

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659861

研究課題名(和文) 口腔細菌による感染発癌における A I D の関与と役割

研究課題名(英文) The involvement of Streptococcus anginosus infection and AID expression in oral cancers

研究代表者

古玉 芳豊 (KODAMA, YOSHITOYO)

岩手医科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：70398486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：S. anginosus と口腔の扁平上皮癌との関連が示唆されている。また、AID の上皮細胞における異所性発現が細胞の癌化に関与するとの報告がある。本研究では、S. anginosus 感染と口腔癌発症機序の解明を目的として、癌組織への本菌の感染と AID 発現誘導の関連を検討した。その結果、口腔癌組織において S. anginosus 感染と AID 発現に関連性が認められ、また、本菌由来抗原により培養細胞に NF- κ B の活性化が認められた。以上の成績より、S. anginosus 感染は口腔の上皮細胞に NF- κ B を介して AID 発現を誘導し、口腔扁平上皮癌発症に関連している可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus anginosus infection could be closely related with oral squamous cell carcinoma. Recent studies suggested that the aberrant expression of AID in the epithelial cells could result in the generation of nucleotide alterations in tumor-related genes and possible malignant transformation of the AID-expressing cells. In this study, the involvement of S. anginosus infection and the AID expression in oral cancers was assessed. S. anginosus DNA was frequently detected in the oral squamous cell carcinoma, and the relatively higher AID expressions were observed in the cancerous region. The stimulation with S. anginosus antigens could induce the NF- κ B activation and AID expression in cultured cell lines. Taken together, S. anginosus infection could be closely related with the AID expression in the oral squamous cell carcinoma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：感染発癌 AID 口腔細菌 口腔癌 Streptococcus anginosus

1. 研究開始当初の背景

口腔レンサ球菌の一菌種である *Streptococcus anginosus* は 1998 年 Sasaki, H.らにより同菌のゲノム DNA が、胃および食道の扁平上皮癌組織中から高頻度で検出されることが報告された。さらに、近年、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。Activation-induced cytidine deaminase (AID) は抗体の多様性を作り出すため B 細胞の遺伝子に変異を誘導する酵素で通常 B 細胞でしか働かない。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。また、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。

2. 研究の目的

本研究においては、*S. anginosus* の口腔癌発症機序の解明を目的として、癌組織への本菌の感染および AID 発現、さらに株化上皮細胞への *S. anginosus* 菌体および菌由来生理活性物質（培養上清から精製したものとその組み替えタンパク質）による AID 発現誘導、および細胞内シグナル伝達系について検討し、細菌性生物発癌における AID の異所性発現の関与と役割を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 口腔癌組織における *S. anginosus* 感染と AID 遺伝子発現

口腔癌組織を材料として Wizard (Promega) を用いてゲノム DNA を抽出した。*S. anginosus* に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、*S. anginosus* 遺伝子を検出し感染状況を検討した。さらに、RNeasy kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、サイバークリーンを用いた real time PCR を実施し癌組織における AID 遺伝子の発現量を定量化した。

2) *S. anginosus* 抗原刺激株化培養細胞における AID 発現解析

初代培養ヒト口腔上皮細胞、マウスマクロファージ様細胞株 (RWA)、ヒト咽頭上皮細胞

株 (HEp-2) と舌癌由来株化上皮細胞 (DOK) を *S. anginosus* あるいは *S. anginosus* 由来生理活性物質 (SAA) で刺激し、以下の点について解析した。各細胞から RNA を抽出し AID 遺伝子発現をリアルタイム PCR で、また、細胞の SDS-PAGE およびウエスタンブロットティングで AID タンパク質の発現を解析した。

各細胞内シグナル伝達系について、NF- κ B は I κ B の分解すなわち、刺激後の細胞を SDS-PAGE 後に抗 I κ B 抗体を用いたウエスタンブロットティングで、さらにディユアルルシフェラーゼアッセイで検討した。JAK/STAT 系もリン酸化抗体を用いて同様に解析した。各細胞からのサイトカイン遺伝子発現 (TNF- α , IL-8) を定量 PCR で検討した。

