

Candida albicans 感染によるラット歯肉組織における
遺伝子発現の網羅的解析ならびに
ヒト気管上皮細胞における *C. albicans* 感染に対する
プロタミン加水分解ペプチドの効果

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

矢口 学

(指導：渋谷 鑛 教授)

**Analysis of Gene Expression in *Candida*
albicans-Infected Rat Gingival Tissue and
Effects of Hydrolyzed Protamine on Human Bronchial
Epithelial Cells Infected with *C. albicans***

Manabu Yaguchi

Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo, Special Needs
Dentistry, 870-1, Sakaecho-Nishi 2, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan
(Director : Koh Shibutani)

Key words : *Candida albicans*, aspiration pneumonia, hydrolyzed protamine,
Interleukin-6, Interleukin-8

Abstract

Candida albicans (*C. albicans*) is the fungus most commonly detected in association with humans, especially in the elderly and people with immunocompromised disorder. *C. albicans* cause not only periodontal lesions and oral candidiasis but also various systemic disorders such as aspiration pneumonia. However, the role of *C. albicans* in the chronic inflammation on

periodontal tissues and respiratory tract was not fully understood. Therefore, the aim of this study is to be clear the effect of *C. albicans* in those infectious diseases and to investigate an effective agent derived from natural materials; 1) The comprehensive gene expression analysis of gingival tissue in rat infected with *C. albicans* and 2) The effect of hydrolyzed protamine HAP-100 (ROHTO Pharmaceutical Co., Ltd. Japan) in human bronchial epithelial cell, BEAS-2B cell, infected with *C. albicans*.

Rat gingival tissue was infected with *C. albicans*. Total RNA was extracted from the gingival tissue and mRNA levels were monitored using DNA microarray. The gene expressions of IL-1 β and TNFR1B were highly detected in the gingival tissue infected with *C. albicans*. Ingenuity pathway analysis demonstrated that TNF and IL-1 induced gene expression of CC type Chemokine CCL2, also known as monocytes chemoattractant protein-1 (MCP-1), through NF- κ B pathway. These results suggest that *C. albicans* was important pathogen which induce inflammation in gingival tissue.

We examined to evaluate cell viability of BEAS-2B cell infected with *C. albicans*. And after *C. albicans* was cultured with HAP-100 in BHI broth, the number of colony was counted to evaluate growth. BEAS-2B cell was cultured with *C. albicans* under HAP-100. Total RNA was extracted from BEAS-2B cell and mRNA expression levels of IL-6 and IL-8 were determined by real-time PCR. Further, BEAS-2B cell was cultured with IL-1 β under HAP-100. IL-6 and IL-8 production and mRNA expression were measured by ELISA and real-time PCR respectively.

The cell viability of BEAS-2B cell was decreased in a time-dependent

manner in the presence of *C. albicans*. HAP-100 reduced growth and hyphal formation of *C. albicans* in a concentration-dependent manner. And then the enhanced IL-6 and IL-8 mRNA expressions on BEAS-2B cell infected with *C. albicans* were reduced in the presence of HAP-100. Further, the enhanced productions and mRNA expressions of IL-6 and IL-8 on BEAS-2B cell stimulated with IL-1 β were decreased in the presence of HAP-100.

Taken together, it is considered that HAP-100 could be candidate peptide that not only has anti-*C. albicans* activity via inhibiting growth and hyphal formation of *C. albicans* but also has anti-inflammatory activity on BEAS-2B cell.

要旨

口腔常在菌である *Candida albicans* (*C. albicans*) は、近年、歯周組織の慢性炎症や口腔カンジダ症などの口腔疾患との関連性が報告されているうえ、誤嚥性肺炎などの様々な全身疾患を誘発することが明らかになっている。しかしながら、*C. albicans* 感染による口腔疾患や誤嚥性肺炎の発症と進行への関与については未だ不明な点が多く、画期的な予防法の確立がなされていない。そこで本研究では *C. albicans* に注目し、研究課題として 1) *C. albicans* 感染によるラット歯肉組織における遺伝子発現の網羅的解析、2) ヒト気管上皮細胞における *C. albicans* 感染に対するプロタミン加水分解ペプチド HAP-100 の効果、について検討を加えた。

まず、*C. albicans* を感染させたラット歯肉組織から抽出した total RNA を用い、DNA microarray にて遺伝子発現変動を網羅的に検出し、Ingenuity pathway analysis (IPA) 解析を行った。その結果、*C. albicans* 感染群において IL-1 β や TNFR1B の遺伝子発現が対照群よりも 2 倍以上、CCL2 遺伝子は 1.7 倍高く検出され、IL-1 や TNF が炎症反応経路の一つである古典的経路を介して CCL2 の発現に関与していることが示された。

次に、気管上皮細胞である BEAS-2B 細胞に *C. albicans* を感染させ細胞生存率を確認した後、*C. albicans* に HAP-100 を添加し増殖能への影響を検討した。また、BEAS-2B 細胞に *C. albicans* ならびに HAP-100 を同時に添加し、細胞から抽出した total RNA を用いて IL-6 および IL-8 の遺伝子発現を real-time PCR 法にて確認した。さらに、BEAS-2B 細胞に炎症性サイトカインである IL-1 β ならびに HAP-100 を同時に作用させ、培養上清を用いて ELISA 法にて IL-6 および IL-8 の産生量を測定し、total RNA を用いて real-time PCR 法にて遺伝子

発現を確認した。

C. albicans は BEAS-2B 細胞に対し酵母形から菌糸形へ形態変化し接着することが示され、時間依存的に細胞生存率を低下させた。HAP-100 は *C. albicans* の増殖能および菌糸形への形態変化能を抑制し、さらに、BEAS-2B 細胞において *C. albicans* 感染によって上昇した IL-6 および IL-8 の遺伝子発現を抑制した。また、IL-1 β で刺激した BEAS-2B 細胞において、HAP-100 添加により *C. albicans* 感染実験と同様に上昇した IL-6 および IL-8 の産生量ならびに遺伝子発現レベルが減少した。

以上のことから、HAP-100 は *C. albicans* の増殖能および菌糸形への形態変化能の抑制による抗真菌作用を有するだけでなく、BEAS-2B 細胞において炎症抑制作用を有する可能性が示唆された。従って、プロタミン加水分解ペプチド HAP-100 は BEAS-2B 細胞における慢性炎症の発症と進行の予防に有効であると考えられた。

緒言

口腔常在菌は歯周病や齲蝕などの口腔疾患のみならず様々な全身疾患を誘発することが明らかになってきている^{1~4}。特に誤嚥性肺炎は、要介護高齢者において QOL の低下や死亡の直接的原因の一つとなる重大疾患である。誤嚥性肺炎の多くが不顕性誤嚥であり、その起因菌として *Candida albicans* (*C. albicans*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Fusobacterium nucleatum* などの口腔常在菌が報告されている^{5,6}。なかでも *C. albicans* は、口腔機能が低下した高齢者や免疫不全患者の口腔内から高頻度で検出され^{7,8}、口腔カンジダ症を発症させることは周知の事実である。そして近年、*C. albicans* は慢性歯周炎患者の歯肉縁下プラーク^{9,10}や感染根管¹¹からも検出されており、歯周病原菌との共凝集や相互作用によるバイオフィルム形成や増殖への関与が指摘されている^{12~14}他、*P. gingivalis* のヒト歯肉上皮細胞および線維芽細胞への接着を増強するという報告¹⁵もある。ヒト口腔上皮細胞は、局所的な *C. albicans* 感染に対して初期の免疫応答において重要な役割を担っており、炎症性サイトカインやケモカインを産生すると言われている^{16~18}。しかしながら、*C. albicans* 感染による慢性炎症の発症と進行のメカニズムについては未だ不明な点が多い。そこで、歯肉組織の *C. albicans* に対する応答性についての検討を研究課題の一つとし、ラット歯肉組織に *C. albicans* を感染させ、炎症関連物質の遺伝子発現変動を DNA microarray にて網羅的に検索した。

近年、介護施設において専門的な口腔のケアを継続実施した群では肺炎の発症率が対照群よりも有意に低下したとの米山ら¹⁹の報告によって、口腔からの誤嚥性肺炎予防が注目されている。しかしながら、心身機能が低下している場

