

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

岩崎 賢介¹⁾, 松本 直子¹⁾, 佐々木 実²⁾

¹⁾ 岩手医科大学歯学部口腔顎顔面再建学講座口腔外科学分野

(主任: 杉山 芳樹 教授)

²⁾ 岩手医科大学微生物学講座分子微生物学分野

(主任: 木村 重信 教授)

(受付: 2014年11月26日)

(受理: 2015年1月7日)

Streptococcus anginosus 感染が口腔扁平上皮癌と深く関連していることが示唆されているが、その発癌機序については未だ明確にはなっていない。最近の研究から、上皮細胞における活性化誘導シチジン脱アミノ酵素 (AID: activation-induced cytidine deaminase) の異所性発現が癌関連遺伝子に変異を誘発し、癌化へと繋がる可能性が示唆されている。そこで本研究では、17例の口腔癌患者から組織サンプルを採取し、口腔扁平上皮癌における *S. anginosus* 感染と AID 異所性発現の有無とその関連性について、菌種特異的 PCR および real-time RT-PCR を用いて検討した。さらに、3種の株化上皮細胞とヒト正常歯肉上皮細胞を用いて、*S. anginosus* 由来の特異的生理活性物質である SAA による刺激後の、AID 異所性発現と NF- κ B の活性化について real-time RT-PCR と dual luciferase assay を用いて検討した。その結果、今回調べた口腔扁平上皮癌組織中では *S. anginosus* 感染 (47%) と AID 異所性発現 (41%) がともに高頻度で観察されること、*S. anginosus* 感染と AID 異所性発現の間に有意の正の相関関係があることが明らかとなった。培養上皮細胞を用いた実験からは、調べたすべての培養上皮細胞において SAA 刺激により NF- κ B 活性化と AID 異所性発現が誘導されること、さらに、NF- κ B 阻害剤の添加により AID 異所性発現の抑制が認められることが明らかとなった。以上の結果より、*S. anginosus* 感染は、その特異抗原による AID 異所性発現の誘導を通じて、口腔扁平上皮癌の発症に深く関連していることが示唆された。

The involvement of *Streptococcus anginosus* infection and the aberrant activation-induced cytidine deaminase (AID) expression in human oral squamous cell carcinoma

Kensuke IWASAKI¹⁾, Naoko MATSUMOTO¹⁾, Minoru SASAKI²⁾

¹⁾ Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Reconstructive Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University

(Chief: Prof. Yoshiki SUGIYAMA)

²⁾ Division of Molecular Microbiology, Department of Microbiology, Iwate Medical University

(Chief: Prof. Shigenobu KIMURA)

¹⁾ 1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate, 020-8505, Japan

²⁾ 2-1-1 Nishitokuta, Yahaba-cho, Shiwagun, Iwate, 028-3694, Japan

¹⁾ 岩手県盛岡市中央通 1-3-27 (〒020-8505)

²⁾ 岩手県紫波郡矢巾町西徳田 2-1-1 (〒028-3694)

緒 言

Streptococcus anginosus は条件さえ整えば膿瘍、感染性心内膜炎の起炎菌ともなる¹⁻⁵⁾ が、通常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長らく考えられてきた。しかし 1995 年に胃、1998 年に食道の扁平上皮癌組織から *S. anginosus* のゲノム DNA が高頻度で検出されること、近傍の健常組織中には *S. anginosus* の感染がみられないことが明らかにされて以来、*Helicobacter pylori* 同様、発癌（感染発癌）に関与する原因細菌の一つとして注目されるに至っている^{6, 7)}。その後、我々を含めた複数の研究グループが行った口腔癌組織サンプルを対象とした観察結果から、*S. anginosus* 感染が口腔癌、特に口腔扁平上皮癌に関連することが強く示唆されている⁸⁻¹⁰⁾。

H. pylori の感染発癌の機序については必ずしも明確ではないが、その生理活性物質である cytotoxin-associated gene A (CagA) がタイプ IV 分泌機構によって胃粘膜上皮細胞内に注入されると、細胞内情報伝達系を攪乱して胃粘膜で多彩なサイトカイン、ケモカインあるいは一酸化窒素の過剰産生が誘導され、最終的に胃癌発症につながるという機序が考えられている¹¹⁻¹⁷⁾。もう一つの *H. pylori* による感染発癌の機序として、最近の研究から、胃上皮細胞における活性化誘導シチジン脱アミノ酵素 (AID: activation-induced cytidine deaminase) の異所性発現が挙げられている¹⁸⁾。ヒトの B 細胞は無数の抗原に反応する多様な抗体を産生するために、抗原刺激を受けた場合、抗体遺伝子の体細胞高頻度突然変異（体細胞超変異）とクラススイッチ組換えという 2 種類の DNA 改編をその細胞内で行っている。この 2 種類の DNA 改編を制御するのが AID で、現在判明している唯一の遺伝子編集能をもった酵素である。したがって、AID は通常、抗原刺激を受けた B 細胞でのみ発現し、抗体遺伝子に関わる DNA だけに特異的に DNA 切断／改編を行う¹⁹⁻²¹⁾。AID はゲノム DNA に積極的に変異

を導入する分子であることから、B 細胞以外の細胞での発現、すなわち異所性発現が起これば、ゲノムの不安定化や染色体の転座さらには発癌にもつながる可能性がある。実際、AID のトランスジェニックマウスでは胃癌、肺癌、リンパ腫などを起こす頻度が高いことが明らかとなっている^{18, 22)}。それゆえ、*H. pylori* 感染による AID の異所性発現は、上述の炎症反応の誘導による機序とは異なる新たな *H. pylori* 感染による胃癌発症機序として注目されている。

