

令和 4 年 5 月 22 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10343

研究課題名(和文) 骨代謝因子OPGが担う免疫寛容制御とカンジダ症の発症・増悪機序の解明

研究課題名(英文) RANK/RANKL/OPG signaling upregulates IL-10-regulated anti-inflammatory response during *Candida albicans* infection

研究代表者

小林 美智代 (Kobayashi, Michiyo)

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：加齢により血中などで量的に変化する骨代謝因子RANK/RANKL/OPGが免疫系に関与するか不明である。そこで、骨代謝因子の量的変化が*Candida albicans*の感染に与える影響を検証した。ICRマウス口腔内に*C. albicans*を感染させ、舌組織のmRNA発現量を測定した。その結果、感染後にIL-12, IL-23, IL-10, RANKL, RANK, OPGの発現上昇が認められた。また、可溶性RANKLの舌への投与により、RANKおよびIL-10の発現上昇が認められた。これら本研究の結果は、RANK/RANKL/OPGが*C. albicans*感染病態に関与することを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カンジダ感染症は高齢者に発症率が高い内因性感染症である。高齢者は骨代謝因子Osteoprotegerin (OPG)の血清濃度が若年者、中年者に比較して高いことが報告されている。本研究結果はOPGやRANKLの局所の濃度が*Candida albicans*感染の発症、増悪に関与している可能性を示唆する。これは内因性感染症である*C. albicans*の発症を制御し、QOLを高めて国民の健康寿命を延伸するうえで有益な結果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)： Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) to RANK interactions are critical to pathogenesis in immune cells. Osteoprotegerin (OPG) prevents binding of RANKL to RANK. This study utilized a mouse model (orally inoculated) to determine if there was a correlation between superficial candidiasis, commonly caused by the opportunistic fungus *Candida albicans*, and RANK/RANKL/OPG. Upregulation of OPG, RANKL, and RANK mRNA expression were found in mice whose oral cavity had a superficial *C. albicans* infection. Moreover, administration of exogenous soluble RANKL upregulated the mRNA of RANK in the infected tissue. Exogenous soluble RANKL also upregulated the mRNA of IL-10, which prompted anti-inflammatory effects including wound healing. Therefore, our data suggested that RANK/RANKL/OPG signaling might play a role in the pathogenesis of candidiasis, making this the first study to show the relationship between this opportunistic infection and the RANK/RANKL/OPG axis.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：Osteoprotegerin RANKL RANK *Candida albicans*

1. 研究開始当初の背景

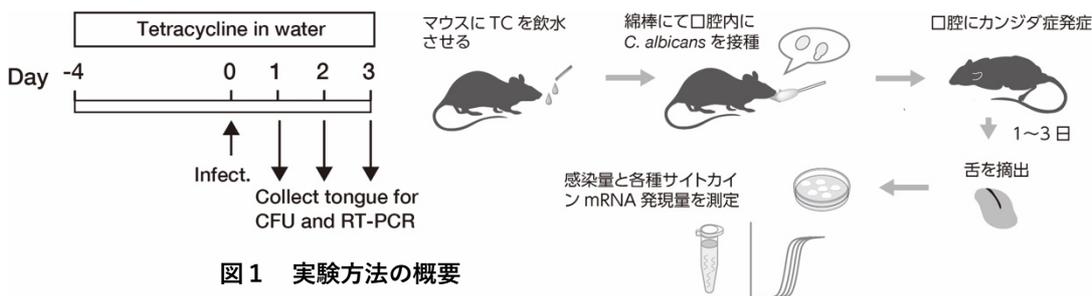
加齢や生活習慣病などにより骨の周囲では Receptor activator of NF- κ B (RANK) ligand (RANKL)が活性化される。一方、血中など骨周辺以外の組織では、その補償作用として RANKL/RANK 結合の抑制に関わる Osteoprotegerin (OPG)の発現が上昇する。高い血清 OPG 値を持つことは疫学的に HIV 感染症、循環器性疾患、糖尿病などの予後不良を示唆するが、その詳細は未だ不明である。我々はこれまで内因性感染症であるカンジダ症の発症機序とこれら骨代謝因子との関連に着目してきた。我々は免疫抑制した「口腔・消化管カンジダ症」モデルマウスを作成し(Kobayashi-Sakamoto M, et al., Microb Pathog. 2018)、*C. albicans* の感染が OPG の血中濃度を上昇させる可能性を示した。しかし、これら骨代謝因子における *C. albicans* 感染の病態形成への関与は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では免疫抑制を行っていないマウスを口腔カンジダ症モデルとして用い、口腔内に接種された *C. albicans* の口腔内病態形成・発症における RANK/RANKL/OPG の関与を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

