

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月14日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390352

研究課題名（和文）口腔常在細菌による制御性T細胞の活性化とガン増殖との関連性

研究課題名（英文）Activation of regulatory T cells by oral inhabitant bacteria and relationship of their existence and growth of cancer

研究代表者

柴田 健一郎 (SHIBATA KEN-ICHIRO)

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：50145265

研究成果の概要（和文）：

口腔レンサ球菌 *S. mutans* と *S. gordonii* の野生株 (WT) ならびにリポタンパク質(LP)欠損株 (dLP) は Toll-like receptor 2 依存的に CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 制御性 T 細胞の増殖を活性化したが、抑制活性は減弱させた。ただ、リポタンパク質の存在はこれらの活性には影響はなかった。

C57BL/6 マウスにおける B16 melanoma の増殖に及ぼす *S. gordonii* の WT と dLP 株の影響を検証したところ、WT 株が LPKO 株よりも強くガンの増殖を抑制することを明らかにした。さらに、WT 株の抗腫瘍活性には腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞ではなく、ナチュラルキラー細胞の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Both wild-type (WT) and lipoprotein-deficient (dLP) strains of oral streptococci, *S. mutans* and *S. gordonii*, increased the proliferation of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells, but reduced their suppressive activity. However, the presence of lipoprotein was not involved in these activities.

WT strain of *S. gordonii* suppressed the growth of B16 melanoma in C57BL/6 mice, whereas dLP strain did not, suggesting that the presence of lipoprotein plays an important role in the anti-tumor activity. In addition, it was found that NK cells, but not cytolytic T cells, were involved in the anti-tumor activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2012年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：炎症、ガン、制御性T細胞、抗腫瘍活性、口腔細菌

1. 研究開始当初の背景

ガンは、免疫系で認識されたガン抗原

(TAA)を有しているにも拘わらず、無制限に増殖し、宿主を死に至らしめる。1995年(*J Immunol* 155:1151)に、免疫抑制活性を有し、ホメオスターシス維持に重要な役割を果たしている制御性T細胞(Treg)が同定され、活発に研究されている。最近、Tregがガンの微小環境に浸潤し、免疫抑制状態を惹起し、ガンの増殖に好都合な環境を提供していることが明らかにされ、ガンの撲滅にTregを利用するという免疫療法が研究されている(*Nat Rev Immunol* 6: 295, 2006)。我々は、これまで口腔マイコプラズマ由来のリポタンパク質(LP)が種々の細胞を活性化し、炎症性サイトカインを誘導すること、さらに、その活性部位であるN末端リポペプチド部分であることを明らかにしている(K. Shibata et al. *J. Immunol.* 165, 6538-6544, 2000.)。また、その活性部位の構造を基に合成したリポペプチド(FSL-1)がToll-like receptor 2 (TLR2)で認識されることを明らかにしている(M. Fujita et al. *J. Immunol.* 171: 3675-3683, 2003. T. Okusawa, et al. *Infect. Immun.* 72 (3): 1657-1665, 2004 他10編)。最近、FSL-1が*in vivo*におけるガン増殖に及ぼす影響を調べ、TAAとFSL-1を同時に免疫した後、ガンを接種するとガン増殖が強力に抑制される。FSL-1の単独免疫では、ガン増殖が有意に増強されることを明らかにした。(K Kiura, et al. *Immunobiology* 216: 891-900, 2011)。

2. 研究の目的

以前から「炎症とガン」が注目され、すなわち、慢性炎症の場ではガンが発症しやすいと言われ、その原因は慢性炎症の場で産生された反応性酸素中間体ROSによるDNA損傷であると推測されている(*Nature* 420:860, 2002)。以下に記載する最近の我々の実験結果に基づき、本研究では、口腔連鎖球菌の野生型(WT)とLP欠損(dLP)菌株を用いて、Tregに及ぼす*in vitro*ならびに*in vivo*に検証

し、さらに*in vivo*におけるガン増殖に及ぼす影響を調べ、ガン増殖における口腔常在細菌の役割、特に細菌LPの役割を細胞ならびに分子レベルで明らかにすることにより「炎症とガン」の関連に関する新規な免疫学的な側面を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

1. *Streptococcus mutans* (Sm)ならびに *Streptococcus gordonii*(Sg)のWT (SmWT、SgWT)ならびにLPKO株(SmdLP、SgdLP)のC57BL/6ならびにTLR2KO由来マウス脾細胞中のTregに対する影響—C57BL/6ならびにTLR2KOマウス由来脾細胞にSmWT、SmdLP、SgWTならびにSgdLP株を作用させ、Tregの変動：それぞれ異なった蛍光色素で標識したanti-CD4, anti-CD25, anti-Foxp3抗体で三重染色し、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg数の変動を調べる。

