

---

総 説

---

口腔癌の免疫療法：基礎から臨床へ

－レンサ球菌, Toll-like receptor, 樹状細胞－

岡本 正人

キーワード：癌免疫療法, OK-432, リボタイコ酸関連分子, Toll-like receptor 4 シグナル, 樹状細胞

Immunotherapy for Oral Cancer: Bench to Bed

－ Streptococcus, Toll-like Receptor, Dendritic Cell －

Masato OKAMOTO

**Abstract :** OK-432, a penicillin-killed and lyophilized preparation of a low-virulence strain (Su) of *Streptococcus pyogenes* (group A), is successfully used as an immunotherapeutic agent in many types of malignancies including head and neck cancer. Recently, we succeeded in isolating the effective molecule (lipoteichoic acid-related molecule OK-PSA) by affinity chromatography of a butanol extract of OK-432 on CNBr-activated sepharose 4B bound TS-2 monoclonal antibody that neutralizes interferon- $\gamma$ -inducing activity of OK-432. In this review, we described the findings regarding the effect of the OK-432 and OK-PSA in enhancing anti-tumor immunity and the molecular mechanism. Our *in vitro* and *in vivo* study demonstrated that OK-PSA induces Th1-type cytokines in human as well as in mice, and elicits anti-tumor effect in tumor-bearing mice. Furthermore, our data indicated that the signaling mediated by Toll-like receptor (TLR) 4/MD-2 was involved in regulating OK-432/OK-PSA-induced anti-tumor immunity. It is suggested that OK-PSA is most responsible molecule for the anti-tumor effect of OK-432, that TLR4 and MD-2 are certain molecular targets for OK-432 as well as OK-PSA, and that expression of these genes may be useful marker to discriminate between responder and nonresponder to OK-432-based immunotherapy. In addition, OK-432/OK-PSA induced tumor-antigen specific cytotoxic T cells via the maturation of dendritic cells (DCs) which are professional antigen-presenting cells. It has been strongly suggested the possibility that OK-432/OK-PSA may be a useful adjuvant for DC therapy.

## はじめに

OK-432 (ピシバニール, 中外製薬, 東京) は, ヒト由来 A 群溶血性レンサ球菌 *Streptococcus pyogenes* 弱毒 Su 株を, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理後, ペニシリン G カリウム処理し, 凍結乾燥した菌体制剤であり, 1967年、金沢大学の岡本、越村によって開発された<sup>1)</sup>。OK-432 は強力な癌免疫療法剤として, 頭頸部癌を含め多くの領域の悪性腫瘍において用いられ, 有効例が多数報告されている。当教室でも, 口腔扁平上皮癌患者において, OK-432 の皮内投与あるいは腫瘍周囲への局所投与が有効であり, さらに放射線療法および代謝拮抗性抗癌剤 UFT との併用により極めて強い抗腫瘍効果を発現する事を報告している<sup>2,3)</sup>。OK-432 の抗腫瘍効果発現の, 細胞レベルにおける作用機序については, 当教室も含め多数の報告があり, interferon (IFN)- $\gamma$ , 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor: TNF)- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , interleukin (IL)-2, IL-12, IL-18 等の抗腫瘍性サイトカインの誘導ならびに natural killer (NK) 細胞, T 細胞, マクロファージ等の細胞障害性細胞の活性化を介して抗腫瘍効果を発現する事が明らかになってきた。しかしながら, その分子レベルにおける詳細な検討はほとんどなされていない。すなわち, 全菌体制剤である OK-432 中に含まれる如何なる分子が, 免疫担当細胞上に発現する如何なる受容体分子と結合し, どのようなシグナル伝達経路を介して抗腫瘍効果を発現するかは不明である。さらに, この事に伴い, かねてより OK-432 の臨床での使用において最も大きな問題となっているのが, OK-432 療法に対し反応しない宿主 (患者), いわゆる “Non-responder” の存在である。Responder/Non-responder の判別ならびに Non-responder への対処法の確立は, OK-432 を使用してゆく上で極めて重要であると考えられる。これらの問題点を解明するため, 我々は OK-432 より, その有効成分, すなわち抗腫瘍免疫活性分子の分離を試み, 近年これに成功した。さらに, この分子生物学的機能解析を進める事により, この活性分子を認識する受容体ならびにそのシグナル伝達経路も明らかになるとともに, 従来の細胞レベルでの検索ではわからなかった OK-432 の抗腫瘍メカニズムも解明されてきた。本総説においては, OK-432 の活性分子の抽出とその抗腫瘍活性の分子メカニズムについて, 我々が得た研究結果について報告するとともに, Responder/Nonresponder 判別ならびに Nonresponder への対処法について考察する。さらに, 我々は最近, OK-432 の樹状細胞 (dendritic cells: DC) に対する効果についても興味深い研究結果を得ている。OK-432 の新しい臨床応用法として, DC 療法へのアジュバントとしての可能性についても, 我々の研究結果をもとに, 本総説にて言及する。

## 1. OK-432の活性成分の探索

OK-432 による抗腫瘍免疫活性の分子メカニズムの検

討ならびにより効果的な癌免疫療法剤を開発するために, OK-432 の活性成分の分離を行なった。

### 1.1. 単クローン抗体を用いた OK-432活性成分 (OK-PSA) の分離

OK-432 に含まれる抗腫瘍免疫活性化分子を分離するため, 単クローン抗体を用いた (図 1 A)。すなわち, OK-432 中に存在する抗腫瘍免疫活性化分子を認識する単クローン抗体を作成し, この単クローン抗体をリガンドとするアフィニティクロマトグラフィにて, OK-432 の活性分子の分離・精製を行なった。OK-432 を BALB/c マウス腹腔内に投与する事により得られた抗 OK-432 単クローン抗体のうち, TS-2 と命名された単クローン抗体が OK-432 の IFN- $\gamma$  誘導活性をほぼ完全に中和した。すなわち, TS-2 が認識する抗原が OK-432 の IFN- $\gamma$  誘導に重要な分子である事が示唆された。IFN- $\gamma$  は, 代表的な Helper T-cell 1 (Th1) 型サイトカイン (次節参照) であり, OK-432 の抗腫瘍免疫活性においても IFN- $\gamma$  の誘導が非常に重要である事から, TS-2 が OK-432 の抗腫瘍活性において中心的な役割を演じている分子を認識している可能性が強く示唆された。そこで, 我々は TS-2 を結合させたアフィニティカラムを作成し, これを用いて TS-2 が認識する抗原を分離し, これを OK-PSA と命名した<sup>4)</sup>。さらなる解析により, OK-PSA はリポタイコ酸 (lipoteichoic acid: LTA) の構造を保有する糖脂質である事が明らかとなった<sup>4,5)</sup>。LTA はグラム陽性菌表層に存在する生理活性物質であり, 骨格構造であるポリグリセロリン酸に細胞質膜由来の糖脂質が結合した構造をなしている。さらにアシル基が 2 個あるいは 4 個結合しており, それぞれ Fischer によって LTA-1 および LTA-2 と分類されている (図 1 B)<sup>6)</sup>。最近の研究により LTA-1 および -2 以外にもいくつかの LTA 類似構造物が発見されており, LTA family を形成している事がわかってきた。現在までの OK-PSA の成分および構造解析から, OK-PSA は LTA と共通の構造を含むが, 従来報告されている LTA とは必ずしも一致しない。OK-PSA が新規の LTA family のひとつである事も考えられるが, 現在, 鹿児島大学大学院理工学研究科 隅田泰生教授との共同研究において OK-PSA の詳細な構造解析を進行中である。

### 1.2. OK-PSA の抗腫瘍免疫活性

IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-2, IL-12, IL-18 等の Th1 型サイトカインは細胞障害性リンパ球を誘導し抗腫瘍効果発現に重要な働きをしており, 対して IL-4, IL-6, IL-10, IL-13等の Th2 型サイトカインは抗癌免疫能を抑制する。担癌患者においては, この Th1/Th2 サイトカインバランスが Th2 優位にシフトしており, 抗腫瘍免疫の減弱や癌悪液質の原因になっている事が報告されている。すなわち, 抗腫瘍免疫活性の増強には, Th1 型サイ

