

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592046

研究課題名（和文）口腔癌予防ワクチンの開発に向けた癌原性口腔レンサ球菌表層抗原の同定

研究課題名（英文）The identification of cell surface antigen of oral *streptococcus* for development of vaccine for oral cancer

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

研究成果の概要（和文）：*Streptococcus anginosus* はプラーク常在細菌だが，口腔扁平上皮癌との関連が示唆されている．本研究ではワクチン開発を目的として，*S. anginosus* のフィブロネクチン結合タンパク質 Fbp62 を同定し，本菌の病原性に果たす役割について検討した．*fbp62* 欠損株では野生株に比べ上皮細胞に対する付着性が有意に低下した．また，マウス致死活性，膿瘍形成能が有意に低かった．以上の成績より，*S. anginosus* の新規フィブロネクチン結合タンパク質 Fbp62 は本菌の病原性に深く関与することから，口腔癌の有効なワクチンの候補となることが示唆された．

研究成果の概要（英文）：*Streptococcus anginosus* inhabits dental plaques, and its infection in oral mucosa could be closely related with some squamous cell carcinoma. In this study for the development of vaccine, the fibronectin binding protein gene of *S. anginosus*, designated *fbp62* was cloned, and the pathogenic involvement of Fbp62 in *S. anginosus* infection was investigated. The results indicated that the adhesive ability of an *fbp62* knockout mutant (Δ *fbp62*) of *S. anginosus* to mucosal epithelial cells diminished significantly, and that the Δ *fbp62*-infected mice showed considerably lower mortality and abscess formation rates, compared to the wild type *S. anginosus*-infected mice. Thus, a novel fibronectin binding protein of *S. anginosus*, Fbp62, could be an effective vaccine candidate for the *S. anginosus*-related oral cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

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：*Streptococcus anginosus*, フィブロネクチン結合タンパク質, 上皮細胞, 付着因子

1. 研究開始当初の背景

Streptococcus anginosus は口腔常在菌の一菌種で病原性は低いと考えられているが，近年，口腔癌をはじめ種々の消化器癌との関

連が示唆されている．しかし，現在，本菌の生物発癌に関わる病原因子あるいは病原性発現の機序についての解析はほとんどなされていない．

2. 研究の目的

本研究では、*S. anginosus* の感染初期に重要な役割を演じると考えられる病原因子、すなわち、本菌の宿主細胞への付着因子を分子および遺伝子レベルで明らかにする。さらに、感染における本分子の機能、役割を *in vitro* および *in vivo* の実験で検討することで *S. anginosus* の病原性発現機序の一端を解明するとともに、本付着因子の口腔癌予防ワクチンとしての可能性を組換えタンパク質を作製し検討する。

3. 研究の方法

(1) *S. anginosus* の株化上皮細胞への付着

株化上皮細胞をコンフルエントに培養したプレートに ³H ラベルした *S. anginosus* 菌株（分離株：癌組織由来，健康者口腔由来，NCTC10713）を添加して培養し，付着した菌の放射活性から付着率を算出し，菌株間での付着率の違いを検討する。培養液にフィブロネクチンあるいは抗フィブロネクチン抗体を添加し，それぞれの影響を検討して菌付着におけるフィブロネクチン結合の特異性について明らかにする。

(2) *S. anginosus* のフィブロネクチン結合タンパク質の同定

S. anginosus 菌株（癌組織由来，健康者口腔由来，NCTC10713）の菌表面タンパク質を抽出し，二次元電気泳動後ニトロセルロース膜に転写し，ウエストウエスタンブロッティングにより ECM 結合タンパク質の検出を行う。ECM 結合性を示すタンパク質のスポットを切り出し N 末端アミノ酸配列の解析を行い，その配列を相同検索により解析しタンパク質を同定する。次にインバース PCR やジーンウォーキング等で遺伝子のクローニングを行う。

(3) *S. anginosus* フィブロネクチン結合タンパク質（ワクチン抗原）のリコンビナント体および欠失変異株の作製

リコンビナントタンパク質は pGEX-4T ベクターを用いる。特異抗体はリコンビナント体を家兎に免疫して作製し，本遺伝子の部分配列を含む KO ベクターをコンピテントセルにトランスフェクトし相同組み替えにより欠失変異株を作製する。それらの付着活性などの生物活性を解析し，また，菌体におけるそれらタンパク質の局在について特異抗体を用いウエストスタンブロッティングで検討する。

(4) *S. anginosus* フィブロネクチン結合タンパク質（ワクチン抗原）を用いた感染予防実験

マウスにワクチン抗原を接種し，血清抗体価のチェックを行う。次に，*S. anginosus* 全身感染モデルで生存率から検討する。また，同様に背部皮下膿瘍形成に対する抑制効果

