

## *Streptococcus anginosus* の粘膜上皮細胞への付着機構

古玉 芳豊

岩手医科大学歯学部口腔病因病態制御学講座・口腔微生物学免疫学分野

(主任 : 木村 重信 教授)

(受付 : 2009年10月29日)

(受理 : 2009年11月30日)

**Abstract :** Although *Streptococcus anginosus* is a part of the normal flora found in human dental plaque, recent studies indicate that *S. anginosus* infection in oral mucosa can be associated with oral squamous cell carcinoma. The organism possesses a number of pathogenic properties, however, the adhesive mechanism that mediates the initial process of *S. anginosus* infection to oral mucosal epithelial cells remains to be elucidated. In this study, the adhesive abilities of *S. anginosus* to mucosal epithelial cells of a human larynx carcinoma cell line (HEp-2 cells) and a gingival epithelial cell line (GE1 cells) as well as the immobilized fibronectin were investigated. The results indicated that *S. anginosus* can adhere to both mucosal epithelial cells as other oral streptococci do, and that the adhesive ability could be ascribable to mainly its fibronectin-mediated adherence to the mucosal epithelial cells. It was also indicated that the adhesive ability to HEp-2 cells of the *S. anginosus* isolates from oral cancer tissues was significantly higher than that of the isolates from the plaque sample of healthy subjects. Although the cell-surface expression of fibronectin in HEp-2 cells was augmented by the bacterial adhesion itself and the autocrine activation of TGF- $\beta$  1 induced by the bacterial adhesion, the addition of exogenous fibronectin (10 nM) enhanced the *S. anginosus* adherence to HEp-2 cells. Furthermore, the pretreatments with fibronectin of the bacterial cells as well as HEp-2 cells enhanced the *S. anginosus* adherence, and the enhancements were abrogated by the addition of anti-fibronectin antibodies, suggesting the coexistence of a direct adhesion of *S. anginosus* to the fibronectin of HEp-2 cell surfaces and another fibronectin-mediated adhesion mechanism involving a fibronectin bridge between the *S. anginosus* fibronectin-binding molecule(s) and the integrins of HEp-2 cells. Moreover, the adhesive ability of the oral cancer isolates of *S. anginosus* was markedly higher than those of the plaque sample isolates and of the laboratory strain of *S. anginosus*. Taken together, the present findings suggest that *S. anginosus* could adhere to mucosal epithelial cells via multiple adhesion mechanisms, and the adhesive ability to fibronectin could be involved in the pathogenicity of *S. anginosus*, leading to the onset of oral squamous cell carcinoma.

**Key Words :** *Streptococcus anginosus*, adhesion mechanism, mucosal epithelial cells, fibronectin

---

Adhesion mechanism of *Streptococcus anginosus* to mucosal epithelial cells

Yoshitoyo KODAMA

Department of Pathogenesis and Control of Oral Diseases, Division of Oral Microbiology and Immunology, Iwate Medical University School of Dentistry

(The chief : Prof. Shigenobu KIMURA)

1-3-27, Chuo-dori, Morioka, Iwate, 020-8505, JAPAN

## 緒 言

*Streptococcus anginosus* はヒトの口腔、特に(デンタル)プラークに常在するレンサ球菌の一菌種で、16S rRNA の塩基配列に基づくレンサ球菌の分類では *S. constellatus*, *S. intermedius* とともに *anginosus* group に属している<sup>1)</sup>。口腔以外では上気道、腸管、泌尿生殖器の粘膜面にも存在し、いずれの部位においても常在細菌叢の一員で病原性は低いと考えられているが、肺や肝臓での化膿性疾患や感染性心内膜炎の原因菌ともなることが報告されている<sup>2-6)</sup>。

しかし、1995年および1998年に、*S. anginosus* の新たな病原性についての報告がなされた<sup>7,8)</sup>。それは、ヒトの胃および食道の扁平上皮癌組織中から *S. anginosus* のゲノム DNA が高頻度で検出されるとの報告で、*S. anginosus* が発癌(生物発癌)に関与することを示唆するとともに、*S. anginosus* の主要定着部位である口腔での発癌にも本菌の感染が関与している可能性を示唆するものであった。この報告以降、多くの研究グループが *S. anginosus* の病原性、特に生物発癌に関わる病原性に注目するようになった。我々の研究グループでも、*S. anginosus* の生物発癌に関わる病原機序に関して、核酸の化学修飾による突然変異につながるシクロオキシゲナーゼ2や一酸化窒素のマクロファージからの過剰産生を *S. anginosus* が誘導することを報告してきた<sup>9-11)</sup>。また口腔癌との関連性については、特に口腔扁平上皮癌で *S. anginosus* 感染が高頻度で観察されることが明らかとなってきた<sup>12,13)</sup>。我々の研究グループでも、口腔扁平上皮癌の約45%で *S. anginosus* 感染が見られること、また、口腔癌組織に *S. anginosus* 感染が見られる場合、プラーク中にも *S. anginosus* の付着/定着が見られ、プラーク中の *S. anginosus* と口腔癌組織中の *S. anginosus* 株のゲノタイプが一致したことから、プラークが *S. anginosus* の感染源であることを明らかにした<sup>14)</sup>。これらの研究結果から、口腔癌に関連する *S. anginosus* 株では(通常は見られない)口

腔粘膜上皮に対する強い付着能を有していることが推測されるが、本菌の上皮細胞に対する付着機構についてはこれまでのところほとんど研究が行われていない。

細菌感染の第一段階は宿主細胞への付着に始まることから、宿主細胞への菌体付着因子とその付着機構の解明は細菌ビルレンス因子/病原機序を解明する上で重要で、特に病原性の強い細菌について活発に研究が行われている。レンサ球菌属では *S. pyogenes* で、気管支粘膜上皮細胞由来の A549 細胞、喉頭粘膜上皮由来の HEp-2 細胞、臍帯静脈内皮細胞株の HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) 細胞といった上皮細胞株や血管内皮細胞株を用いて付着機構の解明が進んでおり<sup>15-17)</sup>、また、*S. pyogenes* 側の付着因子としては複数のフィブロネクチン結合タンパク質が存在することが明らかにされている<sup>18-21)</sup>。

フィブロネクチンは分子量 450 kDa の糖タンパク質で、粘膜上皮細胞の分泌する主要な細胞外マトリックス (ECM) タンパク質である<sup>22)</sup>。そのため、粘膜上皮細胞に付着する多くの細菌の付着因子の標的リガンドとなる<sup>20, 21, 23, 24)</sup>。細菌のフィブロネクチン結合分子としては、レンサ球菌では *S. pyogenes* の Sfb I および Sfb II<sup>20)</sup>、*S. dysgalactiae* の FnBA および FnB<sup>25)</sup>、*S. gordonii* の CshA および FbpA<sup>26)</sup>、*S. pneumoniae* の PavA<sup>27)</sup>などが、*Staphylococcus aureus* では FnBPA<sup>28)</sup>などが同定されている。しかし、*S. anginosus* の上皮細胞への付着機構を検討した報告はなく、*S. anginosus* のフィブロネクチン結合分子についても明らかではない。そこで本研究では、健常ヒトプラークおよび口腔癌患者病巣組織より分離した *S. anginosus* 株を用いて、*S. anginosus* の粘膜上皮細胞への付着機構について検討するとともに、*S. anginosus* のフィブロネクチン結合能およびフィブロネクチン結合分子について検討した。さらに、粘膜上皮細胞への付着能から癌組織由来の *S. anginosus* 株の病原特異性についても検討を行った。

## 材料および方法

### 1. 使用細菌, 細胞株および培養方法

*S. anginosus* NCTC 10713 株 (Lancefield group G), *S. anginosus* 臨床分離株 (口腔癌組織由来株および健常者プラーク由来株), およびその他の口腔レンサ球菌株として *S. sanguinis* ATCC 10556 株, *S. mitis* ATCC 49456 株, *S. mutans* ATCC 25175 株, *S. gordonii* ATCC 10558 株を用いた. 菌株は Todd Hewitt Broth (Becton and Dickinson Co., Cockeysville, MD, USA) に接種し 37°C で 24 時間培養した.

