

令和 2 年 4 月 24 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11623

研究課題名(和文) 癌原性口腔レンサ球菌の発癌機序におけるヒト歯肉上皮AID異所性発現誘導

研究課題名(英文) The involvement of aberrant AID expression in human gingival epithelial cells with Streptococcus anginosus antigen on the mechanisms of oral cancer.

研究代表者

佐々木 実 (Sasaki, Minoru)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：40187133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：正常ヒト歯肉上皮細胞をS. anginosus SAAで刺激するとmRNAレベルでのAID異所性発現が認められた。さらにSAAの連続刺激によりAIDタンパク質の異所性発現も認められた。ウエスタンブロット、LC-MS/MSによりSAAを同定したところTyrosine-tRNA synthetaseと同定された。リコンビナントSAAを用いてJ774.1を刺激した結果、S. anginosus菌体より精製したSAA同様、誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)、TNF- $\alpha$ のmRNA発現誘導が認められた。SAAにより歯肉上皮細胞でNF- $\kappa$ Bの活性化が認められ、その阻害剤によりAID発現が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線、化学物質およびウイルス感染という発癌因子に比べ、細菌感染による発癌研究の歴史は浅い。これまで感染によって過剰に産生される活性酸素や一酸化窒素などの分子によるDNAへの傷害が発癌要因の中心と考えられてきた。本研究により、S. anginosus感染により遺伝子を直接変異させる能力のある酵素“AID”の発現、動態が明らかとなり、生物発癌発症機序の研究領域へ波及効果が期待できる。さらに、口腔癌予防ワクチンとしてのS. anginosusのSAAを用いた粘膜ワクチンやAID活性化阻害剤による口腔癌治療薬の開発につながることも期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, the aberrant AID expressions in the primary cultured gingival epithelial cells after stimulation with SAA, a bioactive antigen of S. anginosus, was investigated. The stimulation of the cultured cells with SAA could induce the NF- $\kappa$ B activation and aberrant AID expression in all the epithelial cells tested, and the addition of an inhibitor of NF- $\kappa$ B activation abrogated the aberrant AID expression. In addition, to identify the proteins in bioactive fractions of SAA, we used proteome analysis with two-dimensional gel electrophoresis and LC-MS/MS. The SAA was identified to tyrosine aminoacyl-tRNA synthetase. When the recombinant protein of SAA stimulated the macrophage cell line, J774.1, this recombinant protein produced NO and expressed induced NO synthetase (iNOS) mRNA. Thus, S. anginosus infection could be closely related with squamous cell carcinoma.

研究分野：分子微生物学

キーワード：AID Streptococcus anginosus bacterial infection carcinogenesis

## 1. 研究開始当初の背景

活性化誘導シチジン脱アミノ酵素 (Activation-induced cytidine deaminase ; AID) は抗体の多様性を作り出すため、抗原刺激を受けた B 細胞内に遺伝子変異を誘導する酵素で通常 B 細胞でしか発現しない。しかし、AID のトランスジェニックマウスでは胃癌、肺癌、リンパ腫などを起こす頻度が高いことが明らかとなっている。2007 年、Matsumoto らは、*H. pylori* に感染したマウスの胃粘膜上皮細胞で AID が過剰発現していることを見だし、感染による発癌機構に AID の上皮細胞への異所性発現が関与していることを示唆している。一方、我々を含む複数の研究グループにより本菌と口腔癌を含む頭頸部癌との関連も報告されている。さらに我々は、*S. anginosus* の菌由来生理活性物質 SAA (マウスマクロファージに対して MAPK の活性化を通じて NO および炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 の産生を誘導する強力な免疫生理活性物質) で株化上皮細胞を刺激すると AID 遺伝子発現が誘導されることを *in vitro* の系で明らかにしている。

## 2. 研究の目的

*In vivo* の癌組織中、*in vitro* の株化上皮細胞のいずれの系においても *S. anginosus* 感染と AID 発現に関連が認められていることから、正常歯肉上皮細胞を対象に、*S. anginosus* に由来する生理活性物質 SAA で刺激した際の AID 発現を、遺伝子並びにタンパク質レベルでも明らかにし、さらに、SAA を同定、組み換えタンパク質を作製して、癌原性口腔レンサ球菌の発癌機序の詳細を以下の検討から明らかにすることを目的とした。

- (1) 正常歯肉上皮細胞における AID 発現を SAA で刺激した上皮細胞について、定量 PCR やウエスタンブロットングで検討し、AID の遺伝子およびタンパク質レベルでの発現誘導を明らかにする。
- (2) SAA タンパク質を同定しその遺伝子をクローニングして、組換え体タンパク質を作製する。さらにその分子構造から活性ドメインの検索も行う。
- (3) SAA による正常歯肉上皮細胞における AID 発現の活性化経路を細胞内シグナル伝達経路から検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 正常ヒト歯肉上皮細胞における AID 発現

