

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462871

研究課題名(和文) 癌原性口腔細菌によるヒト上皮AID発現誘導とp53遺伝子変異の解析

研究課題名(英文) The analysis of induction of aberrant AID expression and mutagenesis in TP53 in human gingival epithelial cells with carcinogenic bacteria

研究代表者

佐々木 実 (Sasaki, Minoru)

岩手医科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40187133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：S. anginosusによる口腔癌発症機序の解明を目的として、口腔扁平上皮癌組織への本菌の感染率およびAID発現誘導、また培養細胞でのS. anginosus由来生理活性物質SAA刺激によるAID発現誘導ならびにp53遺伝子変異について検討した。その結果、口腔癌組織においてS. anginosus感染とAID発現に有意な関連性が認められ、また、SAA刺激で培養上皮細胞にNF- $\kappa$ Bの活性化が関与するAID遺伝子およびタンパク質の発現誘導が認められた。さらに、SAA刺激したヒト正常歯肉上皮細胞のp53遺伝子配列の一部に変異が認められた。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus anginosus, one of the oral streptococci could be closely related with oral squamous cell carcinoma (SCC). Recent studies have revealed that the relationship between bacterial carcinogenesis and aberrant AID expression. In this study, the involvement of S. anginosus infection and the AID expression in oral SCC was demonstrated. S. anginosus genome DNA was frequently observed in the oral SCC, and the relatively higher AID expressions were detected in the cancerous region. The stimulation with S. anginosus antigen SAA could induce the AID expression through NF- $\kappa$ B activation in cultured epithelial cells. Further, S. anginosus SAA induced the generation of nucleotide alterations in TP53. Taken together, S. anginosus infection could be closely related with the oral SCC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：口腔レンサ球菌 AID oral cancer p53

## 1. 研究開始当初の背景

*Streptococcus anginosus* は口腔レンサ球菌の一菌種で、2005年、Sasaki, M.らにより同菌のゲノムDNAが口腔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、本菌と口腔癌の関連が示唆されている。一方、B細胞の遺伝子に変異を誘導する酵素AIDは通常B細胞でしか働かないといわれているが、近年、*Helicobacter pylori* 感染マウスの胃粘膜上皮細胞で過剰発現していることが明らかとなり、感染による発癌にAIDの異所性発現が関与している可能性が示唆されている。また2001年Sasaki, M.らは*S. anginosus*から強力に免疫系を活性化する生理活性物質(SAA)を見だし、その性状および病原因子としての可能性を報告している。

## 2. 研究の目的

*S. anginosus*による口腔癌発症機序の解明を目的として、*in vivo*および*in vitro*実験系での口腔扁平上皮癌組織への本菌の感染率およびAID発現誘導、また培養細胞での*S. anginosus*由来生理活性物質(SAA)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詳細に検討する。さらに、この*S. anginosus* SAAを同定し、その遺伝子クローニング、また、組換えタンパク質の発現を行い、本組換えタンパク質の免疫生物活性も検討する。さらに、ヒト正常歯肉上皮細胞におけるSAA刺激後のp53遺伝子配列を解析して変異原性についても検討する。

## 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

口腔扁平上皮癌組織からWizard(Promega)を用いてゲノムDNAを抽出した。*S. anginosus*特異的なプライマーを用いてPCRを行い、16SリボソームDNA配列の一部を検出し感染状態を検討した。さらに、RNeasy kit(QIAGEN)を用いてRNAを抽出し、逆転写後サイバークリーンを用いたreal time RT-PCR(q-PCR)を実施し癌組織におけるAID遺伝子の発現を定量した。

### 2) *S. anginosus*由来生理活性物質(SAA)で刺激した培養上皮細胞におけるAID発現解析および細胞内シグナル伝達の検討

初代培養細胞のヒト正常歯肉上皮細胞

(GEC)と株化細胞の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* SAAで刺激し、各細胞からRNAを抽出してAID遺伝子発現をリアルタイムPCRで検討した。また、正常歯肉上皮細胞をSAAで1~7回刺激し、1~28日後にSDS-PAGE, Western blottingを行いAIDタンパク質の発現を解析した。さらに、細胞内シグナル伝達系について、NF- $\kappa$ Bの活性化はpGL4.32[*luc2P/NFkB-RE/Hygro*] Vectorをヒト正常歯肉上皮細胞に導入し、SAA刺激して37℃, 24時間培養後、デュアルレポーターアッセイを行い検討した。

