



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	In vivoにおける口腔レンサ球菌の抗腫瘍活性
Author(s)	原, 博志; 長谷部, 晃; 佐伯, 歩 他
Citation	北海道歯学雑誌, 35(1), 16-24
Issue Date	2014-09
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57068
Type	journal article
File Information	35-01-4hara.pdf



原 著

*In vivo*における口腔レンサ球菌の抗腫瘍活性

原 博志^{1,2)} 長谷部 晃¹⁾ 佐伯 歩¹⁾
阿部 亜美¹⁾ 山崎 裕²⁾ 柴田健一郎¹⁾

抄 録：我々は、これまでにToll-like receptor 2 (TLR2) のリガンドであるリポペプチドFSL-1が*in vivo*においてTLR2依存的な抗腫瘍活性を示すこと、また、口腔レンサ球菌の全菌体の認識に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、本研究では口腔レンサ球菌の全菌体の*in vivo*における抗腫瘍活性を検証した。

8-9 週齢のC57BL/6マウスの背部皮下にメラノーマB16F0を接種後、4日後及び9日後に、*Streptococcus gordonii*の生菌あるいは死菌で免疫した。その結果、生菌ならびに死菌は共に腫瘍の増殖を有意に抑制した。さらに、2回目の免疫を行った翌日の脾臓ならびに所属リンパ節からリンパ球を採取し、ナチュラルキラー（NK）細胞と細胞傷害性T細胞（CTL）の傷害活性を調べた。生菌で免疫したマウスの脾臓ならびに所属リンパ節では有意に高いNK活性を示した。また、脾臓では有意に高いCTL活性を示したが、所属リンパ節では有意ではないが、活性化傾向を示した。さらに、2回目の免疫から6日後の所属リンパ節において、免疫抑制状態を惹起することが知られている制御性T細胞（Treg）ならびに骨髄由来抑制細胞（MDSC）の割合を調べた。その結果、生菌で免疫していた場合にTregならびにMDSCの割合が共に有意に減少していることがわかった。また、腫瘍周囲におけるTregの存在状況を調べたところコントロール群では移植腫瘍間や間質にTregが認められたが、生菌で免疫した群は認められなかった。

以上の結果から、口腔レンサ球菌の一つである*Streptococcus gordonii*の全菌体は*in vivo*において抗腫瘍活性を有しており、その活性発現にはNK細胞ならびにCTLによる細胞傷害活性と、TregならびにMDSC数の減少による免疫力の亢進が関与していることが示唆された。

キーワード：*Streptococcus gordonii*, ナチュラルキラー細胞, 細胞傷害性T細胞, 制御性T細胞, 骨髄由来抑制細胞

緒 言

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のもと、William Coleyにより化膿レンサ球菌とセラチア菌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¹⁻³⁾。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（APC）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^{4,5)}。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⁶⁾。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（LTA）などを、TLR4はグラム陰性菌のリポ多糖（LPS）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^{4,5)}。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（Phase3）もされている⁶⁻⁹⁾。また、リンパ管腫や頭頸部癌の治療薬として臨床応用（Phase3）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^{10,11)}。

今までに我々は、TLR2リガンドであるマイコプラズマ

¹⁾〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

北海道大学大学院歯学研究科 口腔病態学講座 口腔分子微生物学教室（主任：柴田健一郎 教授）

²⁾〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 高齢者歯科学教室（主任：山崎 裕 教授）

由来リポペプチドFSL-1¹²⁾の*in vivo*における腫瘍細胞の増殖に及ぼす影響を調べ、FSL-1と腫瘍抗原と同時に予め免疫した場合には抗腫瘍活性がみられたが、FSL-1を単独で免疫した場合には、逆に、腫瘍増殖促進活性がみとめられること、さらに、これらの活性はTLR2依存的であることを明らかにした¹³⁾。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¹⁴⁾。一方で、Oldfordらの研究¹⁵⁾により、FSL-1を単独で免疫した場合においても、腫瘍接種後に免疫した場合には腫瘍の増殖を抑制することが報告されている。

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。

材料ならびに方法

1) 細胞培養

C57BL/6 (B6) マウス由来のB16F0メラノーマ細胞 (JCRB0202) は、10% (vol/vol) 非働化牛胎児血清 (FBS) (Invitrogen社)、100 µg/mlペニシリンGおよび100 µg/mlストレプトマイシン (Sigma-Aldrich社) を含むDMEM培地 (Sigma-Aldrich社) を用い、37℃で5% CO₂下で培養した。

マウスの脾臓細胞、所属リンパ節細胞ならびにYAC-1 (ATCC TIB 160) は10% (vol/vol) 非働化FBS, 100 µg/mlペニシリンG, 100 µg/mlストレプトマイシンおよび28.6 µM 2-メルカプトエタノール (Sigma-Aldrich社) を含むRPMI 1640培地 (Sigma-Aldrich社、以下RPMI-ME) を用い、37℃で5% CO₂下で培養した。

