

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10179

研究課題名(和文) 口腔粘膜の新規カンジダ細胞壁成分認識受容体の機能解析と口腔カンジダ症における意義

研究課題名(英文) Functional analysis of new receptor that recognize Candida cell wall component in oral mucosa and its significance in oral candidiasis

研究代表者

太田 耕司 (Ohta, Kouji)

広島大学・医系科学研究科(歯)・教授

研究者番号：20335681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CEACAM1は癌胎児性抗原関連細胞接着分子ファミリー受容体である。口腔粘膜上皮細胞のCEACAM1が、Candida細胞壁構成成分を認識し、免疫応答に関連しているかは不明である。

今回の研究によって口腔粘膜上皮細胞へのC. albicans由来の β -glucanの添加によってCEACAM1の発現が増加すること、CEACAM1が β -glucanで誘導されるHO-1発現調節に関与することを明らかにした。口腔粘膜上皮細胞のCEACAM1がCandida albicans感染時のHO-1の調節に関連する免疫応答に重要な役割をもっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔粘膜上皮細胞における癌胎児性抗原関連細胞接着分子ファミリー受容体CEACAM1が、Candida感染に対する免疫応答に関連しているかは不明とされている。

今回の研究によって国内外で初めて口腔粘膜上皮細胞へのC. albicans生菌、加熱死菌、C. albicans由来の β -glucanの添加によってCEACAM1の発現が増加すること、CEACAM1が β -glucanで誘導されるHO-1発現調節に関与することを明らかにした。口腔粘膜上皮細胞のCEACAM1がCandida albicans感染時のHO-1の調節に関連する免疫応答に重要な役割をもっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) is a receptor of member of the carcinoembryonic antigen family. it is unclear whether CEACAM1 in oral keratinocytes recognizes Candida cell wall component and that participates in host immune response against Candida albicans.

From this study, we found that expression of CEACAM1 in oral keratinocytes was increased by β -glucan derived from Candida albicans. Furthermore, CEACAM1 in oral keratinocytes was associated with regulation of β -glucan-induced HO-1. CEACAM1 in oral keratinocytes may have a critical role in regulation of HO-1 for host immune defense during Candida infection.

研究分野：外科系歯学

キーワード：Candida albicans CEACAM1 口腔粘膜上皮細胞

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) を主な原因菌とする日和見感染症である。

Ca は口腔粘膜上皮に付着し、増殖しながら上皮組織に侵入し、損傷する。一方、口腔粘膜上皮を構成する口腔粘膜上皮細胞は Ca の侵入に対して Ca を認識し、宿主防御応答を稼働すると考えられている。

β -glucan は、*Candida* や酵母の主要な細胞壁構成成分である。 β -glucan は *Candida* 細胞壁の内層を構成しているが、*Candida* のバイオフィーム形成時に細胞壁表面に露出される。また、 β -glucan は、Dectin-1 や TLR2 などの β -glucan 受容体を介して単球やマクロファージなどの免疫細胞の免疫応答を活性化することが知られている。これまでの我々の研究成果により、 β -glucan 顆粒が ROS/p38MAPK/Nrf2 を介して口腔粘膜上皮細胞のストレス応答遺伝子、Heme oxygenase-1 (HO-1) の発現を増加させ、Ca 感染によって生じる細胞内酸化ストレスに対する宿主防御に関連することを明らかにした。口腔粘膜上皮細胞では Dectin-1 や TLR2 などの β -glucan 受容体が発現していることが知られているが、口腔粘膜上皮細胞においてこれらの受容体をノックダウンしても、 β -glucan による HO-1 の発現には影響を与えなかった。口腔粘膜上皮細胞においてこれらの受容体をノックダウンしても、 β -glucan による HO-1 の発現には影響を与えなかった。よって、口腔粘膜上皮細胞における HO-1 の発現誘導に影響を与える β -glucan に関連する受容体に関しては、いまだ不明である。

