

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19437

研究課題名（和文）常在細菌叢による病原真菌制御機構の解明

研究課題名（英文）Detection of commensal bacteria which prevent fungal infections

研究代表者

西城 忍（SAIJO, SHINOBU）

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授

研究者番号：60396877

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：病原真菌カンジダ菌(*Candida albicans*, 以下*C. albicans*)は、日和見感染の原因菌として、高齢者、がん患者、免疫不全患者にとって時には命を脅かす感染症を引き起こす。本研究では、*C. albicans*に対する宿主の感染防御機構として腸管に常在する真菌が、その後の全身性感染に対して防御的に機能することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
近年、社会の高齢化に伴い真菌感染症をはじめとした日和見感染症が大きな問題となっている。本研究では、全身性真菌感染防御機構として、常在性真菌が重要な役割を担っていることを明らかにした。この結果により、真菌感染に対する新たな治療戦略を導ける可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：*Candida albicans* is known as one of the commensal fungi in humans. The fungus is also known as a causative agent that drives life-threatening invasive infections. Here we show that colonization of *C. albicans* in the guts induce host protection against systemic *C. albicans* infection.

研究分野：細菌学（含真菌学）

キーワード：サイトカイン 真菌感染防御 感染免疫 常在細菌叢

1. 研究開始当初の背景

病原真菌カンジダ菌(*Candida albicans*, 以下 *C. albicans* は、日和見感染の原因菌として、高齢者、がん患者、免疫不全患者にとって時には命を脅かす感染症を引き起こす。研究代表者らは、これまでに *C. albicans* に対する宿主の感染防御機構として、1) 抗原提示細胞に発現している膜タンパク質の C 型レクチンファミリー分子が病原体を感知し、炎症性サイトカインの分泌を誘導すること、2) そのサイトカインによって T 細胞を IL-17A 産生性の Th17 細胞に分化誘導すること、3) IL-17A は菌体の排除に必須であることなどを明らかにしてきた (Saijo et al., *Nat. Immunol.*, 2007, Saijo et al., *Immunity*, 2010)。一方で、真菌も健常人の微生物叢を構築する成分の一つとして、皮膚や粘膜、腸管などに常在する種類や環境中に常在している種類が存在することが明らかになりつつある。これらの常在菌が病原性を発揮する機構に関してはほとんど解明されていないのが現状であった。

2. 研究の目的

我々の身体は 30 兆個を超える細胞からなる集合体として機能しているが、近年、実はそれを遥かに超える 100 兆個以上の様々な微生物と共存し、それらとの相互作用を介して個体としての恒常性が維持され、健康な生活を可能にしていることが明らかになっている。真菌も健常人の微生物叢を構築する成分の一つとして、皮膚や粘膜、腸管などに常在していることが知られているが、通常は病原性を示さず、宿主と共存していると考えられている。その一方で、悪性の血液疾患や骨髄移植、免疫不全患者、AIDS 発症患者などでは、生命を脅かすほどの重篤な真菌感染症を引き起こし大きな問題となっている。さらに、健常人においても、抗生物質の投与により真菌症が顕在化する現象は、いわゆる「菌交代現象」として古くから知られている。しかし、「菌交代現象」の本態は全くわかっていない。そこで本研究では、まず常在細菌叢と真菌感染症の関係を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. 抗生物質の経口投与による腸内細菌叢の不均衡と皮膚 *C. albicans* 感染の検討

- i) 野生型 (WT) マウスの飲水中に抗菌スペクトルの異なる抗生物質であるバンコマイシン、ポリミキシンB、ストレプトマイシン、アンピシリン、およびその4種類の混合抗生物質を調整し、4週間持続的に経口投与することで、各薬剤の特性に応じた腸内細菌の排除を行なった。また、水道水のみをマウスに経口投与したマウスを対照群とし、合計6群のマウスを準備した (各群5匹)。
- ii) 6群全てのマウスの背部の被毛を取り除き、一定量の *C. albicans* 懸濁液を含ませたガーゼを貼付、滅菌フィルムで密封した。7日後に密封を解除し、感染部位の観察、病理像の解析、CFUアッセイを行い抗生物質の投与により *C. albicans* の感染重症度を比較した。

3-2. 腸管定着 *C. albicans* と全身性 *C. albicans* 感染防御の検討

- i) マウスの飲水にアンピシリンの最終濃度が 1g/L に調整したものを準備し、4週間継続的に経口投与した。その後、経口ゾンデを用いて、マウス 1匹あたり 5×10^7 細胞の *C. albicans* を摂取させた。 *C. albicans* の経口接種後は、1週間に1回の頻度で糞便を回収し、糞便中に含まれる *C. albicans* の生菌数を計数した。
- ii) *C. albicans* の経口接種後3週間目にマウス 1匹あたり 2×10^5 細胞の *C. albicans* を尾静脈より感染させ、翌日より28日目まで生死の確認と体重測定を行なった (図1)。