2) 試薬と抗体

抗CD16/CD32抗体(clone 93)、Allophycocyanin (APC) 標識抗CD4抗体 (clone RM4-5)、Phycoerythrin (PE) 標識抗CD25抗体 (clone PC61)、Alexa Fluor 488標識抗Foxp3抗体 (clone 150D)、Fix/Perm緩衝液、Alexa Fluor 488標識抗Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) 抗体 (clone 1RB6-8C5)、PE標識抗CD11b抗体 (clone M1/70) ならびにそれらのイソタイプコントロールはBioLegend社より購入した。ナチュラルキラー (NK) 細胞アイソレーションキットはMiltenyi-Biotec社より購入した。Mitomycin CはSigma-Aldrich社より購入した。

その他の試薬はすべて市販の特級品を使用した。

3) マウス

8週令の雌のB6マウス (TLR2^{+/+}) は日本クラーレより購入した。また、同種のTLR2欠損マウス (TLR2^{-/-}) は

大阪大学の審良 静男教授の好意により分与していただいた。マウスは北海道大学歯学研究所・歯学部実験動物施設のSPFの環境下で維持し、すべての実験は北海道大学動物実験指針に従って行った。

4) 細菌

口腔レンサ球菌は*S. gordonii* Challisを使用し、2% (wt/vol) トリプトン、0.5% (wt/vol) K₂HPO₄、0.2% (wt/vol) グルコース、0.05% (vol/vol) Tween-80を含むトリプトン培地で培養し、対数増殖期の後期に達した時に、8,000 gで10分間遠心することにより細胞を回収し、滅菌したPBS (phosphate-buffered saline) で3回洗浄した後、9.2×10⁸ cfu/mlになるようにPBSに懸濁した生菌懸濁液 (live *S. gordonii*) とした。菌懸濁液の一部を沸騰水中で5分間処理し、熱処理菌体 (HK *S. gordonii*) とした。

5) 免疫

100 µlのPBSに懸濁したB16F0 (5.0×10⁴ cells) を8～9週令の雌のB6マウス各10匹の背部皮下に接種した。腫瘍接種4日後及び9日後に腫瘍を接種した部位に、250 µlのPBSに懸濁したlive *S. gordonii* (2.3×10⁸ cfu) あるいはHK *S. gordonii* (5.6×10⁸ cfu) を接種し、経日的に腫瘍の大きさ及び生存率を測定した。また、コントロールとしてはPBSを250 µl接種した。腫瘍の大きさはノギスを用いて測定した値を、以下の式を用いて計算した。腫瘍の大きさ (mm³) = 腫瘍長径 (mm) × 短径 (mm) × 高さ (mm) × 0.4

6) CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性T細胞 (Treg)

腫瘍接種15日後のB6マウスの鼠蹊部及び腋下より所属リンパ節を摘出し、金属メッシュ上でRPMI-ME培地に浸してシリンジの柄を用いて金属メッシュ上で潰し、細胞懸濁液を得た。懸濁液はナイロン製メッシュを通した後、1% (wt/vol) 牛血清アルブミンを含むPBS (PBS/BSA) で3回洗い、1×10⁶細胞/mlになるように懸濁した。その細胞懸濁液0.2 mlに2 µlの抗CD32/16抗体を加え、氷上で15分間反応させた後、APC標識抗CD4抗体 (clone RM4-5) とPE標識抗CD25抗体 (clone PC61) と室温、暗所で20分間反応させた。その後、Fix/Perm緩衝液を用いて固定と透過処理を行い、PBS/BSAで洗った後、Alexa Fluor 488標識抗Foxp3抗体 (clone 150D) あるいはイソタイプコントロールと室温、暗所で15分間反応させた。PBS/BSAで3回洗浄した後、1 mlのPBS/BSAに懸濁し、フローサイトメーター (FACS Calibur: BD Biosciences社) で50,000細胞を取り込み、Tregの存在状況を測定した。なお、フローサイトメーターのデータは解析ソフトFlowJo (トミーデジタルバイオロジー社) を用いて解析した。

7) CD11b⁺Gr-1⁺骨髄由来抑制細胞 (MDSC)

腫瘍接種15日後のB6マウスの鼠蹊部及び腋下より所属リンパ節を摘出し、金属メッシュ上でRPMI-ME培地に浸してシリンジの柄を用いて潰し、細胞懸濁液を得た。懸濁液はナイロン製メッシュを通した後、PBS/BSAで3回洗い、 1×10^6 細胞/mlになるように懸濁した。その細胞懸濁液0.2 mlに2 μ lの抗CD32/16抗体を加え、氷上で15分間反応させた後、Alexa Fluor 488標識抗Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) 抗体 (clone 1RB6-8C5) とPE標識抗CD11b抗体 (clone M1/70) で室温、暗所で20分間反応させた。また、それぞれのイソタイプコントロールでも同様に反応させた。その後、PBS/BSAで3回洗浄したのち、1 mlのPBS/BSAに懸濁し、フローサイトメーターで30,000細胞を取り込み、それぞれの発現レベルを測定した。なお、フローサイトメーターのデータは解析ソフトFlowJo (トミーデジタルバイオロジー社) を用いて解析した。

8) NK細胞の細胞傷害活性 (NK活性)

