

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670747

研究課題名(和文) 乳酸菌を用いた頭頸部進行・再発癌に対する新たな分子治療の開発と臨床応用

研究課題名(英文) development of new treatment against head and neck cancer using lactobacillus casei

研究代表者

片桐 克則 (Katagiri, Katsunori)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：10455842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Lactobacillus caseiの偏性嫌気化株の投与により、マウスに移植したヒト扁平上皮癌の増殖を抑制する効果が得られた。またマウス血中にTNFなどのサイトカインの増加がみられたことから、この効果は免疫の賦活作用によると考えられた。さらにこの効果は同じLactobacillus caseiの死菌の投与では認められず、腫瘍内でのLactobacillus caseiが生存することで腫瘍免疫の賦活化が持続し効果が得られるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We injected obligate anaerobe strains of Lactobacillus casei in the squamous cell carcinoma transplanted on mouse subcutaneous tissue, and antitumor effect of Lactobacillus casei was observed. This effect was not observed with dead cells of lactobacillus casei. We considered this effect was the result of the immunostimulation by the proliferating bacteria in the tumor.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：lactobacillus casei head and neck SCC antitumor activity obligate anaerobe

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌を癌の治療に利用する考えは古くは19世紀以上前から存在し、特に1970年代以降、*Streptococcus pyogenes*、*Corynebacterium pavidum*、*Lactobacillus casei*、BCGなどによる抗腫瘍効果の報告が散見される^{1)~4)}。また、細菌をベクターとして用いたという報告もなされている。しかし細菌自体の病原性や正常組織への影響などが臨床応用においては障害となっている。

2. 研究の目的

乳酸菌そのものまたは乳酸菌をベクターとして用いて頭頸部扁平上皮癌の治療法の確立を目指す。

実際に細菌を治療に用いることを考えると、細菌自体の病原性や正常組織への影響が問題となる。固形癌では腫瘍内が正常組織に比べて嫌気的環境にある⁵⁾ことから、我々は、病原性のない乳酸菌 *Lactobacillus casei* のうち、正常組織に影響を与えにくいと考えられる偏性嫌気性化株を用いて、腫瘍抑制効果につき検討した。

3. 研究の方法

ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞をマウスに接種し腫瘍が目標の大きさになった時点で腫瘍内に *Lactobacillus casei* を局所注射投与し、経時的に腫瘍体積を計測、さらに、マウス血中サイトカインを測定した。

使用したマウスはヌードマウス BALB/cSlc-nu/nu、癌細胞はヌードマウス可移植株であるヒト扁平上皮癌細胞の HSC2 と SAS を用いた。まず *Lactobacillus casei* の偏性嫌気性化株 *lactobacillus casei* KJ378 を 10^4 [cfu]、 10^6 [cfu]、 10^8 [cfu]の3通りの菌体数で投与、コントロール群としては PBS を投与し、腫瘍体積の経時的計測を行った。投与11日目に腫瘍、肺、肝臓、腎臓を摘出してグラム染色により菌の局在を調べ、また血中サイトカインを測定した。

ヌードマウスに HSC2 を移植し作成した腫瘍に、*Lactobacillus casei* 偏性嫌気性化株にヒト IL-2 発現遺伝子を組み込んだ KJ474 株 : *Lactobacillus casei* KK378(pLP:hIL2)EMr (IL-2 産生菌、以下 IL-2(+)) と、IL-2 非産生株 KJ679 株 : *Lactobacillus casei* KK378(pLP:Empty)EMr (以下 IL-2(-)) をそれぞれ 10^8 [cfu]、コントロール群として PBS を投与した3群で比較し経時的に腫瘍体積を測定した。乳酸菌および PBS の投与は5日間連続で投与した。

HSC2 腫瘍に対して、IL-2(+))菌、IL-2(-))菌 10^8 [cfu]を5日間連続投与し、長期効果およびマウスの生存期間など長期観察を行った。

IL-2(+))菌、IL-2(-))菌をそれぞれ100で30分間煮沸処理し、死菌を作成した。死菌としたものを同様にマウスに作成した HSC2 腫瘍に局注しその効果を検討した。

