

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463007

研究課題名(和文) 口腔粘膜細胞から誘導されるヘムオキシゲナーゼ-1の機能とカンジダ症における意義

研究課題名(英文) Function of Heme oxygenase-1 induced from oral mucosal cells and the role for oral candidiasis

研究代表者

太田 耕司 (Kouji, Ohta)

広島大学・病院(歯)・助教

研究者番号：20335681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜はcandidaに対して、ストレス応答を行うことを考えている。口腔粘膜上皮細胞からC. albicans (以下 Ca)によって誘導されるヘムオキシゲナーゼ1 (HO-1) を同定し、その発現誘導について検討した。DNA マイクロアレイによってCa加熱死菌で誘導されるHO-1 を同定した。Ca由来のbeta-glucanはHO-1の発現を誘導した。beta-glucanは細胞内活性酸素を亢進し、Nrf2 の核内移動を亢進した。口腔粘膜上皮細胞からbeta-glucan によって誘導されるHO-1はカンジダ感染におけるストレスに対する防御に重要な役割を担っている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Oral mucosa may regulate stress response against Candida. We focused on Heme oxygenase-1 (HO-1) gene induced by Candida albicans (Ca), and investigated the HO-1 expression oral keratinocytes. We found HO-1 expression induced by heat-killed Ca using a cDNA microarray. beta-glucan derived from Ca increased HO-1 expression in oral keratinocytes. beta-glucans promoted induction of intercellular reactive oxygen species and Nrf2 translocation into nuclei. HO-1 induced by beta-glucan may have an important role in host defense against the stress caused by C. albicans.

研究分野：口腔外科

キーワード：ヘムオキシゲナーゼ1 (HO-1) 口腔粘膜細胞 口腔カンジダ症

1. 研究開始当初の背景

口腔カンジダ症は、*Candida albicans*(以下 Ca) を主な原因菌とする日和見感染症である。Ca は口腔粘膜に付着、定着、侵入するが、それに対して宿主の口腔粘膜は Ca を認識し、そのストレスから防御する初期免疫応答を稼働すると考えられる。しかしながら口腔粘膜が Ca に対して起こす免疫応答に関しては不明な事が多い。申請者らは Ca 細胞壁構成成分の認識による口腔粘膜の免疫防御応答の解明を目的とし、口腔粘膜上皮細胞に Ca 加熱死菌を添加し、発現が誘導される特異的遺伝子をマイクロアレイ法によって網羅的に解析し、24000 個の遺伝子群の中から Ca 加熱死菌により Heme oxygenase-I (HO-1) が誘導されることを発見した。HO-1 は酸化ストレスによって生じた Heme を分解する酵素であり、抗酸化ストレス作用、抗細胞障害作用など多彩な防御作用をもつ抗ストレス遺伝子であることが知られている。一方、酸化ストレスは活性酸素種(ROS)が産生され障害を発現する作用と、障害を修復する作用との均衡が崩れた状態として定義され、粘膜疾患の増悪因子として知られている。これらの結果は口腔粘膜上皮細胞が何らかの Ca 構成成分を認識することで、HO-1 を誘導し、Ca 感染で生じる酸化ストレスのような細胞障害を防御している可能性を示唆している。しかしながら口腔粘膜細胞における HO-1 の発現やその機能に関しては不明である。今回の研究の目的は、口腔粘膜細胞が Ca の構成成分を認識し、口腔粘膜防御機構としての HO-1 発現誘導される機構を解析し、さらに *Candida* 症における HO-1 の役割を検討する。

2. 研究の目的

口腔粘膜細胞における HO-1 の発現やその機能に関しては不明である。今回の研究の目的は、口腔粘膜細胞が Ca の構成成分を認識し、口腔粘膜防御機構としての HO-1 発現誘導されるメカニズムと HO-1 の役割を検討する。

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って不死化させた口腔粘膜上皮細胞 RT7、初代培養の正常口腔粘膜上皮細胞を用いた。表皮角化基本培地 (Lonza 社)で培養を行った。

2) 菌株の調整

Ca、*C.grabrata*、*C.tropicaris* は Sabouraud 培地で培養を行った。*S.aureus*、*E.coli* は BHI 培地にて培養した。酵母 beta-glucan は WGP Dispresable (Invivogen 社)を用いた。

