

学 位 論 文

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

佐久間 美雪

広島大学大学院医歯薬保健学研究科
博士課程 医歯薬学専攻
修了年度 (2019 年度)

主指導教員：加藤 功一教授
(医系科学研究科 生体材料学)

目次

I.	緒言	1
II.	実験材料および方法	4
	1. 培養細胞	
	2. 口腔粘膜上皮細胞の樹立	
	3. <i>Candida albicans</i> 生菌, 加熱死菌の調整	
	4. <i>Candida albicans</i> からの細胞壁構成成分 β -glucan 含有分子の抽出	
	5. RNA 抽出	
	6. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	
	7. Real-Time RT-PCR	
	8. 蛋白抽出およびウエスタンブロットティング法	
	9. Binding Assay	
	10. 免疫沈降	
	11. 細胞蛍光免疫染色	
	12. CEACAM1 ノックダウン株の作製	
	13. DCF-DA 法	
	14. 核内蛋白抽出	

15. 中和抗体の添加

16. 統計解析

III.	結果	16
IV.	考察	22
V.	結論	30
VI.	謝辞	32
VII.	参考文献	33
VIII.	付図説明	37
IX.	表および図	42

I. 緒言

口腔 *Candida* 症は, *Candida* 属による日和見感染症で¹⁾, その中でも *Candida albicans* が最も多く検出されている²⁾. *Candida albicans* は口腔粘膜の表面にコロニーを形成して付着する³⁾. *Candida albicans* が口腔粘膜上皮細胞に付着すると, 増殖しながら口腔粘膜に侵入し, 口腔粘膜を損傷する⁴⁾. 一方, 口腔粘膜上皮細胞は, 自然免疫において *Candida albicans* に対する防御の第一線である. 口腔粘膜上皮細胞は, *Candida albicans* 生菌に曝露されると, 炎症性サイトカインやケモカイン, 抗菌ペプチドを産生し, 初期免疫応答を行う^{5,6,7)}. また, *Candida albicans* 加熱死菌に曝露した際には, 口腔粘膜上皮細胞から炎症やストレス応答に関連するさまざまな遺伝子の発現が増加する⁸⁾. これらの結果は, *Candida* 細胞壁構成成分を認識する受容体が口腔粘膜上皮細胞に存在することを示唆している.

β -glucan は, *Candida albicans* や出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の主要な細胞壁構成成分である⁹⁾. 通常, β -glucan は *Candida* 細胞壁の内層を構成し, その外層にはマンナンが位置しているが¹⁰⁾, in vivo および in vitro モデルにおいて *Candida* バイオフィルム形成時に β -glucan は細胞表面に露出しているとの報告がある¹¹⁾. また, β -glucan は, β -glucan 受容体を介して単球やマクロファ-

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¹²⁾。これまでの研究により、 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、*Candida albicans* 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。さらに、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を確認したが、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⁸⁾。よって、口腔粘膜上皮細胞において、HO-1 の発現誘導に影響を与える β -glucan に関連するセンサーに関しては、いまだ不明である。

Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules 1 (CEACAM1, CD66a, 胆道糖蛋白質) は CEA ファミリーのサブグループであり、数種類の遺伝子ファミリーの存在が報告されている¹³⁾。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¹⁴⁾。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(*Neisseria meningitidis*), *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* などが報告されている。近年の報告によると、Klaile らは、腸粘膜上皮細胞の CEACAM1 と *Candida albicans* 生菌が結合することを発

見した¹⁵⁾。CEACAM1 は口腔粘膜上皮細胞にも発現していることが報告されているが、その発現は炎症を伴う組織において優位であった¹⁶⁾。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、口腔粘膜上皮細胞における β -glucan で誘導される免疫応答と CEACAM1 の関係を明らかにするために、*Candida albicans* と *Candida* 細胞壁構成成分 β -glucan によって誘導される CEACAM1 の発現を検討した。さらに、 β -glucan と CEACAM1 との相互作用や、 β -glucan で誘導される HO-1 の発現やそのシグナル伝達経路に対する CEACAM1 の影響を検討した。

II. 実験材料および方法

1. 培養細胞

本研究では、hTERT 遺伝子を導入し不死化させた不死化ヒト口腔粘膜上皮細胞 RT7 を用いた^{17,18)}。RT7 は表皮角化細胞添加因子セット-Gold (KGM-Gold™SingleQuots™; ロンザジャパン株式会社, 東京) を含む表皮角化細胞基本培地-Gold(無血清)(KGM-Gold™BasalMedium; 以下 KBM と略記する; ロンザジャパン株式会社, 東京)を用い, 5%CO₂ 存在下, 37°C加湿下で培養した。全ての継代培養は, カルチャープレート (CELLSTAR® , greiner bio-one; Duesseldorf, German) に播種した細胞をトリプシン/ EDTA 溶液 (ロンザジャパン株式会社, 東京) で処理し細胞を浮遊, 回収して行った。

2. 口腔粘膜上皮細胞の樹立

本研究で用いた口腔粘膜上皮細胞は, 埋伏歯の抜歯術において切除した健康な歯肉組織を用いて, CELL CULTURE FLASKS (greiner bio-one)にて初代培養を行ったものを使用した¹⁹⁾。これらの組織の採取に関しては, 広島大学倫理委員会で承認されたプロトコールに従いインフォームドコンセントを得た (approval no. E-930) 。初代培養した口腔粘膜上皮細胞は, 3~5 回の継代後に使

用した.

3. *Candida albicans* 生菌, 加熱死菌の調整

Ca.IFO1385 生菌は Sabouraud 培地 (DifcoTMSabouraud Dextrose Broth ; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) にて 37°C, 二晩振とう培養し, Phosphatase Inhibitor Solution (PBS) にて 10⁵CFU/mL の濃度へ希釈して使用した.

Ca.IFO1385 加熱死菌は, 同様に培養した真菌を PBS にて 10⁹CFU/mL の濃度へ希釈し, 75°Cで 45 分加熱し, 10⁷CFU/mL の濃度で使用した.

4. *Candida albicans* からの細胞壁構成成分 β -glucan 含有分子の抽出

Sabouraud 培地にて Ca を大量培養 (1200ml) した後, 9,000rpm で遠心し, 回収したペレットへ 1%NaOH (SIGMA, St.Louis, MO, USA) 300mL を加え, 100°C, 24 時間加熱した. 沈殿物を滅菌した超純水 (Milli-Q[®] Advantage A10[®] Ultrapure Water Purification System ; Merck Millipore, Japan) にて 3 度洗浄し, 0.5M Acetic acid を 100mL 加え, 80°C, 24 時間加熱した. 沈殿物を凍結乾燥し, 1.01g の β -glucan を抽出した²⁰⁾. 抽出した β -glucan は ENZYMATYC YEAST BETA-GLUCAN ASSAY PROCEDURE (Megazyme, Bray, Wicklow,

Ireland) にて高濃度の β -glucan であることを確認し, 400 μ g/mL の濃度で使用した.

S.cerevisiae β -glucan は WGP Dispresable (Invivogen, San Diego, CA, USA) を 400 μ g/ml の濃度で使用した.

5. RNA 抽出

Total RNA (1 μ g) は RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用い細胞から抽出した. RT7 を 6well カルチャープレート (greiner bio-one) に播種し, 70~80%のコンフルエントまで培養した. PBS にて洗浄し, 抗菌薬を含まない KBM 培地にて交換した後, *Candida albicans* 生菌 (10⁵CFU/mL) , 加熱死菌 (10⁷CFU/mL) , β -glucan (400 μ g/mL) を添加し, 37°C, 12 時間インキュベートした. 培地を吸引し, PBS にて 1~2 回洗浄した後, PBS を少量追加し, Cell スクレイパーにて細胞を採取し, 15,000rpm にて 10 分遠心した. その後, 上澄みを除去し, 細胞を回収した.

細胞に 1% 2-メルカプトエタノールを加えた RLT Buffer を加え, QIAshredder[®] に移し, 15,000rpm にて 3 分遠心し, ゲノム DNA を切断した. ホモジナイズしたライセートに 70%エタノールを添加し, 細胞溶解液を RNA 結合スピнкаラムに移し, 9,300rpm にて 30 秒遠心後, カラムに結合したトー

タル RNA へ洗浄バッファー (RW Buffer) を添加し遠心することで洗浄した。溶出バッファー (RPE Buffer) を 500 μ L 添加し遠心する操作を 2 回繰り返す。RNase-free water 30 μ L を添加し 9,300rpm にて 1 分遠心し、トータル RNA を回収した。回収液中の RNA 濃度をナノドロップ (Thermo Fisher Scientific, Waltman, MA, USA) により測定した。

6. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA 1 μ g をテンプレートとし、逆転写酵素 Rever Tra Ace 1 μ L, Random Primer (25pmol), dNTP (各 20mM), Ribonuclease Inhibitor (10U) を含む Rever Tra Ace 反応バッファー (TOYOBO, 大阪) を用い、逆転写反応を行った。30 $^{\circ}$ C 10 分, 42 $^{\circ}$ C 20 分, 99 $^{\circ}$ C 5 分, 4 $^{\circ}$ C 5 分を Master cycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) を用いて実施し、1 本鎖 cDNA 20 μ L を RT-PCR のテンプレートとして得た。

PCR 反応は cDNA 溶液 1 μ L を各遺伝子の特異的なセンスおよびアンチセンスプライマー各 0.5 μ M と GoTaq[®]Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) を含む反応液 20 μ L を用いて実施した。サーマルサイクラーを用い、変性 96 $^{\circ}$ C 30 秒, アニーリング 42 $^{\circ}$ C 1 分, 72 $^{\circ}$ C 1 分のサイクルを 35 回行い、標的遺伝子を検出した。標的遺伝子特異的プライマーは表 1 に示す。PCR 産

物は 100ng/mL ethidium bromide (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) を含む 2%アガロースゲル (和光, 大阪) にて電気泳動を行い, Printgraph ゲルイメージングシステム (ATTO, 東京) により記録した. 標的遺伝子発現量の定性には β -actin を内部標準として使用した.

7. Real-Time RT-PCR

Real-Time RT-PCR には標準遺伝子として β -actin を使用し, 上記 RT-PCR に用いたテンプレート cDNA 1 μ L および遺伝子特異的センスおよびアンチセンスプライマー6pmol, THUNDERBIRDTMSYBER[®]qPCR Mix (TOYOBO) を含む反応液 20 μ L を用いた. 反応は 95 $^{\circ}$ C 30 秒, 58 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 1 分を 40 サイクル行った. 検出には CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いた. 使用したプライマー (北海道システムサイエンス, 札幌) の塩基配列は表 1 に別記した.