2. C57BL/6マウスにガン増殖に及ぼすSgWT、ならびにSgdLP株の影響—B16 F0メラノーマ細胞をC57BL/6マウスの背部皮下に接種し、4, 10日後にSgWTならびにSgdLP株菌体の単独ならびにTAAとの共存下で2回免疫した。B16 F0メラノーマの大きさならびに生存率の経日変化を調べる。

4. 研究成果

1. SmWT、SgWT、SmdLPならびにSgdLPのC57BL/6ならびにTLR2KO由来マウス脾細胞中のTregに対する影響

SmWT、SgWT、SmdLPならびにSgdLPの4菌株はTLR2依存的にCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Tregの増殖を活性化したが、抑制活性は減弱させた(Fig. 1とFig. 2)。ただ、LPの存在はこれらの活性には影響はなかった(Fig. 1とFig. 2)。

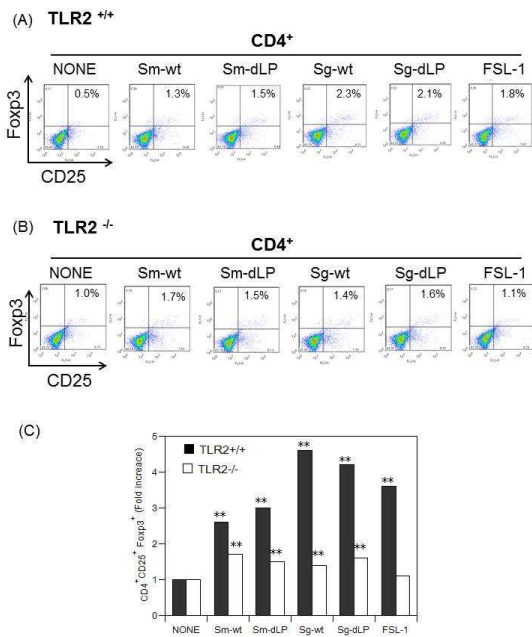


Fig. 1. Upregulation of the frequency of nTreg cells in splenocytes by stimulation with streptococci

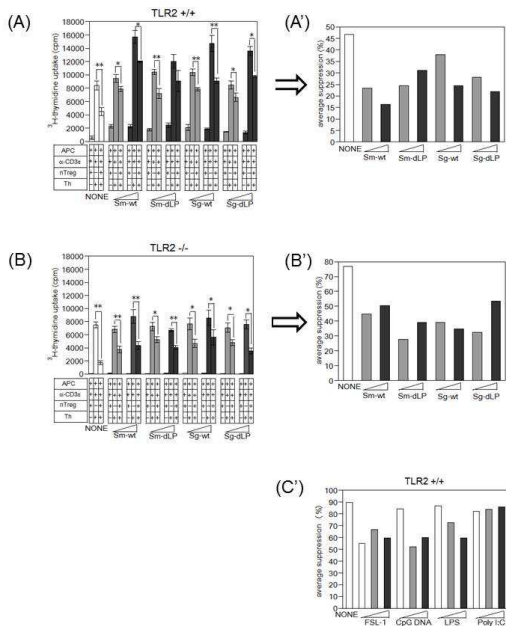


Fig. 2. Effects of streptococcal cells or TLR ligands on the immunosuppressive activity of nTreg cells.

2. C57BL/6 マウスにガン増殖に及ぼす SgWT ならびに SgdLP 株の影響

SgWT は C57BL/6 マウスにおける B16F0 メラノーマの増殖を有意に抑制したが、

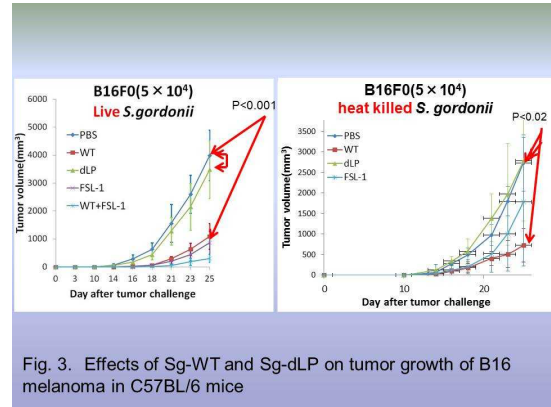


Fig. 3. Effects of Sg-WT and Sg-dLP on tumor growth of B16 melanoma in C57BL/6 mice

