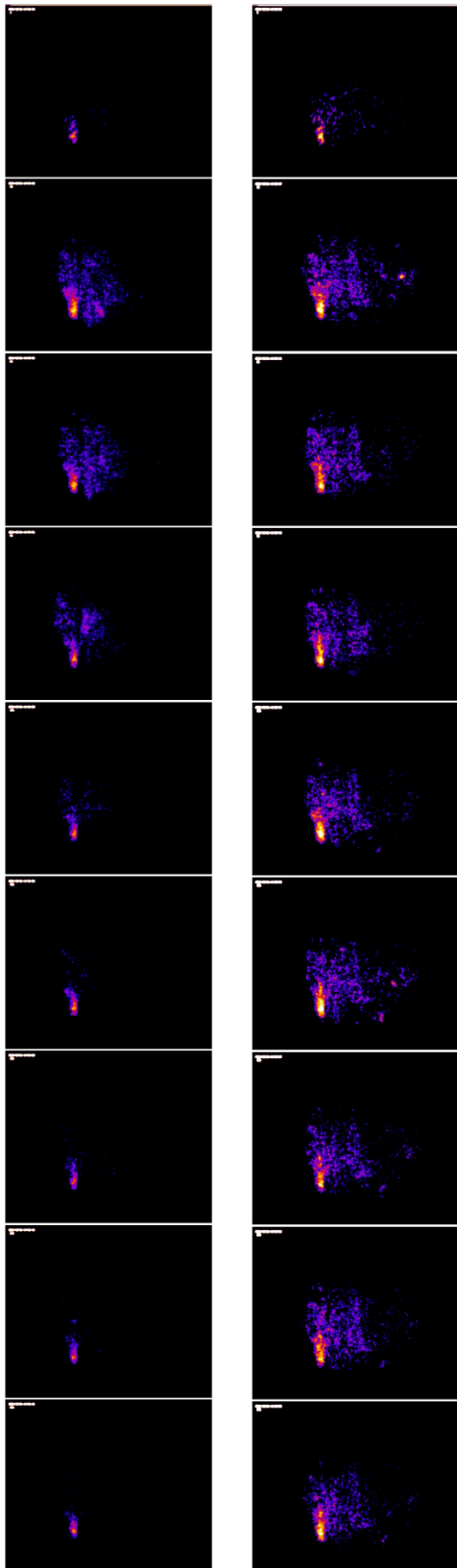
b

VNP20009 (-) VNP20009 (+)



c

VNP20009 (-) VNP20009 (+)



d

VNP20009 (-) VNP20009 (+)

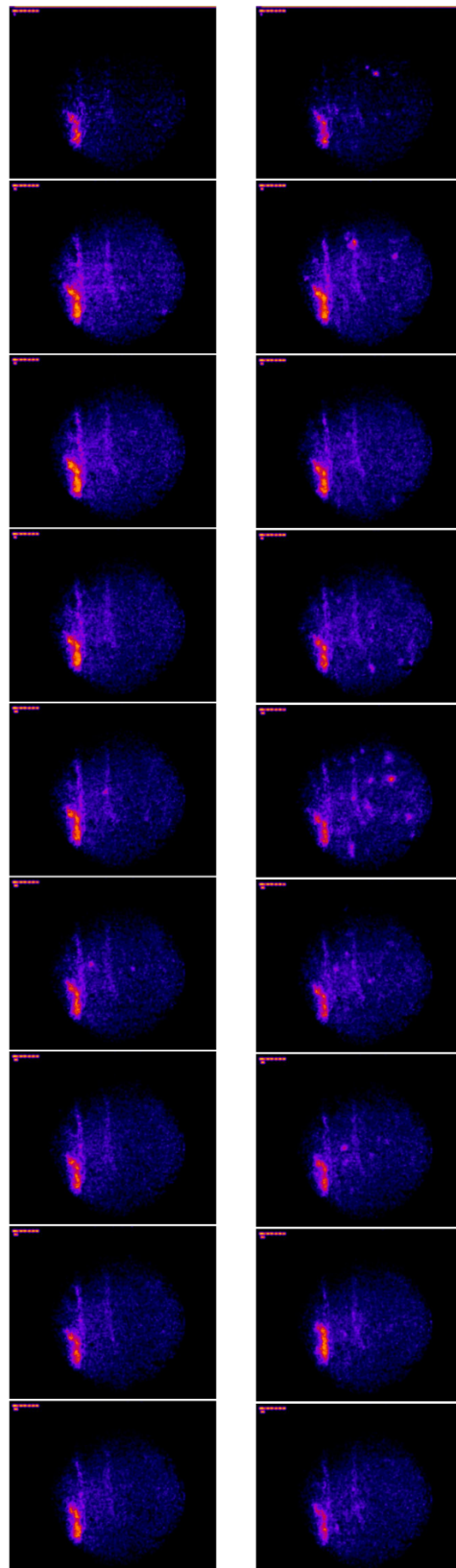


図 2.3.3 VNP20009投与後の腫瘍内S/G2/M期細胞の顕微内視鏡観察

顕微内視鏡（視野：350 μm ）を用い、FUCCI導入U87MG細胞の皮下移植担がんモデルマウスの腫瘍組織内におけるS/G2/M期細胞が発現する緑色蛍光（h2-3:Ex 506 nm, Em 516 nm）を観察した。観察はVNP20009投与1日前（a）、VNP20009投与1日後（b）、5日後（c）および8日後（d）の計4回行った。光ファイバーの腫瘍組織への刺入は動画を撮影しながら行った。（a-d）には動画として取得した約300フレームのうち30フレームごとに抜粋した静止画像を示す。各静止画像は上から腫瘍表面、腫瘍深部、腫瘍底面（マウス体表面近傍）を示す。（c）および（d）において視野左下に観察された蛍光強度が高い領域は撮影時に生じた光ファイバー断面のアーチファクトに由来する。観察した緑色蛍光は観察日ごとに蛍光強度によって表示色を変更した。

顕微内視鏡を用いた観察においてはS/G2/M期の細胞のみを観察対象としたことから、次に、VNP20009投与8日後の腫瘍組織を回収し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてS/G2/M期およびG1/G0期それぞれの細胞の観察を行い、各細胞周期の存在比を比較した。その結果、腫瘍辺縁部においてはVNP20009の投与に依らずS/G2/M期の細胞は20%程度であった一方で、腫瘍中心部においてはVNP20009非投与群ではS/G2/M期の細胞は15%程度であったのに対し、VNP20009投与群においては25%程度に増加した（図 2.3.4）。以上の結果から、VNP20009は投与後1週間程度で腫瘍組織深部のがん細胞の細胞周期をG1/G0期からS/G2/M期に移行させることが示唆された。

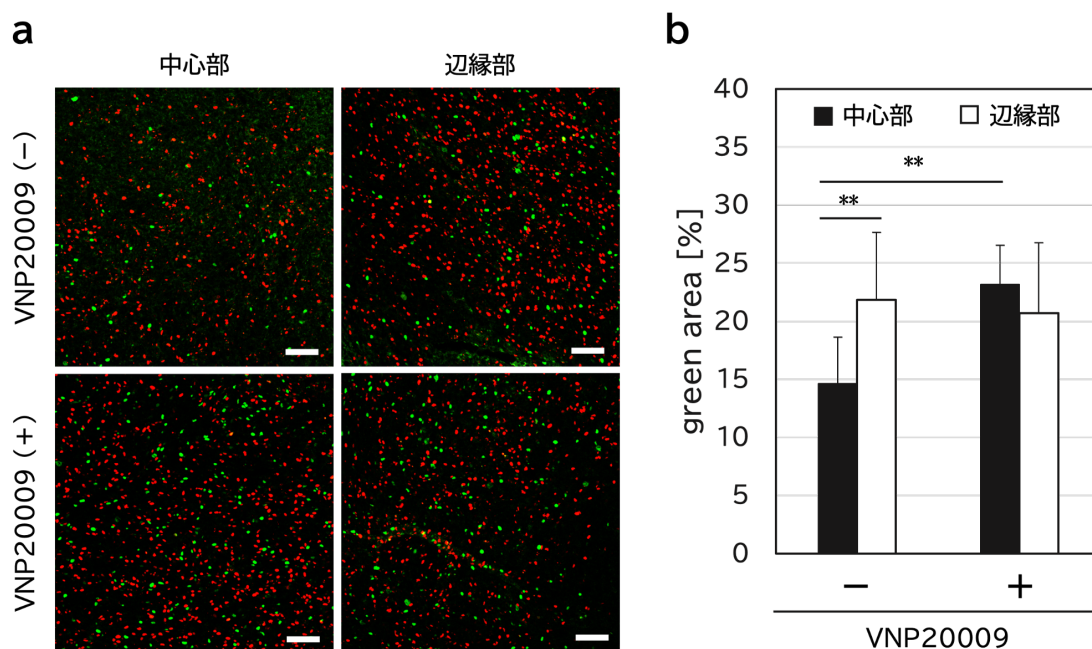


図 2.3.4 VNP20009の投与によるがん細胞の細胞周期変化

(a) FUCCI導入U87MG細胞を皮下移植することで作成した担がんモデルマウスに対し、VNP20009 (5×10^5 CFU) を静脈内投与より投与した。投与8日後に腫瘍組織を回収し、4% PFAによる固定およびOCT compoundによる包埋後、10 μ mの凍結切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。スケールバーは200 μ mを表す。緑:h2-3 (S/G2/M期細胞)、赤:AzaleaB5 (G1/G0期細胞)

(b) 共焦点レーザー顕微鏡による観察から得られた蛍光画像を用い、腫瘍組織の中心部および辺縁部におけるS/G2/M期細胞の割合を定量した (n=9)。データは平均 \pm SDとして表した。 (**p<0.01, Student's t-test)

2.4 VNP20009とドキシソルビシン封入リポソーム (Dox-LP) の併用による抗腫瘍効果の評価

蛍光標識リポソームの3種のがんにおける腫瘍移行量の測定および腫瘍内分布の観察結果から、A549腫瘍およびBxPC3腫瘍においてVNP20009とリポソームを同時投与することでリポソームの腫瘍への移行量および腫瘍内分布が増加および改善することが示された。そこで、最後にA549およびBxPC3担がんマウスに対して、VNP20009と抗がん剤封入リポソームを併用した際の抗腫瘍効果の評価を行った。

アントラサイクリン系の抗腫瘍性抗生物質であるドキシソルビシンのpolyethyleneglycol修飾リポソーム製剤としてDox-LP (持田製薬、ドキシル注 20 mg) を用いた。Dox-LPは水素添加大豆ホスファチジルコリン (HSPC), コレステロール及び N-(Carboxymethylpolyethylene glycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine sodium salt (Sodium MPEG-2000-Carboxymethyl-DSPE; MPEG-DSPE) の脂質二重膜から成る平均粒子径150 nm以下のリポソーム製剤である。

同時投与されたVNP20009およびDox-LPはいずれも血液を介して腫瘍組織へと運搬されることから、血中および腫瘍組織内において両者が一定時間共存することが想定される。ドキシソルビシンは細菌による産生あるいは細菌表面への修飾などによってがん治療戦略にも用いられた報告が存在するものの、同時投与した場合のVNP20009の増殖への影響は明らかではない。そこで、Dox-LPあるいはドキシソルビシン存在下におけるVNP20009の増殖性を評価した。抗腫瘍効果の評価におけるDox-LPの投与量のうち、0.1, 1, 5, 10%が腫瘍組織に到達した場合を想定した濃度のDox-LPおよびドキシソルビシンを添加したmodified-LB培地中におけるVNP20009のCFUを、培養開始後0, 2, 6, 24 hにおいて測定した。その結果、Dox-LPおよびドキシソルビシンのいずれを添加した場合においても薬剤非添加のmodified-LB培地と比較してVNP20009の増殖に顕著な変化は認められなかった (図 2.4.1)。蛍光標識リポソームの腫瘍移行量の測定結果から、リポソームの腫瘍移行量は多くとも投与量の3%程度であると想定される。また、VNP20009は腫瘍組織へと到達後、腫瘍深部へと移動するためDox-LPが比較的多く存在すると想定される血管近傍に24 h以上滞留する可能性は低い。以上のことから、同時投与したDox-LPによるVNP20009の増殖への影響は小さいことが示唆された。

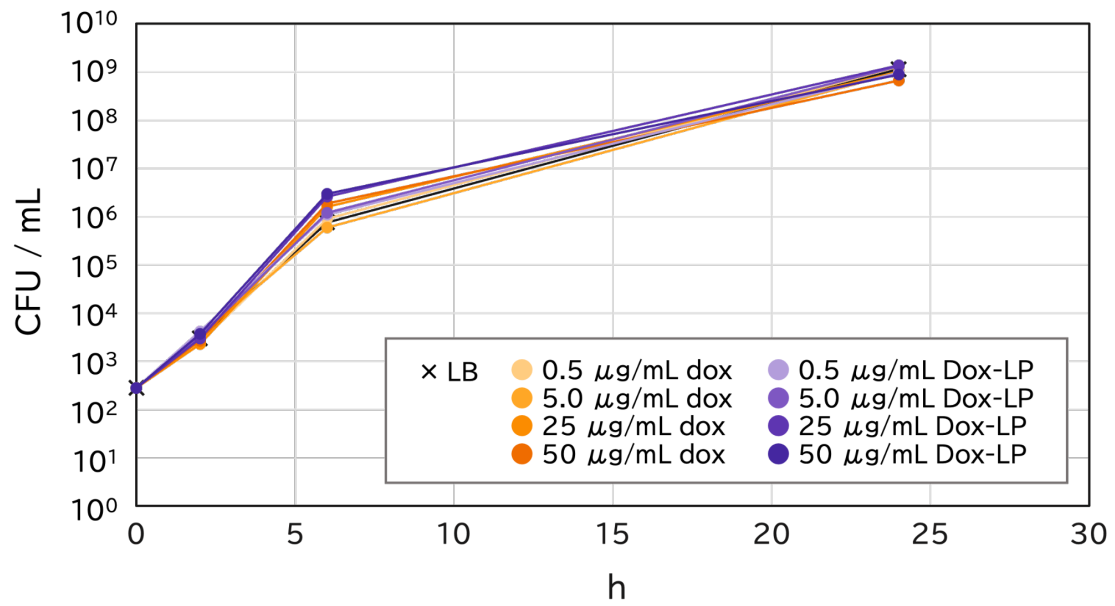


図 2.4.1 ドキソルビシンまたはDox-LP存在下におけるVNP20009の増殖の評価

ドキソルビシン (dox) またはDox-LPを添加したmodified-LB培地 (4 mL) にVNP20009を添加後、37°C、130 rpmの条件下で0, 2, 6, 24 h培養後の培地中VNP20009のCFUを測定した。doxおよびDox-LPの添加濃度は担がんマウスにDox-LPを投与後0.1, 1, 5, 10%が200 mgの腫瘍組織に到達した場合の想定濃度を用いた。