8. 蛋白抽出およびウエスタンブロッティング法

RT7 を 10cm カルチャープレート (greiner bio-one) に播種し, 70~80%のコンフルエントまで培養した後, *Candida albicans* 加熱死菌 (10⁷CFU/mL) , β -glucan (400 μ g/mL) を添加し, 37 $^{\circ}$ C, 24 時間インキュベートした. 培地を吸引

し、PBS にて 1~2 回洗浄した後、PBS を少量追加し、Cell スクレイパーにて細胞を剥離浮遊後、15mL の遠沈管に回収し、4°C 15,000rpm にて 5 分遠心し、上清を除去してペレットを回収した。蛋白抽出には Mammalian Cell Lysis Kit (SIGMA, St.Louis, MO, USA) を用いた。回収したペレットに 1%プロテアーゼインヒビター (Roche, Indianapolis, IN, USA) を添加した 200 μ L の氷冷 Lysis buffer を添加して可溶し、氷上、1 時間振とうした。この操作を 2 回繰り返した後、4°C 13,000rpm にて 10 分遠心し、上清をサンプルとして回収した。

上記抽出した各種サンプルに 5 \times sample buffer (1M Tris-HCL pH6.8, 10%SDS, 2-メルカプトエタノール, ブロモフェノールブルー) を加えた後、95°C 5 分加熱し、直ちに 4%スタッキングゲル, 10%ランニングゲルを用いて電気泳動を行った。サンプルは Immobilon[®]-P PVDF メンブレン (Millipore corporate Headquarters, Billerica, MA, USA) に転写後、ブロッキングワンプ (ナカライテスク, 京都) を用いて、室温、1 時間ブロッキングを行った。1 次抗体 CEACAM1 Antibody (MAB22441)(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) CEACAM1 Antibody (ab182622)(Abcam, Cambridge, MA, USA) は、5%BSA in TBS-T 溶液にて 1000 倍希釈し、4°C、一晩反応を行い、TBS-T (1M Tris-HCl, NaCl, Tween-20) にてメンブレンを洗浄後、1000 倍に希釈した 2 次抗体と室温、1 時間反

応させた. 2次抗体反応後, TBS-T にてメンブレンを洗浄し, ECLTMPlus Western blotting system (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社, 東京) を発光基質として添加し, LUMINESCENT IMAGE ANALYZER (LAS-4000 mini PR, FUJIFILM, 東京) を用いて発光シグナルを検出した. 内部標準は GAPDH Antibody (Millipore corporate Headquarters, Billerica , MA, USA) を用いた.

9. Binding Assay

96 Well Plate (Corning, ME, USA) に CEACAM1 Antibody (Novus Biologicals, Centennial, CO, USA) を 1 μ g/mL の濃度で添加し, 室温, 一晩反応させた. 1% BSA in PBS 溶液にて室温, 1 時間ブロッキングを行った後, PBS-T (0.05% Tween-20) にて洗浄し, recombinant CEACAM1 (R&D Systems, USA&CANADA) を 0, 0.5, 5.0 μ g/mL の濃度で添加し, 室温, 1 時間反応させた. PBS-T にて洗浄し, *Candida albicans* β -glucan を 1mg/mL の濃度で添加し, 室温, 1 時間反応させた. 再度 PBS-T にて洗浄し, ビオチン標識キット-NH₂ (同仁化学研究所, 熊本, 日本) を用いてビオチン標識した β -glucan 抗体 (Biosupplies Australia, Parkville, Australia) を 1 μ g/mL の濃度で添加し, 室温, 1 時間反応させた. PBS-T にて洗浄し, streptavidin-HRP 溶液 100 μ L を室温, 1 時間反応させた後, *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩 (SIGMA) 基質発色溶液

100 μ Lにて発光させた。検出には Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad) を用い、450nmの波長にて検出を行った。

10. 免疫沈降

RT7 を 10cm カルチャープレート (greiner bio-one) に播種し、コンフルエントまで培養した後、蛋白を抽出し、*Candida albicans* β -glucan を 400 μ g/mL の濃度で添加し、4 $^{\circ}$ C、三晩インキュベートした。 β -glucan 抗体 (Biosupplies Australia) および mouse IgG 抗体 (R&D Systems) を結合させた Dynabeads[®]ProteinG (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、東京) を用いて免疫沈降を行った。 PBS にて洗浄した後、50mM Glycine (pH 2.8) 20 μ L を添加して蛋白を溶出し、1次抗体 CEACAM1 (MAB22441) を用いて、ウエスタンブロッティング法にて検討した。

11. 細胞蛍光免疫染色

RT7 をチャンバースライド (松浪硝子工業株式会社、大阪) に播種し、サブコンフルエントまで培養後、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液にて、室温、1時間固定した。0.2% Triton-X-100 にて膜透過処理を行った後、1% BSA in PBS 溶液を用いてブロッキングを行った。1% BSA in PBS 溶液にて 1 : 10 倍希

釈した 1 次抗体液 CEACAM1 Antibody (ab182622) および 1 : 200 倍希釈した 1 次抗体液 β -glucan Antibody (Biosupplies, Australia) を反応させ、室温、一晚反応させた。PBS にて洗浄し、1% BSA in PBS 溶液にて 1 : 500 倍希釈した蛍光標識抗体 Alexa Fluor[®] 488 標識 rabbit IgG および Alexa Fluor[®] 568 標識 mouse IgG 2 次抗体 (サーモフィッシュサイエンティフィックライフテクノロジー ジャパン株式会社、東京) を遮光下、室温、1 時間反応させた。PBS にて洗浄後、核染色を ProLong[®] Gold Antifade Reagent with DAPI (サーモフィッシュサイエンティフィックライフテクノロジー ジャパン株式会社、東京) にて行い、蛍光励起および位相差画像を蛍光顕微鏡 BZ9000 (KEYENCE, 大阪) にて記録した。

12. CEACAM1 ノックダウン株の作製

Lipofectamin RNAiMAX (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いた siRNA CEACAM によるノックダウン法の製品マニュアル法に従って CEACAM1 のノックダウンを行った。RT7 を 6well カルチャープレート (greiner bio-one) に播種し、50~70%のコンフルエントまで培養した。Opti-MEM 培地に CEACAM1 Stealth[™] siRNA (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) と Lipofectamin RNAiMAX を各々溶解した後、両者を混合し、室温、20 分反

応させて 90 pmol の CEACAM1 siRNA 液を作成した。その後, RT7 に添加し, 48 時間作用させ, トランスフェクションを行った。48 時間後, 細胞を回収し, Real-Time RT-PCR 法にて CEACAM1 のノックダウンを確認した。siRNA の塩基配列は表 2 に示す。コントロールとして Control siRNA (Stealth RNAi Negative Control, Medium GC Duplex ; Life technologies) を用いた。

13. DCF-DA 法

RT7 を 96well カルチャープレート (greiner bio-one) に播種し, 50~70% のコンフルエントまで培養した後, 12. CEACAM1 ノックダウン株の作製 と同様に CEACAM1 のノックダウンを行った。70~80% のコンフルエントまで培養した後, PBS にて洗浄し, KBM 培地を添加した後に 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (SIGMA, St.Louis, MO, USA) を 10 μ M の濃度で添加し, 37 $^{\circ}$ C, 45 分インキュベートした。PBS にて洗浄した後, KBM 培地を添加し, *Candida albicans* β -glucan を 200 μ g/mL の濃度にて添加した。37 $^{\circ}$ C, 1 時間インキュベートした後, PBS にて 3 回洗浄し, 蛍光マイクロプレートリーダー (Skanlt RE for Varioskan Flash 2.4 ; サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社, 東京) にて 485~530nm の波長で測定した。

14. 核内蛋白抽出

RT7 を 10cm カルチャープレート (greiner bio-one) に播種し, 50~70%のコンフルエントまで培養した後, 12. CEACAM1 ノックダウン株の作製と同様に CEACAM1 のノックダウンを行った. 70~80%のコンフルエントまで培養した後, PBS にて洗浄し, KBM 培地を添加した後に *Candida albicans* 加熱死菌 (10^7 CFU/mL) , β -glucan (400 μ g/mL) を添加し, 37 $^{\circ}$ C, 24 時間インキュベートした. PBS にて 1~2 回洗浄した後, PBS を少量追加し, Cell スクレイパーにて細胞を剥離浮遊後, 15mL の遠沈管に回収し, 4 $^{\circ}$ C 15,000rpm にて遠心し, 上清を除去してペレットを回収した. 回収したペレットに 5mL の PBS / Phosphatase Inhibitor を添加し, 4 $^{\circ}$ C 14,000rpm で 5 分遠心した. この操作を 2 回繰り返した後, 上清を除去し, 500 μ L の Hypotonic Buffer で懸濁後, 15 分氷冷し, 100 μ L の Nonidet P-40 Assay Reagent を添加し, 4 $^{\circ}$ C 14,000rpm にて 30 秒遠心後, 上清を核外サンプルとして回収した. その後, 残ったペレットへ 100 μ L の Extraction Buffer を加え, 懸濁後 15 分氷冷し, これを 2 回繰り返し, 4 $^{\circ}$ C 14,000rpm にて 10 分遠心し, 上清を核内サンプルとして回収した (Nuclear Extraction Kit ; Cayman Chemical Company , Ann Arbor, MI, USA).

抽出した各種核内蛋白サンプルは, 1 次抗体 Nrf2 (L593) pAb Antibody (Bioworld Technology, St.Louis Park, MN, USA), 内部標準として LaminB

Antibody (SPRING Bioscience, Pleasanton, CA, USA) を用いて, ウェスタンブロット法にて検討した.

15. 中和抗体の添加

RT7 を 6well カルチャープレート (greiner bio-one) に播種し, 70~80%のコンフルエントまで培養した. PBS にて洗浄し, KBM 培地を添加した後に CEACAM1 中和抗体 (Novus Biologicals) および mouse IgG 抗体 (R&D Systems) を 20 μ g/mL の濃度で添加し, 37 $^{\circ}$ C, 1 時間インキュベートした. その後, *Candida albicans* β -glucan (400 μ g/mL) を添加し, 37 $^{\circ}$ C, 12 時間インキュベートした. 12 時間後, 細胞を回収し, Real-Time RT-PCR 法にて HO-1 の発現量を検討した. 使用したプライマー (北海道システムサイエンス) の塩基配列は表 1 に別記した.

16. 統計解析

すべての検定は例数 \geq 3 で行い, 標準誤差は \pm , 例数は n にて示した. 得られたデータの統計的有意性は, 2 群間比較に Student's t-test を用いて解析し, p value $<$ 0.05 の場合を有意差ありとした.

III. 結果

1. 口腔粘膜上皮細胞における CEACAM1 の発現に対する *Candida albicans* と細胞壁構成成分 β -glucan の影響

口腔粘膜上皮細胞において、CEACAM1 の発現に対する *Candida albicans* 生菌と *Candida albicans* 加熱死菌の影響を調べた。その結果、*Candida albicans* 生菌および *Candida albicans* 加熱死菌共に、健常者の口腔粘膜上皮から樹立した細胞株および RT7 に添加することで、CEACAM1 mRNA の発現が増加した (図 2A)。次に、RT7 を用いて、*Candida albicans* 由来の細胞壁構成成分 β -glucan と出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の β -glucan による CEACAM1 mRNA の発現誘導への影響を検討した結果、RT7 における CEACAM1 mRNA の発現が増加した (図 2B)。さらに、口腔粘膜上皮細胞における CEACAM1 の発現を検討するため、健常者の歯肉より初代培養した正常口腔粘膜上皮細胞を用いて *Candida albicans* 由来の細胞壁構成成分 β -glucan と出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の β -glucan による CEACAM1 mRNA の発現誘導への影響を検討したところ、初代培養した正常口腔粘膜上皮細胞における CEACAM1 mRNA の発現が増加した (図 2C)。また、RT7 に *Candida albicans* β -glucan および *Candida albicans* 加熱死菌を添加し、CEACAM1 mRNA および蛋白の発現を検討

した結果，RT7 における CEACAM1 mRNA および蛋白の発現を認めた（図 2D,E）.

