

## たばこタール抵抗性細菌と発がん

藤木 博太\*、葛原 隆\*、末永みどり\*  
菅沼 雅美\*\*、駒形 浩史\*\*

### はじめに

発がんに関連するとの考えは決して新しくはない。しかし、最近炎症のメディエーターがサイトカインやケモカインであることが分かってくると、これらの因子を指標として発がん性炎症を起こす微生物を検索、並びに微生物の発がん関連遺伝子を同定することが可能になった。例えば、胃の中は強酸性のため無菌だと考えられていたが、ピロリ菌は胃の粘膜下に生息しており、ピロリ菌は内因性発がんプロモーターである TNF- $\alpha$  をヒトの細胞に誘導する遺伝子 *Tip \alpha* をコードしている<sup>1)</sup>。この研究対象は発がんイニシエーション以後の多段階発がんの段階に当てはまる。肺がんの発症に関連する TNF- $\alpha$  誘導微生物が存在するとの考えで研究を始めた。たばこタールはこれらの微生物の生存に大きな選択性を与えているので、肺がんの発症に新しい解釈をもたらすと考える。

### たばこタール抵抗性細菌

肺がんによる死亡率が国内外で第一位を占めているので、肺がんの予防研究は重要である。しかし、フィンランドとアメリカで行われた  $\beta$ -カロテンによる肺がんの予防は、期待に反し、肺がんの増加をもたらした<sup>2)3)</sup>。その理由を討議するアメリカがん学会のシンポジウムでは、がん予防対象者ががん予防期間中でも喫煙を続けていたと報告された。この説明を聞いた時に、たばこによる肺がんの発症は、単にたばこの煙

に発がん物質が含まれているからだという考えは、余りにも単純である。もっと複雑なたばこの影響を示す実験結果を提示することが必要だと感じた。

埼玉県立がんセンターから徳島文理大学薬学部へ研究グループの一部が異動した機会に、新しい発想での研究に着手した。同意を得た学生の口腔内細菌を培養し、次に、たばこタール 4 mg/ml で培養すると、たばこタール抵抗性細菌を 2 種類見出した。一つは病原性の *Staphylococcus aureus* 黄色ブドウ球菌で、20 名中 4 名に見出され、他は病原性が無い *Staphylococcus warneri* で 20 名中全員に見出された<sup>4)</sup>。たばこタール抵抗性菌がいろいろな人から分離されたので、黄色ブドウ球菌の一つの株を Sa-TA10、*S. warneri* の一株を Sw-TA75 と呼び、実験を進めた。

Sa-TA10 と Sw-TA75 の菌破壊タンパク液をヒト肺扁平上皮がん細胞 H226B やマウス Bhas 42 細胞 (*v-Ha-ras* 遺伝子を導入した BALB/3T3) に処理すると、タンパク質の濃度に依存して Sa-TA10 は TNF- $\alpha$  の遺伝子発現を誘導し、Sw-TA75 は誘導しなかった (図-1)<sup>4)</sup>。TNF- $\alpha$  はヒトの内因性発がんプロモーターとして作用するので<sup>5)</sup>、20% の健常人は口腔内に発がんプロモーターを分泌するたばこタール抵抗性細菌を常時持っていることが分かった。

### TNF- $\alpha$ 誘導黄色ブドウ球菌の発がん性

黄色ブドウ球菌 Sa-TA10 が分泌する TNF- $\alpha$  は内因性発がんプロモーターとして作用し、細胞をがん化 (形質転換) するか検討を始めた。