3) 生理活性物質 SAA 遺伝子の同定、クローニングおよび組み替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、ウエスタンブロットティングで確定されたスポットをアミノ酸シーケンサーあるいは LC-MS を行い同定する。既に報告がある *S. anginosus* の全ゲノム情報に基づき SAA の遺伝子を特定し、全長をベクターにクローニングした。

リコンビナント SAA の作製

SAA 遺伝子をクローニングしたベクター (pGEX-4T/2) を大腸菌 (XL1-blue) に導入し GST 融合タンパク質としてリコンビナント SAA を作製した。

4) リコンビナント SAA の AID およびサイトカイン誘導活性の解析

各培養細胞に対して、リコンビナント SAA で刺激した際の AID 発現、細胞内シグナル伝達系、サイトカイン産生を定量 PCR、ウエスタンブロットティング等の手法を用いて検討した。

4. 研究成果

1) 口腔癌組織における *S. anginosus* 感染と AID 遺伝子発現

口腔癌組織からの *S. anginosus* ゲノム DNA 検出については、DNA 抽出キットを用いて調整した DNA サンプルについて菌種特異的プライマーを用いて本菌の存在を 16 例中 9 例で確認した。さらに、RNeasy kit を用いて RNA を抽出後、逆転写、リアルタイム PCR を実施し AID 遺伝子の発現量を定量化した。その結果、口腔癌組織 16 例中 8 例において *S.*

*anginosus*感染とAID発現が同時に認められ、両者には有意の関連性が認められた。

2) *S. anginosus* 抗原刺激株化培養細胞におけるAID発現解析

初代培養ヒト口腔上皮細胞、マウスマクロファージ様細胞株(RWA)、ヒト咽頭上皮細胞株(HEp-2)と舌癌由来株化上皮細胞(DOK)に対し *S. anginosus* 菌体および菌由来抗原(SAA)刺激で、AID遺伝子の発現誘導が認められた。また、ECL ウェスタンブロッティングによる細胞内シグナル伝達系の解析では、RAW細胞において明確なNF- κ Bの活性化が認められたが、他の細胞でのシグナルは弱かった。そこで、ルシフェラーゼ発現ベクターを用いたデュアルルミノールアッセイを行ったところ、NF- κ Bの活性化誘導をDOK、GECにおいても明確かつ定量的に明らかにすることができた。これらのことから、*S. anginosus*による上皮細胞(DOK、GEC)からのAID発現誘導にNF- κ Bの活性化が関与している可能性が示唆された。

3) SAA 遺伝子の同定、クローニングおよび組み替えタンパク質の作製

SAAのクローニングならびにリコンビナントタンパク質の発現については、精製SAAを二次元電気泳動後、特異抗体と反応するスポットをLC/MS解析した結果、既存の*S. anginosus*由来タンパク質と同定できた。遺伝子の解析をゲノムライブラリーから検討し、本遺伝子を発現ベクターにクローニング、さらには大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質の発現にも成功した。

4) リコンビナントSAAのAIDおよびサイトカイン誘導活性の解析

培養上皮株化細胞(DOK)へのリコンビナントSAAによるAID遺伝子発現について定量PCRで検討したところ、有意な発現誘導が認められた。さらに、リコンビナントSAAを用いて他の生物活性について検討したところ、株化上皮細胞に対するAID発現誘導に加え、IL-8、TNF等のサイトカインmRNA発現を強力に誘導することが明らかとなった。また、マウスマクロファージ系の細胞株(RAW)あるいはマウス腹腔浸出細胞に対し、一酸化窒素(NO)や炎症性サイトカイン産生誘導が認められた。

これら *S. anginosus* 由来抗原 SAA の多岐

にわたる生物活性が感染局所での慢性炎症からAIDの異所性発現を誘導し、*S. anginosus*による感染発癌を惹起する可能性が強く示唆された。

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 5 件)

1) 佐々木実, 古玉芳豊, 木村重信: 口腔癌と *Streptococcus anginosus* 感染. 岩医歯誌. 38, 45-52, 2013

2) Hatakeyama, W., Taira, M., Y., Kihara, H., Sasaki, M., Kimura, S., Kondo, H.: Subcutaneous tissue reactions against nano-apatite collagen composites. Nano Biomedicine, 査読有 4: 118-124 (2012)

