

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11841

研究課題名(和文) 口腔粘膜細胞のCandida albicans 認識とHO-1の新規炎症制御機構

研究課題名(英文) Recognition of Candida albicans and mechanism of inflammatory response via HO-1 in oral mucosal cells

研究代表者

福井 暁子 (FUKUI, AKIKO)

広島大学・病院(歯)・助教

研究者番号：50647550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜上皮細胞のCaに対する炎症制御機構の検討を行った。Caを添加した口腔粘膜上皮細胞にはROSを介しHO-1を誘導する経路が存在し、HO-1がCa<sup>2+</sup>-glucanで誘導される炎症性サイトカインの調節に関与することが明らかになった。近年、CEACAM1がCaレセプターとして認識され口腔粘膜上皮細胞での機能を検討した。CEACAM1はRT7の細胞膜上に発現と局在を認め、Ca加熱死菌、Ca<sup>2+</sup>-glucan添加で発現が上昇し、CEACAM1 SiRNA株ではCaで誘導されるHO-1発現が低下した。口腔粘膜上皮細胞では、CEACAM1がCaを認識しROSを介しHO-1を誘導することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔カンジダ症は常在菌であるCandida albicansが主な原因菌の感染症で、有病者や高齢者など免疫力の低下した状態や、唾液の減少・長期の抗菌薬使用による常在菌間のバランスの乱れにより病原性を発揮し発症するとされる。口腔粘膜は細菌やウイルスが最初に接する器官で、病原菌に対する防御機構が存在すると考えられるが、口腔粘膜細胞におけるCaの認識機構や免疫応答については不明な点が多い。これらを解明することで既存の抗真菌薬と異なる経路をターゲットにした新規治療薬の開発や、易感染患者の口腔内の炎症制御、深在性カンジダ症など重症例の防止につながり、有病者のQOL向上に貢献することができる分野である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of inflammatory response to Ca in oral keratinocyte. In this study, we found that Ca induced HO-1 expression via ROS in oral keratinocyte and it was revealed that HO-1 controlled inflammatory cytokines which induced by Ca<sup>2+</sup>-glucan. Recently CEACAM1 was recognized as a Ca receptor, we investigated its function to Ca in oral keratinocyte. CEACAM1 was expressed and localized in the cell membrane of RT7, and its expression was increased by heat-killed Ca and Ca<sup>2+</sup>-glucan. HO-1 expression which induced by Ca was decreased in CEACAM1 SiRNA. Therefore, CEACAM1 recognizes Ca in the oral keratinocyte and it induced HO-1 expression via ROS.

研究分野：口腔外科

キーワード：Heme oxygenase 1 ROS CEACAM1 Candida albicans 口腔粘膜上皮細胞 炎症性サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

口腔カンジダ症は *Candida albicans* (以下 Ca) を主な原因とする日和見感染症で、Ca は口腔粘膜上皮に侵入し上皮細胞を障害するとされる。この Ca の侵入に対し、口腔粘膜細胞には Ca を認識し、そのストレスから細胞を防御する応答機構が存在すると考えられるが、口腔粘膜細胞における Ca の認識機構や免疫応答に関しては不明な点が多い。不死化口腔粘膜上皮細胞 (RT7) に Ca 加熱死菌を添加するとストレス応答性蛋白 Heme oxygenase1 (HO-1) の発現が誘導され、また Ca の細胞壁構成成分  $\beta$ -glucan を同様に添加すると、細胞内酸化ストレス Intracellular reactive oxygen species (ROS) が増加し HO-1 を誘導された。さらに Ca 浸潤組織切片においては健常者と比較し HO-1 が高度に発現し、上皮内に  $\beta$ -glucan 顆粒の存在を確認したことから、口腔粘膜が Ca の  $\beta$ -glucan を細胞表面の受容体を介して認識し HO-1 を誘導する経路の存在が示唆される。次に、Ca 生菌を口腔粘膜上皮細胞に添加すると、炎症性サイトカインが誘導されるがその中でも IL-8 が最も上昇した。IL-8 は好中球を活性化させ宿主防御に機能する一方で過剰に発現されると粘膜の炎症が増悪することが知られている。HO-1 をノックダウンした口腔粘膜上皮細胞に Ca 生菌を添加したところ、Ca で誘導される IL-8 が過剰に誘導されること、また NF- $\kappa$ B の転写活性がノーマル細胞と比較しさらに増加する事を確認した。これらの結果は HO-1 が Ca の感染により引き起こされる過剰な炎症反応を調節し、抗炎症作用や細胞防御に機能している可能性を示唆している。予備実験において、口腔粘膜上皮細胞において Ca  $\beta$ -glucan は IL-8 を誘導しないことから、 $\beta$ -glucan を認識して HO-1 が誘導される経路と Ca 生菌に關与する IL-8 を誘導する経路は別の受容体を介する経路であることも示唆されるが、これらに關与した口腔粘膜細胞での Ca 認識から細胞障害を誘導する経路やその経路に対する HO-1 の防御機構についての報告はない。以上の予備実験より、口腔粘膜における Ca 生菌、細胞壁成分の  $\beta$ -glucan を認識し、初期免疫応答に起因する受容体を解明し、Ca で誘導される炎症応答に対する HO-1 の制御機構を解明し、臨床への応用を目標とし研究を行った。