3) 加熱死菌の作成と Ca 構成成分の抽出

Candida 属、*S.aureus*、*E.coli* を培養し、Midorikawa らの方法によって加熱死菌を作成した。さらに Ca を大量培養し、Nishini らの方法によって細胞壁構成成分である beta-glucan を抽出した。また Shinoda らの方法によって細胞壁構成成分である mannan を抽出した。

4) 口腔粘膜上皮細胞における Ca 加熱死菌によって誘導される遺伝子の同定

RT7 に Ca 加熱死菌を添加、非添加後の RNA を抽出し、マイクロアレイ (ロシュ社)を行い、24000 個の遺伝子群の変化を網羅的に検出した。

5) HO-1 の定常状態の発現と局在

RT7、正常口腔粘膜上皮細胞をコンフルエントに培養し、RNA を抽出、cDNA を合成し、HO-1mRNA の発現を検討した。RT7 をコンフルエントに培養し、HO-1 抗体にて免疫組織化学染色を行い、HO-1 蛋白の細胞内局在を検討した。

6) *Candida* 加熱死菌、Ca 構成成分による HO-1 の発現誘導の解析

RT7 に Ca 生菌、*Candida* 属、*S. aureus*、*E. coli* の加熱死菌、Ca から抽出した beta-glucan、mannan を添加培養し、RNA を抽出、cDNA を合成し、HO-1mRNA の発現を Real time-PCR 法で検討した。また同様に全蛋白を抽出し、HO-1 蛋白の発現を Western blotting 法で検討

した。

7) Ca 加熱死菌, beta-glucan による酸化ストレスの解析

Ca 加熱死菌, Ca beta-glucan, 酵母 beta-glucan を添加し, 生体内活性酸素種(Reactive oxygen species; ROS) の亢進を DCF-DA 法で, 活性酸素分解酵素である Super oxide dismutase (SOD) の発現を Western blotting 法にて検討した。

8) Ca 加熱死菌, beta-glucan による酸化ストレス関連転写因子の活性化

ROS の前段階でおこる NADPH oxidase の活性化を検討するために, NADPH オキシダーゼ阻害剤である Apocynin (APO),

Diphenyleneiodonium (DPI) の前処理による

Ca 加熱死菌, Ca beta-glucan, 酵母 beta-glucan 誘導性の HO-1 の発現の影響を Real-time

PCR 法で検討した。また RT7 に Ca 加熱死菌, Ca beta-glucan, 酵母 beta-glucan 添加後の細胞質画分, 細胞膜画分を抽出し, 各画分における p47-phox 蛋白の発現を Western blotting 法にて検討した。また酸化ストレス転写因子である Nrf2 の転写を検討するために RT7 に Ca 加熱死菌, Ca beta-glucan, 酵母 beta-glucan 添加後の核画分を抽出し, 核画分における Nrf2 蛋白の発現と局在を Western blotting 法, 細胞免疫蛍光染色にて検討した。

9) Ca 加熱死菌, beta-glucan によって誘導される HO-1 に対する Nrf2 の影響

RT7 に Nrf2 の特異的 siRNA を添加し, Nrf2 が抑制されることを Real-time PCR で確認した。Nrf2 の特異的 siRNA を添加し, 48 時間後に Ca 加熱死菌, Ca beta-glucan, 酵母 beta-glucan を添加し, HO-1 蛋白の発現を Western blotting 法で検討した。

4. 研究成果

1) 口腔粘膜上皮細胞における Ca 加熱死菌によって誘導される遺伝子の同定

解析を行った 24,000 個の遺伝子群の中で, Ca 加熱死菌添加群が非添加群と比較して 8

倍以上の発現が認められた遺伝子は 33 個, そのうち偽遺伝子を除くと 9 個の遺伝子が認められた。また, 8 倍以上の発現の減少が認められた遺伝子は 2 個であった。8 倍以上の発現の増加, 減少が認められた遺伝子の Ca 生菌・加熱死菌添加による発現の変化を Real Time RT-PCR 法によって確認した。この結果, Ca 生菌・加熱死菌の添加により発現の増加が認められたストレス応答蛋白である HO-1 を同定した。