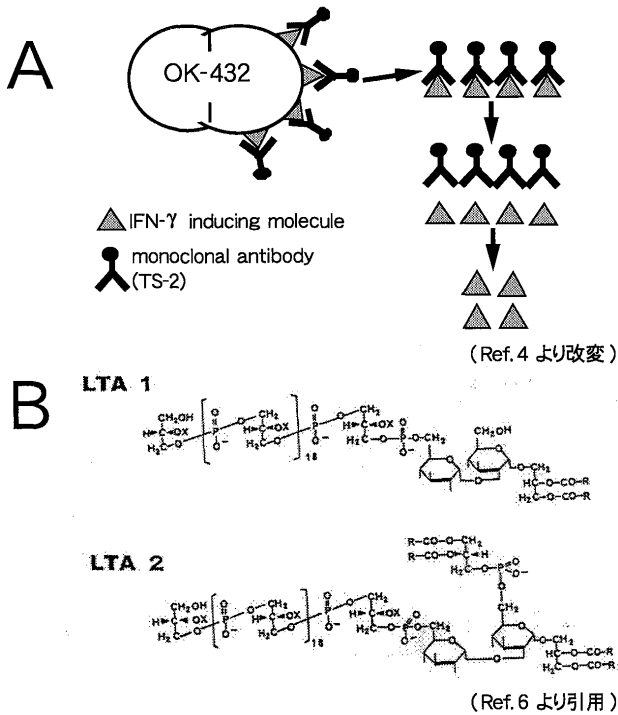
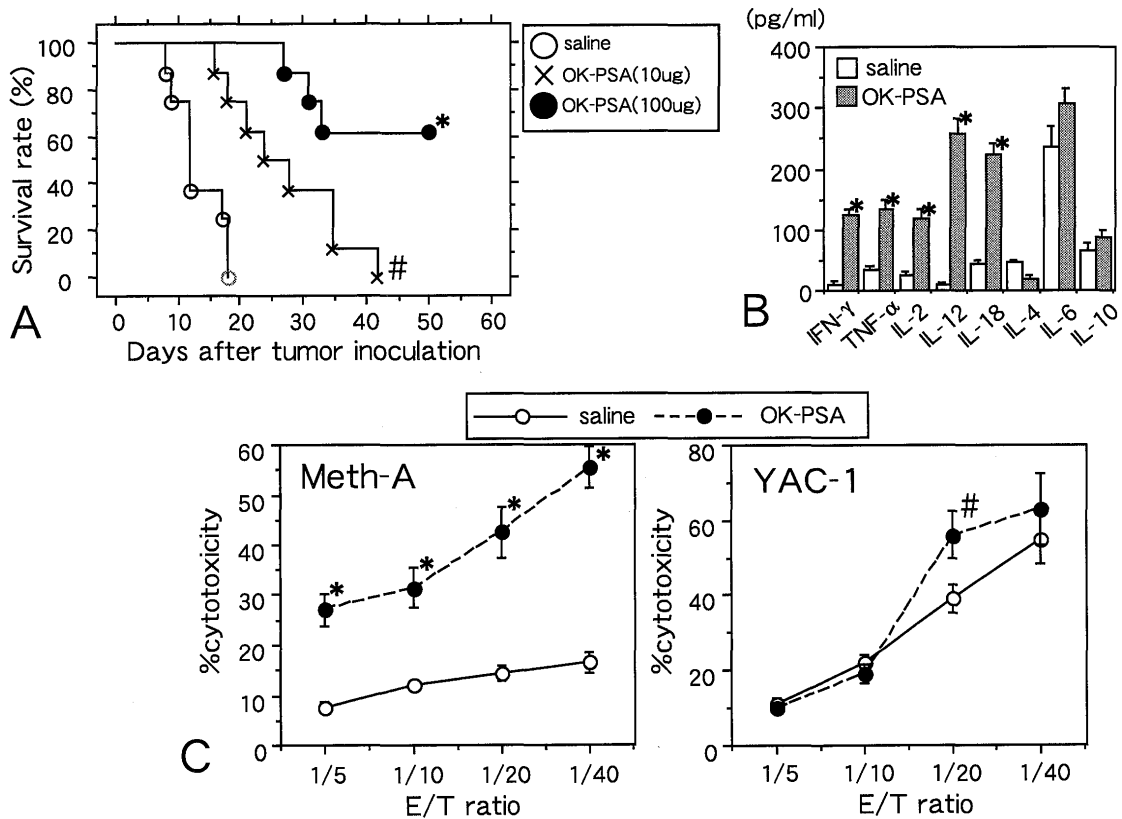


図1 (A) 単クローン抗体をもちいた OK-432 より活性成分分離の戦略。(B) LTA の化学構造式。

トカインを誘導し、サイトカインバランスを Th1 優位にシフトする事が重要である。

我々は、ヒト末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell: PBMC) を用いた *in vitro* の系において、OK-PSA が original OK-432 に比較して、より選択的に Th1 型サイトカインを誘導し、リンパ球の癌細胞障害活性を増強させる事を明らかにした。次に、同系腫瘍細胞を移植した担癌マウスモデルを用いた *in vivo* 実験系にて、OK-PSA の抗腫瘍活性につき検討した。OK-PSA 腹腔内投与により生存日数の有意な延長を認め、特に OK-PSA 100  $\mu$ g 投与群では 62.5% (8 匹中 5 匹) が腫瘍の完全緩解を認めた (図 2 A)。完治したマウスに同系腫瘍細胞の再移植を試みたが全て拒絶され腫瘍細胞は生着しなかった。OK-PSA は、マウス体内においても選択的に Th1 型サイトカインを誘導し (図 2 B)、マウスリンパ球の移植腫瘍細胞 Meth-A に対する特異的細胞障害活性を増強させた (図 2 C)。OK-PSA により誘導される細胞障害活性の主たるエフェクター細胞は、MHC class I 拘束性、CD8+T 細胞である事も明らかとなった。さらに、OK-PSA は担癌ヌードマウスにおいても抗腫瘍効果を発現した。その効果は正常マウスと比較すると軽度であったが、OK-PSA の抗腫瘍免疫活性に NK 細胞も携わっ



(Ref. 9 より改変)

図2 OK-PSA の抗腫瘍免疫活性 (A) 生存率。(B) 血中サイトカイン濃度。(C) 脾細胞の癌細胞障害活性。特異的標的細胞 Meth-A。非特異的標的細胞 YAC-1。\*,  $p < 0.01$ ; #,  $p < 0.05$ 。

ている事が強く示唆された<sup>7-13)</sup>。

## 2. OK-432/OK-PSA の分子標的

### — Toll-like receptor 4/MD-2—

OK-432/OK-PSA が、いかなる受容体分子を介してその作用を発現するのか。この問題について検索を行い、TLR4/MD-2 複合体がその有力な候補として注目される事となった。本節では、OK-432/OK-PSA の標的分子についての検索結果を述べる。

### 2.1. Toll-like receptors

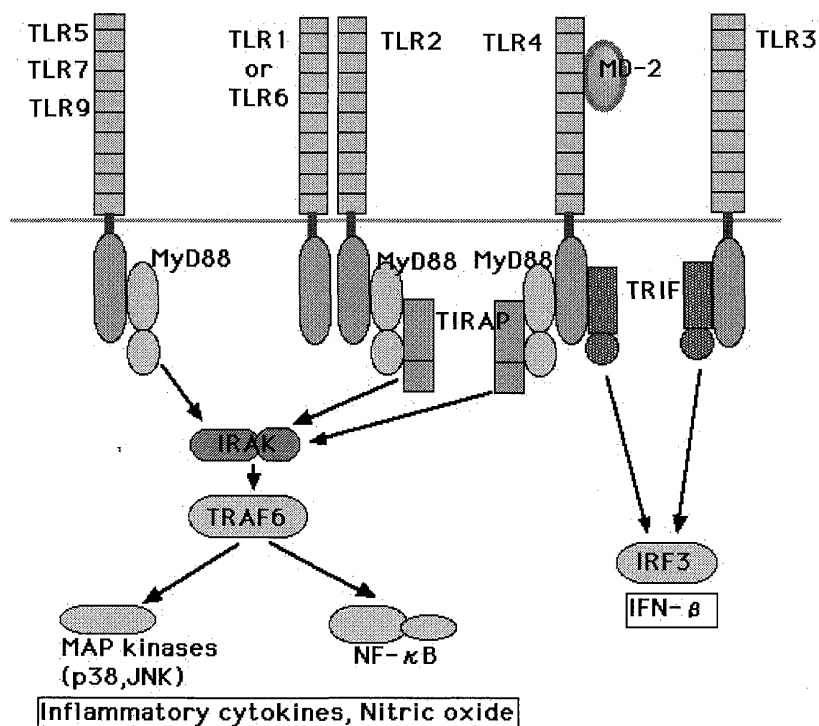
Toll はショウジョウバエの初期発生において形態形成に関わる分子として同定されたが、1996年 Hoffmann らのグループにより感染防御に極めて重要な役割をはたしている事が報告された。1997年以降、ヒトおよびマウスにおいてショウジョウバエ Toll のホモログが次々とクローニングされ、Toll-like receptors (TLRs) と命名された。現在、哺乳類において TLR1-12 が同定され、それらのリガンドおよびシグナル伝達分子につき検討されている。その中でも細菌成分の認識に重要であり研究が進んでいるのが TLR2, TLR4 および TLR9 である。TLR2 は細菌成分のうちの peptidoglycan (PGN), lipoprotein, lipoarabinomannan 等を認識し、TLR4 はグラム陰性菌の lipopolysaccharide (LPS) を認識する受容体である。グラム陽性菌に存在する LTA は TLR2 および TLR4 両受容体によって認識されるという報告がある。TLR9 は細