2. 口腔粘膜上皮細胞における CEACAM1 と β -glucan の関連について

CEACAM1 は口腔粘膜上皮細胞にも発現している細胞間接着分子であり，免疫応答やがん細胞における増殖やアポトーシスなどの生理活性をもつことが報告されている．一方で，淋菌や大腸菌，インフルエンザ桿菌などの様々な病原微生物の受容体であり，細胞間結合を担う．近年の報告によると，*Candida albicans* 生菌が腸粘膜上皮細胞で CEACAM1 に直接結合することが明らかとなった．本研究では，RT7 における CEACAM1 と *Candida albicans* β -glucan の親和性について検討した．まず，組換え CEACAM1 蛋白と *Candida albicans* β -glucan との親和性を Binding Assay にて検討したところ，組換え CEACAM1 蛋白を添加した well では，添加していない well と比較し， β -glucan 抗体の付着の増加が示された（図 3A）．次に， β -glucan を添加した RT7 の全蛋白画分と， β -glucan 抗体を結合させたビーズを用いて免疫沈降を行い，pull-down assay を行い，CEACAM1 蛋白の発現をウエスタンブロッティング法にて検討した．その結果，CEACAM1 が β -glucan 抗体を結合させたビーズによって分離された（図 3B）．最後に，蛍光免疫細胞染色によって CEACAM1 と β -glucan の局在を検討した

ところ、 β -glucan は RT7 の細胞膜表面に存在する CEACAM1 と共局在を示すことが明らかになった (図 3C).

以上の結果から、RT7 における CEACAM1 が β -glucan と結合親和性をもち、相互作用を行っている可能性が示唆された。

3. CEACAM1 ノックダウン細胞の作製

本研究において、口腔粘膜上皮細胞における CEACAM1 の機能について検討するために、CEACAM1 特異的 siRNA を用いて CEACAM1 ノックダウン細胞を作製した。RT7 において、2 種類の CEACAM1 特異的 siRNA を用いて CEACAM1 をノックダウンした結果、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 CEACAM1 mRNA の発現が抑制された (図 4)。

4. β -glucan 誘導性 HO-1 の発現に關与する ROS への CEACAM1 の影響

口腔粘膜上皮細胞において、HO-1 は酸化ストレスを引き起こす因子によって誘導されることが報告されている。以前の研究において、*Candida albicans* β -glucan の存在によって酸化ストレスが亢進し、ROS/p38/Nrf2 経路を介して HO-1 の発現誘導が増加することを明らかにした。そこで、本研究では β -glucan 誘

導性の HO-1 の発現に関連するシグナル伝達経路への CEACAM1 の影響を検討した。

活性酸素種 (Reactive oxygen species ; ROS) は、口腔粘膜上皮細胞においては *Candida albicans* β -glucan によって短時間で細胞内での産生が亢進され、細胞内酸化ストレスが亢進する。本研究では、CEACAM1 ノックダウン細胞を用いて、 β -glucan により早期に誘導される ROS への CEACAM1 の影響を検討した。その結果、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、 β -glucan 誘導性の早期 ROS 産生が抑制された (図 5A)。

5. β -glucan 誘導性 HO-1 の発現に関与する Nrf2 の核内移動への CEACAM1 の影響

細胞内への酸化ストレスに対するストレス応答に重要な役割を有する転写因子 Nrf2 は、核内へ移動することで HO-1 の発現を誘導する。よって、 β -glucan 添加で誘導される HO-1 の発現は Nrf2 を介した応答であることを明らかにしている。本研究では、CEACAM1 ノックダウン細胞を用いて、 β -glucan 誘導性の Nrf2 の核内移動に対する CEACAM1 の影響を検討した。その結果、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、 β -glucan 誘導性の Nrf2 の核内への移動が抑制された (図 5B)。

以上の結果から, CEACAM1 は ROS/Nrf2 経路に関与することで, β -glucan 誘導性の HO-1 の発現に関連している可能性が示唆された.

6. β -glucan 誘導性 HO-1 発現に対する CEACAM1 の影響

β -glucan により誘導されるストレス応答遺伝子 HO-1 の発現に対する CEACAM1 の影響を検討した.

CEACAM1 ノックダウン細胞を用いて, β -glucan にて誘導される HO-1 の発現への影響について検討した. その結果, 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 *Candida albicans* β -glucan 誘導性の HO-1 の発現が抑制された (図 6A). また *Candida albicans* β -glucan と同様に, *Saccharomyces cerevisiae* β -glucan 誘導性の HO-1 の発現も抑制された (図 6B). さらに CEACAM1 中和抗体を用いて β -glucan 誘導性の HO-1 の発現に対する CEACAM1 の影響を検討した. その結果, コントロールとして Mouse IgG を添加した細胞と比較し, CEACAM1 中和抗体を添加した細胞では *Candida albicans* β -glucan 誘導性の HO-1 の発現が抑制された (図 6C). 以上の結果から, β -glucan 誘導性の HO-1 の発現には CEACAM1 が介在している可能性が示唆された.

7. β -glucan 誘導性 IL-8 発現に対する CEACAM1 の影響

ストレス応答蛋白 HO-1 は、細菌構成成分や炎症性サイトカインによって誘導される炎症性遺伝子の発現を制御することが報告されている。以前のわれわれの研究において、口腔粘膜上皮細胞において *Candida albicans* 感染の際にさまざまな白血球遊走因子が誘導され、その中でも好中球遊走因子である炎症性サイトカイン IL-8 が最も誘導されることを報告した^{6, 21)}。本研究では、CEACAM1 ノックダウン細胞を用いて、 β -glucan による IL-8 の発現誘導への CEACAM1 の影響について検討した。その結果、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 β -glucan 誘導性の IL-8 の発現がさらに増加した (図 7)。

以上の結果から、 β -glucan 誘導性の IL-8 の過剰発現に対して、CEACAM1 は抑制的に関与していることが示唆された。

IV. 考察

口腔粘膜上皮細胞は、*Candida albicans* の侵入に対して *Candida albicans* を認識し、*Candida albicans* 感染に対するストレスから防御する免疫応答を稼働すると考えている。しかしながら、口腔粘膜上皮細胞における *Candida albicans* を認識する機序や免疫防御機能に関しては明らかにされていない。これまで我々の研究において、RT7 に *Candida albicans* 加熱死菌を添加することで発現誘導を認めた特異的遺伝子を cDNA マイクロアレイ法にて網羅的に解析した結果、*Candida albicans* で誘導されるストレス応答蛋白 HO-1 を同定した。さらに、口腔粘膜上皮細胞において、*Candida albicans* 細胞壁構成成分 β -glucan によって細胞内酸化ストレス ROS が増加し、抗酸化ストレス転写因子 Nrf2 が核内へ移行し、HO-1 を誘導することを明らかにした⁸⁾。これらの結果は、口腔粘膜上皮細胞が *Candida albicans* 細胞壁構成成分 β -glucan を何らかの受容体を介して認識することによって、ROS 産生の亢進や Nrf2 の核内移行などの細胞内酸化ストレスを介して亢進する経路が活性化され、抗酸化遺伝子である HO-1 を誘導している可能性を示唆していると考えられる。しかしながら、口腔粘膜上皮細胞における *Candida albicans* や細胞壁構成成分 β -glucan を認識する受容体に関しては、いまだ不明な点が多い。

β -glucan は自然免疫系の細胞によって認識されることが明らかにされている。

β -glucan は、C型レクチン受容体である Dectin-1、補体受容体3 (CR3)、および Toll 様受容体 (TLR) などのパターン認識受容体 (PRR) に結合することにより、免疫系に影響を及ぼす^{22, 23, 24}。これらの受容体は、主にマクロファージや樹状細胞、好中球などの免疫細胞の表層に発現している²²。一方、Dectin-1 は、単球やマクロファージなどの免疫細胞、ヒト気管支上皮細胞や腸管上皮細胞などの非免疫細胞に発現していることを特徴とする β -glucan 受容体である²⁵。

Dectin-1 は、 β -glucan を認識すると免疫応答を誘導する。また、Toll 様受容体 (TLR) は、真菌の細胞壁構成成分 β -glucan を認識し、真菌の β -glucan 感染に対する宿主防御に関与している²⁶。TLR2 や TLR4 は、Dectin-1 と同様に β -glucan を認識し、炎症反応を誘導する機能をもつ。ヒト胚性腎細胞 (HEK293) において、Dectin-1 や TLR2, TLR4 を発現するレポーター細胞株を作製し、TLR2 および TLR4 が β -glucan 誘導性の Dectin-1 活性化の調節因子として作用する免疫調節リガンドであることを示した報告がある²⁷。また、不死化ヒト角膜細胞において、アスペルギルス感染の際に、Dectin-1 および TLR2 が互いに制御し、炎症性サイトカインである IL-1 や IL-8 を発現誘導することで炎症応答を行っているとの報告がある²⁸。

口腔粘膜上皮細胞においても、 β -glucan 受容体として知られている Dectin-1

や TLR2 などの受容体が発現していることが知られている。以前の研究において、*Candida albicans* 感染の際に、口腔粘膜上皮細胞に発現する Dectin-1 や TLR2 が *Candida albicans* β -glucan を認識する可能性を考慮し、口腔粘膜上皮細胞を用いてこれらの β -glucan 受容体をノックダウンし、 β -glucan による HO-1 誘導について検討した。しかしながら、コントロール細胞と比較し、 β -glucan 受容体ノックダウン細胞における β -glucan 誘導性の HO-1 発現への影響は認められなかった⁸⁾。Swidergall らは、口腔粘膜上皮細胞上の EphA2 受容体が *Candida albicans* の表面に露出した β -glucan と結合する PRR として機能することを発見したが、口腔粘膜上皮細胞における β -glucan センサーとしての機能はまだ十分に解明されていない⁷⁾。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 *Candida albicans* や β -glucan を認識する受容体に関しては、現在のところ十分に明らかにされていない。

CEACAM1 は、胃、大腸、肺、乳房、子宮内膜、前立腺、胆嚢組織を含むさまざまなヒト組織で検出される。CEACAM1 は免疫細胞や上皮細胞に発現すると報告されている。口腔組織では、歯周病を有する組織では口腔粘膜上皮に、健康者の正常上皮では接合上皮に CEACAM1 が検出されている¹⁶⁾。また、口腔扁平苔癬では口腔粘膜上皮細胞や T 細胞に過剰発現していることが確認されている²⁹⁾。さらに、CEACAM1 の発現は、炎症性サイトカインや病原微生物によって増

