

氏名 古 玉 芳 豊
学位の種類 博士(歯学)
学位授与番号 岩医大歯博第114号
学位授与の日付 平成22年3月4日
学位論文題目 *Streptococcus anginosus* の粘膜上皮細胞への付着機構

論文内容の要旨

I 研究目的

Streptococcus anginosus はヒトプラーク中の常在細菌であるが、最近の研究から、*S. anginosus* の口腔粘膜への感染が口腔扁平上皮癌の発症に関連することが示唆されている。*S. anginosus* の病原因子については種々の報告があるが、口腔粘膜への *S. anginosus* 感染の第一段階である付着分子/付着機構については明らかにはされていない。本研究では、喉頭粘膜上皮細胞由来の HEp-2 細胞、歯肉上皮細胞由来の GE1 細胞および固相化フィブロネクチンを用いて *S. anginosus* の付着機構を明らかにすることを目的とし検討を行った。

II 研究方法

1. 使用菌株および使用細胞株

実験には、*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。粘膜上皮細胞としては、ヒト喉頭粘膜上皮細胞由来株の Human larynx carcinoma cell line ATCC CCL-23 株 (HEp-2 細胞)、およびマウス歯肉上皮細胞由来の GE1 細胞を用いた。

2. *S. anginosus* および口腔レンサ球菌株の培養細胞および細胞外マトリックスタンパク質への付着能

[³H]標識した菌体 (10,000 cpm \approx 5×10^6 CFU) を、コンフルエント状態の培養細胞 (HEp-2 細胞および GE1 細胞) あるいは固相化した細胞外マトリックスタンパク質に添加し、37°C で 90 分間静置した。非付着細菌を洗浄、除去した後、液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定し、付着菌数を測定した。一部の実験では、抗フィブロネクチン抗体を添加して付着に及ぼす影響を検討した。

3. 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、Laemmli 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。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。また、*S. anginosus* 菌体刺激による HEp-2 細胞のフィブロネクチン遺伝子発現を RT-PCR により検討した。

III 研究成績

1. *S. anginosus* は両株化上皮細胞に明確な付着能を有すること、その付着にはフィブロネクチンへの付着が主要な機序の一つとなっていることが強く示唆された。
2. 口腔癌組織から分離された *S. anginosus* の HEp-2 細胞への付着能は、健常者プラークから分離した *S. anginosus* 株と比較して有意に高かった。
3. HEp-2 細胞のフィブロネクチン発現は *S. anginosus* 菌体の付着および内因性の TGF- β 1 のオートクライン刺激により増強したが、反応系へのフィブロネクチンの添加 (10 nM) で *S. anginosus* の HEp-2 細胞へ付着が亢進した。
4. *S. anginosus* 菌体および HEp-2 細胞のフィブロネクチンによる前処理でも *S. anginosus* の付着が亢進し、抗

フィブロネクチン抗体の添加でその亢進が完全に抑制された。

5. さらに、この付着能は、*S. anginosus* 実験室株と健常者プラーク由来株と比較して、口腔癌由来 *S. anginosus* 株で著明に高かった。

IV 考察及び結論

1. *S. anginosus* の粘膜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構という少なくとも2つの付着機構が存在することが明らかとなった。
2. フィブロネクチンを介する付着機構では「*S. anginosus* 上のフィブロネクチン結合分子-フィブロネクチン-粘膜上皮細胞」というブリッジが形成されていることが強く示唆された。
3. フィブロネクチンに対する付着能の差異が、本菌による口腔癌発症機序に深く関与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 木村重信 (口腔病因病態制御学講座口腔微生物学免疫学分野)

副査 教授 杉山芳樹 (口腔外科学講座歯科口腔外科学分野)

副査 教授 原田英光 (口腔機能構造学講座口腔組織学分野)

Streptococcus anginosus はヒトプラーク中の常在細菌であるが、本菌の感染が口腔扁平上皮癌の発症に関連することを示唆する報告がなされて以来、その病原性の解明に注目が集まっている。本菌の病原因子についてはいくつもの報告があるが、口腔粘膜への *S. anginosus* 感染の第一段階である付着分子/付着機構については明らかにはされていない。本研究で著者は、喉頭粘膜上皮細胞由来の HEp-2 細胞、歯肉上皮細胞由来の GE1 細胞および固相化フィブロネクチンを用いて *S. anginosus* の付着機構について検討を行った。その結果、*S. anginosus* は両株化上皮細胞に明確な付着能を有すること、その付着にはフィブロネクチンへの付着が主要な機序の一つとなっていることを強く示唆する成績を得た。さらに、*S. anginosus* 菌体および HEp-2 細胞のフィブロネクチンによる前処理実験系および抗フィブロネクチン抗体添加実験系から、*S. anginosus* の HEp-2 細胞への付着には、①フィブロネクチンを介した *S. anginosus* の直接的な付着とともに、②フィブロネクチンを架橋とする *S. anginosus* のフィブロネクチン結合分子と HEp-2 細胞上のインテグリンとの結合による付着機序が関与していることを明らかにした。加えて、口腔癌組織から分離した *S. anginosus* 株と健常者プラークからの分離株を用いた研究から、口腔癌由来 *S. anginosus* 株では HEp-2 細胞への付着能が有意に亢進していること、また、フィブロネクチンを架橋とする *S. anginosus* のフィブロネクチン結合分子と HEp-2 細胞上のインテグリンとの結合による付着機序が、健常者プラーク由来株や *S. anginosus* 実験室株と比較して、口腔癌由来 *S. anginosus* 株で著明に高いことを明らかにした。

本研究結果は、*S. anginosus* の粘膜上皮細胞への付着機構の詳細を明らかにするとともに、フィブロネクチンを架橋とする付着機構が口腔癌由来 *S. anginosus* 株で著明に高いことを強く示唆するもので、口腔扁平上皮癌の発症に関わる本菌の病原機序の解明にもつながるものと期待されることから、学位に値するものと評価した。

試験・試問の結果の要旨

本研究の目的、概要について説明がなされ、研究結果および関連事項についての試問を行った結果、的確な解答が得られた。また、今後の研究にも意欲を示すとともに幅広い経験と知識を有し、外国語(英語)試験の結果も優れていることから、学位に値する十分な学識と研究能力を有するものと判定した。