



Title	The oral bacterium Streptococcus mutans promotes tumor metastasis by inducing vascular inflammation [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Yu, Li
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15507号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89930
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yu_Li_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 YU LI

審査担当者 主査 教授 樋 田 京 子
副査 教授 北 川 善 政
副査 教授 長 谷 部 晃

学 位 論 文 題 名

The oral bacterium *Streptococcus mutans* promotes tumor metastasis by inducing vascular inflammation

（口腔細菌，*Streptococcus mutans* は、血管炎症を誘発し転移を促進する）

審査は審査担当者全員出席の下，オンラインの公聴会として行われた．はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われ，審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた．その内容を以下に示す．

血行性転移は，がんの死因の約9割を占めるといわれその制御が極めて重要である．がんは炎症部位に転移する傾向があることが知られている．血行性転移の成立には遠隔臓器の血管へがん細胞が遊走，接着，血管内細胞間浸潤が必要である．我々はこれまで血管の炎症性変化が血管内皮細胞間のがん細胞浸潤を増加させることを報告してきた．

う蝕の原因菌であるグラム陽性菌 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*, ミュータンス菌)はTLR2を刺激し宿主細胞に炎症性変化を起こす．外科的侵襲を伴う歯科処置によって，あるいは歯周炎に罹患した粘膜組織から血管内に侵入し血流に *S. mutans* が循環することで心疾患など全身疾患の原因になり得ることが報告されている．しかし，*S. mutans* とがん血行性転移との関連については不明である．本研究の目的は *S. mutans* による血管炎症ががんの転移にどのような影響を及ぼすのかについて明らかにすることとした．

S. mutans の血管内皮細胞への侵入は，グラム染色とコロニー形成アッセイにより解析した．*S. mutans* は刺激後3時間で血管内皮細胞に侵入し，細胞内に侵入する菌数は経時的に増加した．RNAシーケンスを行い *S. mutans* 刺激血管内皮細胞トランスクリプトームのバイオインフォティクス解析によって，炎症関連シグナル経路の活性化が見出された．実際に *S. mutans* 刺激により血管内皮細胞においてNF- κ B活性化を介してIL-6, IL-8, IL-1 β ，およびTNF- α などの炎症性サイトカインの発現レベルが上昇することがわかった．さらに，血管内皮細胞に対して遊走する腫瘍細胞数は血管内皮細胞を *S. mutans* により刺激することで増加し，*S. mutans* による血管炎症が腫瘍細胞の血管への遊走を促進させることが示唆された．

次に，腫瘍細胞と血管内皮細胞と接着を解析した．*S. mutans* で刺激された血管内皮細胞に接着した腫瘍細胞数は，*S. mutans* の数と刺激時間依存的に有意に増加した．*S. mutans* で刺激された血管内皮細胞において接着分子ICAM-1の発現が顕著に亢進していたことから *S. mutans* が血管内皮細胞のICAM-1発現を誘導することにより腫瘍細胞の血管への接着を促進することが示唆された．

次に血管内皮細胞間接着分子のVE-cadherinとZO-1の発現を解析した．両分子のmRNA発現量が，*S. mutans* 刺激により有意に減少した．また *S. mutans* 刺激は単層血管内皮細胞の経内皮電気抵抗

(Transendothelial electrical resistance, TEER)を有意に低下させ、*S. mutans*による血管内皮細胞間結合の破壊が示唆された。

*In vivo*で *S. mutans* を C57BL/6 雌マウスに静脈内投与すると肺組織の IL-6 および TNF- α の mRNA 量の増加がみられた。CD31 と CD45 の二重免疫蛍光染色により、*S. mutans* 静注群の肺における CD45 陽性細胞の有意な増加、特に CD31 陽性の血管周囲への集積が見られたことから、*S. mutans* による血管炎症が示唆された。また、*in vitro*の所見と一致して、*S. mutans*群における ICAM-1 の発現亢進と VE-カドヘリン発現低下がみられた。40kDa の FITC-デキストラン静脈内注射により肺血管透過性を解析したところ *S. mutans* 群で FITC シグナルが高値を示した。これらの結果より、*S. mutans* が肺血管の炎症を誘発し、血管内皮細胞表面の接着分子発現亢進と血管透過性亢進をもたらすことが示された。

マウス乳癌 tdtomato-Luc2-E0771 細胞を用いた尾静脈注射によるがん転移モデルでは、*S. mutans* 静注群で肺転移の有意な増加が認められた。抗炎症薬、アスピリンや NF- κ B 阻害剤によって転移が抑制されたことから、*S. mutans*による血管炎症が肺転移を促進することが示唆された。

以上の結果により、血液循環 *S. mutans*によるがん転移促進することを実証し、口腔細菌が転移の危険因子である可能性を示した。外科手術を受ける患者の口腔ケアは術後肺炎の予防のみならず、転移抑制の観点からも重要と考えられる。

審査は審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた。以下にその項目を示す。

- 1) 口腔常在菌との関連についての国内外の研究の動向
- 2) 本研究で *S. mutans*に着目した経緯について
- 3) *S. mutans* の付着と血管内皮細胞の侵入の実験内容について
- 4) *S. mutans* の付着と侵入による血管内皮細胞の炎症の程度の重要性について
- 5) 高用量 *S. mutans* の刺激下で腫瘍細胞の遊走が減少していることについての考察
- 6) 内皮電気抵抗アッセイを用いた解析方法の詳細について
- 7) *In vivo* 実験における *S. mutans* の反復注入の意義
- 8) *S. mutans* 刺激による血管内皮細胞損傷の評価について
- 9) 血管内皮細胞間遊走アッセイの解析方法と結果の詳細について
- 10) 血管内皮細胞に炎症を誘発する *S. mutans* 責任分子について
- 11) アスピリンの転移抑制薬としての可能性について
- 12) *In vivo* imaging system を用いた解析方法の詳細について

本研究の結果は、口腔常在菌による血管炎症ががん転移のリスクになりうるという重要かつ斬新な基礎科学的情報を提供した。論文は Cancer Science に受理され学術的にも評価されている。加えて、上記の質疑応答から、申請者は本研究内容を中心とした専門分野はもとより、関連分野について十分な理解と知識を有していることが確認された。

以上のことから、審査担当者全員は学位申請者が博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認めた。