3) Taira, M., Y., Kagiya, T., Sasaki, M., Kimura, S.: Quantitative real-time RT-PCR analyses of DNA-damage-recovery-related gene expressions of mouse macrophage-like cell line RAW264 when exposed to IC₅₀ nickel ions. Nano Biomedicine, 査読有 3: 294-299 (2012)

4) Taira, M., Shimoyama, Y., Kagiya, T., Sasaki, M., Nezu, T., Harada, H. and Kimura, S.: Proteome analyses of human macrophages exposed to low cytotoxic IC90 copper (2+) ions. Dent. Mater. J., 査読有 30: 293-299 (2011)

5) Taira, M., Kagiya, T., Sasaki, M. and Kimura, S.: Quantitative real-time RT-PCR analyses of DNA-damage-recovery-related gene expressions of mouse macrophage-like cell line RAW264 when exposed to IC₅₀ nickel ions. Nano Biomed., 査読有 3, 294-299, (2011)

[学会発表](計 19 件)

1) Sasaki, M., Kodama, Y., Ishikawa, T., Kimura, S. The involvement of *Streptococcus anginosus* infection and AID expression in oral cancers. 第 87 回日本細菌学会総会. 3月28日, 船堀, 東京 (2014)

2) Shimoyama, Y., Kimura, M., Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T. K., Tanaka, M., Sasaki, M., Kimura, S. Infection of 'red complex

- species' to the plaque of children. 第 87 回日本細菌学会総会. 3 月 26 日, 船堀, 東京 (2014)
- 3) Iwasaki, K., Sasaki, M., Kodama, Y., Matsumoto, N., Kimura, S. and Sugiyama, Y. The involvement of *Streptococcus anginosus* infection and AID expression in oral cancers. 21st International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Barcelona, Spain (October, 21, 2013)
- 4) Shimoyama, Y., Ohara-Nemoto, Y., Kimura, S., Sasaki, M., Kodama, Y. Tanaka, M., Kimura, S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis fimA* Genotypes in Children's plaques 113th General Meeting ASM May 19, 2013 Denver, USA (May 19, 2013)
- 5) Sasaki, M., Kodama, Y., Shimoyama, Y., Kimura, S.: The aciduricity in *Streptococcus anginosus*. 91th General Session & Exhibition of the International Association of Dental Research (IADR), Siattle, USA, March 21 (2013)
- 6) 佐々木実, 古玉芳豊, 下山 佑, 木村重信: 口腔癌における *Streptococcus anginosus* 感染と AID 異所性発現. 第 55 回歯科基礎医学学会学術大会. 9 月 22 日, 岡山市 (2013)
- 7) 下山 佑, 木村美澄, 佐々木実, 根本優子, 古玉芳豊, 上戸幸美, 田中光郎, 木村重信: Nested PCR を用いた小児口腔への *Porphyromonas gingivalis* 線毛タイプ別感染実態の検討. 第 86 回日本細菌学会総会. 3 月 20 日, 幕張 (2013)
- 8) Sasaki, M., Kodama, Y., Shimoyama, Y., Kimura, S.: A Novel Fibronectin Binding Protein of *Streptococcus intermedius*. 90th General Session & Exhibition of the International Association of Dental Research (IADR), Iguacu Falls, Brazil (June 21, 2012)
- 9) 佐々木実, 古玉芳豊, 下山 佑, 木村重信: *Streptococcus anginosus* の耐酸性に関わる酵素の役割. 第 54 回歯科基礎医学学会学術大会. 9 月 16 日, 郡山 (2012)
- 10) 古玉芳豊, 佐々木実, 下山 佑, 上戸幸美, 木村重信: *Streptococcus intermedius* のフィブロネクチン結合タンパク質による上皮細胞付着機序. 第 85 回日本細菌学会総会. 3 月 27 日, 長崎 (2012)
- 11) 佐々木実, 古玉芳豊, 下山 佑, 木村重信: *Streptococcus anginosus* のフィブロネクチン結合タンパク質のマウスにおける病原性の解析. 第 53 回歯科基礎医学学会学術大会. 10 月 1 日, 岐阜 (2011)
- 12) Sasaki, M., Kodama, Y., Shimoyama, Y., Agato, S. and Kimura, S.: The pathogenic involvement of the fibronectin binding protein, Fbp62, in *Streptococcus anginosus* infection. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS 2011), September 7, Sapporo, Japan (2011)
- 13) Sasaki, M., Kodama, Y., Shimoyama, Y., Ishikawa, T. and Kimura, S.: Fbp62, fibronectin binding protein of *Streptococcus anginosus* involves the virulence in mouse infection. 10th World Congress on Inflammation 2011. June 26, Paris, France (2011)
- 14) Ohara-Nemoto, Y., Rouf, S.M.A., Shimoyama, Y., Kimura, S., Ono, T. and Nemoto, T.K.: Auto-catalytic propeptide processing facilitates the final hetero-catalytic maturation of glutamyl endopeptidase GluV8. 111th General Meeting of the American Society for Microbiology. May 24, New Orleans, USA (2011)
- 15) Sasaki, M., Kodama, Y., Shimoyama, Y., Ishikawa, T. and Kimura, S.: Fibronectin binding activity of *Streptococcus anginosus* promotes the adherence to mucosal epithelial cells. 4th International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai. March 8, Sendai, Japan (2011)
- 16) Shimoyama, Y., Sasaki, M., Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T. K., Ishikawa, T. and Kimura, S.: Rapid identification of *Abiotrophia/Granulicatella* species using by 16S rRNA based PCR and RFLP. 4th International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai. March 8, Sendai, Japan (2011)