2度目の免疫を行った翌日 (10日目) にB6マウスより脾臓あるいは所属リンパ節を摘出し、それぞれの細胞懸濁液を調製した。さらに、脾臓の懸濁液はLysis buffer (0.16 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA-4Na) で赤血球を溶血させた後、ナイロン製メッシュを通したものを脾臓細胞とした。NK細胞は脾臓細胞あるいは所属リンパ節細胞からNK細胞アイソレーションキット (Miltenyi Biotec社) を用いて調製した。ターゲットであるYAC-1細胞は500 μ lのRPMI-MEに懸濁し、100 μ Ciの⁵¹Crを添加した。5時間後にRPMI-MEで3回洗浄した後、YAC-1細胞 (1×10^4 cells/well) に種々の細胞数のNK細胞を加えた。4時間培養した後、遠心により100 μ lの上清を回収し、 γ カウンター (ALOKA社) で放射活性を定量した。なお、本測定は96穴V型マイクロプレートを用い、最終容量200 μ lで行った。また、細胞毒性 (%) [cytotoxicity (%)] は以下の式により求めた。

Cytotoxicity (%) = [(反応液中の放射活性 - 自然放出された放射活性) $\div$ (100%溶解時の放射活性 - 自然放出された放射活性)] $\times$ 100。

9) 細胞傷害性T細胞の細胞傷害活性 (CTL活性)

2度目の免疫を行った翌日 (10日目) にB6マウスより脾臓あるいは所属リンパ節を摘出し、それぞれの細胞懸濁液を調製した。さらに、脾臓の懸濁液はLysis buffer (0.16 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA-4Na) で赤血球を溶血させた後、ナイロン製メッシュを通したものを脾臓細胞とした。脾臓細胞 (1.0×10^7 cells) あるいは所属リンパ節細胞 (1.0×10^7 cells) は、マイトマイシンCで処理したB16F0 (1.0×10^6 cells) と5日間、IL-2 (30 U/ml) の存在下で培養した。ターゲットであるB16F0細胞は500 μ lの

RPMI-MEに懸濁し、100 μ Ciの⁵¹Crを添加した。5時間後にRPMI-MEで3回洗浄した後、B16F0細胞 (1×10^4 cells/well) に種々の細胞数の脾臓細胞あるいは所属リンパ節細胞を加えた。4時間培養した後、遠心により100 μ lの上清を回収し、 γ カウンターで放射活性を定量した。なお、本測定は96穴V型マイクロプレートを用い、最終容量200 μ lで行った。また、%細胞毒性は以下の式により求めた。

%細胞毒性 = [(反応液中の放射活性 - 自然放出された放射活性) $\div$ (100%溶解時の放射活性 - 自然放出された放射活性)] $\times$ 100。

10) 免疫染色

腫瘍細胞接種18日後に実験動物から腫瘍組織を採取し、10% (vol/vol) ホルマリン溶液中で固定後、通法に従いパラフィン包埋を行った。4 μ m切片を作成し脱パラフィン、水洗後、3% H₂O₂で5分間処理、120 $^{\circ}$ Cで10分間の抗原賦活化を行ったのち、1% (wt/vol) BSAで10分間ブロッキングを行った。次いで1/1000に希釈した抗Foxp3抗体 (abcam) で室温1時間、PBSで3回洗浄後、シンプルステインMAX (ニチレイ) を室温で30分間反応させ、その後DAB染色により呈色を行い、ヘマトキシリンで対比染色を行った。

11) 統計学的処理

得られたデータは統計ソフト (SSRI, 社会情報サービス, 東京) Student's T testにて解析し、P<0.05を統計学的に有意とした。

結 果

1. *In vivo*における腫瘍増殖に及ぼす*S. gordonii*全菌体の影響

B6マウスにおける腫瘍増殖に及ぼす*S. gordonii*の生菌あるいは熱処理した菌体の影響を調べた。コントロールのPBSに比較して、生菌ならびに熱処理菌体は共に腫瘍の増殖を有意に抑制することがわかった (図1 A, C)。また、生菌免疫では生存率に延長傾向が認められたが、熱処理菌体免疫ではコントロールとの差が認められなかった (図1 B, D)。

我々はTLR2リガンドであるFSL-1はTLR2依存的な抗腫瘍活性を有することを報告した¹³⁾。そこで、上記の菌体の抗腫瘍活性にもTLR2依存性があるかどうかを確認するために、TLR2^{-/-}マウスでも同様な実験を行った。その結果、TLR2^{-/-}マウスでもTLR2を発現しているB6マウスの場合と同様に菌体の抗腫瘍活性が観察された (図1 E, F)。