粘膜上皮細胞としては, ヒト咽頭粘膜上皮細胞由来株の Human larynx carcinoma cell line ATCC CCL-23 株 (HEp-2 細胞; 大日本製薬株式会社, 大阪), およびマウス歯肉上皮細胞由来の GE1 細胞 (岩手医科大学口腔病態制御学講座口腔病理学分野 畠山節子博士より分与) を用いた. HEp-2 細胞は, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; SIGMA-ARDRICH, St. Louis, MO, USA) に 10% (v/v) ウシ胎児血清 (FBS; Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) および 100 U/ml ペニシリン, 100 μg/ml ストレプトマイシン (ペニシリン・ストレプトマイシン液; SIGMA-ARDRICH) を添加した培地で, 5% CO<sub>2</sub> - 95% 大気, 37°C の条件で培養・維持した. GE1 細胞は, 1% (v/v) FBS を含む SFM-101 培地 (日本製薬株式会社, 東京) に同様にペニシリン・ストレプトマイシン液を添加した系で, 5% CO<sub>2</sub> - 95% 大気, 33°C の条件で培養・維持した.

### 2. HEp-2 細胞および GE1 細胞への *S. anginosus* の付着能

*S. anginosus* および口腔レンサ球菌株を, [6-<sup>3</sup>H]-thymidine 37 kBq/ml 存在下で 37°C で 18 時間培養し, [<sup>3</sup>H] 標識した. 培養終了後, 菌体を滅菌リン酸緩衝食塩水 [PBS; pH 7.4] で 2 回洗浄し, [<sup>3</sup>H] 標識細菌を調製した. [<sup>3</sup>H] 標識細菌 (10,000 cpm ≒ 5 × 10<sup>6</sup> CFU) を, 12 穴培養プレート (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) でコンフルエントにした HEp-2 細

胞および GE1 細胞 (付着実験の開始 12 時間前から FBS とペニシリン・ストレプトマイシン液を除いた DMEM で培養) に添加し, 37°C で 90 分間静置した. 非付着細菌を洗浄, 除去した後, 2 M NaOH を 500 μl 加えて 65°C で 20 分間静置し, HEp-2 および GE1 細胞を溶解し, 付着細菌を回収した. 液体シンチレーションカウンター (ALOKA LIQUID SCINTILLATION COUNTER LSC-6100; アロカ, 東京) を用いて放射活性を測定し, 付着菌数を測定した.

### 3. ECM タンパク質への *S. anginosus* の付着能

ECM タンパク質としてはフィブロネクチン, ラミニン, ビトロネクチンおよびコラーゲン (いずれも SIGMA-ARDRICH) を用い, 固相化した ECM タンパク質への [<sup>3</sup>H] 標識細菌の付着菌数から, ECM タンパク質への付着能を測定した. すなわち, 96 穴マイクロプレート (Nunc A/S) に最終濃度 20 μg/ml の ECM タンパク質を添加し, 一夜 4°C で静置し, 固相化した後, 1% 牛血清アルブミン (SIGMA-ARDRICH) でブロッキングを行った. これに [<sup>3</sup>H] 標識細菌 (5 × 10<sup>6</sup> CFU) を加え, 37°C で 90 分間静置した. 非付着細菌を洗浄, 除去した後, 2.5% トリプシン溶液を加えて付着細菌を回収し, その放射活性から付着細菌を測定した.

### 4. HEp-2 細胞におけるフィブロネクチンの発現

HEp-2 細胞をコンフルエントまで培養し, TGF-β 1 (10 nM) で 24 時間処理した. PBS で 2 回洗浄後, セルスクレーパーで回収し, Laemmli<sup>29)</sup> の方法に準じて, 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて細胞タンパク質の SDS-PAGE を行った. ウエスタンブロッティングは, Sasaki, M. らの方法<sup>10)</sup> に準じ, ビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜 (Millipore Co., Bedford, MA, USA) に 200 mA, 1 時間転写を行った後, 200 倍希釈したマウス抗フィブロネクチン抗体 (SIGMA-ARDRICH), 3,000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 (Promega Co., WI, USA) および BCIP/NBT 含有 Alkaline Phosphatase Substrate

(Invitrogen Co.) を用いて検討した。

5. *S. anginosus* 菌体刺激による HEp-2 細胞の TGF- $\beta$  1 およびフィブロネクチン遺伝子発現コンフルエントまで培養した HEp-2 細胞に *S. anginosus* NCTC 10713 株を  $5 \times 10^6$  CFU 添加し, 37°C, 90 分, 5% CO<sub>2</sub> - 95% 大気下で培養した。培養後, RNA 抽出キット (QIAGEN Co., Hilden, Germany) で total RNA を回収した。Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen Co.) を用いて cDNA を合成し, TGF- $\beta$  1 (F; 5'-GGG ACT ATC CAC CTG CAA GA-3', R; 5'-CCT CCT TGG CGT AGT AGT CG-3'), フィブロネクチン (F; 5'-CCG TGG GCA ACT CTG TC-3', R; 5'-TGC GGC AGT TGT CAC AG-3'), およびアクチン特異的プライマー (F; 5'-TGC TGG GCC GCT CTA GGC AC-3', R; 5'-TGG CCT TAG GGT TCA GGG GG-3') を用いて PCR を行った。PCR の条件は 95°C で 30 秒, 52°C で 30 秒, 72°C で 60 秒の 40 サイクルで行った<sup>10)</sup>。反応後, エチジウムブロマイドを含む 1.8% アガロースゲルを用いて電気泳動し, トランスイルミネーターで PCR 産物を検出した。

6. HEp-2 細胞への *S. anginosus* 付着における TGF- $\beta$  1 前処理の影響

コンフルエントまで培養した HEp-2 細胞に TGF- $\beta$  1 (10 nM) を添加し 24 時間培養した。*S. anginosus* NCTC 10713 株および口腔癌組織由来 *S. anginosus* 株の HEp-2 細胞への付着率は菌体の放射活性から検討した。

7. HEp-2 細胞への *S. anginosus* NCTC 10713 株の付着に及ぼすフィブロネクチン添加の影響

コンフルエントまで培養した HEp-2 細胞にフィブロネクチン (5, 10, 20, 50, 100 nM) を添加した。1 時間後 *S. anginosus* NCTC 10713 株を接種し, 37°C で 90 分間反応させ, 付着した菌体の放射活性から付着率を求めた。

8. HEp-2 細胞への *S. anginosus* の付着におよぼすフィブロネクチン前処理および抗フィブロネクチン抗体の影響

HEp-2 細胞をフィブロネクチン (10 nM) で 2 時間, 5% CO<sub>2</sub> - 95% 大気, 37°C で処理した。また, *S. anginosus* NCTC 10713 株および口腔癌組織由来 *S. anginosus* 株も同様にフィブロネクチン (10 nM) で 2 時間処理し, 付着実験に用いた。また, 抗フィブロネクチン抗体の付着に及ぼす影響を検討する目的で, フィブロネクチンによる前処理を行った *S. anginosus* 菌体あるいは HEp-2 細胞を用いて, 抗フィブロネクチン抗体 (1:200) 存在下あるいは非存在下で付着実験を行った。なお, 同一条件下で用いたコントロールウサギ IgG は HEp-2 細胞への付着に影響を及ぼさなかった。付着の測定は菌体の放射活性から行った。

9. 統計解析

*S. anginosus* NCTC 10713 株と他の口腔レンサ球菌の実験室株間, および口腔癌組織由来 *S. anginosus* 株と健常者プラーク由来 *S. anginosus* 株間の, HEp-2 細胞および GE1 細胞への付着能については, unpaired *t* 検定および ANOVA を用いて行った。

