

口腔がん細胞の増殖を抑制する口腔内常在細菌の存在

Oral resident bacteria that inhibit the growth of cancer

戌亥衣祝^{1,2)}, 山崎亮太¹⁾, 吉岡香絵¹⁾, 有吉渉¹⁾

¹⁾ 九州歯科大学 感染分子生物学分野, ²⁾ 九州歯科大学 顎顔面外科学分野

Inori Inui^{1,2)}, Ryota Yamasaki¹⁾, Yoshie Yosioka¹⁾, Wataru Ariyoshi¹⁾

¹⁾ Division of Infections and Molecular Biology, Kyushu Dental University

²⁾ Division of Maxillofacial Surgery, Kyushu Dental University

E-mail address: r18yamasaki@fa.kyu-dent.ac.jp

1. はじめに

口腔がんとは顎口腔領域に発生する悪性腫瘍の総称であり、その90%が扁平上皮癌に分類される^[1]。口腔がんの原因として、主に喫煙や過度のアルコール、物理的な刺激等が挙げられる^[2]。近年、口腔微生物叢が腫瘍の発生や進行に関与していることが明らかになっている^[3]。口腔内には数百種、数千億個もの菌が生息しているが、*Streptococcus* 属の菌がその多くを占めている。現在、歯周病原細菌である *Fusobacterium nucleatum* や *Porphyromonas gingivalis* が口腔がんの進行に関わっていることが報告されている^[4]。これらが、過剰な炎症反応や免疫回避、抗アポトーシス活性、形質転換の促進を引き起こし、癌を促進することが解明されている^[4]。一方で *Streptococcus* 属の菌と口腔がんとの相互作用についてはほとんど報告がない。本研究では *Streptococcus* 属の菌が口腔がんに与える影響と、その作用機序を明らかにする。

2. 材料と方法

2. 1 細胞株

口腔扁平上皮癌株 HSC-3 (ヒト舌癌由来)

口腔扁平上皮癌株 Ca9-22 (ヒト歯肉癌由来)

2. 2 細菌株

Streptococcus mitis ATCC 49456

Streptococcus sanguinis ATCC 10556

Streptococcus anginosus ATCC 33379

Streptococcus salivarius ATCC BAA-1024

Streptococcus mutans UA 159

2. 3 細胞と細菌の共培養

細菌は1~2日37℃、5%CO₂環境下で培養した。単一コロニーをBHI液体培地に播種し、37℃、5%CO₂環境下で12時間培養した。菌の培養液を600nmで0.4の濁度となるように調製し、3500Gで10分遠心分離の後FBSと1%SMPCを加えたE-MEMまたはMEMαで沈殿物を再懸濁した。このプロセスは2回繰り返した。

2. 4 細胞生存率アッセイ

細胞生存率はWST-8を用いたCell Counting Kit-8を使用して評価した。HSC-3またはCa9-22を96wellプレートに2000cells/wellで6時間培養し接着させた。各菌液を別の96wellプレートにて連続2倍希釈し、最終的に最大50%(v/v)濃度にして各濃度でがん細胞に添加した。48時間培養後、CCK-8を10μL添加し2時間インキュベートした後、450nmでの吸光度を測定した。

2. 5 遺伝子発現の変化

*S. mitis*の菌液1.56%を添加し48時間培養したHSC-3からtotal RNAを抽出しNovogene Co.,Ltd.によるRNAシーケンシングが行われ、機能分析として遺伝子オンロジー(GO)解析を行った。

また、total RNAを逆転写し、リアルタイムRT-qPCRを行った。

2. 6 細胞周期への影響

Φ10cmディッシュにHSC-3を7×10⁵cells/well播種し6時間の前培養の後、24時間、*S. mitis*の菌液1.56%で処理し、細胞を70%エタノールで2時間固定した。PI/RNase溶液で染色しフローサイトメーターで分析した。

2. 7 菌の形態や成分によるがん細胞への影響

生菌、生菌の分泌物、死菌(超音波破碎、イソプロパノール処理)をサンプルとして調製した。培養上清は、菌の培養液600nmで0.4の濁度となるように調製し、遠心した後の上澄み液を、0.2μmのフィルターに通し抽出した。2.3の手順で得られた菌液について、70%イソプロパノールで1時間処理することで死菌サンプルを得た。また、菌液を超音波ホモジナイザーにて15秒・15秒間隔で5分間超音波破碎した。また、超音波破碎された菌体をProteinase Kで処理し、90℃30分でプロテアーゼを失活させることでタンパク質を除く菌体成分サンプルを調製した。それぞれの菌液をHSC-3に添加し、細胞生存率アッセイを行った。生菌、死菌(超音波破碎、イソプロパノール処理)はLIVE/DEAD染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

