

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11033

研究課題名(和文) ヒト口腔粘膜常在微生物に応答する粘膜免疫の全身的制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of systemic control mechanism in mucosal immunity responded to human oral microbiota

研究代表者

長環(Cho, Tamaki)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：90131870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：カンジダはヒトの皮膚や粘膜に常在する真菌ですが、口腔においてカンジダ症は注目される日和見感染症です。カンジダ症発症に深く関わる免疫細胞はTh17細胞とされていますが、このT細胞分化機構におけるカンジダ抗原は分かっていません。本研究ではカンジダの膜由来タンパク質がTh17細胞の分化誘導を有意に促進し、その誘導されたTh17細胞がマウス口腔カンジダ症の病態を抑制する結果を得ました。これにより新しい治療デザインの開発が期待されます。

研究成果の概要(英文)：Candida albicans is a human commensal that causes opportunistic infections. Th17 cells provide resistance against mucosal infection with C. albicans; however, the T cell antigens remains little known. Our final goal is to find effective T cell antigens of C. albicans that are responsible for immunotherapy against candidiasis. Here, we prepared fractions including cytosol, membrane and cell wall from yeast and mycelial cells of C. albicans. Proteins derived from a membrane fraction of mycelial cells effectively induced differentiation of CD4+ T cells into IL-17A-producing Th17 cells. Moreover, mycelial membrane-differentiated CD4+ Th17 cells from donor mice adoptively transferred intravenously prevented oral candidiasis by oral infection of C. albicans in recipient mice. The design of novel vaccination strategies against candidiasis will be our next step.

研究分野：微生物学

キーワード：粘膜免疫 カンジダ常在マウス 口腔カンジダ症マウス 樹状細胞 T細胞 IL-17

### 1. 研究開始当初の背景

免疫学の中でも粘膜免疫に関しては長い間手付かずの領域であった。粘膜は比較的薄い組織で構成され外界に露出しているため、多くの病原微生物の侵入経路となる一方、常在微生物叢が存在するという特殊な環境にある。しかもこれらの常在微生物は通常宿主と共生関係にあり免疫学的なバランスを取って宿主の正常を保っている。しかしこのバランスの崩壊が常在菌による日和見感染症の発症を誘導する。最近腸内微生物叢の解析が急速に進展する中、腸管における粘膜免疫の機構解明が精力的に研究されている。特に細胞外感染症では Th17 細胞による感染防御の機構解明が盛んである。口腔領域では加齢と共に常在率が上昇するカンジダ真菌が、昨今の超高齢化社会を背景に口腔カンジダ症の発症率増加が問題視されている。治療に用いられる抗真菌薬の数は少なく耐性菌や副作用の問題から真菌症は難治性疾患であるため、新しい発想の治療法開発が急がれる。

### 2. 研究の目的

口腔の常在菌に対する免疫応答の「場」を全身的に解明した研究がこれまでに殆ど報告されていないことから、本研究の目的はヒト口腔粘膜常在微生物による粘膜感染機序を全身的視野から解明することである。すなわち腸管における Th17 細胞の粘膜免疫機構の研究をもとに、口腔感染症における Th17 細胞の免疫機構を解明する。そのために口腔感染症を起こす口腔常在真菌であるカンジダに関して、T 細胞の受容体を介した抗原エпитープを解析し、ヒト口腔常在真菌にフォーカスした口腔と全身の粘膜免疫応答の研究を計画した。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト常在カンジダに対する効果的な免疫応答系を確立するために、カンジダ菌体から網羅的に抗原候補を得る方法として酵母形、菌糸形それぞれの細胞を下記の方法を用いて分画した。カンジダ菌株は、*Candida albicans* SC5314 を用いた。酵母形細胞は通常の栄養平板培地を用い 37°C、18 時間培養して回収した。菌糸形細胞は 20%牛胎児血清培地を用い 37°C、24 時間培養して回収した。カンジダ菌体の分画はまず凍結菌体を乳鉢破碎・ビーズ破碎後、6000g、20 分の遠心分離で上清(細胞質および膜成分を含む)と沈渣(細胞壁画分)に分けた。上清はさらに 105000g、60 分の遠心分離で可溶画分(細胞質画分)と膜画分に分けた。膜画分は界面活性剤による可溶性タンパク質を以後の膜画分タンパク質として用いた。細胞壁画分はフッ化水素ピリジン処理を行った細胞壁 GPI タンパク質画分と、低温水酸化ナトリウム処理を行った細胞壁タンパク質画分を得た。

(2) CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いた T 細胞受容体エピトープ評価方法は、(1) で分画したタンパク

質を抗原としマウス (C57BL/6N) 骨髄由来樹状細胞およびマウス末梢リンパ節および脾臓由来 CD4<sup>+</sup> T 細胞とともに共培養した。分化した T 細胞は、抗 CD4 抗体、抗 IL-17A 抗体、抗 IFN $\gamma$  抗体を用いてフローサイトメトリー解析によりデータを得た。

(3) これまでに報告されている口腔カンジダ症モデルマウス<sup>①</sup>を参考に、薬剤などにより免疫系に影響を与えないモデルを確立した。マウスは C57BL/6N、6 週齢から 8 週齢、雌雄ともに使用した。通常用いられる免疫抑制剤や菌交代症を狙った抗菌薬は全く用いなかった。鎮静後のマウス舌表面・裏面に綿棒で菌液 (2 $\times$ 10<sup>9</sup> cells/ml) を丁寧にスワブした。口腔カンジダ症の評価は菌塗布後 3 日目に行った。評価項目として体重変化、舌の状態のスコア化、切除舌由来のカンジダ菌数、切除舌の病理標本を用いた。

(4) (1) および (2) で得られたカンジダ由来抗原の in vivo 評価を行うために、(3) のモデルマウス実験系を用いて口腔カンジダ症への効果を確認した。カンジダ由来抗原により分化された Th17 細胞が口腔カンジダ症を抑制可能かを検証するために、T 細胞が Th17 細胞に分化すると GFP を発現するように遺伝子コントロールされた IL-17GFP マウス (C57BL/6-I117a<sup>tm1Bcgen</sup>/J) をドナーマウスとし、その CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いた。Ex vivo 法でカンジダ由来抗原により GFP を発現したドナーマウスの T 細胞をレシピエントマウスに養子移入し、その 1 日後 (3) で記した方法でレシピエントマウスの口腔にカンジダを感染し in vivo 実験を行なった。

### 4. 研究成果

(1) カンジダ酵母形・菌糸形細胞由来可溶性タンパク質の SDS-PAGE 解析: カンジダ酵母形細胞と菌糸形細胞の各画分に含まれる可溶性タンパク質を SDS-PAGE 解析すると、ゲル上で観察される酵母形由来タンパク質と菌糸形由来タンパク質のバンドの種類・数に大きな違いは認められなかった。

(2) カンジダ画分に含まれる CD4<sup>+</sup> T 細胞受容体エピトープの候補抗原となる画分のフローサイトメトリー解析: フローサイトメトリー法で、CD4<sup>+</sup> T 細胞受容体エピトープの候補を含むカンジダ画分を検討した。酵母形および菌糸形カンジダそれぞれをヒートキルしたものをポジティブコントロール抗原として用い、このヒートキルカンジダによる IL-17A 産生誘導細胞数を基準値とした場合、図 1 に示したように酵母形画分では IL-17A 産生細胞数が有意に増加した画分は認められなかった。しかし菌糸形由来の膜画分を抗原として用いた場合には、有意に IL-17A 産生細胞数の増加を認めた。

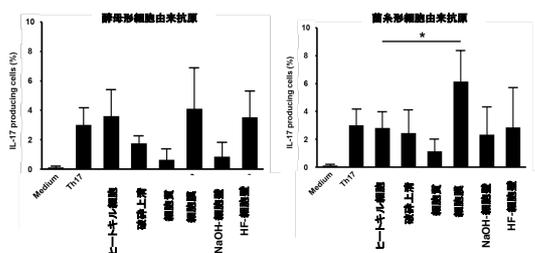


図1 カンジダ抗原によるIL-17A産生誘導能

(3) カンジダ菌糸形細胞膜由来タンパク質により誘導されたTh17細胞の養子移入実験：図2に、養子移入実験の概要を示した。菌糸形由来の膜成分でIL-17を産生するように分化した細胞(緑色の蛍光を発する)を含むT細胞をレシピエントマウスに養子移入した後口腔カンジダ症を誘発させた。図3に示したように菌糸形カンジダの膜成分由来タンパク質で誘導されたTh17細胞を移入したレシピエントマウスでは口腔カンジダ症の発症が抑制された。

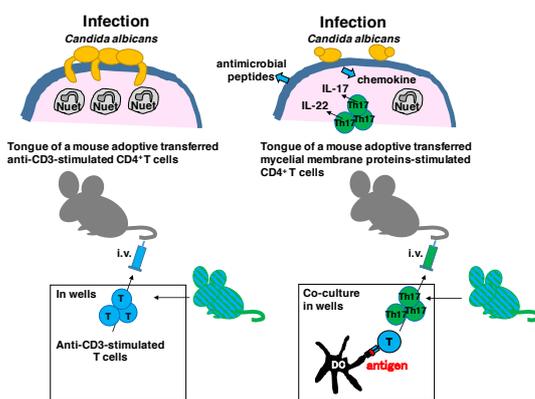


図2 カンジダ菌の成分を認識して分化したT細胞(Th17)は、カンジダ症発症を抑える

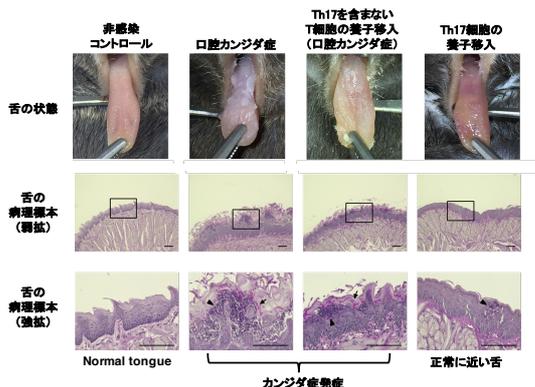


図3 菌糸形細胞由来膜成分抗原によるTh17細胞は、口腔カンジダ症発症を抑える

(4) 結語：カンジダ菌糸形細胞を分画した膜成分中に、CD4<sup>+</sup>T細胞をTh17細胞に分化誘導するタンパク質抗原が含まれることが、in vitro および in vivo 実験により確認された。

<引用文献>

① Takakura N, Wakabayashi H, Ishibashi H et al. Oral lactoferrin treatment of experimental oral candidiasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2003, 2619-2623.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Sonoko Tasaki, Tamaki Cho, Jun-ichi Nagao, Shojiro Ikezaki, Yuka Narita, Ken-ichi Arita-Morioka, Kanae Yasumatsu, Keita Toyoda, Hiroshi Kojima, Yoshihiko Tanaka Th17 cells differentiated with mycelial membranes of *Candida albicans* prevent oral candidiasis. *FEMS Yeast Research* 査読有、18, 2018, foy018 DOI:10.1093/femsyr/foy018

② Marie Hashimoto, Jun-ichi Nagao, Shojiro Ikezaki, Sonoko Tasaki, Ken-ichi Arita-Morioka, Yuka Narita, Tamaki Cho, Kenji Yuasa, Amnon Altman, Yoshihiko Tanaka Identification of a novel alternatively spliced form of inflammatory regulator SWAP-70-like adapter of T cells. *International Journal of Inflammation* 査読有、2017, Article ID 1324735, 10 pages DOI:10.1155/2017/1324735

③ Jun-ichi Nagao, Tamaki Cho, Makoto Mitarai, Keishi Iohara, Kazumi Hayama, Shigeru Abe, Yoshihiko Tanaka Antifungal activity in vitro and in vivo of a salmon protamine peptide and its defived cyclic peptide against *Candida albicans*. *FEMS Yeasy Research* 査読有、17, 2017, fow099 DOI:10.1093/femsyr/fow099

[学会発表] (計12件)

① Cho T., et al. Alternative antifungal candidates against *Candida albicans* infection. 第91回日本細菌学会総会 2018

② 田崎園子 他 *Candida albicans* に対するT細胞による免疫機構の解明. 第61回日本医真菌学会学術総会・学術集会 2017

③ 池崎昌二郎 他 mild heat stress 条件下における *Candida albicans* の遺伝子発現と細胞応答. 第61回日本医真菌学会学術総会・学術集会 2017

- ④ Cho T., et al. Host immune responses induced by molecules from *Candida albicans* biofilm formed under mild heat stress. 第59回歯科基礎医学会学術大会 2017
- ⑤ Tasaki S., et al. Identification of the major T cell component of *Candida albicans* in oral candidiasis. 第59回歯科基礎医学会学術大会 2017
- ⑥ 池崎昌二郎 他 mild heat stress 条件下における *Candida albicans* の遺伝子発現. 第60回日本医真菌学会学術総会・学術集会 2016
- ⑦ 田崎園子 他 *Candida albicans* に対する T 細胞応答を誘導する表層抗原探索. 第60回日本医真菌学会学術総会・学術集会 2016
- ⑧ Cho T., et al. Analysis of *Candida albicans* derived molecules recognized by T cells. 第58回歯科基礎医学会学術大会 2016
- ⑨ Tasaki S., et al. Induction of T cell response in the regulation for oral candidiasis. 第58回歯科基礎医学会学術大会 2016
- ⑩ Ikezaki S., et al. Effects of mild heat stress on biofilm formation of *Candida albicans*. 第58回歯科基礎医学会学術大会 2016
- ⑪ Cho T., et al. Exploration of novel *Candida albicans* derived antigens recognized by T-cell receptor of CD4<sup>+</sup>T cell. 第57回歯科基礎医学会学術大会 2015
- ⑫ Tasaki S., et al. Selective immune regulation by novel targets against oral candidiasis. 第57回歯科基礎医学会学術大会 2015

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長 環 (CHO, Tamaki)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：90131870

### (2) 研究分担者

稲井 哲一郎 (INAI, Tetsuichirou)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：00264044

田中 芳彦 (TANAKA, Yoshihiko)  
福岡歯科大学・口腔歯学部・教授  
研究者番号：00398083

成田 由香 (NARITA, Yuka)  
福岡歯科大学・口腔歯学部・助教  
研究者番号：50758050