合はセルフケアを十分に行えないことも多く、日常の場面において、専門的な口腔のケアを継続的に実施することは困難である。さらに、超高齢社会である我が国では、在宅介護や施設介護が増加しており、定期的かつ継続的な口腔のケアは、家族をはじめ、施設職員にとって負担となっていることが多い。従って、より簡便で効果的な予防法の確立が必要であり、口腔のケア製品は有用な手段であると考えられる。近年、抗菌性を有する天然素材であるカテキン、ポリフェノール、ヒノキチオール、植物性乳酸菌が産生する抗菌物質など^{20~23)}を利用した口腔のケア製品が数多く開発されている。しかしながら、その効果に関して細胞レベルでのメカニズムまで網羅した報告は少なく、明確な科学的根拠が得られているとは言い難い。また、現在までに口腔上皮細胞を標的とした *C. albicans* の感染実験は行われているものの、呼吸器領域での検討は少なく、細胞レベルでの応答性については未だ不明な点が多い。

そこで本研究では、ヒト気管上皮細胞の *C. albicans* に対する応答性ならびに口腔のケア製品の新規開発への可能性を検討することをもう一つの研究課題とし、抗菌性を有し天然物由来で安全性が高く食品保存料としても広く利用されているプロタミンに着目した。プロタミンは、サケ白子の主成分である精子に DNA と結合した形で存在している蛋白質で、32~33 個のアミノ酸で構成されており、一般細菌だけでなく歯周病原菌である *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* に対し抗菌作用を示すことが報告されている^{24,25)}。義歯へのコーティングを検討した Miura ら²⁶⁾は、プロタミンをプロテアーゼで処理したプロタミン加水分解ペプチドがプロタミンよりも *C. albicans* に対して抗真菌作用が強力であると報告している。しかし、プロタミン加水分解ペプチドの細胞レベルでの応答性についての報告はなされていない。従って、本研究では、*C. albicans* に対するプロタミン加水分解ペプチドである

HAP-100[®]（ロート製薬株式会社，Tokyo，Japan）の有効性について，ヒト気管上皮細胞（BEAS-2B：ATCC[®]CRL-9609TM）を用いて検討を加えた。

上記の二つの研究課題を基本とし実験を行った結果，*C. albicans*はラット歯肉組織における慢性炎症に関与し，また，HAP-100は*C. albicans*に対する抗真菌作用のみならず，気管上皮細胞においては直接的な抗炎症作用を有することから，口腔のケア製品としての有用性だけでなく，その効果は全身をも網羅できる可能性があることが示唆されたため報告する。

材料および方法

1. *C. albicans* 感染によるラット歯肉組織における網羅的遺伝子発現の解析

1.1 使用菌株

C. albicans (ATCC®90029™) を BHI ブロス (Brain heart infusion broth ; BD Biosciences, Sparks, USA) にて, 37°C, 24 時間振盪培養した後, 3000 rpm で 5 分間遠心分離し, 沈渣を生理食塩液にて 3 回洗浄し, 必要な濃度に生理食塩液で懸濁して各々の実験に供した。

1.2 動物実験

7 週齢 Sprague-Dawley 系雄性ラット (三協ラボサービス株式会社, Tokyo, Japan) を 1 週間の予備飼育の後, 体重が一定になったことを確認し, 実験に使用した。ラットにペントバルビタールナトリウムを 30 mg/kg で腹腔内注射し, 麻酔下にて 1×10^8 colony forming unit (CFU) /ml の *C. albicans* と 2%カルボキシメチルセルロースの混合液を歯肉組織に塗布した。対照群には同量の生理食塩液を塗布した。なお, 対照群ならびに *C. albicans* 感染群には各々 5 匹のラットを使用した。本動物実験は日本大学松戸歯学部動物実験倫理に関する指針 (#08-0004) に従って行った。

1.3 DNA microarray 解析ならびに Ingenuity pathway analysis (IPA) 解析

ラットにペントバルビタールナトリウムを 30 mg/kg で腹腔内注射し, 麻酔下にて歯肉組織を切除し, Trizol (GIBCO BRL, Life Technologies, Rockville,

USA) を用いて Fast Prep™ マシン (MP Biomedicals, Solon, USA) にて攪拌処理した後, Ambion RNA queous Kit (Ambion, Austin, USA) で total RNA を抽出した。cDNA 合成は, Superscript II RNaseH (-) reverse transcriptase (GIBCO BRL, Life Technologies, Rockville, USA) を使用し, oligo d (T)₁₂₋₁₈ プライマーを加え, 42°C, 1 時間で反応させた。蛍光ラベル化 cRNA は Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent, Santa Clara, USA) を使用して合成した。3.5 µg の Cyanine3 (Cy3) ラベル化 cRNA を Agilent 社のプロトコールに従って Agilent 44K Whole Rat Genome Oligo Microarray (41,000 rat genes and transcripts; Agilent, Santa Clara, USA) にハイブリダイズした後, GeneArray Scanner (Agilent, Santa Clara, USA) でスキャンをし, GeneSpring 4.0 software (Silicon Genetics, Redwood City, USA) を使用して画像解析を行った。データ解析には, GeneChip Expression Analysis software (Affymetrix, Santa Clara, USA) および GeneSpring software (Silicon Genetics, Redwood City, USA) を使用した。IPA 解析は, IPA software version 4.0 (Ingenuity Systems, Mountain View, USA) を使用した。

1.4 Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) による解析

RT-PCR による解析は Roter-Gene™ 6000 (Corbett Life Science, Sydney, Australia) を使用して行った。C-C motif chemokine 2 (CCL2) のプライマー (Table 1) を用い, Taq DNA polymerase にて 95°C 15 秒で熱変性した後, 95°C 5 秒, 56°C 15 秒, 72°C 60 秒の 3 段階で設定し, 40 サイクルで RT-PCR を行った。PCR 産物は 2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い, エチジウムブロマイドにて染色した。

2. ヒト気管上皮細胞における *C. albicans* 感染に対するプロタミン加水分解ペプチド HAP-100 の効果

2.1 使用菌株

C. albicans (ATCC®90029™) を 1.1 と同条件で振盪培養した後、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、沈渣を Phosphate Buffered Saline (PBS) にて 3 回洗浄し、必要な濃度に PBS で懸濁して各々の実験に供した。

2.2 ヒト気管上皮細胞の培養

ヒト気管上皮細胞株の BEAS-2B 細胞 (BEAS-2B : ATCC®CRL-9609™) を 10% ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum ; FBS) および抗菌薬 (50 units/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin ; GIBCO, NY, USA) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM ; Sigma, St. Louis, USA) にて 37°C, air 95%, CO₂ 5% の条件下で継代培養し、実験に供した。

2.3 プロタミン加水分解ペプチド

プロタミンをブロメライン酵素で処理した加水分解ペプチド (アミノ酸配列: VSRRRRRRGRRRR) の HAP-100® (ロート製薬株式会社, Tokyo, Japan) をロート製薬株式会社より提供を受け、実験に供した。

2.4 *C. albicans* 感染による BEAS-2B 細胞の生存率の検討

BEAS-2B 細胞を 6 well 培養プレートに 2×10^5 細胞/well になるように播種し、

18 時間培養後, FBS および抗菌薬を含まない D-MEM に交換し, 1×10^5 CFU/well の *C. albicans* を感染させ, 8, 12 および 24 時間後に Trypan blue にて染色を行い Countess™自動セルカウンター (invitrogen, Eugene, USA) を用いて細胞生存率の測定を行った。なお, 対照群には PBS のみを添加した。

2.5 HAP-100 による *C. albicans* 増殖能抑制効果の測定

BHI ブロスに HAP-100 を 0.1 ~ 2 mg/ml の濃度で添加し, 5×10^7 CFU/ml の *C. albicans* を 37°C で 18 時間振盪培養した後, *C. albicans* の選択培地である Sabouraud 寒天培地に塗布し, 発育コロニー数を測定し, CFU/ml で示した。

2.6 HAP-100 による BEAS-2B 細胞の生存率への影響

BEAS-2B 細胞を 6 well 培養プレートに 2×10^5 細胞/well になるように播種し, 18 時間培養後, FBS および抗菌薬を含まない D-MEM にて HAP-100 を 0.1 μ g/ml ~ 500 μ g/ml の濃度で添加し, 8 時間後に細胞を回収し, Trypan blue にて染色を行い Countess™自動セルカウンター (invitrogen, Eugene, USA) を用いて細胞生存率の測定を行った。