S. anginosus による感染発癌の機序については、これまでのところ、ほとんど検討が進められておらず、口腔扁平上皮癌における *S. anginosus* 感染と AID 異所性発現の関連性を明らかにした報告はなく、また、in vitro 実験系で上皮細胞への *S. anginosus* 感染と AID の異所性発現との関連性を検討した報告もない。

これまで我々の研究グループでは、*S. anginosus* が本菌種に特異的な菌由来抗原 SAA（マウスマクロファージに対し NO 産生を誘導する熱感受性のタンパク質部分と炎症性サイトカインの産生を誘導する多糖部分からなる *S. anginosus* に特異的な免疫生理活性物質）を産生し、マウスマクロファージに対して mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化を通じて一酸化窒素および炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β , IL-6) の産生を誘導することを報告した^{23, 24)}。上皮細胞に対する SAA の作用については検討を行っていないが、口腔レンサ球菌のうち *S. anginosus* のみが特異的に口腔扁平上皮癌に関連するとの観察結果^{8-10, 25)} を勘案すれば、他の口腔レンサ球菌種では見られない SAA が上皮細胞における AID 異所性発現を誘導する可能性は高い。*S. anginosus* 感染により上皮細胞で AID 異所性発現が誘導されるとすれば、明確な炎症反応を惹起しない *S. anginosus* のような常在細菌の感染が如何にして DNA の修復に影響を及ぼす発癌因子となり得るのかという問いに対する一つの答となる可能性がある。

そこで本研究では、*S. anginosus* による口腔

扁平上皮癌発症機序の解明を目的として, ヒト口腔扁平上皮癌組織中の *S. anginosus* の感染と AID 異所性発現およびその関連性について検討した. さらに, 株化上皮細胞を用いた *in vitro* 実験系で SAA による AID の異所性発現誘導とその上皮細胞内シグナル伝達系について検討した.

材 料 と 方 法

1. 口腔癌組織の採取および核酸の精製

岩手医科大学附属病院歯科医療センター口腔外科を受診した一次症例の口腔癌患者でこれまで癌治療を受けていない者のうちインフォームドコンセントを得た患者から, 生検時あるいは手術時に口腔癌組織を採取した (岩手医科大学歯学部倫理委員会承認番号: 01177). 対象患者は男性 10 名, 女性 7 名で, 年齢は 48 歳から 84 歳, 平均年齢は 70.0 歳であった. 発症部位は舌 8 例, 歯肉 9 例で, stage 分類では stage I が 5 名, stage II が 8 名, stage IV が 4 名であった. 病理学的検査では採取した組織はすべて扁平上皮癌と診断された.

図 1 に示すように口腔扁平上皮癌の病変部組織および近傍の正常組織から組織サンプルを採取し, Allprotect Tissue Reagent (QIAGEN Co., Hilden, Germany) 中に 4℃ で保存した. 病変部組織サンプルおよび正常組織からの対照組織サ

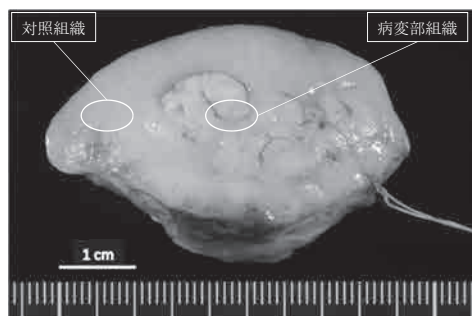


図 1 病変部組織サンプルおよび対照組織サンプルの採取 (一例)

得られた口腔扁平上皮癌組織より病変部組織サンプルおよび正常組織から対照組織サンプルを採取した.

ンプル (ともに重量 ≤ 30 mg) を細かく裁断し, DNA/RNA 精製用キット [AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN)] を用いてマニュアルに従い DNA と RNA を精製した.

2. 口腔扁平上皮癌組織における *S. anginosus* 感染の検討

精製した病変部組織の DNA を用いて PCR により *S. anginosus* 感染を検討した. すなわち, DNA 50 ng, PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (タカラバイオ, 大津), *S. anginosus* 菌種特異的 primer (表 1) の forward および reverse それぞれ 0.5 μ M からなる反応液を作製し PCR を行った. PCR は 96℃ 10 秒, 58℃ 15 秒, 72℃ 45 秒を 1 サイクルとして 30 サイクル行った. PCR 産物はエチジウムブロマイド含有 3% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い, トランスイルミネーターを用いてバンドを検出した.

3. 口腔扁平上皮癌組織における AID 異所性発現の検討

病変部組織と正常対照組織から精製した RNA を用いて real-time RT-PCR により AID 異所性発現を検討した. RNA は 50 μ g/ml として PrimeScript[™] RT Master Mix (タカラバイオ) を用いて逆転写した. cDNA 100 ng, SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (タカラバイオ), AID に特異的な primer (表 1) の forward および reverse, 対照として GAPDH の primer (表 1) の forward および reverse それぞれ 0.4 μ M 加え, Thermal Cycler Dice[®] Real Time System Single (タカラバイオ) により real-time PCR を行った. PCR は 95℃ 30 秒 hot start, 95℃ 5 秒, 60℃ 30 秒で 40 サイクル行った. 結果は Miyazaki ら²⁶⁾ の方法に準じて AID の値を

