

論文内容の要旨

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
(岩手医科大学歯学雑誌 第 40 巻 1 号 平成 27 年 4 月)

いわさき けんすけ
岩崎 賢介

- I. 研究目的: *Streptococcus anginosus* はヒトプラーク中に常在する病原性の低い細菌であると考えられてきたが, 1995 年に胃, 1998 年に食道の扁平上皮癌組織から本菌のゲノム DNA が高頻度で検出されることが明らかにされて以来, *Helicobacter pylori* 同様, 感染発癌の原因細菌の一つとして注目されている. その後, 複数の研究グループ (Tateda M ら, 2000; Sasaki M ら, 2005) によって, *S. anginosus* 感染と口腔癌, 特に口腔扁平上皮癌との関連性を強く示唆する報告がなされているが, 感染発癌のメカニズムは必ずしも明確にはなっていない. 近年, マウスの胃粘膜上皮細胞への *H. pylori* 感染で活性化誘導シチジン脱アミノ酵素 (AID: activation-induced cytidine deaminase) の過剰発現が誘導されることが明らかにされ, AID の異所性発現と感染発癌の関連性が強く示唆されるにいたっている (Matsumoto Y ら, 2007). そこで本研究では, *S. anginosus* による口腔癌発症機序の解明を目的として, 口腔癌組織中の *S. anginosus* の感染実態と AID 発現の関連性について検討した. また, ヒト正常歯肉上皮細胞および株化上皮細胞を用いて, *S. anginosus* 抗原刺激による AID 発現誘導ならびに細胞内シグナル伝達系について検討を行った.
- II. 研究方法: 本研究は歯学部倫理委員会の承認を得て行った (#01177). 本学附属病院歯科医療センター口腔外科を受診した口腔癌患者を対象に, インフォームドコンセントを得た後, biopsy あるいは外科処置時に口腔癌組織を採取した. 癌組織中の *S. anginosus* 感染および AID 発現は, *S. anginosus* および AID に特異的なプライマーを用いた PCR およびリアルタイム RT-PCR で検討した. ヒト正常歯肉上皮細胞あるいは株化上皮細胞に対する AID 発現誘導は, *S. anginosus* 抗原で刺激後, 同様にリアルタイム RT-PCR で解析した. *S. anginosus* 抗原としては, 分子微生物学分野の研究グループが報告した, 種々の口腔レンサ球菌種のうち *S. anginosus* のみが有する生理活性物質である SAA (Sasaki M ら, 2001) を用いた. さらに, NF- κ B の活性化はルシフェラーゼアッセイから検討した.
- III. 研究成績: 口腔扁平上皮癌組織 17 例中 8 例で *S. anginosus* のゲノム DNA が検出され, そのうち 6 例では同時に AID 発現誘導が観察された. また, ゲノム DNA が検出されなかった 9 例中 8 例では AID 発現誘導は観察されなかった. *in vitro* 実験の結果から, SAA 刺激によってヒト正常歯肉上皮細胞, 株化上皮細胞とも AID 発現が誘導され, 同時に NF- κ B 活性化が認められることが明らかとなった. また, NF- κ B 阻害剤の添加により, SAA による AID 発現誘導が阻害された.
- IV. 考察及び結論: 口腔扁平上皮癌では, *S. anginosus* 感染および AID 異所性発現が, 関連して高い頻度で見られることが強く示唆された. また, SAA 刺激により上皮細胞での NF- κ B の活性化と AID 異所性発現が観察されたことから, *S. anginosus* は, NF- κ B の活性化を介した AID 異所性発現誘導を通じて, 口腔 (扁平上皮) 癌発癌機序に関わっている可能性が強く示唆された.

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 杉山 芳樹 (口腔顎顔面再建学講座 口腔外科学分野)

副査 教授 木村 重信 (微生物学講座 分子微生物学分野)

副査 教授 石崎 明 (生化学講座 細胞情報科学分野)

胃、食道、口腔の扁平上皮癌組織では、高頻度で口腔レンサ球菌の一菌種である *Streptococcus anginosus* の感染が認められるとの報告がある。しかし、その発癌メカニズムについては明らかにはされていなかった。そこで本研究で著者らは、*S.anginosus* による口腔癌発症機序の解明を目的として、口腔癌組織中の *S.anginosus* の感染実態と AID 発現の関連性について検討した。また、ヒト正常歯肉上皮細胞および株化上皮細胞を用いて、*S.anginosus* 抗原刺激による AID 発現誘導ならびに細胞内シグナル伝達系について検討を行った。その要旨を以下に記載する。