続いて、VNP20009とDox-LPを同時投与した際の抗腫瘍効果を評価した。A549およびBxPC3腫瘍の担がんモデルマウスにおいて、腫瘍の体積が200–400 mm³に達した時点で無作為に3–4匹ずつの群に分けた。Dox-LPは5 mg/kg（ドキソルビシン相当量）、VNP20009は5 × 10⁵ CFU/mouse の投与量とし、VNP20009およびDox-LPをいずれも投与しない未処理群、VNP20009単独投与群、Dox-LP単独投与群、Dox-LPとVNP20009の併用投与群の4群を設定した。細胞周期変化の評価結果から、VNP20009投与によるがん細胞の細胞周期はVNP20009投与後およそ1週間後に変化が認められたことから、各投与群はそれぞれ1週間おきに計3回の静脈内投与を行った。初回投与時から腫瘍体積およびマウス体重をモニタリングした結果、A549およびBxPC3腫瘍のいずれにおいてもDox-LP単独およびVNP20009単独の投与ではわずかな腫瘍成長の抑制効果に留まった一方、併用群においては初回投与直後から強力な抗腫瘍効果が認められた（図 2.4.2, 2.4.3）。

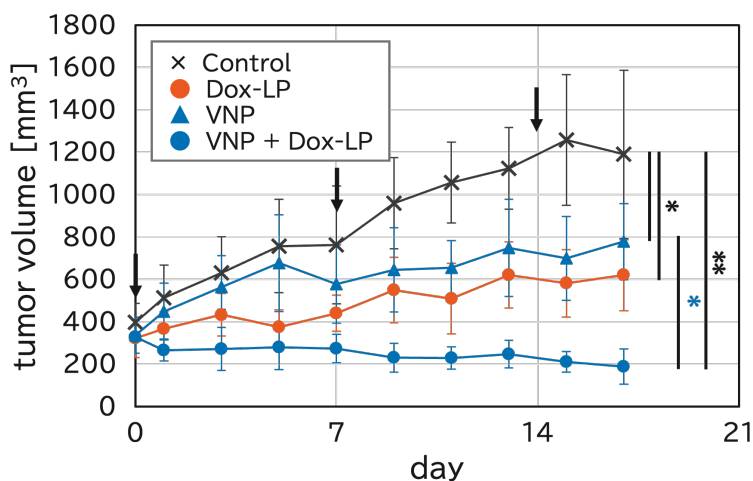


図 2.4.2 VNP20009とDox-LPの併用の複数回投与によるA549腫瘍に対する抗腫瘍効果

A549腫瘍担がんマウスに対し、Dox-LPまたはVNP20009（VNP）の単独投与またはDox-LPおよびVNP20009の同時投与を1週間おきに計3回行った際の腫瘍の成長曲線を示す。VNP20009は5 × 10⁵ CFU、Dox-LPはドキソルビシン量として5 mg/kgの投与量にて使用した。矢印は投与日を示す。（*p<0.05, **p<0.01, nrANOVA followed by SNK test）

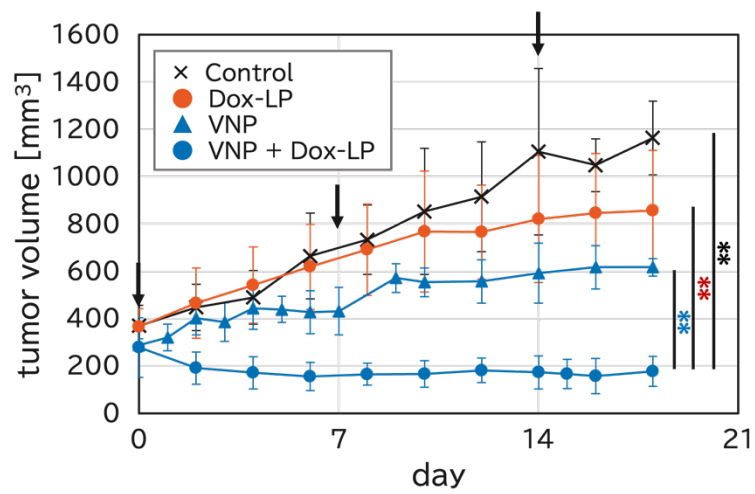


図 2.4.3 VNP20009とDox-LPの併用の複数回投与によるBxPC3腫瘍に対する抗腫瘍効果

BxPC3腫瘍担がんマウスに対し、Dox-LPまたはVNP20009（VNP）の単独投与またはDox-LPおよびVNP20009の同時投与を1週間おきに計3回行った際の腫瘍の成長曲線を示す。VNP20009は 5×10^5 CFU、Dox-LPはドキソルビシン量として5 mg/kgの投与量にて使用した。矢印は投与日を示す。(** $p < 0.01$, nrANOVA followed by SNK test)

VNP20009とDox-LPの併用によってそれぞれの単剤よりも強力な抗腫瘍効果が得られたが、VNP20009の投与はリポソーム製剤以外の薬剤の全身および腫瘍組織内における動態も変化させうる。そのため、リポソームに内包されていないドキソルビシンを用い、Dox-LPと同様にVNP20009との同時投与を計3回行った際の抗腫瘍効果を評価した。その結果、Dox-LPと同様にドキソルビシン量として5 mg/kgの投与量を用いて評価を行ったものの、Dox-LPを用いた際に認められた強力な腫瘍成長の抑制効果は認められず、VNP20009単独投与と同程度の抗腫瘍効果を示した（図 2.4.3, 2.4.4）。したがって、VNP20009の投与による動態改善を介した薬効の向上には抗がん剤のリポソーム化が必要であることが示唆された。

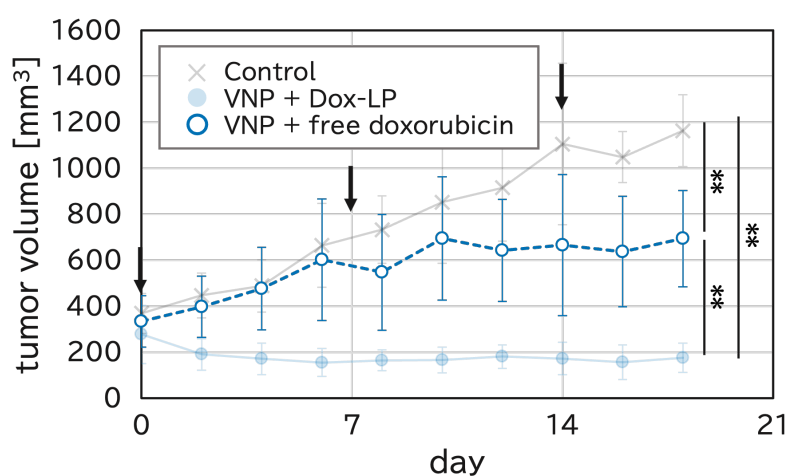


図 2.4.4 VNP20009と非封入ドキソルビシンの併用投与によるBxPC3腫瘍に対する抗腫瘍効果

BxPC3腫瘍担がんマウスに対し、VNP20009（VNP）と非封入ドキソルビシンの同時投与を計3回行った際の腫瘍の成長曲線を示す。未処理群およびDox-LPとの同時投与群に関しては図2.4.3と同様のものを示す。VNP20009は 5×10^5 CFU、Dox-LPおよびドキソルビシンは5 mg/kgの投与量にて使用した。（** $p < 0.01$, nrANOVA followed by SNK test）

前述した抗腫瘍効果の評価において、VNP20009およびDox-LPの併用群においては初回投与直後から強力な腫瘍成長抑制効果が認められ、この効果は2回目の投与日においても持続した。この結果から、VNP20009とDox-LPの併用は単回投与においても抗腫瘍効果を発現可能であると仮説を立てた。VNP20009は正常組織からは排除を受けるが、血中からの排除は数時間程度で完了する一方で固形組織からの排除には数日、投与量や組織の種類によっては1週間以上の期間を要する。そのため、VNP20009およびDox-LPの投与回数は副作用の観点からも少ないことが望ましい。そこで、BxPC3腫瘍を用い、VNP20009およびDox-LPの併用の単回投与による抗腫瘍効果の評価した。前述した検討と同様に腫瘍の体積が200-400 mm³に達したBxPC3腫瘍の担がんモデルマウスを用い、VNP20009およびDox-LPは同様の投与量にて投与を行った。その結果、前述した計3回の投与を行った評価と同様に併用投与直後から強力な抗腫瘍効果が認められ、投与後2週間経過時点においても腫瘍の再増殖は認められなかった（図 2.4.5）。

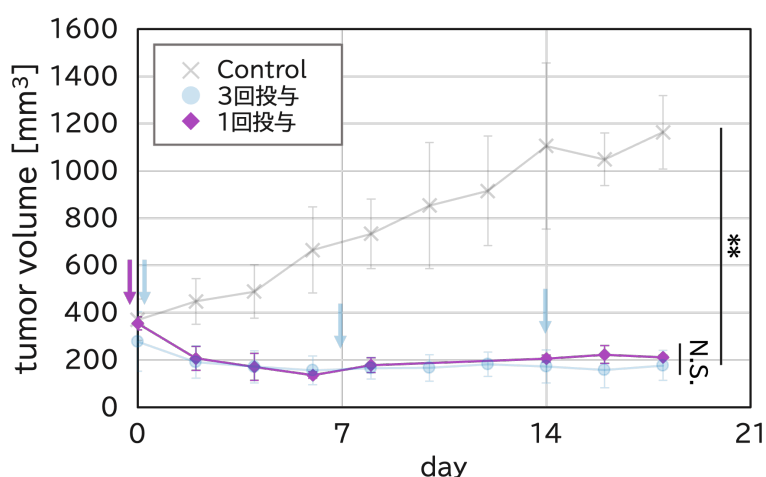


図 2.4.5 VNP20009とDox-LPの単回投与によるBxPC3腫瘍に対する抗腫瘍効果

BxPC3腫瘍担がんマウスに対し、VNP20009（VNP）とDox-LPの同時投与を計3回または1回行った際の腫瘍の成長曲線を示す。未処理群および3回投与群に関しては図2.4.3と同様のものを示す。VNP20009は 5×10^5 CFU、Dox-LPはドキソルビシン量として5 mg/kgの投与量にて使用した。緑矢印は3回投与の投与日、紫矢印は1回投与の投与日を示す。（**p<0.01, nrANOVA followed by SNK test） N.S.:not significance

VNP20009とDox-LPの併用投与はA549およびBxPC3腫瘍のいずれにおいても腫瘍成長を強く抑制したことに加え、投与回数を3回から1回に減らした場合においても同様の効果が得られた。VNP20009は腫瘍組織内で増殖することから、より少ない投与量においても同様に腫瘍成長が抑制されうると仮説を立てた。また、腫瘍組織内での増殖によりバクテリアの治療効果または副作用の大きさは投与量との相関が小さいものの、Zhangらは 2.5×10^7 CFUと 5.0×10^7 CFUの2つの投与量でVNP20009をマウスに投与した場合に 5.0×10^7 CFUのほうが早期に死亡する個体が多いことを報告しているなど、バクテリアの投与量は少ないほうが望ましい(106)。そこで、VNP20009の投与量を10分の1(5×10^4 CFU)にした場合のDox-LPとの併用による抗腫瘍効果を評価した。その結果、投与量を10分の1(5×10^4 CFU)にした場合においては従来の投与量(5×10^5 CFU)と比較して投与後腫瘍成長抑制効果が現れるまでの期間が4日程度長かったものの、投与後1週間程度経過した後は同様の抗腫瘍効果を示した(図 2.4.6a)。この結果から、VNP20009とDox-LPの併用投与で得られる抗腫瘍効果にはDox-LPの効果とともに腫瘍組織内におけるVNP20009の増殖の寄与も大きいことが示唆された。また、 5×10^4 CFUのVNP20009を投与したマウスはコントロール群と同等の体重推移を示した(図 2.4.6b)。

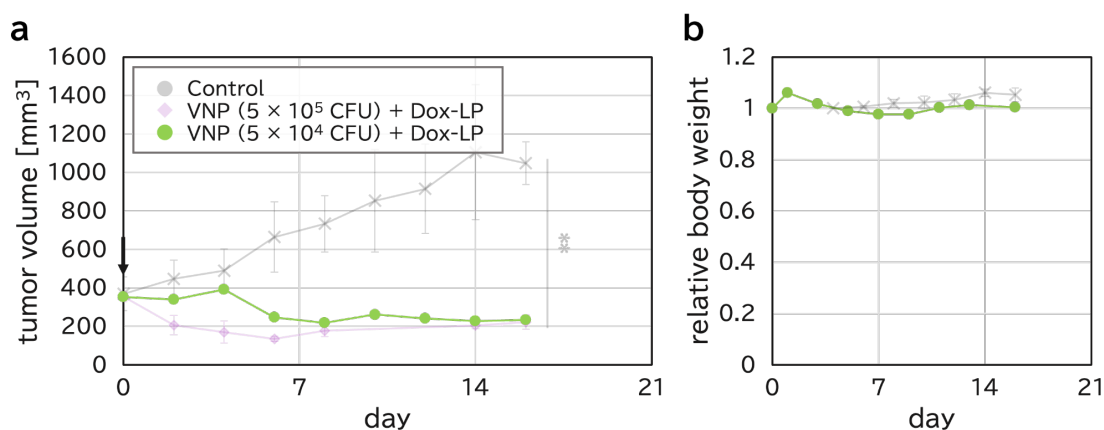


図 2.4.6 低投与量のVNP20009を用いた場合の抗腫瘍効果

BxPC3腫瘍担がんマウスに対し、上述した4つの検討で用いた投与量(5×10^5 CFU)の10分の1の投与量(5×10^4 CFU)のVNP20009(VNP)とDox-LPの同時投与を1回行った際の腫瘍の成長曲線(a)および体重変化(b)を示す。未処理群および 5×10^5 CFUのVNP20009を用いた併用群に関しては図2.4.5と同様のものを示す。Dox-LPはドキソルビシン量として5 mg/kgの投与量にて使用した。矢印は投与日を示す。

3. 考察

本研究では異なる腫瘍組織構造を有する複数のがんを用い、VNP20009の投与がリポソーム製剤の動態に与える影響を評価するとともに両者の併用投与の治療効果における有効性の検証を目的とした。