3-3. *C. albicans* の培養

C. albicans SC5314 株をポテトデキストロール (PDA) 培地に播種し、30℃ で2日間培養した。独立したコロニーを回収し、リン酸緩衝生理食塩水に懸濁、2回洗浄後、血球計算版を用いて計数した。

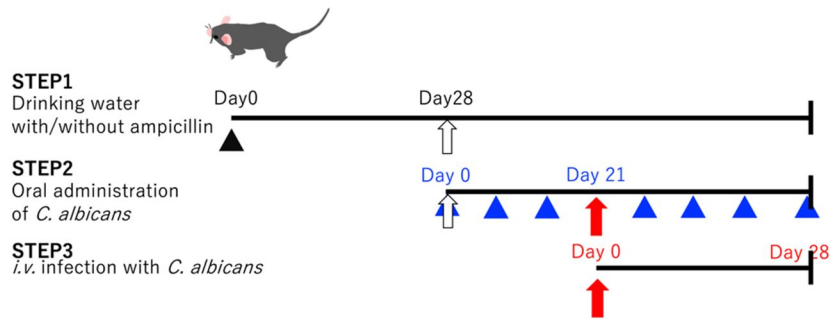


図1 感染実験の方法
マウスの飲水中にアンピシリンを加え、4週間後に*C. albicans*を経口投与した。経口投与3週間後に尾静脈より*C. albicans*を感染させた。

3-4 実験動物

野生型 C57BL/6J マウス (WT マウス) は日本クレアより購入した。IL-17A 欠損 (KO) IL-17A/F 二重欠損 (*Il17af^{-/-}*) マウスは、C57BL/6J 背景のものを使用した。

4. 研究成果

4-1: 腸内細菌叢と皮膚真菌感染

WT マウスの飲水にバンコマイシン、ポリミキシン B、ストレプトマイシン、アンピシリン、およびこれら4種類混合抗生物質を4週間経口投与した。これらの5群の抗生物質投与群、および抗生物質を投与しない対象群、陽性コントロールとして *Il17af^{-/-}* マウスの合計7群のマウスを用いて皮膚 *C. albicans* 感染実験を行なった。その結果、感染7日後の CFU 値は5群の抗生物質投与群全てにおいて、対象群と優位な差は検出できなかった。

4-2: 腸内に定着した真菌と全身性真菌感染

これまでに Gotoh らはアンピシリンを経口投与することで、WT マウスの腸管に *C. albicans* を定着させることが可能になることを報告している。そこで、常在性真菌が全身性真菌感染症に及ぼす影響を調べる目的で、*C. albicans* 定着マウスを用いて全身性 *C. albicans* 感染実験を行なった。

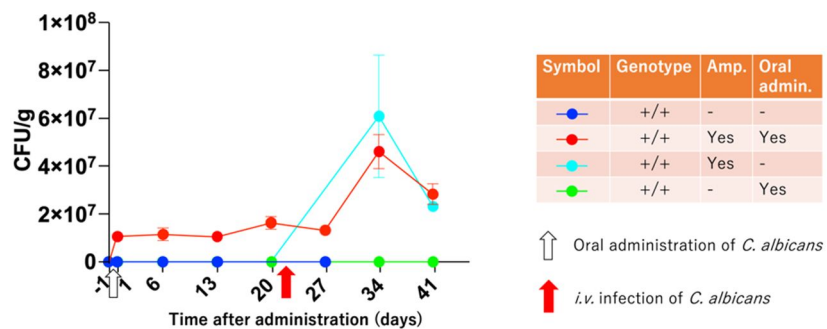


図2. 糞便中の *C. albicans* の量
4週間アンピシリンを摂取させたマウスに *C. albicans* を経口投与した (白矢印)。その21日後に *C. albicans* を系静脈感染させた (赤矢印)。マウスの糞便中の *C. albicans* の量は、1回/週計数した。

