

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 5 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～2010

課題番号：20791522

研究課題名（和文）カンジダ症で口腔粘膜細胞より誘導される特異的蛋白の同定とその意義

研究課題名（英文）Identification and function of specific protein induced by *Candida albicans* from human oral mucosal cell

研究代表者

太田 耕司 (Ohta Kouji)

広島大学・病院・助教

研究者番号：20335681

研究成果の概要（和文）：

口腔粘膜の細胞は *Candida albicans* (以下 Ca) に対して宿主の感染防御機構をもっていると考えている。Ca 生菌の添加により、口腔粘膜上皮細胞(RT7)は CX3CL1 以外の様々なケモカイン mRNA が発現誘導された。一方、歯肉線維芽細胞は Ca 生菌、死菌の添加により CX3CL1 mRNA が発現誘導された。歯肉線維芽細胞(GT1)においては他の *Candida* 属添加で CX3CL1 mRNA 発現が増加した。さらに CX3CL1 は抗真菌活性を持っていた。それらゆえ歯肉線維芽細胞から発現誘導される CX3CL1 は *Candida* 感染に対して口腔粘膜の免疫応答に重要な役割を持っていると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Oral mucosal cells are thought to influence host inflammatory responses against *Candida albicans*(Ca). Addition of Ca live cells to human immortalized oral keratinocytes (RT7) resulted in increases in mRNA levels of multiple chemokines, however not of CX3CL1. In contrast, live and heat-killed Ca caused an increase in CX3CL1 mRNA and protein expression in human immortalized oral fibroblasts (GT1). CX3CL1 mRNA expression in GT1 cells was also enhanced by stimulation with a non-albicans species of *Candida*. Further, the CX3CL1 chemokine domain showed antifungal activity against *C. albicans*. CX3CL1 secreted by oral fibroblasts appears to play an important role in oral immune response to *C. albicans* infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：Candida albicans, ケモカイン, 口腔粘膜上皮細胞, 歯肉線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

口腔カンジダ症は、*Candida albicans* (Ca) を主な原因菌とする日和見感染症であり、AIDS などの免疫不全や悪性腫瘍患者の場合、重篤な転帰をとることが知られている。口腔内常在菌である Ca は、口腔粘膜に対して付着、定着、侵入する性質を有する。これに対して宿主側は初発感染防御機構を稼働し、免疫応答を行うと考えられるが、白血球遊走能をもつケモカインを中心とした口腔粘膜の免疫応答に関しては明らかにされていない。またこれまで Ca 感染による口腔粘膜上皮細胞のケモカインの発現に関する報告は少なく、また Ca による線維芽細胞のケモカイン発現に関する報告はない。

2. 研究の目的

Ca 感染による口腔粘膜の感染防御機構を解明するため、口腔粘膜上皮細胞、線維芽細胞における Ca で誘導される特異的ケモカインの同定を行い、さらにその機能の解析を行った。

3. 研究の方法

1) 用いた細胞

細胞は hTERT 遺伝子を導入することにより不死化させた口腔粘膜上皮細胞 (RT7) と不死化歯肉線維芽細胞 (GT1) を用いた。

2) 用いた細菌

Ca IF1385 株, *Candida glabrata* (Cg) IFM5678 株, *Candida tropicalis* (Ct) IF 5797 株, *Staphylococcus aureus* (Sa) 209P 株, *Escherichia coli* (Ec) HB101 株を用いた。

3) Ca によって上皮、線維芽細胞から誘発されるケモカイン mRNA 発現の検討

Ca をサブロー培地にて 37 度で 24 時間培養し、生菌懸濁液を調整した。また菌液を 70 度で 1 時間加熱処理し、死菌懸濁液を調整した。生菌懸濁液、または死菌懸濁液をサブコンプレ

ントの不死化細胞に添加し、12 時間後に total RNA を抽出、cDNA を作製しました。

その後、リアルタイム RT-PCR を行い、各種ケモカインの遺伝子発現を検討した。

4) Ca によって口腔粘膜上皮、線維芽細胞から誘発される CX3CL1 mRNA 発現の検討

生菌懸濁液、死菌懸濁液を不死化細胞に添加し、蛋白を抽出後、Western blotting を行い、CX3CL1 蛋白発現を検討した。

5) 歯肉線維芽細胞から誘発される Fractalkine の抗真菌活性の検討

様々な濃度の CX3CL1 リコンビナント蛋白と Ca を 37 度で 2 時間反応させ、サブロー寒天培地に播き、生菌数を非添加のコントロールに対する生菌率として計算した。

4. 研究成果

Ca 生菌により、RT7, GT1 から様々なケモカインが発現誘導された (Table.)。RT7 は Ca 生菌により CX3CL1 を除く様々なケモカインが誘導された。一方、GT1 は CX3CL1 が非添加時と比べ 10 倍以上の発現の増加を示した (Table. 1)。