加することが報告されている。皮膚の角化細胞における CEACAM1 mRNA は、IFN- γ などの炎症性サイトカインによって誘導されたとの報告がある³⁰⁾。CEACAM1 は様々な病原微生物の受容体であり、接着および細胞間結合を担う。淋菌、髄膜炎菌、エシェリヒア菌、モラクセラ菌、インフルエンザ菌、サルモネラ菌、ヘリコバクター・ピロリなどの微生物が、各々の表面タンパク質を介して CEACAM1 に結合する^{31,32)}。これらの微生物は、CEACAM1 のヒト特異的細胞外免疫グロブリン V (IgV) 様アミノ末端ドメインを認識し結合することが明らかになっている¹³⁾。CEACAM1 の発現は、淋菌により上皮細胞および内皮細胞で増加することが明らかになった³³⁾。近年、腸粘膜細胞に発現している CEACAM1 が *Candida* 生菌と結合し、細胞壁構成成分の蛋白質が変性した *Candida albicans* は CEACAM1 蛋白との結合が著しく減少するとの報告があった¹⁵⁾。そこで、口腔粘膜上皮細胞における CEACAM1 も、*Candida albicans* の細胞表面に存在する細胞壁構成成分を認識し、結合すると仮説を立てた。

われわれの結果では、口腔粘膜上皮細胞における CEACAM1 の発現は、*Candida* 生菌や *Candida albicans* 加熱死菌のみならず、*Candida* 細胞壁構成成分 β -glucan によっても誘導された。よって *Candida albicans* β -glucan は、*Candida* 生菌と同様に、CEACAM1 の発現に関連した免疫系を活性化させる機能を有する可能性が示唆された。

通常、*Candida albicans* 細胞壁内層の β -glucan は、外層に存在するマンナンに覆われている。しかしながら、以前のわれわれの研究において、*Candida* 侵入時に β -glucan はカンジダ加熱死菌の表面および *Candida* が侵入した口腔粘膜上皮に露出することを明らかにした⁸⁾。*Candida albicans* 細胞壁構成成分・マンナンは、 α -1,6 結合マンノースからなる主鎖に、 α -1,2 結合マンノースや α -1,3 結合マンノースからなる側鎖を有した構造をもつ。*Candida albicans* は、標準培養条件では酵母形態発育を呈するが、培地の性質や pH、温度の変化などによってマンナン側鎖の構造が変化したり、消失したりするとの報告がある³⁴⁾。また、細胞壁外層の O-マンナンの消失により、マンナン内層に存在している β -glucan が露出するとの報告がある³⁵⁾。これらの先行研究および本研究の結果より、口腔粘膜上皮細胞上の CEACAM1 は、*Candida* 感染時に *Candida* 細胞壁表面に露出した β -glucan と結合し、認識することで、*Candida* 感染に対する宿主免疫応答に参与する可能性が示唆された。

HO-1 は、毒性の強いヘムを細胞内で分解し、一酸化炭素 (CO) と鉄、ビリルヂンを生成する酵素で、鉄結合蛋白フェリンの中に貯蔵される³⁶⁾。HO-1 は、活性酸素種 ROS による細胞内酸化ストレスに応答して増加するストレス誘導性酵素として知られている³⁷⁾。ROS を介した酸化ストレスは、多細胞死メカニズムを介して、活性細胞メカニズムを活性化する³⁸⁾。過剰な ROS が産生され、

細胞内酸化ストレス誘導されると、Nrf2 の核内移行を誘導することで HO-1 の発現を増加させ、毒性の強いヘムを CO や Fe, ビリベルジンに分解する反応を触媒し、細胞内酸化ストレスを抑制する機能をもつ^{39, 40, 41)}。これまでわれわれは、*Candida albicans* 加熱死菌によって RT7 から HO-1 の発現誘導が増加することを発見した。さらに、RT7 において、 β -glucan が ROS/p38/Nrf2 経路を介して HO-1 発現を増加させることを明らかにした⁸⁾。本研究では、CEACAM1 を特異的 siRNA でノックダウンすることで、*Candida* 感染に対する RT7 上の CEACAM1 の機能について検討した。その結果、CEACAM1 ノックダウンによって、 β -glucan 誘導性の早期 ROS 産生と Nrf2 活性化は抑制され、HO-1 の発現誘導も抑制された。CEACAM1 変異マウスの心臓において、NADH/NADPH 比が増加し酸化ストレスが増加したとの報告がある⁴²⁾。よって、口腔粘膜上皮細胞における CEACAM1 は、*Candida* 感染の際に β -glucan を認識し、 β -glucan 誘導性の細胞内酸化ストレス亢進に関連する ROS / Nrf2 経路を介した HO-1 の発現に対して重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

炎症性サイトカイン IL-8 は、口腔粘膜上皮細胞に *Candida* 生菌を添加した際に誘導される好中球遊走因子であり²¹⁾、初期免疫応答に重要な役割を担っている。しかしながら、*Candida albicans* 感染による炎症が継続すると、IL-8 の分泌が継続するため、過度な炎症が症じ、細胞が傷害されることが報告されてい

る⁴³⁾. このため、細胞には慢性炎症に伴う IL-8 の過剰な分泌を抑制するような防御機構をもつことが考えられる. 過去の研究において、HO-1 ノックダウン細胞を用いて、*Candida* 生菌や加熱死菌、細胞壁構成成分 β -glucan で誘導される IL-8 mRNA および IL-8 蛋白発現を検討した結果、*Candida* 生菌や加熱死菌、 β -glucan で誘導される IL-8 mRNA および蛋白の著しい増加を認めた (論文未発表データ). 本研究において、CEACAM1 ノックダウン細胞における β -glucan 誘導性 IL-8 の発現への影響を検討したところ、コントロール細胞と比較して IL-8 の発現誘導の増加を認めた. 過去の研究と本研究の結果より、CEAMAM1 に関与する経路が β -glucan で誘導される IL-8 の発現誘導を制御している可能性が示唆された.

IL-8 には、炎症性サイトカインとしての初期免疫応答と、慢性炎症時の細胞傷害という二面性をもつと考えている. *Candida albicans* 感染が長期化し、慢性炎症に伴う IL-8 の過剰分泌に対して、口腔粘膜上皮細胞は CEACAM1 を介して HO-1 発現を増加することによって IL-8 の発現を制御し、抗炎症に関与している可能性が示唆された.

本研究によって、*Candida albicans* 感染の際に、口腔粘膜上皮細胞の CEACAM1 は *Candida* 細胞壁構成成分 β -glucan を認識する. CEACAM1 と β -glucan が結合することで、細胞内活性酸素種 ROS の亢進により細胞内酸化

ストレスが増加する。細胞内酸化ストレスの亢進に伴い抗酸化ストレス転写因子 Nrf2 が核内へ移行し、ストレス応答遺伝子 HO-1 が発現誘導され、酸化ストレスに対する防御を行う。一方、*Candida albicans* 感染に対する初期免疫応答として誘導された炎症性サイトカイン IL-8 を HO-1 が抑制することで、抗炎症へと働く可能性が示唆された (図 8)。

V. 結論

1. 不死化口腔粘膜上皮細胞 (RT7) において, *Candida albicans* 生菌や加熱死菌, *Candida albicans* 由来の細胞壁構成成分 β -glucan や *Saccharomyces cerevisiae* 由来の β -glucan を添加することで, CEACAM1 mRNA の発現誘導を認めた.

初代培養した正常口腔粘膜上皮細胞において *Candida albicans* および *Saccharomyces cerevisiae* 由来の β -glucan を添加することで, CEACAM1 mRNA の発現を認めた.

また, RT7 に *Candida albicans* β -glucan および加熱死菌を添加することで, CEACAM1 蛋白の発現を認めた.

2. RT7 における CEACAM1 が β -glucan と結合親和性をもつ可能性が示唆された.
3. CEACAM1 は β -glucan の添加により誘導される ROS の産生に関与している可能性が示された.
4. CEACAM1 は β -glucan の添加により誘導される Nrf2 の核内移行に関与している可能性が示された.
5. CEACAM1 は, β -glucan の添加により亢進される ROS/Nrf2 酸化ストレス

シグナルによって誘導される HO-1 の発現に関与している可能性が示唆された。

6. CEACAM1 は、 β -glucan の添加によって別の経路から誘導される IL-8 の過剰発現に対して、抑制的に関与している可能性が示唆された。

以上の結果から、*Candida albicans* の感染の際に、口腔粘膜上皮細胞に発現する CEACAM1 が *Candida albicans* 細胞壁構成成分 β -glucan を認識し、結合することで、ROS/Nrf2 経路を介して HO-1 を誘導し、細胞内酸化ストレスに対する防御機構を稼働する重要な役割を担う可能性が示された。また、CEACAM1 は、HO-1 の発現誘導を介して、*Candida albicans* 感染への初期免疫応答として発現が誘導される IL-8 の過剰発現を調節する可能性も示唆された。

VI. 謝辞

稿を終えるにあたり御指導，御校閲を賜りました，広島大学大学院医系科学研究科 生体材料学 加藤功一教授をはじめ，広島大学大学院医系科学研究科 口腔顎顔面病理病態学 宮内睦美教授，広島大学大学院医系科学研究科 歯髓生物学 柴 秀樹教授，広島大学大学院医系科学研究科 口腔生物学 二川浩樹教授，広島大学大学院医系科学研究科 口腔外科学 武知正晃准教授，広島大学大学院医系科学研究科 公衆口腔保健学 重石英生講師に深謝いたします。

また，本研究の遂行のためにご指導頂きました，広島大学大学院医系科学研究科 公衆口腔保健学教室 太田耕司教授，ご協力頂きました口腔外科学教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に，本研究を陰で支えてくれた家族に心より感謝します。

VII. 参考文献

- 1) Lynch DP. Oral candidiasis. History, classification, and clinical presentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 78: 189-193(1994)
- 2) Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch Oral Biol.* 25: 1-10(1980)
- 3) Odds FC. *Candida and candidiasis: a review and bibliography.* 2nd edition. W.B. Saunders Company, Bailliere Tindall, London, United Kingdom (1988)
- 4) Reichart PA, Philipsen HP, Schmidt-Westhausen A, Samaranayake LP. Pseudomembranous oral candidiasis in HIV infection: ultrastructural findings. *J Oral Pathol Med.* 24: 276-281(1995)
- 5) Steele C, Fidel PL Jr. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. *Infect Immun.* 70: 577-583(2002)
- 6) Ohta K, Nishi H, Fukui A, Shigeishi H, Takechi M, Kamata N. CX3CL1 expression induced by *Candida albicans* in oral fibroblasts. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 60: 179-185(2010)
- 7) Swidergall M, Filler SG. Oropharyngeal Candidiasis: Fungal Invasion and Epithelial Cell Responses. *PLoS Pathog.* 13: e1006056(2017)
- 8) Ishida Y, Ohta K, Naruse T, Kato H, Fukui A, Shigeishi H, Nishi H, Tobiume K, Takechi M. *Candida albicans*-Glucan-Containing Particles Increase HO-1 Expression in Oral Keratinocytes via a Reactive Oxygen Species/p38 Mitogen-Activated Protein Kinase/Nrf2 Pathway. *Infect Immun.* 86: 575-617(2018)
- 9) Camilli G, Tabouret G, Quintin J. The Complexity of Fungal β -Glucan in Health and Disease: Effects on the Mononuclear Phagocyte System. *Front Immunol.* 9: 673(2018)
- 10) Masuoka J. Surface Glycans of *Candida albicans* and Other Pathogenic Fungi: Physiological Roles, Clinical Uses, and Experimental Challenges. *Clin Microbiol Rev.* 17: 281-310(2004)
- 11) Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H, Dwivedi P, Diaz P, Vasilakos J. Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. *PLoS One.* 4: e7967(2009)
- 12) Chan GC, Chan WK, Sze DM. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol Oncol.* 2: 25(2009)
- 13) Gray-Owen SD, Blumberg RS. CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat Rev Immunol.* 6: 433-446(2006)
- 14) Khairnar V, Duhan V, Patil AM, Zhou F, Bhat H, Thoens C, Sharma P, Adomati T,