表 1 本研究に用いたプライマー

Target	Primer sequence
<i>S. anginosus</i> forward	5'-GAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTA-3'
reverse	5'-AAGCATCTAACATGTGTTACATAC-3'
AID forward	5'-CACCCCTCAATCAATGGGTTGCATGTCTG-3'
reverse	5'-CTGATTGGCATTTCTGAGTGAAG-3'
GAPDH forward	5'-GCACCACCAAGGCTGAGAAC-3'
reverse	5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'

GAPDH の値で補正し、対照組織での値を超える場合を AID 異所性発現陽性とした。

4. 株化上皮細胞およびヒト正常歯肉上皮細胞とその培養

粘膜上皮細胞としては、ヒト舌癌由来株化細胞 EC94122104 (DOK 細胞; 大日本住友製薬株式会社, 大阪), ヒト胃癌由来株化細胞 EC94042256 (HGC-27 細胞; 大日本住友製薬株式会社) およびヒト喉頭癌由来株化細胞 ATCC CCL-23 株 (HEp-2 細胞; 大日本住友製薬株式会社) を用いた。DOK 細胞は、10% (v/v) ウシ胎児血清 (FBS; Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA), 100 U/ml ペニシリン-100 μ g/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, St. Louis, MO, USA), 5 μ g/ml のヒドロコルチゾン (SIGMA-ARDRICH) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies, 東京) 培地で、HGC-27 細胞は 10% (v/v) FBS, ペニシリン・ストレプトマイシン液, 1% Non-essential amino acid (Life Technologies) を添加した Eagle's minimum essential medium (EMEM; Life Technologies) 培地で、HEp-2 細胞は、DMEM 培地に 10% (v/v) FBS, ペニシリン・ストレプトマイシン液を添加した培地で、37°C, 5% CO₂-95% 大気 の条件で培養・維持した。また、ヒト正常歯肉上皮細胞 (GEC 細胞) は本学歯科保存学講座歯周療法学分野 八重柏隆 教授より恵与されたものを用いた。実験には 4 代から 6 代の細胞を用いた。GEC 細胞の維持・培養には、10% (v/v) FBS, Supplement S7 (Life Technologies), ペニシリン・ストレプトマイシン・アンホテリシン B 液 (和光純薬, 大阪) を含む EpiLife (Life Technologies) 培地を用いた。

5. *S. anginosus* の生理活性物質, SAA

生理活性物質としては *S. anginosus* NCTC 10713 株培養上清から精製した菌由来生理活性物質 SAA^{23, 24)} を用いた。SAA をオートクレーブ処理し、SAA の heat-labile portion を不活化した heated-SAA を作製した。また、マクロ

ファージに対する作用が SAA の heat-stable portion と一致する RRA 抗原を、既報^{23, 24)} に従い、*S. anginosus* 全菌体から調製した。陽性対照としては Miyazaki らの報告²⁶⁾ で株化上皮細胞に AID 異所性発現を誘導することが示されている TNF- α (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いた。

6. SAA による株化上皮細胞およびヒト正常歯肉細胞の AID 異所性発現誘導

SAA による AID 異所性発現誘導の至適培養時間、至適 SAA 量を明らかにする目的で、DOK 細胞を 12-well マイクロプラスチックプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) に 1×10^5 /well 播種し、前培養 24 時間後、SAA (0.1 ~ 100 μ g/ml), あるいは陽性対照の TNF- α (10 ~ 100 ng/ml) で刺激し、0 ~ 48 時間培養した。培養終了後、real-time RT-PCR により、AID の異所性発現誘導を検討した。結果は、得られた AID の値をそれぞれの GAPDH の値で補正した値を、刺激群と PBS 処理の対照群とで算出し、対照群に対する刺激群の百分率で表した。他の上皮細胞株 (HGC-27 細胞, および HEp-2 細胞), ならびに GEC 細胞についても、同様の方法で SAA による AID 異所性発現誘導について検討した。さらに SAA による AID 異所性発現誘導の機序を明らかにする目的で、TNF- α 産生誘導に関わらない heat-labile portion を熱処理して不活化した heated-SAA (10 μ g/ml), および heat-stable portion と作用が一致する RRA 抗原 (10 μ g/ml) を用いて、同様の方法で AID 異所性発現誘導について検討した。1 回の測定につき 3 データをとり、同じ実験を 4 回繰り返し行った。

7. NF- κ B の活性化

TNF- α による AID の異所性発現誘導には nuclear factor-kappa B (NF- κ B) の活性化が関与することが示唆されている¹⁸⁾ ことから、SAA による AID 異所性発現誘導に関わる上皮細胞内シグナル伝達系を明らかにする目的で、SAA による DOK 細胞および GEC 細胞での NF- κ B の活性化について、Paguio ら²⁷⁾ の方法

に準じて, Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて行った. すなわち DOK 細胞および GEC 細胞を 96-well マイクロプラスチックプレート (Nunc) に 2×10^4 /well を播種し 24 時間培養した. pGL4.32 [*luc2P*/NF- κ B-RE/Hygro] Vector (Promega), pGL4. 74 [*hRluc*/TK] Vector (Promega) 各 $1 \mu\text{g}$ および FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega) $2 \mu\text{l}$ を加え室温で 10 分間インキュベートして反応液を調整した. 各 well に反応液を $5 \mu\text{l}$ 加え, 5% CO_2 -95% 大気, 37°C で 24 時間培養しトランスフェクションを行った. 各 well に SAA ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) および陽性対照の TNF- α ($50 \text{ ng}/\text{ml}$) を添加し, さらに 24 時間培養後, Dual-Luciferase® Reporter Assay System のマニュアルに従い生じた化学発光をルミノメーター (Promega) で測定した. 結果は NF- κ B レポーターの発光量をコントロールレポーターの発光量で補正し, 刺激群と PBS 処理の対照群との百分率で表した. 1 回の測定につき 3 データをとり, 同じ実験を 3 回繰り返し行った.

