



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	In vivoにおける口腔レンサ球菌の抗腫瘍活性 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	原, 博志
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11261号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56229
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroshi_Hara_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称

博士（歯学）

氏名 原 博志

学位論文題名

*In vivo*における口腔レンサ球菌の抗腫瘍活性

我が国における平成24年度の死因の約30%は癌である(平成24年 人口動態統計, 厚生労働省). 癌治療における問題点としては, 転移や残存腫瘍に対する有効な治療法が確立されていないことである. 19世紀の終わりに免疫を賦活化させることで, 癌を治療するという考えもと, William Coleyにより

Streptococcus pyogenes と *Serratia marcescens* の混合物を癌患者に接種するという治療がおこなわれ, 癌の縮小や, 寛解したことが知られている. いわゆる Coley's Toxin は癌に対する抑制効果は認められたが, 同時に感染症に対するリスクも含んでいた. そのため, Coley's Toxin よりも安全に用いることができるワクチンがもとめられた. 一方で, Toll-like receptor (TLR) は, 自然免疫系で重要な役割を果たしているマクロファージ, 樹状細胞などの抗原提示細胞の表面あるいは細胞内に発現し, 病原体の侵入を感知するだけでなく, T細胞への抗原提示の際の補助刺激シグナル分子の発現を制御することにより, 獲得免疫の誘導においても重要な役割を果たしている. 細菌成分を認識する TLR の中で抗腫瘍活性に関する研究が進められているのが TLR2, TLR4 ならび TLR9 である. TLR2 は細菌成分のペプチドグリカン(PGN), リポタンパク質, リポアラビノマンナン, リポタイコ酸などを, TLR4 はグラム陰性菌のリポ多糖を, TLR9 は微生物由来非メチル化 CpG-DNA を認識することが知られている.

TLR9 リガンドである CpG-DNA は Th1 応答を誘導し, 抗腫瘍効果を示すこと

が知られており、臨床応用(Phase 3)もされている。また、リンパ管腫や頭頸部癌の治療薬として臨床応用(Phase 3)されているヒト由来 A 群溶血性レンサ球菌 *Streptococcus pyogenes* 弱毒 Su 株由来の OK-432(ピシバニール, 中外製薬)は最近の研究により TLR4 シグナルが関与していることが報告されている。

今までに我々は、TLR2 リガンドであるマイコプラズマ由来リポペプチド FSL-1 が *in vivo* における腫瘍細胞の増殖を TLR2 依存的抑制することを明らかにした。また、我々は口腔レンサ球菌の全菌体の認識に、*in vivo* ならびに *in vitro* においても TLR2 が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

そこで、本研究では安全で有効な癌ワクチンを開発する第一段階として、合成された高価な TLR2 リガンドではなく、TLR2 で認識される口腔レンサ球菌の全菌体を腫瘍接種後に免疫した場合に *in vivo* において抗腫瘍活性を示すかどうかを検証した。口腔レンサ球菌としては、結核菌や HIV の抗原タンパク質のワクチンベクターとしても現在用いられている口腔常在レンサ球菌である *Streptococcus gordonii* を用いた。

TLR2 を発現している C57BL/6 (B6)マウスにおいて B16F0 メラノーマの増殖に及ぼす本菌の生菌ならびに熱処理菌体の影響を調べたところ、共に腫瘍増殖を有意に抑制していることがわかった。我々は *S. gordonii* 菌体の認識には TLR2 が重要な役割をはたしていることが明らかにしている。そこで、本菌体の抗腫瘍活性が TLR2 依存的であるか調べるため B6 マウスから TLR2 をノックアウトした TLR2^{-/-}マウスでも同様の腫瘍細胞の増殖を調べた。その結果、予想に反して、TLR2^{-/-}マウスでも B6 (TLR2^{+/+}) マウスの場合と同様に、本菌菌体による抗腫瘍活性が認められた。このことは、レンサ球菌の菌体には TLR2 のリガンド以外にも、TLR9 リガンドである CpG-DNA, NOD2 のリガンドである PGN 由来のムラミルジペプチド等が含まれていることから、それらのパタ

ーン認識受容体のシグナルが菌体の抗腫瘍活性に関与していることを示唆している．実際に、我々は *S. gordonii* の全菌体が NOD2 で認識されることを報告している．

S. gordonii における抗腫瘍活性のメカニズムを調べるため、腫瘍細胞を傷害する細胞であるナチュラルキラー (NK) 細胞や、腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の活性を脾臓ならびに所属リンパ節で調べてみたところ、菌体免疫により両細胞の活性が亢進していることが分かった．

次に、我々は、担癌生体における癌組織の微小環境における免疫抑制や免疫回避機構に注目した．癌細胞は細胞表面における MHC (major histocompatibility complex) 分子の発現の減少や消失、また、癌細胞あるいは免疫担当細胞による免疫抑制性サイトカイン (TGF- β や IL-10) の産生などが免疫回避の主なメカニズムとして報告されている．最近、免疫抑制性サイトカイン (TGF- β や IL-10) を産生する制御性 T 細胞 (Treg) や骨髄由来抑制細胞 (MDSC) を癌局所に集積させることにより免疫抑制状態を惹起し、癌の増殖を有利にしていることも明らかにされ、注目されている．そこで、B6 マウスに腫瘍細胞接種後 15 日目に、所属リンパ節細胞における Treg ならびに MDSC の割合をフローサイトメーターで測定した．その結果、菌体免疫により Treg や MDSC の所属リンパ節内での割合は減少していることがわかった．このことは *S. gordonii* 菌体免疫を行うことにより腫瘍の増殖しやすい免疫抑制環境を阻害されたために腫瘍の増殖が抑制されたことを示唆している．

このように、本研究では口腔常在菌である *S. gordonii* の菌体は *in vivo* における抗腫瘍活性を有することが明らかにされ、安全性の高い癌ワクチンとしての可能性が示唆された．