VNP20009と蛍光標識リポソームを用いたリポソームの腫瘍移行量および腫瘍内分布の評価から、VNP20009との同時投与によってA549およびBxPC3腫瘍においてリポソームの腫瘍への移行量が増加するとともに腫瘍内分布が改善することが示された（図2.2.1）。VNP20009は投与後約12 hをピークとしてTNF- α の増加を介した腫瘍組織への血流増加を引き起こすことが報告されている（19）。PEG修飾を行った中性のリポソームは血中滞留性を有し投与後24 h程度は血中に存在すると想定されることから、VNP20009の投与による血流増加および血管透過性の亢進によって腫瘍への移行量が増加するとともに腫瘍内分布が改善したと考えられる（107）。VNP20009の投与によるリポソームの腫瘍への移行量の増加がわずかであったU87MG腫瘍は、VNP20009非投与におけるリポソームの腫瘍移行量が投与量の2.5%であり、1%以下の値を示したA549およびBxPC3腫瘍と比較して多かった（図2.2.1）。この結果はVNP20009によるリポソームの腫瘍移行量の増加効果は比較的リポソームの移行が難しいがん種において特に有効であることが示唆している。U87MG腫瘍は、A549腫瘍およびBxPC3腫瘍と比較して豊富な腫瘍内血管を有している（108, 109）。血管内皮細胞に発現するCD31の蛍光免疫染色による観察結果においても細かい血管が張り巡らされた構造が観察されたことから、リポソームを運搬する血液が腫瘍組織内へと流入しやすいために腫瘍移行量が他の2種のがんよりも多いと考えられる（図2.2.6）。VNP20009投与3日後においてはいずれのがんにおいても同時投与で得られた腫瘍移行量の増加効果は得られなかった（図2.2.1）。Jiaらはメラノーマ細胞を用いた評価から、VNP20009の投与により腫瘍組織内の血管が減少することを明らかにした（98）。VNP20009投与4日後の血管構造を観察した結果、VNP20009の投与によりいずれのがんにおいても腫瘍内血管構造が破綻している様子が観察されたことから、本研究で用いた3種のがんにおいても同様の現象が生じたことが示唆された（図2.2.6）。VNP20009投与3日後においては炎症反応は投与直後と比較して小さいと想定されることに加え、血管構造の破綻による血管機能の低下によりリポソームの腫瘍移行量が増加せず、特にU87MG腫瘍およびBxPC3腫瘍においては減少傾向を示したと考えられる。血管機能の低下は血中に投与されたリポソームと同様に、血液を介して運搬される酸素や栄養成分の腫瘍への運搬も妨げると想定される。低酸素かつ低栄養条件下において、通性嫌気性であるVNP20009は死細胞などを栄養源として増殖可能である一方でがん細胞の細胞死は増加すると考えられることから、VNP20009投与3日後に蛍光標識リポソームを投与した際の腫瘍内分布の観察結果において観察された腫瘍内部のネクローシスエリアの拡大にはVNP20009の増殖および血管機能の低下に伴う酸素および栄養成分の供給不足の双方が寄与していると考えられる。

VNP20009は、リポソーム製剤の腫瘍移行量および腫瘍内分布に対する作用に加え、投与後約1週間後にかん細胞の細胞周期を変化させた（**図2.3.3, 2.3.4**）。Hoffmanらは、*Salmonella Typhimurium* A1-Rを用いた評価によって*Salmonella*の投与によってがん細胞の細胞周期が変化することを示したが、詳細なメカニズムは明らかになっていない（103）。*Salmonella*はIII型分泌装置（Type III Secretion Systems; T3SS）と呼ばれるタンパク質を菌体外へと分泌するための器官を有しており、T3SSを介して宿主細胞内にエフェクタータンパク質を送り込むことで宿主細胞内への侵入を促進するほか、宿主細胞に様々な変化を生じさせることが報告されている（110）。一部のエフェクターは宿主細胞の細胞周期を攪乱する機能を有することも報告されており、エフェクターの一種であるSpvBはHeLa細胞で発現させた場合G1/SまたはG2/Mの細胞周期を停止させ、アポトーシスを誘導する（111-113）。また、同様にエフェクターの一種であるPheAはRAW264.7マクロファージの核に局在し、G0/G1期の細胞の割合を増加させ、G2/M期の細胞を減少させるなどの機能が報告されている（114）。*Salmonella Typhimurium*においてはT3SSを介さず、外膜に存在するタンパク質であるRckと宿主細胞上の上皮成長因子受容体（epidermal growth factor receptor; EGFR）を介した侵入経路も報告されている（115-117）。Mambuらは上皮成長因子（EGF）-EGFRシグナル経路が細胞の増殖や分化、アポトーシス等に関与することに基づき、Rckを介した*Salmonella Typhimurium*の宿主細胞への感染は*Salmonella Typhimurium*の内在化とは無関係に宿主細胞の細胞周期のS期を遅延させるとともに遅延させたS期において*Salmonella Typhimurium*の内在化が促進されることを明らかにした（118, 119）。腫瘍組織内においてもこれらと類似の機構が関与している可能性が考えられる。また、VNP20009による細胞周期の変化は、腫瘍中心部において特に顕著であった（**図2.3.4**）。腫瘍中心部は細菌の増殖が盛んな領域であり、VNP20009投与後にネクロシスエリアが形成された腫瘍組織においてはネクロシスエリア近傍においてS/G2/M期の細胞の割合が増加する様子も観察されることから（データ未提示）、がん細胞の細胞周期の変化にはVNP20009との直接的な接触が必要であると考えられる。

前述したHoffmanらの報告においては*Salmonella Typhimurium* A1-Rの投与に伴う細胞周期の変化が併用した抗がん剤による治療効果を向上したと結論づけている。VNP20009の投与においても投与後1週間程度において細胞周期変化が観察されたものの、VNP20009とDox-LPの併用投与による腫瘍成長抑制効果は両者の初回投与直後から観察された（**図2.4.2, 2.4.3, 2.4.5**）。加えて、VNP20009とDox-LPの併用投与は両者の同時投与を複数回繰り返す投与計画のみならず、単回投与においても複数回投与と同様の腫瘍成長抑制効果を示した（**図2.4.5**）。腫瘍成長の抑制に細胞周期の変化とドキシソルビシンの薬効の組み合わせが重要である場合、単回投与では徐々に腫瘍成長が再開することが想定される。以上のことから、VNP20009とDox-LPの併用による抗腫瘍効果の増強においては細胞周期変化の影響は比較的小さく、VNP20009の腫瘍組織内における増殖、および動態改善に伴いより多くのがん細胞に対して効果的に作用することが可能になっ

たDox-LPの薬効の寄与が大きいことが示唆された（図3.1）。死細胞はバクテリアの栄養源となりうることから、VNP20009とDox-LPはそれぞれが独立してがん細胞の細胞死を誘導することに加え、Dox-LPの作用により生じた死細胞がVNP20009の増殖を促進している可能性も考えられる。

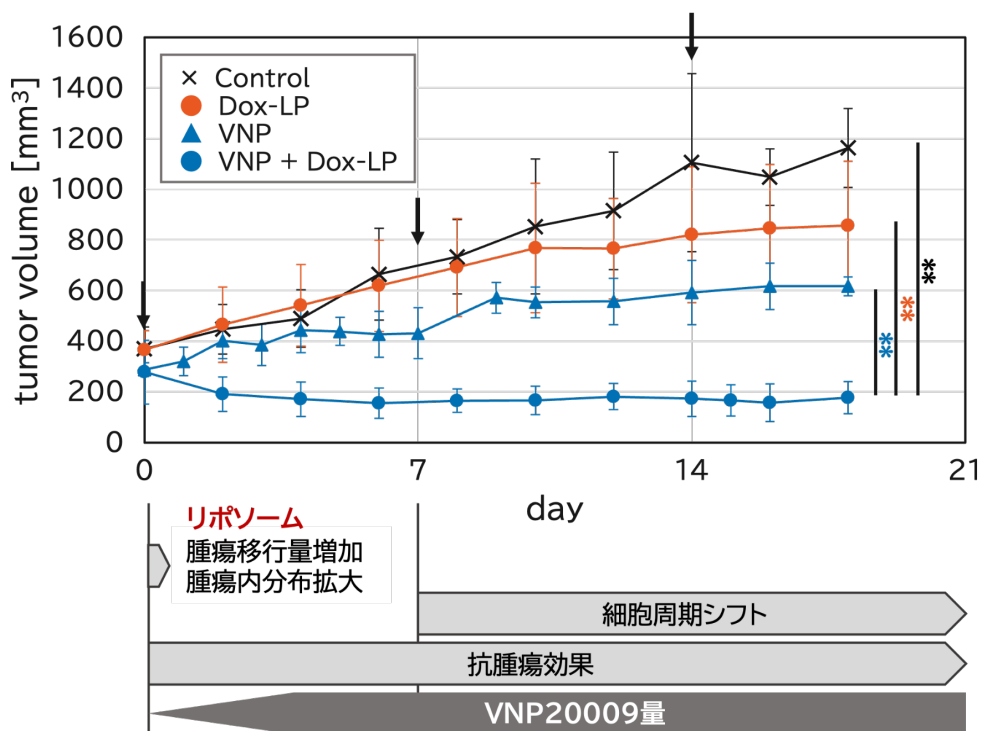


図 3.1 VNP20009単独またはDox-LPとの併用が腫瘍組織に与える影響

初回の投与直後からVNP20009とDox-LPの同時投与による併用群では腫瘍成長が抑制された。2.3のVNP20009の投与による細胞周期変化の検証においてがん細胞の細胞周期変化はVNP20009投与後1週間程度で生じた。VNP20009との同時投与後1日においてリポソームの腫瘍移行量および腫瘍内分布の改善が認められたことから、投与日または投与1日後には動態改善を受けたDox-LPによる抗腫瘍効果が発現していると想定される。VNP20009は投与2 h程度においては投与量の0.01%程度のみが腫瘍組織に存在するが、投与後1-3日で急速に増殖する。2.2の腫瘍組織観察の結果で観察されたように、投与3日後には腫瘍組織内にネクロシスエリアを形成する。

Dox-LP単独投与はA549およびBxPC3腫瘍のいずれにおいてもわずかに腫瘍成長を抑制し、この作用はBxPC3腫瘍よりもA549腫瘍のほうが大きかった（図2.4.2, 2.4.3）。序論でも述べた通り、BxPC3腫瘍は豊富な線維質を含む組織構造を有することから、Dox-LPの腫瘍内への拡散が難しいためにこの差が生じた可能性がある。実際、蛍光標識リポソームを用いた観察を行った際には、血管そのものはBxPC3腫瘍のほうがA549腫瘍よりも太く明瞭な構造を有していたものの、血管から離れた領域に拡散したリポソームはA549腫瘍のほうがBxPC3腫瘍よりも多く観察された（図3.2）。

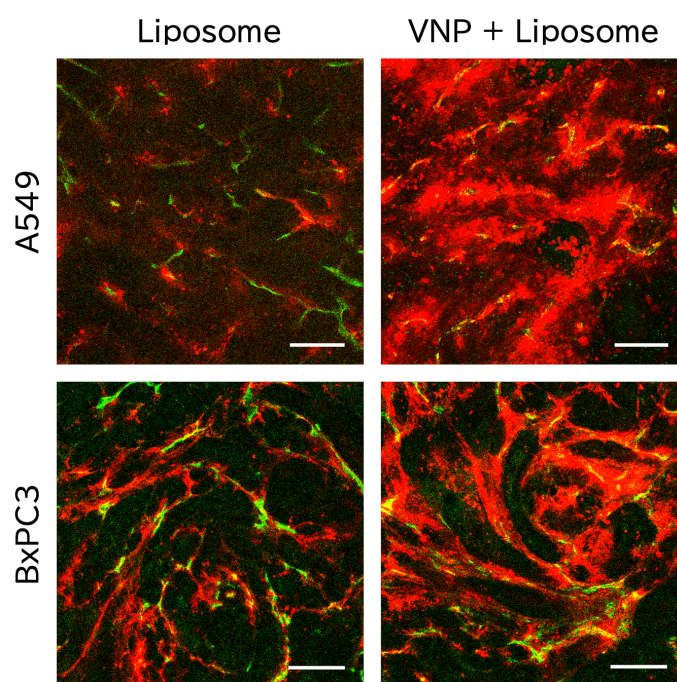


図 3.2 A549およびBxPC3腫瘍におけるリポソームの血管外への拡散

A549（上）またはBxPC3（下）腫瘍に対し、蛍光標識リポソーム単独（Liposome）あるいはVNP20009と同時投与（VNP + Liposome）した。投与1日後に腫瘍組織を回収し、CD31に対する蛍光免疫染色により血管を可視化した。特に蛍光標識リポソームの単独投与群の比較から、BxPC3腫瘍は太く明瞭な血管構造を有するもののほとんどのリポソームが血管近傍に局在した。他方、A549腫瘍はBxPC3よりも細かい不明瞭な血管が多く、多くのリポソームは血管外の腫瘍組織に拡散している様子が観察された。スケールバーは1 mmを表す。緑：CD31（血管内皮細胞）、赤：DiD（蛍光標識リポソーム）

また、VNP20009単独投与は同じ投与菌体数においてもDox-LPとの併用投与と比較して腫瘍成長抑制効果は小さかった（**図2.4.2, 2.4.3**）。この結果は、従来のバクテリア単独では治療効果が得られなかった投与量においても、リポソーム製剤と併用することで強力な治療効果が得られる可能性を示すものである。Dox-LPとの併用投与に関しては 5×10^4 CFUのVNP20009を単回投与で用いた場合においても 5×10^5 CFUのVNP20009を複数回あるいは単回投与で用いた場合と同等の抗腫瘍効果を示しており、より少ない投与量においても同様の結果が得られる可能性が高い（**図2.4.6a**）。今後は、Dox-LPに関してもより低用量で用いた際に同様の治療効果が得られるかどうか検証を行う予定である。