8. SAA の AID 異所性発現誘導に対する NF- κ B 阻害剤の影響

NF- κ B 活性化と AID 異所性発現誘導の関連性を明らかにする目的で, NF- κ B 阻害剤による影響を検討した. すなわち, DOK 細胞および GEC 細胞を 12-well マイクロプラスチックプレート (Nunc) に 1×10^5 /well 播種, 24 時間培養後, NF- κ B 阻害剤 SN50 (コスモバイオ, 東京) $250 \text{ ng}/\text{ml}$ を添加し, 37°C , 5% CO_2 -95% 大気条件で 2 時間培養した. 培養終了後, 培地交換して SN50 を除去した後, SAA による AID 異所性発現誘導を前述の方法で検討した.

9. 統計解析

病変部組織サンプルにおける *S. anginosus* 感染と AID 異所性発現の関連性は Fisher の正確確率検定を, また培養細胞における AID の異所性発現誘導および NF- κ B 活性化の関連性については Student's-*t* 検定を用いて解析した.

結 果

1. 口腔扁平上皮癌組織における *S. anginosus* 感染と AID 異所性発現の関連性

被験 17 例における *S. anginosus* 感染と AID 異所性発現の結果を表 2 にまとめた. 被験 17 例中 8 例 (47%) で *S. anginosus* ゲノム DNA が検出され, *S. anginosus* の感染が認められた. 一方, AID 異所性発現については, 7 例で認められた (41%). さらに, AID 異所性発現が認められた 7 例中 6 例では同時に *S. anginosus* 感染が認められた. また, AID 異所性発現が見られなかった 10 例中 8 例では *S. anginosus* 感染も認められなかった. その結果, *S. anginosus* 感染と AID 異所性発現の結果が一致しなかったのは 17 例中 3 例のみであった. Fisher の正確確率検定を行ったところ, *S. anginosus* 感染と AID 異所性発現に有意の正の相関関係が認められた ($P = 0.0129$).

2. SAA による株化上皮細胞およびヒト正常歯肉細胞の AID 異所性発現誘導

SAA による上皮細胞の AID 異所性発現誘導の至適培養時間, SAA 量について, DOK 細胞を用いて検討した結果, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の SAA で刺激すると, 陽性対照として用いた TNF- α ($50 \text{ ng}/\text{ml}$) 同様, 刺激後 24 時間で有意の AID の異所性発現が誘導された (図 2). 他の株化上皮細胞, およびヒト正常歯肉上皮細胞 (GEC 細胞) についても SAA による AID 異所性発現誘導について検討した結果, SAA はいずれの細胞に対しても有意の AID 異所性発現誘導能を示すことが明らかとなった (図 3).

表 2 口腔扁平上皮癌における *S. anginosus* 感染と AID 異所性発現

AID mRNA発現	<i>S. anginosus</i> ゲノムDNA検出		
	+	-	総数
+	6 (35%)	1 (6%)	7 (41%)
-	2 (12%)	8 (47%)	10 (59%)
総数	8 (47%)	9 (53%)	17

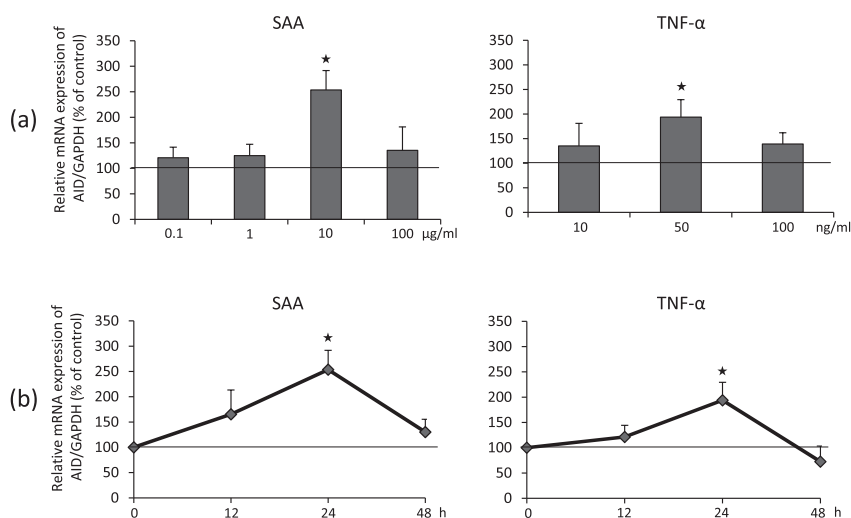


図2 SAAによるDOK細胞のAID異所性発現誘導

- (a) DOK細胞をSAA 0.1~100 $\mu\text{g/ml}$, TNF- α 10~100 ng/mlで刺激し, AID異所性発現誘導を検討した(24時間培養).
- (b) DOK細胞をSAA (10 $\mu\text{g/ml}$), TNF- α (50 ng/ml)で0~48時間刺激し, AID異所性発現誘導を検討した. 平均値 \pm 標準誤差を図に示した. ★: 対照群に対し有意に高い値を示した ($P < 0.05$).