2.7 *C. albicans* の BEAS-2B 細胞への接着および形態変化に対する HAP-100 の影響

BEAS-2B 細胞を Culture slide (BD Falcon, Bedford, UK) に 2.5×10^4 細胞/well になるように播種し, 18 時間培養後, FBS および抗菌薬を含まない D-MEM にて 1.25×10^4 CFU/well の *C. albicans* を感染させ, 共に HAP-100 を 50 μ g/ml で添加した。なお, 対照群には PBS のみを添加した。HAP-100 の添加濃度は, 2.6 の実験結果から決定した。1.5, 4, 8 および 24 時間後にそれ

ぞれ PBS にて 3 回洗浄し, 10%ホルマリンで 10 分間固定をした後, 通法に従い PAS 染色を行い, 光学顕微鏡にて *C. albicans* の BEAS-2B 細胞への接着と HAP-100 による影響を観察した。

2.8 *C. albicans* 感染による BEAS-2B 細胞における Interleukin-6 (IL-6) および Interleukin-8 (IL-8) 遺伝子発現の解析

BEAS-2B 細胞を 6 well 培養プレートに 2×10^5 細胞/well になるように播種し, 18 時間培養後, FBS および抗菌薬を含まない D-MEM にて 1×10^5 CFU/well の *C. albicans* を感染させ, 共に HAP-100 を 50 $\mu\text{g/ml}$ で添加した。8 時間後に RNeasy Mini Kit (Qiagen, Dusseldorf, Germany) で total RNA を抽出し, QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Dusseldorf, Germany) を用いて cDNA を合成した。この cDNA を鋳型とし, KAPA[®] SYBR FAST qPCR Kit (Kapa Biosystems, Boston, USA) と IL-6 および IL-8 のプライマー (Table 2) を用い, Eco[™] Real-Time PCR System (Illumina, San Diego, USA) にて 95°C 30 秒で熱変性した後, 95°C 5 秒, 60°C 20 秒の 2 段階で設定し, 45 サイクルで real-time PCR を行い, IL-6 および IL-8 の遺伝子発現を解析した。

2.9 Interleukin-1 β (IL-1 β) 刺激による BEAS-2B 細胞における IL-6 および IL-8 産生量の測定

BEAS-2B 細胞を 24 well 培養プレートに 5×10^4 細胞/well になるように播種し, 18 時間培養後, FBS および抗菌薬を含まない D-MEM にて recombinant human IL-1 β (R&D systems, Minneapolis, USA) を 0.1 ng/ml で作用させ, 共に HAP-100 を 50 $\mu\text{g/ml}$ で添加した。8, 12 および 24 時間後の培養上清を試料とし, ELISA Kit (Affymetrix, San Diego, USA) を用い, 吸光度 450 nm

にて IL-6 および IL-8 産生量を測定した。

2.10 IL-1 β 刺激による BEAS-2B 細胞における IL-6 および IL-8 遺伝子発現の解析

BEAS-2B 細胞を 6 well 培養プレートに 2×10^5 細胞/well になるように播種し、18 時間培養後、FBS および抗菌薬を含まない D-MEM にて 0.1 ng/ml の IL-1 β を作用させ、共に HAP-100 を 50 μ g/ml で添加した。1.5, 8 および 12 時間の total RNA を抽出後、cDNA を合成し、2.8 と同条件で real-time PCR を行い、IL-6 および IL-8 遺伝子発現を解析した。

2.11 統計分析

実験結果は、平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm SD) で示した。実験群は、対照群、*C. albicans* を感染させた群 (*C. albicans* 感染群)、IL-1 β で刺激した群 (IL-1 β 作用群) ならびに HAP-100 を添加した群 (HAP-100 添加群) とした。2 群間の比較には Student's *t*-test を用い、その他の比較は一元配置分散分析に従い、Tukey-Kramer test を用いた。

結果

1. *C. albicans* 感染によるラット歯肉組織における網羅的遺伝子発現の解析

1.1 DNA microarray 解析ならびに IPA 解析

DNA microarray 解析から得られた Raw データを Table 3 に示す。*C. albicans* 感染群において IL-1 β や TNFR1B の遺伝子発現が対照群と比較して 2 倍以上高く、CCL2 は 1.7 倍高く検出された。さらに、IPA 解析を行ったところ、IL-1 および TNF によって nuclear factor-kappa B (NF- κ B) を経由した炎症応答における古典的経路を介して CCL2 が発現することが示された (Fig.1)。

1.2 RT-PCR による解析

DNA microarray による結果を RT-PCR にて確認したところ、*C. albicans* 感染群における CCL2 遺伝子発現は対照群と比較して高く検出された (Fig. 2)。一方で、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH の発現レベルは対照群と *C. albicans* 感染群に差を認めなかった。

2. ヒト気管上皮細胞における *C. albicans* 感染に対するプロタミン加水分解ペプチド HAP-100 の効果

2.1 *C. albicans* 感染による BEAS-2B 細胞への影響

C. albicans 感染 12 時間以降では BEAS-2B 細胞の生存率が有意に低下した (Fig. 3)。

2.2 HAP-100 による *C. albicans* 増殖能への影響

C. albicans の発育コロニー数は HAP-100 添加濃度依存的に減少した (Fig. 4)。

2.3 HAP-100 による BEAS-2B 細胞の生存率への影響

HAP-100 添加 8 時間後における BEAS-2B 細胞の細胞生存率は、50 $\mu\text{g/ml}$ まで維持され、250 $\mu\text{g/ml}$ 以上で低下した (Fig. 5)。

2.4 *C. albicans* の BEAS-2B 細胞への接着および形態変化に対する HAP-100 の影響

C. albicans 感染群では 1.5 時間において酵母形と発芽管形成を示す *C. albicans* が混在し、BEAS-2B 細胞への接着が一部にみられた。さらに、4 時間以降からは時間依存的に菌糸形発育を示し、BEAS-2B 細胞への接着が認められた。一方で、HAP-100 添加群では 1.5 時間および 4 時間においてわずかに酵母形を示す *C. albicans* を認めたものの、菌糸形を示すものは認められず、8 時間以降では BEAS-2B 細胞への接着を認めなかった (Fig. 6)。

2.5 *C. albicans* 感染による BEAS-2B 細胞における IL-6 および IL-8 遺伝子発現

C. albicans 感染群で IL-6 および IL-8 の遺伝子発現は対照群と比較して有意に上昇し、HAP-100 添加群では上昇が有意に抑制された (Fig. 7a, b)。

2.6 IL-1 β 刺激による BEAS-2B 細胞における IL-6 および IL-8 産生量ならびに遺伝子発現

培養上清中における IL-6 および IL-8 産生量は共に、すべての作用時間において IL-1 β 作用群で対照群に比べ有意に高く、HAP-100 添加群では IL-1 β 作用群と比較して有意に低かった (Fig. 8a, b)。

IL-6 および IL-8 遺伝子発現は、IL-1 β 作用群においてすべての作用時間で対照群と比較して有意に上昇し、特に 1.5 時間では著しく上昇した。HAP-100 添加群においては、IL-6 遺伝子発現は 1.5 時間および 12 時間では有意な上昇抑制を認めたが、8 時間では抑制傾向を示したものの有意差は認めなかった。一方、IL-8 遺伝子発現はすべての作用時間において上昇が有意に抑制された (Fig. 9a, b)。

考察

ラット歯肉組織において *C. albicans* 感染群では、IL-1 β や TNFR1B などの炎症関連物質の遺伝子発現が対照群と比較して高く検出された。歯肉上皮細胞は、歯周病原菌に対して最前線に位置し宿主防御において重要な役割を担っており、自然免疫機能を有する²⁷⁾一方で、*C. albicans* 感染ならびに lipopolysaccharide (LPS) 刺激によって IL-6 や IL-8 などの炎症関連物質を産生し、炎症の惹起と進行に関与している^{28~30)}。*C. albicans* は、歯周病原性プラークの基盤を形成しており歯肉上皮細胞に接着し³¹⁾、様々な生物活性を引き起こす^{32,33)}。本研究においても *C. albicans* が酵母形から菌糸形へ形態変化し BEAS-2B 細胞へ接着することを明らかにしている。二形性真菌である *C. albicans* は、酵母形から発芽管を形成して菌糸形へ形態を変化させ宿主細胞に接着し感染すると言われており³⁴⁾、菌糸形の方がより強い病原性を示すことが知られている³⁵⁾。以上のことから、*C. albicans* 感染によるラット歯肉組織における IL-1 β や TNFR1B などの炎症関連物質の遺伝子発現の上昇は、*C. albicans* が菌糸形へ形態変化して歯肉組織に接着し、生物活性を誘発した結果である可能性が考えられた。また、IPA 解析から IL-1 および TNF によって免疫応答において中心的役割を担う転写因子である NF- κ B の古典的経路を介して CCL2 が発現することが示された。DNA microarray 解析による結果においても、*C. albicans* 感染群の CCL2 遺伝子発現は対照群と比較して高く検出され、RT-PCR 解析においても確認された。CCL2 は monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) としても知られている CC サブファミリーに属するケモカインであり、様々な細胞において恒常的もしくは刺激応答によって産生され、単球の走化性を誘発し炎症細胞を活性化させることが知られている^{36,37)}。過去にもヒト口腔上皮細胞において *C. albicans* 感