2) HO-1 の定常状態の発現と局在

RT7, 正常口腔粘膜細胞において定常状態における HO-1 mRNA の発現が示された。また HO-1 は細胞内に発現していることが認められた。

3) Candida 加熱死菌, Ca 構成成分による HO-1 の発現誘導の解析

Ca 生菌, Candida 属加熱死菌の添加によって HO-1 mRNA の発現誘導が著しく増加した。Ca beta-glucan の添加によって HO-1 の mRNA の発現は増加したが, mannan や, *S. aureus*, *E. coli* 加熱死菌の添加による HO-1 mRNA の発現誘導はみられなかった。Ca 加熱死菌, beta-glucan の添加は HO-1 蛋白の発現誘導を増加した。

4) Candida 加熱死菌, beta-glucan による酸化ストレスの解析

Ca 加熱死菌, beta-glucan 誘導性の HO-1 は NADPH 阻害剤によって有意に抑制された。また Ca 加熱死菌, beta-glucan の添加により短時間で細胞内における ROS の亢進が示された。ROS はその後減少した。また SOD の発現誘導の増加が認められた。

5) Candida 加熱死菌, beta-glucan による酸化ストレス関連転写因子の活性化

Ca 加熱死菌, beta-glucan の添加により p47-phox 蛋白の細胞質から細胞膜画分への移動が確認された。さらに Ca 加熱死菌, beta-glucan の添加により Nrf2 の核内における発現が増加した。

6) Ca 加熱死菌, beta-glucan によって誘導される HO-1 に対する Nrf2 の影響

Nrf2 の特異的 siRNA は Nrf2 の発現を抑制した Nrf2siRNA のノックダウンはコントロール si と比較して Ca 加熱死菌, beta-glucan で誘導される HO-1 蛋白の発現誘導が抑制された。

以上の結果から, 口腔粘膜上皮細胞は Ca の感染によって構成成分である beta-glucan を認識し, 細胞内 ROS の産生が亢進, Nrf2 経路を介して HO-1 が誘導されることが示唆された。beta-glucan で誘導される HO-1 はカンジダ感染によって生じる酸化ストレスに対して宿主防御に重要な役割を担っている可能性がある。

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 12 件)

1) Professional oral health care reduces the duration of hospital stay in patients undergoing orthognathic surgery. Shigeishi H, Rahman MZ, Ohta K, Ono S, Sugiyama M, Takechi M. Biomed Rep 4:180-188, 2016. (査読あり)

2) Higher prevalence and gene amplification of HPV16 in oropharynx as compared to oral cavity. Shigeishi H, Sugiyama M, Ohta K, Rahman MZ, Takechi M. J Appl Oral Sci 24: 397-403, 2016. (査読あり)

3) Combined effects of melatonin and FGF-2 on mouse preosteoblast behavior within interconnected porous hydroxyapatite ceramics - in vitro analysis. Rahman MZ, Shigeishi H, Sasaki K, Ota A, Ohta K, Takechi M. J Appl Oral Sci 24: 153-161, 2016. (査読あり)

4) Effects of Apatite Cement Containing Atelocollagen on Attachment to and Proliferation and Differentiation of MC3T3-E1 Osteoblastic Cells. Takechi M, Ninomiya Y, Ohta K, Tada M, Sasaki K, Rahman MZ, Ohta A, Tsuru K,

Ishikawa K. Materials 9: 283, 2016. doi:10.3390/ma9040283. (査読あり)

5) Preoperative oral health care reduces postoperative inflammation and complications in oral cancer patients. Shigeishi H, Ohta K, Fujimoto S, Nakagawa T, Mizuta K, Ono S, Shimasue H, Ninomiya Y, Higashikawa K, Tada M, Ishida F, Okui G, Okumura T, Fukui A, Kubozono K, Yamamoto K, Ishida Y, Seino S, Hashikata M, Sasaki K, Naruse T, Rahman MZ, Uetsuki R, Nimiya A, Takamoto M, Dainobu K, Tokikazu T, Nishi H, Sugiyama M, Takechi M. Exp Ther Med 12: 1922-1928, 2016. (査読あり)

6) Risk factors for postoperative complications following oral surgery. Shigeishi H, Ohta K, Takechi M. J Appl Oral Sci 23:419-423, 2015(査読あり).