\* 徳島文理大学薬学部

\*\* 埼玉県立がんセンター

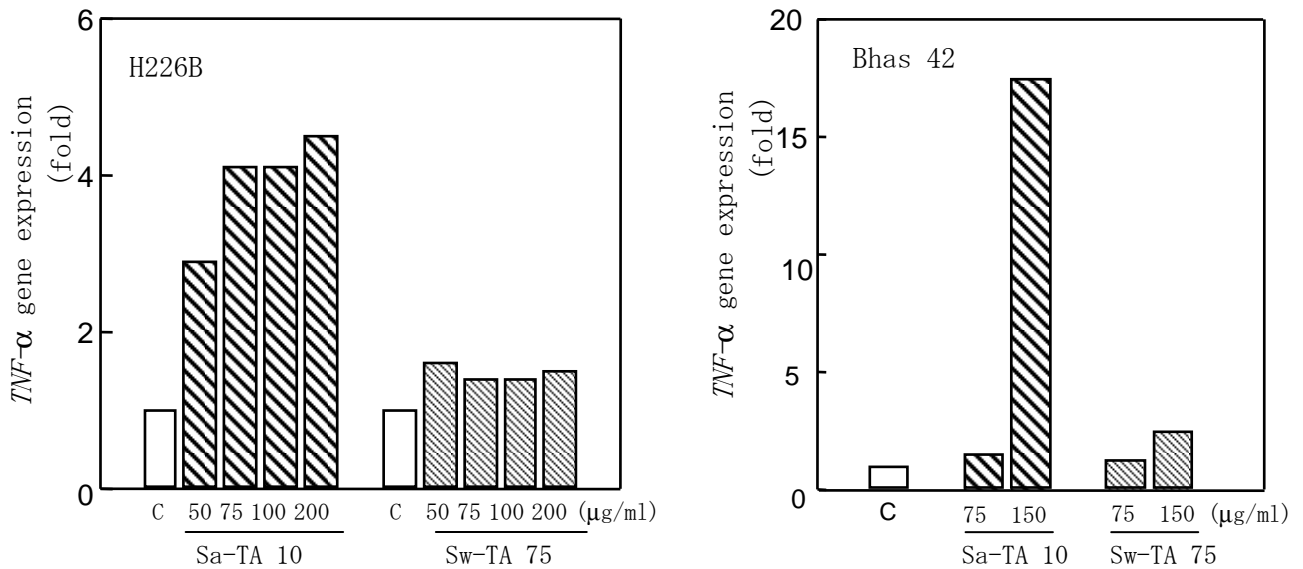


図-1 黄色ブドウ球菌 (Sa-TA10) と *S. warneri* (Sw-TA75) の破壊タンパク液処理による細胞での *TNF-α* 遺伝子の発現

*v-Ha-ras* 遺伝子を導入した Bhas 42 細胞を、Sa-TA10 と Sw-TA75 の菌破壊タンパク液 50 μg/ml、100 μg/ml で、それぞれ 1 日処理し、続いてタンパク溶液を含まない正常な培養液中で 2 週間維持した。Sa-TA10 の菌破壊タンパク液の処理は、図-2 に示すように直径 0.3 mm 以上の大きさのコロニー (形質転換巣) を沢山生じたが、Sw-TA75 の処理では未処理の場合と同等のコロニー数を生じた<sup>4)</sup>。この結果から Sa-

TA10 の黄色ブドウ球菌は細胞をがん化するポテンシャルを備えている、特に、発がんプロモーション活性を持った細菌であることが証明された。

この結果が得られた頃、Nature Medicine に M. I. Gomez らが、黄色ブドウ球菌の表面タンパクである protein A がヒトの呼吸上皮細胞の *TNF-α* 受容体 (TNFR1) に直接結合することを発表していた<sup>6)</sup>。そこで、Sa-TA10 も protein A

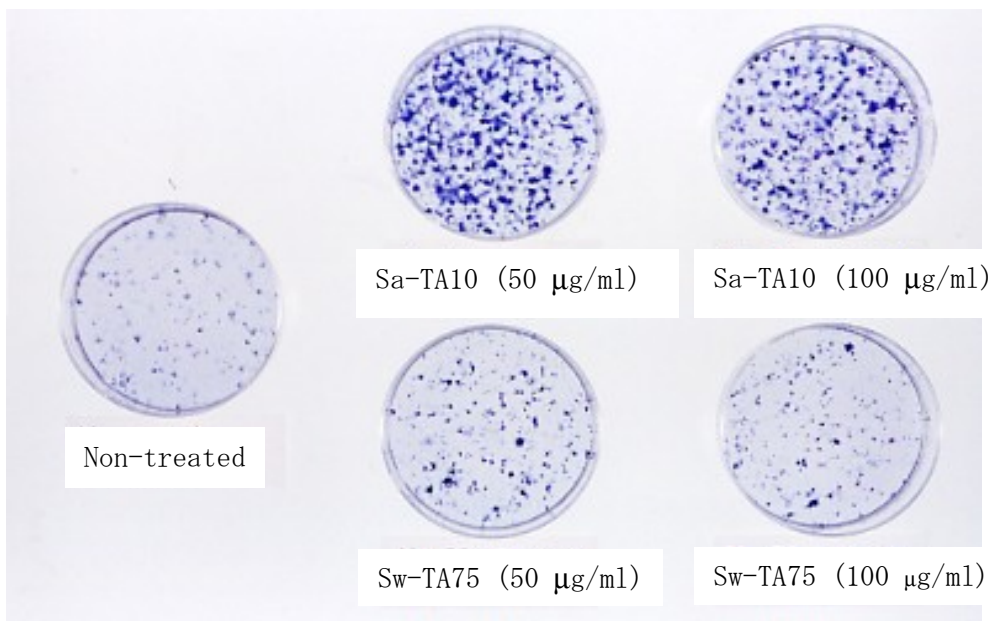


図-2 黄色ブドウ球菌 (Sa-TA10) と *S. warneri* (Sw-TA75) 破壊タンパク液処理による Bhas 42 細胞の形質転換

を産生していれば、ヒト上皮細胞の TNF- $\alpha$  受容体に結合して炎症症状を誘導すると考えた。私共は protein A の産生を検討する前に、先ず、protein A の遺伝子発現を Sa-TA10 とコントロールの黄色ブドウ球菌（大阪大学微生物病研究所より分与）について調べ、明らかに二つの黄色ブドウ球菌共に protein A の遺伝子発現を確認した。

