

論 文 内 容 要 旨

Candida albicans によって口腔粘膜上皮細胞から
誘導される Heme oxygenase-1 の発現と機能

応用生命科学部門 歯科放射線学

(主指導教員：谷本 啓二教授)

基礎生命科学部門 口腔顎顔面病態病理学

(副指導教員：宮内 睦美准教授)

応用生命科学部門 口腔外科学

(副指導教員：武知 正晃准教授)

氏名 石田 陽子

(医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻)

口腔カンジダ症は口腔常在菌である *Candida* 属の *Candida albicans* (Ca) によって惹起される日和見感染症である。Ca は口腔粘膜に付着し、粘膜を障害する性質を持っている。これに対して口腔粘膜は、Ca を認識し何らかのストレス応答を行っていることが考えられる。一方、Heme oxygenase-1 (HO-1) はストレス応答蛋白として報告され、様々なストレスによって誘導され、炎症の抑制に機能することが報告されているが、口腔粘膜上皮細胞における HO-1 の発現と機能に関する報告は不明である。今回、Ca による口腔粘膜のストレス応答機構を明らかにするために、Ca によって口腔粘膜上皮細胞から誘導される遺伝子群を網羅的に解析し同定した HO-1 の発現誘導とその機能について検討した。

最初に、口腔粘膜上皮細胞に Ca が感染した際に誘導される特異的遺伝子を検索するために、培養した Ca から加熱死菌を調整し、不死化口腔粘膜上皮細胞(RT7)に添加した後、細胞を回収、マイクロアレイによって誘導される遺伝子の網羅的解析を行った。8 倍以上の発現の増加が認められた遺伝子群の中から Ca 生菌、加熱死菌によって発現の増加が認められたストレス応答蛋白である HO-1 に焦点をあてた。

最初に、口腔粘膜上皮細胞における HO-1 の発現と局在を検討した。健常者の頬粘膜より擦過した細胞から抽出した RNA を用いて cDNA を作製し、HO-1mRNA の発現を検討した結果、頬粘膜細胞から HO-1mRNA の発現が認められた。口腔粘膜上皮細胞、口腔粘膜上皮組織における HO-1 蛋白の免疫染色を行った結果、上皮細胞の細胞質内における HO-1 蛋白の発現を認めた。

次に *Candida* 属や他菌種の加熱死菌添加による HO-1 の発現誘導を検討した結果、*Candida* 属の加熱死菌の添加によって HO-1 の発現誘導が認められた。一方 *S.aureus* などの他菌種の加熱死菌、炎症性サイトカインの添加では HO-1 の発現誘導は認められなかった。HO-1 を誘導する Ca 構成成分の解析を行うため、Ca 培養液から抽出した β -glucan, mannan などの細胞壁構成成分、酵母 β -glucan を用いて、HO-1 を誘導する真菌構成成分の解析を行った。その結果、Ca, 酵母の β -glucan の添加によって HO-1 の発現誘導が認められた。このことから、HO-1 は真菌特異的な構成成分である β -glucan の添加によって口腔粘膜上皮細胞から誘導されることが明らかとなった。

HO-1 は酸化ストレス誘発因子によって誘導されることが報告されている。Ca 加熱死菌、 β -glucan によって細胞内に酸化ストレスの亢進が誘導されると仮説をたて、細胞内活性酸素種 (ROS) の亢進を DCF-DA 法を用いて解析した。この結果、Ca 加熱死菌、 β -glucan 添加 1 時間後に細胞内 ROS の産生が亢進した。また ROS の前段階でおこる NADPH オキシダーゼの活性化を検討するため、p47-phox 蛋白の発現に対する β -glucan の影響を検討した結果、p47-phox 蛋白の細胞膜における細胞質から細胞膜画分への移動が確認され、 β -glucan の添加によって細胞内の酸化ストレスが亢進することが示唆された。

β -glucan で誘導される HO-1 発現に関与するシグナル伝達経路を解析するため、各種

シグナル伝達阻害剤で前処理を行い、 β -glucan で誘導される HO-1 の発現を検討した。その結果、p38MAPK 阻害剤によって β -glucan で誘導される HO-1 の発現誘導が抑制された。さらに β -glucan 添加によって p38 蛋白のリン酸化が認められ、このリン酸化は NADPH オキシダーゼ阻害剤の処理によって抑制された。このことから、 β -glucan による細胞内の ROS の亢進が p38MAPK を活性化させていることが示唆された。

Nrf2 は酸化ストレス応答を担う重要な転写因子で、細胞内酸化ストレスの亢進によって核内へ移行することで抗酸化遺伝子が発現誘導されることが報告されている。 β -glucan を添加した際の核内中の Nrf2 の発現を検討した結果、核内の Nrf2 の発現が増加し、この増加は p38MAPK 阻害剤によって抑制された。さらに SiRNA を用いた Nrf2 ノックダウン細胞による HO-1 発現の影響を検討した結果、Nrf2 をノックダウンすることで β -glucan で誘導される HO-1 の発現誘導が抑制された。これらの結果から β -glucan により p38MAPK が活性化され、Nrf2 の核内移動がおこり、HO-1 が誘導されることが明らかになった。HO-1 は酸化ストレスに影響を与えることが報告されている。 β -glucan で誘導される ROS に対する HO-1 の影響を検討するため、SiRNA を用いた Nrf2, HO-1 ノックダウンによる ROS の産生の影響を検討した結果、Nrf2, HO-1 をノックダウンすることで親株と比較して β -glucan で誘導される ROS の産生が増加した。これにより Nrf2, HO-1 が酸化ストレスの抑制に関与している可能性が示唆された。

HO-1 はサイトカインなどで誘導される炎症性遺伝子の制御を行っていることが報告されている。Ca で誘導される炎症性遺伝子の発現誘導に対する HO-1 の影響を検討するため、SiRNA を用いた HO-1 ノックダウンによる Ca で誘導される IL-8 の発現誘導の影響を検討した。この結果、HO-1 をノックダウンすることで *Candida* 属の生菌、 β -glucan で誘導される IL-8 の発現が親株と比較してさらに増加した。

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 β -glucan を認識し、細胞内 ROS の産生が亢進し、p38MAPK/Nrf2 経路を介して HO-1 が誘導されることが示唆された。また HO-1 は酸化ストレス、炎症性遺伝子の制御に関与している可能性が示唆された。