## 結 果

1. HEp-2 細胞および GE1 細胞への *S. anginosus* の付着能

HEp-2 細胞および GE1 細胞への *S. anginosus* の付着能を他の口腔レンサ球菌と比較検討した (図 1)。その結果, *S. anginosus* NCTC 10713 株は HEp-2 細胞に対して明らかな付着能を有すること, その付着能は *S. gordonii* を除く他の口腔レンサ球菌, および健常者プラーク由来 *S. anginosus* 株と同程度であることが明らかとなった。また, *S. anginosus* の付着能は GE1 細胞に対しても認められた。*S. anginosus* 臨床分離株間の比較では, 口腔癌組織由来株の付着能は, HEp-2 細胞および GE1 細胞のいずれに対しても, 健常者プラーク由来株のそれと比較して有意に高かった ( $p < 0.05$ )。

2. ECM タンパク質に対する *S. anginosus* の付着能

*S. anginosus* の HEp-2 細胞および GE1 細胞

への付着において、粘膜上皮細胞側の主要な標的リガンドとなると考えられるフィブロネクチンへの *S. anginosus* の直接的な付着能について検討した (図 2). その結果, *S. anginosus* NCTC 10713 株は固相化したフィブロネクチンに対して明らかな付着能を有し, その付着能は他の口腔レンサ球菌および健常者プラーク由来 *S. anginosus* 株と同程度であることが明らかと

なった. また, 口腔癌組織由来 *S. anginosus* 株の付着能は健常者プラーク由来株のそれと比較して有意に高かった ( $p < 0.05$ ). 一方, ビトロネクチンと粘膜上皮組織表層には通常発現していないと考えられる ECM タンパク質であるラミニンおよびコラーゲン<sup>22)</sup> に対しては, *S. anginosus* を含むいずれの口腔レンサ球菌の付着能も低く, ラミニンおよびビトロネクチンで

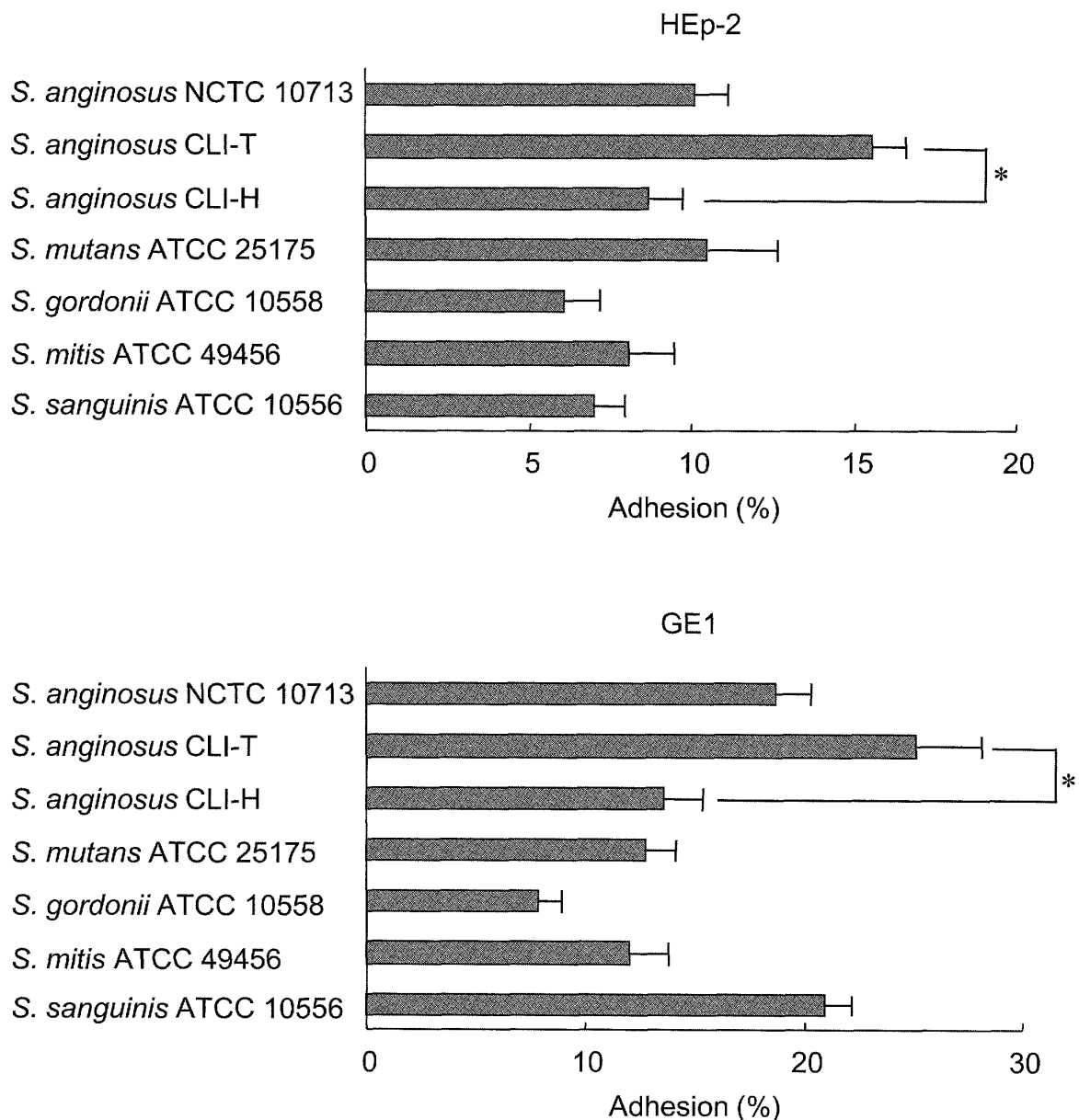


図 1. HEp-2 細胞および GE1 細胞への *S. anginosus* および口腔レンサ球菌の付着能  
<sup>3</sup>H 標識した *S. anginosus* および口腔レンサ球菌株を HEp-2 細胞および GE1 細胞に添加し, 37°C で 90 分間静置した. 付着率 (Adhesion) は液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性から測定した. *S. anginosus* CLI-T: 口腔癌組織由来株 (3 株), *S. anginosus* CLI-H: 健常者プラーク由来株 (5 株). 付着率: 平均値 ± SE (1 回の測定につき 4 データをとり, 同じ実験を 3 回繰り返した), \*:  $p < 0.05$

はフィブロネクチンの50%程度, コラーゲンでは1-2%の付着率であった。

### 3. *S. anginosus* 菌体刺激および TGF- $\beta$ 1 による HEP-2 細胞のフィブロネクチン発現の誘導

粘膜上皮細胞のフィブロネクチン発現は細菌付着により影響を受ける可能性があり, また, HEP-2 細胞を用いた研究で TGF- $\beta$ 1 処理によりフィブロネクチン発現が増強されることが示されている<sup>30)</sup>. そこで, 無刺激の HEP-2 細胞のフィブロネクチンの発現状況を確認するとともに, *S. anginosus* 菌体刺激および TGF- $\beta$ 1 によるフィブロネクチン発現の変動について検討した. その結果, HEP-2 細胞は無刺激でフィブロネクチンを発現しており, その発現は *S. anginosus* 菌体刺激および TGF- $\beta$ 1 のいずれに

よっても増強されることが明らかとなった (図 3A および 3B). また, *S. anginosus* の菌体刺激によりフィブロネクチン発現増強とともに TGF- $\beta$ 1 発現の増強がみられた (図 3B) ことから, 今回用いた付着実験系では, *S. anginosus* の菌体刺激による直接的, および内因性 TGF- $\beta$ 1 による間接的なフィブロネクチンの発現増強が起こっていることが示唆された. そこで, *S. anginosus* NCTC 10713 株および口腔癌組織由来株を用いて TGF- $\beta$ 1 の影響を検討した結果, いずれにおいても TGF- $\beta$ 1 添加で付着能が増強された (図 3C).