一方、CEACAM1 は、免疫応答や細胞接着、がん細胞における増殖やアポトーシスに関連したさまざまなシグナル伝達過程に影響を与える細胞間コミュニケーションに関与していることが報告されている。また、CEACAM1 はさまざまな微生物病原体の細胞受容体としても知られており、結合する微生物として淋菌、*Moraxella catarrhalis*、*Haemophilus influenzae* などが報告されている。しかしながら、口腔粘膜上皮細胞における CEACAM1 が、*Candida* 細胞壁構成成分を認識し、免疫応答に関連しているか否かは明らかではない。本研究では口腔粘膜における CEACAM1 を介した免疫応答機構を明らかにする。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は口腔粘膜上皮細胞における CEACAM1 を介した新規免疫応答機構を明らかにするために、口腔粘膜上皮細胞における Ca と *Candida* 細胞壁構成成分 β -glucan によって誘導される CEACAM1 の発現を調べた。 β -glucan によって誘導される HO-1 の発現に関与する細胞間シグナル伝達経路への CEACAM1 の影響を検討する。

3. 研究の方法

1) 研究に用いた細胞、*Candida* 属真菌

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 を用いた。培養は表皮角化基本培地で行った。

Candida 属真菌は Ca.IFO1385 を Sabouraud 培地にて培養し、生菌、加熱死菌として用いた。

2) 研究に用いた β -glucan

Ca.IFO1385 から Nishiri らの方法を用いてホットアルカリ法にて β -glucan を抽出した。酵母 β -glucan は Invivogen 社の *S. cerevisiae* β -glucan を用いた。

3) 口腔粘膜上皮細胞における CEACAM1 の局在

チャンバースライドに RT7 を播種し、サブコンフルエントまで培養後、パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液による固定、膜透過処理を行った後、膜透過処理、ブロッキングを行い、CEACAM1 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。

4) CEACAM1 の発現誘導に対する Ca 生菌、加熱死菌の影響

RT7 に Ca 生菌、加熱死菌を添加培養後、RNA を抽出し、逆転写酵素によって、逆転写した cDNA をテンプレートに、Real-time PCR を行い、CEACAM1 mRNA の発現誘導を検討した。

5) CEACAM1 の発現誘導に対する β -glucan、の影響

RT7 に Ca β -glucan、*S. cerevisiae* β -glucan を添加培養後、RNA を抽出し、逆転写酵素によって、逆転写した cDNA をテンプレートに、Real-time PCR を行い、CEACAM1 mRNA の発現誘導を検討した。RT7 に Ca β -glucan 添加培養後、全タンパクを抽出し、電気泳動後、CEACAM1 抗体を用いた Western blotting を行った。

6) β -glucan で誘導される HO-1 に対する CEACAM1 の影響

リポフェクタミン法により、RT7 に CEACAM1 si RNA をトランスフェクションし、CEACAM1 ノックダウン細胞を作製した。CEACAM1 ノックダウン細胞に Ca β -glucan を添加培養後、RNA を抽出し、Real-time PCR を行い、HO-1 mRNA の発現誘導を検討した。同様に RT7 に CEACAM1 中和抗体で前処理を行った後、Ca β -glucan を添加培養後、Real-time PCR を行い、HO-1 mRNA の発現誘導を検討した。

7) β -glucan で誘導される HO-1 に対する酸化ストレスの影響

DCFDA 法による活性酸素種(ROS)を測定した。CEACAM1 ノックダウン細胞に Ca β -glucan を添加培養後、2',7'-Dichlorofluorescein diacetate を添加、洗浄後、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて蛍光度を測定した。

8) β -glucan で誘導される HO-1 に対する酸化ストレスシグナルの影響

CEACAM1 ノックダウン細胞に Ca β -glucan 添加培養後、全蛋白、核タンパクを抽出し、電気泳動後、Nrf2 抗体を用いた Western blotting を行った。

4. 研究成果

1) RT7 における CEACAM1 の局在を検討した結果、細胞内における CEACAM1 蛋白の局在が認められた。

2) CEACAM1 の発現誘導に対する Ca 生菌、加熱死菌の影響を検討した結果、生菌、加熱死菌の添加によって CEACAM1 mRNA の発現誘導が示された。