まず、WT マウスの飲水にアンピシリン 1g/L の濃度になるように調整し経口投与を行なった。4週間後に、経口ゾンデを用いて *C. albicans* を直接胃に注入した。その結果、アンピシリン非投与群においては、これまでの報告にあるように、アンピシリン投与群において非投与群と比較して約 1000 倍の *C. albicans* が糞便中から検出された (図2)。この結果から、アンピシリン投与によりマウスの腸管で *C. albicans* が定着可能になったことを示された。次に、これらのマウスを用いて全身性 *C. albicans* 感染実験を行い、各群の生存率に差があるかどうかを検討した。その結果、*C. albicans* を腸管に定着させていない対象群では、全身性感染後7日目に生存率が約45%まで低下したのに対し、*C. albicans* 定着群では生存率約

90%と有意に更新していることが明らかとなった。さらに、対象群では全新感染 15 日目に全例が死亡したが、*C. albicans* 定着群では、全身感染 28 日目でも約 60%のマウスが生存していた(図 2)。これらの結果から、*C. albicans* を腸管に定着させることで、その後の全身性 *C. albicans* 感染に対しては抵抗性となることが示された。

次に、*C. albicans* 定着による全身性 *C. albicans* 感染抵抗性の獲得機構の獲得に、IL-17 が関与しているかどうかを

検討する目的で、*Il17af*^{-/-}マウスを用いて同様の実験を行った。その結果、*Il17af*^{-/-}マウスでは、WT マウスと同様にアンピシリンの投与により *C. albicans* を腸管に定着可能となるものの、その後の全身性 *C. albicans* の感染では、対

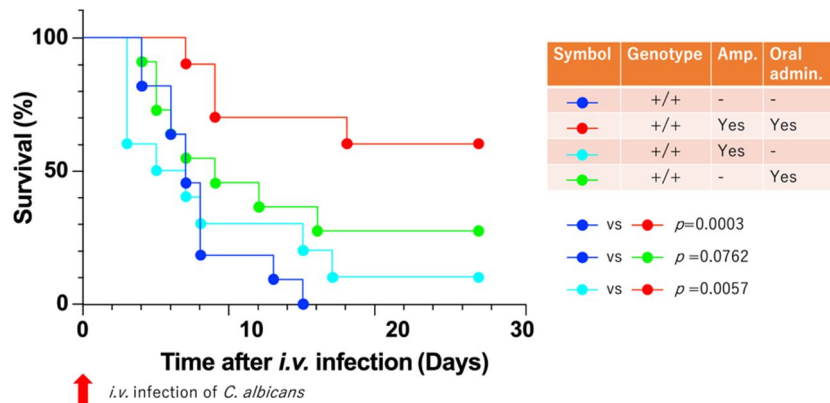


図 3 全身性 *C. albicans* 感染後の生存率
C. albicans を経口接種 21 日後に尾静脈より感染させ、生存率を比較した。

象群と生存率に差は認められないことが明らかとなった(図 3)。これらの結果から、腸管における *C. albicans* の定着には、IL-17A および IL-17F は関与せず、その後の全身性 *C. albicans* の感染防御に重要な働きをしていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuo K, Haku A, Bi B, Takahashi H, Kamada N, Yaguchi T, Saijo S, Yoneyama M, Goto Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Fecal microbiota transplanted prevents <i>Candida albicans</i> from colonizing the gastrointestinal tract.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12680.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miura T, Kawakami K, Kanno E, Tanno H, Tada H, Sato N, Masaki A, Yokoyama R, Kawamura K, Kitai Y, Takagi N, Yamaguchi K, Yamaguchi N, Kyo Y, Ishii K, Imai Y, Saijo S, Iwakura Y, Tachi M.	4. 巻 139
2. 論文標題 Dectin-2-Mediated Signaling Leads to Delayed Skin Wound Healing through Enhanced Neutrophilic Inflammatory Response and Neutrophil Extracellular Trap Formation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol.	6. 最初と最後の頁 702-711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2018.10.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tang C, Kakuta S, Shimizu K, Kadoki M, Kamiya T, Shimazu T, Kubo S, Saijo S, Ishigame H, Nakae S, Iwakura Y.	4. 巻 19
2. 論文標題 Suppression of IL-17F, but not of IL-17A, provides protection against colitis by inducing T(reg) cells through modification of the intestinal microbiota.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Immunol.	6. 最初と最後の頁 755-765
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41590-018-0134-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashiguchi Y, Yabe R, Chung SH, Murayama MA, Yoshida K, Matsuo K, Kubo S, Saijo S, Nakamura Y, Matsue H, Iwakura Y.	4. 巻 201
2. 論文標題 IL-36 from Skin-Resident Cells Plays an Important Role in the Pathogenesis of Imiquimod-Induced Psoriasiform Dermatitis by Forming a Local Autoamplification Loop.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Immunol.	6. 最初と最後の頁 167-182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1701157.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----