7) CD44high/ALDH1 high head and neck squamous cell carcinoma cells exhibit mesenchymal characteristics and GSK3-dependent cancer stem cell properties. Seino S, Shigeishi H, Hashikata M, Higashikawa K, Tobiume K, Okui G, Yamamoto K, Uetsuki R, Ishida Y, Sasaki K, Naruse T, Rahman MZ, Nimiya A, Ono S, Ohta K, Sugiyama M, Takechi M. J Oral Pathol Med 45:180-188, 2015. (査読あり)

8) Zoledronate inhibits receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand-induced osteoclast differentiation via suppression of expression of nuclear factor of activated T-cell and carbonic anhydrase 2. Nakagawa T, Ohta K, Kubozono K, Ishida Y, Naruse T, Takechi M, Kamata N. Arch Oral Biol 60:557-65, 2015. (査読あり)

9) Clinicopathological analysis of salivary gland carcinomas and literature review. Shigeishi H, Ohta K, Okui G, Seino S, Hashikata M, Yamamoto K, Ishida Y, Sasaki K, Naruse T, Rahman MZ, Uetsuki R, Nimiya A, Ono S,

Shimasue H, Higashikawa K, Sugiyama M, Takechi M. Mol Clin Oncol 3:202-206, 2015. (査読あり)

10) Itraconazole inhibits TNF- α -induced CXCL10 expression in oral fibroblasts. Ohta K, Ishida Y, Fukui A, Nishi H, Naruse T, Takechi M, Kamata N. Oral Dis 21: 106-112, 2015. (査読あり)

11) Expression and function of RIG-I in oral keratinocytes and fibroblasts. Ohta K, Fukui A, Shigeishi H, Ishida Y, Nishi H, Tobiume K, Takechi M, Kamata N. Cell Physiol Biochem 34:1556-1565, 2014. (査読あり)

12) Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated IL-8 production by human submandibular gland epithelial cells. Ohta K, Ishida Y, Fukui A, Mizuta K, Nishi H, Takechi M, Kamata N. Mol Med Rep 10:2377-2382, 2014. (査読あり)

〔学会発表〕(計 18 件)

1) 口腔粘膜細胞における細胞内受容体の活性化とヘルペス由来 DNA の認識. 鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子, 西裕美, 重石英生, 武知正晃. 第 61 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 幕張, 11/26, 2016.

2) 口腔粘膜上皮細胞における Candida により誘導される IL-8 の伝達経路と HO-1 の制御機能. 加藤大喜, 太田耕司, 石田陽子, 鳴瀬貴子, 福井暁子, 西裕美, 武知正晃. 第 26 回日本口腔内科学会, 第 29 回日本口腔診断学会 合同学術大会, 岡山, 9/24, 2016.

3) エナメル上皮腫由来不死化細胞株の樹立と TNF- α による骨吸収因子の発現. 鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子, 西裕美, 重石英生, 武知正晃. 第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会学術大集会, 福岡, 4/15, 2016.

16) 口腔粘膜細胞におけるヘルペス由来 DNA の認識に關与する細胞内受容体の局在と TNF- α による調節機構. 鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 加藤大喜, 福井暁子, 西裕

美, 重石英生, 武知正晃. 第 26 回日本口腔内科学会, 第 29 回日本口腔診断学会 合同学術大会, 岡山, 9/24, 2016.

4) 口腔粘膜上皮細胞における Candida albicans による IL-8 の発現誘導と HO-1 の制御機能. 石田陽子, 太田耕司, 鳴瀬貴子, 福井暁子, 加藤大喜, 西裕美, 武知正晃. 第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会学術大集会, 福岡, 4/15, 2016.

5) 口腔粘膜細胞におけるヘルペス由来 DNA の認識と炎症調節機構. 鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子, 西裕美, 重石英生, 武知正晃. 第 60 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 名古屋, 10/16, 2015.

6) *C.albicans* によって口腔粘膜上皮細胞から誘導される Heme oxygenase-1 の炎症制御機能. 石田陽子, 太田耕司, 鳴瀬貴子, 福井暁子, 西裕美, 武知正晃. 第 60 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 名古屋, 10/16, 2015.