次に、protein A がヒト上皮細胞の TNF- $\alpha$  受容体に結合すると、炎症症状が誘導されるわけであるから<sup>7)8)</sup>、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等の炎症性サイトカインの遺伝子発現をヒト肺腺がん細胞 A549 で調べた。炎症性サイトカインの遺伝子発現は、処理 4 時間後から 18 時間と長時間に及ぶことが分かった。その遺伝子発現の強さは、TNF- $\alpha$  では処理前の 6.5 倍、IL-1 $\alpha$  は 5.0 倍、IL-1 $\beta$  は 8.0 倍、IL-6 は 2.0 倍と亢進し、TNF- $\alpha$  カスケードが活性化されていることが明らかになった。即ち、黄色ブドウ球菌の破壊タンパク液は、ヒト肺がん細胞に発がんプロモーション機構を誘導することが証明された。

#### たばこタール抵抗性細菌の意味

口腔内には沢山の細菌が繁殖している。H. J. Jenkinson と R. J. Lamomt の論文によると、口腔内には 750 株以上の細菌が存在し、その 50% 程が現在培養できている<sup>9)</sup>。

今回の実験で示されたように、たばこタール存在下で培養した際、2 種類の細菌が見出されたわけであるから、たばこタール 4 mg/ml は沢山の細菌を死滅させ、同時に、たばこタール抵抗性細菌の増殖を有利に導いたと考えることができる。この立場を喫煙の状態と重ねて推測すると、喫煙はたばこタール抵抗性細菌のセレクションを行い、次に、TNF- $\alpha$  誘導細菌の繁殖を助長していると考えられる。たばこタールによる殺菌作用や、抵抗性細菌のセレクションは今後詳細に研究する必要があると思われる。

#### 肺がん患者の喀痰から分離された たばこタール抵抗性微生物

口腔内に存在するたばこタール抵抗性 TNF- $\alpha$  誘導細菌は、口腔がんや舌がんの発がんプロモーターとして作用すると考えられる。この考えを肺がんの発症と結びつけて研究するために、次に、埼玉県立がんセンター病院の同意が得られた肺がん患者、4 名の喀痰からたばこタール抵抗性細菌の分離を始めた。結果をまとめると、たばこタール抵抗性微生物 6 種類、感受性微生物 1 種類であった（表-1）。*Staphylococcus epidermidis* は病原性ヒト表皮ブドウ球菌で、ほとんどの人の鼻腔に常在する。*Streptococcus salivarius* は非病原性の連鎖球菌で、*Streptococcus mitis* と *Rothia dentocariosa* は通常の口腔内細菌である。中に、*Saccharo-*

表-1 肺がん患者の喀痰から分離されたたばこタール抵抗性微生物

たばこタール抵抗性		たばこタール感受性	
	グラム染色		グラム染色
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(+)	<i>Rothia dentocariosa</i>	(+)
<i>Streptococcus salivarius</i>	(+)		
<i>Streptococcus mitis</i>	(+)		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
<i>Neisseria mucosa</i>	(-)		
<i>Methylobacterium sp.</i>	(+)		

*myces cerevisiae* 酵母が含まれていたため、たばこタール抵抗性微生物と総称することにした。*Neisseria* の中には病原性のもも含まれており、*Methylobacterium sp.* が見出された。

これら 6 個の微生物の中で TNF- $\alpha$  の遺伝子発現を誘導したものは、*Staphylococcus epidermidis*、*Saccharomyces cerevisiae* と *Neisseria mucosa* であった。したがって、肺がん患者の喀痰には TNF- $\alpha$  を産生する微生物が混在していることが示唆された。これらの常在微生物は日和見感染に関与しているだけでなく、今回発がんとの関与が、さらに、強く示唆された。TNF- $\alpha$  の遺伝子発現を誘導する微生物を発がんプロモータータイプ微生物と呼び、今後重視することが必要になった。

