

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 歯 学 )	氏名	石田 陽子
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
<p>論 文 題 目</p> <p><i>Candida albicans</i> 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</p>			
<p>論文審査担当者</p> <p>主 査 杉山 勝 教授 印</p> <p>審査委員 高田 隆 教授</p> <p>審査委員 菅井 基行 教授</p>			
<p>〔論文要旨〕</p> <p>口腔カンジダ症の原因菌である <i>Candida albicans</i> は口腔粘膜に付着し、障害する性質を持っている。これに対して口腔粘膜は、<i>C. albicans</i> を認識し何らかのストレス応答を行っていると考えられる。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。</p> <p>今回、<i>C. albicans</i> 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、<i>C. albicans</i> 加熱死菌によって口腔粘膜上皮細胞から誘導される遺伝子群をマイクロアレイによって網羅的に解析し、同定した HO-1 の発現誘導とその機能について検討した。</p> <p>口腔粘膜上皮細胞に <i>C. albicans</i> 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 <i>C. albicans</i> 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、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 <i>C. albicans</i> 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結果、頬粘膜細胞から HO-1 mRNA の発現と口腔粘膜上皮組織における HO-1 蛋白の発現を認めた。次に <i>Candida</i> 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、<i>Candida</i> 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が、他菌種の加熱死菌の添加では HO-1 の発現誘導は認められなかった。</p> <p>次に HO-1 を誘導する <i>C. albicans</i> 構成成分の解析を行うため、<i>C. albicans</i> 培養液</p>			

から抽出した  $\beta$ -glucan, mannan などの細胞壁構成成分, 酵母  $\beta$ -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, *C. albicans*, 酵母の  $\beta$ -glucan の添加によって HO-1 の発現誘導が認められた。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。*C. albicans*  $\beta$ -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,  $\beta$ -glucan 添加によって 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に関与する p47-phox 蛋白の細胞膜における発現をウエスタンブロッティング法にて検討した結果, p47-phox 蛋白の細胞質から細胞膜画分への移動が確認され,  $\beta$ -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。 $\beta$ -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, 各種シグナル伝達障害剤で前処理を行い,  $\beta$ -glucan で誘導される HO-1 の発現を検討した。その結果, p38MAPK 障害剤によって  $\beta$ -glucan で誘導される HO-1 の発現誘導が抑制された。さらに  $\beta$ -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 オキシダーゼ障害剤の処理によって抑制された。このことから,  $\beta$ -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し抗酸化遺伝子の発現を調節することが報告されている。 $\beta$ -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 障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 を欠損させることで  $\beta$ -glucan で誘導される HO-1 の発現誘導が抑制された。また 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 を欠損させることで親株と比較して  $\beta$ -glucan で誘導される ROS の産生が増加した。この結果から, 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, 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。*C. albicans* 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, HO-1 ノックダウンによる *C. albicans* 生菌,  $\beta$ -glucan で誘導される IL-8 の発現を ELISA 法にて解析した。その結果, HO-1 を欠損させることで *Candida* 属の生菌,  $\beta$ -glucan で誘導される IL-8 の発現が親株と比較して増加した。この結果から, HO-1 は *C. albicans* で誘導される IL-8 の制御に関与していることが示唆された。

以上の結果から, 口腔粘膜上皮細胞は *C. albicans* 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, p38MAPK/Nrf2 経路を介して HO-1 を誘導することを明らかにした。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。よって審査委員会委員全員は, 本論文が著者に博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。