

平成 2 7 年 6 月 2 4 日現在

機関番号：3 1 2 0 1

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：2 4 7 9 2 2 5 0

研究課題名(和文)口腔癌の細菌性生物発癌におけるA I Dの発現と役割

研究課題名(英文)The invlovement of bacterial infection and AID expression in oral cancer

研究代表者

松本 直子(MATSUMOTO, NAOKO)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：5 0 4 3 6 6 3 0

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Streptococcus anginosus感染が口腔扁平上皮癌と深く関連することが示唆されているがその発生機序は明らかでない。また上皮細胞における活性化誘導シチジン脱アミノ酵素Activation-induced cytidine deaminase (AID)の異所性発現が癌関連遺伝子変異を誘発していることが示唆されており、本研究では口腔癌患者の組織サンプルを採取し、口腔扁平上皮癌におけるS.anginosus感染とAID異所性発現の有無およびその関連性について検討した。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus anginosus infection could be closely related with oral squamous cell carcinoma. In this study using surgical tissue specimens, a possible invlovement of S. anginosus infection and aberrant AID expression in oral squamous cell carcinoma was assessed by the species-specific PCR and RT-qPCR.

研究分野：口腔外科学

キーワード：Streptococcus anginosus AID 口腔癌

## 1. 研究開始当初の背景

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) と胃癌との関連が報告され、細菌感染と癌化との因果関係が注目されている。また、*H. pylori* 感染を契機に活性化誘導シチジン脱アミノ酸酵素 (AID: Activation-induced cytidine deaminase) の異常な発現がマウス胃粘膜細胞で誘導されること、また実際に *H. pylori* 感染したヒトの胃上皮細胞や胃癌組織では AID が異常発現し、p53 遺伝子に変異が起こることが明らかとなり、細菌感染発癌機構に AID の異所性発現が関与していることが示唆されている。

また、口腔レンサ球菌の一菌種である *Streptococcus anginosus* (*S. anginosus*) は膿瘍、感染性心内膜炎の起炎菌ともなるが、通常はヒトブランク中に常在する病原性の低い細菌であると長く考えられてきた。しかし、1998 年に *S. anginosus* のゲノム DNA が食道癌の扁平上皮癌組織中から高頻度に検出されることが報告され、近年では本菌と口腔癌を含む頭頸部扁平上皮癌との関連性も報告されている。

*H. pylori* の感染発癌の機序については必ずしも明確ではないが、*H. pylori* の感染による AID の過剰発現には *H. pylori* が分泌する病原タンパクの CagA などが粘膜上皮細胞内のシグナル伝達系を活性化、攪乱することが引き金になっているとの報告がある。*S. anginosus* においても一酸化窒素(NO)や炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6)の発現を誘導し細胞内シグナル伝達系を攪乱する可能性の抗原 *S. anginosus* antigen(SAA)の存在が報告されている。従って、口腔扁平上皮癌組織中に AID の異所性過剰発現を認めること、各組織より分離した各菌株における AID 発現と病原性との関係について明らかにすることにより *S. anginosus* の口腔癌の発生機序の解明になると考えた。

## 2. 研究の目的

*S. anginosus* による感染発癌の機序についてはこれまでほとんど検討が進められておらず、*H. pylori* では同菌が感染したヒト胃上皮細胞や胃癌組織で活性化誘導シチジン脱アミノ酸酵素 Activation-induced cytidine deaminase(AID)が異常発現し、その結果癌関連遺伝子変異が起こることが示唆されている。

*H. pylori* 感染による発癌の機序についても必ずしも明確でないが、*H. pylori* 感染による AID の異所性発現は炎症反応の誘導による機序とは異なる新たな *H. pylori* 感染による胃癌発生機序として注目されており、口腔扁平上皮癌における *S. anginosus* 感染と AID 異所性発現を検討することでその関連性を明らかにすることを目的とした。

本研究では口腔癌組織中の AID 発現および *S. anginosus* 感染の関連性を検討すること、一方でこれまで報告のある *S. anginosus* が産生する特異的な菌由来抗原 SAA (マウスマクロファージに対し NO 産生を誘導する熱感受性のタンパク部分と炎症性サイトカインの産生を誘導する多糖部分からなる *S. anginosus* 特異的な免疫生理活性物質)を用いて 粘膜上皮細胞に対する AID 異所性発現誘導されるという仮説をたて、SAA のヒト口腔粘膜上皮での AID 発現誘導についての解析を行い、明確な炎症反応を惹起しないの *S. anginosus* 感染が発癌因子となりうるのかを検討し、細菌性生物発癌の機序を明らかにし、本酵素の異所性発現の特異性と *S. anginosus* 感染による AID 異所性発現誘導の癌化へと繋がるメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 口腔癌切除組織採取およびゲノム DNA 抽出