を判定する。

4. 研究成果

(1) *S. anginosus* の株化上皮細胞への付着

S. anginosus はいずれの菌株（分離株：癌組織由来，健康者口腔由来，NCTC10713）もヒト咽頭上皮細胞（HEp-2）およびマウス歯肉上皮細胞（GE1）に対して高い付着率能を示した。さらに，*S. anginosus* は細胞外マトリックスタンパク質のうち特にフィブロネクチンに対する有意な付着が認められ，本菌の上皮細胞に対する付着はフィブロネクチンあるいは抗フィブロネクチン抗体により阻害されたことから *S. anginosus* の上皮細胞への付着にはフィブロネクチン結合タンパク質が関与していることが示唆された。

(2) *S. anginosus* のフィブロネクチン結合タンパク質の同定

S. anginosus のフィブロネクチン結合タンパク質を同属の菌種の遺伝子配列から高度保存領域を検索し，インバース PCR やジーンウォーキング等で遺伝子を同定した。本遺伝子（*fbp62*）は 1650 塩基対からなり，その遺伝子産物 Fbp62 は 549 アミノ酸からなる分子量 62,000，pI は 8.1 と推定された。これは他のレンサ球菌で報告されているフィブロネクチン結合タンパク質との相同性がアミノ酸レベルで 72-82% と高かった。

(3) *S. anginosus* フィブロネクチン結合タンパク質のリコンビナント体，欠失変異株の作製およびそれら付着活性

fbp62 を pGEX-4T に組みこみリコンビナント Fbp62 を作製した。また，KO ベクターを用いて欠失変異株を作製した。リコンビナント Fbp62 は固相化フィブロネクチンに有意の付着性を示し，*S. anginosus fbp62* 欠損株は固相化フィブロネクチンおよび上皮細胞（HEp-2）への付着が野生株に比べ有意に低かった。また，Fbp62 は菌体表面に局在していることが明らかとなった。

(4) *S. anginosus* フィブロネクチン結合タンパク質の *in vivo* における病原性の評価

S. anginosus fbp62 欠損株では野生株に比べマウスに対する致死率および膿瘍形成能が有意に低かった。また，あらかじめ Fbp62 を免疫し特異抗体が認められたマウスでは，*S. anginosus* による感染の病原性を有意に低下させた。

以上の成績から，*S. anginosus* の Fbp62 は上皮細胞へのフィブロネクチンを介した付着機序に関与する重要な病原因子として働き，その組換えタンパク質は感染防御抗原としての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 8 件)

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) Taira, M., Kagiya, T., Harada, H., Sasaki, M., Kimura, S., Narushima, T., Nezu, T. and Araki, Y.: Microscopic observations and inflammatory cytokine productions of human macrophage phagocytising submicron titanium particles. J. Mater. Sci. Mater. Med., 査読有 21: 267-275 (2010)
- 6) Kishi, M., Ohara-Nemoto, Y., Takahashi, M., Kishi, K., Kimura, S. and Yonemitsu, M.: Relationship between oral status and prevalence of periodontopathic bacteria on the tongues of elderly individuals. J. Med. Microbiol., 査読有 59: 1354-1359 (2010)
- 7) Ono, T., Ohara-Nemoto, Y., Shimoyama,

Y., Okawara, H., Kobayakawa, T., Baba, T. T., Kimura, S. and Nemoto, T. K.: Amino acid residues modulating the activities of staphylococcal glutamyl endopeptidases. Biol. Chem., 査読有 391: 1221-1232 (2010)

8) Saitoh, S., Sasaki, K., Nezu, T., Taira, M., Shimoyama, Y., Sasaki, M., Kimura, S. and Ishizeki, K.: Histological and TEM observation of subcutaneous tissues exposed to particulate copper, nickel and titanium. J. Oral Tissue Engin., 査読有 8: 102-106 (2010)

〔学会発表〕 (計 23 件)

- ① 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), March 21 (2013), Seattle, USA,
- ② 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. 2013 年 3 月 20 日, 幕張
- ③ 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 回歯科基礎医学会学術大会. 2012 年 9 月 16 日, 郡山
- ④ 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), (June 21, 2012) Iguazu Falls, Brazil
- ⑤ 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. 2012 年 3 月 27 日, 長崎