- Friendrich SK, Bezgovsek J, Dreesen JD, Wennemuth G, Westendorf AM, Zelinsky G, Dittmer U, Hardt C, Timm J, Göthert JR, Lang PA, Singer BB, Lang BB. CEACAM1 promotes CD8⁺ T cell responses and improves control of a chronic viral infection. *Nat Commun.* 9: 2561(2018)
- 15) Klaile E, Müller MM, Schäfer MR, Clauder AK, Feer S, Heyl KA, Stock M, Klassert TE, Zipfel PF, Singer BB, Slevogt H. Binding of *Candida albicans* to Human CEACAM1 and CEACAM6 Modulates the Inflammatory Response of Intestinal Epithelial Cells. *mBio.* 8: e02142-16(2017)
- 16) Huynh-Torlakovic H, Bjerkan L, Schenck K, Blix IJS. Distribution of carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecules in human gingiva. *Eur J Oral Sci.* 120: 395-401(2012)
- 17) 藤本良一, 鎌田伸之, 横山和博, 瀧 雅行, 友成真弓, 堤 聡, 山之内浩司, 長山勝. テロメア-ゼ遺伝子導入による不死化ヒト口腔粘膜上皮細胞の樹立. *日口粘膜誌.* 8: 1-8(2002)
- 18) Ohta K, Fukui A, Shigeishi H, Ishida Y, Nishi H, Tobiume K, Takechi M, Kamata N. Expression and function of RIG-I in oral keratinocytes and fibroblasts. *Cell Physiol Biochem.* 34: 1556-65(2014)
- 19) Uchida Y, Shiba H, Komatsuzawa H, Hirono C, Ashikaga A, Fujita T, Kawaguchi H, Sugai M, Shiba Y, Kurihara H. Irsogladine maleate influences the response of gap junctional intercellular communication and IL-8 of human gingival epithelial cells following periodontopathogenic bacterial challenge. *Biochem Biophys Res Commun.* 333: 502-507(2005)
- 20) Nisini R, Torosantucci A, Romagnoli G, Chiani P, Donati S, Gagliardi MC, Teloni R, Sargentini V, Mariotti S, Iorio E, Cassone A. beta-Glucan of *Candida albicans* cell wall causes the subversion of human monocyte differentiation into dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 82: 1136-1142(2004)
- 21) Palomino DC, Marti LC. Chemokines and immunity. *Einstein.* 13: 469-473(2015)
- 22) Brown GD, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity.* 19: 311-5(2003)
- 23) Chan GC, Chan WK, Sze DM. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol Oncol.* 2: 25(2009)
- 24) Ujita M, Nagayama H, Kanie S, Koike S, Ikeyama Y, Ozaki T, Okumura H. Carbohydrate binding specificity of recombinant human macrophage beta-glucan receptor dectin-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 237-40(2009)
- 25) Adachi Y. Role of the 1,3-β-D-Glucan Receptor Dectin-1 in Fungal Infection and Activation of Innate and Anti-Tumor Immunity. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 19:

- 195–207(2007)
- 26) Kawai T, Akira S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*. 34: 637-650(2011)
 - 27) Kanjan P, Sahasrabudhe NM, Haan BJ, Vos P. Immune effects of β -glucan are determined by combined effects on Dectin-1, TLR2, 4 and 5. *J. Funct. Foods*. 37: 433-440(2017)
 - 28) Zhao G, Qiu X, Lin J, Li Q, Hu L, Wang Q, Li H. Co-regulation of Dectin-1 & TLR2 in inflammatory response of human corneal epithelial cells induced by *Aspergillus fumigatus*. *Int J Ophthalmol*. 9: 18(2016)
 - 29) Liu GX, Xie Q, Zhou CJ, Zhang XY, Ma BL, Wang CQ, Wei FC, Qu X, Sun SZ. The possible roles of OPN-regulated CEACAM1 expression in promoting the survival of activated T cells and the apoptosis of oral keratinocytes in oral lichen planus patients. *J Clin Immunol*. 31: 827-839(2011)
 - 30) Rahmoun M, Molès JP, Pedretti N, Mathieu M, Fremaux I, Raison-Peyron N, Lecron JC, Yssel H, Pène J. Cytokine-induced CEACAM1 expression on keratinocytes is characteristic for psoriatic skin and contributes to a prolonged lifespan of neutrophils. *J Invest Dermatol*. 129: 671-681(2009)
 - 31) Tchoupa AK, Schuhmacher T, Hauck CR. Signaling by epithelial members of the CEACAM family—mucosal docking sites for pathogenic bacteria. *Cell Commun Signal*. 12: 27(2014)
 - 32) Javaheri A, Kruse T, Moonens K, Mejías-Luque R, Debraekeleer A, Asche CI, Tegtmeyer N, Kalali B, Bach NC, Sieber SA, Hill DJ, Königer V, Hauck CR, Moskalenko R, Haas R, Busch DH, Klaile E, Slevogt H, Schmidt A, Backert S, Remaut H, Singer BB, Gerhard M. *Helicobacter pylori* adhesin HopQ engages in a virulence-enhancing interaction with human CEACAMs. *Nat Microbiol* 2: 16189(2016)
 - 33) Muenzner P, Naumann M, Meyer TF, Gray-Owen SD. Pathogenic *Neisseria* trigger expression of their carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 (CEACAM1; previously CD66a) receptor on primary endothelial cells by activating the immediate early response transcription factor, nuclear factor- κ B. *J Biol Chem*. 276: 24331-24340(2001)
 - 34) 柴田信之 : *Candida* 属真菌の細胞壁マンナンの構造と病原性への関与. 東北薬大研誌. 58: 13-27(2011)
 - 35) Bain JM, Louw J, Lewis LE, Okai B, Walls CA, Ballou ER, Walker LA, Reid D, Munro CA, Brown AJP, Brown GD, Gow NAR, Erwig LP. *Candida albicans* Hypha Formation and Mannan Masking of β -Glucan Inhibit Macrophage Phagosome

- Maturation. *mBio*. 5: e01874-14(2014)
- 36) Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM. Ferritin: A cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem*. 267: 18148-18153(1992)
 - 37) Ryter SW, Choi AMK. Heme oxygenase-1: molecular mechanisms of gene expression in oxygen-related stress. *Antioxid Redox Signal* 4: 625-632(2002)
 - 38) Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JY, Nakahira K, Wang X, Choi AMK. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 9: 49-89(2007)
 - 39) Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, Park BK. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem Pharmacol*. 85: 705-717(2013)
 - 40) Bellezza I, Giambanco I, Minelli A. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys*. 1865: 721-733(2018)
 - 41) Pae HO, Chung HT. Heme oxygenase-1: its therapeutic roles in inflammatory diseases. *Immune Netw*. 9: 12-19(2009)
 - 42) Russo L, Muturi HT, Ghadieh HE, Wisniewski AM, Morgan EE, Quadri SS, Landesberg GP, Siragy HM, Vazquez G, Scalia R, Gupta R, Najjar SM. Liver-specific rescuing of CEACAM1 reverses endothelial and cardiovascular abnormalities in male mice with null deletion of Ceacam1 gene. *Mol Metab*. 9: 98-113(2018)
 - 43) Takahashi M, Izawa K, Urai M, Yamanishi Y, Maehara A, Isobe M, Matsukawa T, Kaitani A, Takamori A, Uchida S, Yamada H, Nagamine M, Ando T, Shimizu T, Ogawa H, Okumura K, Kinjo Y, Kitamura T, Kitaura J. The phytosphingosine-CD300b interaction promotes zymosan-induced, nitric oxide-dependent neutrophil recruitment. *Sci Signal*. 12: eaar5514(2019)

VIII. 付図説明

表 1

本研究で使⽤したプライマーの塩基配列を示す.

表 2

本研究で使⽤した siRNA の塩基配列を示す.

図1 *Candida albicans* (CA) 細胞壁構成成分 β -glucan の抽出方法
Nishini らの方法を参考に抽出した。

図2 口腔粘膜上皮細胞における, CA 生菌, 加熱死菌で誘導される CEACAM1 の発現

A ; RT7 における CA 生菌 (Live CA) および CA 加熱死菌 (Heat-killed CA) 添加による CEACAM1 mRNA 発現への影響を Real-Time RT-PCR 法にて検討した. CA 生菌および CA 加熱死菌にて, CEACAM1 mRNA の発現は増加した.

B ; RT7 における CA β -glucan, *Saccharomyces cerevisiae* (SC) β -glucan 添加による CEACAM1 mRNA 発現への影響を Real-Time RT-PCR 法にて検討した. CA β -glucan および SC β -glucan にて, CEACAM1 mRNA の発現は増加した.

C ; 口腔粘膜上皮細胞における CA β -glucan, SC β -glucan 添加による CEACAM1 mRNA 発現への影響を Real-Time RT-PCR 法にて検討した. CA β -glucan および SC β -glucan にて, CEACAM1 mRNA の発現は増加した.

D ; RT7 における CA β -glucan, CA 加熱死菌の添加による CEACAM1 mRNA の発現への影響を RT-PCR 法にて検討した. CA β -glucan および CA 加熱死菌にて, CEACAM1 の発現を認めた.

E ; RT7 における CA β -glucan, CA 加熱死菌の添加による CEACAM1 蛋白の発現への影響をウエスタンブロッティング法にて検討した. CA β -glucan および CA 加熱死菌にて, CEACAM1 の発現を認めた.

図3 CEACAM1 と β -glucan との親和性

A ; 組換え CEACAM1 蛋白と β -glucan との親和性.

Binding Assay により, 組換え CEACAM1 蛋白と β -glucan の親和性が示された.

B ; RT7 における CEACAM1 と β -glucan との親和性.

pull-down assay により, RT7 における CEACAM1 と β -glucan の親和性が示された.

C ; CEACAM1 と β -glucan との共局在.

蛍光免疫細胞染色により, RT7 の細胞膜表面に存在する CEACAM1 と β -glucan の共局在が示された.

図4 siRNA を用いた CEACAM1 のノックダウン

RT7 を CEACAM1 特異的 siRNA にて 48 時間トランスフェクションした.

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 CEACAM1 mRNA の発現が抑制された。

図 5 CEACAM1 ノックダウン細胞における CA β -glucan 誘導性の酸化ストレスシグナル経路への影響

A ; CEACAM1 ノックダウン細胞における CA β -glucan 誘導性の ROS 産生への影響.