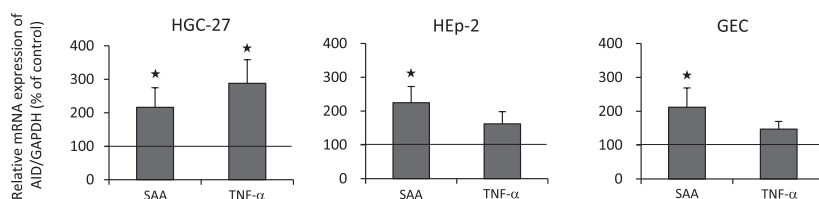


図3 株化上皮細胞およびヒト正常歯肉上皮細胞におけるAID異所性発現誘導

HGC-27細胞, Hep-2細胞およびGEC細胞をSAA (10 $\mu\text{g/ml}$), TNF- α (50 ng/ml)で24時間刺激し, AID異所性発現誘導を検討した. 平均値 \pm 標準誤差を図に示した. ★: 対照群に対し有意に高い値を示した ($P < 0.05$).

3. SAAによる株化上皮細胞およびヒト正常歯肉細胞のNF- κ B活性化とAID異所性発現誘導

TNF- α によるAIDの異所性発現誘導にはNF- κ Bの活性化が関与することが示唆されていることから, DOK細胞およびGEC細胞を用いてSAAによるNF- κ B活性化について検討した結果, GEC細胞に対してはばらつきが大きく対照群との間に有意差は認められなかった

ものの, DOK細胞に対してはSAAおよびTNF- α のいずれの刺激によっても上皮細胞内で有意のNF- κ Bの活性化が起こっていた(図4a).

そこで, NF- κ B活性化とAID異所性発現誘導の関連性を明らかにする目的で, NF- κ B阻害剤による影響を検討した結果, SN50処理群で, DOK細胞およびGEC細胞のいずれの細胞を対象とした場合にも, SAAによる上皮細胞

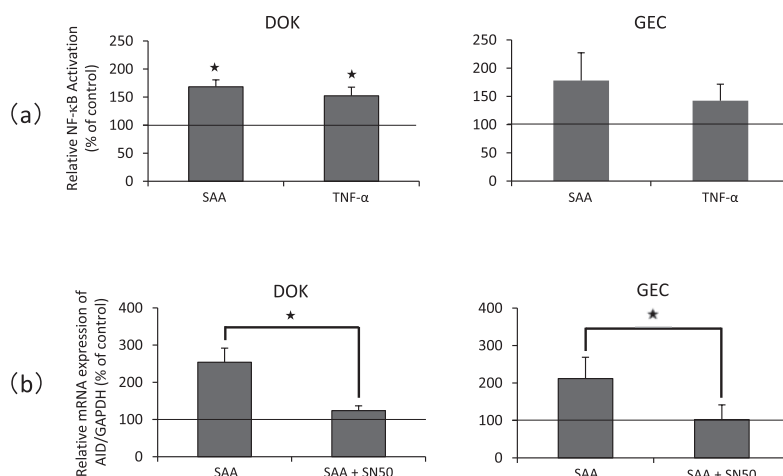


図4 NF- κ B 活性化および AID 異所性発現誘導に及ぼす NF- κ B 阻害剤の影響

- (a) DOK 細胞および GEC 細胞を SAA (10 μ g/ml), TNF- α (50 ng/ml) で刺激し, NF- κ B 活性化を検討した. 平均値 \pm 標準誤差を図に示した. ★: 対照群に対し有意に高い値を示した ($P < 0.05$).
- (b) DOK 細胞および GEC 細胞を SAA (10 μ g/ml) で刺激し NF- κ B 阻害剤による AID 異所性発現誘導に及ぼす影響を検討した. 平均値 \pm 標準誤差を図に示した. ★: 阻害剤非添加群に対し添加群は有意に低い値を示した ($P < 0.05$).

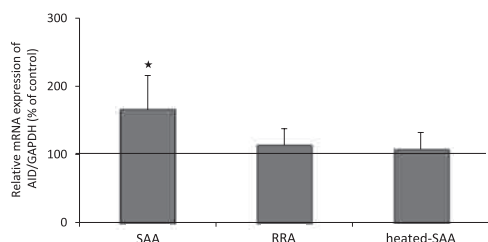


図5 SAA および SAA 関連抗原による AID 異所性発現誘導

DOK 細胞を SAA, RRA 抗原, および heated-SAA それぞれ 10 μ g/ml で刺激し, AID 異所性発現誘導を検討した. 平均値 \pm 標準誤差を図に示した. ★: 対照群に対し有意に高い値を示した ($P < 0.05$).

胞での AID 異所性発現誘導がほぼ完全に抑制された (図 4 b). なお, 結果には示さなかったが, TNF- α による上皮細胞での AID 異所性発現誘導も SN50 処理で完全に抑制された.

4. SAA および SAA 関連抗原による上皮細胞での AID 異所性発現誘導

SAA は heat-stable portion がマクロファ-

ジからの TNF- α 産生を誘導することから, 上皮細胞に対しても TNF- α 産生を誘導し, 産生された TNF- α が autocrine に働いて NF- κ B 活性化, AID 異所性発現誘導を惹起する可能性がある. そこで, TNF- α 産生誘導に関わらない heat-labile portion を熱処理して不活化した heated-SAA, および heat-stable portion と作用が一致する RRA 抗原を用いて, DOK 細胞に対する AID 異所性発現誘導能を検討した. その結果, SAA 以外の SAA 関連抗原では DOK 細胞に対する AID の異所性発現は誘導されなかった (図 5).