菌由来非メチル化 CpG-DNA を認識し、Th1 サイトカイン誘導に働く事で抗腫瘍免疫における重要性が示唆されている。また、特に TLR4 シグナリングにおいては、MD-2 が重要な補助因子として働いている事が報告されている。すなわち MD-2 は TLR4 シグナル伝達系における補助受容体であり、細胞膜上で TLR4 とヘテロ複合体 (TLR4/MD-2 複合体) を形成し、細菌成分の認識およびシグナル伝達を司っている。TLRs より伝えられたシグナルは myeloid differentiation protein (MyD) 88, IL-1R-associated kinase (IRAK), そして TNFR-associated factor (TRAF) 6 を介して、転写因子 nuclear factor (NF)- $\kappa$ B や mitogen-activated protein kinases (MAPKs) を活性化する事により、サイトカイン産生等に働く。また、最近では、TLR4/MD-2 複合体より入ったシグナルが MyD88 を介さずに直接に転写因子 IFN-regulatory factor (IRF) 3 を活性化させる新しい経路も報告されている (図3)<sup>14)</sup>。

OK-432 はレンサ球菌製剤であり、OK-PSA はその活性成分である。したがって、その効果発現には TLRs および MD-2 が密接に関係している事が強く示唆される。我々は、OK-432 および OK-PSA の抗腫瘍免疫活性発現において、TLR2 あるいは TLR4/MD-2 複合体がその標的分子となっているのではないかとの仮説を立て、この事につき分子生物学的に検索したので報告する。

### 2.2. OK-432/OK-PSA の効果発現と TLR4シグナリング

我々は、まず、NF $\kappa$ B-dependent luciferase reporter plasmid

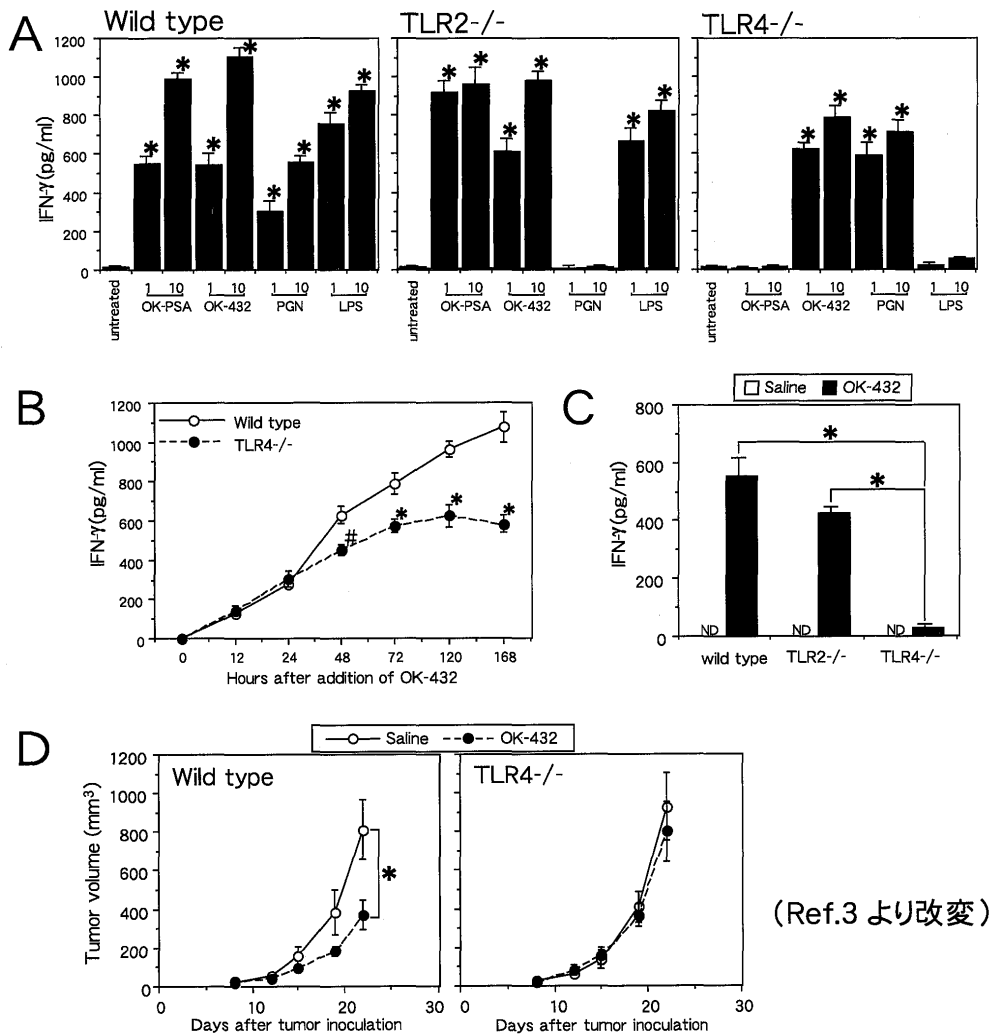


(Ref.14より引用)

図3 TLRs シグナル伝達経路

を用いた luciferase assay にて, OK-432 あるいは OK-PSA のシグナルが TLR2 あるいは TLR4/MD-2 複合体を介して伝達され, NF- $\kappa$ B を活性化するか否かを検索した。OK-PSA 刺激にて, TLR4 発現細胞で NF- $\kappa$ B 活性の上昇を認め, TLR4/MD-2 発現細胞ではより強い活性を認めた。TLR2 発現細胞では OK-PSA 刺激で活性は認められなかった。一方, OK-432 処理では全ての細胞で NF- $\kappa$ B 活性の上昇は認められなかった。この結果から, OK-432 活性成分 OK-PSA が TLR4/MD-2 のリガンド活性を保有する事, また OK-432 は菌体であるため, そのままの状態では細胞表面上の TLR に結合するのは困難である事が強く示唆された。次に, TLR2 $^{-/-}$  および TLR4 $^{-/-}$  マウスより採取された脾細胞を, OK-432 および OK-PSA で48時間刺激し, IFN- $\gamma$  誘導につき検索した。OK-PSA の IFN- $\gamma$  誘導活性は TLR4 $^{-/-}$  マウスにおいてほぼ完全に消失したのに対し, OK-432 は全ての

マウスにおいて IFN- $\gamma$  を誘導した (図 4 A)。さらに, TLR4 $^{-/-}$  脾細胞を OK-432 で7日間処理した後 IFN- $\gamma$  産生を検討したところ, 野生型マウスと比較して IFN- $\gamma$  産生量は約 1/2 量であった (図 4 B)。OK-432 を野生型および TLR4 $^{-/-}$  マウス腹腔内に投与した後, 血清中の IFN- $\gamma$  を測定したところ, TLR4 $^{-/-}$  マウスでは IFN- $\gamma$  産生を誘導しなかった (図 4 C)。菌体である OK-432 はまず脾細胞中の貪食細胞によって取り込まれる。細胞は貪食にともなう刺激により一過性に活性化しサイトカインを産生するが, その後放出された活性分子と TLR4 との結合がなければ持続的にサイトカインを産生する事はできず, *in vivo* の環境において血清中にほとんど検出できないレベルになる事が強く示唆された。野生型および TLR4 $^{-/-}$  マウスに同系腫瘍細胞を移植し OK-432 で治療を行なったところ, 野生型マウスでは OK-432 投与により腫瘍増殖抑制効果が現れたのに対し, TLR4 $^{-/-}$  マウス