RT7 を CEACAM1 特異的 siRNA にて 48 時間トランスフェクションし、DCF-DA 法により、CEACAM1 ノックダウン細胞における CA β -glucan 添加による ROS 産生の変化を検討した。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 誘導性の早期の ROS の産生が抑制された。

B ; CEACAM1 ノックダウン細胞における Nrf2 の核内移動への影響.

RT7 を CEACAM1 特異的 siRNA にて 48 時間トランスフェクションし、CA β -glucan にて 4 時間刺激した。全蛋白画分 (WE) および核内蛋白画分 (NE) を抽出し、Nrf2 蛋白の発現への影響をウエスタンブロッティング法にて検討した。LaminB および GAPDH を全蛋白画分および核内蛋白画分のマーカータンパク質として使用した。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 誘導性の Nrf2 の核内移動が抑制された。一方、全蛋白画分では、CEACAM1 ノックダウンによる CA β -glucan 誘導性の Nrf2 の発現に変化は認められなかった。

図 6 β -glucan 誘導性 HO-1 発現に対する CEACAM1 の影響

A ; RT7 における CA β -glucan 誘導性の HO-1 mRNA 発現に対する CEACAM1 特異的 siRNA の影響.

RT7 を CEACAM1 特異的 siRNA にて 48 時間トランスフェクションし、CA β -glucan にて 12 時間刺激した。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 β -glucan 誘導性の HO-1 mRNA の発現が抑制された。

B ; RT7 における SC β -glucan 誘導性の HO-1 mRNA 発現に対する CEACAM1 特異的 siRNA の影響.

RT7 を CEACAM1 特異的 siRNA にて 48 時間トランスフェクションし、SC β -glucan にて 12 時間刺激した。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 β -glucan 誘導性の HO-1 mRNA の発現が抑制された。

C ; RT7 における CA β -glucan 誘導性の HO-1 mRNA 発現に対する

CEACAM1 中和抗体の影響.

RT7 は CEACAM1 中和抗体およびコントロールとして Mouse IgG を用いて予め1時間程度インキュベートし, CA β -glucan にて12時間刺激した. コントロール Mouse IgG と比較し, CEACAM1 中和抗体を用いると, β -glucan 誘導性の HO-1 の発現が抑制された.

図7 β -glucan 誘導性 IL-8 発現に対する CEACAM1 の影響

- A ; RT7 を CEACAM1 特異的 siRNA にて48時間トランスフェクションし, CA 生菌にて12時間刺激した. 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 生菌添加によって IL-8 mRNA の発現がさらに増加した.
- B ; RT7 を CEACAM1 特異的 siRNA にて48時間トランスフェクションし, CA β -glucan にて12時間刺激した. 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 β -glucan 誘導性の IL-8 mRNA の発現がさらに増加した.

IX. 表および図

表 1

プライマーの塩基配列

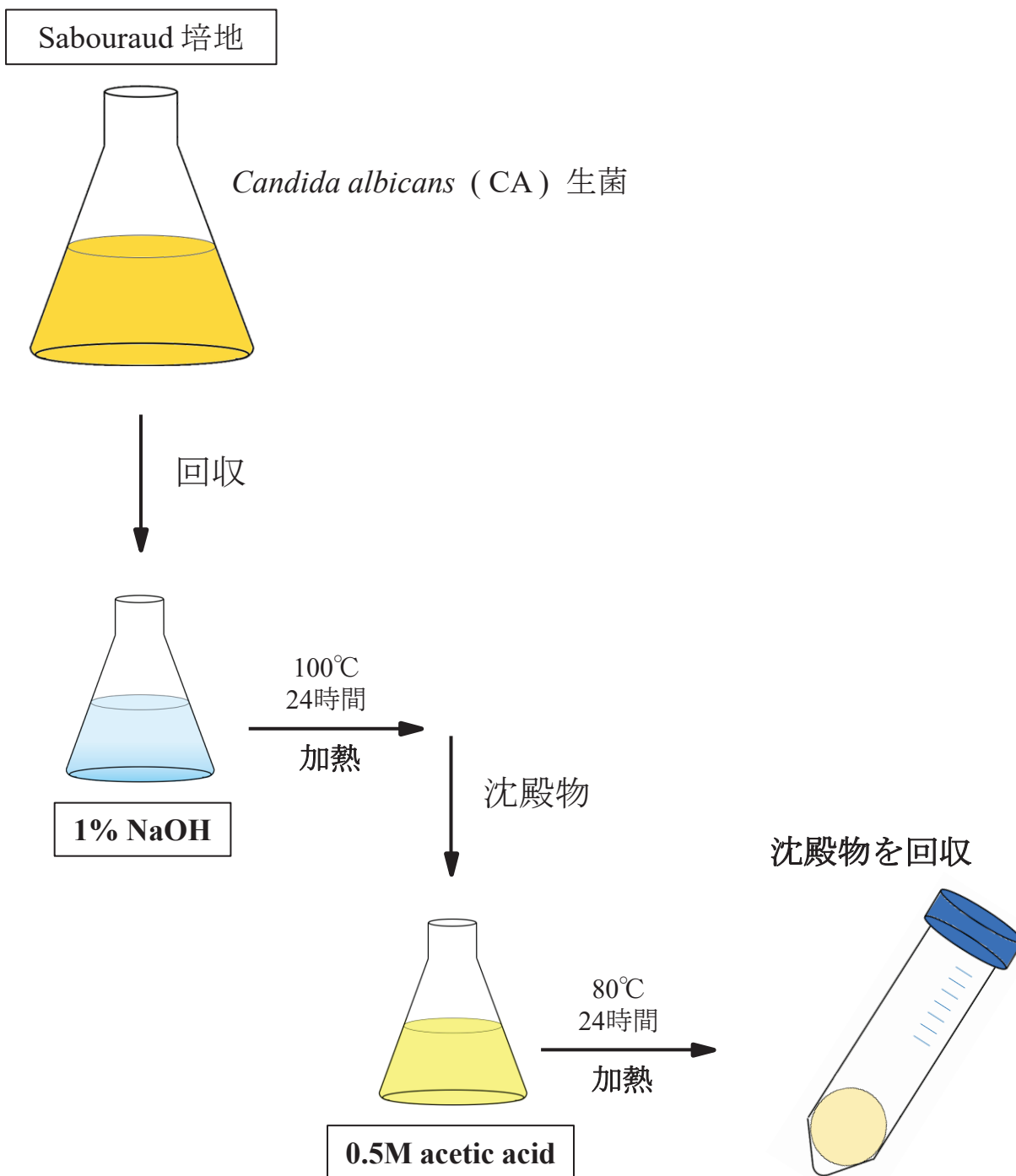
Target mRNA	Sequence of primer
CEACAM1	F:5'-TGACACAGGACCCTATGAGT-3'
	R:5'-ACTGTGCAGGTGGGTTAGAG-3'
HO-1	F:5'-TCCGATGGGTCCTTACACTC-3'
	R:5'-ATTGCCTGGATGTGCTTTTC-3'
IL-8	F:5'-TAGCAAAATTGAGGCCAAGG-3'
	R:5'-AAACCAAGGCACAGTGGAAC-3'
β -actin	F:5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'
	R:5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'

表 2

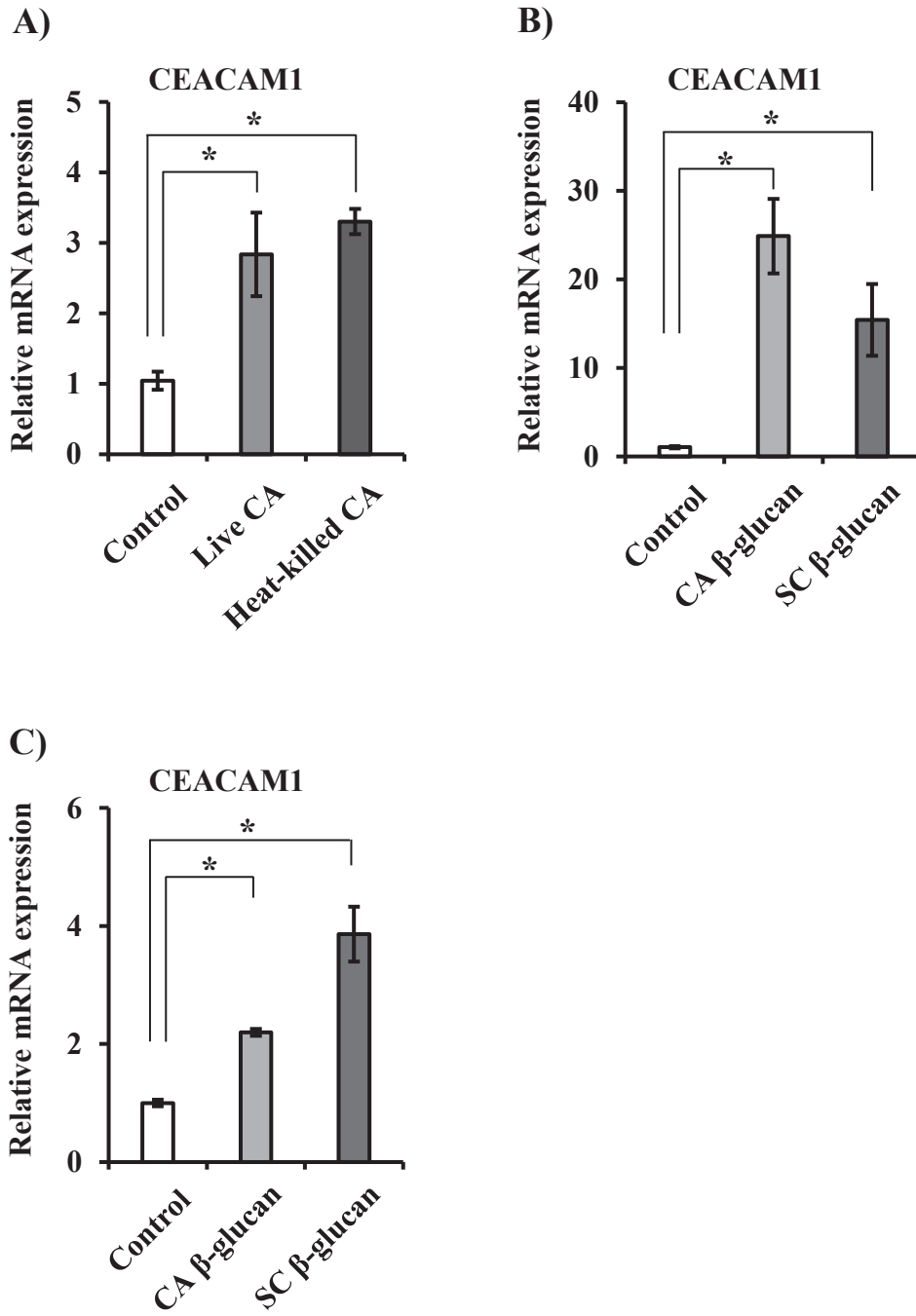
si RNA の塩基配列

Target RNA		Sequence of primer
CEACAM1 # 1		F:5'-CCAUUGCUGGCAUUGUGAUUGGAGU-3'
		R:5'-ACUCCAAUCACAAUGCCAGCAAUGG-3'
CEACAM1 # 2		F:5'-CCAGUCACCUUGAAUGUCACCUAUG-3'
		R:5'-CAUAGGUGACAUUCAAGGUGACUGG-3'