4. 研究成果

腫瘍内に投与する乳酸菌の偏性嫌気性化株の投与が 10^8 [cfu]の群で、それより少ない菌体数の群および PBS 群と比べて腫瘍の増大を抑制した(図1)。

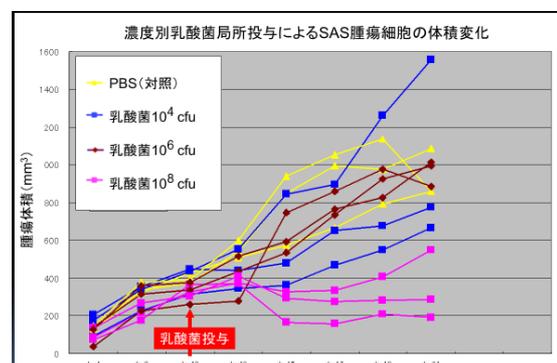


図1 濃度別乳酸菌投与による腫瘍体積変化

腫瘍および各臓器のグラム染色では、腫瘍にのみ乳酸菌が認められ、肺、肝臓、腎臓には菌は認められなかった(図2)。

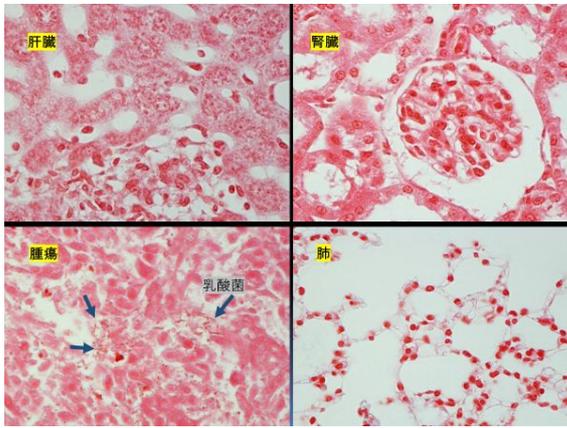


図2 腫瘍、各組織グラム染色

血中サイトカイン測定では対象群に比較して、投与菌体数に依存して TNF- α , IL12, INF- γ , IL-5, IL-10 が増加していた (図3)

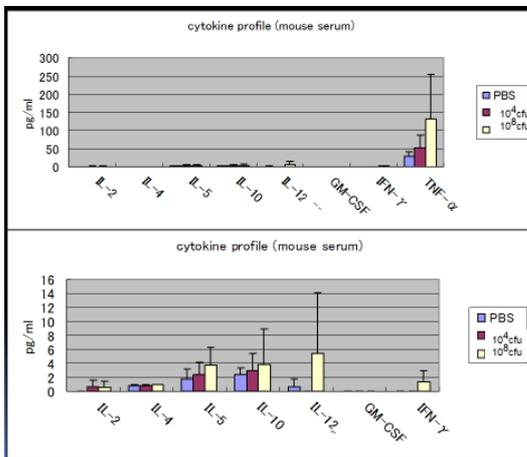


図3 マウス血中サイトカイン測定値

IL-2(+)菌投与群、IL-2(-)菌投与群ともにPBS投与群に比べて腫瘍増大を抑制していたが、IL-2(+)菌群でより強い腫瘍抑制効果が得られた (図4)。

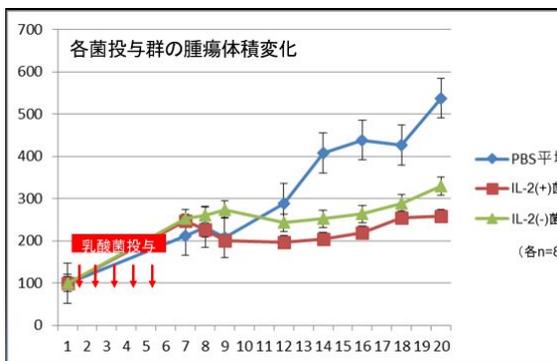
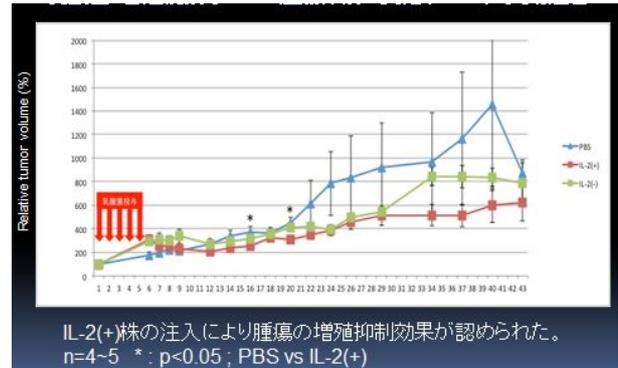