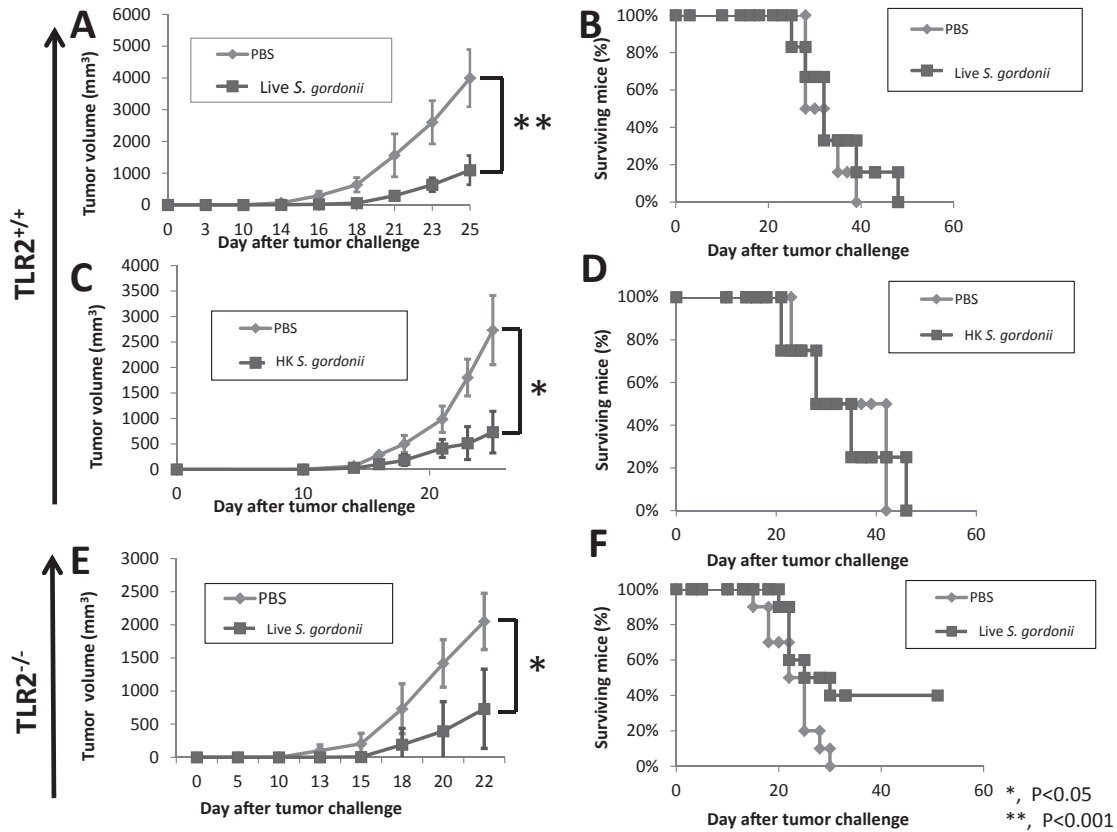


図1 腫瘍増殖及び生存率

TLR2^{+/+} (A, B, C, D) マウスあるいはTLR2^{-/-} (E, F) マウスにB16F0腫瘍細胞を接種後、4日及び9日目に生菌 (Live *S. gordonii*) (A, B, E, F) あるいは熱処理した菌体 (HK- *S. gordonii*) (C, D) で免疫し経口的に腫瘍の大きさ並びに生存率を測定した。

T-test: *, P<0.05; **, P<0.001

2. NK活性

B6マウスにおける生菌の抗腫瘍活性のメカニズムを明らかにするため、まず脾臓細胞ならびに所属リンパ節細胞を調製し、YAC-1細胞を標的細胞としてNK活性を測定した。その結果、生菌免疫群では、脾臓 (図2A) ならびに所属リンパ節 (図2B) において有意に高いNK活性が認められた。

3. CTL活性

腫瘍を殺傷する細胞としてNK細胞のほかには腫瘍抗原特異的なCTLがよく知られている¹⁶⁻¹⁸⁾。そこで、B6マウスから脾臓細胞ならびに所属リンパ節細胞を調製し、CTL活性を測定した。菌体免疫群では、脾臓 (図3A) においては有意に高いCTL活性が認められたが、所属リンパ節 (図3B) では有意ではないが、高いCTL活性が認められた。

4. TregとMDSCの関与

近年、癌局所に集積して免疫抑制状態を惹起することに

より癌の増殖を有利にし、癌組織の免疫抑制や免疫回避に関与しているTreg¹⁹⁻²²⁾やMDSC^{23,24)}が注目されている。そこで、所属リンパ節におけるTregならびにMDSCの割合が菌体免疫によりどのように変化するかを検証した。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、生菌免疫群ではTregならびにMDSCの割合が有意に少ないことがわかった (図4A, B)。

5. 腫瘍の微小環境におけるTregの存在状況

腫瘍の微小環境におけるTregの存在状況を調べるため、腫瘍細胞接種後18日目に腫瘍組織を摘出し、Tregに特異的な転写因子Foxp3に対する抗体を用いて免疫染色を行った。コントロール群では、腫瘍細胞の充実性増殖が認められ、腫瘍細胞間や間質にFoxp3抗体に陽性所見を呈するTregが認められた。一方、菌体免疫群では変性傾向を示す腫瘍細胞周囲にリンパ球をはじめとする単核細胞の浸潤がみられたが、明らかなTregの存在は認められなかった (図5)。