### 4. *S. anginosus* の HEP-2 細胞への付着におけるフィブロネクチン添加の影響

*S. anginosus* の HEP-2 細胞への付着機構にフィブロネクチンが重要な役割を果たすことが

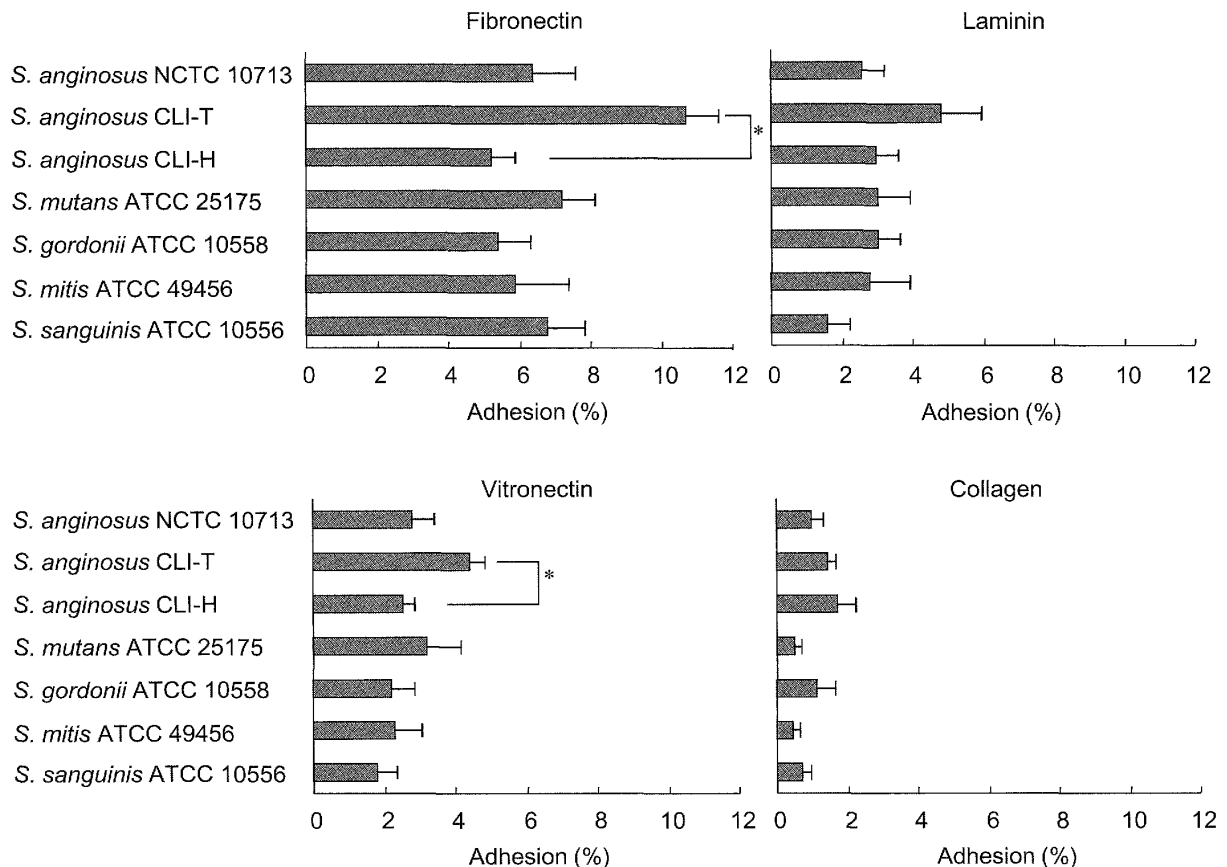


図2. ECMタンパク質への *S. anginosus* および口腔レンサ球菌の付着能  
96穴マイクロプレートに固相化したECMタンパク質(フィブロネクチン, ラミニン, ビトロネクチンおよびコラーゲン)への $^3\text{H}$ 標識細菌の付着菌数から, ECMタンパク質への付着率(Adhesion)を測定した. *S. anginosus* CLI-T: 口腔癌組織由来株(3株), *S. anginosus* CLI-H: 健常者プラーク由来株(5株). 付着率: 平均値 $\pm$ SE(1回の測定につき4データをとり, 同じ実験を3回繰り返した)

明らかとなったことから, *S. anginosus* NCTC 10713 株の HEp-2 細胞への付着実験系にフィブロネクチンを添加してその影響を検討した. その結果, *S. anginosus* NCTC 10713 株の付着は, 10 nM までのフィブロネクチン添加により上昇し, それ以上の濃度では低下した (図 4A). 10 nM のフィブロネクチン添加により有意の上昇がみられたため, 口腔癌組織由来 *S. anginosus* 株および健常者プラーク由来株についても, フィブロネクチン (10 nM) 添加の影響を検討したところ, 口腔癌組織由来の臨床分離株において同様に HEp-2 細胞への付着の上昇

が認められた (図 4B).

5. *S. anginosus* の HEp-2 細胞への付着におけるフィブロネクチン前処理の影響

*S. anginosus* の HEp-2 細胞への付着実験系で, 添加したフィブロネクチンが菌体側に作用しているのか, HEp-2 細胞側に作用しているのかを明らかにする目的で, つぎに, *S. anginosus* 菌体 (図 5A) および HEp-2 細胞 (図 5B) をフィブロネクチンで前処理し, その影響を検討した. その結果, 菌体を前処理した場合も, HEp-2 細胞前処理した場合も, *S. anginosus* の HEp-2 細胞への付着が上昇した.