### 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2D電気泳動してタンパク質を展開し、Western blottingを行った。抗SAA一次抗体と反応し、確定されたスポットをLC-MSを行って解析し同定する。既に報告がある*S. anginosus*の全ゲノム情報に基づきSAAの遺伝子を特定する。

#### リコンビナントSAAの作製

SAA遺伝子をベクター(pGEX-4T/2)にクローニングして、大腸菌(XL1-blue)あるいはClean coliに導入しGST融合タンパク質としてリコンビナントSAAを作製する。

### 4) リコンビナントSAAの誘導型一酸化窒素産生酵素(iNOS)遺伝子発現および一酸化窒素(NO)産生誘導活性の解析

チオグリコレート誘導マウス腹腔マクロファージあるいはマウスマクロファージ様細胞株J774細胞に対して、リコンビナントSAA刺激後のiNOS誘導を定量PCRで、また、NO産生をグリース法で検討した。

### 5) ヒト正常歯肉上皮細胞におけるp53遺伝子解析

ヒト正常歯肉上皮細胞をSAAで3日おきに4週間刺激後、ゲノムDNAを精製し、ヒトp53遺伝子の特異的プライマーを用いてPCR法で増幅し、各領域の塩基配列をDNAシーケンサーで解析した。

## 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

口腔癌組織から菌種特異的プライマーを用いて、本菌の存在を17例中8例で確認し

た。さらに、リアルタイム PCR を行い、口腔癌組織中の AID 遺伝子の発現量を定量した。その結果、口腔癌組織 17 例中 6 例において *S. anginosus* 感染と AID 発現が同時に認められ、両者には有意の相関が認められた。

2) *S. anginosus* SAA で刺激した培養上皮細胞における AID 発現解析

初代培養ヒト歯肉上皮細胞、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 SAA 刺激で、AID 遺伝子の発現誘導が認められた。また、Western blotting による AID タンパク質発現の解析では、SAA 単回刺激ではほとんど AID の発現は認められなかった。しかし、SAA を 3 日おきに 1~4 週間刺激するとタンパク質レベルでも AID 発現が認められた。これらのことから、SAA のタンパク質レベルでの発現も長期にわたる繰り返し刺激で誘導されることが明らかとなった。ルシフェラーゼ発現ベクターを用いたデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、DOK、GEC において NF- $\kappa$ B の活性化誘導を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 発現誘導に細胞内シグナル伝達系の NF- $\kappa$ B の活性化が関与している可能性が示唆された。

3) SAA の遺伝子同定、クローニングおよび組換えタンパク質の作製

部分精製 SAA を 2D 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された。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 *Clean coli* を用いてリコンビナントタンパク質を発現することができた。

4) リコンビナント SAA の iNOS 遺伝子発現および NO 産生誘導活性の解析

リコンビナント SAA はチオグリコレート誘導マウス腹腔マクロファージあるいはマウスマクロファージ様細胞株 J774 細胞に対して、iNOS 発現および、NO 産生を誘導した。

5) ヒト正常歯肉上皮細胞における SAA 刺激後の p53 遺伝子解析

ヒト正常歯肉上皮細胞を SAA で 3 日おきに 4 週間刺激し p53 遺伝子 DNA 配列を解析した。SAA 刺激 GEC でエクソン 5 の一部に変異が認められた。

これら *S. anginosus* 由来抗原 SAA により上皮細胞への AID 異所性発現誘導等の生物活性が、口腔の感染局所で起こり、結果として p53 遺伝子など癌抑制遺伝子の変異を誘発し、*S. anginosus* による感染発癌を惹起する可能性が示唆された。

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 10 件)