## 2. 研究の目的

口腔粘膜が Ca を認識し、誘導される免疫防御応答機構に関しては不明な点が多い。申請者らは、口腔粘膜上皮細胞で Ca  $\beta$ -glucan によって HO-1 が誘導されること、HO-1 をノックダウンすると Ca で誘導される IL-8 が過剰に誘導されること、NF- $\kappa$ B の活性が増大する事から、口腔粘膜細胞が Ca  $\beta$ -glucan や Ca 生菌を認識する受容体や、Ca によって誘導される HO-1 の機能を解析し、口腔感染症や口腔粘膜炎症性疾患における HO-1 の機能を検討することで、最終的には新規の治療方法や検査方法の開発など、臨床での応用を目的とした。

## 3. 研究の方法

### 使用した細胞；

細胞は hTERT 遺伝子を導入する事によって不死化させた口腔粘膜上皮細胞 RT7 を主に用いた。培地は表皮角化細胞培地 (Lonza 社) を用いて培養を行った。

### Ca 加熱死菌の調整

BHI 培地 (Bacto TM Brain heart infusion 社) にて一夜培養し PBS で 109CFU/ml の濃度に希釈し、75 °C で 45 分加熱し、107CFU/ml の濃度で使用した。

### Ca $\beta$ -glucan の抽出

Sabouraud 培地で大量培養した Ca を遠心分離し、回収したペレットへ 1%NaOH を加え 100 °C で 24 時間加熱し、沈殿物を滅菌した超純水にて 3 度洗浄し、0.5M Acetic acid を 100ml 加え 80 °C で 24 時間加熱し、沈殿物を凍結乾燥し、1.01g の  $\beta$ -glucan を抽出した。

### 組織免疫染色、細胞蛍光免疫染色

1 次抗体は CEACAM1 Antibody (R&D System 社)、2 次抗体は ECL Anti-rabbit IgG (GEヘルスケア・ジャパン株式会社) を使用した。

### SiRNA による HO-1、CEACAM ノックダウン細胞の作製

RT7 を細胞培養し、70%コンフルエンスになった時点で HO-1 StealthTM siRNA (LIFE technologies 社)、CEACAM1 siRNA (invitrogen 社) を添加し、各種発現を RT-PCR、ウエスタンブロッティング法で各種発現を確認した。

#### 4. 研究成果

これまでに Ca 生菌を添加した RT7 のマイクロアレイ解析で発現が優位に上昇したいくつかの遺伝子に注目し、特に優位に上昇したストレス応答性蛋白 H0-1 遺伝子の発現に関する伝達経路を Ca 細胞壁構成成分の Ca  $\beta$ -glucan の RT7 への添加実験を行った結果、細胞内酸化ストレス ROS を介して H0-1 の発現が誘導される経路を確認していたため、さらに詳細なシグナル伝達経路の解析を目的に、H0-1 ノックダウン RT7 を作成し Ca を添加すると、IL-8 の過剰な発現の上昇や、NF- $\kappa$ B の発現上昇を認めた。以上より、口腔粘膜上皮細胞では ROS を介し H0-1 が炎症性サイトカインである IL-8 や NF- $\kappa$ B の発現を抑制し、炎症反応の制御に機能することが明らかになった。

次に、口腔粘膜上皮細胞の Ca が H0-1 を誘導する ROS の上流の経路についての検討を進めた。真菌のレセプターとして TLR2・4 などの TLRs や Dectin1・2 などの CLR などの報告があるが、近年腸上皮細胞において新たに報告のあった癌胎児性抗原関連接着分子 CEACAM に注目し検討を行った。上皮細胞における発現部位を確認するため、蛍光免疫染色を用い検討を行ったところ、RT の細胞膜上に CEACAM レセプターの局在を確認した。次に CEACAM 1 の siRNA 株に Ca を添加し、H0-1 の発現を検討したところ、CEACAM1 ノックダウンで H0-1 の発現が優位に低下し、口腔粘膜上皮細胞には CEACAM 1 が Ca を認識し ROS を介して H0-1 が誘導され、炎症性サイトカインを調節する経路の存在が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	太田 耕司  (Ohta Kouji)  (20335681)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授    (15401)	