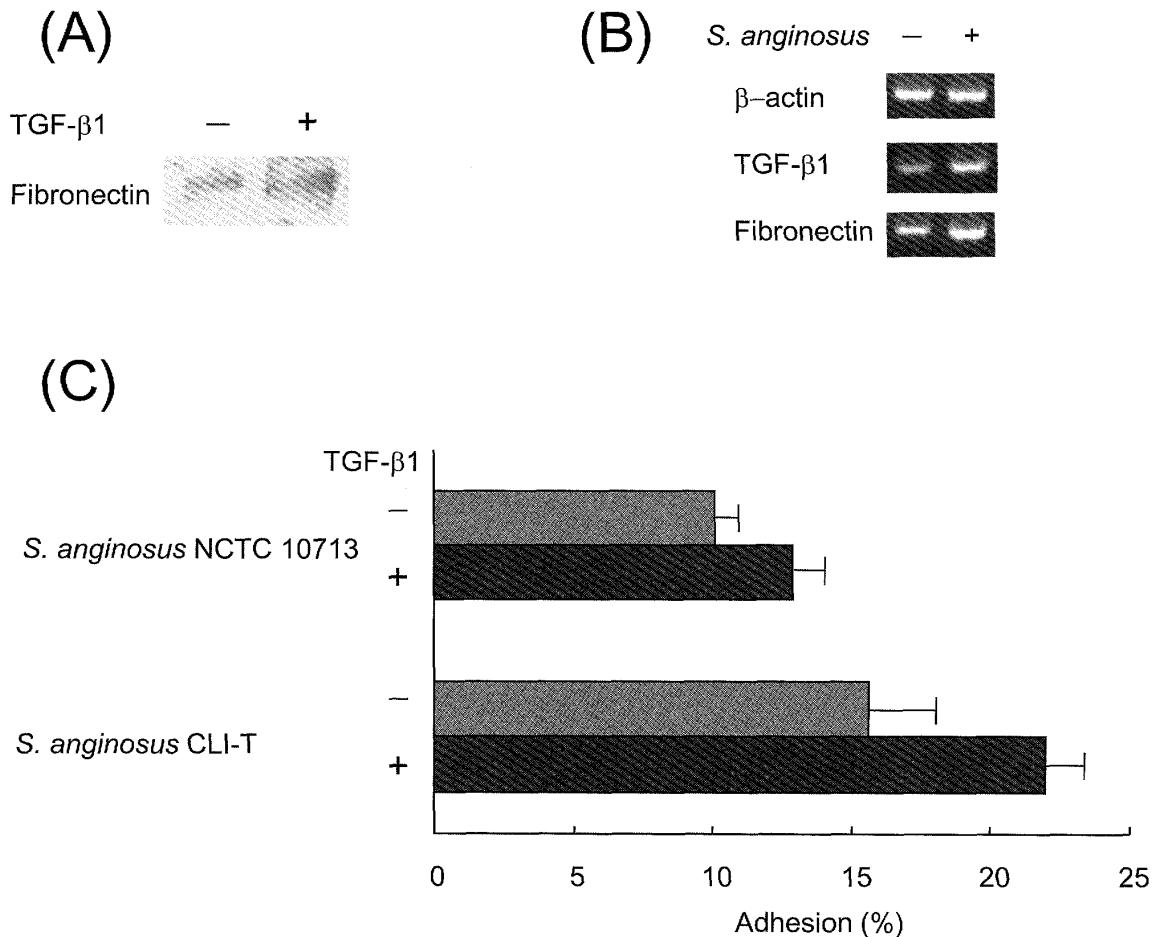


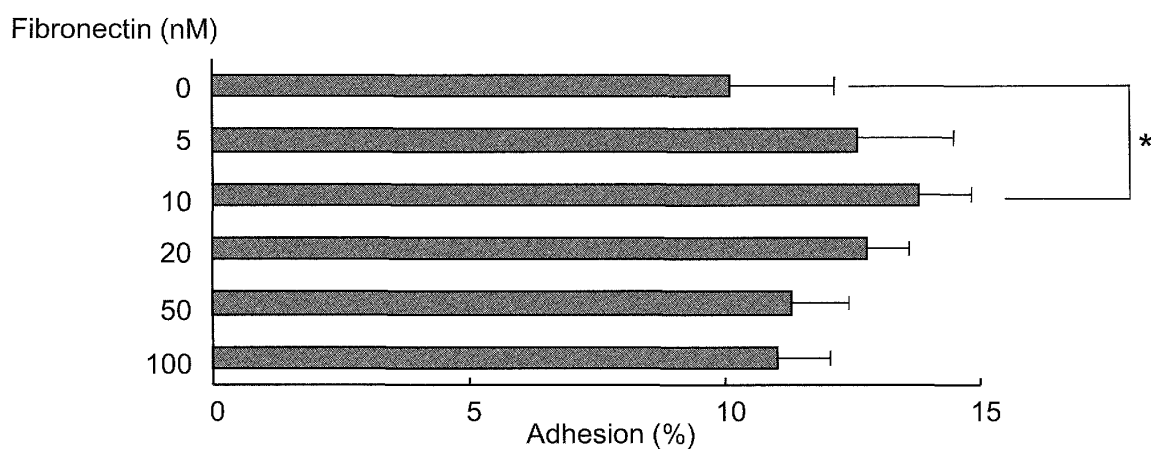
図 3. HEp-2 細胞における *S. anginosus* 刺激によるフィブロネクチン, TGF-β 1 の発現および TGF-β 1 が *S. anginosus* の付着に及ぼす影響  
 (A) HEp-2 細胞を TGF-β 1 (10 nM) で 24 時間処理し, 抗フィブロネクチン抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った. (B) HEp-2 細胞を *S. anginosus* NCTC 10713 株で刺激後, TGF-β 1, フィブロネクチン, およびアクチン特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った. (C) HEp-2 細胞に TGF-β 1 (10 nM) を添加し 24 時間培養した. *S. anginosus* NCTC 10713 株および *S. anginosus* CLI-T (口腔癌組織由来株, 3 株) の HEp-2 細胞への付着率 (Adhesion) を菌体の放射活性から検討した. 付着率: 平均値 ± SE (1 回の測定につき 4 データをとり, 同じ実験を 3 回繰り返し行った)

6. *S. anginosus* の HEp-2 細胞への付着におけるフィブロネクチン前処理および抗フィブロネクチン抗体による抑制効果

*S. anginosus* 菌体および HEp-2 細胞をフィブロネクチンで前処理するといずれの場合も付着が上昇したことから、つぎに、実験系に抗フィブロネクチン抗体を添加してその抑制効果について検討した (図 6). *S. anginosus* NCTC

10713 株および口腔癌組織由来 *S. anginosus* 株のいずれの場合も、菌体あるいは HEp-2 細胞のフィブロネクチン (10 nM) 前処理で付着が上昇した。付着の上昇は、*S. anginosus* NCTC 10713 株のフィブロネクチン前処理の場合を除き、すべて有意であった。この実験系に抗フィブロネクチン抗体を添加した結果、いずれの上昇も低下し、抗フィブロネクチン抗体添加によ

(A)



(B)

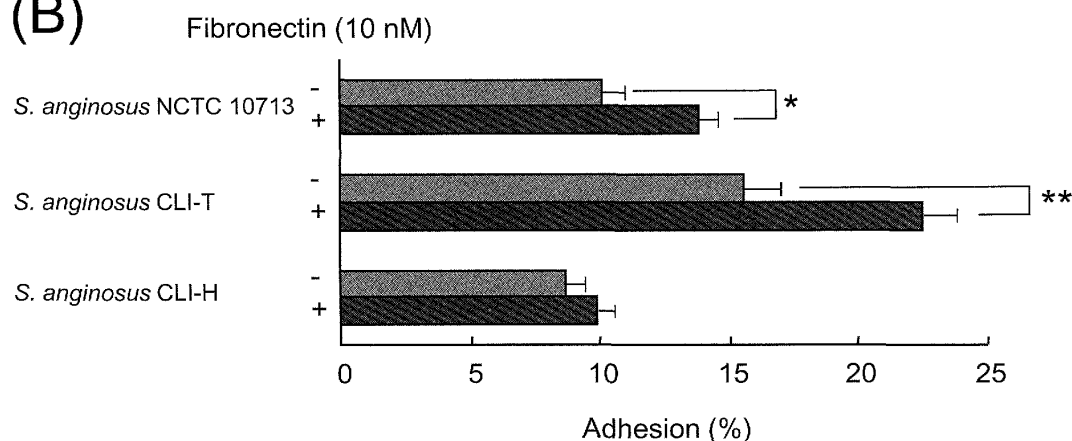


図 4. HEp-2 細胞への *S. anginosus* 株の付着に及ぼすフィブロネクチン添加の影響

(A) HEp-2 細胞にフィブロネクチン (5, 10, 20, 50, 100 nM) を添加した後, [<sup>3</sup>H]標識 *S. anginosus* NCTC 10713 株を接種し, 付着した菌体の放射活性から付着率 (Adhesion) を求めた. (B) HEp-2 細胞にフィブロネクチン (10 nM) を添加した後, [<sup>3</sup>H]標識 *S. anginosus* [NCTC 10713 株, CLI-T (口腔癌組織由来株, 3 株) および CLI-H (健常者プラーク由来株, 5 株)] を接種し, 付着した菌体の放射活性から付着率を求めた. 付着率: 平均値 ± SE (1 回の測定につき 4 データをとり, 同じ実験を 3 回繰り返した), \* : p < 0.05, \*\* : p < 0.01



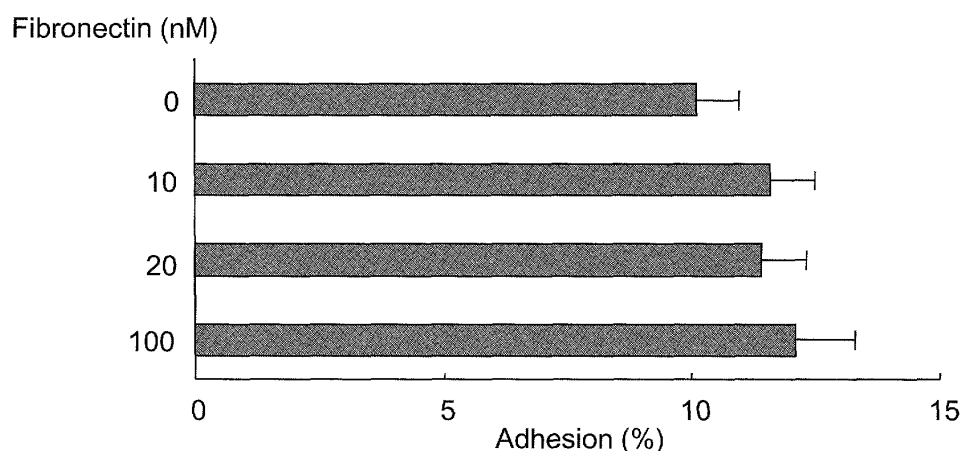
りフィブロネクチン前処理の効果が完全に抑制されることが明らかとなった。一方、前処理を行わなかった実験系への抗フィブロネクチン抗体の添加は、*S. anginosus* の HEp-2 細胞への付着に著明な影響を及ぼさなかった。

