

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10252

研究課題名(和文) 高齢者における免疫再構築症候群としてのカンジダ症の発現機序と治療法の開発

研究課題名(英文) Mechanism and development of treatment for candidiasis as an immune reconstitution syndrome in the elderly

研究代表者

清浦 有祐 (Kiyoura, Yusuke)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：90194951

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)：本研究では、カンジダ症のマウスモデルを用いて免疫再構築症候群としてのカンジダ症に特有の発症メカニズムを解明することを目的として、T細胞機能不全マウスにおける *Candida* spp. 3種の病原性を調べた。その結果、*Candida albicans* よりも病原性が弱い *C. tropicalis* または *C. glabrata* (ノンアルビカンスカンジダ) 感染5日後の生存率は共に10%だった。感染1日後の脾臓によるサイトカイン産生には差があり、*C. tropicalis* の場合は IL-1 β の、*C. glabrata* では IL-1 α 、IL-1 β 、および MIP-1 α の産生があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔カンジダ症がカンジダ血症に移行する可能性があるため、舌組織以外に小腸、胃、脾臓、腎臓中の *Candida* spp. 菌数と産生されるサイトカインの種類とその量の増減を調べた。健常マウスでは生存率100%であった病原性が弱い *Candida tropicalis* と *C. glabrata* 感染によって、T細胞機能不全マウスのサイトカイン産生がみられ、その生存率は著しく低下した。この結果は、T細胞が減少する AIDS 患者で見られる免疫再構築症候群としてのカンジダ症発症メカニズムの解明に貢献する。また、サイトカインストームのマウスモデルも確立できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, using a mouse model of candidiasis, we investigated the pathogenicity of *Candida* spp. 3 species in mice with T-cell dysfunction, with the aim of elucidating the unique onset mechanism of candidiasis as an immune reconstitution syndrome. As a result, both *C. tropicalis* and *C. glabrata* (non-albicans *Candida*), which are less virulent than *Candida albicans*, had a 10% survival rate 5 days after infection. There were differences in cytokine production 1 day after infection. Infection with *C. tropicalis* induced IL-1 β production, while *C. glabrata* induced production of IL-1 α , IL-1 β , and MIP-1 α by spleens.

研究分野：口腔微生物学・免疫学

キーワード：カンジダ症 免疫再構築症候群 易感染性宿主 *Candida albicans* *Candida tropicalis* *Candida glabrata*

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の学術的背景

自己免疫疾患患者に対する抗体医薬や免疫抑制剤のプレドニゾロンの投与が突然中止されると、カンジダ症のような日和見感染症が起こる病態を免疫再構築症候群として分類するようになった。サイトカインに対する抗体およびプレドニゾロンの投与中止は、ヒトの免疫機能を回復させるにも関わらず、日和見感染症が起こることは矛盾した現象である。しかし、*Candida albicans* はヒトの体内に常在する真菌なので、免疫機能の回復に伴って、*C. albicans* を排除しようとする免疫応答が過度に強まり、炎症反応の高まりでカンジダ症が起こる。申請者は、口腔カンジダ症のマウスモデルを使用して、免疫抑制剤のプレドニゾロンや抗体医薬である抗 IL-1 α 抗体が口腔カンジダ症の発現に与える影響を調べた結果、プレドニゾロンを舌への感染の翌日に投与した場合は、舌組織及び腸管内の *C. albicans* の菌数は有意に増加した。さらに、免疫抑制剤のプレドニゾロンを投与したマウス小腸の IL-17 産生は有意に低下していた (Kobayashi-Sakamoto et al. *Microb Pathog*, 2018)。抗 IL-1 α 抗体を舌への感染の翌日に投与した場合は、腸管内の *C. albicans* の菌数は有意に増加した。舌に *C. albicans* を感染させた翌日に免疫チェックポイント阻害薬の抗 PD-1 抗体を投与した場合、不投与の場合と比較して腸管内の *C. albicans* の菌数は約 5 倍に増加した。以上の結果から、プレドニゾロン、抗 IL-1 α 抗体および抗 PD-1 抗体の投与を中止すれば免疫抑制が解除され、増加した *C. albicans* を排除するために強い炎症反応が起こると考えられる。