染によって CCL2 の産生量が増加するという報告³⁸⁾がある。これらのことから、*C. albicans* は菌糸形で歯肉上皮細胞に接着し IL-1 や TNF を産生させ、NF- κ B を介して CCL2 の産生を誘導し、重篤な炎症反応を引き起こしている可能性が考えられた。このように、*C. albicans* が歯肉組織の炎症応答に関与していることが示唆されたため、次に、ヒト気管上皮細胞の BEAS-2B 細胞における *C. albicans* 感染に対する細胞応答性を確認し、さらにそれに対するプロタミン加水分解ペプチド HAP-100 の効果について検討した。

BEAS2-B 細胞は、*C. albicans* 感染 12 時間で約 80% の細胞が死滅した。また、*C. albicans* が経時的に酵母形から菌糸形へ形態変化し、BEAS-2B 細胞へ接着することが確認された。菌糸形へ形態変化した *C. albicans* が BEAS-2B 細胞に接着し細胞生存率に影響を与えたと考えられた。この結果は、Egusa ら³⁰⁾ の歯肉上皮細胞に接着した菌糸形の *C. albicans* がネクロシスおよびアポトーシスを引き起こすとの報告と同様であった。つまり、気管上皮細胞に対する *C. albicans* の長時間停滞は炎症のみならず細胞為害性を誘発し生体に強い影響を与える可能性が考えられた。

本研究において HAP-100 は、過去の報告²⁶⁾と同様に *C. albicans* の増殖能を抑制することが示されたが、250 μ g/ml 以上では BEAS-2B 細胞の生存率をも低下させることから高濃度では細胞為害性を示すことが考えられた。そこで、HAP-100 が細胞為害性を示さない 50 μ g/ml で *C. albicans* に対する効果を検討した。*C. albicans* の菌糸形成は病原性の発現に重要な役割を担っており、本研究の結果から、HAP-100 は *C. albicans* の増殖抑制の働きをするだけでなく、菌糸形への形態変化をも抑制する可能性が示唆された。IL-6 および IL-8 は慢性炎症性疾患の病態進展に深く関与しており、これまでも歯肉上皮細胞において *C. albicans* 感染によって IL-6 および IL-8 の遺伝子発現が上昇するという報

告^{29,30)}がある。本研究においても同様の結果が得られたことから、*C. albicans* は気管上皮細胞における慢性炎症の病態進展に関与していることが示唆された。そして、HAP-100 は BEAS-2B 細胞において *C. albicans* に対する増殖能抑制および菌糸形発育抑制をすることで、IL-6 および IL-8 の遺伝子発現の上昇を抑制したと考えられた。

近年、様々な上皮細胞において IL-1 β 刺激により IL-6 および IL-8 が誘導されることが明らかになっており^{39,40)}、本研究でも BEAS-2B 細胞において IL-1 β 作用群の IL-6 および IL-8 の産生量ならびに遺伝子発現は対照群と比較して有意に上昇した。過剰な炎症性サイトカイン産生は組織障害を引き起こし肺炎の重症化に繋がるという報告^{41,42)}があり、IL-1 β がサイトカインネットワークを活性化し、他の炎症性サイトカインが持続的に産生されることで BEAS-2B 細胞における炎症応答を増大させるのではないかと考えられた。さらに、興味深いことに、IL-1 β 刺激で増加した IL-6 および IL-8 の産生量も HAP-100 添加によって有意に減少した。このことは、HAP-100 が間接的だけではなく直接的な抗炎症作用をも有する可能性を示唆している。特に、IL-8 は好中球の遊走と活性化を誘導し、呼吸器感染において好中球を局所に浸潤させる⁴³⁾ことが知られている。BEAS-2B 細胞において IL-1 β によって誘導された IL-8 産生の増加は、様々な機能が低下した高齢者や免疫能力が低下している場合は症状を増悪させる可能性があると考えられる。従って、HAP-100 添加によって IL-8 産生量が抑制されたことは、今後の臨床応用に向けて有用な結果であると考えられる。

一方、*C. albicans* 感染実験と IL-1 β 刺激実験とで BEAS-2B 細胞における HAP-100 による IL-6 遺伝子発現の上昇抑制効果が異なる結果となった。炎症の急性期に分泌される IL-6 は、IL-6 受容体に結合することで様々な経路によって細胞内にシグナルを伝達し、炎症促進性あるいは抗炎症性に働くサイトカイ

ンの産生に関与している⁴⁴⁾。また、炎症性サイトカインやケモカインは、自己分泌増殖因子としての働きや、他のサイトカインシグナルとのクロストークなど複雑な細胞内シグナル伝達経路を有しており未だ不明な点が多い。従って、今後 BEAS-2B 細胞における細胞内シグナル伝達経路への HAP-100 の関与について詳細な検討が必要であると考えられた。

本研究において HAP-100 が *C. albicans* に対する抗真菌作用を有するだけでなく、炎症性サイトカインの遺伝子発現に作用することで BEAS-2B 細胞における炎症抑制作用を有する可能性が示唆されたことは、非常に有意義であると考えられる。口腔機能が低下した要介護高齢者における肺炎の多くは不顕性誤嚥をきっかけとして発症する。本研究で *C. albicans* は気管上皮細胞に対しても重篤な炎症症状を誘発させることが明確になり、下気道に落ち込む口腔常在菌の菌量を減少させることの重要性を裏付けるものであると考えられる。誤嚥性肺炎の予防法として口腔からのアプローチは重要であり、今後の展開として HAP-100 の *C. albicans* 増殖能および病原性抑制作用による口腔での利用方法の検討、さらには炎症抑制作用を利用した口腔ならびに呼吸器官をターゲットとした薬剤開発の検討をしていくことで、本研究の結果が臨床場面への応用に向けて有用なものになると考えている。

結論

1. *Candida albicans* は歯肉組織の炎症応答を誘発し、その炎症応答の増大にケモカインである C-C motif chemokine 2 (CCL2) が関与していることが示唆された。
2. プロタミン加水分解ペプチドである HAP-100 は、*Candida albicans* の増殖能と菌糸形への形態変化能の抑制による抗真菌作用を有するだけでなく、気管上皮細胞である BEAS-2B 細胞において炎症抑制作用を有する可能性が示唆された。

本論文は、主となる参考論文「ヒト気管上皮細胞における *Candida albicans* に対するプロタミン加水分解ペプチドの効果」日本障害者歯科学会雑誌，掲載予定および副となる参考論文「Stimulation of CCL2 Expression in Human Gingival Epithelium by *Candida albicans*」International Journal of Oral-Medical Sciences, Vol. 11, No.2, 90-95, 2012.をまとめたものである。

参考文献

- 1) Van Winkelhoff AJ, Slots J : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in Nonoral Infections. *Periodontol*, 20 : 122-135, 2000.
- 2) Demmer RT, Desvarieux M : Periodontal Infections and Cardiovascular Disease. *J Am Dent Assoc*, 137 : 14s-20s, 2006.
- 3) Scannapieco FA, Bush RB, Paju S : Periodontal Disease as a Risk Factor for Adverse Pregnancy Outcomes. A Systematic Review. *Ann Periodontol*, 8 : 70-78, 2003.
- 4) Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP, Leishman S, Yamazaki K : Relationship between Periodontal Infections and Systemic Disease. *Clin Microbiol Infect*, 13 : 3-10, 2007.
- 5) El-Solh AA, Pietrantonio C, Bhat A, Aquilina AT, Okada M, Grover V, Gifford N : Microbiology of Severe Aspiration Pneumonia in Institutionalized Elderly. *Am J Respir Crit Care Med*, 167 : 1650-1654, 2003.
- 6) 奥田克爾, 君塚隆太, 阿部修, 加藤哲男, 石原和幸, 西條みのり : 口腔ケアによる誤嚥性肺炎予防. *歯科学報*, 105 : 129-137, 2005.
- 7) Sumi Y, Kagami H, Ohtsuka Y, Kakinoki Y, Haruguchi Y, Miyamoto H : High Correlation between the Bacterial Species in Denture Plaque and Pharyngeal Microflora. *Gerodontology*, 20 : 84-87, 2003.
- 8) Edwards JE Jr, Lehrer RI, Stiehm ER, Fischer TJ, Young LS : Severe Candidal Infections : Clinical Perspective, Immune Defense Mechanisms,