通常は歯肉粘膜への定着はほとんど見られない<sup>14)</sup>。しかし、口腔を含むヒトの上部消化器の癌組織中から本菌のゲノム DNA が高頻度で検出されるとの報告<sup>7, 8, 12-14)</sup> からすれば、*S. anginosus* が粘膜上皮細胞に付着／定着し感染が成立すると、あるいは、生物発癌能の高い *S. anginosus* 株が粘膜上皮細胞に感染することによって、口腔を含む上部消化器で発癌が誘導さ

考 察

*S. anginosus* はヒトのプラーク中に常在し、

(A)



(B)

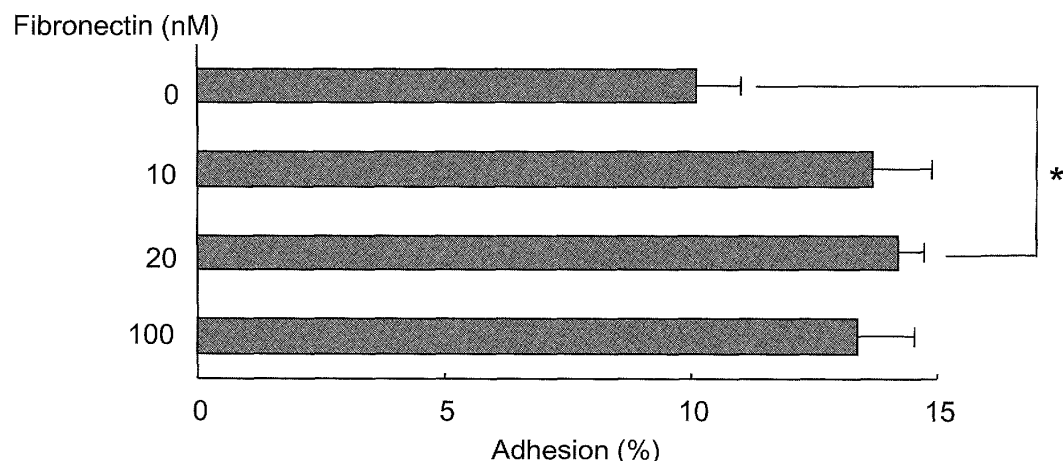


図5. HEp-2 細胞への *S. anginosus* NCTC 10713 株の付着に及ぼすフィブロネクチン前処理の影響  
 (A) [<sup>3</sup>H]標識 *S. anginosus* NCTC 10713 株をフィブロネクチン (10, 20, 100 nM) で前処理し、HEp-2 細胞への付着率 (Adhesion) を測定した。(B) HEp-2 細胞をフィブロネクチン (10, 20, 100 nM) で前処理し、 [<sup>3</sup>H]標識 *S. anginosus* NCTC 10713 株の付着率を測定した。付着率は放射活性から求めた。平均値 ± SE (1回の測定につき 4 データをとり、同じ実験を 3 回繰り返し行った)。\* : p < 0.05

れる可能性が示唆される。しかし、*S. anginosus* の粘膜上皮細胞に対する付着機構について検討した報告はほとんどなく、したがって、その付着因子についても明らかにはされていない。そこで本研究では、まず、健常ヒトプラークおよび口腔癌患者病巣組織より分離した *S. anginosus* 株を用いて、HEp-2 細胞および GE1 細胞への *S. anginosus* の付着機構について比較検討した。

その結果、HEp-2 細胞および GE1 細胞のいずれに対しても *S. anginosus* は明確な付着能を有していること、特に、口腔癌組織由来株の付着能は健常者プラーク由来株のそれと比較して有意に高いことが明らかとなった (図 1)。

細菌の上皮細胞への付着では、細菌の表層分子と上皮細胞上の分子間で特異的あるいは非特異的な相互作用が生じる<sup>15, 23)</sup>。特異的な付着において宿主側の標的分子と考えられているものにフィブロネクチンがある<sup>15, 24)</sup>。そこで、フィブロネクチンに対する付着能を検討した結果、*S. anginosus* は明確な付着能を有することが明らかとなった (図 2)。しかし、付着率からは

HEp-2 細胞あるいは GE1 細胞を対象とした場合 (図 1) と比較していずれも低かったことから、フィブロネクチンへの付着能は *S. anginosus* の上皮細胞への付着機序において主要な役割を果たすものの、その他の付着機構も存在することが示唆された。この成績は、*S. anginosus* の臨床分離株を用いて ECM タンパク質への付着能を検討した Allen ら<sup>31)</sup> の報告、同じ *anginosus* group のレンサ球菌である *S. intermedius* を用いて ECM タンパク質への付着能を検討し、フィブロネクチンへの付着能がコラーゲン I およびコラーゲン IV より有意に高いことを明らかにした Petersen ら<sup>32)</sup> の報告を支持する。

*S. anginosus* が上皮細胞に対し明確な付着能を有し、その付着機構としてはフィブロネクチンへの付着が重要な役割を演じていることが明らかとなったが、粘膜上皮細胞のフィブロネクチン発現は細菌付着により影響を受ける可能性があり、また、HEp-2 細胞を用いた研究で TGF- $\beta$  1 処理によりフィブロネクチン発現が増強されることが示されている<sup>30, 33)</sup>。細菌付着に

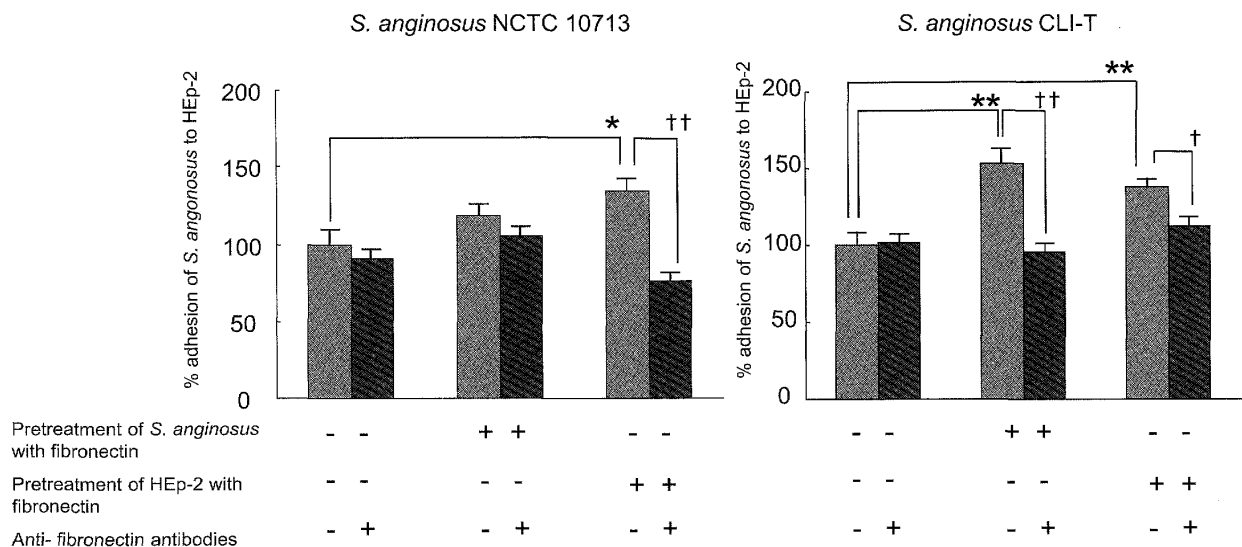


図 6. HEp-2 細胞への *S. anginosus* の付着におよぼすフィブロネクチン前処理および抗フィブロネクチン抗体の影響

HEp-2 細胞または [<sup>3</sup>H] 標識した *S. anginosus* [NCTC 10713 株および CLI-T (口腔癌組織由来株, 3 株)] をフィブロネクチン (10 nM) で前処理し、抗フィブロネクチン抗体 (1:200) 存在下あるいは非存在下で付着実験を行った。付着率 (Adhesion) は放射活性から測定した。平均値  $\pm$  SE (1 回の測定につき 4 データをとり、同じ実験を 3 回繰り返した)。\*,  $\dagger$ :  $p < 0.05$ ; \*\*,  $\dagger\dagger$ :  $p < 0.01$