(2) 研究課題の核心をなす学術的問い

免疫抑制剤や抗体医薬の投与の中止に伴って起こる真菌感染症を免疫再構築症候群として考えると、その解明には口腔カンジダ症マウスモデルを使用することが有用である。免疫抑制の急激な中断が起きれば、多数の *C. albicans* を排除するための強い炎症反応が起こると考える。すなわち、長期間マウスを免疫抑制状態に置き、その免疫抑制状態を突然解除することで、ヒトの免疫再構築症候群に似た状態を起こすことができる。

マウスで免疫再構築症候群としての口腔カンジダ症とそれに続くカンジダ血症のような全身的なカンジダ症を起こすことができれば、免疫再構築症候群としてのカンジダ症の発症メカニズムを明らかにできる。

2. 研究の目的

申請者らが確立した口腔カンジダ症のマウスモデルを進展させて、免疫抑制剤を中止することで起こる免疫機能の急激な回復が、*C. albicans* に対する炎症反応を高めることを明らかにする。そして、免疫再構築症候群としての口腔カンジダ症の発症メカニズムとその後の腸管内への感染のメカニズムを解明し、予防法と治療法の開発につなげる。

3. 研究の方法

(1) *Candida* spp. は、*C. albicans* OH-1 株、*C. glabrata* ATCC90030 株、*C. tropicalis* ATCC750 株を使用した。

(2) 感染実験は、奥羽大学動物実験委員会の承認を得て行った。雌性 ICR マウスまたは T 細胞機能不全マウスに、免疫抑制剤のプレドニゾロンを皮下注射し、テトラサイクリン含有水道水の飲水を開始させた翌日にクロルプロマジン塩酸塩を後肢大腿部に注射後に口腔内に *Candida* spp. 菌液を接種した。一部の実験では腹腔内投与を行った。

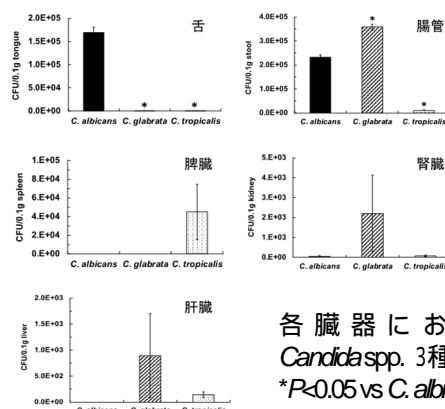
(3) 各マウスの舌、小腸、胃、脾臓、腎臓におけるサイトカイン (IL-6, IL-33, IL-17, MCP-1, IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , および MIP-1 α) 定量を ELISA で調べた。

(4) 上記臓器をホモジナイズして浮遊液を作成し、カンジダ GS 培地で培養して、*Candida* spp. の菌量を測定した。

(5) 統計処理は one-way analysis of variance を用いた分散分析の後、Bonferroni or Dunn method による多重比較検定を行った。また、マウスの生存率の比較においてはログランク検定を使用した。

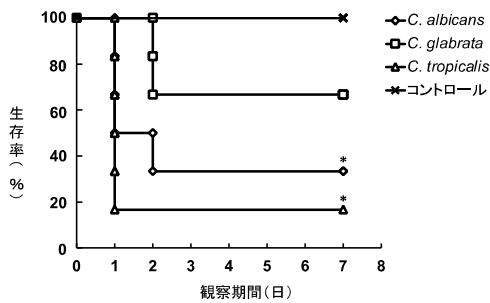
4. 研究成果

(1) 舌への定着は *C. albicans* が *C. glabrata* 及び *C. tropicalis* に比較して有意に高い菌数であった。腸管内での定着は 3 菌種共に検出されたが、特に *C. albicans* と *C. glabrata* が多く認められた。脾臓からは *C. albicans* 及び *C. glabrata* は検出されなかった。腎臓では 3 菌種がすべて検出された。肝臓では *C. albicans* は検出されず、*C. glabrata* と *C. tropicalis* は検出された (右図)。