(Ref.3 より改変)

図 4 OK-432/OK-PSA の免疫活性における TLR4 の役割 (A) マウス脾細胞を OK-432/OK-PSA で48時間処理した時の培養上清中 IFN- $\gamma$  濃度。(B) マウス脾細胞を OK-432 で 0-168時間処理した時の培養上清中 IFN- $\gamma$  濃度。(C) OK-432 をマウス腹腔内に投与した時の血清中 IFN- $\gamma$  濃度。(D) 抗腫瘍効果。\*,  $p < 0.01$ 。

ではOK-432は抗腫瘍効果を発現しなかった(図4D)。我々はさらに、TLR4<sup>-/-</sup>マウス由来脾細胞にTLR4遺伝子を導入したところ、これらの脾細胞はOK-PSAに対する反応性を獲得し、IFN- $\gamma$ を産生する事も確認している<sup>3,15,16</sup>。

### 2.3. TLR4を介したOK-432効果発現メカニズム

#### — 貪食と活性成分の放出 —

前説で述べた実験結果より得られた仮説、すなわちOK-432の貪食、活性成分の放出とTLR4との結合とシグナル伝達を介した抗腫瘍免疫活性の発現につき、*in vitro*実験系にて検討した。マウス腹腔マクロファージ(PM)あるいはヒトDCをOK-432で処理すると、サイトカインを産生するが、この時貪食阻害剤サイトカラシンBで前処理する事によりOK-432のサイトカイン誘導活性は有意に抑制された。OK-432の活性成分OK-PSAを認識する単クローン抗体TS-2を用いた間接蛍光抗体法によりOK-432がDCやPMにより貪食され分解を受ける事が明らかになった(図5A)。さらに、OK-432でDCを処理した時の培養上清中にTS-2抗体により認識される成分OK-PSAの存在が示され、同上清はTLR4強制発現細胞株においてNF- $\kappa$ Bの転写活性を増強させた。この活性はTS-2抗体あるいは抗TLR4抗体にて有意に抑制された(図5B)。以上より、OK-432はまず貪食細胞により取り込まれ、分解され、放出された活性分子OK-PSAがTLR4シグナルを活性化する事により抗腫瘍免疫活性を発現する事(図5C)が明らかとなった<sup>17</sup>。

次に、我々は、TLR4およびMD-2遺伝子発現とOK-432の臨床効果との関連性を口腔癌患者において検討した。

### 2.4. TLR4/MD-2遺伝子発現とOK-432の治療効果 — 臨床研究 —

徳島大学病院第二口腔外科にて治療のためOK-432を投与された口腔癌患者のうち、本研究への協力の同意を得られた28例の口腔癌患者を対象とした。検索結果を表1に示す。患者より採取したPBMCを半定量reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法にて、TLR4およびMD-2遺伝子発現につき検索した。28例中TLR4(-)症例は2例(7.1%)、MD-2(-)症例6例(21.4%)が認められた。患者PBMCをOK-PSA(1  $\mu$ g/ml)で24時間処理後、全RNAを抽出し、IFN- $\gamma$  mRNAの発現につき半定量RT-PCR法にて検索したところ、TLR4(-)あるいはMD-2(-)の8例は全てOK-PSAによるIFN- $\gamma$  mRNA発現増強は認められなかった。TLR4(+)/MD-2(+)の20例においてはわずかに1例のぞいて全ての症例で、OK-PSA刺激によりIFN- $\gamma$  mRNA発現増強を認めた(95%)。尚、今回のRT-PCRの条件下では、未処理PBMCでは全ての症例において、IFN- $\gamma$  mRNAの発現は認められなかった。さらに、我々はOK-432を腫瘍周囲あるいは肩部皮下に投与された患者より投与24時間後に血清を採取し、IFN- $\gamma$ 蛋白量をELISAにて検索した。OK-432投与により血清中にIFN- $\gamma$ が検出された症例は21例(75%)、検出されなかった

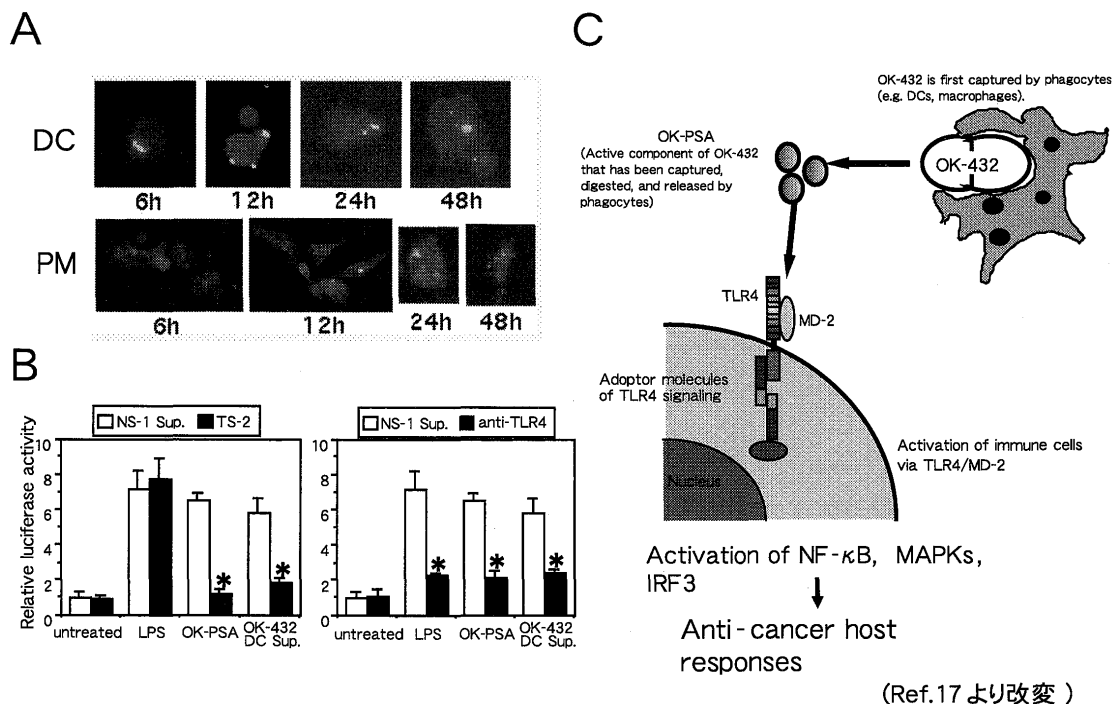


図5 (A) 抗OK-PSA抗体TS-2を用いた間接蛍光抗体法。(B) TLR4強制発現細胞株およびNF- $\kappa$ B依存性レポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイ。(C) 貪食とTLR4シグナルを介したOK-432活性発現メカニズム。\*,  $p < 0.01$ 。

表1 末梢血 TLR4/MD-2 遺伝子発現と OK-432 + UFT + 放射線同時併用療法の治療効果との関係

TLR4	MD2	症例数	OK-PSAの in vitro 処理による IFN- $\gamma$		OK-432投与後の末梢血中 IFN- $\gamma$		臨床効果	
			(-)	(+)	(-)	(+)	PR	CR
+	+	20	0	20	1	19	10	10
+	-	6	6	0	4	2	6	0
-	+	2	2	0	2	0	2	0

(Ref.3 より改変)

症例が7例（25%）であった。TLR4(-)あるいはMD-2(-)の8症例中IFN- $\gamma$ が誘導されなかった症例が6例（75%）存在した。TLR4(+)/MD-2(+)症例では20例中19例（95%）でIFN- $\gamma$ の誘導が認められた。尚、OK-432投与前の血清中IFN- $\gamma$ 濃度は検索された全ての患者において、検出限界（7.8 pg/ml）未満であり、OK-432投与後IFN- $\gamma$ が検出された症例は全て、OK-432に反応したと判断した。口腔癌患者において、OK-432投与によるIFN- $\gamma$ の誘導は、TLR4/MD-2遺伝子発現と高い関連性を認めた。検討された患者は全てOK-432 + UFT + 放射線同時併用による術前療法が施行されている。その臨床効果とTLR4/MD-2遺伝子発現との関連性を検討したところ、TLR4(+)/MD-2(+)症例20例中10例（50%）で腫瘍の完全緩解（CR）を認め、手術なしで治癒したのに対し、TLR4(-)あるいはMD-2(-)の8例においてはCRは全く認められなかった<sup>3)</sup>。この事からTLR4/MD-2遺伝子発現が、OK-432に対するResponder/Nonresponderの判別において極めて有用なマーカーとなりうる事、さらにはNonresponderにおいては、TLR4あるいはMD-2遺伝子導入療法が、OK-432に対する反応性を獲得させるために効果的である可能性が示唆された。この事は前述のin vitroにおける遺伝子導入実験の結果からも強く支持される。