図1 *Candida albicans* β -glucan の抽出方法

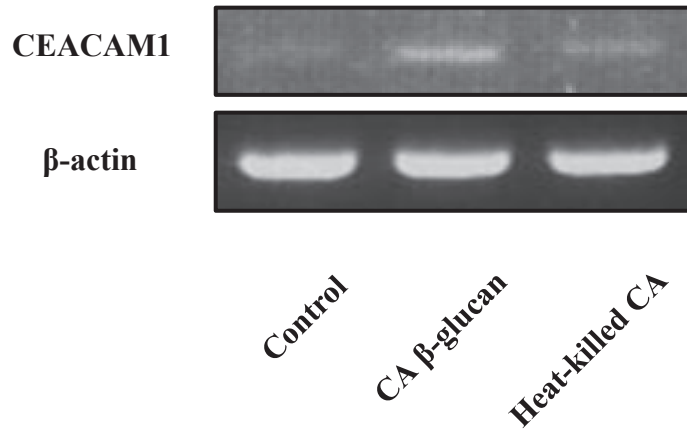


☒ 2

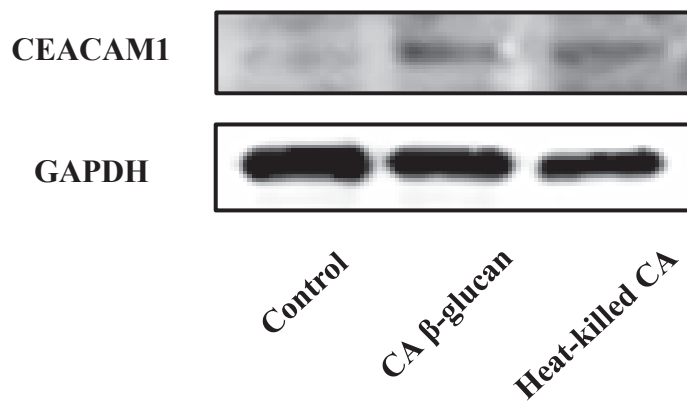


* : $p < 0.05$; Significantly different from control cell.

D)

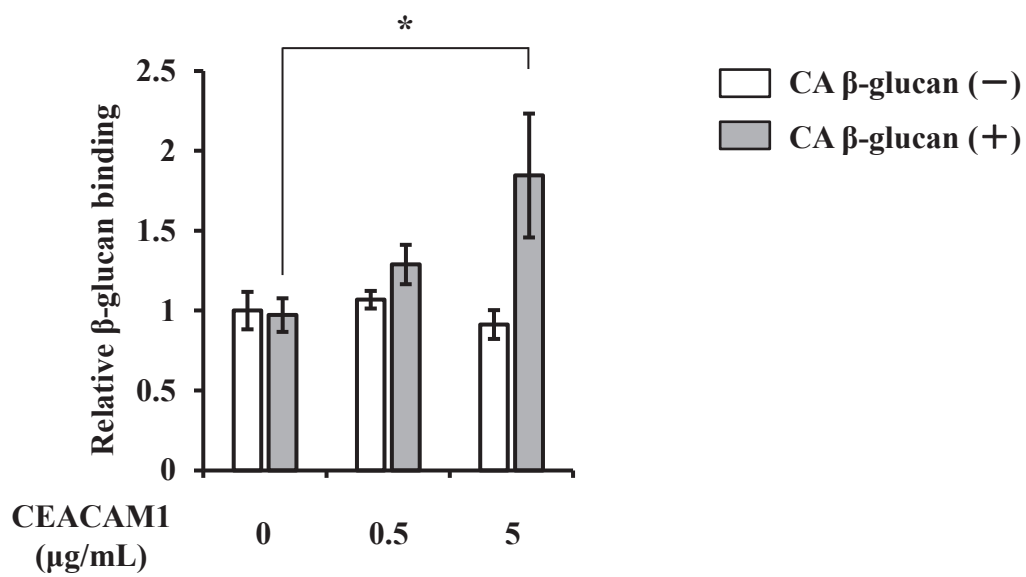


E)

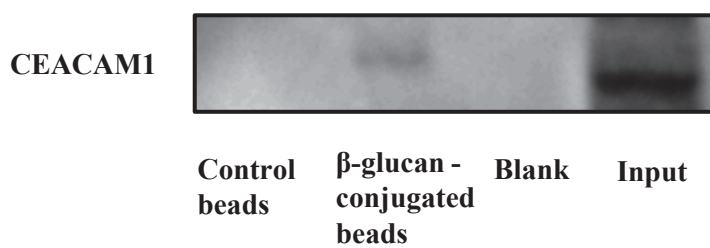


☒3

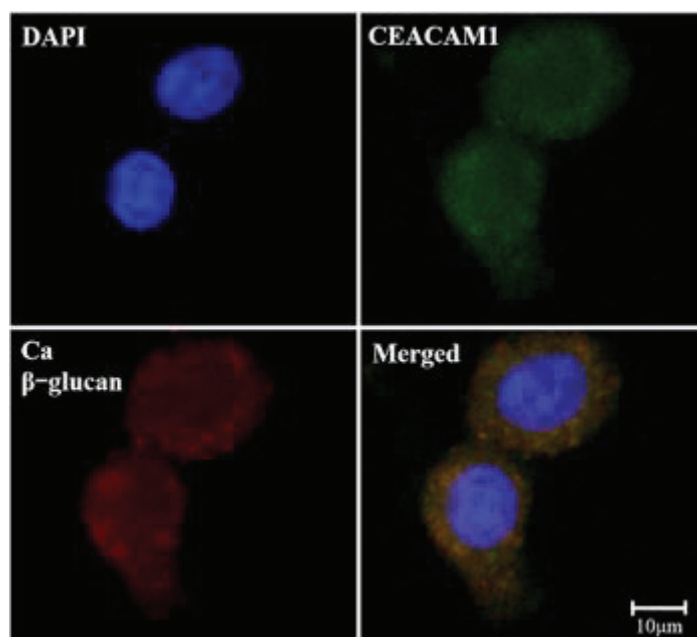
A)



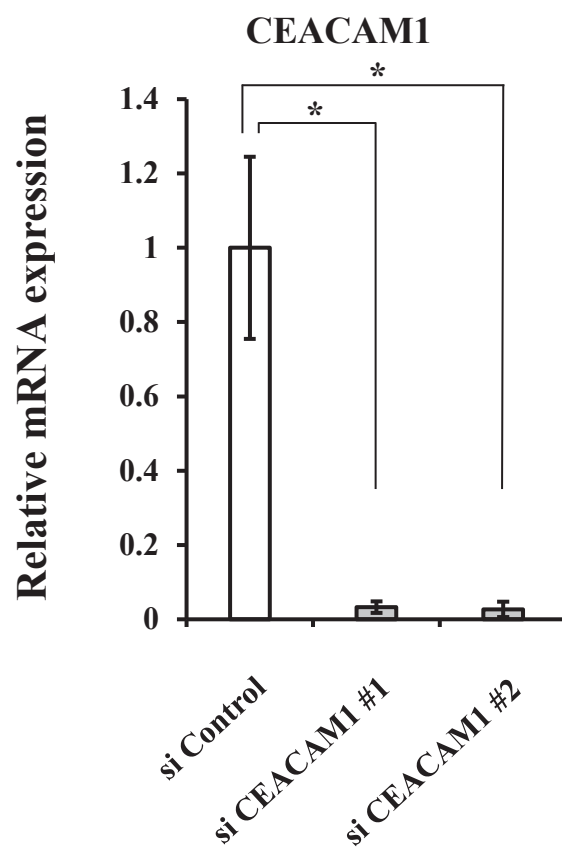
B)



C)

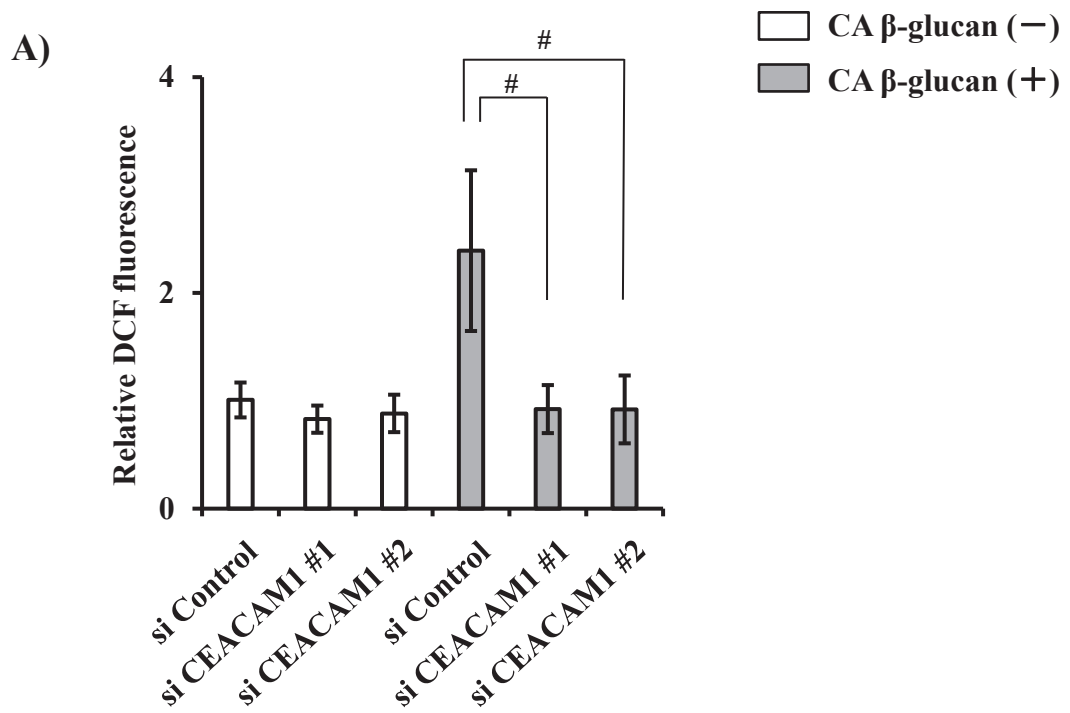


☒4

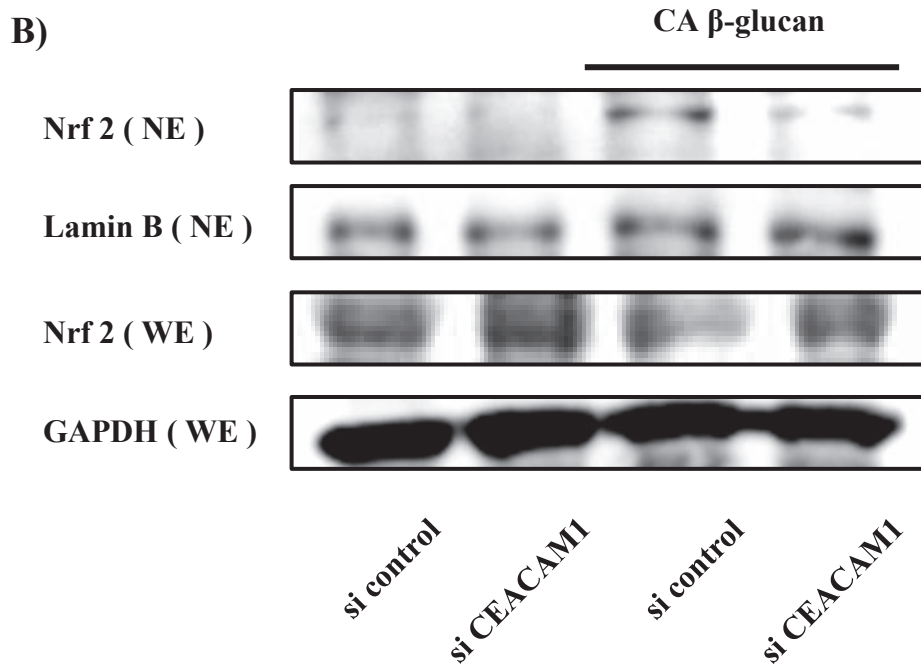


* : $p < 0.05$; Significantly different from si control cell.