- and Current Concepts of Therapy. *Ann Intern Med*, 89 : 91-106, 1978.
- 9) Slots J, Rams TE, Listgarten MA : Yeasts, Enteric Rods and Pseudomonads in the Subgingival Flora Severe Adult Periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, 3 : 47-52, 1988.
 - 10) Reynaud AH, Nygaard-Østby B, Bøygard GK, Eribe ER, Olsen I, Gjermo P : Yeasts in Periodontal Pockets. *J Clin Periodontol*, 28 : 860-864, 2001.
 - 11) Waltimo TMT, Sen BH, Meurman JH, Ørstavik D, Haapasalo MPP : Yeasts in Apical Periodontitis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 14 : 128-137, 2003.
 - 12) Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP : Effect of Oral Bacteria on Growth and Survival of *Candida albicans* Biofilms. *Arch Oral Biol*, 51 : 672-680, 2006.
 - 13) Bagg J, Silverwood RW : Coagglutination Reactions between *Candida albicans* and Oral Bacteria. *J Med Microbiol*, 22 : 165-169, 1986.
 - 14) Nair RG, Anil S, Samaranayake LP : The Effect of Oral Bacteria on *Candida albicans* Germ-tube Formation. *APMIS*, 109 : 147-154, 2001.
 - 15) Tamai R, Sugamata M, Kiyoura Y : *Candida albicans* Enhances Invasion of Human Gingival Epithelial Cells and Gingival Fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog*, 51 : 250-254, 2011.
 - 16) Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H : *Candida albicans* Triggers Interleukin-8 Secretion by Oral Epithelial Cells. *Microb Pathog*, 34 : 169-177, 2003.
 - 17) Mostefaoui Y, Bart C, Frenette M, Rouabhia M : *Candida albicans* and *Streptococcus Salivarius* Modulate IL-6, IL-8, and TNF- α Expression and Secretion by Engineered Human Oral Mucosa Cells. *Cell Microbiol*, 6 :

- 1085-1096, 2004.
- 18) Egusa H, Nikawa H, Makihira S, Jewett A, Yatani H, Hamada T : Intercellular Adhesion Molecule 1-Dependent Activation of Interleukin 8 Expression in *Candida albicans*-Infected Human gingival Epithelial Cells. *Infect Immun*, 73 : 622-626,2005.
 - 19) Yoneyama T, Yoshida M, Matsui T, Sasaki H : Oral Care and Pneumonia. *Lancet*, 354 : 515, 1999.
 - 20) Tamura M, Saito H, Kikuchi K, Ishigami T, Toyama Y, Takami M, Ochiai K : Antimicrobial Activity of Gel-Entrapped Catechins toward Oral Microorganisms. *Biol Pharm Bull*, 34 : 638-643, 2011.
 - 21) Evensen NA, Braun PC : The Effects of Tea Polyphenols on *Candida albicans* : Inhibition of Biofilm Formation and Proteasome Inactivation. *Can J Microbiol*, 55 : 1033-1039, 2009.
 - 22) Nakamura M, Fujibayashi T, Tominaga A, Satoh N, Kawarai T, Shinozuka O, Watanabe H, Yamazaki T, Senpuku H : Hinokitiol Inhibits *Candida albicans* Adherence to Oral Epithelial Cells. *J Oral Biosci*, 52 : 42-50, 2010.
 - 23) Iwatani S, Zendo T, Yoneyama F, Nakayama J, Sonomoto K : Characterization and Structure Analysis of a Novel Bacteriocin, Lacticin Z, Produced by *Lactococcus lactis* QU 14. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71 : 1984-1992, 2007.
 - 24) Kontani M, Amano A, Nakamura T, Nakagawa I, Kawabata S, Hamada S : Inhibitory Effects of Protamines on Proteolytic and Adhesive Activities of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 67 : 4917-4920, 1999.

- 25) Miura T, Iohara K, Kato T, Ishihara K, Yoshinari M : Basic Peptide Protamine Exerts Antimicrobial Activity against Periodontopathic Bacteria. *J Biomed Sci Eng*, 3 : 1069-1072, 2010.
- 26) Miura T, Hayakawa T, Okumori N, Iohara K, Yoshinari M : Antifungal Activity against *Candida albicans* on PMMA Coated with Protamine Derivatives. *J Oral Tissue Engin*, 8 : 30-38, 2010.
- 27) Taguchi Y, Imai H : Expression of β -defensin-2 in Human Gingival Epithelial Cells in Response to Challenge with *Porphyromonas gingivalis* *in vitro*. *J Periodont Res*, 41 : 334-339, 2006.
- 28) Kusumoto Y, Hirano H, Saitoh K, Yamada S, Takedachi M, Nozaki T, Ozawa Y, Nakahira Y, Saho T, Ogo H, Shimabukuro Y, Okada H, Murakami S : Human Gingival Epithelial Cells Produce Chemotactic Factors Interleukin-8 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 After Stimulation with *Porphyromonas gingivalis* via Toll-Like Receptor 2. *J Periodontol*, 75 : 370-379, 2004.
- 29) Tsushima K, Li Y, Zhang L, Kuboyama N, Abiko Y : IL-6 Signaling in *Candida albicans*-Infected Human Gingival Epithelial Cells. *Int J Oral Med Sci*, 10 : 43-49, 2011.
- 30) Egusa H, Nikawa H, Makihira S, Yatani H, Hamada T : In vitro Mechanisms of Interleukin-8-Mediated Responses of Human Gingival Epithelial Cells to *Candida albicans* Infection. *Int J Med Microbiol*, 296 : 301-311, 2006.
- 31) Järvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M : *Candida* Yeasts in Chronic Periodontitis Tissues and Subgingival Microbial

- Biofilms *in vitro*. Oral Dis, 10 : 106-112, 2004.
- 32) Schaller M, Zakikhany K, Naglik JR, Weindl G, Hube B : Models of Oral and Vaginal Candidiasis Based on *in vitro* Reconstituted Human Epithelia. Nat Protoc, 1 : 2767-2773, 2006.
- 33) Schaller M, Boeld U, Oberbauer S, Hamm G, Hube B, Korting HC : Polymorphonuclear Leukocytes (PMNs) Induce Protective Th1-type Cytokine Epithelial Responses in an *in vitro* Model of Oral Candidosis. Microbiology, 150 : 2807-2813, 2004.
- 34) 芦田久 : 擬態分子で宿主に接着する病原性微生物. 化学と生物, 37 : 114-115, 1999.
- 35) Cutler JE : Putative Virulence Factors of *Candida albicans*. Annu Rev Microbiol, 45 : 187-218, 1991.
- 36) Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya B : Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) : An Overview. J Interferon Cytokine Res, 29 : 313-326, 2009.
- 37) 向田直史 : 炎症とケモカイン. 臨床化学, 33 : 61-68, 2004.
- 38) 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.
- 39) Parikh AA, Salzman AL, Kane CD, Fischer JE, Hasselgren P : IL-6 Production in Human Intestinal Epithelial Cells Following Stimulation with IL-1 β Is Associated with Activation of the Transcription Factor NF- κ B. J Surg Res, 69 : 139-144, 1997.
- 40) Shimotake TK, Izhar FM, Rumilla K, Li J, Tan A, Page K, Brasier AR,

Schreiber MD, Hershenson MB : Interleukin (IL)-1 β in Tracheal Aspirates from Premature Infants Induces Airway Epithelial Cell IL-8 Expression via an NF- κ B Dependent Pathway. *Pediatr Res*, 56 : 907-913, 2004.

41) Sabroe I, Lloyd CM, Whyte MKB, Dower SK, Williams TJ, Pease JE : Chemokines, Innate and Adaptive Immunity, and Respiratory Disease. *Eur Respir J*, 19 : 350-355, 2002.

42) Delclaux C, Azoulay E : Inflammatory Response to Infectious Pulmonary Injury. *Eur Respir J*, 22 : 10s-14s, 2003.