1) Nemoto, T.K., Ohara-Nemoto, Y., Bezerra, G. A., Shimoyama, Y. and Kimura, S.: Acylpeptidyl oligopeptidase: *Porphyromonas gingivalis* periplasmic novel exopeptidase releases N-acylated di- and tri-peptides from oligopeptides. J. Biol. Chem., 査読有り, 2016 Jan 5. pii: jbc.M115.687566. [Epub ahead of print], 2016

2) 岩崎賢介, 松本直子, 佐々木実: ヒト口扁平上皮癌における *Streptococcus anginosus* 感染と AID 異所性発現. 岩医大歯誌 査読有り, 40, 26-36. (2015)

3) 松本知生, 下山 佑, 丸尾勝一郎, 木村重信: チタン表面での骨芽細胞分化に対する IL-17F の促進作用. 岩医大歯誌, 査読有り, 40 巻, 14-25. 2015

4) Nishimata, H., Ohara-Nemoto, Y., Baba, T.T., Hoshino, T., Fujiwara, T., Shimoyama, Y., Kimura, S. and Nemoto, T.K.: Identification of dipeptidyl-peptidase (DPP)5 and DPP7 in *Porphyromonas endodontalis*, distinct from those in *Porphyromonas gingivalis*. PLOS ONE, 査読有り, 10;9(12):e114221. doi: 10.1371/journal.pone.0114221. eCollection 2014

5) Matsui, M., Chosa, N., Shimoyama, Y., Minami, K., Kimura, S. and Kishi, M.: Effects of tongue cleaning on bacterial

- flora in tongue coating and dental plaque: a crossover study. BMC Oral Health, 査読有り, 14:4. doi: 10.1186/1472-6831-14-4, 2014
- 6) Ohara-Nemoto, Y., Rouf, S.M., Naito, M., Yanase, A., Tetsuo, F., Ono, T., Kobayakawa, T., Shimoyama, Y., Kimura, S., Nakayama, K., Saiki, K., Konishi, K. and Nemoto, T.K.: Identification and characterization of prokaryotic dipeptidyl-peptidase 5 from *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem., 査読有り, 289, 5436-5448, 2014
- 7) Kishi, M., Ohara-Nemoto, Y., Takahashi, M., Kishi, K., Kimura, S., Aizawa, F. and Yonemitsu, M.: Prediction of periodontopathic bacteria in dental plaque of periodontal healthy subjects by measurement of volatile sulfur compounds in mouth air. Arch. Oral Biol., 査読有り, 58: 324-330, 2013
- 8) Rouf, S.M., Ohara-Nemoto, Y., Ono, T., Shimoyama, Y., Kimura, S. and Nemoto, T.K.: Phenylalanine 664 of dipeptidyl peptidase (DPP) 7 and Phenylalanine 671 of DPP11 mediate preference for P2-position hydrophobic residues of a substrate. FEBS Open Bio., 査読有り, 3: 177-183, 2013
- 9) Rouf, S.M., Ohara-Nemoto, Y., Ono, T., Shimoyama, Y., Kimura, S. and Nemoto, T.K.: In vitro processing of glutamyl endopeptidase proenzymes from *Enterococcus faecalis* and importance of N-terminal residue in enzyme catalysis. 査読有り, Adv. Biochem., 1: 73-80, 2013
- 10) 佐々木実, 古玉芳豊, 木村重信: 口腔癌と *Streptococcus anginosus* 感染. 岩医歯誌. 査読有り, 38, 45-52, 2013
- [学会発表](計 16件)
- 1) 佐々木実, 岩崎賢介, 古玉芳豊, 下山 佑, 石河太知, 木村重信: *Streptococcus anginosus* 生理活性物質SAAによる歯肉上皮細胞でのAID異所性発現. 第89回日本細菌学会総会, 2016, 3月23日, 大阪
- 2) 下山 佑, 根本優子, 中里茉那美, 根本孝幸, 高橋晋平, 石河太知, 佐々木大輔, 八重柏隆, 佐々木実, 木村重信: 歯周病原性細菌 'red complex species' のビルレンス因子としてのプロテアーゼ. 第89回日本細菌学会総会, 2016, 3月24日, 大阪
- 3) *Tannerella forsythia* のジペプチジルペプチダーゼ4の性状解析. 中里茉那美, 下山 佑, 根本優子, 根本孝幸, 高橋晋平, 石河太知, 佐々木実, 八重柏隆, 木村重信. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 9月12日, 2015, 新潟
- 4) 下山 佑, 中里 茉那美, 根本 優子, 根本 孝幸, 石河 太知, 八重柏 隆, 佐々木 実, 木村 重信: 歯周病原性 'red complex species' のビルレンス因子としてのプロテアーゼ. 第69回日本細菌学会東北支部総会, 8月22日, 2015, 郡山
- 5) 高橋晋平, 石河太知, 下山佑, 八重柏隆, 佐々木実, 木村重信. 歯周病原性細菌の上皮ハリア突破機構. 第69回日本細菌学会東北支部総会, 8月22日, 2015, 郡山
- 6) M. Sasaki, K. Iwasaki, Y. Kodama, T. Ishikawa, Y. Shimoyama, Y. Sugiyama and S. Kimura. The involvement of *Streptococcus anginosus* infection and the aberrant activation-induced cytidine deaminase expression in human oral squamous cell carcinoma. 6<sup>th</sup> Congress of European Microbiology (FEMS 2015), Maastricht, Netherlands (June, 9, 2015)
- 7) 佐々木実, 古玉芳豊, 下山 佑, 石河太河, 木村重信: *Streptococcus anginosus* による上皮細胞でのAID異所性発現の誘導. 第