リポソームに封入されていないドキシソルピシンとVNP20009の併用投与においては、Dox-LPを使用した際に得られたような強力な腫瘍成長抑制効果は認められず、VNP20009単独投与とほぼ同等の効果を示した（**図2.4.4**）。諸言で述べた通り、非封入のドキシソルピシンを含む低分子医薬品は血中滞留性が低く生体内における半減期が短い。マウスモデルにおける半減期はDox-LPが15-20 hであるのに対し、ドキシソルピシンの半減期は5 min程度と報告されている（120, 121）。したがって非封入のドキシソルピシンに関してはVNP20009の投与による血流増加に乗じた腫瘍への移行は投与後十数分程度のごく短時間の現象に限定される。上述したようにDox-LPは血中滞留性を有することから、VNP20009の投与後24 h程度持続する血流増加の効果を受け続けることが可能である。以上のことから、VNP20009の投与による動態改善を介した抗腫瘍効果の増強には併用する薬剤の血中滞留性が必要であり、薬剤のリポソーム化は治療効果の向上そのものに重要な条件であることが明らかとなった。VNP20009の投与による血流増加および血管透過性の亢進は全身性に生じるため、Dox-LPの正常組織への移行増加による副作用の発現が懸念されたが、VNP20009との同時投与後24 hにおいて、蛍光標識リポソームの正常組織への移行量の増加は観察されなかった（**図2.2.2**）。Yuharaらは赤痢菌破砕液の投与がTNF- α の増加を誘導し、赤痢菌破砕液の投与7時間および24時間後に投与した青色色素であるEvans Blueの脳への浸透性を向上させることを示した（122）。この結果は低分子医薬品などの分子量の小さい物質においてはTNF- α の増加に伴い正常組織への流入量が増加することを意味する。一方、諸言で述べた通り、腫瘍内血管は正常血管と比較して構造的に脆弱である（**図3.3**）（123）。VNP20009の投与による影響は組織非特異的に生じるが、VNP20009非投与においても脆弱な構造を有する腫瘍内血管は、正常血管よりも血管壁の開口部が大きくなりうる。VNP20009投与後の正常血管の観察を含むより詳細な検討が必要であるが、100 nm程度の粒子径を有するリポソームが血管外へ漏出しうる開口部が正常血管よりも腫瘍内血管に多く存在した可能性がある。以上のことから、薬剤のリポソーム化はVNP20009の投与による血流増加および血管透過性亢進が生じた条件下においても内包した薬剤の正常組織への移行を抑制し、副作用の低減に寄与することが示唆された。

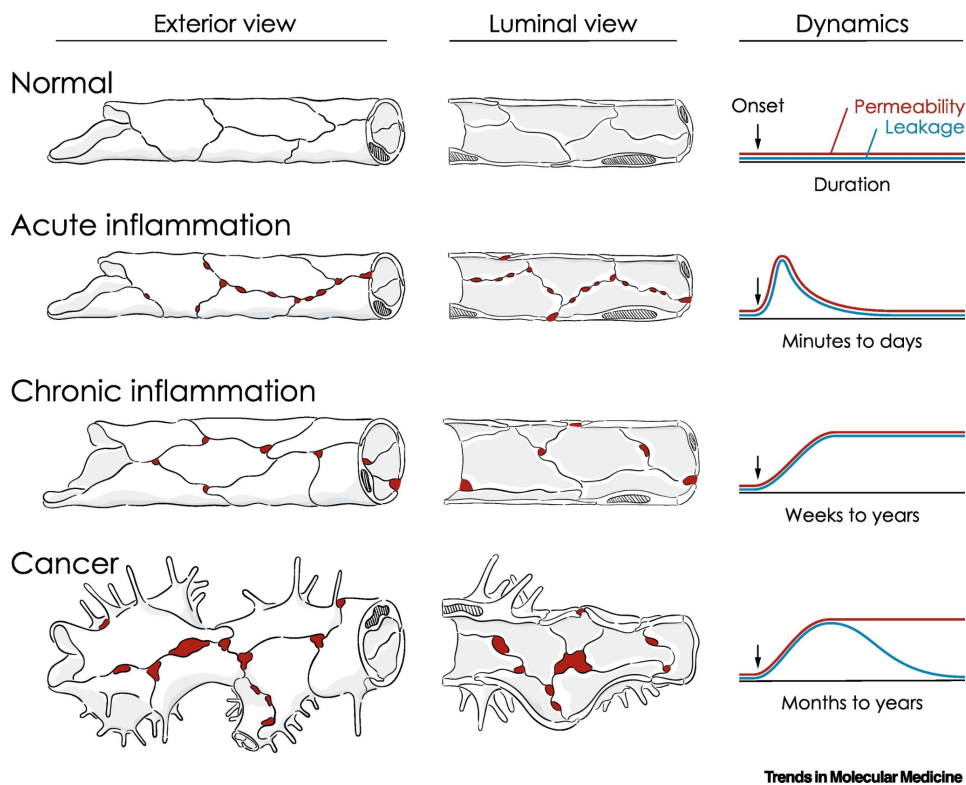


図 3.3 炎症時またはがんにおける血管構造と血管透過性 (123)

正常な血管では血管内皮細胞が密な構造を有していることに加えて血管平滑筋などによる裏打ちにより血管透過性および血管外への血液成分の漏出は低く制御されている。急性炎症では、局所的な内皮の間隙（赤色）が形成され、透過性が急速に上昇し、血液成分の血管外漏出が起こる。この間隙の形成は一過性で、炎症反応が終了するか不活性化されると血管は元に戻る。慢性炎症では、血管の形成および拡大、持続的な間隙の形成と血液成分の血管外漏出が反映され、血管構造のリモデリングが行われる。血管の変化は自然に治ることはないが、慢性的な状態を治療することで正常状態に戻すことが可能となる。がんでは過剰な血管新生が亢進し、発芽様の血管新生、血管内皮細胞の異常増殖、内皮接合部の欠陥などを伴う異常血管が形成され、血漿や赤血球の漏出を引き起こす。血管透過性の高さは持続するが、組織内間質液圧の上昇とともに血液成分の血管外漏出は減少する。(L Claesson-Welsh et al., *Trends Mol Med.*, 27(4):314-331 (2021))

VNP20009とDox-LPの併用による抗腫瘍効果において、VNP20009は大きく分けて(1) 静脈内投与に伴う炎症反応の誘導によるDox-LPの腫瘍移行性の向上、および(2) 腫瘍組織内における増殖に伴うがん細胞の細胞死の誘導 の2つを担うと考えられる。VNP20009は腫瘍組織内で増殖するため、投与量は(1) の効果を発揮する下限量で十分な治療効果を有する可能性が高い。バクテリアは正常組織においては腫瘍組織で認められるような爆発的な増殖はせず、数週間を要するものの徐々に排除される。また、治療効果の評価に用いた投与量である 5×10^5 CFUの10倍にあたる 10^6 CFU程度のVNP20009の投与においては正常組織内のバクテリア量が多い投与直後においても副作用は認められなかった。したがって、本研究で治療効果の評価に用いた 5×10^5 あるいは 5×10^4 CFUの投与量においては正常組織へのバクテリアの残留による副作用の懸念は小さく、 5×10^4 CFU のVNP20009を投与した場合の体重推移もコントロール群と同等であった (図2.4.6b)。一方、 5×10^5 CFUの100倍にあたる 10^7 CFU程度のVNP20009の投与においては投与数日後に投与マウスが死亡したとする報告もあることから、投与バクテリア量の低減が可能であることはリポソーム製剤との併用療法の大きな利点の一つであるとともに併用する薬剤種あるいは治療対象を拡大する際の重要な検討項目であると言える (106)。また、本研究においてはヒト腫瘍に近い組織構造を有する腫瘍に対する治療効果を評価する目的でヒト由来細胞を免疫不全マウス(胸腺欠損マウス)に移植した担がんモデルマウスを用いた。免疫不全マウスの使用は、腫瘍組織内におけるバクテリアの増殖に対する影響は比較的小さいと考えられる一方、獲得免疫由来の治療効果への影響は大きい。Westphalらは腫瘍中心部から増殖するバクテリアを好中球が囲い込むように集積することでバクテリアの増殖を妨げることを明らかにした (124)。好中球は胸腺の有無に依らず存在するため、いずれのマウスを用いた場合においても同等の作用が生じると考えられる。実際に、本研究で得られたVNP20009の腫瘍内におけるCFUは、マウス腫瘍を移植した免疫正常マウスにVNP20009を投与した場合と同等の値を示した (24, 92)。一方で、胸腺欠損の免疫不全マウスでは獲得免疫による治療効果は著しく低下する。獲得免疫の機能が欠損した状態で前述したような強力な抗腫瘍効果が得られていることから、VNP20009とリポソーム製剤の併用による抗腫瘍効果においてはVNP20009による抗腫瘍効果のうち、増殖に伴う栄養成分の消費やがん細胞に対する直接的な細胞死誘導、および自然免疫応答が強く関与しており、反対に、獲得免疫の関与は小さいことが示唆された。このことは、上述した細胞周期変化の寄与の小ささや、併用投与による抗腫瘍効果が投与直後から認められたこと、およびVNP20009は投与後1-3日において腫瘍内で急激に増殖し、その後腫瘍内CFUは頭打ちになることなどからも支持されうる (96)。従来のバクテリア単独によるがん治療においては獲得免疫の関与も重要であったことから、VNP20009とリポソーム製剤の併用はバクテリア自身の抗腫瘍効果のみに依存しない治療戦略として有望であると考えられる。加えて、バクテリアの実用化においてはバクテリアに起因する副作用の制御を目的として抗生物質の投与による処置が行われるが、治療効果が獲得免疫に大きく依存している場合、十分な免疫応答、すなわち治療効果の発現と副作用の発現のタイミングを見極めることが難しく、治療効果

の発現前に抗生物質を投与してしまうことでがんの再増殖が生じることが課題の一つであった。これに対し、VNP20009とDox-LPの併用投与においては投与直後から顕著に腫瘍成長の抑制が生じたことから、抗生物質の投与も柔軟に適用可能である可能性が高いなど、実用化においても利点の多い治療戦略であると言える。

結論

本研究では、異なる腫瘍組織構造を有する複数のがんを用い、バクテリアの投与によるリポソーム製剤の動態改善効果の検証と両者の併用のがん治療における有用性の検証を目的とした。

本研究で得られた知見を以下にまとめる。

通性嫌気性の *Salmonella Typhimurium* の弱毒化株である VNP20009 は、ヒト神経膠芽腫由来 U87MG 細胞・ヒト肺癌由来 A549 細胞・ヒト膵臓癌由来 BxPC3 細胞それぞれを用いて作成した担がんモデルマウスのいずれに対しても 10^9 CFU/g tumor 程度の高い生着および増殖能を示した。特に、BxPC3 細胞を移植することで得られる腫瘍組織はヒト腫瘍に類似した組織構造を形成することから、VNP20009 を用いたリポソーム製剤との併用療法はヒト腫瘍を含む広範な腫瘍に対して評価可能であることが示唆された。

VNP20009 とリポソーム製剤の同時投与によって、比較的反リポソーム製剤の移行が難しいがん種においてリポソーム製剤の腫瘍移行量が有意に増加し、腫瘍内分布範囲が拡大した。また、比較的反リポソーム製剤が移行しやすいがん種においては移行量の増加はわずかであったが、腫瘍内分布範囲は拡大した。リポソーム製剤単独ではいずれの腫瘍においても腫瘍組織内部への拡散は少なかったことから、がん種による差異はあるものの VNP20009 との併用はリポソーム製剤の動態を改善させることが明らかとなった。

VNP20009 の投与は、腫瘍組織内部において S/G2/M 期の細胞の割合を増加させることが示された。腫瘍中心部のがん細胞はほとんどが静止期である G1/G0 期である一方、VNP20009 の投与を行った担がんモデルマウスの腫瘍においては投与後約 1 週間において S/G2/M 期の細胞が約 10% 増加した。腫瘍組織辺縁部においては S/G2/M 期の細胞の割合は変化しなかったことから、細胞周期の変化には VNP20009 とがん細胞の直接的な接触が必要であることが示唆された。

VNP20009 と抗がん剤封入リポソーム製剤の併用は、それぞれの単剤と比較して強力な抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。併用投与群においては投与直後から腫瘍成長の抑制効果が認められ、単回投与においても約 3 週間にわたって腫瘍の再増殖は生じなかった。VNP20009 の投与量を 1/10 に減らした場合においても同等の抗腫瘍効果が得られた。また、非封入の抗がん剤と VNP20009 を併用した場合には抗腫瘍効果が小さかったことから、VNP20009 との併用による動態改善を介した治療効果の向上にはリポソーム製剤の使用が有効であることが示唆された。

VNP20009とリポソーム製剤の併用は、腫瘍組織内において薬剤の拡散を妨げる要因となる線維質を豊富に有するがん種を含む複数のがんに対し、獲得免疫非依存的に強力な抗腫瘍効果を示した。この結果はがんを標的とするリポソーム製剤およびバクテリアのいずれにおいても新たなアプローチであり、双方の利用可能性を大きく拡大させるものである。特に、バクテリアの実用化に際してはヒトにおける治療に十分な免疫誘導を副作用の低減と両立する必要があったが、リポソーム製剤との併用によってこの問題が根本的に回避される意義は大きい。また、バクテリアとリポソーム製剤を独立して使用するため、特に既に開発が進んでいる様々なリポソーム製剤を用いることで多様ながんへの応用も可能であると考えられる。

以上の結果から、VNP20009とリポソーム製剤の併用はがん治療において有用な治療戦略であることが示唆された。

実験方法

1. 試薬

Alexa Fluor 488 Goat anti-armenian hamster IgG	Jackson immuno research/127-545-160
anti-mouse CD31 antibody	Thermo Fisher Scientific/MA3105
Bacto Tryptone	Becton, Dickinson and Company/211705
Bacto Yeast Extract	Becton, Dickinson and Company/212750
Bacto Agar	Becton, Dickinson and Company/214010
Blasticidin S	和光純薬株式会社/029-18701
BSA	和光純薬株式会社/012-15113
CELLBANKER 1plus	NIPPON ZENYAKU工業/CB023
Cholesterol	ナカライテスク株式会社/08721-62
DOPC	NOF/MC-8181
Dox-LP	持田製薬/ドキシル注20 mg
Entellan® new	Sigma-Aldrich/107961
MEM	ナカライテスク株式会社/21442-25
MEM非必須アミノ酸溶液	ナカライテスク株式会社/06344-56
mPEG(2000)-DSPE	Laysan Bio Inc.
Ham's F-12	ナカライテスク株式会社/17458-65
HBSS	ナカライテスク株式会社/09735-75
HEPES	ナカライテスク株式会社/17514-15
Hoechst33342	chemodex/B0030
Lipofectamine 3000	Thermo Fisher Scientific/L3000015
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific/11668027
OCT compound	サクラファインテックジャパン株式会社/45833
Opti-MEM	gibco/31985062
PBS (-)	ナカライテスク株式会社/14249-24
ProLongDiamond	Thermo Fisher Scientific/P36961
ProLongDiamond with DAPI	Thermo Fisher Scientific/P36962
RPMI-1640	ナカライテスク株式会社/30264-56
tFucci(CA)5	addgene/153521
Tryple™ Express Enzyme	gibco/12605-028
アンピシリンナトリウム	ナカライテスク株式会社/02739-74
イソフルラン	Pfizer Inc.
イソプロピルアルコール	和光純薬株式会社/166-04836
イソペンタン	ナカライテスク株式会社/26404-75