43) 滝沢始 : 呼吸器疾患におけるサイトカイン. *モダンメディア*, 44 : 349-357, 1998.

44) Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, Hamada T, Takeda K, Akira S, Hoshijima M, Hirano T, Chien KR, Yoshimura A : IL-6 Induces an Anti-Inflammatory Response in the Absence of SOCS3 in Macrophages. *Nat Immunol*, 4 : 551-556, 2003.

図および表

Table 1 Primer design for RT-PCR

Target		Sequence(5' – 3')
CCL2	Forward	GTGCTGACCCCAATAAGGAA
	Reverse	TGAGGTGGTTGTGGAAAAGA
GAPDH	Forward	ATCACCATCTTCCAGGAG
	Reverse	ATCGACTGTGGTCATGAG

Table 2 Primer design for real-time PCR

Target		Sequence (5' – 3')
IL-6	Forward	AAGCCAGAGCTGTGCAGATGAGTA
	Reverse	TGTCCTGCAGCCACTGGTTC
IL-8	Forward	ATTGCATCTGGCAACCCTAG
	Reverse	CTGCGCCAACACAGAAATTA
GAPDH	Forward	GTAGAGGCAGGGATGATGT
	Reverse	TCCAAAATCAAGTGGGGCGA

Table 3

Gen
IL-1
IL-1
IL-1
TNF
TNF
TNF
NF- κ B
CCl
Flag (P) i
gene expr
against tl

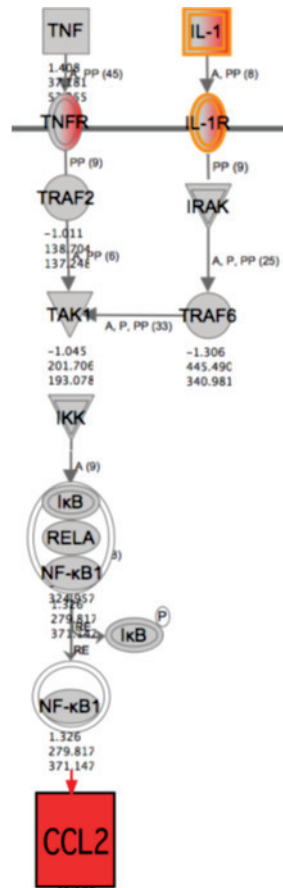


Fig. 1 IPA Canonical pathway analysis.

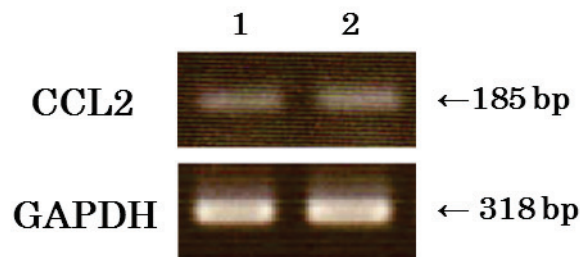


Fig. 2 RT-PCR analysis of CCL2 gene expression. An ethidium bromide staining pattern of the amplified polymerase chain reaction products using agarose gel electrophoresis is shown. 1 ; control, 2 ; with *C. albicans*.

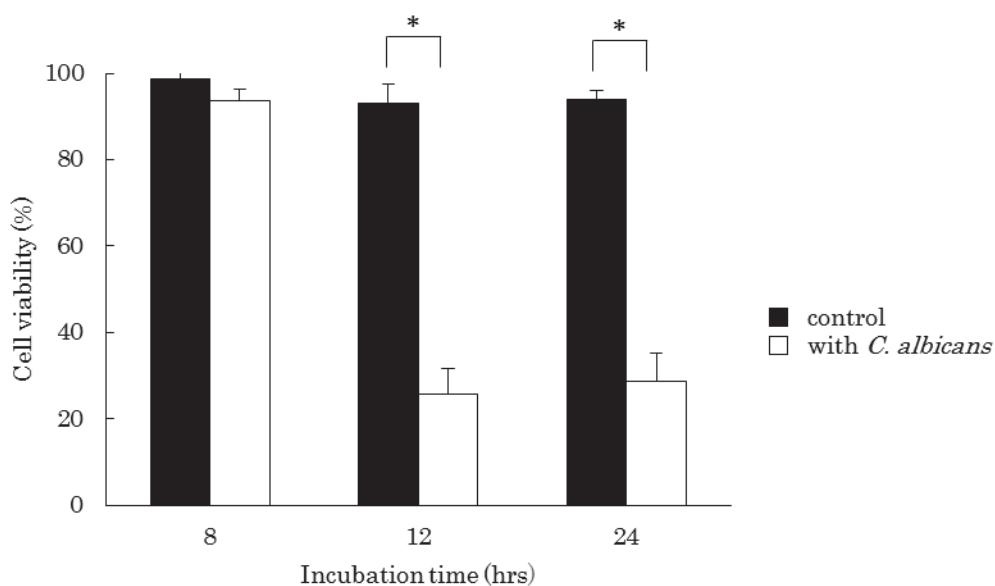


Fig. 3 The cell viability on BEAS-2B cell infected with *C. albicans*. BEAS-2B cell was cultured with *C. albicans* for 8, 12 and 24 hrs. Cell viability was assayed as described in Materials and Methods. Values represent the means \pm SD of the results of three cultures. Significant differences ($*P < 0.05$) were evaluated in comparison to control values. (*t*-test)

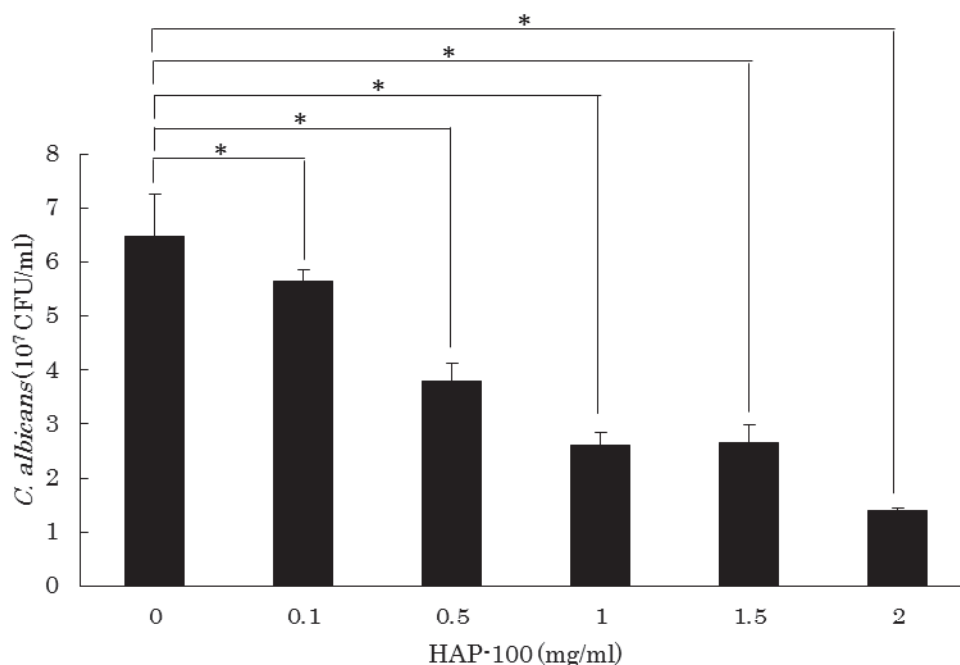


Fig. 4 The growth on *C. albicans* cultured with HAP-100. *C. albicans* was cultured with various concentrations (0.1–2 mg/ml) of HAP-100 in BHI broth for 18 hrs. The number of colony was counted to evaluate growth. Values represent the means \pm SD of the results of three cultures. Significant differences ($*P < 0.05$) were evaluated in comparison to control values. (*t*-test)