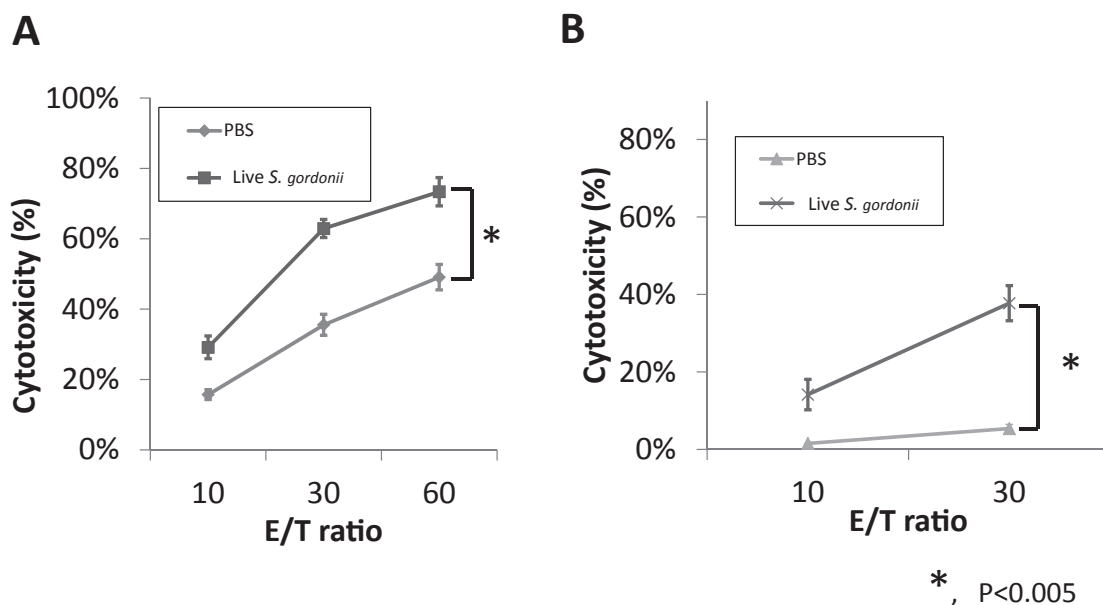


図2 脾臓及び所属リンパ節におけるNK活性

TLR2^{+/+}マウスに腫瘍細胞接種後、4日及び9日目に生菌 (Live *S. gordonii*) で免疫した。2回目の免疫の翌日 (10日目) に脾臓細胞 (A) 並びに所属リンパ節細胞 (B) を調整し、YAC-1細胞を標的細胞としてNK活性を調べた。NK活性は4時間反応後の⁵¹Cr放出活性で評価した。

E/T: 脾臓細胞数あるいは所属リンパ節細胞数 / YAC-1細胞数

Cytotoxicity (%) = [(反応液中の放射活性 - 自然放出された放射活性) ÷ (100%溶解時の放射活性 - 自然放出された放射活性)] × 100.

T-test: *, P<0.05

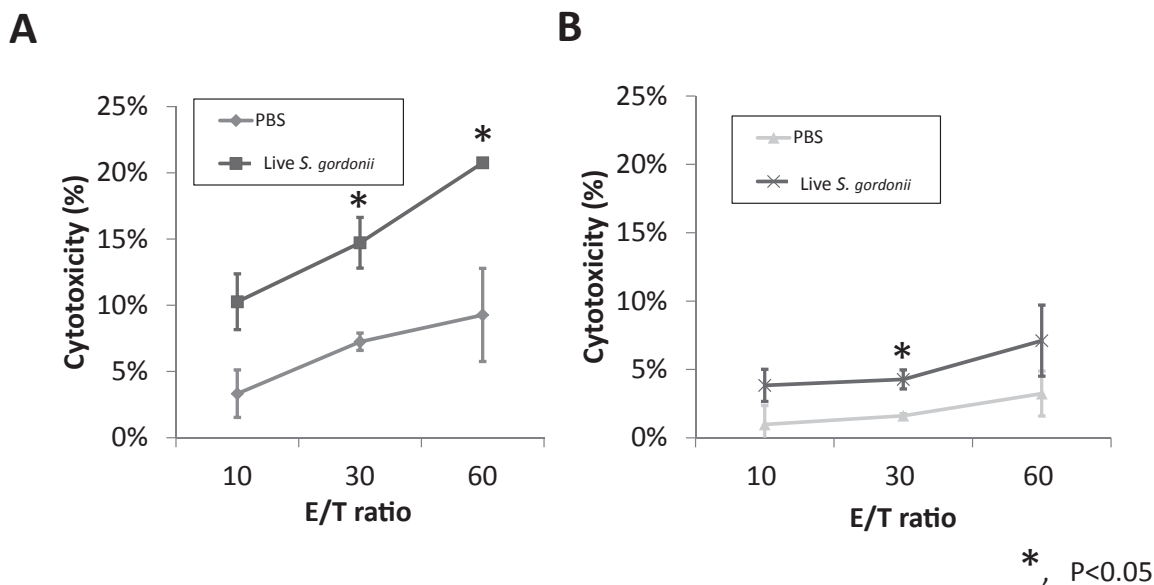


図3 脾臓及び所属リンパ節におけるCTL活性

TLR2^{+/+}マウスに腫瘍細胞接種後、4日及び9日目に生菌 (Live *S. gordonii*) で免疫した。2回目の免疫の翌日 (10日目) に脾臓細胞 (A) 並びに所属リンパ節細胞 (B) を調整し、マイトマイシンCで処理したB16F0細胞で、5日間再刺激を行なったのちCTL活性を調べた。CTL活性は4時間反応後の⁵¹Cr放出活性で評価した。

E/T: 脾臓細胞数あるいは所属リンパ節細胞数 / B16F0細胞数

Cytotoxicity (%) = [(反応液中の放射活性 - 自然放出された放射活性) ÷ (100%溶解時の放射活性 - 自然放出された放射活性)] × 100.