3) CEACAM1 の発現誘導に対する β -glucan、の影響を検討した結果、Ca β -glucan、*S. cerevisiae* β -glucan の添加によって CEACAM1 mRNA の発現誘導が示された。また Ca β -glucan の添加によって CEACAM1 蛋白の発現誘導が認められた。

4) β -glucan で誘導される HO-1 に対する CEACAM1 の影響を検討した結果、コントロール siRNA 導入細胞と比較し、CEACAM1 ノックダウン細胞では Ca β -glucan で誘導される HO-1 の発現が減少した。同様に CEACAM1 中和抗体で前処理を行った細胞は、コントロール IgG での前処理した細胞と比較して Ca β -glucan で誘導される HO-1 の発現が減少した。

5) β -glucan で誘導される HO-1 に対する酸化ストレスの影響を検討した結果、コントロール siRNA 導入細胞と比較し、CEACAM1 ノックダウン細胞では Ca β -glucan で亢進する細胞内 ROS が減少した。

6) β -glucan で誘導される HO-1 に対する酸化ストレスシグナルの影響を検討した結果、コントロール siRNA 導入細胞と比較し、CEACAM1 ノックダウン細胞では Ca β -glucan で増加する

核内 Nrf2 の発現 が減少した .

本研究によって ,1) 口腔粘膜上皮細胞において CEACAM1 が定常的に発現していること 2) Ca 生菌 ,加熱死菌 ,Ca の細胞壁構成成分である β -glucan によって CEACAM1 の発現が誘導されること ,3) CEACAM1 が β -glucan によって活性化される ROS/Nrf2 シグナルを介した HO-1 の発現誘導にに關係していることが示唆された .

CEACAM1 が β -glucan によって誘導される HO-1 の調節に關連する免疫応答に重要な役割をもっていることが示唆された . 今後さらに CEACAM1 の β -glucan 受容体としての役割を検討している .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakuma M, Ohta K, Fukada S, Akagi M, Kato H, Ishida Y, Naruse T, Takechi M, Shigeishi H, Nishi H, Aikawa T.	4. 巻 30
2. 論文標題 Effects of CEACAM1 in oral keratinocytes on H0-1 expression induced by Candida -glucan particles.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Applied Oral Science	6. 最初と最後の頁 e20220158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1590/1678-7757-2022-0158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakuma M, Ohta K, Fukada S, Kato H, Naruse T, Nakagawa T, Shigeishi H, Nishi H, Takechi M.	4. 巻 30
2. 論文標題 Expression of anti-fungal peptide, -defensin 118 in oral fibroblasts induced by C. albicans -glucan-containing particles.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Applied Oral Science	6. 最初と最後の頁 e20210321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1590/1678-7757-2021-0321.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐久間美雪，太田耕司，加藤大喜，福井暁子，鳴瀬貴子，重石英生，武知正晃
2. 発表標題 口腔粘膜上皮細胞における Candida albicans 細胞壁構成成分による CEACAM1 の発現誘導と認識機能
3. 学会等名 第74回 NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐久間美雪，太田耕司，加藤大喜，鳴瀬貴子，石田陽子，福井暁子，
2. 発表標題 Candida albicans 感染における CEACAM1 による Candida 細胞壁構成成分の認識
3. 学会等名 第33回日本口腔診断学会・第30回日本口腔内科学会・第13回日本口腔検査学会 合同学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐久間美雪, 太田耕司, 加藤大喜, 鳴瀬貴子, 石田陽子, 福井暁子, 重石英生, 武知正晃
2. 発表標題 口腔粘膜上皮細胞の CEACAM1 による Candida 細胞壁構成成分の認識
3. 学会等名 第65回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

〔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	武知 正晃 (Takechi Masaaki) (00304535)	独立行政法人国立病院機構(呉医療センター臨床研究部)・ その他部局等・医師 (85402)	
研究分担者	西 裕美 (Nishi Hiromi) (70403558)	広島大学・病院(歯)・助教 (15401)	
研究分担者	重石 英生 (Shigeishi Hideo) (90397943)	広島大学・医系科学研究科(歯)・講師 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------