### 細菌のテリトリーと発がん

Sa-TA10 は 20 名中 4 名の口腔内に見出された細菌であるが、喫煙者と非喫煙者に分けると、共に 2 名ずつ見出された<sup>4)</sup>。黄色ブドウ球菌は通常 30% の健常者の皮膚に付着し、口腔内に見出される<sup>10)</sup>。したがって、舌、口腔、上部気管の発がんを促進すると推測される。ヒト表皮ブドウ球菌は 100% の健常者の鼻腔に生育しているから、鼻腔は発がんプロモータータイプ微生物の貯蔵庫と考えられ、東南アジアの鼻咽頭がんが高い理由と結びつけて研究する必要がある。

細菌はそれぞれのテリトリーを持って繁殖していることを考えると、気管支肺がん、扁平上皮肺がん等について、それぞれのたばこタール抵抗性 TNF- $\alpha$  誘導微生物の存在が推測される。したがって、私共は次に、肺がん患者の気管支洗浄液から細菌の分離を始める準備をしている。

たばこタール抵抗性 TNF- $\alpha$  誘導微生物を発がんプロモータータイプ微生物と考えると、肺がんだけでなく、*H. pylori* の胃がんは勿論、大腸がんにも発想を広げることは可能である。この考えを進めると、パピローマウイルス感染による子宮がん等にも、類似した発がん機構が推測される。

### 今後の課題

最近菌の増殖を調節する autoinducer がそれぞれの細菌に見出された<sup>11)</sup>。細菌の増殖がある一定の密度に達すると新しい遺伝子発現が誘導され増殖の優位性を獲得する。又、細菌の細胞内コミュニケーションの一つとして Quorum sensing 或いは biofilm が注目されてきた<sup>11)</sup>。これらは、発がんとの関連において、今後研究を進める重要な課題になると信じる。

### 謝辞

肺がん患者の喀痰採集に関し埼玉県立がんセンター倫理審査委員会のご協力に感謝する。実験に協力して戴いた徳島文理大学薬学部生化学教室の学生諸君にお礼を申し上げる。文部科学省科学研究費補助金基盤研究 C 及び喫煙科学研究財団の研究助成に深謝する。

喫煙科学研究財団が設立 20 周年を迎えられ、心よりお祝辞を申し上げます。毎年沢山な国内の研究者の研究を助成され、学問の発展に大きく貢献なさっておられることを高く評価いたします。今回、平成 8 年から平成 17 年の 10 年間の成果をまとめられる中に、トピックスとして私共の研究成果を含めていただけることを大変うれしく思います。

私共の研究グループはこの 10 年間に、いろいろな研究課題に対して研究助成を戴きました。例えば「タバコの葉に含まれる TNF- $\alpha$  の産生抑制物質の研究」や「hnRNPB1 蛋白質を指標とした肺がん早期診断法の研究」等です。これらの研究はそれぞれ発展しておりますが、ここでは現在研究助成をいただいています研究課題をトピックスとして簡単に紹介しました。

### 文献

- 1) Suganuma M, Kurusu M, Suzuki K, Nishizono A, Murakami K, Fujioka T, Fujiki H. New tumor necrosis factor- $\alpha$ -inducing protein released from *Helicobacter pylori* for gastric cancer progression. J Cancer Res Clin Oncol 2005; 131: 305-13.
- 2) The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer

Prevention Study Group. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med* 1994; 330: 1029-35.

- 3) Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL Jr, Valanis B, Williams JH Jr, Barnhart S, Cherniack MG, Brodtkin CA, Hammar S. Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the beta-carotene and retinol efficacy trial. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1550-9.
- 4) Fujiki H, Takeuchi H, Nishitani N, Yamanaka H, Suzuki K, Kurusu M, Suganuma M. Carcinogenic potential of tobacco tar-resistant *Staphylococcus aureus* in buccal cavity. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 301-5.
- 5) Komori A, Yatsunami J, Suganuma M, Okabe S, Abe S, Sakai A, Sasaki K, Fujiki H. Tumor necrosis factor acts as a tumor promoter in BALB/3T3 cell transformation. *Cancer Res* 1993; 53: 1982-5.
- 6) Gomez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, Cheung A, Prince A. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat Med* 2004; 10: 842-8.
- 7) Lax AJ. Opinion: Bacterial toxins and cancer - a case to answer? *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 343-9.
- 8) Fujiki H, Suganuma M. Translational research on TNF- $\alpha$  as an endogenous tumor promoter and green tea as cancer preventive in humans. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2005; 23: 3-30.
- 9) Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol* 2005; 13: 589-95.
- 10) Bachert C, Gevaert P, van Cauwenberge P. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: a key in airway disease? *Allergy* 2002; 57: 480-7.
- 11) Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 319-46.