エタノール	ナカライテスク株式会社/14713-95
塩化ナトリウム	ナカライテスク株式会社/31333-45
カナマイシン	ナカライテスク株式会社/19839-44
カルベニシリンナトリウム	ナカライテスク株式会社/07129-14
キシレン	ナカライテスク株式会社/36612-93
グリセロール	和光純薬株式会社/075-00616
スクロース	ナカライテスク株式会社/30404-45
生理食塩水	大塚製薬株式会社/生理食塩液 250 mL
ドキシソルビシン塩酸塩	和光純薬株式会社/046-21523
ドデシル硫酸ナトリウム	和光純薬株式会社/191-07145
パラホルムアルデヒド	和光純薬株式会社/162-16065
100 mMピルビン酸ナトリウム溶液	ナカライテスク株式会社/06977-34
ペニシリン/ストレプトマイシン	ナカライテスク株式会社/26253-84
ヘパリンナトリウム	持田製薬株式会社/ヘパリンNa注5千単位/5 mL

2. 試薬組成

LB培地

1% Bacto Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 1% NaCl

オートクレーブ後必要に応じてカルベニシリンまたはカナマイシンを最終濃度 25-50 µg/mLとなるように加え、冷蔵 (4°C) 保存した。

LB寒天培地

1% Bacto Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 1% NaCl, 1.5% Agar

オートクレーブ後必要に応じてカルベニシリンまたはカナマイシンを最終濃度 25-50 µg/mLとなるように加え、15 mLずつ10 cmシャーレに分注した後冷蔵 (4°C) 保存した。

Modified-LB培地

1% Bacto Tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.002N CaCl₂, 0.002N MgSO₄, pH 7.0

オートクレーブ後15 mLずつ10 cmシャーレに分注し、室温保存した。

Modified-LB寒天培地

1% Bacto Tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.002N CaCl₂, 0.002N MgSO₄, pH 7.0

オートクレーブ後15 mLずつ10 cmシャーレに分注し、冷蔵 (4°C) 保存した。

20 mM HEPES

HEPES 476.6 mgを100 mLのDDWに溶解し、pHを7.6に調整し、常温で保存した。

3. 機器

CO ₂ インキュベーター	三洋電機株式会社/MCO-18AIC(UV)
CO ₂ インキュベーター	三洋電機株式会社/MCO-17A1C
pHメーター	HORIBA/LAQUA F-71
Zetasizer nano ZSP	Malvern Panalytical
安全キャビネット	日本エアーテック株式会社/BHC-T700IIA1
安全キャビネット	日本エアーテック株式会社/KBB-1914LS
インキュベーター (プレート用)	三洋電機株式会社/SIB-35
インキュベーター (プレート用)	ヤマト科学株式会社/IC400
インキュベーター (振盪用)	タイテック株式会社/BR-23FP
オートクレーブ	HIRAYAMA/HICLAVE HG-80
オートピペッター	Drummond/Pipet-Aid XP
吸光度計	Biochrom Ltd./Biowave CO8000
共焦点レーザー顕微鏡	Carl Zeiss AG/LSM710
クライオスタット	Thermo Fisher Scientific/CRYOSTAR NX
70	
クリーンベンチ	三洋電機株式会社/MCV-710ATS
クリーンベンチ	三洋電機株式会社/MCV-B131F
クリーンベンチ	三洋電機株式会社/MCV-B91F
蛍光顕微鏡	KEYENCE/BZ-X710
光学顕微鏡	Leica Camera AG/DM IL LED
水浴	タイテック株式会社/SO mini N
スライドスキャナー	Leica Biosystems/SCN400
精密天秤	ザルトリウス/CPA2202S-DS
精密天秤	ザルトリウス/MSU224S-000-DU
セルカウンター	invitrogen/Countess
セルソーター	SONY/SH800S
全自動振動刃マイクロトーム	Leica Camera AG/VT1200 S
卓上遠心機	Thermo Fisher Scientific/LEGEND X1R
卓上遠心機	GeneReach/cubee
超純水装置	Merck/MilliQ Q-POD1 Z00Q0V0JP Elix
電子天秤	A&D Company/FX-1200i WP
バイオメディカルフリーザー	Panasonic/MDF-U538D-PJ
バイオメディカルフリーザー	三洋電機株式会社/MDF-U538D
バス型ソニケーター	Fine/FU-3H
ハンディマイクロホモジナイザー	株式会社マイクロテック・ニチオン/NS-310E3
ビーズ式ホモジナイザー	エムエス機器株式会社/Minilys

微量高速冷却遠心機	株式会社トミー精工/MX-307
微量分光光度計	GE Healthcare/nanoVue
ボルテックスミキサー	Scientific Industries/VORTEX-GENIE 2
マイクロプレートリーダー	Molecular Devices/SPECTRA MAX
GEMINI EM	
薬用冷蔵ショーケース	Panasonic/MPR-514-PJ
冷凍庫	日本フリーザー株式会社/CLN-32UW

4. 実験操作

細菌、細胞、マウス

弱毒化 *Salmonella Typhimurium* VNP20009はATCC (202165) より購入した。BALB/c nu/nuマウス (4週齢または7週齢) は日本エスエルシーより購入した。

腫瘍組織内におけるVNP20009の検出

U87MG細胞、A549細胞およびBxPC3細胞を皮下に移植することで作製した担がんモデルマウスを用い、腫瘍の体積が200-400 mm³に達した時点で2-4 × 10⁶ CFUのVNP20009をイソフルラン麻酔下において29G針付シリンジを用いてマウス尾静脈内より投与した。VNP20009の投与後任意の日数で腫瘍組織を回収し、湿重量を測定した。100 mg wet tissue/mL の濃度となるように生理食塩水を加え、ハンディマイクロホモジナイザーを用いて組織を破碎した。得られた組織破碎液を生理食塩水を用いて任意の濃度に希釈し、Modified-LB寒天培地上に塗布した。37°C、O/Nの条件でインキュベーションし、CFUを測定した。

VNP20009の培養

VNP20009はModified-LB培地を用い、37°C、130 rpmの条件で定常期に至るまで16-18時間培養した。定常期の菌体培養液を20倍希釈した後再度37°C、130 rpmの条件で培養し、菌体数の指標となる光学密度 (OD600) が0.5-0.7に達した時点でVNP20009培養液10 mLを回収した。遠心 (r.t., 8,000 ×g, 3 min) し、上清を除去した後得られたペレットを生理食塩水10 mLを用いて再懸濁することで洗浄を行った。同様の操作を再度繰り返した後、生理食塩水10 mLに再懸濁した。リポソームの移行量測定および腫瘍組織内分布観察においては得られたVNP20009懸濁液を生理食塩水を用いて10倍希釈したものを投与サンプルとした (2-4 × 10⁶ CFU/mouse)。抗腫瘍効果の評価においては得られたVNP20009懸濁液を50倍または100倍希釈したものを投与サンプルとした (5 × 10⁵、5 × 10⁴ CFU/mouse)。各投与サンプルを生理食塩水を用いて任意の濃度に希釈し、100 μLをmodified-LB寒天培地に塗布したものを37°C、O/Nの条件でインキュベーションし、各投与サンプルのCFUを測定した。

細胞培養

ヒト神経膠芽腫由来U87MG 細胞はMEMを培地として、100U/mL ペニシリン、および100 ng/mL ストレプトマイシン、1%非必須アミノ酸、1%ピルビン酸を加えた培養液中で培養を行った。ヒト肺癌由来A549細胞はHam's F-12、ヒト膵臓癌由来BxPC3細胞はRPMI-1640を培地として、10%FBS、100U/mL ペニシリン、および100 ng/mL ストレプトマイシンを加えた培養液中で培養を行った。全ての細胞は、5% CO₂、95%水蒸気下、37°Cで培養した。凍結された細胞ストックを37°Cの水浴中で素早く溶かし、培養液9 mLに添加した後に遠心操作 (r.t., 1,000 rpm, 3 min) を行なった。その後、上清を除去後に沈殿した細胞を1 mLの培養液に懸濁し、10 mLの培養液を含む10-cm dish (Falcon / 353003) に播種した。継代は、80~90%コンフルエントになった際に、Tryple™ Express Enzyme 1 mL で剥離させた細胞を9 mLの培地に添加した後に遠心操作 (r.t., 1,000 rpm, 3 min) を行い、細胞を計数した後に適当な濃度で再播種を行った。

がんマウスの作製

各細胞を上記に従って培養し、移植の3-4日前に15-cm dish (Greiner bio-one / 188271-013) を用いて大量培養した。Tryple™ Express Enzymeを用いて細胞を回収し、細胞を計数した後に遠心 (r.t., 1,000 rpm, 3 min) し、 $3-4 \times 10^6$ cells/80 μ LとなるようにHBSSに再懸濁した。細胞懸濁液はon iceで保存し、回収してから可能な限り素早くイソフルラン麻酔下のBALB/cSlc-nu/nuの左背部皮下に27G注射針を用いて細胞懸濁液80 μ Lを移植した。全ての細胞の移植には雄性のマウスを用いた。

蛍光標識リポソームの作製

15 mLコニカルチューブ (Falcon / 352095) に20 mM HEPES緩衝液を1.2 mL添加した(1)。5 mLチューブに20 mM DOPC、20 mM Cholesterol、10 mM mPEG (2000)-DSPEのエタノール溶液をモル比60/40/5となるように添加した。そこに、1 mM DiDのエタノール溶液250 μ Lを添加し、イソプロピルアルコールで全量を1 mLとした溶液を調製した(2)。1をボルテックスミキサーで攪拌しながら2を全量添加し、30 sec攪拌し続けた後にPBS (-) 1 mLを滴下した。全量をAmiconUltra-15 (Millipore / MWCO 100,000) に移し、限外濾過によりエタノールおよびイソプロピルアルコールの除去、バッファ交換、濃縮を行った。最後に適当な容積にPBS (-) を用いてメスアップした。リポソームの粒子径、Polydispersity Index および電位は、Zetasizer nano ZSPを用いて測定した。

リポソームの組織移行量測定

DiD標識したリポソームを、各がん細胞の担がんマウスに表記の投与量で静脈内投与した。投与から24時間後、イソフルラン麻酔下で各組織を回収し、湿重量を測定した後全量をチュ

ープに回収した。100 mg wet tissue/mL の濃度となるように生理食塩水を加え、ハンディマイクロホモジナイザーを用いて組織を破碎した。腫瘍、肝臓および腎臓については組織破碎液および2%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液をTissue grinding CKMix50-R (エムエス機器株式会社、P000922-LYSK0-A) に等量添加し、ビーズ式ホモジナイザーを用いて、5,000 rpm, 20 secの条件で攪拌した。肺、心臓および脾臓については組織破碎液200 μ Lおよび2%SDS溶液 800 μ Lを用いて同様の処理を行った。全組織について、DiD標識リポソーム非投与マウスから各組織を回収し、測定サンプルと同様に破碎した後、任意量のDiD標識リポソームと混合することで検量線サンプルを作製した。全てのサンプルを遠心操作 (4°C, 10,000 $\times g$, 10 min) 後、それぞれ上清 200 μ L を 96-well Sterilin Microtiter Plate Black (フナコシ、611F96BK) に移し、マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した。

測定条件は以下に示す。

Excitation wavelength: 648 nm

Emission wavelength: 670 nm

Cutoff: 665 nm

Temperature: r.t.

C. Speed: Normal

Reas Well: 6/well

リポソームの腫瘍内分布評価 (固定組織切片)

DiD標識したリポソームを、各がん細胞の担がんマウスに表記の投与量で静脈内投与した。投与から24時間後、イソフルラン麻酔下で各組織を回収し、4% パラホルムアルデヒド (PFA) 溶液を用いて4°C、O/Nの条件で組織を浸透固定した。固定した組織を全自動振動刃ミクロトームを用いて300 μ m厚に薄切し、1.5%BSA溶液を用いてr.t., 1 h、遮光下の条件でブロッキングした。10 μ g/mL anti-mouse CD31 antibodyおよび15 μ g/mL Alexa Fluor 488 Goat anti-american hamster IgGを添加した1.5%BSA溶液を用いてr.t., 1 h、遮光下の条件で染色を行った。その後、10 μ g/mL Hoechst33342 を添加したPBS (-) 溶液を用いてr.t., 30 min、遮光下の条件で核染色を行った。PBS (-) を用いてr.t., 5 min、遮光下の条件で洗浄操作を計2回行い、カバーガラスを用いて組織切片を固定したうえで共焦点顕微鏡を用いた観察を行った。

トリクローム染色による腫瘍組織内線維構造の観察

皮下移植したBxPC3腫瘍内の線維構造の観察を行った。皮下移植した腫瘍が200-400 mm³に達した時点で腫瘍組織を回収し、細胞周期評価用サンプルの調製 (凍結切片) と同様の方法で腫瘍組織をOCT compound中に包埋した。クライオスタットを用いて厚さ3-4 μ mの凍結切片を作製し、スライドガラスに張り付けた後、PBS (-) で2回洗浄した。その後、

トリクローム染色キット (abcam/ab150686) を用いて細胞核 (Weigert's Iron Hematoxylin) ・細胞質 (Biebrich Scarlet/Acid Fuchsin Solution) ・線維組織 (Aniline Blue Solution) の染色を行った。封入剤として Entellan new (Sigma-Aldrich, 107961) を用い、カバーガラス (松浪硝子工業株式会社, C025601) で覆った後観察まで室温、遮光下で保存した。観察にはスライドスキャナー SCN400を用いた。

抗腫瘍効果の評価

皮下移植したA549腫瘍およびBxPC3腫瘍に対して抗腫瘍効果の評価を行った。皮下移植した腫瘍が200-400 mm³に達した時点で投与を開始した。VNP20009は $3-5 \times 10^5$ CFU/mouseまたは 5×10^4 CFU/mouseの投与量で投与した。非封入ドキシソルピシンおよびDox-LPは5 mg/kgの投与量で投与した。投与はイソフルラン麻酔下で実施し、1回または1週間おきに計3回行った。1日おきに腫瘍径および体重の測定を行った。

トランスフェクション試薬を用いたFUCCI導入細胞の作製

トランスフェクションの 24 h 前に、任意のがん細胞を 3×10^5 cells/well で 6-well plate (CORNING/353046) に播種した。任意のプラスミドDNA 濃度となるように tFucci(CA)5をOpti-MEMで希釈し、Lipofectamine 3000またはLipofectamine 2000)の手順に従いトランスフェクションを行った。トランスフェクションから1日後に蛍光顕微鏡を用いて蛍光の発現を確認し、培養液の交換を行った。培養液の交換から1日後より2-10 μ g/mL Blasticidin Sを添加した培養液中での培養を2週間行った。Blasticidin Sを含まない培養液に交換し、細胞の増殖が観察された時点でセルソーターを用いてFucci-green (h2-3) を対象としてシングルセルソーティングを行った。FSC Heightに対しFSC Areaをプロットすることでダブレットを除いた。Fucci-greenは488 nm laserを用いて励起し、FL2 (525/50) のフィルターを使用して検出した。得られたクローンを用いてFucci-greenおよびFucci-redの蛍光の発現・細胞増殖・実験動物に移植した際の腫瘍成長速度を評価し、以降の評価に用いるクローンを選択した。