図4 IL-2(+)菌、IL-2(-)菌投与後の腫瘍体積

40 日間の観察では IL-2(+)菌投与群、IL-2(-)菌投与群とも PBS 群に比べて腫瘍抑制傾向が見られたが、IL-2(+)菌投与群で有意に

認められた (図5)。また、腫瘍に乳酸菌を投与した後のマウスの生存につき観察したが (図6)、腫瘍が背部中央に広がったもののみ脊髄浸潤による後肢麻痺から動けなくなったマウスのみが死亡し、腫瘍増大自体はマウスの生存には影響せず、今回の実験系で生存への寄与は検討できなかった。



IL-2(+)株の注入により腫瘍の増殖抑制効果が認められた。
n=4-5 * : p<0.05 ; PBS vs IL-2(+)

図5 長期経過

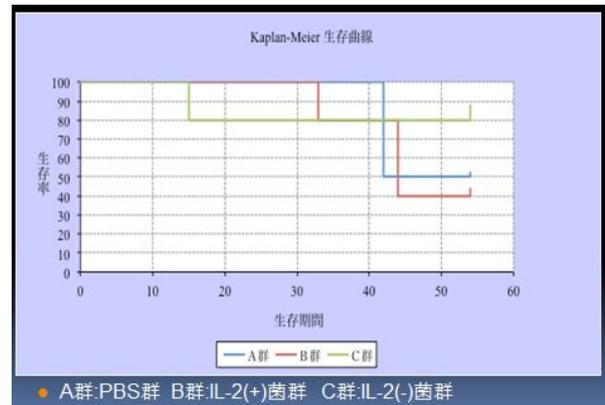


図6 乳酸菌投与後マウス生存率

死菌体の投与では、IL-2(+)菌群、IL-2(-)菌群とも腫瘍抑制効果を認められなかった (図7)。また死菌体投与後 14 日目に摘出した腫瘍のグラム染色では、菌体は明らかではなかった。

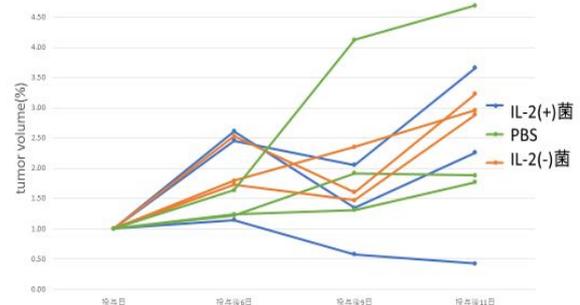


図7 死菌投与後腫瘍体積変化

Lactobacillus casei の偏性嫌気化株の投与により、正常組織に影響することなく扁平上皮癌の増殖を抑制する効果が得られた。また TNF α などサイトカインの増加が見られたことから、この効果は腫瘍免疫の賦活化によると考えられた。さらにこの効果は死菌体では認められず、腫瘍内での菌の生存により腫瘍免疫の賦活化が継続し効果が得られるものとする。

IL-2(+)菌の投与では、より強力な腫瘍増殖抑制効果が見られたことから、IL-2 を発現させるベクターとしての乳酸菌の投与も有効と考える。

<引用文献>

- 1) Ishii Y, Yamaoka H, et al: Inhibition of tumor growth in vivo and in vitro by macrophages from rats treated with a streptococcal preparation, OK-432. Gann, 67, 115-119(1976)
- 2) Milas L, Hunter N, et al.: Antitumor activity of *Corynebacterium paviu*m. Adv. Cancer Res,34, 613-620(1974)
- 3) Kato I, Kobayashi S, et al.: Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. Gann, 72, 517-523(1981)
- 4) Piessens W. F, Campbell M, et al.: Inhibition or enhancement of rat mammary tumors dependent on dose of BCG. J. Natl. Cancer Inst. 59. 207-211(1977)
- 5) Vaupel PW, Hockel M.: Oxygenation status of human tumors: a reappraisal using computerized pO₂ histography. Tumor oxigenation, Gustav Verlag, Germany. 219-232 (1994)

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 件)

〔学会発表〕(計 2件)

2017年4月13日~4月15日
第35回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会

乳酸菌による頭頸部扁平上皮癌の増殖抑制効果の検討

発表者 片桐克則

場所 山形市

2016年7月23日~7月24日

第64回日本耳鼻咽喉科学会東北地方部会連合学術講演会

乳酸菌による頭頸部扁平上皮癌の増殖抑制効果の検討

発表者 片桐克則

場所 山形市

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1)研究代表者

片桐 克則 (KATAGIRI, Katsunori)
岩手医科大学・医学部・頭頸部外科学科・助教
研究者番号：10455842

(2)研究分担者

志賀 清人 (SHIGA, Kiyoto)
岩手医科大学・医学部・頭頸部外科学科・教授

研究者番号： 10184338

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()