OK-432菌体には核酸成分も含まれており、OK-432の生物活性において核酸成分が重要な働きをしている可能性が古くから論じられてきた。我々はOK-432が非メチル化CpGモチーフを有するDNAを含有しており、これがTLR9を介して免疫活性を増強させる事、しかしながらOK-432の抗腫瘍免疫活性においてdominantに働いているのはTLR4/MD-2シグナルでありTLR9シグナルの役割は極めて限られたものである事を報告した<sup>18)</sup>。ところが最近我々の共同研究者らのグループが、肝臓癌においてはOK-432のTLR4を介さない免疫賦活活性が重要である事を発見した<sup>19)</sup>。癌の発生する臓器によって働く免疫細胞も違って来る。当然働く分子も違う事が考えられる。さらなる研究課題といえよう。

### 3. OK-432/OK-PSAのDC療法への応用

生体内で、癌抗原特異的細胞障害性T細胞（CTL）を誘導し、治療効果を得ようとする試みの中で、

professionalな抗原提示細胞である樹状細胞（DC）を用いた免疫療法が注目されている。DCは通常腫瘍内で未熟な状態で存在する。未熟DCは癌抗原を取り込んだ後、適切に成熟すると近傍のリンパ節へ移動し、T細胞に抗原を提示する。T細胞はこれを認識し、CD8+T細胞はCTLに、CD4+T細胞はTh細胞に分化し癌細胞の拒絶に働く。患者末梢血より試験管内でDCを誘導する方法が確立され、DC療法は多くの施設で試みられる様になった。近年、我々のグループを含め幾つかの施設よりOK-432のDC成熟化、活性化に関する報告がなされ、OK-432がDC療法の有用なアジュバントになる可能性が示唆されている。我々の近年の研究結果より、OK-432/OK-PSAが強いDC成熟活性を有し、口腔癌に対するDC療法において極めて有用なアジュバントになる事を示唆するデータが得られた。本節では、我々が施行した口腔癌に対するOK-432/OK-PSA併用DC腫瘍内投与療法についての基礎的、臨床的検討の結果を紹介する。

#### 3.1. DC療法一局所投与と全身投与

我々は口腔癌に対してDCの腫瘍内投与療法を計画した。DC療法は、(1)試験管内で癌抗原（腫瘍溶解液、タンパク、ペプチド、核酸）をパルスした成熟DCを作成し、所属リンパ節近傍あるいは全身的に投与する方法と、(2)試験管内で作製したDCを直接腫瘍内に投与し、（試験管内ではなく）腫瘍組織内において癌抗原を取り込ませる方法に大別できる。多くの領域の癌では局所投与が困難であり、(1)の方法が広く試みられている。同療法で問題となるのは抗原が必要であるという点である。必要量の抗原（腫瘍溶解液や腫瘍由来核酸）が適切な条件で得られない症例では施行できない。また、特定の癌抗原ペプチドやタンパクを使用する場合は腫瘍組織における抗原の多様性や変化に対応できない可能性があり必ずしも期待された治療効果は得られていない。対して(2)の腫瘍内投与は、癌抗原を準備する必要がなく、癌組織が保有する全ての抗原を網羅できるという利点がある。癌組織内に移入されたDCはリンパ流路に乗って所属リンパ節に到達しやすいとも考えられる。欠点としては、癌抗原を貪食させるために未熟なDCを投与すると、これが確実に成熟しているか否かは極めて曖昧である。すなわち組織内で確実にDCを成熟させるための優れた

アジュバントが必要不可欠である。

口腔癌は特異抗原が明らかになっていない。また、腫瘍内投与が比較的簡便に行う事ができる。そこで、我々は口腔癌に対しDC腫瘍内投与療法を試みる事にし、局所DC療法におけるOK-432/OK-PSAの併用効果を検討した。

### 3.2. OK-432/OK-PSAのDCに対する作用

#### —基礎的検討—

我々は、OK-432のみならずOK-PSAもDCを成熟させ、癌抗原特異的CTLを誘導し、抗腫瘍効果を発現する事、同活性はTLR4シグナルを介するものである事を報告した<sup>20)</sup>。すなわちOK-432がDC療法の効果的なアジュバントとなりうる事が強く示唆された。

一方、腫瘍内投与したDCが癌抗原を効率良く取り込むためには、癌細胞がアポトーシスあるいはネクローシスを起こしている必要がある。口腔癌において細胞死を誘導するためには、放射線療法や様々な抗癌剤が考えられるが、これらは重篤な宿主免疫能の低下を引き起こす。我々は癌細胞死を誘導するために先行投与する抗癌剤として経口5-FU系抗癌剤TS-1を選択した。我々は低濃度の5-FUがTh1型免疫反応を誘導し抗腫瘍免疫を上昇させる可能性がある事を既に報告している<sup>21,22)</sup>。TS-1を先行投与して癌細胞死を誘導した後、未熟DCを腫瘍内投与して癌抗原を貪食させ、OK-432腫瘍内投与によりこれを成熟させ、癌抗原特異的CTLを誘導し治療効果を得るというコンセプトのもと、動物実験にてその治療効果を検討した。

同系線維肉腫Meth-A移植BALB/cマウスならびに同系口腔扁平上皮癌細胞SCCVII移植C3H/Heマウスの2モデルにて検討した。両側の背部皮下に腫瘍を移植し、5日目よりTS-1(100 µg/日)を経口にて7日間投与し、同系マウス骨髄細胞よりGM-CSFおよびIL-4で誘導したDCを右側腫瘍内に投与し、その6時間後にOK-432(100 µg)を右腫瘍内に投与した。TS-1投与で抗腫瘍効果が認められたがTS-1終了後より著明な腫瘍の再増殖を認めた。TS-1終了後にDC+OK-432局所投与を行う事により強力な抗腫瘍効果が得られ8匹中4匹のマウスで腫瘍は完全に消失した。この効果はDCのみ、あるいはOK-432のみを投与した時と比較して有意に強いものであった。興味深い事に、DCおよびOK-432を投与していない左側腫瘍においてもほぼ同様の結果が得られた(図6AおよびB)。DC局所投与によって誘導されたCTLが全身的に効果を及ぼしている事が示された。生存日数も有意に延長した(図6C)。同治療終了後23日目のリンパ節細胞および脾細胞において、移植腫瘍Meth-Aに対する著明なMHC class I拘束性CD8+T細胞によるCTL活性が確認され、癌抗原に対するメモリーが誘導されている事も明らかになった。口腔扁平上皮癌移植マウスにおいても同様の結果が得られた<sup>23)</sup>。

OK-PSAによるDC成熟化とTLR4シグナルとの関連性につき検討した。結果を図7Aに示す。TLR4(+)/MD-2(+)/患者由来DCはOK-PSA刺激により、成熟化マーカーMHC class II, CD80, CD83, CD86分子の発現増強とIL-12産生の上昇を認め、OK-PSA刺激DCはアロT細胞を刺激しIFN-γを誘導した。TLR4(-)患者由