7) 口腔粘膜上皮細胞におけるヘルペス由来 DNA の細胞内受容体を介した認識と NF-kb. 鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子, 西裕美, 重石英生, 武知正晃. 第 25 回日本口腔内科学会学術大会, 大阪, 9/18, 2015.

8) 口腔粘膜上皮細胞から Candida albicans beta-glucan によって誘導される Heme oxygenase-1 と炎症性遺伝子発現の制御. 石田陽子, 太田耕司, 鳴瀬貴子, 福井暁子, 西裕美, 武知正晃. 第 25 回日本口腔内科学会学術大会, 大阪, 9/18, 2015.

9) 口腔粘膜細胞における細胞内受容体を介したヘルペス由来 DNA の認識と CXCL10 の発現誘導. 鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子, 西裕美, 重石英生, 武知正晃. 第 69 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 大阪, 5/13, 2015.

10) 口腔粘膜上皮細胞における *Candida albicans* による ROS/p38MAPK/Nrf2 を介した Heme oxygenase-1 の発現誘導と機能. 石田陽子, 太田耕司, 鳴瀬貴子, 福井暁子,

西裕美, 奥井岳, 武知正晃. 第 69 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 大阪, 5/13, 2015.

11) 口腔粘膜細胞おけるヘルペス由来 DNA による NF- κ B の活性化と炎症性遺伝子の発現誘導. 鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子, 西 裕美, 重石英生, 武知正晃. 第 51 回日本口腔組織培養学会, 北九州, 11/15, 2014.

12) 口腔粘膜上皮細胞, 線維芽細胞おけるヘルペス由来 DNA による NF- κ B の活性化と炎症性ケモカインの発現誘導, 鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子, 西 裕美, 重石英生, 武知正晃. 第 24 回日本口腔内科学会/第 27 回日本口腔診断学会合同学術大会, 福岡, 9/19, 2014.

13) 口腔粘膜上皮細胞, 線維芽細胞おけるヘルペス由来 DNA による炎症性ケモカインの発現. 鳴瀬貴子, 太田耕司, 石田陽子, 福井暁子, 西 裕美, 重石英生, 武知正晃. 第 68 回日本口腔科学会, 東京, 5/8, 2014.

14) 口腔粘膜上皮細胞における Candida albicans による ROS/p38MAPK/Nrf2 を介した Hemeoxygenase-1 の発現誘導. 石田陽子, 太田耕司, 福井暁子, 西 裕美, 奥井 岳, 鳴瀬貴子, 武知正晃. 第 51 回日本口腔組織培養学会学術大会, 北九州, 11/15, 2014.

15) 口腔粘膜上皮細胞における Candida albicans による Hemeoxygenase-1 誘導とシグナル伝達. 石田陽子, 太田耕司, 福井暁子, 西裕美, 奥井岳, 鳴瀬貴子, 武知正晃. 第 59 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 千葉, 10/17, 2014.

16) 口腔粘膜上皮細胞における Candida albicans による ROS-Nrf2 経路を介した Hemeoxygenase-1 の発現誘導. 石田陽子, 太田耕司, 鳴瀬貴子, 福井暁子, 西裕美, 奥井岳, 武知正晃. 第 24 回日本口腔内科学会/第 27 回日本口腔診断学会合同学術大会, 福岡, 9/18, 2014.

17) Heme oxygenase-1 expression induced by

Candida albicans in oralkeratinocytes. Yoko Ishida, Kouji Ohta, Takako Naruse, Akiko Fukui, Hiromi Nishi, Gaku Okui, Masaaki Takech. 第 47 回広島大学歯学会総会, 広島, 6/21, 2014.

6. 研究組織

(1)研究代表者

太田耕司 (KOUJI OHTA)

広島大学, 病院, 助教, 研究者番号: 20335681

(2)研究分担者

武知正晃 (MASAAKI TAKECHI)

広島大学, 医歯薬学研究院 (歯), 准教授, 助教, 研究者番号: 00304535

重石英生 (HIDEO SHIGEISHI)

広島大学, 医歯薬学研究院 (歯), 助教, 研究者番号: 90397943