よる上皮細胞でのフィブロネクチン発現増強についてはいくつかの機序が存在するが、直接的な作用のほかに、内因性の TGF- $\beta$  1 を誘導し、産生された TGF- $\beta$  1 のオートクライン刺激によるフィブロネクチン発現増強も可能性がある<sup>30, 33, 34</sup>。そこで本研究では、無刺激の HEp-2 細胞のフィブロネクチンの発現状況と、S. anginosus 菌体刺激および TGF- $\beta$  1 によるフィブロネクチン mRNA 発現の変動について検討した (図 3)。その結果、HEp-2 細胞は無刺激でフィブロネクチンを発現しており、その発現は S. anginosus 菌体刺激および TGF- $\beta$  1 のいずれによっても増強されることが明らかとなった (図 3)。また、S. anginosus の菌体刺激によりフィブロネクチン発現増強とともに TGF- $\beta$  1 発現の増強がみられたこと (図 3B) から、今回用いた付着実験系では、S. anginosus の菌体刺激による直接的、および内因性 TGF- $\beta$  1 による間接的なフィブロネクチンの発現増強が起こっている可能性が強く示唆された。

付着反応系にフィブロネクチンを添加した実験では、競合阻害がみられず、S. anginosus の上皮細胞への付着が増強された (図 4)。また、S. anginosus 菌体および HEp-2 細胞のいずれを

フィブロネクチンで前処理しても S. anginosus の上皮細胞への付着増強がみられたこと (図 5) から、S. anginosus の上皮細胞への付着機構には、遊離のフィブロネクチンの関与する付着機構が存在する可能性が強く示唆された (図 7)。そこで、付着実験系に抗フィブロネクチン抗体を添加してその抑制効果について検討した (図 6) 結果、遊離のフィブロネクチンは S. anginosus 菌体および HEp-2 細胞のいずれにも付着し、S. anginosus の上皮細胞への付着機構に関与していることが示唆された。

HEp-2 細胞上の遊離フィブロネクチンに対する結合分子としては、 $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンがそのレセプターであることが示されている<sup>14, 15</sup> (図 7)。一方、S. anginosus 上のフィブロネクチンに対する結合分子はこれまでのところ報告されていないが、他菌種では種々のフィブロネクチン結合タンパク質が同定されており、真核細胞への付着に重要な役割を演じていることが報告されている<sup>19-21, 23-27</sup>。

本研究から、S. anginosus の上皮細胞への付着機構には、フィブロネクチンの関与しないものと、フィブロネクチンを介する付着機序があり、フィブロネクチンを介する付着機序ではさ

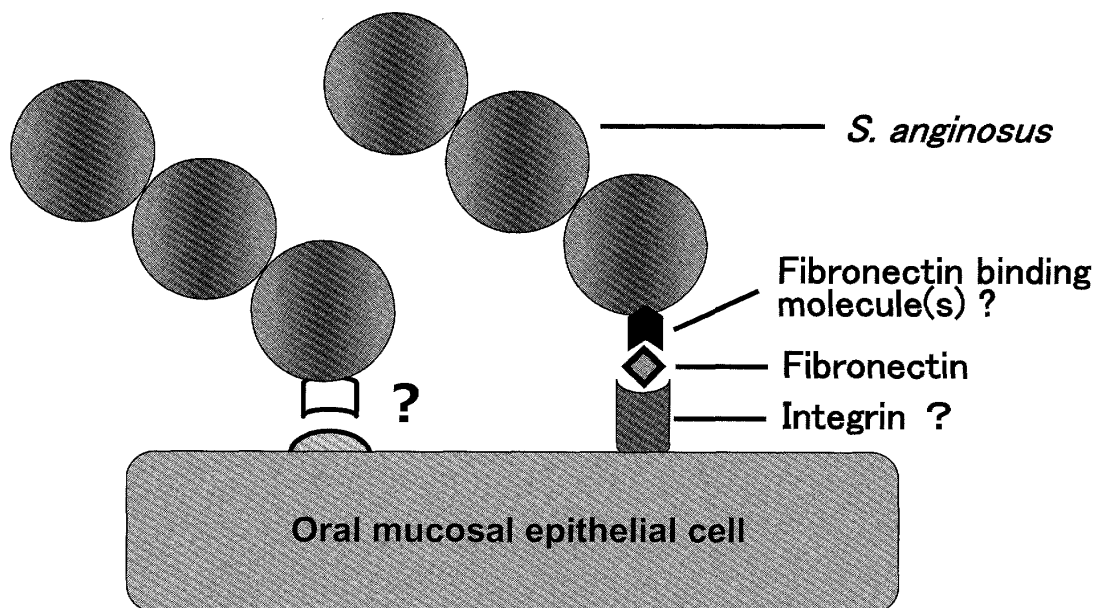


図 7. フィブロネクチンを介する S. anginosus の上皮細胞への付着機構 (仮説)

らに、直接上皮細胞上のフィブロネクチンに付着する機序と、「*S. anginosus* 上のフィブロネクチン結合タンパク質-遊離のフィブロネクチン-上皮細胞上のインテグリン」という付着機序の2つが存在することが強く示唆された(図7)。フィブロネクチンを介する2つの付着機序については、*S. pyogenes* で遊離のフィブロネクチンを介して、細菌のフィブロネクチン結合タンパク質-フィブロネクチン-宿主細胞のインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ 分子という形で、粘膜上皮細胞に付着することが示されており<sup>15, 18, 35, 36)</sup>、*S. intermedius* でも固相化フィブロネクチンと遊離フィブロネクチンの両方に付着することが報告<sup>32, 37)</sup>されていることから、口腔レンサ球菌群では一般的にみられる機構なのかもしれない。

本研究では、上皮細胞上のフィブロネクチンに直接付着する *S. anginosus* 上のフィブロネクチン結合分子と、「*S. anginosus* 上のフィブロネクチン結合タンパク質-遊離のフィブロネクチン-上皮細胞上のインテグリン」系での *S. anginosus* 上のフィブロネクチン結合分子の異同は明らかにはなっていないが、口腔癌組織由来の *S. anginosus* 株で「*S. anginosus* 上のフィブロネクチン結合タンパク質-遊離のフィブロネクチン-上皮細胞上のインテグリン」系が強く作用しているとの結果(図6)は、それらが異なった分子であることを示唆しているのかもしれない。口腔癌発症機序に繋がる *S. anginosus* の上皮細胞への付着/感染機序を解明するため、*S. anginosus* のフィブロネクチン結合分子について今後更なる検討が必要となろう。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会をあたえていただき、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました口腔病因病態制御学講座・口腔微生物学免疫学分野 木村重信 教授に深く感謝致します。また、本研究に際し、終止ひとかならぬ御指導、御助言をいただき御懇篤な御校閲を賜りました口腔病因病態制御学講座・口腔微生物学免疫学分野 佐々木実 准教授に深甚なる