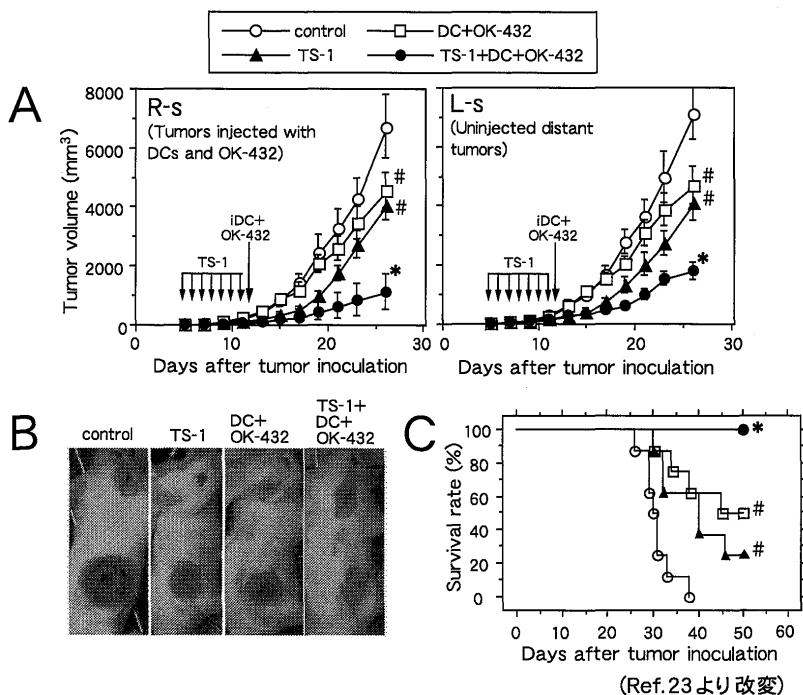


図6 TS-1 および OK-432 併用 DC 腫瘍内投与療法の抗腫瘍効果 (A) 腫瘍体積の推移。(B) 腫瘍体積 (病態写真)。(C) 生存率。\*, p < 0.01; #, p < 0.05。



来 DC ではこれらの活性は発現されなかったが、TLR4 遺伝子を導入する事により OK-PSA に対する反応性を獲得し、IL-12 を産生し、アロ T 細胞を刺激し IFN- $\gamma$  を誘導した。次に、野生型および TLR4<sup>-/-</sup> マウスにおいて、OK-PSA 併用 DC 腫瘍内投与療法の抗腫瘍効果につき検討した（図 7 B）。担癌野生型マウスにおいて、DC + OK-PSA 腫瘍内投与は有意な腫瘍増殖抑制効果を発現したが、TLR4<sup>-/-</sup> マウスでは同療法は抗腫瘍効果を発現しなかった。ところが、TLR4<sup>-/-</sup> マウスにおいても野生型マウス由来の TLR4<sup>+/+</sup>DC および OK-PSA を投与した時は有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。TLR4 欠損宿主においても、局所投与する DC が TLR4 を発現していれば OK-PSA 併用により抗腫瘍効果を発現する事が明らかとなった<sup>20)</sup>。

以上の結果は、TLR4 あるいは MD-2 を発現していない OK-432/OK-PSA の non-responder への対処法の開発において大きな示唆を与えるものである。

### 3.3. 口腔癌に対する抗癌剤および OK-432 併用 DC 腫瘍内投与療法—臨床試験—

以上の基礎的検討の結果を基に、標準治療に対して

抵抗性の口腔癌患者に対して『抗癌剤および OK-432 併用 DC 腫瘍内投与療法』の早期臨床試験を開始した。プロトコルおよび要約を図 8 に示す。5 例中 1 例で完全奏功 (CR) を認めた。3 例で部分奏功 (PR), 1 例で安定病変 (SD) であった。ELISPOT 法により、5 例中 4 例の末梢血リンパ球において、癌抗原 CEA, Her2/neu あるいは MAGE3 のいずれかに対する特異的 IFN- $\gamma$  誘導活性が認められた。NIC 共通毒性基準による grade 3 以上の重篤な副作用は認めなかった。同治療法が標準治療抵抗性口腔癌において、安全かつ有効な治療法となる可能性が強く示唆された<sup>24)</sup>。

### おわりに

我々は OK-432 の抗腫瘍免疫活性に TLR4/MD-2 を介したシグナルが重要な役割を演じている事を明らかにし、世界で初めて分子レベルでの科学的根拠を示すとともに、OK-432 が DC を成熟させる事により癌抗原特異的免疫反応を誘導する事、さらに DC 療法の有用なアジュバントとなりうる事を示した。TLR4/MD-2 複合体を標的分子とした OK-432 効果発現のメカニズムをまとめる（図 9）。OK-432 菌体は、マクロファージや DC