バクテリア投与による細胞周期変化の評価

FUCCI導入がん細胞を皮下移植した担がんモデルマウスを用い、in vivoにおいてバクテリアを投与した際の腫瘍組織内のがん細胞の細胞周期変化を評価した。担がんモデルマウスは移植した腫瘍体積が200-300 mm³に達した時点で評価に用いた。同一マウスを用いて経時的な細胞周期変化を観察するため、FUCCIシステムにより発現する蛍光の観察には顕微内視鏡 (理化学研究所 生命機能科学研究センター 細胞機能評価研究チーム) を用いた。顕微内視鏡による観察はVNP20009投与1日前・1日後・5日後および8日後に行った。VNP20009の投与量は 5×10^5 CFU/mouseとし、マウス尾静脈内に29G針付シリンジを用いてイソフルラン麻酔下において投与した。VNP20009投与8日後において腫瘍組織

を回収し、4% PFA溶液を用いて4°C、O/Nの条件で組織を浸透固定した。固定後、必要に応じてOCT compoundを用いて凍結ブロックを作製した。

顕微内視鏡による細胞周期観察

イソフルラン麻酔下の担がんモデルマウス背部の皮下腫瘍組織を、縫合糸を用いて固定した。動画撮影を行った状態で、26G針を用いて指定した位置から光ファイバーを腫瘍組織に刺入した。光ファイバーの刺入はマウス体表面に対して垂直方向または水平方向に行った。顕微内視鏡には488 nmレーザーを搭載し、FUCCI導入細胞のうちS/G2/M期に含まれるがん細胞が発現する緑色蛍光であるh2-3 (Excitation wavelength: 506 nm, Emission wavelength: 516 nm) を観察した。

細胞周期評価用サンプルの調製 (非凍結組織)

固定した組織を全自動振動刃マイクロトーム (Leica, VT1200 S) を用いて300 μ m厚に薄切し、カバーガラスを用いて組織切片を固定した。

細胞周期評価用サンプルの調製 (凍結切片)

FUCCI導入がん細胞を用いて作製した担がんマウスから腫瘍組織を回収し、4°C、O/Nで4% PFA中に浸すことで浸透固定した。その後段階的に15%・20%・30%ショ糖溶液に浸すことで置換を行い、OCT compound中に包埋した。クライオスタットを用いて厚さ6-25 μ mの凍結切片を作製し、スライドガラス (松浪硝子工業株式会社、SMAS-01) に張り付けた。PBS (-) を用いてr.t., 5 min, 遮光下の条件で洗浄操作を計2回行った。封入剤としてProLong Diamondを用い、カバーガラス (松浪硝子工業株式会社、C025601) で覆った後観察まで4°C、遮光下で保存した。

共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察

作製した組織切片を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて以下の条件で観察した。また、必要に応じてTile scanおよびz-stack機能を用いた。解析にはZEISS ZEN (blue edition) を用いた。

LSM710 (Carl Zeiss)

Objective

Laser (30 mW 405 nm Diode Laser, 25/35 mW 458/488/514 nm Multi Ar Laser, 10 mW 561 nm DPSS Laser, 5 mW 633 nm HeNe Laser, Carl Zeiss)
main dichroic beam splitter (488/561/633, Carl Zeiss)

Filter Set (38, 43, 49, DIC, Carl Zeiss)

ドキソルビシンおよびDox-LP存在下でのバクテリアの増殖評価

VNP20009 20%グリセロールストック溶液10 μ Lをmodified-LB培地4 mL中に懸濁し、37°C、130 rpmの条件で定常期に至るまで16-18時間培養した。定常期の菌体培養液を20倍希釈し、菌体数の指標となる光学密度 (OD600)が0.5-0.7に達した時点でVNP20009培養液10 mLを回収した。遠心 (r.t., 8,000 \times g; 3 min) し、上清を除去した後得られたペレットを生理食塩水10 mLを用いて再懸濁することで洗浄を行った。同様の操作を再度繰り返した後、生理食塩水10 mLに再懸濁した。得られたVNP20009懸濁液を10倍希釈後、さらに5倍希釈した。in vivo実験において尾静脈内投与されたVNP20009の腫瘍到達率を想定し、 1×10^3 CFU VNP20009 / 4 mL modified-LB培地 (薬剤含有/非含有) となるようにVNP20009懸濁液を各培地に添加した。ドキソルビシンおよびDox-LPはin vivo実験におけるDox-LPの投与量である5 mg/kg (ドキソルビシン換算)のうち、0.1, 1, 5, 10%が腫瘍組織に移行した場合を想定し、0.5, 5, 25, 50 μ g ドキソルビシン /mL modified-LB となるようにそれぞれmodified-LB培地に添加した。VNP20009懸濁液を各薬剤含有/非含有modified-LB培地に添加後2, 6, 24 hにおける各培養液中のCFUを測定した。

謝辞

本研究を行う機会を与えて頂き、また適切なご指導、御鞭撻を賜りました、北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室 原島秀吉教授に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、適切な研究環境を提供していただくとともに適切なご指導を賜りました、理化学研究所 生命機能科学研究センター 分子送達・イメージング技術研究チーム 向井英史チームリーダーに深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、有益なる御助言を賜りました、北海道大学大学院 薬学研究院 薬剤分子設計学研究室 山田勇磨准教授、中村孝司助教、佐藤悠介助教に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、顕微内視鏡システムによる観察技術をご提供いただきました、理化学研究所 生命機能科学研究センター 細胞機能評価研究チーム 片岡洋祐チームリーダーならびに後藤俊志修士に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、遺伝子導入細胞の作製および評価に関して多大なるご協力を賜りました、徳島大学 先端研究推進センター 田原強准教授に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、楽しい研究環境を提供していただくとともに日頃から有意義な議論をしていただきました、理化学研究所 生命機能科学研究センター 分子送達・イメージング技術研究チーム 野村祥子博士、高橋麻衣子修士に深く感謝致します。

本論文を審査して頂きました、北海道大学大学院薬学研究院 生体分析化学研究室 小川美香子教授、高倉栄男講師に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、有益なる御助言を賜りました、理化学研究所 生命機能科学研究センター 分子送達・イメージング技術研究チームの皆様へ感謝致します。

本論文の執筆に際し、多大なる御助言を賜りました、理化学研究所 生命機能科学研究センター 神田元紀博士に深く感謝致します。

本論文の執筆に際し、有益な御助言を賜りました、奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 伊藤健史医師に深く感謝致します。

本研究の発表に際し、貴重なご意見を賜りました、北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室 木村誠悟修士に心より感謝致します。

有益な御助言を頂きました薬剤分子設計学研究室の諸先輩、同輩、後輩の皆様に感謝致します。

2021年2月 橋場(加藤) 月

参考文献

1. H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
2. P. Hainaut, A. Plymoth, Targeting the hallmarks of cancer: towards a rational approach to next-generation cancer therapy. *Curr. Opin. Oncol.* **25**, 50–51 (2013).
3. R. A. Burrell, N. McGranahan, J. Bartek, C. Swanton, The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature.* **501**, 338–345 (2013).
4. R. Fisher, L. Pusztai, C. Swanton, Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br. J. Cancer.* **108**, 479–485 (2013).
5. S. A. Hoption Cann, J. P. van Netten, C. van Netten, Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgrad. Med. J.* **79**, 672–680 (2003).
6. W. Busch, Einfluss von Erysipel. *Berliner Klin Wschr.* **3**, 245–246 (1866).
7. F. Fehleisen, *Die Aetiologie des Erysipels* (Theodor Fischer, 1883).
8. W. B. Coley, II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann. Surg.* **14**, 199–220 (1891).
9. W. B. Coley, The Treatment of Sarcoma of the Long Bones. *Ann. Surg.* **97**, 434–460 (1933).
10. R. L. Modlin, Innate immunity: ignored for decades, but not forgotten. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 882–886 (2012).
11. S. S. Hall, *A commotion in the blood : life, death, and the immune system* (Henry Holt, New York, 1997).
12. M. Sedighi, A. Zahedi Bialvaei, M. R. Hamblin, E. Ohadi, A. Asadi, M. Halajzadeh, V. Lohrasbi, N. Mohammadzadeh, T. Amiriani, M. Krutova, A. Amini, E. Kouhsari, Therapeutic bacteria to combat cancer; current advances, challenges, and opportunities. *Cancer Med.* **8**, 3167–3181 (2019).
13. P. Sarotra, B. Medhi, Use of Bacteria in Cancer Therapy. *Recent Results Cancer Res.* **209**, 111–121 (2016).

14. J.-J. Min, H.-J. Kim, J. H. Park, S. Moon, J. H. Jeong, Y.-J. Hong, K.-O. Cho, J. H. Nam, N. Kim, Y.-K. Park, H.-S. Bom, J. H. Rhee, H. E. Choy, Noninvasive real-time imaging of tumors and metastases using tumor-targeting light-emitting *Escherichia coli*. *Mol. Imaging Biol.* **10**, 54-61 (2008).
15. S.-N. Jiang, T. X. Phan, T.-K. Nam, V. H. Nguyen, H.-S. Kim, H.-S. Bom, H. E. Choy, Y. Hong, J.-J. Min, Inhibition of tumor growth and metastasis by a combination of *Escherichia coli*-mediated cytolytic therapy and radiotherapy. *Mol. Ther.* **18**, 635-642 (2010).
16. V. H. Nguyen, H.-S. Kim, J.-M. Ha, Y. Hong, H. E. Choy, J.-J. Min, Genetically engineered *Salmonella typhimurium* as an imageable therapeutic probe for cancer. *Cancer Res.* **70**, 18-23 (2010).
17. S.-N. Jiang, S.-H. Park, H. J. Lee, J. H. Zheng, H.-S. Kim, H.-S. Bom, Y. Hong, M. Szardenings, M. G. Shin, S.-C. Kim, V. Ntziachristos, H. E. Choy, J.-J. Min, Engineering of bacteria for the visualization of targeted delivery of a cytolytic anticancer agent. *Mol. Ther.* **21**, 1985-1995 (2013).
18. N. S. Forbes, L. L. Munn, D. Fukumura, R. K. Jain, Sparse initial entrapment of systemically injected *Salmonella typhimurium* leads to heterogeneous accumulation within tumors. *Cancer Res.* **63**, 5188-5193 (2003).
19. S. Leschner, K. Westphal, N. Dietrich, N. Viegas, J. Jablonska, M. Lyszkiewicz, S. Lienenklaus, W. Falk, N. Gekara, H. Loessner, S. Weiss, Tumor invasion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is accompanied by strong hemorrhage promoted by TNF-alpha. *PLoS One.* **4**, e6692 (2009).
20. R. W. Kasinskas, N. S. Forbes, *Salmonella typhimurium* lacking ribosome chemoreceptors localize in tumor quiescence and induce apoptosis. *Cancer Res.* **67**, 3201-3209 (2007).
21. R. W. Kasinskas, N. S. Forbes, *Salmonella typhimurium* specifically chemotax and proliferate in heterogeneous tumor tissue in vitro. *Biotecnol. Bioeng.* **94**, 710-721 (2006).
22. M. Zhao, M. Yang, X.-M. Li, P. Jiang, E. Baranov, S. Li, M. Xu, S. Penman, R. M. Hoffman, Tumor-targeting bacterial therapy with amino acid auxotrophs of GFP-expressing *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 755-760 (2005).
23. M. Sznol, S. L. Lin, D. Bermudes, L. M. Zheng, I. King, Use of preferentially replicating bacteria for the treatment of cancer. *J. Clin. Invest.*

- t.* **105**, 1027–1030 (2000).
24. C. Clairmont, K. C. Lee, J. Pike, M. Ittensohn, K. B. Low, J. Pawelek, D. Bermudes, S. M. Brecher, D. Margitich, J. Turnier, Z. Li, X. Luo, I. King, L. M. Zheng, Biodistribution and genetic stability of the novel antitumor agent VNP20009, a genetically modified strain of *Salmonella typhimurium*. *J. Infect. Dis.* **181**, 1996–2002 (2000).
 25. C.-H. Lee, C.-L. Wu, A.-L. Shiau, Endostatin gene therapy delivered by *Salmonella choleraesuis* in murine tumor models. *J. Gene Med.* **6**, 1382–1393 (2004).
 26. J. M. Pawelek, K. B. Low, D. Bermudes, Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector. *Cancer Res.* **57**, 4537–4544 (1997).
 27. T. S. Wallis, E. E. Galyov, Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol. Microbiol.* **36**, 997–1005 (2000).
 28. T. Danino, A. Prindle, J. Hasty, S. Bhatia, Measuring growth and gene expression dynamics of tumor-targeted *S. typhimurium* bacteria. *J. Vis. Exp.*, e50540 (2013).
 29. B. Beutler, A. Cerami, The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 625–655 (1989).
 30. M. A. Dobrovolskaia, S. N. Vogel, Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect.* **4**, 903–914 (2002).
 31. T. X. Phan, V. H. Nguyen, M. T.-Q. Duong, Y. Hong, H. E. Choy, J.-J. Min, Activation of inflammasome by attenuated *Salmonella typhimurium* in bacteria-mediated cancer therapy. *Microbiol. Immunol.* **59**, 664–675 (2015).
 32. N. D. Leigh, G. Bian, X. Ding, H. Liu, S. Aygun-Sunar, L. G. Burdelya, A. V. Gudkov, X. Cao, A flagellin-derived toll-like receptor 5 agonist stimulates cytotoxic lymphocyte-mediated tumor immunity. *PLoS One.* **9**, e85587 (2014).
 33. A. Kupz, R. Curtiss 3rd, S. Bedoui, R. A. Strugnell, In vivo IFN- γ secretion by NK cells in response to *Salmonella typhimurium* requires NLR4 inflammasomes. *PLoS One.* **9**, e97418 (2014).
 34. C. T. Nguyen, S. H. Hong, J.-I. Sin, H. V. D. Vu, K. Jeong, K. O. Cho, S. Uematsu, S. Akira, S. E. Lee, J. H. Rhee, Flagellin enhances tumor-specific CD8⁺ T cell immune responses through TLR5 stimulation in a therapeutic cancer vaccine model. *Vaccine.* **31**, 3879–3887 (2013).