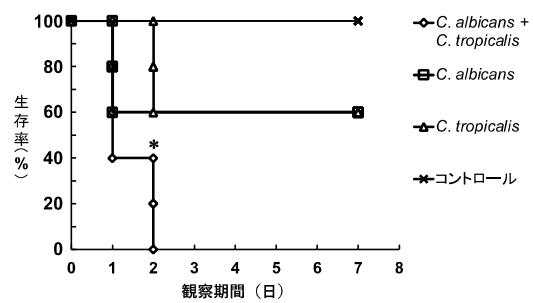


各臓器における
Candida spp. 3種の検出
* $P < 0.05$ vs *C. albicans*

- (2) *C. albicans* を腹腔感染させた場合に感染7日後までの生存率は 33.3%, *C. glabrata* は 66.7%, *C. tropicalis* の場合は 16.7%であった(下左図)。また、*C. albicans* 及び *C. tropicalis* を混合感染させると全てのマウスが死亡した(下右図)。



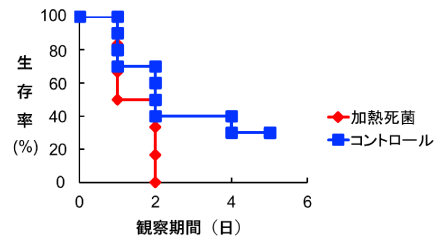
Candida spp. 腹腔投与後の ICR マウス生存率
* $P < 0.05$ vs コントロール



混合感染後の ICR マウス生存率
* $P < 0.05$ vs コントロール

- (3) *C. albicans* 腹腔感染においてテトラサイクリンとプレドニゾロンの両方の処置をしない場合と比較して、テトラサイクリンのみを飲水させた場合、プレドニゾロンを投与した場合、テトラサイクリンを飲水させると共にプレドニゾロンを投与した場合の4群間で生存率に有意差は認められなかった。

- (4) *C. albicans* 感染1日後に、ICR マウス脾臓の IL-1 α , IL-1 β , IL-6 および MCP-1 の有意な産生がみられた。一方、*C. tropicalis* 感染によって IL-1 α , IL-1 β , および MIP-1 α 産生が、*C. glabrata* 感染では IL-1 α のみ有意に増加した。

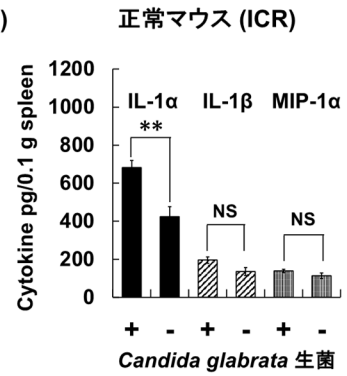
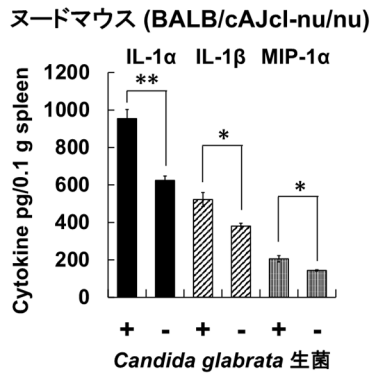
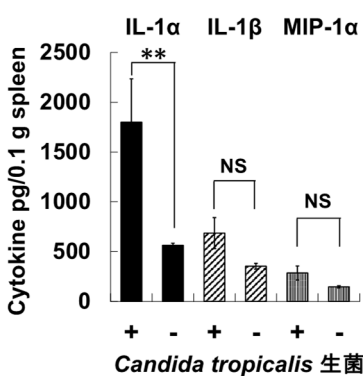