56回歯科基礎医学会学術大会 ,9月27日 ,2014 ,  
福岡

8) 下山 佑 , 石河太河 , 根本優子 , 根本孝  
幸 , 佐々木実 , 木村重信 : SLPIによる  
*Porphyromonas gingivalis*に対する感染抑制作  
用 , 第56回歯科基礎医学会学術大会 , 9月26  
日 , 2014 , 福岡

9) 岩崎賢介 , 佐々木実 , 古玉芳豊 , 下山 佑 ,  
石河太河 , 杉山芳樹 , 木村重信 :  
*Streptococcus anginosus*による上皮細胞の  
AID異所性発現誘導 . 第68回日本細菌学会東  
北支部総会 , 8月22日 , 2014 , 仙台

10) 下山 佑 , 石河太河 , 佐々木実 , 木村重  
信 : 術後感染症予防に寄与する口腔ケア . 第  
68回日本細菌学会東北支部総会 , 8月22日 ,  
2014 , 仙台

11) M. Sasaki , K. Iwasaki , Y. Kodama , Y.  
Shimoyama , T. Ishikawa , Y. Sugiyama , S.  
Kimura . The involvement of *Streptococcus  
anginosus* infection and AID expression in  
oral cancers. 92th, General Session &  
Exhibition of the International  
Association of Dental Research (IADR),  
Cape Town, South Africa, (June, 28, 2014).

12) Yu Shimoyama , Misumi Kimura , Yuko  
Ohara-Nemoto , Takayuki K. Nemoto , Mitsuro  
Tanaka , Minoru Sasaki , Shigenobu Kimura ,  
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)

13) Minoru Sasaki , Yoshitoyo Kodama ,  
Taichi Ishikawa , Shigenobu Kimura , 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)

14) Kensuke Iwasaki , Minoru Sasaki ,  
Yoshitoyo Kodama , Naoko Matsumoto ,  
Shigenobu Kimura and Yoshiki Sugiyama .  
*Streptococcus anginosus* infection and AID

expression in oral cancers. ICOMS  
Barcelona, Spain (October, 21, 2013)

15) 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  
学会学術大会 . 9月22日 , 岡山市 (2013)

16) Y. Shimoyama , Y. Ohara-Nemoto , M.  
Kimura , M. Sasaki , Y. Kodama1 , M. Tanaka ,  
S. Kimura : Distribution of *Porphyromonas  
gingivalis fimA* Genotypes in Children ' s  
plaques 113<sup>th</sup> General Meeting ASM May 19 ,  
2013 Denver, USA (May 19, 2013)

〔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 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

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

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

木村 重信 (KIMURA SHIGENOBU)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：10177917

下山 佑 (SIMOYAMA YU)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：90453331