35. L. Sfondrini, A. Rossini, D. Besusso, A. Merlo, E. Tagliabue, S. Mènard, A. Balsari, Antitumor activity of the TLR-5 ligand flagellin in mouse models of cancer. *J. Immunol.* **176**, 6624–6630 (2006).
36. Z. Cai, A. Sanchez, Z. Shi, T. Zhang, M. Liu, D. Zhang, Activation of Toll-like receptor 5 on breast cancer cells by flagellin suppresses cell proliferation and tumor growth. *Cancer Res.* **71**, 2466–2475 (2011).
37. F. Saccheri, C. Pozzi, F. Avogadri, S. Barozzi, M. Faretta, P. Fusi, M. Rescigno, Bacteria-induced gap junctions in tumors favor antigen cross-presentation and antitumor immunity. *Sci. Transl. Med.* **2**, 44ra57 (2010).
38. W.-W. Chang, C.-H. Lai, M.-C. Chen, C.-F. Liu, Y.-D. Kuan, S.-T. Lin, C.-H. Lee, Salmonella enhance chemosensitivity in tumor through connexin 43 upregulation. *Int. J. Cancer.* **133**, 1926–1935 (2013).
39. H.-C. Lin, C.-J. Yang, Y.-D. Kuan, W.-K. Wang, W.-W. Chang, C.-H. Lee, The inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 by connexin 43. *Int. J. Med. Sci.* **14**, 1181–1188 (2017).
40. G. A. Bacon, T. W. Burrows, M. Yates, The effects of biochemical mutation on the virulence of *Bacterium typhosum*; the loss of virulence of certain mutants. *Br. J. Exp. Pathol.* **32**, 85–96 (1951).
41. T. Chen, X. Zhao, Y. Ren, Y. Wang, X. Tang, P. Tian, H. Wang, H. Xin, Triptolide modulates tumour-colonisation and anti-tumour effect of a attenuated *Salmonella* encoding DNase I. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 929–939 (2019).
42. T. Chen, P. Tian, Z. Huang, X. Zhao, H. Wang, C. Xia, L. Wang, H. Wei, Engineered commensal bacteria prevent systemic inflammation-induced memory impairment and amyloidogenesis via producing GLP-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 7565–7575 (2018).
43. K. B. Low, M. Ittensohn, T. Le, J. Platt, S. Sodi, M. Amoss, O. Ash, E. Carmichael, A. Chakraborty, J. Fischer, S. L. Lin, X. Luo, S. I. Miller, L. Zheng, I. King, J. M. Pawelek, D. Bermudes, Lipid A mutant *Salmonella* with suppressed virulence and TNF α induction retain tumor-targeting in vivo. *Nat. Biotechnol.* **17**, 37–41 (1999).
44. J. F. Toso, V. J. Gill, P. Hwu, F. M. Marincola, N. P. Restifo, D. J. Schwartzentruber, R. M. Sherry, S. L. Topalian, J. C. Yang, F. Stock, L. J. Freezer, K. E. Morton, C. Seipp, L. Haworth, S. Mavroukakis, D. White, S. MacDonald, J. Mao, M. Sznol, S. A. Rosenberg, Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella typhimurium* to patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **20**, 142–152

- (2002).
45. D. M. Heimann, S. A. Rosenberg, Continuous intravenous administration of live genetically modified salmonella typhimurium in patients with metastatic melanoma. *J. Immunother.* **26** (2003), pp. 179–180.
 46. J. Nemunaitis, C. Cunningham, N. Senzer, J. Kuhn, J. Cramm, C. Litz, R. Cavagnolo, A. Cahill, C. Clairmont, M. Sznol, Pilot trial of genetically modified, attenuated Salmonella expressing the E. coli cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. *Cancer Gene Ther.* **10**, 737–744 (2003).
 47. G. L. Rosano, E. A. Ceccarelli, Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Front. Microbiol.* **5**, 172 (2014).
 48. J. H. Zheng, V. H. Nguyen, S.-N. Jiang, S.-H. Park, W. Tan, S. H. Hong, M. G. Shin, I.-J. Chung, Y. Hong, H.-S. Bom, H. E. Choy, S. E. Lee, J. H. Rhee, J.-J. Min, Two-step enhanced cancer immunotherapy with engineered Salmonella typhimurium secreting heterologous flagellin. *Sci. Transl. Med.* **9** (2017), doi:10.1126/scitranslmed.aak9537.
 49. A. Uchugonova, M. Zhao, Y. Zhang, M. Weinigel, K. König, R. M. Hoffman, Cancer-cell killing by engineered Salmonella imaged by multiphoton tomography in live mice. *Anticancer Res.* **32**, 4331–4337 (2012).
 50. M. Loeffler, G. Le'Negrate, M. Krajewska, J. C. Reed, Salmonella typhimurium engineered to produce CCL21 inhibit tumor growth. *Cancer Immunol. Immunother.* **58**, 769–775 (2009).
 51. W. Yoon, Y. C. Park, J. Kim, Y. S. Chae, J. H. Byeon, S.-H. Min, S. Park, Y. Yoo, Y. K. Park, B. M. Kim, Application of genetically engineered Salmonella typhimurium for interferon-gamma-induced therapy against melanoma. *Eur. J. Cancer.* **70**, 48–61 (2017).
 52. C. R. Gurbatri, I. Lia, R. Vincent, C. Coker, S. Castro, P. M. Treuting, T. E. Hinchliffe, N. Arpaia, T. Danino, Engineered probiotics for local tumor delivery of checkpoint blockade nanobodies. *Sci. Transl. Med.* **12** (2020), doi:10.1126/scitranslmed.aax0876.
 53. V. Shahabi, M. Reyes-Reyes, A. Wallecha, S. Rivera, Y. Paterson, P. Maciag, Development of a Listeria monocytogenes based vaccine against prostate cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **57**, 1301–1313 (2008).
 54. R. Hannan, H. Zhang, A. Wallecha, R. Singh, L. Liu, P. Cohen, A. Alfi

- eri, J. Rothman, C. Guha, Combined immunotherapy with *Listeria monocytogenes*-based PSA vaccine and radiation therapy leads to a therapeutic response in a murine model of prostate cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **61**, 2227–2238 (2012).
55. X. Wu, S. Wang, M. Li, A. Wang, Y. Zhou, P. Li, Y. Wang, Nanocarriers for TRAIL delivery: driving TRAIL back on track for cancer therapy. *Nanoscale.* **9**, 13879–13904 (2017).
 56. S. Ganai, R. B. Arenas, N. S. Forbes, Tumour-targeted delivery of TRAIL using *Salmonella typhimurium* enhances breast cancer survival in mice. *Br. J. Cancer.* **101**, 1683–1691 (2009).
 57. C. Nagakura, K. Hayashi, M. Zhao, K. Yamauchi, N. Yamamoto, H. Tsuchiya, K. Tomita, M. Bouvet, R. M. Hoffman, Efficacy of a genetically modified *Salmonella typhimurium* in an orthotopic human pancreatic cancer in nude mice. *Anticancer Res.* **29**, 1873–1878 (2009).
 58. H.-D. Cao, Y.-X. Yang, L. Lü, S.-N. Liu, P.-L. Wang, X.-H. Tao, L.-J. Wang, T.-X. Xiang, Attenuated *Salmonella typhimurium* carrying TRAIL and VP3 genes inhibits the growth of gastric cancer cells in vitro and in vivo. *Tumori.* **96**, 296–303 (2010).
 59. W. S. Yoon, Y. S. Chae, J. Hong, Y. K. Park, Antitumor therapeutic effects of a genetically engineered *Salmonella typhimurium* harboring TNF- α in mice. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 1807–1819 (2011).
 60. C.-M. Cheng, Y.-L. Lu, K.-H. Chuang, W.-C. Hung, J. Shiea, Y.-C. Su, C.-H. Kao, B.-M. Chen, S. Roffler, T.-L. Cheng, Tumor-targeting produg-activating bacteria for cancer therapy. *Cancer Gene Ther.* **15**, 393–401 (2008).
 61. F. Friedlos, P. Lehouritis, L. Ogilvie, D. Hedley, L. Davies, D. Bermudes, I. King, J. Martin, R. Marais, C. J. Springer, Attenuated *Salmonella* targets prodrug activating enzyme carboxypeptidase G2 to mouse melanoma and human breast and colon carcinomas for effective suicide gene therapy. *Clin. Cancer Res.* **14**, 4259–4266 (2008).
 62. W. Tang, Y. He, S. Zhou, Y. Ma, G. Liu, A novel *Bifidobacterium infantis*-mediated TK/GCV suicide gene therapy system exhibits antitumor activity in a rat model of bladder cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **28**, 155 (2009).
 63. B. Liu, Y. Jiang, T. Dong, M. Zhao, J. Wu, L. Li, Y. Chu, S. She, H. Zhao, R. M. Hoffman, L. Jia, Blockage of autophagy pathway enhances *Salmonella* tumor-targeting. *Oncotarget.* **7**, 22873–22882 (2016).

64. Y.-F. Xu, L.-P. Zhu, B. Hu, G.-F. Fu, H.-Y. Zhang, J.-J. Wang, G.-X. Xu, A new expression plasmid in *Bifidobacterium longum* as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **14**, 151-157 (2007).
65. E. Berger, R. Soldati, N. Huebener, O. Hohn, A. Stermann, T. Durmus, S. Lobitz, A. C. Zenclussen, H. Christiansen, H. N. Lode, S. Fest, Salmonella SL7207 application is the most effective DNA vaccine delivery method for successful tumor eradication in a murine model for neuroblastoma. *Cancer Lett.* **331**, 167-173 (2013).
66. H. Jia, Y. Li, T. Zhao, X. Li, J. Hu, D. Yin, B. Guo, D. J. Kopecko, X. Zhao, L. Zhang, D. Q. Xu, Antitumor effects of Stat3-siRNA and endostatin combined therapies, delivered by attenuated Salmonella, on orthotopically implanted hepatocarcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **61**, 1977-1987 (2012).
67. E. R. Manuel, C. A. Blache, R. Paquette, T. I. Kaltcheva, H. Ishizaki, J. D. I. Ellenhorn, M. Hensel, L. Metelitsa, D. J. Diamond, Enhancement of cancer vaccine therapy by systemic delivery of a tumor-targeting Salmonella-based STAT3 shRNA suppresses the growth of established melanoma tumors. *Cancer Res.* **71**, 4183-4191 (2011).
68. C. A. Blache, E. R. Manuel, T. I. Kaltcheva, A. N. Wong, J. D. I. Ellenhorn, B. R. Blazar, D. J. Diamond, Systemic delivery of Salmonella typhimurium transformed with IDO shRNA enhances intratumoral vector colonization and suppresses tumor growth. *Cancer Res.* **72**, 6447-6456 (2012).
69. E. R. Manuel, J. Chen, M. D'Apuzzo, M. G. Lampa, T. I. Kaltcheva, C. B. Thompson, T. Ludwig, V. Chung, D. J. Diamond, Salmonella-Based Therapy Targeting Indoleamine 2,3-Dioxygenase Coupled with Enzymatic Depletion of Tumor Hyaluronan Induces Complete Regression of Aggressive Pancreatic Tumors. *Cancer Immunol Res.* **3**, 1096-1107 (2015).
70. R. K. Jain, Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science.* **307**, 58-62 (2005).
71. M. B. Schaaf, A. D. Garg, P. Agostinis, Defining the role of the tumor vasculature in antitumor immunity and immunotherapy. *Cell Death Dis.* **9**, 115 (2018).
72. J. I. Moss, H. Barjat, S.-A. Emmas, N. Strittmatter, J. Maynard, R. J. A. Goodwin, G. Storm, T. Lammers, S. Puri, M. B. Ashford, S. T. Barry, High-resolution 3D visualization of nanomedicine distribution in tumors. *Theranostics.* **10**, 880-897 (2020).

73. O. Thews, A. Riemann, Tumor pH and metastasis: a malignant processes beyond hypoxia. *Cancer Metastasis Rev.* **38**, 113–129 (2019).
74. M. R. Asgharzadeh, J. Barar, M. M. Pourseif, M. Eskandani, M. Jafari Niya, M. R. Mashayekhi, Y. Omid, Molecular machineries of pH dysregulation in tumor microenvironment: potential targets for cancer therapy. *Bioimpacts.* **7**, 115–133 (2017).
75. S. Xie, L. Zhao, X. Song, M. Tang, C. Mo, X. Li, Doxorubicin-conjugated Escherichia coli Nissle 1917 swimmers to achieve tumor targeting and responsive drug release. *J. Control. Release.* **268**, 390–399 (2017).
76. S. Xie, M. Chen, X. Song, Z. Zhang, Z. Zhang, Z. Chen, X. Li, Bacterial microbots for acid-labile release of hybrid micelles to promote the synergistic antitumor efficacy. *Acta Biomater.* **78**, 198–210 (2018).
77. F. Chen, Z. Zang, Z. Chen, L. Cui, Z. Chang, A. Ma, T. Yin, R. Liang, Y. Han, Z. Wu, M. Zheng, C. Liu, L. Cai, Nanophotosensitizer-engineered Salmonella bacteria with hypoxia targeting and photothermal-assisted mutual bioaccumulation for solid tumor therapy. *Biomaterials.* **214**, 119226 (2019).
78. D.-W. Zheng, Y. Chen, Z.-H. Li, L. Xu, C.-X. Li, B. Li, J.-X. Fan, S.-X. Cheng, X.-Z. Zhang, Optically-controlled bacterial metabolite for cancer therapy. *Nat. Commun.* **9**, 1680 (2018).
79. J.-X. Fan, M.-Y. Peng, H. Wang, H.-R. Zheng, Z.-L. Liu, C.-X. Li, X.-N. Wang, X.-H. Liu, S.-X. Cheng, X.-Z. Zhang, Engineered Bacterial Bioreactor for Tumor Therapy via Fenton-Like Reaction with Localized H₂ O₂ Generation. *Adv. Mater.* **31**, e1808278 (2019).
80. C. Mignon, R. Sodoyer, B. Werle, Antibiotic-free selection in biotherapeutics: now and forever. *Pathogens.* **4**, 157–181 (2015).
81. N. S. Forbes, R. S. Coffin, L. Deng, L. Evgin, S. Fiering, M. Giacalone, C. Gravekamp, J. L. Gulley, H. Gunn, R. M. Hoffman, B. Kaur, K. Liu, H. K. Lyerly, A. E. Marciscano, E. Moradian, S. Ruppel, D. A. Saltzman, P. J. Tattersall, S. Thorne, R. G. Vile, H. H. Zhang, S. Zhou, G. McFadden, White paper on microbial anti-cancer therapy and prevention. *J Immunother Cancer.* **6**, 78 (2018).
82. D. Saltzman, L. Augustin, A. Leonard, M. Mertensotto, J. Schottel, Low dose chemotherapy combined with attenuated Salmonella decreases tumor burden and is less toxic than high dose chemotherapy in an autochthonous murine model of breast cancer. *Surgery.* **163**, 509–514 (2018).