T-test: *, P<0.05

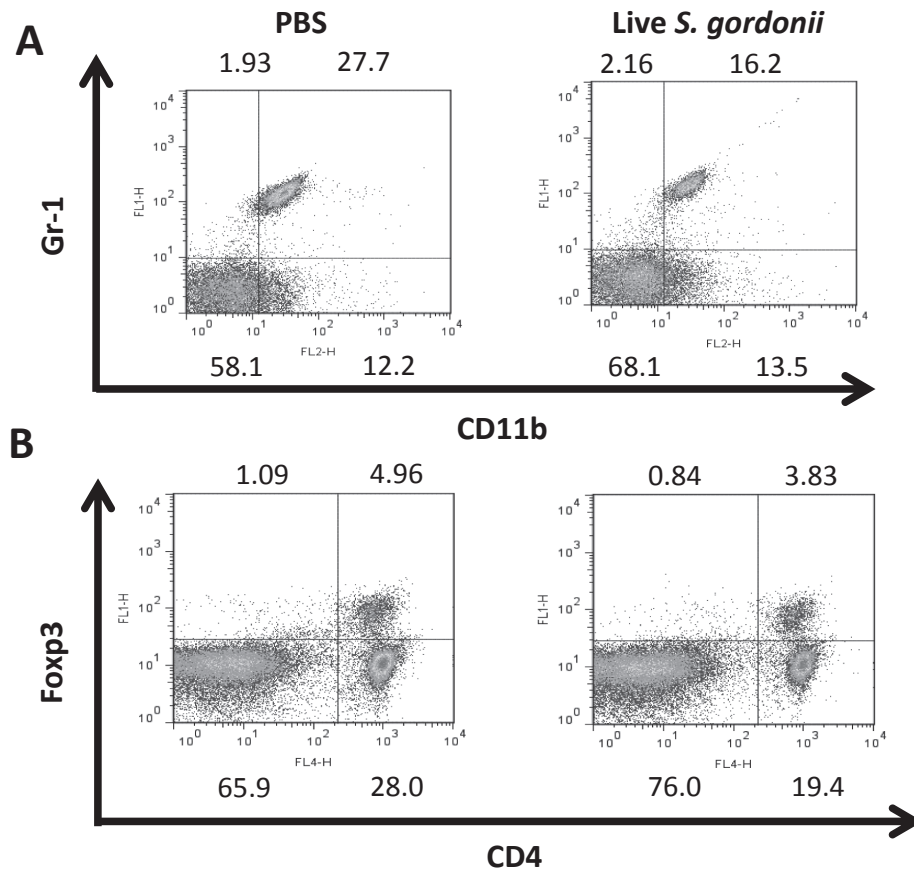


図4 所属リンパ節細胞におけるTregならびにMDSC
TLR2^{+/+}マウスに腫瘍細胞接種後, 4日及び9日に生菌 (Live *S. gordonii*) で免疫した. 2回目の免疫の6日後 (15日目) に所属リンパ節細胞におけるMDSC (A) ならびにTreg (B) の割合をフローサイトメーターで調べた.

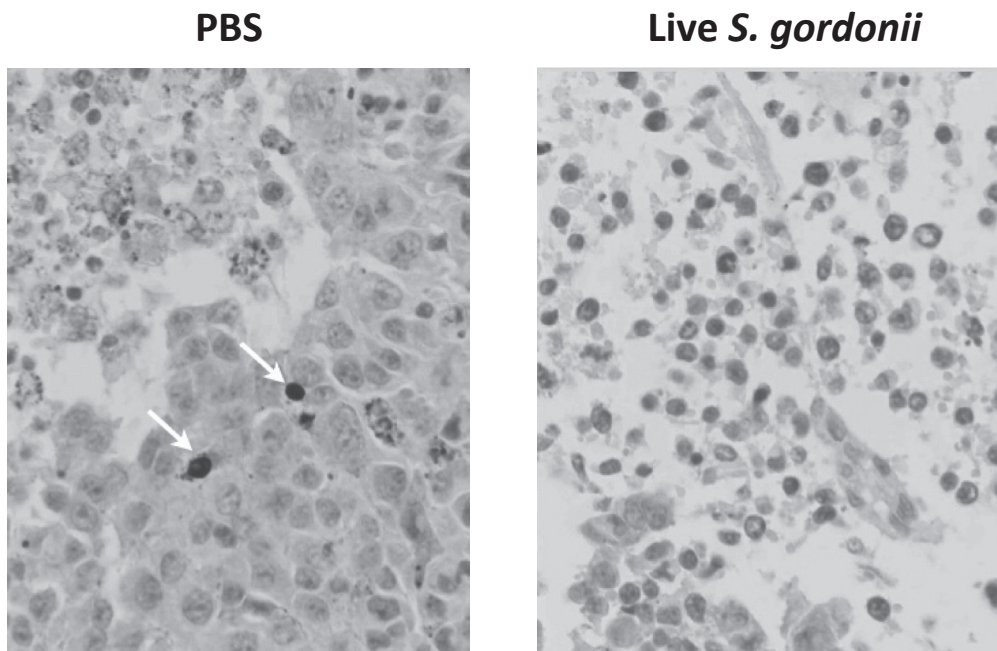


図5 腫瘍の微小環境におけるTregの存在状況
TLR2^{+/+}マウスに腫瘍細胞接種後, 4日及び9日目に生菌 (Live *S. gordonii*) で免疫した. 2回目の免疫の6日後 (15日目) に腫瘍組織を摘出し, Tregに特異的な転写因子Foxp3に対する抗体を用いて免疫染色した. 矢印はTregを示す.