正常ヒト歯肉上皮細胞を *S. anginosus* 菌体由来生理活性物質 SAA で刺激し、上皮細胞から RNA を抽出し cDNA に逆転写後、AID 遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR で、また、AID タンパク質の発現を抗 AID 抗体を用いたウエスタンブロットングで解析した。

### (2) SAA 遺伝子の同定およびクローニングと組換えタンパク質の作製

#### SAA の同定と遺伝子クローニング

SAA を二次元電気泳動し、特異抗体を用いてウエスタンブロットングで確定されたスポットを LC-MS/MS で同定する。既に報告がある *S. anginosus* のゲノム情報に基づき SAA の遺伝子を同定し、ベクターにクローニングした。

#### ②リコンビナント SAA の作製

SAA をクローニングした発現ベクター (pGEX-4T) を大腸菌 (XL1-blue) に導入 GST 融合タンパク質としてリコンビナント SAA を作製した。組み換えタンパク質は全長 (aa1-a418)

に加え, aa199-aa418, aa299-aa418 の分断されたものも作製した。(右図)

(3) SAA の歯肉上皮細胞内シグナル伝達経路の解析: 細胞内シグナル伝達系について, NF- $\kappa$ B の活性化を pGL4.32[Luc2p/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro]Vector を用いたレポーターアッセイによるルシフェラーゼアッセイで検討した. すなわち, 歯肉上皮細胞にベクターをトランスフェクトし, SAA 刺激後の NF- $\kappa$ B 活性化による発光の強度を計測した. さらに, 各種阻害剤を用いることで活性化される細胞内シグナル伝達経路を明確にし, また, 細胞内シグナルを阻害することが AID 発現に及ぼす影響も同時に検討する.

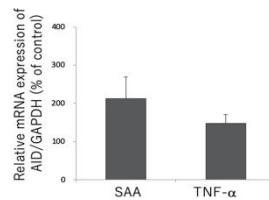
#### リコンビナント変異体の作製



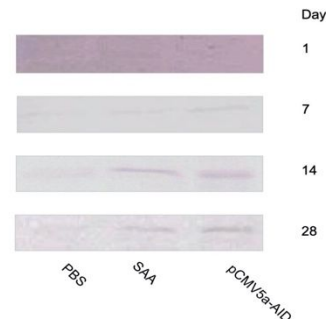
## 4. 研究成果

### (1) 正常ヒト歯肉上皮細胞における AID 発現の解析

*S. anginosus* 菌由来精製生理活性物質 SAA の正常歯肉上皮細胞への AID mRNA 発現誘導を認めた. 一方, SAA の単回刺激によって正常ヒト歯肉上皮細胞で有意の AID mRNA 発現が誘導されたが, 今回の条件下では AID タンパク質発現は観察されなかった. しかし SAA の連続刺激を行った結果, 4 週後まで AID mRNA 発現が認められ, 4 週後には AID タンパク質の異所性発現が認められた. すなわち, 正常ヒト歯肉上皮細胞を SAA で刺激すると mRNA レベルでの AID 異所性発現が認められるが, SAA の連続刺激によりさらに増強され, AID タンパク質の異所性発現に至ることが明らかとなった. (右図)



Western blotting of AID expression



### (2) さらに, SAA の同

定と遺伝子クローニングを行った. すなわち, SAA を二次元電気泳動し, 特異抗体を用いてウエスタンブロットングを行った. 抗体と特異的に反応したスポットを切り出し LC-MS/MS を行い解析した (右図) その結果, 既に報告がある *S. anginosus* のゲノム情報から SAA は菌体のタンパク質合成に関わる酵素の一つである Tyrosine-tRNA synthetase (Tyr-tRNA synthetase) と同定された. SAA タンパク質の遺伝子全長を発現ベクター (pGEX-4T) に組み込み大腸菌 (XL1-blue) に導入し GST 融合タンパク質

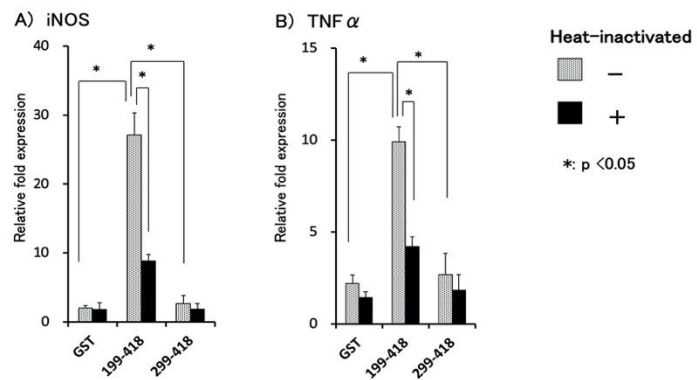
#### LC-MS/MSによるSAAの同定



MASCOT による同源性検索の結果, Aminoacyl-tRNA synthetase (Tyrosine tRNA synthetase) と高い同源性を示した.