83. C.-H. Lee, C.-L. Wu, Y.-S. Tai, A.-L. Shiau, Systemic administration of attenuated *Salmonella choleraesuis* in combination with cisplatin for cancer therapy. *Mol. Ther.* **11**, 707–716 (2005).
84. K. Kawaguchi, K. Miyake, M. Zhao, T. Kiyuna, K. Igarashi, M. Miyake, T. Higuchi, H. Oshiro, M. Bouvet, M. Unno, R. M. Hoffman, Tumor targeting *Salmonella typhimurium* A1-R in combination with gemcitabine (GEM) regresses partially GEM-resistant pancreatic cancer patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) nude mouse models. *Cell Cycle*. **17**, 2019–2026 (2018).
85. L.-J. Jia, D.-P. Wei, Q.-M. Sun, G.-H. Jin, S.-F. Li, Y. Huang, Z.-C. Hua, Tumor-targeting *Salmonella typhimurium* improves cyclophosphamide chemotherapy at maximum tolerated dose and low-dose metronomic regimens in a murine melanoma model. *Int. J. Cancer*. **121**, 666–674 (2007).
86. J. Chen, Y. Qiao, B. Tang, G. Chen, X. Liu, B. Yang, J. Wei, X. Zhang, X. Cheng, P. Du, W. Jiang, Q. Hu, Z.-C. Hua, Modulation of *Salmonella* Tumor-Colonization and Intratumoral Anti-angiogenesis by Triptolide and Its Mechanism. *Theranostics*. **7**, 2250–2260 (2017).
87. K. Miyake, T. Kiyuna, M. Miyake, M. Zhao, S. Wangsiricharoen, K. Kawaguchi, Z. Zhang, T. Higuchi, S. Razmjooei, Y. Li, S. D. Nelson, T. Russell, A. Singh, T. Murakami, Y. Hiroshima, M. Momiyama, R. Matsuyama, T. Chishima, S. R. Singh, S. P. Chawla, F. C. Eilber, I. Endo, R. M. Hoffman, Tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R overcomes partial carboplatinum-resistance of a cancer of unknown primary (CUP). *Tissue Cell*. **54**, 144–149 (2018).
88. Y. Hiroshima, Y. Zhang, M. Zhao, N. Zhang, T. Murakami, A. Maawy, S. Mii, F. Uehara, M. Yamamoto, S. Miwa, S. Yano, M. Momiyama, R. Mori, R. Matsuyama, T. Chishima, K. Tanaka, Y. Ichikawa, M. Bouvet, I. Endo, R. M. Hoffman, Tumor-Targeting *Salmonella typhimurium* A1-R in Combination with Trastuzumab Eradicates HER-2-Positive Cervical Cancer Cells in Patient-Derived Mouse Models. *PLoS One*. **10**, e0120358 (2015).
89. A. Soundararajan, A. Bao, W. T. Phillips, R. Perez 3rd, B. A. Goins, [(186)Re]Liposomal doxorubicin (Doxil): in vitro stability, pharmacokinetics, imaging and biodistribution in a head and neck squamous cell carcinoma xenograft model. *Nucl. Med. Biol.* **36**, 515–524 (2009).
90. S. Suh, A. Jo, M. A. Traore, Y. Zhan, S. L. Coutermarsh-Ott, V. M. Ringel-Scaia, I. C. Allen, R. M. Davis, B. Behkam, Nanoscale Bacteria-Enabled Autonomous Drug Delivery System (NanoBEADS) Enhances Intratumoral Transport of Nanomedicine. *Adv. Sci.* **6**, 1801309 (2019).

91. M. Frahm, S. Felgner, D. Kocijancic, M. Rohde, M. Hensel, R. Curtiss 3rd, M. Erhardt, S. Weiss, Efficiency of conditionally attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in bacterium-mediated tumor therapy. *MBio*. **6** (2015), doi:10.1128/mBio.00254-15.
92. D. S. Leventhal, A. Sokolovska, N. Li, C. Plescia, S. A. Kolodziej, C. W. Gallant, R. Christmas, J.-R. Gao, M. J. James, A. Abin-Fuentes, M. Momin, C. Bergeron, A. Fisher, P. F. Miller, K. A. West, J. M. Lora, Immunotherapy with engineered bacteria by targeting the STING pathway for anti-tumor immunity. *Nat. Commun.* **11**, 2739 (2020).
93. N. R. Smith, D. Baker, M. Farren, A. Pommier, R. Swann, X. Wang, S. Mistry, K. McDaid, J. Kendrew, C. Womack, S. R. Wedge, S. T. Barry, Tumor stromal architecture can define the intrinsic tumor response to VEGF-targeted therapy. *Clin. Cancer Res.* **19**, 6943–6956 (2013).
94. A. Rix, M. Piepenbrock, B. Flege, S. von Stillfried, P. Koczera, T. Opacic, N. Simons, P. Boor, S. Thoröe-Boveleth, R. Deckers, J.-N. May, T. Lammers, G. Schmitz, E. Stickeler, F. Kiessling, Effects of contrast-enhanced ultrasound treatment on neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Theranostics*. **11**, 9557–9570 (2021).
95. E. Ostermann, P. Garin-Chesa, K. H. Heider, M. Kalat, H. Lamche, C. Puri, D. Kerjaschki, W. J. Rettig, G. R. Adolf, Effective immunconjugate therapy in cancer models targeting a serine protease of tumor fibroblasts. *Clin. Cancer Res.* **14**, 4584–4592 (2008).
96. B. Yu, M. Yang, L. Shi, Y. Yao, Q. Jiang, X. Li, L.-H. Tang, B.-J. Zheng, K.-Y. Yuen, D. K. Smith, E. Song, J.-D. Huang, Explicit hypoxia targeting with tumor suppression by creating an “obligate” anaerobic *Salmonella Typhimurium* strain. *Sci. Rep.* **2**, 1-10 (2012).
97. S. Nomura, M. Takahashi, A. H. Kato, Y. Wada, Y. Watanabe, F. Yamashita, H. Mukai, Biosorption-based ⁶⁴Cu-labeling of bacteria for pharmacokinetic positron-emission tomography. *Int. J. Pharm.* **590**, 1199-1205 (2020).
98. L.-J. Jia, H.-M. Xu, D.-Y. Ma, Q.-G. Hu, X.-F. Huang, W.-H. Jiang, S.-F. Li, K.-Z. Jia, Q.-L. Huang, Z.-C. Hua, Enhanced therapeutic effect by combination of tumor-targeting *Salmonella* and endostatin in murine melanoma model. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 840–845 (2005).
99. C. C. Mills, E. A. Kolb, V. B. Sampson, Development of Chemotherapy with Cell-Cycle Inhibitors for Adult and Pediatric Cancer Therapy. *Cancer Res.* **78**, 320–325 (2018).
100. S. Yano, Y. Zhang, S. Miwa, Y. Tome, Y. Hiroshima, F. Uehara, M.

- Yamamoto, A. Suetsugu, H. Kishimoto, H. Tazawa, M. Zhao, M. Bouvet, T. Fujiwara, R. M. Hoffman, Spatial-temporal FUCCI imaging of each cell in a tumor demonstrates locational dependence of cell cycle dynamics and chemoresponsiveness. *Cell Cycle*. **13**, 2110–2119 (2014).
101. S. Yano, R. M. Hoffman, Real-Time Determination of the Cell-Cycle Position of Individual Cells within Live Tumors Using FUCCI Cell-Cycle Imaging. *Cells*. **7** (2018), doi:10.3390/cells7100168.
 102. S. Yano, S. Miwa, S. Mii, Y. Hiroshima, F. Uehara, M. Yamamoto, H. Kishimoto, H. Tazawa, M. Bouvet, T. Fujiwara, R. M. Hoffman, Invading cancer cells are predominantly in G0/G1 resulting in chemoresistance demonstrated by real-time FUCCI imaging. *Cell Cycle*. **13**, 953–960 (2014).
 103. S. Yano, Y. Zhang, M. Zhao, Y. Hiroshima, S. Miwa, F. Uehara, H. Kishimoto, H. Tazawa, M. Bouvet, T. Fujiwara, R. M. Hoffman, Tumor-targeting Salmonella typhimurium A1-R decoys quiescent cancer cells to cycle as visualized by FUCCI imaging and become sensitive to chemotherapy. *Cell Cycle*. **13**, 3958–3963 (2014).
 104. S. Yano, K. Takehara, M. Zhao, Y. Tan, Q. Han, S. Li, M. Bouvet, T. Fujiwara, R. M. Hoffman, Tumor-specific cell-cycle decoy by Salmonella typhimurium A1-R combined with tumor-selective cell-cycle trap by methioninase overcome tumor intrinsic chemoresistance as visualized by FUCCI imaging. *Cell Cycle*. **15**, 1715–1723 (2016).
 105. R. Ando, A. Sakaue-Sawano, K. Shoda, A. Miyawaki, Two new coral fluorescent proteins of distinct colors for sharp visualization of cell-cycle progression. *bioRxiv* (2020), p. 2020.03.30.015156.
 106. Y. Zhang, N. Zhang, M. Zhao, R. M. Hoffman, Comparison of the selective targeting efficacy of Salmonella typhimurium A1-R and VNP20009 on the Lewis lung carcinoma in nude mice. *Oncotarget*. **6**, 14625–14631 (2015).
 107. S. Dadashzadeh, N. Mirahmadi, M. H. Babaei, A. M. Vali, Peritoneal retention of liposomes: Effects of lipid composition, PEG coating and liposome charge. *J. Control. Release*. **148**, 177–186 (2010).
 108. A. Nishiguchi, M. Matsusaki, M. R. Kano, H. Nishihara, D. Okano, Y. Asano, H. Shimoda, S. Kishimoto, S. Iwai, M. Akashi, In vitro 3D blood/lymph-vascularized human stromal tissues for preclinical assays of cancer metastasis. *Biomaterials*. **179**, 144–155 (2018).
 109. Y. Zhou, Y.-S. Kim, S. Chakraborty, J. Shi, H. Gao, S. Liu, ^{99m}Tc-labeled cyclic RGD peptides for noninvasive monitoring of tumor inte

- grin $\alpha V\beta 3$ expression. *Mol. Imaging*. **10**, 386–397 (2011).
110. D. L. LaRock, A. Chaudhary, S. I. Miller, Salmonellae interactions with host processes. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 191–205 (2015).
 111. B. Mesa-Pereira, C. Medina, E. M. Camacho, A. Flores, E. Santero, Novel tools to analyze the function of Salmonella effectors show that SvpB ectopic expression induces cell cycle arrest in tumor cells. *PLoS One*. **8**, e78458 (2013).
 112. S. D. Auweter, A. P. Bhavsar, C. L. de Hoog, Y. Li, Y. A. Chan, J. van der Heijden, M. J. Lowden, B. K. Coombes, L. D. Rogers, N. Stoynov, L. J. Foster, B. B. Finlay, Quantitative mass spectrometry catalogues Salmonella pathogenicity island-2 effectors and identifies their cognate host binding partners. *J. Biol. Chem.* **286**, 24023–24035 (2011).
 113. A. P. Bhavsar, N. F. Brown, J. Stoepel, M. Wiermer, D. D. O. Martin, K. J. Hsu, K. Imami, C. J. Ross, M. R. Hayden, L. J. Foster, X. Li, P. Hietter, B. B. Finlay, The Salmonella type III effector SspH2 specifically exploits the NLR co-chaperone activity of SGT1 to subvert immunity. *PLoS Pathog.* **9**, e1003518 (2013).
 114. H.-N. Na, Y.-H. Yoo, C. N. Yoon, J.-S. Lee, Unbiased proteomic profiling strategy for discovery of bacterial effector proteins reveals that Salmonella protein PheA is a host cell cycle regulator. *Chem. Biol.* **22**, 453–459 (2015).
 115. E. J. Heffernan, L. Wu, J. Louie, S. Okamoto, J. Fierer, D. G. Guiney, Specificity of the complement resistance and cell association phenotypes encoded by the outer membrane protein genes rck from Salmonella typhimurium and ail from Yersinia enterocolitica. *Infect. Immun.* **62**, 5183–5186 (1994).
 116. M. Rosselin, I. Virlogeux-Payant, C. Roy, E. Bottreau, P.-Y. Sizaret, L. Mijouin, P. Germon, E. Caron, P. Velge, A. Wiedemann, Rck of Salmonella enterica, subspecies enterica serovar enteritidis, mediates zipper-like internalization. *Cell Res.* **20**, 647–664 (2010).
 117. A. Wiedemann, L. Mijouin, M. A. Ayoub, E. Barilleau, S. Canepa, A. P. Teixeira-Gomes, Y. Le Vern, M. Rosselin, E. Reiter, P. Velge, Identification of the epidermal growth factor receptor as the receptor for Salmonella Rck-dependent invasion. *FASEB J.* **30**, 4180–4191 (2016).
 118. P. Wee, Z. Wang, Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers*. **9** (2017), doi:10.3390/cancers9050052.

119. J. Mambu, E. Barilleau, L. Fragnet-Trapp, Y. Le Vern, M. Olivier, G. Sadrin, O. Grépinet, F. Taieb, P. Velge, A. Wiedemann, Role of Salmonella Typhimurium Delays the Host Cell Cycle to Facilitate Bacterial Invasion. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 586934 (2020).
120. A. Gabizon, D. Goren, R. Cohen, Y. Barenholz, Development of liposomal anthracyclines: from basics to clinical applications. *J. Control. Release.* **53**, 275–279 (1998).
121. A. Gabizon, D. Tzemach, L. Mak, M. Bronstein, A. T. Horowitz, Dose dependency of pharmacokinetics and therapeutic efficacy of pegylated liposomal doxorubicin (DOXIL) in murine models. *J. Drug Target.* **10**, 539–548 (2002).
122. Y. Yuhas, L. Shulman, A. Weizman, E. Kaminsky, A. Vanichkin, S. Ashkenazi, Involvement of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta in enhancement of pentylenetetrazole-induced seizures caused by Shigella dysenteriae. *Infect. Immun.* **67**, 1455–1460 (1999).
123. L. Claesson-Welsh, E. Dejana, D. M. McDonald, Permeability of the Endothelial Barrier: Identifying and Reconciling Controversies. *Trends Mol. Med.* **27**, 314–331 (2021).
124. K. Westphal, S. Leschner, J. Jablonska, H. Loessner, S. Weiss, Containment of tumor-colonizing bacteria by host neutrophils. *Cancer Res.* **68**, 2952–2960 (2008).