Table 1. RT7, GT1 における *Candida albicans* で発現が誘導されるケモカインの検索

Chemokine	mRNA levels*	
	GT1	RT7
CC Chemokine		
CCL2/monocytes chemotactic protein-1 (MCP-1)	1.3 ± 0.5	6.6 ± 0.8†
CCL5/regulated upon activation, normal T expressed and secreted (RANTES)	0.9 ± 0.2	11.5 ± 2.1†
CCL20/liver and activation-regulated chemokine (LARC)	0.9 ± 0.2	31.7 ± 3.3†
CXC Chemokine		
CXCL1/growth-related product a (Groa)	0.9 ± 0.1	43.3 ± 3.8†
CXCL5/epithelial derived neutrophil attractant-78 (ENA-78)	0.6 ± 0.1	20.9 ± 2.1†
CXCL6/granulocyte chemotactic protein-2 (GCP-2)	0.8 ± 0.1	12.7 ± 1.5†
CXCL8/interleukin-8 (IL-8)	1.6 ± 0.2†	86.4 ± 9.6†
CXCL9/monokine induced by interferon g (Mig)	3.8 ± 0.4†	9.4 ± 1.6†
CXCL10/interferon-inducible protein-10 (IP-10)	0.9 ± 0.1	9.8 ± 1.4†
CXCL11/interferon-inducible T-cell a chemoattractant (I-TAC)	1.0 ± 0.2	9.1 ± 1.2†
CXCL12/stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)	1.1 ± 0.2	19.9 ± 1.5†
CX3C Chemokine		
CX3CL1/fractalkine	12.7 ± 1.9†	0.8 ± 0.2

*The chemokine mRNA levels are shown as relative to β-actin, and data are presented as fold-increase in mRNA expression compared with non-treated cells as the mean ± SD from 3 independent experiments.
†Significantly different from non-treated cells (p<0.05; t test)

GT1においてCaの生菌、加熱死菌を添加することによりCX3CL1 mRNAが濃度依存的な増加を示した(Fig. 1)またGT1においてCaの生菌、加熱死菌を添加することによりCX3CL1蛋白が増加した(Fig. 2).

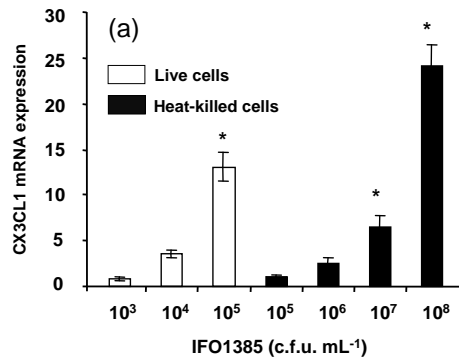


Fig. 1 GT1における *Candida albicans* によるCX3CL1 mRNA発現の増加

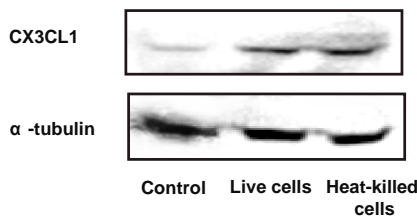


Fig. 2 GT1における *Candida albicans* によるCX3CL1蛋白発現の増加

Ca生菌、加熱死菌と同濃度のCg, Ctの添加によっても、CX3CL1の増加が認められた(Fig. 3).

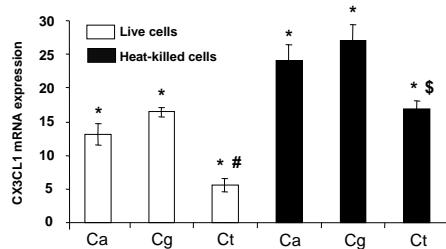


Fig. 3 GT1における *Candida* 属によるCX3CL1 mRNA発現の増加

炎症系サイトカイン INF- γ , TNF- α 添加時のRT7, GT1におけるCX3CL1発現の増加をRT-PCRによって検討した結果, RT7ではINF- γ , TNF- α 添加によりCX3CL1発現の増加は認められたが, GT1では認められなかった.

一方, Ca生菌と同濃度のSa, Saの生菌添加によっても, CX3CL1の増加は認められなかった(Fig. 4). これらの結果から, 上皮細胞と線維芽細胞ではCX3CL1の発現を誘導するリガンドが異なっていることが示され, CX3CL1は歯肉線維芽細胞が発現するCandida特異的ケモカインであることが明らかになった.