考 察

AID は生理的には活性化 B 細胞で発現が認められるが, ヒトの慢性リンパ性白血病では 40% (8/20)²⁸⁾, 肝細胞癌では 80% (41/51)²⁹⁾ の症例で腫瘍細胞中に AID の異所性発現が報告されており, AID の異所性発現は新たな発癌機序として注目されている. 細菌による感染発癌に AID 異所性発現が関連することは, *H.*

pylori の胃粘膜への感染実験から示されている¹⁸⁾。これらの報告からすれば *S. anginosus* の感染が口腔癌の発癌機序となる可能性も考えられる。そこで本研究では、*S. anginosus* による口腔扁平上皮癌発症機序の解明を目的として、口腔扁平上皮癌組織での *S. anginosus* 感染と AID 異所性発現の関連性を検討するとともに、ヒト正常歯肉上皮細胞／株化上皮細胞を用いた in vitro 実験系から *S. anginosus* による AID 異所性発現誘導について検討した。

ヒト口腔扁平上皮癌組織における *S. anginosus* 感染率は 17 例中 8 例、47% で、我々のこれまでの成績¹⁰⁾ (16/38 = 42%) とほぼ同率であったが、Tateda ら⁸⁾ の成績 (217/217 = 100%) よりは低かった。一方、口腔扁平上皮癌組織における AID mRNA 発現誘導は、被験 17 例中 7 例で認められた (41%)。これは、口腔扁平上皮癌での AID 異所性発現についての Nakanishi らの最近の報告³⁰⁾ (10/27 = 37%) とほぼ同率であった。特筆すべきは、今回、AID の異所性発現が見られた 7 例中 6 例では同時に *S. anginosus* 感染も認められたことで、*S. anginosus* 感染と AID 異所性発現が一致しなかったのは 17 例中 3 例のみであった。Fisher の正確確率検定を行ったところ、*S. anginosus* 感染と AID 異所性発現との間に有意の正の相関関係が認められた。これらの結果より、胃粘膜細胞への *H. pylori* 感染¹⁸⁾ 同様、*S. anginosus* 感染も歯肉上皮細胞での AID 異所性発現を誘導し、口腔扁平上皮癌の発症に関与している可能性が示唆された。

培養上皮細胞を用いた in vitro 実験系では *S. anginosus* 由来生理活性物質 SAA による AID 異所性発現誘導について検討した。その結果、SAA によりいずれの株化上皮細胞および正常歯肉上皮細胞 (GEC 細胞) に対しても、有意の AID 異所性発現の誘導が認められた。本研究結果は、胃粘膜上皮癌由来株化上皮細胞である AGS 細胞に *H. pylori* を感染させると AID 異所性発現誘導が認められたとの Matsumoto らの報告¹⁸⁾ を支持する結果ではあるが、株化上皮

細胞のみならず正常歯肉上皮細胞においても AID 異所性発現誘導を認めた初めての報告であり、これまで多くの研究者が示して来た株化細胞を用いた感染発癌のリスクが正常細胞でも起こりうることを強く示唆している。

H. pylori による胃培養株化上皮細胞での AID 異所性発現においては、*H. pylori* の生理活性物質である CagA による NF- κ B 活性化が関与することが示唆されている³¹⁾。また、C 型肝炎ウイルスに感染した肝細胞でも AID の発現が NF- κ B の活性化に制御されているとの報告^{29, 32, 33)} もあり、実際、癌病変部組織では NF- κ B の強い活性化が認められている^{34, 35)}。そこで SAA による上皮細胞の AID 異所性発現誘導の細胞内シグナル伝達系を明らかにする目的で、DOK 細胞および GEC 細胞を用いて SAA による NF- κ B 活性化について検討した。その結果、DOK 細胞および GEC 細胞ともに NF- κ B の活性化が認められた。また、NF- κ B 阻害剤により AID の発現が有意に抑制されたことから、SAA による AID 異所性発現誘導も NF- κ B を介している可能性が強く示唆された。

さらに、SAA の heat-stable portion による TNF- α 産生誘導からの autocrine の NF- κ B 活性化の可能性を排除するため、TNF- α 産生誘導に関与しない heat-labile portion を熱処理して不活化した heated-SAA、および heat-stable portion と作用が一致する RRA 抗原を用いて AID 異所性発現誘導能を検討した。その結果、SAA による AID 発現誘導は heat-stable portion による内因性 TNF- α を介したのではなく、heat-labile portion による上皮細胞への直接的な作用であることが強く示唆された。

口腔扁平上皮癌組織を用いた検討、および in vitro 実験系での研究結果より、*S. anginosus* 特異的生理活性物質 SAA による NF- κ B の活性化を介した AID 異所性発現の誘導を通じて、*S. anginosus* 感染が口腔扁平上皮癌の発症に深く関連していることが強く示唆された。AID 異所性発現を介するという点では *H. pylori* 感染

による胃癌発症機序³⁶⁾と同じであるが, *H. pylori* の場合はその生理活性物質である CagA を胃粘膜上皮細胞に注入するタイプIV分泌機構を有している¹⁷⁾. *S. anginosus* はタイプIV分泌機構を欠くため, 上皮細胞の受容体を介した NF- κ B 活性化が起こると考えられる. 今後, SAA の遺伝子クローニング, 組替えタンパク質の作製を行い, 上皮細胞における受容体の解析等, 詳細な検討が必要となろう. さらに, *H. pylori* 感染では AID 異所性発現と関連して, 上皮細胞の p53 遺伝子が高率に変異するとの報告¹⁸⁾を勘案すると, *S. anginosus* 感染による AID の異所性発現以降の癌化のプロセスとしても口腔粘膜上皮細胞の p53 遺伝子の変異の生成・蓄積が予想される. 今後も詳細な検討を行って行く予定である.