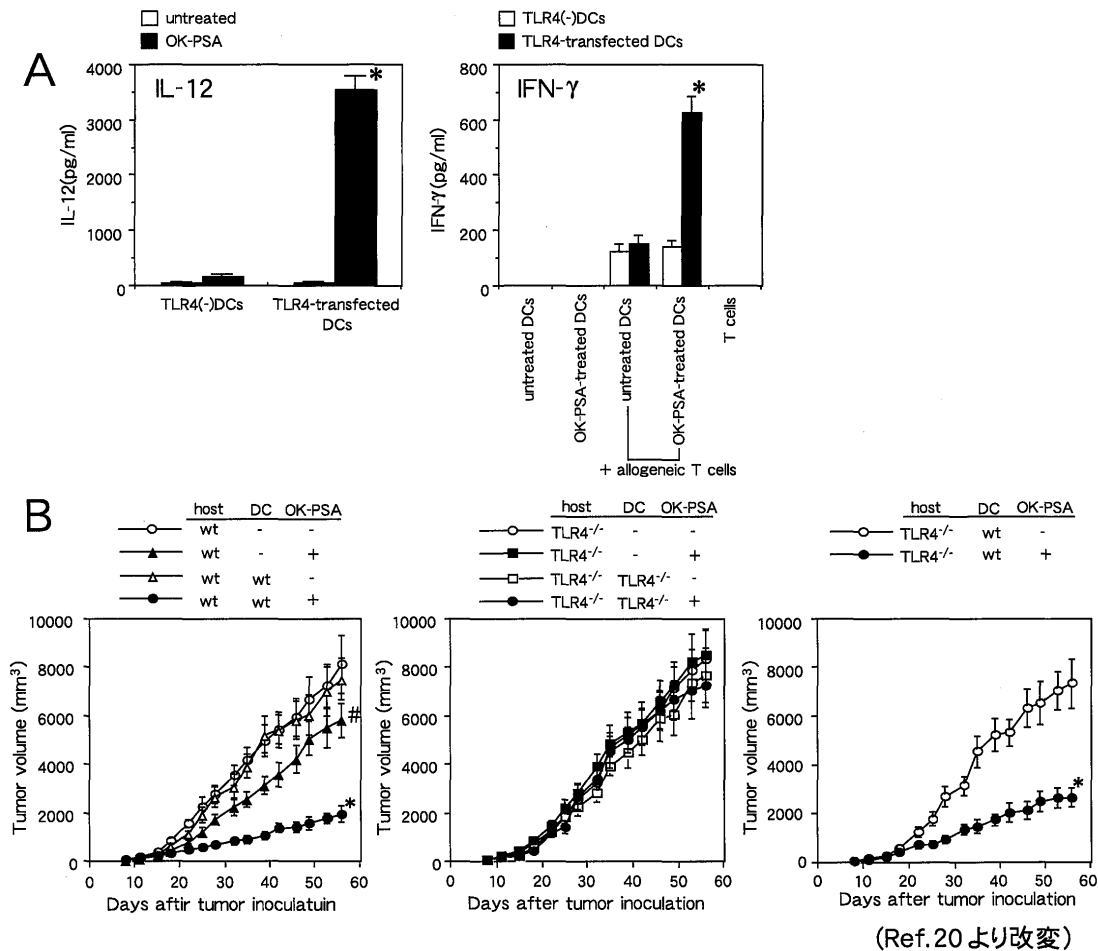
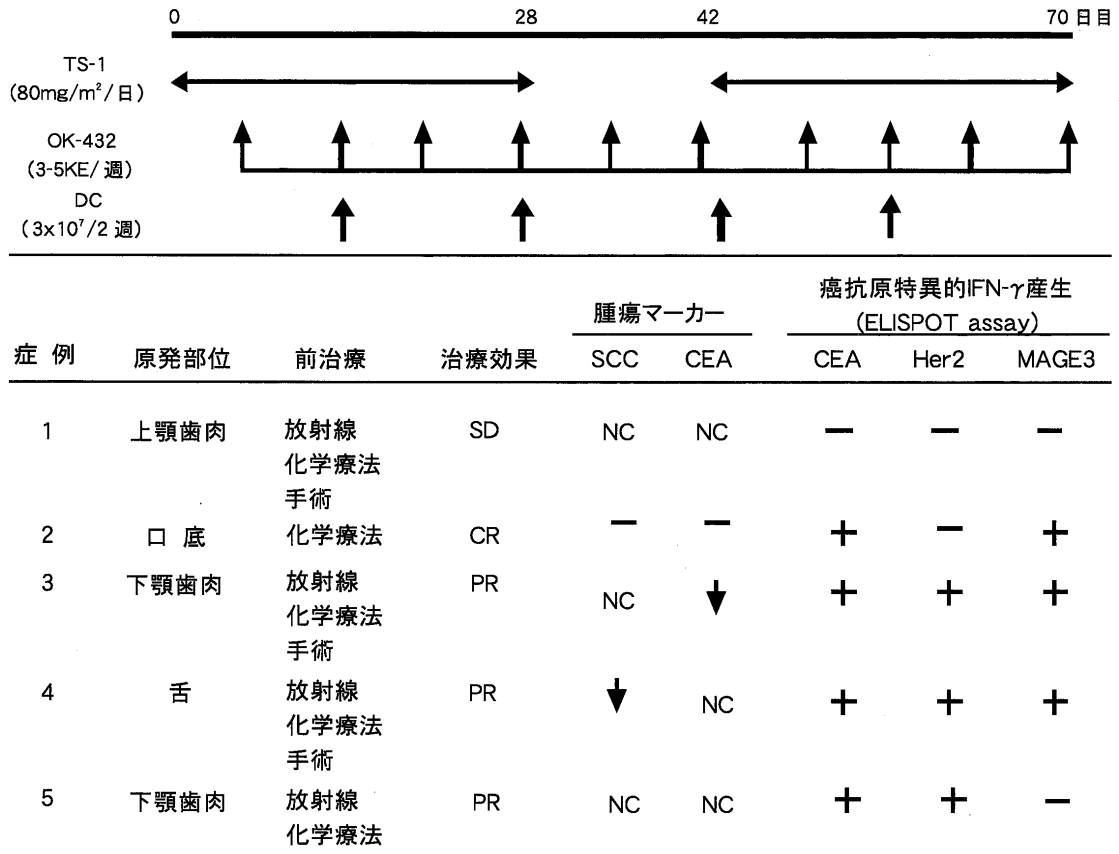
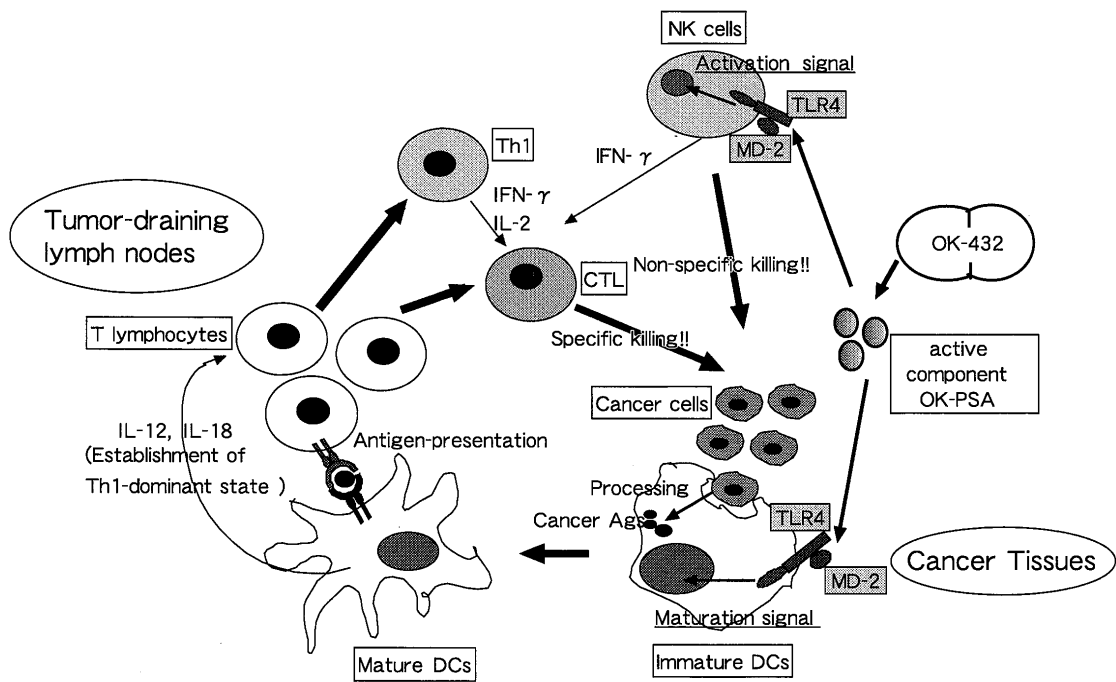


図 7 (A) OK-PSA の DC 成熟化における TLR4 の役割。(B) OK-PSA+DC 療法の抗腫瘍効果における TLR4 の役割。\*, p < 0.01; #, p < 0.05。



(Ref.24 より改変)

図8 口腔癌に対する TS-1 併用 DC および OK-432 腫瘍内投与療法 (早期臨床試験)



(著者作成)

図9 OK-432/OK-PSA の抗腫瘍免疫活性発現のメカニズム—自然免疫 (非特異免疫) の先行的活性化と獲得免疫 (特異免疫) の誘導—

等の貪食細胞により取り込まれ、放出された活性成分 (LTA 関連分子 OK-PSA) が TLR4シグナルを活性化する事により非特異的ならびに特異的免疫活性を発現する。すなわち, (1)TLR4/MD-2 を発現する NK 細胞 (さらには  $\gamma\delta$ T 細胞や抗腫瘍性マクロファージ) を活性化し, 非特異的キラー活性を誘導する。(2)癌抗原を貪食した DC を成熟させる事により癌抗原特異的 T 細胞を誘導する。この時 OK-432/OK-PSA 刺激 DC は IL-12, IL-18を強く誘導し, Th1細胞を誘導し, Th1細胞は IFN- $\gamma$ , IL-2を産生する。この様な Th1 環境化で抗原提示が行なわれる事によって癌抗原特異的 CTL が優位に誘導され, 強い抗腫瘍免疫が誘導されると考えられる。

OK-432は, いわゆる“非特異的免疫療法剤”と位置づけられ, “非特異的免疫療法から特異的免疫療法へ”という流れのもと, “old BRM”とも呼称されるようになった。本稿で紹介したように, OK-432 は強力な DC 成熟化能を保有しており, 加えて強力な Th1 インデューサーである。癌抗原特異的 CTL の誘導には Th1 環境下で DC が T 細胞に抗原を提示する必要があるが, OK-432 が癌抗原特異的免疫反応を誘導する事が明らかになった事は, 今後の癌免疫療法において極めて重要な事であると考えられる。我々が OK-432 を中心に抗癌免疫研究を進めてきた過程において, TLRs の発見に代表される自然免疫研究の著しい進歩がみられ, 抗原特異的獲得免疫の確立のためには TLRs を介した自然免疫の先行的活性化が必須である事が明らかになり, さらに自然免疫と獲得免疫の橋渡しとなる重要な細胞として樹状細胞が再認識された事が, 我々の研究を強く支持した事はまぎれもない事実であり, 自然免疫研究の先駆者たちに感謝し敬意を表したい。

OK-432 は, 癌抗原特異的な免疫療法の効果を増強させる免疫アジュバントとして, 極めて重要な位置づけにある薬剤と考えられる。現状, 癌治療は, いわゆる 3 大療法, すなわち手術, 放射線, 化学療法を中心として行なわれているが, 必ずしも患者様に満足のいく治療効果は得られていない。今後さらに研究を続け, 第 4 の治療法といわれる免疫療法を, 科学的根拠をもって提供する事で, QOL の改善を伴った延命を目的とした, より良い癌治療法の開発を目指して行きたいと考えている。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり, 私が徳島大学歯学部第二口腔外科入局時に「癌免疫研究」という課題を頂き, 以来退官されるその日まで変わらぬ御指導を賜った佐藤光信前第二口腔外科教授ならびに大学院時代の指導教官吉田秀夫助教授, 加治亮詞博士, さらに私の研究を支えて頂いた第二口腔外科免疫グループの先生たち (合田永先生, 大江剛先生, 押川哲也先生, 古市幸子先生, 西川英知先生, 田野智之先生, Sharif Uddinn Ahmed 先生) に心から謝意を表します。また, 本総説執筆の機会を与えて頂