17) Otake-Asakawa, A., Harada-Oikawa, R., Ohara-Nemoto, Y., Tanaka, M. and Kimura, S.: Maternal transmission of mutans and other oral streptococcal species. 4th International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai. March 8, Sendai, Japan (2011)

18) Nomura, T., Suzuki, T., Furuya, J., Shimoyama, Y., Sasaki, M. and Kimura, S.: In vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic resin with different surface status. 4th International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai. March 8, Sendai, Japan (2011)

19) Taira, M., Sasaki, M. and Kimura, S.: Macrophage reaction against sub-micron titanium particles. 4th International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai. March 8, Sendai, Japan (2011)

〔図書〕(計 6 件)

1) Kimura, S., Ohara-Nemoto, Y., Shimoyama, Y., Ishikawa, T., and Sasaki, M.: Pathogenic factors of Porphyromonas gingivalis and the host defence mechanisms. In Periodontitis, InTech, 1-18, (2012)
Pathogenesis and Treatment of Periodontitis

2) Sasaki, M., Kodama, Y., Shimoyama, Y., Ishikawa, T. and Kimura, S.: Fibronectin binding activity of *Streptococcus anginosus* promotes the adherence to mucosal epithelial cells. In Interface Oral Health Science 2011 (Watanabe, M. et al., eds.), Springer Japan, Tokyo, 204-205, (2012)

3) Shimoyama, Y., Sasaki, M., Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T. K., Ishikawa, T. and Kimura, S.: Rapid identification of *Abiotrophia/Granulicatella* species using by 16S rRNA based PCR and RFLP. In Interface Oral Health Science 2011 (Watanabe, M. et al., eds.), Springer

Japan, Tokyo, 206-208, (2012)

4) Otake-Asakawa, A., Harada-Oikawa, R., Ohara-Nemoto, Y., Tanaka, M. and Kimura, S.: Maternal transmission of mutans and other oral streptococcal species. In Interface Oral Health Science 2011 (Watanabe, M. et al., eds.), Springer Japan, Tokyo, 198-200, (2012)

5) Nomura, T., Suzuki, T., Furuya, J., Shimoyama, Y., Sasaki, M. and Kimura, S.: In vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic resin with different surface status. In Interface Oral Health Science 2011 (Watanabe, M. et al., eds.), Springer Japan, Tokyo, 145-146, (2012)

6) Taira, M., Sasaki, M. and Kimura, S.: Macrophage reaction against sub-micron titanium particles. In Interface Oral Health Science 2011 (Watanabe, M. et al., eds.), Springer Japan, Tokyo, 283-284, (2012)

〔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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

古玉芳豊 (KODAMA YOSHITOYO)
岩手医科大学・歯学部・非常勤講師
研究者番号：70398486

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

佐々木 実 (SASAKI MINORU)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号：40187133

木村 重信 (KIMURA SHIGENOBU)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：10177917