免疫抑制を行っていない5-6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4日間飲水させた後、*C. albicans* 臨床分離株 OH-1 株を舌に接種 (10^8 CFU/匹)した。その後、感染させたマウスの舌を経時的に採取し、解析を行った(図1)。

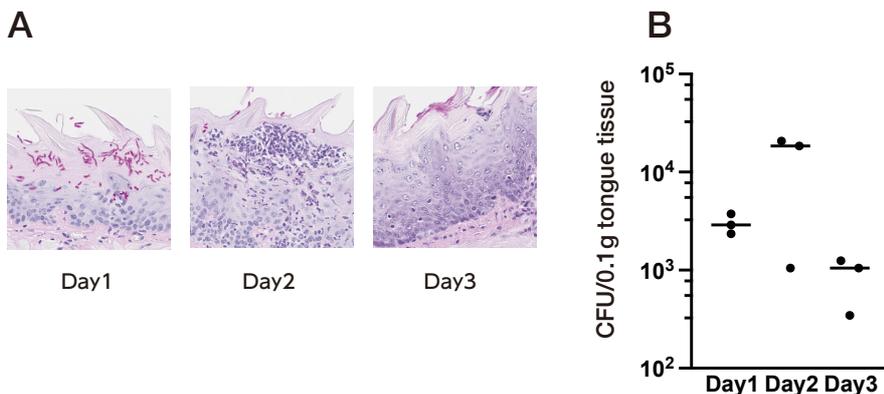


4. 研究成果

(1) マウス口腔内に感染させた *C. albicans* の感染量は経時的に減少する。

マウス口腔内に *C. albicans* を感染させ、経時的に舌の感染量を測定した。結果を図2に示す。

C. albicans は組織染色像においてもプレート培養による感染量の測定においても感染後2日に最も多く認められ、その後急速に減少した。



(2) *C. albicans* 感染は舌組織の抑制性サイトカイン IL-10 mRNA 発現を上昇させる

口腔内に *C. albicans* を感染させたマウス舌から total RNA を取り出し、サイトカイン発現量を測定した結果を **図 3** に示す。炎症性サイトカインである IL-12、IL-23 と共に、抑制性サイトカインである IL-10、制御性 T 細胞の分化・機能発現に重要な Foxp3 mRNA の経時的な増加が認められた。