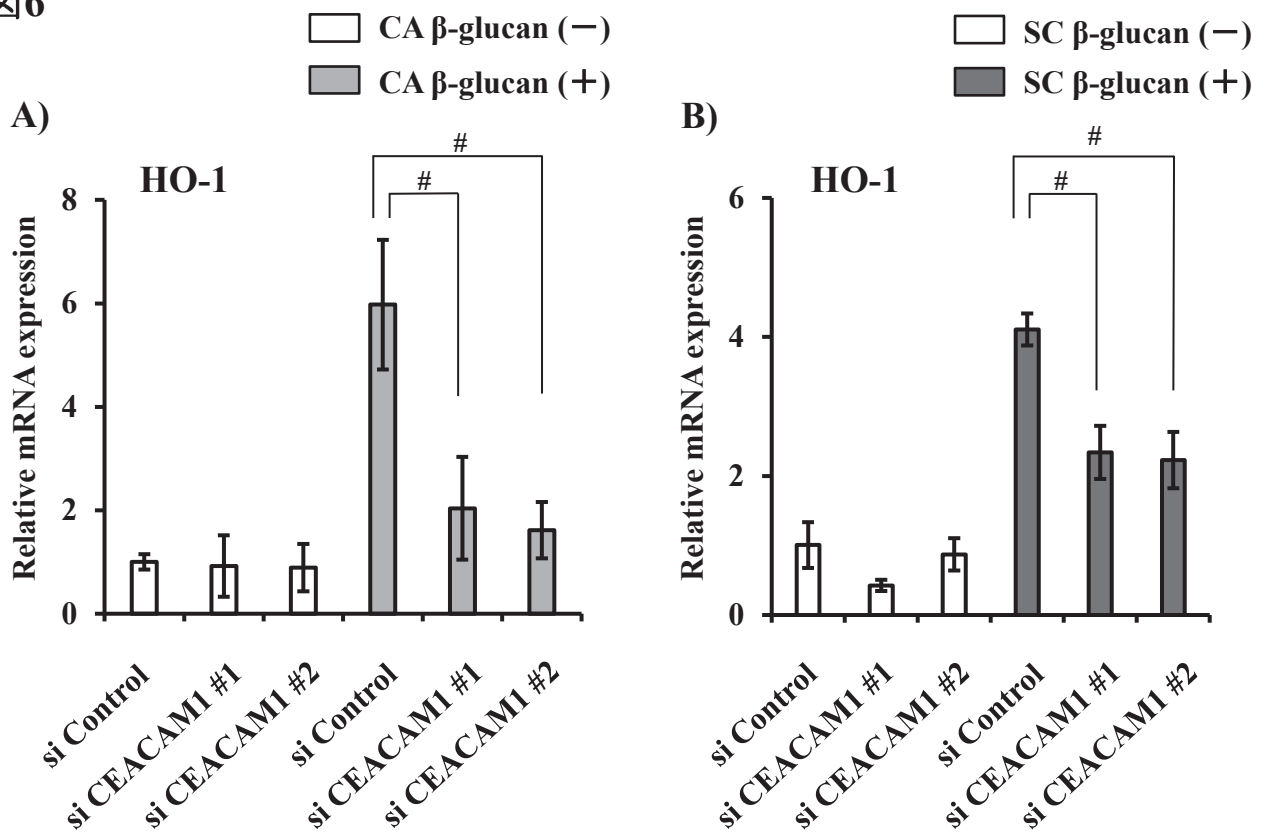
☒5



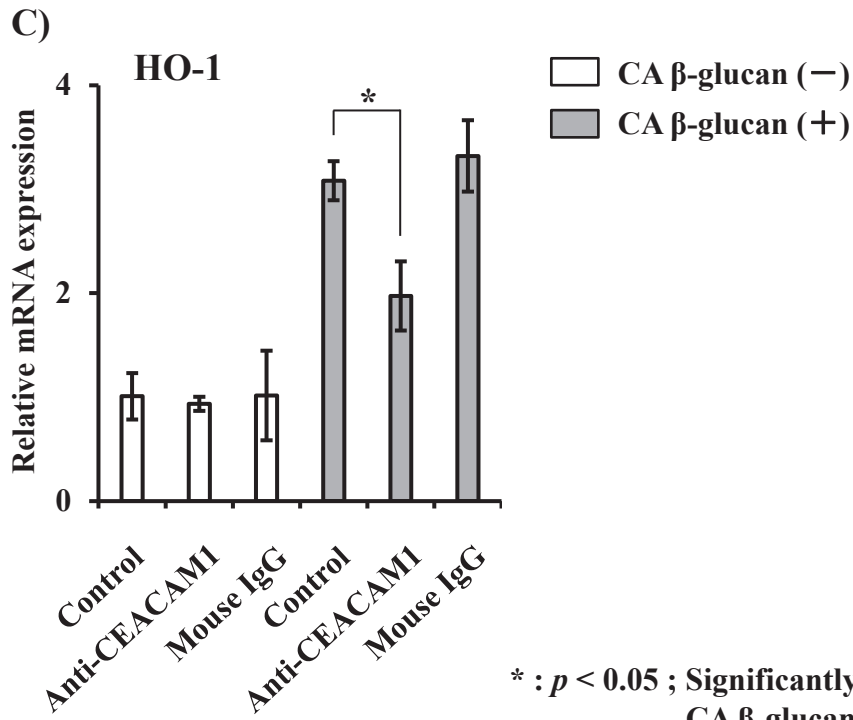
: $p < 0.05$; Significantly different from CA β-glucan stimulated si control cell.



6



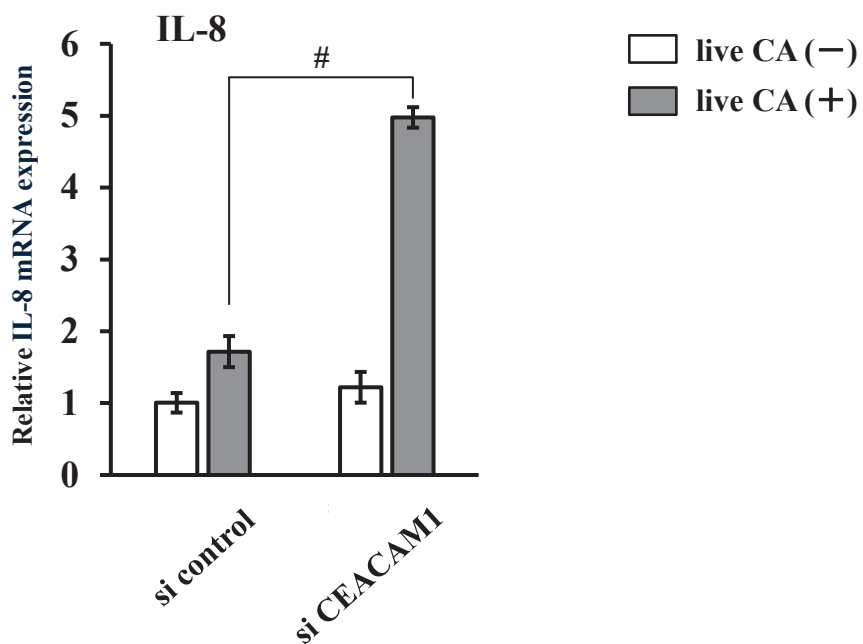
: $p < 0.05$; Significantly different from CA β -glucan stimulated si control cell.



* : $p < 0.05$; Significantly different from CA β -glucan stimulated cell.

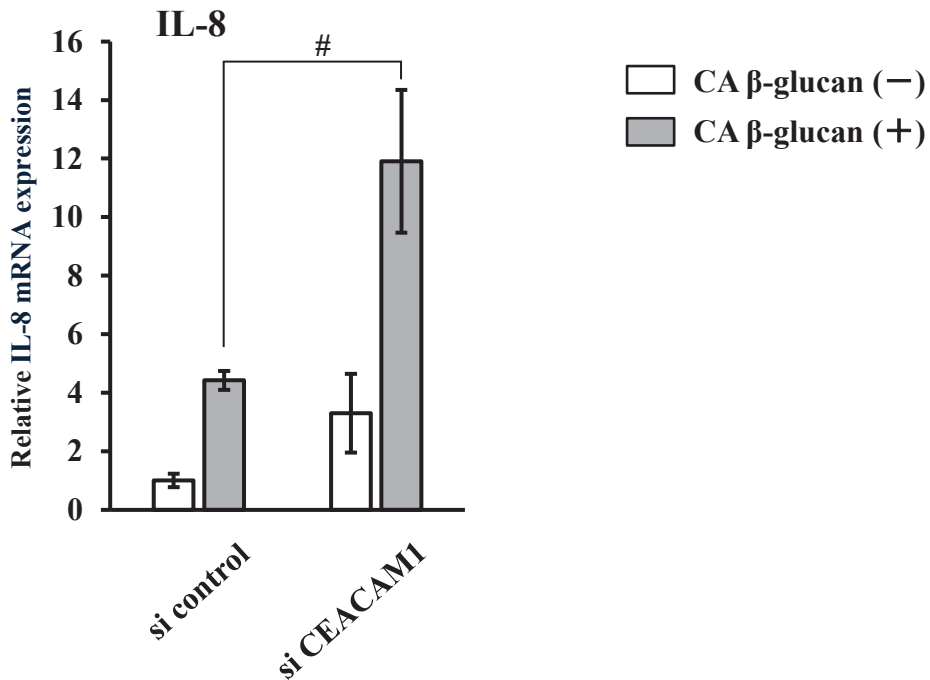
☒7

A)



: $p < 0.05$; Significantly different from live-CA stimulated si control cell.

B)



: $p < 0.05$; Significantly different from CA β -glucan stimulated si control cell.