- ⑥ 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 回歯科基礎医学会学術大会. 2011 年 10 月 1 日, 岐阜
- ⑦ 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), (2011) September 7, Sapporo, Japan
- ⑧ 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. (2011) June 26, Paris, France
- ⑨ 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. (2011) May 24, New Orleans, USA
- ⑩ 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. (2011) March 8, Sendai, Japan
- ⑪ 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. (2011) March 8, Sendai, Japan
- ⑫ 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. (2011) March 8, Sendai, Japan
- ⑬ 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. (2011) March 8, Sendai, Japan
- ⑭ Taira, M., Sasaki, M. and Kimura, S.: Macrophage reaction against sub-micron titanium particles. 4th International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai. (2011) March 8, Sendai, Japan
- ⑮ 下山 佑, 佐々木 実, 石河太知, 古玉芳豊, 木村重信: Nutritionally variant streptococci の新規迅速同定法の開発, 第 36 回岩手医科大学歯学会総会, 2010 年 12 月 4 日, 盛岡
- ⑯ 平 雅之, 佐々木 実, 木村重信: ストレプトアビジン付き磁性マイクロビーズを用いた単球の磁気回収に関する研究 第 52 回歯科基礎医学会学術大会総会 2010 年 9 月 22 日, 東京
- ⑰ 古玉芳豊, 佐々木 実, 下山 佑, 石河太知, 木村重信: Anginosus group streptococci のフィブロネクチン結合タンパク質の解析 第 52 回歯科基礎医学会学術大会総会 2010 年 9 月 22 日, 東京
- ⑱ 下山 佑, 佐々木 実, 石河太知, 根本優子, 根本孝幸, 木村重信: Nutritionally variant streptococci の新規迅速同定法の開発, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総

会 2010年9月22日, 東京

- ⑱ 下山 佑, 佐々木 実, 石河太知, 木村重信: Nutritionally variant streptococci の新規迅速同定法 第64回日本細菌学会 東北支部総会, 2010年8月19日, 仙台
- ⑳ Ohara-Nemoto, Y., Rouf, S.M.A., Shimoyama, Y., Kimura, S. and Nemoto, T.K.: Structural chemistry of *Staphylococcus aureus* glutamyl endopeptidase. 88th General Session & Exhibition of the IADR. (2010) July 16, Barcelona, Spain
- ㉑ Ishikawa, T., Ohara-Nemoto, Y., Shimoyama, Y., Sasaki, M. and Kimura, S.: SLPI production from gingival epithelial cells against *Porphyromonas gingivalis* infection. 88th General Session & Exhibition of the IADR. (2010) July 15, Barcelona, Spain
- ㉒ Otake-Asakawa, A., Kimura, S., Asakawa, T. and Tanaka, M.: Maternal transmission of mutans and other oral streptococcal species. 88th General Session & Exhibition of the IADR. (2010) July 15, Barcelona, Spain
- ㉓ Kodama, Y., Sasaki, M., Shimoyama, Y., Tajika, S. and Kimura, S.: Adhesion mechanism of *Streptococcus anginosus* to mucosal epithelial cells. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (20th ECCMID 2010). (2010) April 13, Vienna, Austria

[図書] (計6件)

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

(2012)1-18, Pathogenesis and Treatment of Periodontitis

- 2) Sasaki, M., Kodama, Y., Shimoyama, Y., Ishikawa, T. and Kimura, S.: Springer Japan, Tokyo: Fibronectin binding activity of *Streptococcus anginosus* promotes the adherence to mucosal epithelial cells. In Interface Oral Health Science 2011 (Watanabe, M. et al., eds.), (2012) 204-205,
- 3) Shimoyama, Y., Sasaki, M., Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T. K., Ishikawa, T. and Kimura, S.: Springer Japan, Tokyo: Rapid identification of *Abitrophia/Granulicatella* species using by 16S rRNA based PCR and RFLP. In Interface Oral Health Science 2011 (Watanabe, M. et al., eds.), (2012)206-208,
- 4) Otake-Asakawa, A., Harada-Oikawa, R., Ohara-Nemoto, Y., Tanaka, M. and Kimura, S.: Springer Japan, Tokyo, Maternal transmission of mutans and other oral streptococcal species. In Interface Oral Health Science 2011 (Watanabe, M. et al., eds.), (2012)198-200,
- 5) Nomura, T., Suzuki, T., Furuya, J., Shimoyama, Y., Sasaki, M. and Kimura, S.: , Springer Japan, Tokyo, In vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic resin with different surface status. In Interface Oral Health Science 2011 (Watanabe, M. et al., eds.) (2012) 145-146,
- 6) Taira, M., Sasaki, M. and Kimura, S.: , Springer Japan, Tokyo, Macrophage reaction against sub-micron titanium particles. In Interface Oral Health Science 2011 (Watanabe, M. et al., eds.) (2012)283-284,

[その他]
ホームページ等

[http://hitech-d.iwate-med.ac.jp/micr/
index.htm](http://hitech-d.iwate-med.ac.jp/micr/index.htm)

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 (SHIMOYAMA YU)
岩手医科大学・歯学部・助教
研究者番号：90453331