3. 結果と考察

3. 1 *S. mitis* はがん細胞の増殖を最も抑制した

HSC-3 に各菌液を添加し WST-8 アッセイを行った (n=3)。この中では *S. mitis* が最も少ない量でがん細胞の増殖抑制をもたらした。また、*S. mitis* は Ca9-22 に対しても増殖抑制効果があることが確認された。この結果から、*S. mitis* に着目することとした。

3. 2 有糸分裂・核分裂に関わる遺伝子群が有意に増加した

遺伝子発現への影響を RNA シーケンスで検証した。GO 解析の結果、*S. mitis* 添加群では有糸分裂・核分裂に関わる遺伝子群が有意に増加した。有糸分裂・核分裂に関わる遺伝子群に含まれる具体的な遺伝子のうち、DUSP1 についてリアルタイム RT-qPCR で検証したところ顕著な増加を認めた。

3. 3 *S. mitis* を添加した HSC-3 は G0/G1 期が減少し、G2/M 期が増加した

S. mitis による HSC-3 の細胞周期の変化についてフローサイトメトリー (n=3) の結果を示す (表 1)。*S. mitis* 添加群では G0/G1 期の割合が減少し、G2/M 期が増加した。がん細胞の増殖が阻害されていることから、*S. mitis* は HSC-3 細胞に対し G2/M 期で停止させることで増殖の抑制をもたらしている可能性がある。

表 1. *S. mitis* による細胞周期の割合の変化。各周期の細胞の割合。

	Control(%)	<i>S. mitis</i> (%)
G0/G1	27.0	19.3
S	8.2	10.9
G2/M	62.5	69.1

3. 4 菌の分泌物は抑制効果を持たず、菌体は生死に関わらずがん細胞の増殖を抑制した

S. mitis を様々処理した生菌・死菌サンプルによる、がん細胞への影響を WST-8 アッセイで比較した結果を表 2 に示す。超音波破碎、またはイソプロパノール処理した菌は添加直前の LIVE/DEAD 染色により死滅していることが確認された。

S. mitis が生きた状態で添加された場合と、超音波処理により死滅した状態で添加された場合で増殖抑制効果に変化はなかった。一方、菌の分泌地物とイソプロパノール処理で死滅した菌は増殖抑制効果を持たなかった。Proteinase K によるタンパク質の分解により、その効果が完全にではないが減弱することが示された。これらの

結果から、増殖抑制効果に *S. mitis* の構造タンパク質が深く関与することが考えられる。

表 2. 菌の状態と細胞生存率アッセイの結果。

菌の状態	IC80 (v/v%)
<i>S. mitis</i> (菌体)	0.78
分泌物	-
イソプロパノール処理	-
超音波処理	0.78
プロテアーゼ処理	25

4. おわりに

S. mitis は歯周病のない健康な口腔内で多いとされる口腔内常在菌である^[5]。本研究では *S. mitis* が口腔がんを抑制することが示唆された。生体を用いた更なる研究でその作用機序を明らかにすることは新たな口腔がん治療の発見に繋がると考えられる。

参考文献

- [1] Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. 2010. Oral cancer: Clinical features. Oral Oncol. 46(6):414-417.
- [2] Chamoli A, Gosavi AS, Shirwadkar UP, Wangdale KV, Behera SK, Kurrey NK, Kalia K, Mandoli A. 2021. Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: Risk factors, mechanisms, and diagnostics. Oral Oncol. 121:105451.
- [3] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. 2021. Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 71(3):209-249.
- [4] Li R, Xiao L, Gong T, Liu J, Li Y, Zhou X, Li Y, Zheng X. 2023. Role of oral microbiome in oral oncogenesis, tumor progression, and metastasis. Mol Oral Microbiol. 38(1):9-22.
- [5] Costalonga M, Herzberg MC. 2014. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. Immunol Lett. 162(2 Pt A):22-38.