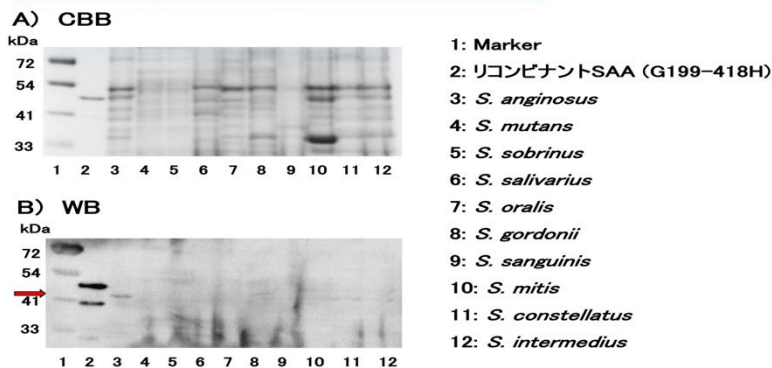
としてリコンビナント SAA を作製した。リコンビナント体を用いて J774.1 を刺激した結果、誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS), TNF の mRNA 発現誘導が認められた。さらにこの活性は、組換え変異体および加熱処理により消失した。次に全長, aa199-aa418 及び aa299-aa418 の分断されたリコンビナント体を用いて iNOS の発現を評価したところ, aa299-aa418 でのみ活性誘導が認められなかったことから, SAA の活性ドメインは aa199-aa299 にあるケモカイン様モチーフに存在する可能性が示唆された。(右図)

### リコンビナント変異体刺激によるmRNA 発現誘導

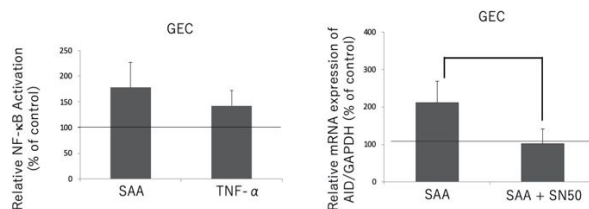


また,各口腔レンサ球菌における Tyrosine -tRNA synthetase の局在を検討したところ, *S. anginosus* では主に菌体外画分で認められたのに対し,他の口腔レンサ球菌では菌体外画分で認められなかった。(下図)

### 口腔レンサ球菌菌体画分でのTyrRS



(3) SAAによる細胞内シグナル伝達系について,歯肉上皮細胞でNF- $\kappa$ Bの活性化が認められ,その阻害剤によりAID発現が抑制されたことから,本生理活性物質による正常歯肉上皮細胞へのAID発現にNF- $\kappa$ B活性化の関与が示唆された。(下図)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sasaki M, Kodama Y, Shimoyama Y, Ishikawa T, Kimura S.	4. 巻 64
2. 論文標題 Aciduricity and acid tolerance mechanisms of <i>Streptococcus anginosus</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Gen. Appl. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 174-179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2323/jgam.2017.11.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kodama Y, Ishikawa T, Shimoyama Y, Sasaki D, Kimura S, Sasaki M.	4. 巻 62
2. 論文標題 The fibronectin-binding protein homologue Fbp62 of <i>Streptococcus anginosus</i> is a potent virulence factor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiol. Immunol.	6. 最初と最後の頁 624-634
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12646.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki M, Shimoyama Y, Ishikawa T, Kodama Y, Tajika S, Kimura S.	4. 巻 62
2. 論文標題 Contribution of different adherent properties of <i>Granulicatella adiacens</i> and <i>Abiotrophia defectiva</i> to their associations with oral colonization and the risk of infective endocarditis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Oral Sci.	6. 最初と最後の頁 36-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.19-0021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 下山 佑, 石河 太知, 古玉 芳豊, 佐々木 実
2. 発表標題 <i>Streptococcus anginosus</i> 新規病原因子としてのaminoacyl-tRNA synthetase
3. 学会等名 第72回日本細菌学会東北支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下山 佑, 石河 太知, 古玉 芳豊, 木村 重信, 佐々木 実
2. 発表標題 Streptococcus anginosus 菌体外タンパク質抗原の炎症応答誘導
3. 学会等名 第60歯科基礎医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taichi Ishikawa, Yu Shimoyama, Yoshitoyo Kodama, Masahito Ogasawara and Minoru Sasaki .
2. 発表標題 Expressions Of TAS2Rs On HUVEC By The Periodontopathic Bacterial Infection .
3. 学会等名 97th International association of dental research ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yu Shimoyama, Taichi Ishikawa, Yoshitoyo Kodama, Shigenobu Kimura and Minoru Sasak .
2. 発表標題 Signal transduction pathway of an extracellular antigen from Streptococcus anginosus for inflammatory responses .
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下山 佑, 石河太知, 古玉芳豊, 佐々木 実 .
2. 発表標題 Streptococcus anginosus アミノアシル-tRNA 合成酵素 のマクロファージ活性化 .
3. 学会等名 第87回岩手医科大学歯学会例会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	石河 太知  (Ishikawa Taichi)  (10569247)	岩手医科大学・歯学部・助教   (31201)	
研究 分担者	下山 佑  (Shimoyama Yu)  (90453331)	岩手医科大学・歯学部・講師   (31201)	