謝辞および利益相反について

稿を終えるにあたり, 御懇篤なる御指導, 御校閲を賜りました岩手医科大学歯学部口腔顎顔面再建学講座口腔外科学分野 杉山芳樹 教授, 微生物学講座分子微生物学分野 木村重信 教授に深く感謝いたします. さらに本研究に際し, ひとかたならぬ御指導, 御助言をいただきました微生物学講座分子微生物学分野 下山佑 博士, 石河太知 博士に心からの感謝の意を表します. 最後に絶えず温かい御支援ならびに御協力を頂きました口腔外科学分野, 分子微生物学分野の皆様方に深謝致します.

本論文の一部は 21st International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery (October 21, 2013, Barcelona, Spain), 第 87 回日本細菌学会総会(平成 26 年 3 月 28 日, 東京), 第 68 回日本細菌学会東北支部総会(平成 26 年 8 月 22 日, 仙台), 第 56 回歯科基礎医学学会学術大会(平成 26 年 9 月 27 日, 福岡)において発表した. また, 本研究は文部科学省科学研究費(基盤研究 C, 課題番号:40187133, 研究代表者:佐々木実;若手研究 B, 課題番号:24792250, 研究代表者:松本直子)および文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(未来医療開発

プロジェクト)の助成により実施された. なお, 本研究において, 利益相反はない.

引用文献

- 1) Ruoff, K. L.: *Streptococcus anginosus* ("*Streptococcus milleri*") : the unrecognized pathogen. Clin. Microbiol. Rev., 1: 102-108, 1988.
- 2) Gossling, J.: Occurrence and pathogenicity of the *Streptococcus milleri* group. Rev. Infect. Dis., 10: 257-285, 1988.
- 3) Whitworth, J. M.: Lancefield group F and related streptococci. J. Med. Microbiol., 33: 135-151, 1990.
- 4) Willcox, M. D.: 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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-oral head and neck squamous cell carcinoma and its implication in carcinogenesis. Oncol. Rep., 8: 245-248, 2001.
- 10) 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.
- 11) Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burrone, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N. and Rappuoli, R.: Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90: 5791-5795, 1993.

- 12) Peek, R. M. Jr., Miller, G. G., Tham, K. T., Perez-Perez, G. I., Zhao, X., Atherton, J. C. and Blaser, M. J.: Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA + *Helicobacter pylori* strains. *Lab. Invest.*, 73: 760-770, 1995.
- 13) Wilson, K. T., Ramanujam, K. S., Mobley, H. L. T., Musselman, R. F., James, S. P. and Meltzer, S. J.: *Helicobacter pylori* stimulates inducible nitric oxide synthase expression and activity in a murine macrophage cell line. *Gastroenterol.*, 111: 1524-1533, 1996.
- 14) Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J. E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R. and Covacci, A.: cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93: 14648-14653, 1996.
- 15) Shimoyama, T., Everett, S. M., Dixon, M. F., Axon, A. T. and Crabtree, J. E.: Chemokine mRNA expression in gastric mucosa is associated with *Helicobacter pylori* cagA positivity and severity of gastritis. *J. Clin. Pathol.*, 51: 765-770, 1998.
- 16) Segal, E. D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S. and Tompkins, L. S.: Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96: 14559-14564, 1999.
- 17) Hatakeyama, M.: Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat. Rev. Cancer*, 4: 688-694, 2004.
- 18) Matsumoto, Y., Marusawa, H., Kinoshita, K., Endo, Y., Kou, T., Morisawa, T., Azuma, T., Okazaki, I. M., Honjo, T. and Chiba, T.: *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat. Med.*, 13: 470-476, 2007.
- 19) Honjo, T., Kinoshita, K. and Muramatsu, M.: Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.*, 20: 165-196, 2002.
- 20) Honjo, T., Muramatsu, M. and Fagarasan, S.: AID: how does it aid antibody diversity? *Immunity*, 20: 659-668, 2004.
- 21) Begum, N. A. and Honjo, T.: Evolutionary comparison of the mechanism of DNA cleavage with respect to immune diversity and genomic instability. *Biochemistry*, 51: 5243-5256, 2012.
- 22) Okazaki, I. M., Hiai, H., Kakazu, N., Yamada, S., Muramatsu, M., Kinoshita, K. and Honjo, T.: Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *J. Exp. Med.*, 197: 1173-1181, 2003.
- 23) Sasaki, M., Ohara-Nemoto, Y., Tajika, S., Kobayashi, M., Yamaura, C. and Kimura, S.: Antigenic characterisation of a novel *Streptococcus anginosus* antigen that induces nitric oxide synthesis by murine peritoneal exudate cells. *J. Med. Microbiol.*, 50: 952-958, 2001.
- 24) 山浦千春: *Streptococcus anginosus* 由来抗原によるマウス腹腔滲出細胞からの NO 産生誘導機構. *岩医大歯誌*, 29: 3-14, 2004.
- 25) Hooper, S. J., Wilson, M. J. and Crean, S. J.: Exploring the link between microorganisms and oral cancer: a systematic review of the literature. *Head Neck*, 31: 1228-1239, 2009.
- 26) Miyazaki, Y., Inoue, H., Kikuchi, K., Ochiai, K. and Kusama, K.: Activation-induced cytidine deaminase mRNA expression in oral squamous cell carcinoma-derived cell lines is upregulated by inflammatory cytokines. *J. Oral Sci.*, 54: 71-75, 2012.
- 27) Paguio, A., Stecha, P., Wood, K. V. and Fan, F.: Improved dual-luciferase reporter assays for nuclear receptors. *Curr. Chem. Genomics*, 4: 43-49, 2010.
- 28) McCarthy, H., Wierda, W. G., Barron, L. L., Cromwell, C. C., Wang, J., Coombes, K. R., Rangel, R., Elenitoba-Johnson, K. S., Keating, M. J. and Abruzzo, L. V.: High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) and splice variants is a distinctive feature of poor-prognosis chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 101: 4903-4908, 2003.
- 29) Kou, T., Marusawa, H., Kinoshita, K., Endo, Y., Okazaki, I. M., Ueda, Y., Kodama, Y., Haga, H., Ikai, I. and Chiba, T.: Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes during hepatocarcinogenesis. *Int. J. Cancer*, 120: 469-476, 2007.
- 30) Nakanishi, Y., Kondo, S., Wakisaka, N., Tsuji, A., Endo, K., Murono, S., Ito, M., Kitamura, K., Muramatsu, M. and Yoshizaki, T.: Role of activation-induced cytidine deaminase in the development of oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 8: e62066, 2013.
- 31) Shibata, W., Hirata, Y., Yoshida, H., Otsuka, M., Hoshida, Y., Ogura, K., Maeda, S., Ohmae, T., Yanai, A., Mitsuno, Y., Seki, N., Kawabe, T. and Omata, M.: NF- κ B and ERK-signaling pathways contribute to the gene expression induced by cag PAI-positive-*Helicobacter pylori* infection. *World J. Gastroenterol.*, 11: 6134-6143, 2005.
- 32) Marusawa, H., Hijikata, M., Chiba, T. and Shimotohno, K.: Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor α -mediated apoptosis via NF- κ B activation. *J. Virol.*, 73: 4713-4720, 1999.
- 33) Endo, Y., Marusawa, H., Kinoshita, K., Morisawa, T., Sakurai, T., Okazaki, I. M., Watashi, K., Shimotohno, K., Honjo, T. and Chiba, T.: Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes via NF- κ B signaling. *Oncogene*, 26: 5587-5595, 2007.
- 34) Aihara, M., Tsuchimoto, D., Takizawa, H.,