研究材料・方法：口腔癌患者から説明と同意を得て、biopsy あるいは外科処置時に口腔癌組織を採取した。この癌組織中の *S.anginosus* 感染および AID 発現は、*S.anginosus* および AID に特異的なプライマーを用いた PCR およびリアルタイム RT-PCR で検討した。ヒト正常歯肉上皮細胞あるいは株化上皮細胞に対する AID 発現誘導は、*S.anginosus* 抗原で刺激後、同様にリアルタイムで RT-PCR で解析した。*S.anginosus* 抗原としては、分子微生物学分野の研究グループが報告した種々の口腔レンサ球菌種のうち *S.anginosus* のみが有する生理活性物質である SAA を用いた。さらに、NF- κ B の活性化はルシフェラーザアッセイで検討した。

結 果：口腔扁平上皮癌組織 17 例中 8 例で *S.anginosus* のゲノム DNA が検出され、そのうち 6 例では同時に AID 発現誘導が観察された。また、ゲノム DNA が検出されなかった 9 例中 8 例では AID 発現誘導は観察されなかった。in vitro 実験の結果から、SAA 刺激によってヒト正常歯肉上皮細胞、株化上皮細胞とも AID 発現が誘導され、同時に NF- κ B 活性化が認められることが明らかとなった。また、NF- κ B 阻害剤の添加により SAA による AID 発現誘導が阻害された。

結 論：口腔扁平上皮癌では、*S.anginosus* 感染および AID 異所性発現が関連して高い頻度で見られることが強く示唆された。また、SAA 刺激により上皮細胞での NF- κ B の活性化と AID 異所性発現が観察されたことから、*S.anginosus* は、NF- κ B の活性化を介した AID 異所性発現誘導を通じて、口腔扁平上皮癌発癌機序に関わっている可能性が強く示唆された。

本研究は、口腔扁平上皮癌の発癌機序の一つとして *S.anginosus* 感染による AID 異所性発現誘導があることを、実際の口腔扁平上皮癌組織での観察から示すとともに、in vitro 実験からもそれを明らかにした新機軸の研究で、その結果は、臨床的にも口腔扁平上皮癌の予防法の開発・リスク因子の探索にもつながる極めて意義深いものであり、学位に値するものと評価した。

試験・試問結果の要旨

最初に本論文の要旨について説明がなされた。続いて主査、副査から研究方法や結果の解釈・意義、これまでの報告との関連などの質問があった。また、本研究の今後の展開に対しての提案があった。

今回の質問・提案および返答を以下に記載した。

[質問・提案]

1. *H. pylori*も含めて、in vivo 実験系での細菌感染と AID 異所性発現の関連について検討した報告はこれまでにあるか。
2. AID の異所性発現が見られた癌組織では、転移病巣における AID の異所性発現はどうなっていると考えられるか。
3. In vivo 実験系で AID 異所性発現が認められ、なおかつ *S.anginosus* の感染を認めない症例が 1 例あった。その理由についてはどのように考えられるのか。
4. マクロファージに SAA の heat stable portion を作用させることで TNF- α などのサイトカインが誘導されると既報で報告しているが、今回 In vitro 実験系で使用した上皮由来細胞に作用させた場合でも同様の結果は得られるのだろうか。その点については検討しているのだろうか。
また、以下のような提案があった。
5. SAA による AID 異所性発現が TNF- α の autocrine/paracrine の作用ではないとの証明にはさらに検討を加えた方が良いと思われる。たとえば、TNF- α や TNF- α 受容体に対する抗体をも用いた阻害実験等があると思われる。

[返答]

1. については *H. pylori* を扱った研究では in vitro 実験系での感染による AID 異所性発現と、胃癌組織における AID の異所性発現を検討した報告があるが、本研究のように癌組織中での AID 異所性発現と細菌感染の関連について検討した報告は渉猟し得た限りでは認めていないとしている。2. については、本研究では原発病巣を対象とした実験を行ってきたため、転移病巣については検討していない。しかし SAA 刺激によって AID の異所性発現が誘導されていることを考えると、転移病巣では *S.anginosus* 感染があるとは考えにくいので、AID の異所性発現は認められないと思われるとの返答であった。3. の質問については、発癌機序についてはマルチファクトリアルであると考えられているので、指摘のあった 1 例についても原因については明確ではない。他の要因によって AID の発現が誘導されたことが考えられるとの回答を得た。また、4. の質問については、今回使用した上皮由来細胞に対する SAA の TNF- α 産生誘導については検討していないが、マクロファージに対して SAA の TNF- α 産生誘導が報告されているため、図 5 の実験を行ったが、今後、検討していきたいとの返答であった。最後の 5. の提案については、今後の本研究の展開に大いに活用すべき提案であり、参考にさせていただきたいとの発言があった。

いずれの質問についても的確な回答を行い、提案に対しては前向きで真摯な回答が得られたことから、学位に値する学識と研究能力を有するものと認めた。

参考論文 なし