C. albicans 感染生存率に与える加熱死菌投与の影響

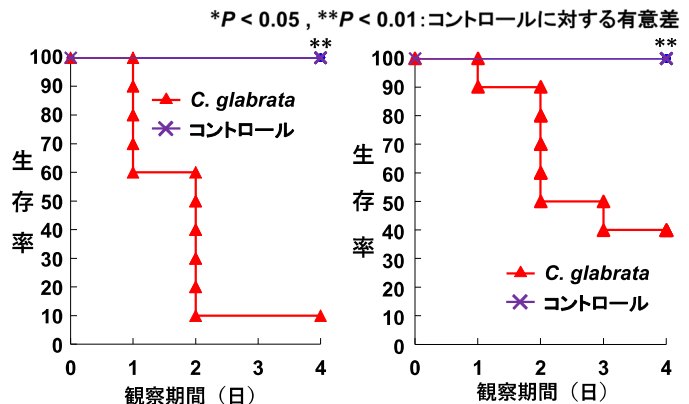
- (5) *C. albicans* の加熱死菌を投与後に生菌を感染させた場合、その致死率は増加した(右図)。

- (6) *C. tropicalis* または *C. glabrata* の加熱死菌投与による ICR マウスの死亡はなかった。

- (7) *C. glabrata* を T 細胞機能不全である BALB/cAJcl-nu/nu マウスに腹腔感染させた場合には、10%の生存率であった。また、感染1日後に IL-1 α と IL-1 β 及び MIP-1 α の有意に高い産生が認められた(右下図)。すなわち、*C. glabrata* は、正常マウスよりも免疫不全マウスのように免疫恒常性が破綻したマウスに対して強い炎症反応を誘導することが示された。



- (8) *C. tropicalis* を BALB/cAcl-nu/nu マウスに腹腔感染させた場合には、10%の生存率であった。また感染1日後、IL-1 α のみ産生が増加した(上図)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: コントロールに対する有意差

** $P < 0.01$: コントロール vs *C. glabrata*

BALB/cAcl-nu/nu マウスの生存率減少と炎症性サイトカイン産生

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 4件）

1. 著者名 中條雅人、玉井利代子、清浦有祐	4. 巻 48
2. 論文標題 カンジダ症マウスモデルを使用した <i>Candida</i> spp. の菌種間における病原性の差異の解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 奥羽大学歯学誌	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 井ノ上靖尊、玉井利代子、清浦有祐	4. 巻 50
2. 論文標題 全身性の <i>Candida albicans</i> 感染に対する宿主の免疫応答	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 奥羽大学歯学誌	6. 最初と最後の頁 9-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 中野貴覚、玉井利代子、清浦有祐	4. 巻 50
2. 論文標題 Non-albicans <i>Candida</i> spp. 感染における宿主の炎症性サイトカインの産生動態	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 奥羽大学歯学誌	6. 最初と最後の頁 19-28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 伊波良将、玉井利代子、清浦有祐	4. 巻 50
2. 論文標題 マウスカンジダ症モデルを用いた <i>Candida glabrata</i> の病原性の解析	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 奥羽大学歯学誌	6. 最初と最後の頁 29-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井ノ上靖尊、玉井利代子、清浦有祐
2. 発表標題 全身性のカンジダ症における宿主の免疫応答
3. 学会等名 第70回奥羽大学歯学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野貴覚、玉井利代子、清浦有祐
2. 発表標題 Non-albicans Candida spp. 感染における宿主の炎症性サイトカインの産生動態
3. 学会等名 第70回奥羽大学歯学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊波良将、玉井利代子、清浦有祐
2. 発表標題 マウスカンジダ症モデルを用いた <i>Candida glabrata</i> の病原性の解析
3. 学会等名 第70回奥羽大学歯学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉井利代子、清浦有祐
2. 発表標題 免疫再構築症候群としての口腔カンジダ症に続発するカンジダ血症のセグメント細菌の抑制に基づく予防法
3. 学会等名 第36回「歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い（令和2年度）」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本一野、玉井利代子、清浦有祐
2. 発表標題 Candida tropicalis 感染に対する宿主の免疫応答
3. 学会等名 第72回奥羽大学歯学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福島和美、玉井利代子、清浦有祐
2. 発表標題 Candida glabrata の免疫不全宿主に対する病原性
3. 学会等名 第72回奥羽大学歯学会
4. 発表年 2022年

〔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
研究協力者	玉井 利代子 (Tamai Riyoko)		

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
---------	---------