

論文内容要旨

口腔粘膜上皮細胞における CEACAM1 による
Candida 細胞壁構成成分 β -glucan の認識機構

主指導教員：加藤 功一教授

(医系科学研究科 生体材料学)

副指導教員：武知 正晃准教授

(医系科学研究科 口腔外科学)

副指導教員：重石 英生講師

(医系科学研究科 公衆口腔保健学)

佐久間 美雪

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

口腔粘膜上皮細胞における CEACAM1 による *Candida* 細胞壁構成成分 β -glucan の認識機構

Mechanism and recognition of *Candida* cell wall components β -glucan by CEACAM1 in oral keratinocytes

【目的】

口腔カンジダ症は、*Candida* 属真菌、主に *C. albicans* (以下 Ca) を原因菌とする日和見感染症である。Ca は口腔粘膜に付着、定着し、粘膜を障害する性質を持っている。一方、口腔粘膜上皮細胞は Ca を認識し、免疫防御応答を行っている。これまで我々は口腔粘膜上皮細胞が Ca 感染の際に、Ca 細胞壁構成成分 β -glucan を認識することによって、ストレス応答蛋白 Heme oxygenase-1 (HO-1) を発現誘導することで、酸化ストレスに対する宿主防御を行っていることを報告している (*Infect Immun* 22, 2018)。これらの結果は口腔粘膜上皮細胞が β -glucan を何らかの細胞表面受容体によって認識し、HO-1 を誘導することが考えられる。しかしながら、口腔粘膜上皮細胞における β -glucan 認識受容体に関しては解明されていない。一方、Carcinoembryonic antigen-related cell-adhesion molecules 1 (CEACAM1) は CEA ファミリーのサブグループで、細胞間接着分子として知られている。血管新生や腫瘍増殖に関与することが報告されているが、口腔粘膜上皮における宿主免疫機能の役割に関しては分かっていない。今回、我々は、口腔粘膜上皮細胞における Ca β -glucan で誘導される免疫応答に対する CEACAM1 の影響と β -glucan の認識について検討した。

【材料および方法】

1. Ca 細胞壁構成成分 β -glucan による CEACAM1 の発現の影響

不死化口腔粘膜上皮細胞 (RT7) に Ca 生菌, Ca 加熱死菌, Ca および酵母由来 β -glucan を添加し、CEACAM1 の発現を Real-time PCR 法, Western blotting 法で検討した。

2. β -glucan で誘導される遺伝子発現に対する CEACAM1 の影響

β -glucan で誘導されるストレス応答遺伝子 HO-1 および炎症誘導因子である IL-8 の発現に対する CEACAM1 特異的 siRNA, 中和抗体の影響を Real-time PCR 法で検討した。

3. β -glucan で誘導されるシグナル伝達経路に対する CEACAM1 の影響

CEACAM1 特異的 siRNA による CEACAM1 ノックダウン細胞を用いて、 β -glucan の添加によって早期に誘導される細胞内活性酸素種 Reactive oxygen species (ROS) の産生を DCF-DA 法にて検討した。同様に CEACAM1 ノックダウン細胞を用いて、 β -glucan 誘導による Nrf2 の核内移行を Western blotting 法で検討した。

4. β -glucan と CEACAM1 の親和性

リコンビナント CEACAM1 蛋白と β -glucan との結合を binding assay にて検討した。また RT7 から抽出した蛋白に β -glucan を添加し、 β -glucan 抗体を結合したビーズによって免疫沈降し、CEACAM1 と β -glucan の親和性について検討した。さらに蛍光免疫染色法を用いて

RT7 における CEACAM1 と β -glucan の局在を検討した。

【結果】

1. Ca 生菌, Ca 加熱死菌, β -glucan を添加することで, CEACAM1 mRNA, 蛋白の発現が誘導された。
2. CEACAM1 特異的 siRNA, 中和抗体によって, β -glucan 誘導性の HO-1 の発現が抑制された。一方, HO-1 のノックダウンによって β -glucan 誘導性の IL-8 の発現はさらに増加した。
3. CEACAM1 ノックダウン細胞では, コントロール細胞と比較して, β -glucan 添加後 1 時間で誘導される ROS の亢進が抑制された。また CEACAM1 のノックダウンによって β -glucan で活性化される Nrf2 の核内移行が抑制された。
4. binding assay によって CEACAM1 リコンビナント蛋白と β -glucan の付着が示され, 免疫沈降法によって RT7 における CEACAM1 と β -glucan の親和性が認められた。また蛍光免疫染色法によって CEACAM1 と β -glucan の共局在が観察された。

【結論】

今回の研究によって, 口腔粘膜上皮細胞の CEACAM1 は, Ca 感染の際に, Ca 細胞壁構成成分である β -glucan を認識し, ROS/Nrf2 経路を介して HO-1 を発現誘導することで宿主防御機構を稼働している可能性が示唆された。