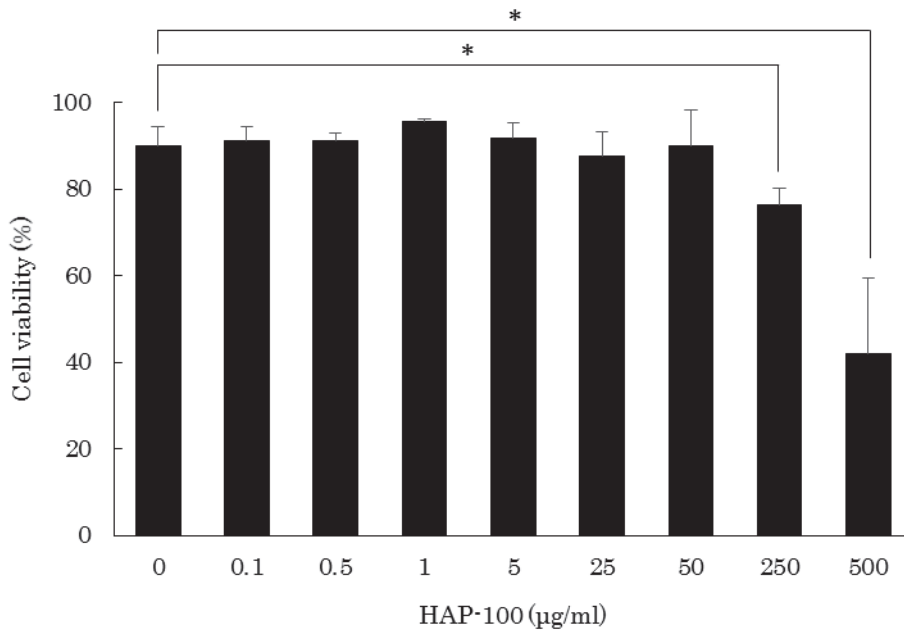


Fig. 5 The cell viability on BEAS-2B cell cultured with HAP-100. BEAS-2B cell was cultured with HAP-100 with concentration from 0.1 µg/ml to 500 µg/ml for 8 hrs. Cell viability was assayed as described in Materials and Methods. Values represent the means \pm SD of the results of three cultures. Significant differences ($*P < 0.05$) were evaluated in comparison to control values. (*t*-test)

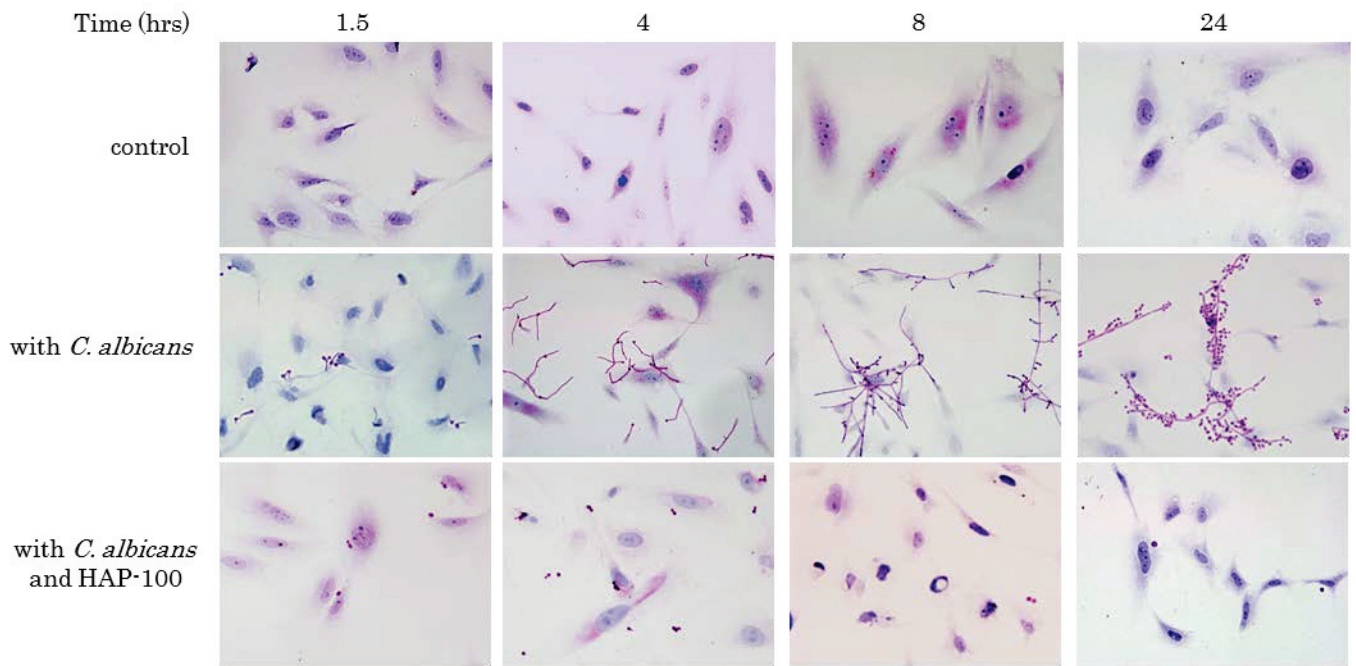


Fig. 6 *C. albicans* adhesion to BEAS-2B cell in the presence or absence of HAP-100. BEAS-2B cell was cultured with *C. albicans* in the presence or absence of 50 µg/ml HAP-100 for 1.5, 4, 8 and 24 hrs. The cells were stained by PAS staining, observed under the light microscopy, and photographed.

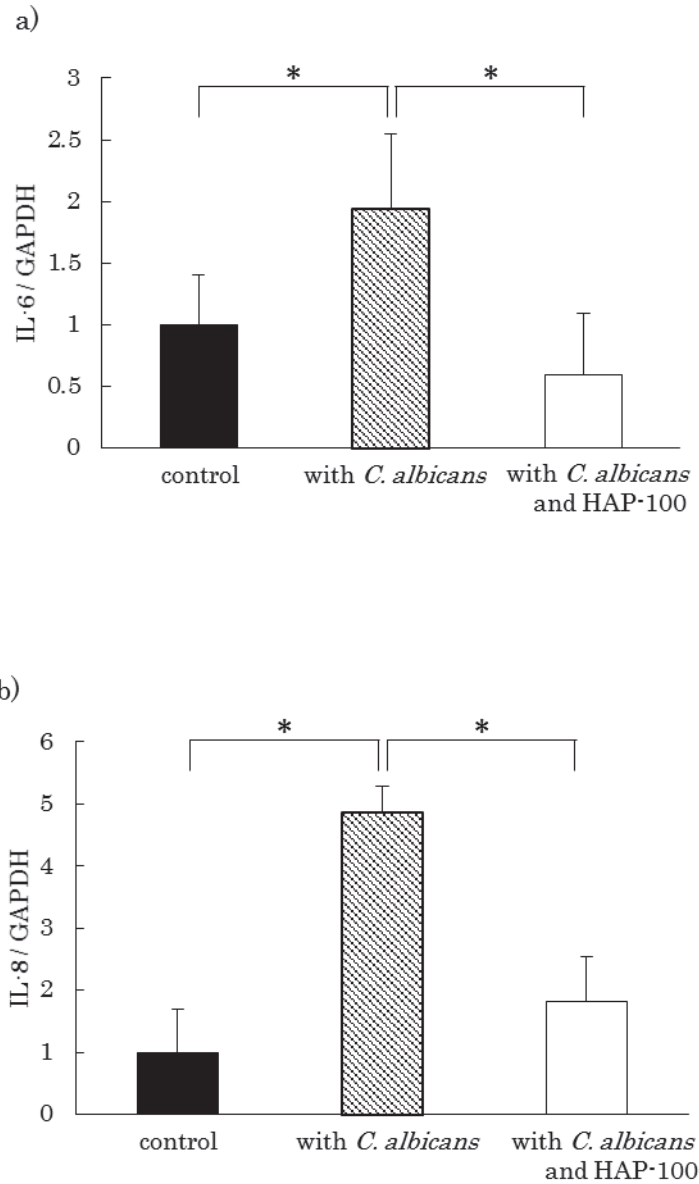


Fig. 7 The gene expression of IL-6 and IL-8 on BEAS-2B cell infected with *C. albicans* in the presence or absence of HAP-100. BEAS-2B cell was cultured with *C. albicans* in 50 µg/ml HAP-100 for 8 hrs. Total RNA was isolated from each samples. The gene expression levels of IL-6 mRNA (a) and IL-8 mRNA (b) were determined by real-time PCR. Values represent the means ± SD of the results of triplicate samples. Statistical significance was defined as $P < 0.05$ (*). (Tukey-Kramer test)