謝意を表します。最後に、絶えず暖かい御支援ならびに御協力を頂きました口腔病因病態制御学講座・口腔微生物学免疫学分野の皆様へ深謝いたします。

## 引用文献

- 1) Kawamura, Y., Hou, X. G., Sultana, F., Miura, H. and Ezaki, T.: Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 406-408, 1995.
- 2) Ruoff, K. L.: *Streptococcus anginosus* ("Streptococcus milleri"): the unrecognized pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 1: 102-108, 1988.
- 3) Gossling, J.: Occurrence and pathogenicity of the *Streptococcus milleri* group. *Rev. Infect. Dis.* 10: 257-285, 1988.
- 4) Whitworth, J. M.: Lancefield group F and related streptococci. *J. Med. Microbiol.* 33: 135-151, 1990.
- 5) Willcox, M. D. P.: Potential pathogenic properties of members of the "*Streptococcus milleri*" group in relation to the production of endocarditis and abscesses. *J. Med. Microbiol.* 43: 405-410, 1995.
- 6) Kitada, K. and Inoue, M.: Immunochemical characterization of the carbohydrate antigens of serotype K and Lancefield group G "*Streptococcus milleri*". *Oral Microbiol. Immunol.* 11: 22-28, 1996.
- 7) Sasaki, H., Igaki, H., Ishizuka, T., Kogoma, Y., Sugimura, T. and Terada, M.: Presence of *Streptococcus* DNA sequence in surgical specimens of gastric cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* 86: 791-794, 1995.
- 8) Sasaki, H., Ishizuka, T., Muto, M., Nezu, M., Nakanishi, Y., Inagaki, Y., Watanabe, H., Watanabe, H. and Terada, M.: Presence of *Streptococcus anginosus* DNA in esophageal cancer, dysplasia of esophagus, and gastric cancer. *Cancer Res.* 58: 2991-2995, 1998.
- 9) Sasaki, M., Ohara-Nemoto, Y., Tajika, S. and Kaneko, M.: Induction of inflammatory cytokine and cyclooxygenase-2 mRNA expression by secreted substances from oral streptococci. *Dent. J. Iwate Med. Univ.* 20: 284-290, 1995.
- 10) Sasaki, M., Ohara-Nemoto, Y., Tajika, S., Kobayashi, M., Yamaura, C. and Kimura, S.: Antigenic characterization of a novel *Streptococcus anginosus* antigen that induces nitric oxide synthesis by murine peritoneal exudate cells. *J. Med. Microbiol.* 50: 952-958, 2001.
- 11) Yamaura, C., Sasaki, M., Ohara-Nemoto, Y., Tajika, S., Shimoyama, Y. and Kimura, S.: *Streptococcus anginosus* induced nitric oxide

- synthesis by murine peritoneal macrophages without help of IFN  $\gamma$ . In Interface Oral Health Science (M. Watanabe, N. Takahashi and H. Takada. eds.), Elsevier B.V., Amsterdam. 203-204, 2005.
- 12) Tateda, M., Shiga, K., Saijo, S., Sone, M., Hori, T., Yokoyama, J., Matsuura, K., Takasaka, T. and Miyagi T.: *Streptococcus anginosus* in head and neck squamous cell carcinoma: implication in carcinogenesis. *Int. J. Mol. Med.* 6: 699-703, 2000.
  - 13) Shiga, K., Tateda, M., Saijo, S., Hori, T., Sato, I., Tateno, H., Matsuura, K., Takasaka, T. and Miyagi, T.: Presence of *Streptococcus* infection in extra-oropharyngeal head and neck squamous cell carcinoma and its implication in carcinogenesis. *Oncol. Rep.* 8: 245-248, 2001.
  - 14) Sasaki, M., Yamaura, C., Ohara-Nemoto, Y., Tajika, S., Kodama, Y., Ohya, T., Harada, R. and Kimura, S.: *Streptococcus anginosus* infection in oral cancer and its infection route. *Oral Dis.* 11: 151-156, 2005.
  - 15) Hanski, E. and Caparon, M.: Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesin of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 6172-6176, 1992.
  - 16) LaPenta, D., Rubens, C., Chi, E. and Cleary, P. P.: Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 12115-12119, 1994.
  - 17) Greco, R., De Martino, L., Donnarumma, G., Conte, M. P., Seganti, L. and Valenti P.: Invasion of cultured human cells by *Streptococcus pyogenes*. *Res. Microbiol.* 146: 551-560, 1995.
  - 18) Cue, D., Dombek, P. E., Lam, H. and Cleary P. P.: *Streptococcus pyogenes* serotype M1 encodes multiple pathways for entry into human epithelial cells. *Infect. Immun.* 66: 4593-4601, 1998.
  - 19) Courtney, H. S., Li, Y., Dale, J. B. and Hasty, D. L.: Cloning, sequencing, and expression of a fibronectin/fibrinogen-binding protein from group A Streptococci. *Infect. Immun.* 62: 3937-3946, 1994.
  - 20) Goodfellow, A. M., Hibble, M., Talay, S. R., Kreikemeyer, B., Currie, B. J., Sriprakash, K. S. and Chhatwal, G. S.: Distribution and Antigenicity of Fibronectin Binding Proteins (SfbI and SfbII) of *Streptococcus pyogenes* Clinical Isolates from the Northern Territory, Australia. *J. Clin. Microbiol.* 38: 389-392, 2000.
  - 21) Schwarz-Linek, U., Höök, M. and Potts, J. R.: The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. *Mol. Microbiol.* 52: 631-641, 2004.
  - 22) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D.: Molecular Biology of the Cell 3th ed., Newton Press, Tokyo, pp949-1009, 2000.
  - 23) Proctor, R. A.: The staphylococcal fibronectin receptor: evidence for its importance in invasive infections. *Rev. Infect. Dis.* 9S: 335-340, 1987.
  - 24) Terao, Y., Kawabata, S., Kunitomo, E., Murakami, J., Nakagawa, I. and Hamada, S.: Fba, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, promotes bacterial entry into epithelial cells, and the *fba* gene is positively transcribed under the Mga regulator. *Mol. Microbiol.* 42: 75-86, 2001.
  - 25) Visai, L., De Rossi, E., Valtulina, V., Casolini, F., Rindi, S., Guglielame, P., Pietrocola, G., Bellotti, V., Riccardi, G. and Speziale, P.: Identification and characterization of a new ligand-binding site in FnbB, a fibronectin-binding adhesin from *Streptococcus dysgalactiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1646: 173-183, 2003.
  - 26) Christie, J., McNab, R. and Jenkinson, H. F.: Expression of fibronectin-binding protein FbpA modulates adhesion in *Streptococcus gordonii*. *Microbiology* 148: 1615-1625, 2002.
  - 27) Holmes, A. R., McNab, R., Millsap, K. W., Rohde, M., Hammerschmidt, S., Mawdsley, J. L. and Jenkinson, H. F.: The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol. Microbiol.* 41: 1395-1408, 2001.
  - 28) Bingham, R. J., Rudiño-Piñera, E., Meenan, N. A. G., Schwarz-Linek, U., Turkenburg, J. P., Höök, M., Garman, E. F. and Potts, J. R.: Crystal structures of fibronectin-binding sites from *Staphylococcus aureus* FnBPA in complex with fibronectin domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 12254-12258, 2008.
  - 29) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
  - 30) Wang, B., Li, S., Southern, P. J. and Cleary, P. P.: Streptococcal modulation of cellular invasion via TGF- $\beta$  1 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 2380-2385, 2006.
  - 31) Allen, B. L., Katz, B. and Höök, M.: *Streptococcus anginosus* adheres to vascular endothelium basement membrane and purified extracellular matrix proteins. *Microb. Pathog.* 32: 191-204, 2002.
  - 32) Petersen, F. C., Assev, S., van der Mei, H. C., Busscher, H. J. and Scheie, A. A.: Functional variation of the antigen I/II surface protein in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius*. *Infect. Immun.* 70: 249-256, 2002.
  - 33) Nakamura, T., Miller, D., Ruoslahti, E. and Border, W. A.: Production of extracellular matrix by glomerular epithelial cells is regulated by transforming growth factor-beta 1. *Kidney Int.* 41: 1213-1221, 1992.
  - 34) Leask, A. and Abraham D. J.: TGF- $\beta$  signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 18: 816-827,

- 2004.
- 35) Fowler, T., Wann, E. R., Joh, D., Johansson, S., Foster, T. J. and Höök, M.: Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur. J. Cell Biol.* 79: 672-679, 2000.
- 36) Jenkinson, H. F. and Lamont, R. J.: Streptococcal adhesion and colonization. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 8: 175-200, 1997.
- 37) Hasty, D. L., Ofek, I., Courtney, H. S. and Doyle, R. J.: Multiple adhesins of streptococci. *Infect. Immun.* 60: 2147-2152, 1992.