考 察

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世紀の終わりに開発された*Streptococcus pyogenes*と*Serratia marcescens*の混合物ワクチンであるColey's Toxinは，免疫を賦活化させることで，癌に対する奏功は認められたが，同時に感染症に対するリスクも含まれていた¹⁻³⁾。そのため，20世紀の初めに放射線治療が開発されると，Coley's Toxinに対する関心は薄れはじめたが，近年の自然免疫に関する免疫科学の発達とともに細菌菌体成分の抗腫瘍活性が再び見直されてきている。

一方，口腔常在菌である*S. gordonii*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^{25,26)}。この理由の一つとして，本菌は口腔常在細菌であるという安全性があげられる。そこで，我々も本菌に注目し，その*in vivo*における抗腫瘍活性を検証した。

TLR2を発現しているB6マウスにおいてB16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（図1 A, 1 C）。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を明らかにしている¹⁴⁾。そこで，本菌菌体の抗腫瘍活性がTLR2依存적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TLR2^{+/+}マウスの場合と同様に本菌菌体による抗腫瘍活性は認められた。このことはTLR2シグナル以外にも関わっているシグナルがあることを示唆している（図1 E）。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が推測される。実際に，我々は*S. gordonii*の菌体がNOD2で認識されることを報告している¹⁴⁾。

*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として知られているNK細胞や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，菌体免疫により活性が亢進していることが分かった（図2，3）。

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major histocompatibility complex (MHC) 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²⁷⁾。最近，免疫抑制性サイトカイン（TGF- β やIL-10）を産生するTreg¹⁹⁻²²⁾やMDSC^{23,24)}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（図4 A, B）。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*の菌体が*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。

結 論

口腔レンサ球菌の一つである*Streptococcus gordonii*の全菌体は*in vivo*において抗腫瘍活性を有しており，その活性発現にはNK, CTL, TregならびにMDSCが関与していることが示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり，本研究に数々のご援助，ご協力いただきました北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座口腔病理病態学教室の進藤 正信教授，口腔健康科学講座高齢者歯科学教室ならびに口腔病態学講座口腔分子微生物教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

1. Zacharski LR, Sukhatme VP: Coley's toxin revisited: immunotherapy or plasminogen activator therapy of cancer? J Thromb Haemost 3 : 424-427, 2005.
2. Tsung K, Norton JA: Lessons from Coley's Toxin. Surg Oncol 15 : 25-28, 2006.
3. Rook G: Tumours and Coley's toxins. Nature 357 : 545, 1992.
4. Takeda K, Kaisho T, Akira S: Toll-like receptors. Annu Rev Immunol 21 : 335-376, 2003.
5. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. Cell 124 : 783-801, 2006.
6. Wang RF, Miyahara Y, Wang HY: Toll-like receptors and immune regulation: implications for cancer therapy. Oncogene 27 : 181-189, 2008.
7. Speiser DE, Lienard D, Rufer N, Rubio-Godoy V, Rimoldi D, Lejeune F, Krieg AM, Cerottini JC, Romero P: Rapid and strong human CD8+ T cell

- responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest* 115 : 739–746, 2005.
8. Krieg AM: Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J Clin Invest* 117 : 1184–1194, 2007.
 9. Schmidt C: Clinical setbacks for toll-like receptor 9 agonists in cancer. *Nat Biotechnol* 25 : 825–826, 2007.
 10. Okamoto M, Oshikawa T, Tano T, Ohe G, Furuichi S, Nishikawa H, Ahmed SU, Akashi S, Miyake K, Takeuchi O, Akira S, Moriya Y, Matsubara S, Ryoma Y, Saito M, Sato M: Involvement of Toll-like receptor 4 signaling in interferon-gamma production and antitumor effect by streptococcal agent OK-432. *J Natl Cancer Inst* 95 : 316–326, 2003.
 11. 萩田 修, 他 : OK-432の小児リンパ管腫に対する臨床第3相試験. *日本小児外科学会雑誌* 29 : 729, 1993.
 12. Shibata K, Hasebe A, Into T, Yamada M, Watanabe T: The N-terminal lipopeptide of a 44-kDa membrane-bound lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts. *J Immunol* 165 : 6538–6544, 2000.
 13. Kiura K, Hasebe A, Saeki A, Segawa T, Okada F, Shamsul HM, Ohtani M, Into T, Inoue N, Wakita M, Shibata K: In vivo anti- and pro-tumour activities of the TLR2 ligand FSL-1. *Immunobiology* 216 : 891–900, 2011.
 14. Saeki A, Segawa T, Abe T, Sugiyama M, Arimoto T, Hara H, Hasebe A, Ohtani M, Tanizume N, Ohuchi M, Kataoka H, Kawanami M, Yokoyama A, Shibata K: Toll-like receptor 2-mediated modulation of growth and functions of regulatory T cells by oral streptococci. *Mol Oral Microbiol* 28 : 267–280, 2013.
 15. Oldford SA, Haidl ID, Howatt MA, Leiva CA, Johnston B, Marshall JS: A critical role for mast cells and mast cell-derived IL-6 in TLR2-mediated inhibition of tumor growth. *J Immunol* 185 : 7067–7076, 2010.
 16. Davila E, Celis E: Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity. *J Immunol* 165 : 539–547, 2000.
 17. Kochenderfer JN, Chien CD, Simpson JL, Gress RE: Maximizing CD8+ T cell responses elicited by peptide vaccines containing CpG oligodeoxynucleotides. *Clin Immunol* 124 : 119–130, 2007.
 18. Wirth S, Bille F, Koenig S, Wehrli N, Miconnet I, Levy F, Diggelmann H, Romero P, Acha-Orbea H: Testing mouse mammary tumor virus superantigen as adjuvant in cytotoxic T-lymphocyte responses against a melanoma tumor antigen. *Int J Cancer* 99 : 201–206, 2002.
 19. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD: The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21 : 137–148, 2004.
 20. Zou W: Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6 : 295–307, 2006.
 21. Shevach EM: CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2 : 389–400, 2002.
 22. Turk MJ, Guevara-Patino JA, Rizzuto GA, Engelhorn ME, Sakaguchi S, Houghton AN: Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J Exp Med* 200 : 771–782, 2004.
 23. Gabrilovich DI, Nagaraj S: Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9 : 162–174, 2009.
 24. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V: Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12 : 253–268, 2012.
 25. Oggioni MR, Medaglini D, Maggi T, Pozzi G: Engineering the gram-positive cell surface for construction of bacterial vaccine vectors. *Methods* 19 : 163–173, 1999.
 26. Ciabattini A, Cuppone AM, Pulimeno R, Iannelli F, Pozzi G, Medaglini D: Stimulation of human monocytes with the gram-positive vaccine vector *Streptococcus gordonii*. *Clin Vaccine Immunol* 13 : 1037–1043, 2006.
 27. Khong HT, Restifo NP: Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat Immunol* 3 : 999–1005, 2002.

ORIGINAL

In vivo anti-tumor activity of oral *Streptococci*

Hiroshi Hara^{1,2)}, Akira Hasebe¹⁾, Ayumi Saeki¹⁾,
Tsugumi Abe¹⁾, Yutaka Yamazaki²⁾ and Ken-ichiro Shibata¹⁾

ABSTRACT : We have found that the microbial lipopeptide FSL-1, a Toll-like receptor 2 (TLR2) ligand, has the TLR2-mediated anti-tumor activity *in vivo*. Therefore, we tested the anti-tumor activity *in vivo* of oral *streptococci*, because they are known to be recognized by TLR2. On day 0, B16F0 melanoma cells were implanted subcutaneously in the back of C57BL/6 mice of 8-9 weeks of age. Heat-killed and live cells of *Streptococcus gordonii* were injected into the back of the mice on day 4 and 9 after implantation. Both heat-killed and live *S. gordonii* significantly inhibited the growth of tumors. As a first step in clarifying the mechanism by which they exhibit anti-tumor activity, the cytotoxic activities of lymphocytes of draining lymph nodes and spleens toward YAC-1 cells as a target (natural killer activity) or B16F0 melanoma cells as a target (tumor-specific cytotoxic T lymphocyte activity) were therefore measured on day 1 after the second immunization. Natural killer activity was significantly higher in the draining lymph nodes and spleens of the immunized mice. Tumor-specific cytotoxic T lymphocyte activity in spleen of the immunized mice was significantly higher, whereas activity in the draining lymph nodes was also higher, but not significantly. Furthermore, the proportion of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) and regulatory T cells (Treg) in the draining lymph nodes was measured by flow cytometry on day 6 after the second immunization. The proportions of both MDSC and Treg were significantly reduced in the immunized mice. Furthermore, Treg was observed around stroma cells and/or transplanted tumor cells in the non-immunized mice, but not in the immunized mice. Taken together, whole cells of *S. gordonii* had anti-tumor activity *in vivo*, in which the cytotoxic activities of both tumor-specific cytotoxic T lymphocytes natural killer cells and the upregulation of anti-tumor immune response caused by reduction of the numbers of the immunosuppressor cells such as MDSC and Treg are involved.

Key Words : *Streptococcus gordonii*, natural killer cell, tumor-specific cytotoxic T lymphocyte, regulatory T cells, Myeloid-Derived Suppressor Cells

¹⁾Division of Oral Molecular Microbiology (Chief : prof. Ken-ichiro Shibata), Department of Oral Pathobiological Science, and ²⁾Division of Oral Health Science (Chief : prof. Yutaka Yamazaki), Department of Gerodontology, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, Kita 13, Nishi 7, Kita-ku Sapporo 060-8586, Japan