SgdLP は抑制しなかった (Fig. 3)。

また、SgWT の抗腫瘍活性には細胞傷害性 T 細胞ではなく、ナチュラルキラー細胞の関与が示唆された (データ未掲載)。

このように、口腔レンサ球菌である *S. gordonii* は LP 依存的な抗腫瘍活性をゆうしていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. A. Saeki, T. Segawa, T. Abe, M. Sugiyama, T. Arimoto, H. Hara, A. Hasebe, M. Ohtani, N. Tanizume, M. Ohuchi, H. Kataoka, M. Kawanami, A. Yokoyama and K. Shibata. Toll-like receptor 2-mediated modulation of growth and functions of regulatory T cells by oral streptococci. **Mol Oral Microbiol**, 査読有, in press, 2013.
2. A. Hasebe, I. Ishikawa, H. M. Shamsul, M. Ohtani, T. Segawa, A. Saeki, N. Tanizume, M. Ouchi, Y. Okagami, T. Okano, and K. Shibata. Mycoplasma Removal from Cell Culture Using Antimicrobial Photodynamic Therapy. **Photomed Laser Surg**, 査読有, 31: 1-7, 2013.
3. M. Ohtani, M. Iyori, A. Saeki, N. Tanizume, T. Into, A. Hasebe, Y. Totsuka and K. Shibata. Involvement of suppressor of cytokine signaling-1-mediated degradation of MyD88-adaptor-like protein in the suppression of Toll-like receptor 2-mediated signaling by the murine C-type lectin SIGNR1-mediated signaling. **Cell Microbiol**, 査読有, 14(1):40-57, 2012.

4. M Inomata, Niida S., Shibata K., and Into T. Regulation of Toll-like receptor signaling by NDP52-mediated selective autophagy is normally inactivated by A20. **Cell Mol Life Sci**, 査読有, 69(6): 963-79. 2012.
5. 柴田 健一郎. 「口腔マイコプラズマ由来ジアシルリポペプチド FSL-1 の in vivo における抗腫瘍活性」化学療法の領域. 医薬ジャーナル社, 査読有, 2012年11月号 (vol.28: 97-104, 2012)
6. K Kiura, A Hasebe, A Saeki, T Segawa, F Okada, H M Shamsul, M Ohtani, T Into, N Inoue, M Wakita, K Shibata. In vivo anti- and pro-tumour activities of the TLR2 ligand FSL-1. **Immunobiology**, 査読有, 216: 891-900, 2011.

[学会発表] (計 8 件)

1. 佐伯 歩、柴田 健一郎. 口腔レンサ球菌によるインフラマゾームの活性化. 第 5 回「口腔環境制御研究」カテゴリー集会. 2013年2月1日. 長崎大学, 長崎. プログラム: 12. 2013.
2. 大内 学、佐伯 歩、柴田 健一郎. Expression and function of Toll-like receptors and NK activity in oral candidiasis and aging. 第 86 回日本細菌学会総会. 2013年3月18~20日. 幕張メッセ国際会議場, 千葉. 日本細菌学雑誌 68(1): 222. 2013.
3. 佐伯 歩、大谷 誠、長谷部 晃、中澤太、柴田 健一郎. Recognition of oral streptococci by intracellular sensors, NODs, and inflammasome. 第 86 回日本細菌学会総会. 2013年3月18~20日. 幕張メッセ国際会議場, 千葉. 日本細菌学雑誌 68(1): 201. 2013.
4. 原 博志、佐伯 歩、長谷部 晃、柴田 健一郎. 微生物由来リポタンパク質・リポペプチドの抗腫瘍活性. 第 79 回日本細菌学会北海道支部学術総会. 2012年8月29日. とかちプラザ, 帯広. 要旨集: 31. 2012.

5. 佐伯 歩、杉山 正博、瀬川 卓、長谷部 晃、北川 善政、柴田 健一郎. 口腔連鎖球菌のパターン認識受容体による認識とインフラマゾームの活性化. 第 79 回日本細菌学会北海道支部学術総会. 2012年8月29日. とかちプラザ, 帯広. 要旨集: 32. 2012.
6. 原 博志、佐伯 歩、長谷部 晃、柴田 健一郎. 口腔連鎖球菌の抗腫瘍活性. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会. 2012年9月14日~16日. 奥羽大学, 郡山. Journal of Oral Biosciences 54 Suppl: 101. 2012
7. 佐伯 歩、瀬川 卓、片岡 嗣雄、長谷部 晃、有本 隆文、五十嵐 武、川浪 雅光、横山 敦郎、柴田 健一郎. 制御性 T 細胞 (Treg) の免疫抑制活性に及ぼす口腔連鎖球菌の影響. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会. 2011年9月30日~10月2日. 長良川国際会議場, 岐阜. Journal of Oral Biosciences 53 Suppl: 155. 2011.
8. 瀬川 卓、長谷部 晃、佐伯 歩、片岡 嗣雄、有本 隆文、五十嵐 武、横山 敦郎、川浪 雅光、柴田 健一郎. 口腔連鎖球菌の生体からの排除におけるリポタンパク質の影響. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会. 2011年9月30日~10月2日. 長良川国際会議場, 岐阜. Journal of Oral Biosciences 53 Suppl: 156. 2011.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.den.hokudai.ac.jp/saikin/achievements.html> に成果を掲載している。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 健一郎 (SHIBATA KEN-ICHIRO)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：50145265

(2) 研究分担者

長谷部 晃 (HASEBE AKIRA)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：90281815

(3) 連携研究者

()

研究者番号：