当科を受診し、同意の得られた口腔癌患者でこれまで癌治療を受けていない一次症例の生検時または手術時の口腔癌組織より採取し、DNA/RNA 精製用キットを用いた。

(2) 切除癌組織における *S. anginosus* 感染の検討

精製した病変部組織の DNA を用いて PCR により *S. anginosus* 感染を検討した。

(3) 口腔扁平上皮癌組織における AID 異所性発現の検討

real-time RT-PCR による AID 発現解析を行った。

上記(2)(3)において相関性の解析を行い検討した。

(4) SAA による株化上皮細胞およびヒト歯肉細胞の AID 異所性発現誘導

株化粘膜上皮細胞およびヒト正常歯肉細胞を SAA で刺激し、培養したのち real-time RT-PCR により AID の異所性発現誘導について検討した。

## 4. 研究成果

当科において同意が得られた。生検時あるいは手術時に採取した口腔癌組織は 17 例で内訳は舌 8 例、歯肉 9 例であった。Stage 分類では stage が 5 例、stage が 8 例、stage が 4 例であった。すべての症例は病理学検査で扁平上皮癌と診断された。

口腔扁平上皮癌組織および近傍の正常組織から組織サンプルを採取し、DNA および RNA を精製した。これらの DNA を用いて PCR により *S. anginosus* の感染した検討では 8 例 (47%) に *S. anginosus* 感染が認められた。また、real-time RT-PCR による AID 発現解析、では 7 例で AID の異所性発現を認められた。また、AID 異所性発現が認められた 7 例中 6 例では同時に *S. anginosus* 感染が認められた。

これらの結果を利用し、*S. anginosus* の感染と AID 異所性発現の関連性について行った解析では有意に正の相関関係が認められた。

また、培養上皮細胞を利用した SAA による AID 異所性発現誘導についての検討では SAA 刺激後 24 時間でいずれの株化上皮細胞とヒト正常歯肉細胞に対して有意な AID 異所性発現誘導能を示すことが明らかとなった。これは株化細胞のみならず、感染発癌のリスクが正常細胞でも起こりうることを強く示唆している。

これらの結果より *S. anginosus* 感染により口腔粘膜上皮での AID 異所性発現を誘導し、口腔扁平上皮癌の発症に関与している可能性を示唆された。

今後も症例数を増やすと共に株化上皮細胞を用いた in vitro 実験で SAA による AID の異所性発現誘導についても解析を進め、*S. anginosus* 感染による AID の異所性発現以降の癌化のプロセスについても検討を行っていく予定である。

#### 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. 岩崎賢介、松本直子、佐々木実.  
ヒト口腔扁平上皮癌における *Streptococcus anginosus* 感染と Activation-induced cytidine deaminase (AID) 異所性発現  
Dental Journal of Iwate Medical University  
査読有 40:2015

2. Yu Ohashi, Akiko Kumagai, Naoko Matsumoto, Mitsuru Izumisawa, Hideki Hoshi, Yoshiki Sugiyama. A huge osteoma of the mandible detected with head and neck computed tomography. Oral Science International  
査読有 12;31-36 :2015

3. 小野寺慧、松本直子、熊谷章子、星 秀樹、杉山芳樹、及川大成、石橋 修. 下顎埋伏智歯 12 年間で筋突起下方まで移動した 1 例  
日本口腔診断学会雑誌 査読有 28 ; 26 - 30 : 2015

4. 飯島 伸、角田耕一、松本直子、石橋 修、星 秀樹、杉山芳樹. Tongue-lip adhesion を行った Robin sequence の長期経過観察例 岩手医科大学歯学会雑誌 査読有 37 (3) ; 121 - 126 : 2013

5. 熊谷章子、角田直子、松本直子、飯島 伸、星 秀樹、杉山芳樹. 破傷風の診断に直接至らなかった開口障害の 1 例 日本口腔外科学会雑誌 査読有 58(1) ; 12 - 16 : 2012.

##### 〔学会発表〕(計 5 件)

1. Kensuke Iwasaki, Minoru Sasaki, Yoshitoyo Kodama, Naoko Matsumoto, Shigenobu Kimura, Yoshiki Sugiyama. THE INVOLVEMENT OF STREPTOCOCCUS ANGINOSUS INFECTION AND AID EXPRESSIN IN ORAL CANCERS.

21st International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery .Barcelona Spain  
2013.10.21-24

2. 岩崎賢介、松本直子、星 秀樹、木村重信、杉山芳樹. ヒト口腔癌における *Streptococcus anginosus* 感染と activation-induced cytidine deaminase (AID) 異所性発現. 第 69 回日本口腔科学会総会 2015.5.13-15

3. 増田智幸、大橋祐生、熊谷章子、松本直子、星 秀樹、杉山芳樹. 骨再生における効果的なサイトカイン投与法の探索とそのメカニズムの解明 . 第 68 回日本口腔科学会総会 2014.5.8-9

4. 飯島 伸、角田直子、石橋 修、大橋祐生、松本直子、熊谷章子、星 秀樹、杉山芳樹. 口腔扁平苔癬罹患粘膜に含まれる微量元素の PIXE 分析. 第 26 回日本口腔診断学会総会 2013.9.13-14

5. 飯島 伸、松本直子、西平宗功、角田耕一、星 秀樹、杉山芳樹. 兄弟に認められた先天性鼻咽腔閉鎖機能不全. 第 36 回日本口蓋裂学会. 2012.5.24-25

##### 〔図書〕(計 0 件)

##### 〔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 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
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

松本 直子 ( MATSUMOTO, Naoko )

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：50436630

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：