きました分子薬理学分野吉本勝彦教授に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Okamoto H, Shoin S, Koshimura S and Shimizu R : Studies on the anticancer and streptolysin S-forming abilities of hemolytic streptococci. *Jpn J Microbiol* 11, 323-336 (1967)
- 2) Sato M, Harada K, Yoshida H, Yura Y, Azuma M, Iga H, Bando T, Kawamata H and Takegawa Y : Therapy for oral squamous cell carcinoma by tegafur and streptococcal agent OK-432 in combination with radiotherapy : Association of the therapeutic effect with differentiation and apoptosis in the cancer cells. *Apoptosis* 2, 227-238 (1997)
- 3) 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 and Sato M : Involvement of Toll-like receptor 4 signaling in interferon- $\gamma$  production and anti-tumor effect by a streptococcal agent OK-432. *J Natl Cancer Inst* 95, 316-326 (2003)
- 4) Okamoto M, Kaji R, Kasetani H, Yoshida H, Moriya Y, Saito M and Sato M : Purification and characterization of interferon- $\gamma$ -inducing molecule of OK-432, a penicillin-killed streptococcal preparation, by monoclonal antibody neutralizing interferon- $\gamma$ -inducing activity of OK-432. *J Immunother* 13, 232-242 (1993)
- 5) Takada H, Kawabata Y, Arakaki R, Kusumoto S, Fukase K, Suda Y, Yoshimura T, Kokeyuchi S, Kato K and Komuro T : Molecular and structural requirements of a lipoteichoic acid from enterococcus hirae ATCC 9790 for cytokine-inducing, antitumor, and antigenic activities. *Infect Immun* 63, 57-65 (1995)
- 6) Fischer W. Bacterial phospholipids and lipoteichoic acids. In: Fates K, ed. *Glycolipids, phosphoglycolipids, and sulfoglycolipids*. Handbook of Lipid Reserch, vol. 6 p123-234, New York: Plenum Press (1990)
- 7) Okamoto M, Gohda H, Ohe G, Yoshida H, Matsuno T, Saito M and Sato M: Cytokine-inducing activity and anti-tumor effect of a liposome-incorporated interferon- $\gamma$ -inducing molecule derived from OK-432, a streptococcal preparation. *J Immunother* 23, 94-103 (2000)
- 8) Okamoto M, Ohe G, Oshikawa T, Nishikawa H, Furuichi S, Yoshida H, Matsuno T, Saito M and Sato M: Induction of Th1-type cytokines by lipoteichoic acid-related preparation isolated from OK-432, a penicillin-killed streptococcal agent. *Immunopharmacol* 49, 363-376 (2000)
- 9) Okamoto M, Ohe G, Oshikawa T, Furuichi S, Nishikawa

- H, Tano T, Ahmed SU, Yoshida H, Moriya Y and Saito M, Sato M: Enhancement of anti-cancer immunity by lipoteichoic acid-related molecule isolated from a penicillin-killed group A *Streptococcus*. *Cancer Immunol Immunother* 50, 408-418 (2001)
- 10) Okamoto M, Oshikawa T, Ohe G, Furuichi S, Nishikawa H, Tano T, Bando T, Yoshida H, Matsubara S, Matsuno T, Saito M and Sato M: Comparison of Cytokine-Inducing Activity in a Lipoteichoic Acid-Related Molecule Isolated from a Penicillin-Killed Group A *Streptococcus* and from the Untreated Bacteria. *Int Immunopharmacol* 1, 1957-1968 (2001)
  - 11) Okamoto M, Ohe G, Furuichi S, Nishikawa H, Oshikawa T, Tano T, Ahmed SU, Yoshida H, Moriya Y, Matsubara S, Ryoma Y, Saito M and Sato M: Enhancement of anti-tumor immunity by lipoteichoic acid-related molecule isolated from OK-432, a streptococcal agent, in athymic nude mice bearing human salivary adenocarcinoma: Role of natural killer cells. *Anticancer Res* 22, 3229-3240 (2002)
  - 12) Oshikawa T, Okamoto M, Tano T, Sasai A, Kan S, Moriya Y, Ryoma Y, Saito M, Sato M: Involvement of nitric oxide in anti-tumor effects of OK-432, a streptococcal anti-tumor immunotherapeutic agent. *Int Immunopharmacol* 6, 764-773 (2006)
  - 13) Horiuchi Y, Bae SJ, Katayama I, Oshikawa T, Okamoto M and Sato M: Lipoteichoic acid-related molecule derived from the streptococcal preparation, OK-432, which suppresses atopic dermatitis-like lesions in NC/Nga mice. *Arch Dermatol Res*, 298, 163-173 (2006)
  - 14) Akira S, Uematsu S and Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 203-214 (2006)
  - 15) Okamoto M, Oshikawa T, Ohe G, Nishikawa H, Furuichi S, Tano T, Moriya Y, Saito M and Sato M: Severe Impairment of Anti-cancer Effect of lipoteichoic acid-related molecule isolated from a penicillin-killed *Streptococcus pyogenes* in toll-like receptor 4-deficient mice. *Int Immunopharmacol* 1, 1789-1795 (2001)
  - 16) Oshikawa T, Okamoto M, Ohe G, Furuichi S, Nishikawa H, Ahmed SU, Yoshida H, Moriya Y, Matsubara S, Ryoma Y, Saito M and Sato M. Anti-tumor response induced by the fractions derived from OK-432, a streptococcal preparation, by using a monoclonal antibody TS-2 that neutralizes the interferon- $\gamma$ -inducing activity of OK-432: comparison between the TS-2-binding and TS-2-unbinding fraction. *Int Immunopharmacol* 3, 643-655 (2003)
  - 17) Okamoto M, Oshikawa T, Tano T, Ahmed SU, Kan S, Sasai A, Akashi S, Miyake K, Moriya Y, Ryoma Y, Saito M and Sato M. Mechanism of anti-cancer host response induced by OK-432, a streptococcal preparation, mediated by phagocytosis and Toll-like receptor 4 signaling. *J Immunother* 29, 78-86 (2006)
  - 18) Oshikawa T, Okamoto M, Tano T, Sasai A, Kan S, Moriya Y, Ryoma Y, Saito M, Akira S and Sato M. Anti-tumor effect of OK-432-derived DNA: One of the active constituents of OK-432, a streptococcal immunotherapeutic agent. *J Immunother* 29, 143-150 (2006)
  - 19) Homma S, Sagawa Y, Komita H, Koido S, Nagasaki E, Ryoma Y and Okamoto M: Mechanism of antitumor effect on mouse hepatocellular carcinoma by intratumoral injection of OK-432, a streptococcal preparation. *Cancer Immunol Immunother*, in press (2007)
  - 20) Okamoto M, Furuichi S, Nishioka Y, Oshikawa T, Tano T, Ahmed SU, Takeda K, Akira S, Ryoma Y, Moriya Y, Saito M, Sone S and Sato M. Expression of Toll-like receptor 4 on dendritic cells is significant for anti-cancer effect of dendritic cell-based immunotherapy in combination with an active component of OK-432, a streptococcal preparation. *Cancer Res* 64, 5461-5470 (2004)
  - 21) Okamoto M, Kasetani H, Kaji R, Goda H, Ohe G, Yoshida H and Sato M: Cis-diamminedichloroplatinum and 5-fluorouracil are potent inducers of the cytokines and natural killer cell activity in vivo and in vitro. *Cancer Immunol Immunother* 47, 233-239 (1998)
  - 22) Okamoto M, Ohe G, Oshikawa T, Nishikawa H, Furuichi S, Yoshida H and Sato M: Induction of cytokines and killer cell activities by cisplatin and 5-fluorouracil in head and neck cancer patients. *Anti-Cancer Drug* 11, 165-173 (2000)
  - 23) Ahmed SU, Okamoto M, Oshikawa T, Tano T, Sasai A, Kan S, Hiroshima T, Ohue H, Moriya Y, Ryoma Y, Saito M and Sato M. Anti-tumor effect of an intratumoral administration of dendritic cells in combination with TS-1, an oral fluoropyrimidine anti-cancer drug, and OK-432, a streptococcal immunopotentiator: Involvement of Toll-like receptor 4. *J Immunother* 27, 432-441 (2004)
  - 24) Okamoto M and Sato M. Streptococcal preparation, OK-432-based immunotherapy for head and neck cancer: Possible stimulation of dendritic cells via Toll-Like Receptor 4. In R.M. Mohan (ed.), *Res Adv in Cancer*, Vol 5, p61-76, Global Research Network, Kerala, India (2005)