- Azuma, A., Wakebe, H., Ohmoto, Y., Imagawa, K., Kikuchi, M., Mukaida, N. and Matsushima, K.: Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect. Immun.*, 65: 3218-3224, 1997.
- 35) Van den Brink, G. R., Ten Kate, F. J., Ponsioen, C. Y., Rive, M. M., Tytgat, G. N., Van Deventer, S. J. and Peppelenbosch, M. P.: Expression and activation of NF- κ B in the antrum of the human stomach. *J. Immunol.*, 164: 3353-3359, 2000.
- 36) Chiba, T. and Marusawa, H.: A novel mechanism for inflammation-associated carcinogenesis; an important role of activation-induced cytidine deaminase (AID) in mutation induction. *J. Mol. Med.*, 87: 1023-1027, 2009.

研 究

The involvement of *Streptococcus anginosus* infection and the aberrant activation-induced cytidine deaminase (AID) expression in human oral squamous cell carcinomaKensuke IWASAKI¹⁾, Naoko MATSUMOTO¹⁾, Minoru SASAKI²⁾¹⁾ Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Reconstructive Oral and Maxillofacial Surgery,
School of Dentistry, Iwate Medical University

(Chief : Prof. Yoshiki SUGIYAMA)

²⁾ Division of Molecular Microbiology, Department of Microbiology, Iwate Medical University

(Chief : Prof. Shigenobu KIMURA)

[Received : November 26, 2014 : Accepted : January 7, 2015]

Abstract : *Streptococcus anginosus* infection could be closely related with oral squamous cell carcinoma, although the mechanism underlying carcinogenesis is still unknown. Recent studies suggested that the aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in the epithelial cells could result in the generation of nucleotide alterations in tumor-related genes and possible malignant transformation of the AID-expressing cells. In this study using the 17 surgical tissue specimens, a possible involvement of *S. anginosus* infection and aberrant AID expression in oral squamous cell carcinoma was assessed by the species-specific PCR and RT-qPCR. Further, the aberrant AID expression and NF- κ B activation were examined by a dual luciferase assay and RT-qPCR in three epithelial cell lines and the primary human gingival epithelial cells after stimulation with a bioactive antigen of *S. anginosus*, SAA. The results indicated that both *S. anginosus* infection and aberrant AID expressions were frequently observed in the tissue specimens (47% and 41%, respectively), and *S. anginosus* infection was significantly correlated with the aberrant AID expression. The stimulation of the cultured cells with SAA could induce the NF- κ B activation and aberrant AID expression in all the epithelial cells tested, and the addition of an inhibitor of NF- κ B activation abrogated the aberrant AID expression. Thus, *S. anginosus* infection could be closely related with oral squamous cell carcinoma through the induction of the aberrant AID expression by *S. anginosus* antigen.

Key Words : *Streptococcus anginosus*, oral squamous cell carcinoma, aberrant activation-induced cytidine deaminase (AID) expression, NF- κ B, an *S. anginosus* antigen (SAA)