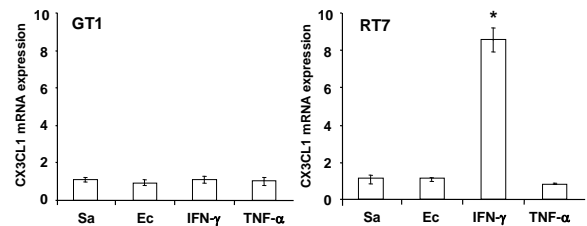


Fig. 4 GT1, RT7における炎症性サイトカイン, Sa, ECの生菌によるCX3CL1 mRNA発現の増加

CX3CL1の抗菌効果の検討を行った結果, CaにCX3CL1を添加することによって濃度依存的に生菌率が減少した. これらの結果からCX3CL1は抗真菌活性をもつことが明らかになった(Fig. 5).

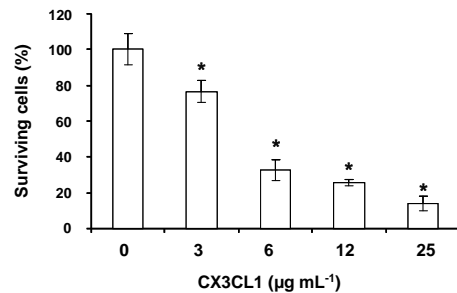


Fig. 5 CX3CL1の *Candida albicans* に対する抗菌活性

これらの結果から国内外で初めてCaにより口腔粘膜上皮細胞, 線維芽細胞においてそれぞれ異なったケモカインが発現誘導されること, またCaにより歯肉線維芽細胞から発現誘導されるCX3CL1はCandida特異的ケモカインでさらに抗菌活性をもつことを明らかにした. それらゆえ, Candida感染に対して口腔粘膜の免疫応答に重要な役割を持っていると考えられた.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- 1) CX3CL1 expression induced by *Candida albicans* in oral fibroblasts. Ohta K, Nishi H et al. FEMS Immunol Med Microbiol 60 179-185, 2010. (査読有り)
- 2) Histopathological evaluation including cytokeratin13 and Ki-67 in the border between Lugol-stained and -unstained areas. Ohta K, Ogawa K, Ono S et al. Oncology reports 24 9-14, 2010 (査読有り)
- 3) Influence of factors related to implant stability detected by wireless resonance frequency analysis device. Ohta K, Takechi M et al. Journal of Oral Rehabilitation. 37 131-137, 2010. (査読有り)
- 4) Wound healing effects of gingival fibroblasts cultured in animal-free medium. NISHI H, Ohta K, TAKECHI M et al. Oral Diseases 16 438-444, 2010. (査読有り)
- 5) Expression of TPX2 in salivary gland carcinomas. Shigeishi H, Ohta K, Hiraoka M, et al. Oncol Rep 21:341-4, 2009. (査読有り)
- 6) Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility, correlates with expression of microtubule-associated protein in human oral squamous cell carcinomas. Shigeishi H, Fujimoto S, Hiraoka M, Ono S, Taki M, Ohta K, et al. Int J Oncol 34:1565-1571, 2009. (査読有り)
- 7) Regulation of CXCL9/10/11 in oral keratinocytes and fibroblasts. Ohta K, Shigeishi H, Taki M. J Dent Res 87:1160-1165, 2008 (査読有り)

8) Expression of epiregulin, a novel epidermal growth factor ligand associated with prognosis in human oral squamous cell carcinomas : Shigeishi H, Higashikawa K, Hiraoka M, Mitani Y, Ohta K et al. Oncol Rep. 19: 1557-1564, 2008. (査読有り)

9) Increased expression of CENP-H gene in human salivary gland carcinomas : Shigeishi H, Yoshitsugu M, Ono S, Higashikawa K, Ohta K et al.. *Oral Science International* 5: 43-51, 2008. (査読有り) [学会発表] (計 4 件)

1) candida albicans による歯肉線維芽細胞の Fractalkine (CX3CL1) 発現誘導と機能 : 太田耕司, 西裕美, 他 : 第 62 回日本口腔科学会学会集会 (2009. 6. 6 神奈川)

2) candida albicans による口腔粘膜上皮細胞, 線維芽細胞における Fractalkine (CX3CL1) 発現の検討 : 太田耕司, 西裕美, 他 : 第 63 回日本口腔科学会学会集会 (2009. 4. 16 浜松)

3) candida albicans による口腔粘膜上皮細胞, 線維芽細胞における特異的ケモカイン発現誘導 : 太田耕司, 西裕美, 他 : 第 18 回日本口腔粘膜学会 (2008. 9. 19~20 東京)

4) candida albicans による不死化口腔粘膜上皮細胞, 線維芽細胞における特異的ケモカイン発現誘導 : 太田耕司, 西裕美, 他 : 第 62 回日本口腔科学会学会集会 (2008. 4. 17 福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 耕司 (OHTA KOUJI)

広島大学病院・助教

研究者番号 : 20335681

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :