

令和元年6月10日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11516

研究課題名(和文)骨代謝因子OPG/RANKLが明示する血管内皮細胞の新しい炎症制御機構

研究課題名(英文)An increase in serum osteoprotegerin is a marker of the onset of *Candida albicans* infection and may contribute to endothelial cell dysfunction

研究代表者

小林 美智代 (Michiyo, Kobayashi)

奥羽大学・歯学部・講師

研究者番号：80316265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：骨吸収抑制因子であるOsteoprotegerin (OPG)は循環器系疾患の発症や予後を予測するマーカーの一つであり、血管への有害性が報告されているが、詳細は不明である。

我々は慢性の感染症がOPGの血中濃度に与える影響を調べるため、口腔・消化管カンジダ症モデルマウスを作成し、血清OPG濃度の増減について検討した。その結果、*Candida albicans*感染群は非感染群に比較して、血清OPG濃度の有意な上昇が認められた。

本研究結果は、高齢者に有病率の高い*C. albicans*の持続的な感染が血清OPG濃度に影響し、循環器系疾患の発症や増悪に関与する可能性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

*Candida albicans*は日和見感染症の原因菌の一つであり、ヒトの多くが常在菌として保有する。そして、薬物療法や加齢などによる免疫力の低下により、粘膜疾患として発症する。自覚症状が乏しく、治療を行わない場合もある。本研究結果は、*C. albicans*の慢性感染症が血清中のOPG濃度を上昇させる可能性を示している。高すぎる血清OPG値は血管内皮障害を起こし、循環器系疾患の発症リスクを高めることが報告されている。以上のことから、我々の研究結果は*C. albicans*感染症の治療が循環器系疾患の発症を抑制する可能性を示唆するものあり、国民の健康寿命の延伸に有益な結果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Osteoprotegerin (OPG) prevents the binding of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) to RANK. Recent studies have reported that RANK-RANKL interactions in immune cells are critical for the infection process. *Candida albicans* is an opportunistic pathogen and a common cause of candidiasis. This study used a mouse model (orally inoculated) to determine whether gastrointestinal candidiasis is associated with changes in serum OPG levels. The results showed that systemic *C. albicans* infection elevated serum OPG levels. This is the first study to show the relationship between this opportunistic infection and OPG. Because several studies showed that serum OPG levels are correlated with cardiovascular mortality, our findings suggest that *C. albicans* infection might contribute to cardiovascular disease onset. Therefore, our study illustrates the importance of treating candidiasis infections at early stages, even for mild infections in order to prevent damage to the heart.

研究分野：口腔免疫学

キーワード：osteoprotegerin 日和見感染症 *Candida albicans*

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Osteoprotegerin (OPG)は、C型肝炎ウイルスやヒト免疫不全ウイルスなどの感染の慢性化により血中濃度が高くなることが報告されている。さらに近年、感染症患者のうち血中 OPG 値が高い患者は心筋梗塞や心不全など重篤な循環器系疾患の発症に至る危険性が高いこと、その予後が不良であることが報告されている (D'Abramo, A. et al., *Mediators Inflamm*, 2014; Nanda, K.S. et al. *Cytokine*, 2012)。さらに、高い血清 OPG 値は高齢者に多いことが知られており、OPG と循環器系疾患発症の関係性の解明が待たれている。

OPG は破骨細胞を活性化する receptor activator of NF- κ B (RANK) ligand (RANKL) のおとりレセプターであり、RANK-RANKL 結合を阻害し、骨吸収を抑制する。

血清中の OPG が、疾病の進行あるいは治癒にどのように関わっているかわかっていない。しかし申請者らはこれらの報告と我々の研究報告より、OPG/RANKL の血中濃度が感染症と循環器系疾患発生リスクを結びつける因子であり、OPG/RANKL が血管内皮細胞の病原体に対する炎症を制御している可能性を考え実験を計画した (Kobayashi-Sakamoto, M. et al., *Integr Mol Med.*, 2015)。

2. 研究の目的

慢性感染症により骨吸収抑制因子 OPG の血清濃度が上昇すること、血清 OPG 濃度が高い患者は循環器系疾患の発症リスクが高いことが報告されている。しかしながら、血清中の OPG が疾患の増悪に寄与しているのか不明である。そこで本研究は慢性感染が血清 OPG 濃度に影響を及ぼすメカニズムを解明するために、口腔内に症状を呈し、全身に持続的な感染症を起こす「口腔・消化管カンジダ症」のモデルマウスを作成し、その血清や組織中の OPG 濃度の変動とメカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

5週齢メス ICR マウスに塩酸クロルテトラサイクリン含有水道水(4mg/ml)を飲水させプレドニゾロンを感染4日前と1日前に 100mg/kg 投与した。C. albicans 臨床分離株 OH-1 株を舌に接種(10⁸CFU/匹)した後、経時的に舌、脾臓および腎臓の感染量と、舌組織と血清の OPG 濃度を測定した (図1)。

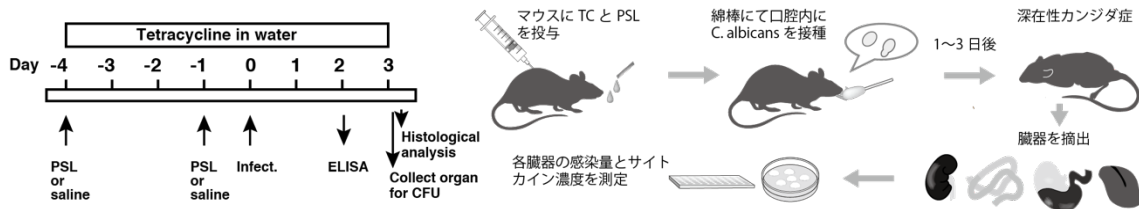


図1 実験方法の概要

4. 研究成果

(1) C. albicans 口腔感染による口腔・消化管カンジダ症モデルマウスの作成

口腔内に C. albicans を感染させ、経時的に腎臓の感染量を測定した。結果を図2(A)に示す。プレドニゾロン投与群は経時的に感染量を増加させた。

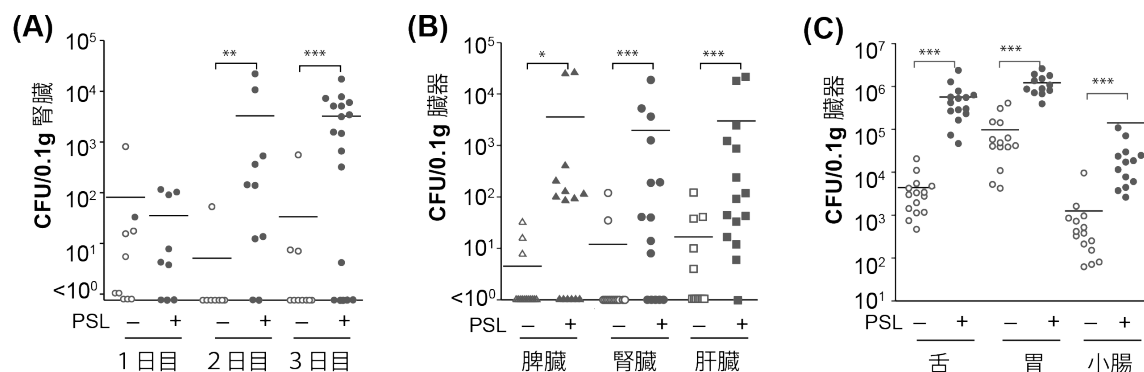


図 2 (A) プレドニゾロン投与群 (PSL +)と非投与群 (PSL -)の腎臓における経日的な感染量の変化 (B) 感染後 3 日目の深部臓器における感染量の比較 (C) 感染後 3 日目の消化器官における感染量の比較
*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

さらに、感染後 3 日目の脾臓、腎臓、肝臓の感染量を **図 2(B)** に示す。プレドニゾロン投与群は各臓器ともに高い感染量を示した。次に、感染後 3 日目の舌、胃および小腸の感染量を測定した結果を **図 2 (C)** に示す。プレドニゾロン投与群は各臓器ともに高い感染量を示した。プレドニゾロン非投与群も、胃において比較的高い感染量を示した。

次に、感染 3 日目にマウスの臓器を摘出し、PAS 及び HE 染色を行った (**図 3**)。胃と舌に菌糸状の *C. albicans* が多数認められた (矢印)。プレドニゾロン非投与マウスでは、舌から *C. albicans* が排除された後も、胃に *C. albicans* の感染が認められた。

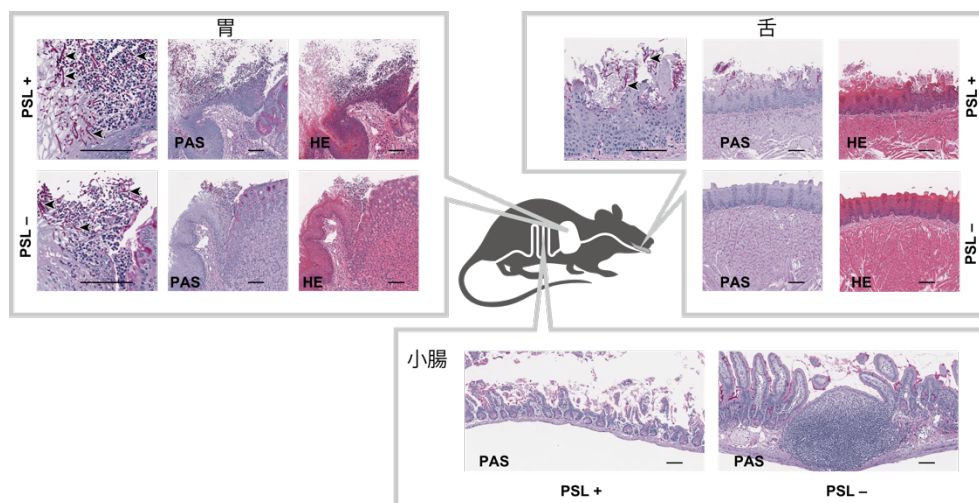


図 3 感染 3 日目の口腔・消化管カンジダ症モデルマウスの組織染色
PSL- プレドニゾロン投与マウス、PSL+ プレドニゾロン投与マウス。HE はヘマトキシリンとエオジン染色、PAS は PAS 染色。矢印は菌糸状の *C. albicans* を示す。

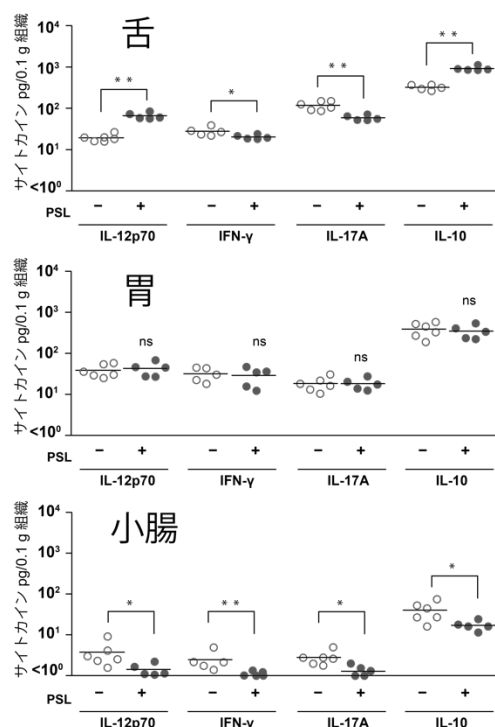
(2) 消化管臓器のサイトカイン量の変化

感染後 3 日目の消化管組織の病態に関与するサイトカイン濃度を測定した結果を **図 4** に示す。舌では IL-12 と IL-10 に関して、プレドニゾロン投与群が非投与群より濃度が高かった。その他のサイトカインについては、プレドニゾロン投与群が非投与群より低かった。

胃ではプレドニゾロン投与群と非投与群の有意な違いは認められなかった。小腸では測定したすべてのサイトカインで、プレドニゾロン投与群が非投与群よりも低かった。

以上の結果より、消化管の部位により *C. albicans* に対するサイトカイン産生が異なることが示された。

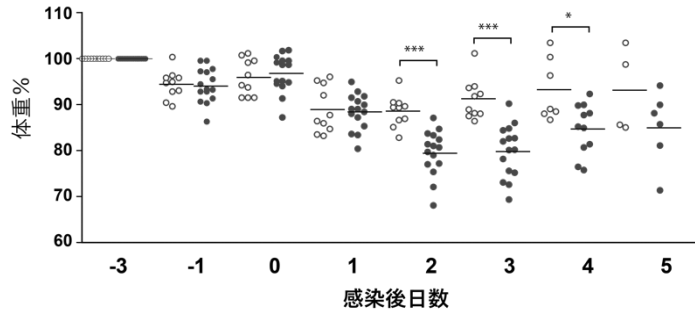
図 4 感染 3 日目の口腔・消化管カンジダ症モデルマウスにおける舌、胃及び小腸のサイトカイン濃度の比較。
PSL- プレドニゾロン非投与群、PSL+ プレドニゾロン投与群 * , $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$



(3) *C. albicans* 感染における血清及び組織 OPG 濃度の測定

プロトコールに従い、プレドニゾロン投与後に口腔内に *C. albicans* を感染させ、経日的に非感染群と感染群の体重を測定した結果を図 5 に示す。*C. albicans* 感染群では非感染群に比較して感染後 2 日目から 4 日目において有意に体重の減少が認められた。

図 5 プレドニゾロンを投与した *C. albicans* 感染群及び非感染群のマウスの体重の変化。○ 非感染群 ● 感染群
*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$



C. albicans 感染 3 日目から 5 日目の舌組織での OPG 濃度を測定した結果を図 6 (A) に示す。感染群と非感染群における有意な差は認められなかった。

次に、*C. albicans* 感染後 3 日目の血清中の OPG 濃度を測定した結果を図 6 (B) に示す。感染群、非感染群共にプレドニゾロン投与群は非投与群に比較して有意に高い OPG 値が認められた。

感染後 3 日目から 5 日目までの血清 OPG 濃度を測定した結果を図 6 (C) に示す。非感染群では OPG 濃度の経時的な低下が認められたが、感染群では OPG 濃度は引き続き高い値を示した。

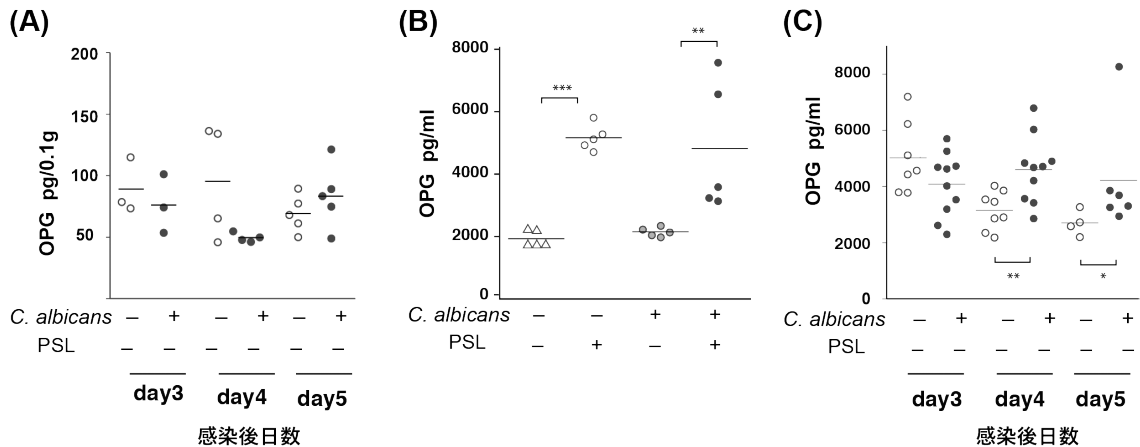


図 6 (A) 感染 3 日目から 5 日目における舌組織の OPG 濃度の変化 (B) 感染後 3 日目におけるプレドニゾロン投与群と非投与群の血清濃度の比較 (C) 感染 3 日目から 5 日目における感染群と非感染群の血清 OPG 濃度の変化 * , $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

(4) 結論

血清 OPG 濃度の上昇と血管内皮細胞の機能障害との関連が報告されているが、未だ不明な点が多い。

本研究結果は *C. albicans* の感染が血清 OPG 濃度を上昇させる可能性を示すものである。この結果より、高齢者に有病者が多い持続的な *C. albicans* 感染が血清 OPG 濃度を高めることにより、感染者の循環器疾患の発症リスクを大きくしている可能性が考えられる。

今後このモデルマウスを用いて *C. albicans* 感染による血清 OPG の上昇の機構やその影響を解明していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

① Kobayashi-Sakamoto M, Tamai R, Isogai E, Kiyoura Y.

Gastrointestinal colonisation and systemic spread of *Candida albicans* in mice treated with antibiotics and prednisolone. *Microb Pathog.* 2018 Apr;117:191-199. doi:

10.1016/j.micpath.2018.02.043. Epub 2018 Feb 22. PubMed PMID: 29477742.

〔学会発表〕（計 2 件）

① 口腔カンジダ症モデルマウスにおける *Candida albicans* の腎臓への移行と血中マーカーの探索 小林 美智代 2018 年 9 月 第 62 回日本医真菌学会・総会 東京都

② 口腔カンジダ症モデルマウスにおける *Candida albicans* の消化管定着と腎臓への移行 小林 美智代、磯貝 恵美子 2018 年 3 月 第 91 回日本細菌学会総会・福岡県

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：磯貝 恵美子（退職の為 2018 年は分担者辞退）

ローマ字氏名：Isogai Emiko

所属研究機関名：東北大学

部局名：農学研究科（研究院）

職名：教授

研究者番号（8 桁）：80113570

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：玉井 利代子

ローマ字氏名：Tamai Riyoko

研究協力者氏名：清浦 有祐

ローマ字氏名：Kiyoura Yusuke

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。