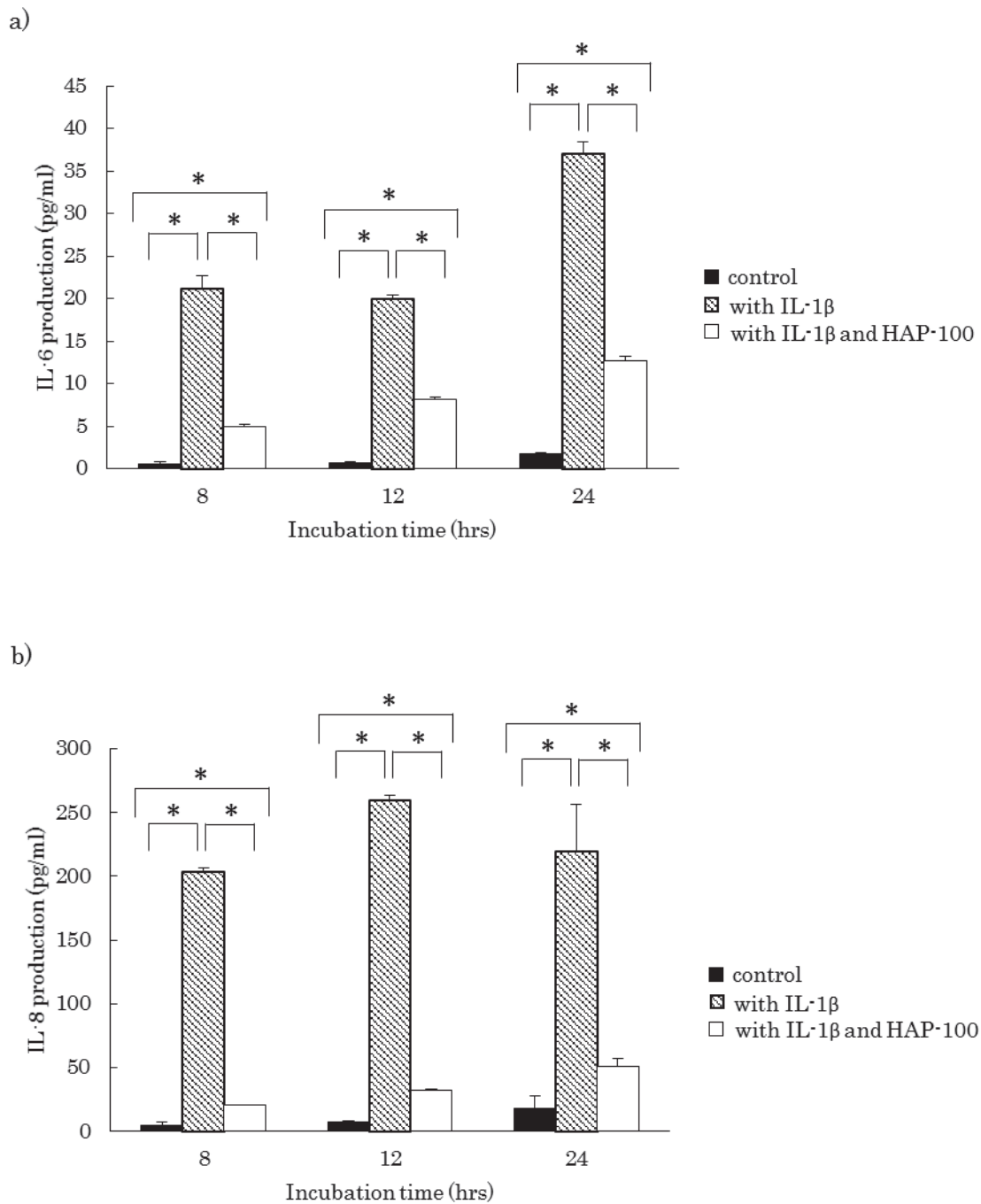


Fig. 8 The production of IL-6 and IL-8 on BEAS-2B cell stimulated with IL-1 β in the presence or absence of HAP-100. BEAS-2B cell was stimulated with IL-1 β in 50 μ g/ml HAP-100 for 8, 12 and 24 hrs. The amounts of IL-6 (a) and IL-8 (b) in the supernatants were measured by ELISA. Values represent the means \pm SD of the results of triplicate samples. Statistical significance was defined as $P < 0.05$ (*). (Tukey-Kramer test)

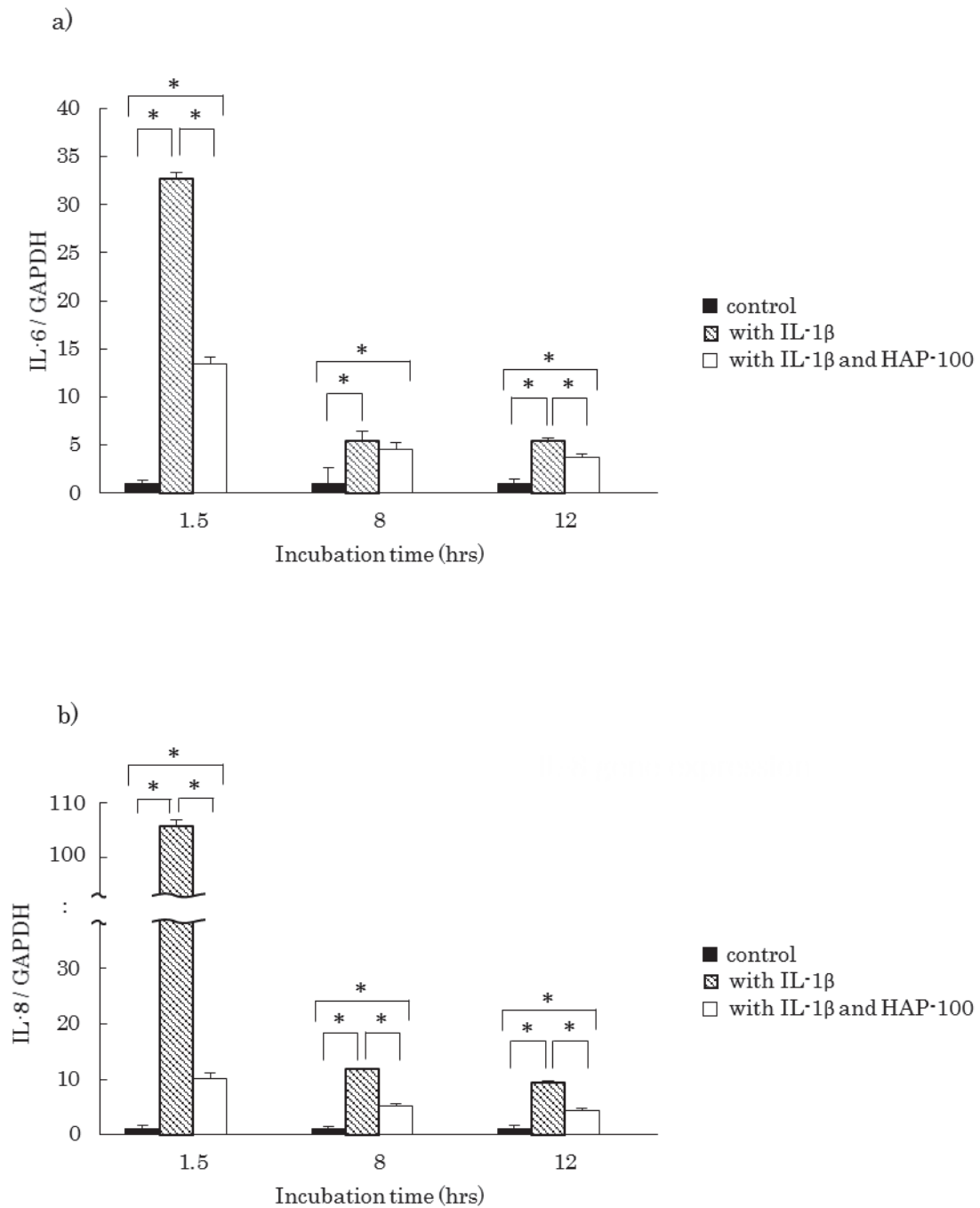


Fig. 9 The gene expression of IL-6 and IL-8 on BEAS-2B cell stimulated with IL-1 β in the presence or absence of HAP-100. BEAS-2B cell was stimulated with IL-1 β in 50 μ g/ml HAP-100 for 1.5, 8 and 12 hrs. Total RNA was isolated from each samples at the indicated time points. The gene expression levels of IL-6 mRNA (a) and IL-8 mRNA (b) were determined by real-time PCR. Values represent the means \pm SD of the results of triplicate samples. Statistical significance was defined as $P < 0.05$ (*). (Tukey-Kramer test)