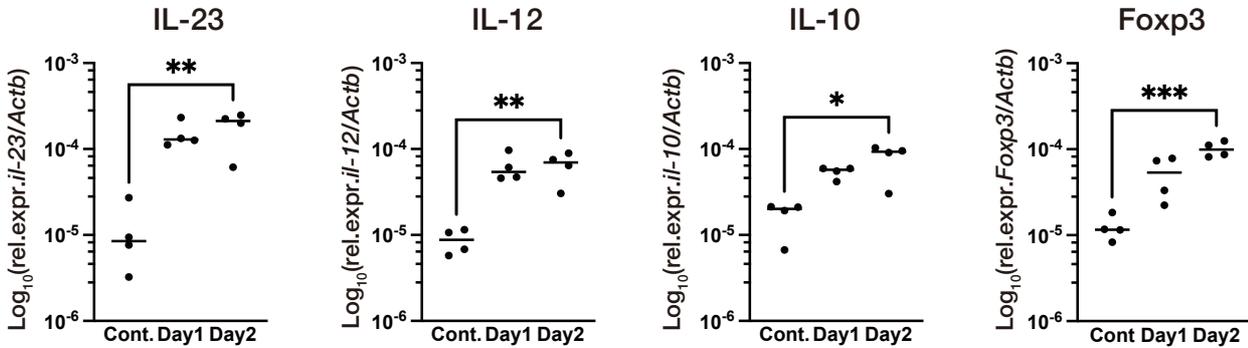


図 3 *C. albicans* 感染後の経時的なサイトカイン mRNA 発現量。

C. albicans を口腔内に感染後 1 日目と 2 日目のマウス舌を採取し、各サイトカインの mRNA 量を real time RT-PCR にて測定した結果を示す。Cont, Control 非感染群。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ 。

(3) *C. albicans* 感染は舌組織の RANK/RANKL/OPG mRNA 発現を上昇させる

RANK/RANKL/OPG が *C. albicans* の感染病態に関与しているか否かを明らかにすることを目的として、口腔内に *C. albicans* を感染させたマウスの舌から total RNA を取り出し、骨関連因子の mRNA 量を測定した。その結果を **図 4** に示す。患部である舌において RANKL, RANK, OPG の mRNA 発現量の増加が認められた。

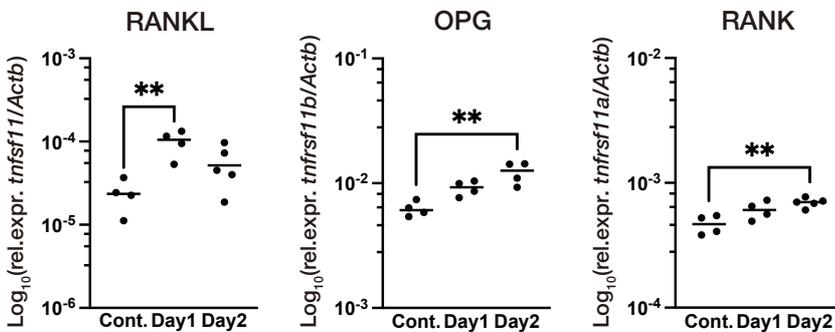


図 4 *C. albicans* 感染後の経時的なサイトカイン mRNA 発現量。
C. albicans を口腔内に接種後 1 日目と 2 日目のマウス舌を採取し、各サイトカインの mRNA 量を real time RT-PCR にて測定した結果を示す。Cont, Control 非感染群。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

(4) *C. albicans* 感染前の sRANKL の舌投与は免疫反応を沈静化する IL-10 mRNA の発現を促す。

骨関連因子が *C. albicans* の感染病態に関与するか否かを明らかにするために、soluble RANKL (sRANKL) を舌に注射した 4 時間後に *C. albicans* を感染させた。対照群には同量の PBS を舌に注射した。その 24 時間後に採取した舌から total mRNA を採取し、各種サイトカイン mRNA 発現量を測定した。その結果 RANK や IL-10 の発現上昇が認められた (**図 5**)。また、感染量は sRANKL 投与によって変化しなかった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kobayashi-Sakamoto M, Maeda T, Yusa J, Kato Y, Kiyoura Y.	4. 巻 149
2. 論文標題 RANK-RANKL signaling upregulates IL-10 mRNA expression in mucosal Candida infection in vivo.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microb Pathog.	6. 最初と最後の頁 104285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.micpath.2020.104285.	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
研究分担者	坂本 直哉 (Sakamoto Naoya) (30466429)	北海道大学・創成研究機構・助教 (10101)	
研究分担者	奥村 一彦 (Okumura kazuhiko) (60194510)	北海道医療大学・歯学部・教授 (30110)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------