

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790423

研究課題名 (和文) APECED 疾患モデルマウスを用いたカンジダ感染防御機構の解析

研究課題名 (英文) Candida infection and defense mechanism in APECED model mouse

研究代表者

栗崎 宏憲 (KURISAKI HIRONORI)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：70403962

研究成果の概要 (和文) : BALB/c マウスに *Candida albicans* を  $3.0 \times 10^5$  CFU 尾静脈接種すると、Aire KO および各種免疫不全マウス ( $\mu$  MT、Rag-1、nu/nu) で感受性に差が認められた。そこでこの感受性の差が何に基づくものか解明するため、各種サイトカインの変動に着目し、Th1、Th2、Th17 応答の代表的なサイトカインとして *C. albicans* 感染マウス血清中の IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-6、IL-17A の変動を測定した。その結果、Aire WT マウスでは IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17A は変動せず、IL-6 のみ上昇することが確認できた。IL-6 が、*C. albicans* 感染により血清での濃度の上昇が認められたことから、IL-6 が関与する自然免疫における貪食細胞の動員や炎症の誘導、また、Th17 細胞の分化がカンジダ感染防御に重要であると考えられた。

研究成果の概要 (英文) : It was found that Aire KO and several immunodeficiency mice ( $\mu$  MT, Rag-1 and nu/nu) had a difference in susceptibility against *Candida albicans* infection by  $3.0 \times 10^5$  CFU intravenous challenge of the pathogen. In order to investigate the difference, we measured changes of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 and IL-17A in *C. albicans* infection mice serum, because main cytokines of Th1, Th2 and Th17 response are IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 and IL-17A, respectively. We found that in Aire WT mice IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-17A did not change, while the level of IL-6 only elevated. In *Candida albicans* infection, we supposed that innate immunity dependent on IL-6 production with the development of Th17 cells and a recruitment of phagocytes to induction of inflammation played an important role.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：感染免疫、カンジダ感染、APECED、Aire

## 1. 研究開始当初の背景

一般に真菌感染は日和見感染症として重要にもかかわらず、その感染成立機構については不明な点が多い。近年、種々の病原微生物に対する宿主の生体応答機構として、パタ

ーン認識受容体を介する自然免疫機構の仕組みが明らかになってきているが、真菌のパターン認識受容体による自然免疫機構の詳細については、現在のところ明らかではない。また最近、TGF- $\beta$  と IL-6 の共存下もしくは

IL-23 で誘導され、IL-17 や TNF- $\alpha$  を高産生する Th17 細胞が発見されている。この Th17 細胞は、自己免疫疾患や好中球活性化、細胞外細菌排除、腫瘍免疫に重要であるという知見が得られつつある。カンジダ感染症防御メカニズムについても、自然免疫、獲得免疫について IL-17 産生細胞 (Th17 等) や Th1 が関与しているとの報告があるものの、詳細はいまだ不明である。

また、自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉性ジストロフィー (autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy : APECED) は、常染色体劣性遺伝形式をとり、自己免疫疾患としてはきわめて珍しく単一の遺伝子異常によって発症する自己免疫疾患である。この疾患は内分泌臓器特異的自己免疫病に加えて、ほぼ全例にカンジダ症を合併する。自己免疫調節遺伝子 (autoimmune regulator : AIRE) はこの疾患の原因遺伝子として同定されており (Nat Genet 1997)、胸腺およびリンパ節に発現することから、中枢および末梢の免疫応答調節にかかわると推測されている。また AIRE 遺伝子は、免疫系の中核器官である胸腺の髄質上皮細胞において、末梢組織特異的遺伝子群の例外的・網羅的活性化 (異所性発現とよばれる) に重要な役割を果たすことにより、自己免疫の制御に関わっていることが明らかとなった (Science 2002, Nat Immunol 2003)。しかし一方、末梢リンパ系における役割についての報告は乏しいのが現状である。

さらに Aire ノックアウト (KO) マウスは、ヒトの APECED に類似した臓器特異的自己免疫疾患をきたすことが知られているが、感染防御に関する報告は皆無である。そこで本研究では、カンジダ感染症を特徴とする APECED の原因遺伝子である自己免疫調節遺伝子 (Aire) に焦点を絞り、Aire をノックアウトしたマウスを用いて、カンジダ感染症の防御メカニズムについて解析する。

## 2. 研究の目的

カンジダ感染症を特徴とする APECED の原因遺伝子である自己免疫調節遺伝子 (Aire) に着目し、Aire をノックアウトしたマウスを用いて、カンジダ感染症の防御メカニズムについて解析を行う。

## 3. 研究の方法

Aire KO マウスは BALB/c マウスに 13 代の戻し交配を行い純系化し、Hetero の遺伝子型で維持している。これらを交配し KO マウスを作成し、雄のみを実験に用いる。また感

染実験には *Candida albicans* (APECED 患者分離株) を使用する。

### (1) *C. albicans* 感染による生存率の検討

Aire KO マウスおよび WT マウスへ *C. albicans* を尾静脈注射にて感染させ、30 日間の生存を観察。

### (2) *C. albicans* 感染を臓器内菌数の変化で確認

WT マウスへ *C. albicans*  $4.2 \times 10^4$  CFU を尾静脈注射し、各臓器 (肝臓、腎臓、脾臓) を接種 1、3、5、7 日後に摘出し、ホモジナイズした。その後 PBS で希釈系列を作成し、サブロー寒天培地 (ニッスイ) に塗布、培養後コロニーをカウントして臓器内菌数の変化を感染後 7 日まで観察。

### (3) Aire KO および各種免疫不全マウスでの *C. albicans* 感受性を生存率で確認

Aire KO マウスおよび各種免疫不全マウスとして BALB/c 遺伝背景の  $\mu$  MT マウス (B 細胞欠損)、nu/nu マウス (T 細胞欠損) および Rag-1 マウス (T および B 細胞欠損) に  $4.0 \times 10^4$  CFU/0.2ml の *C. albicans* を尾静脈注射で感染させ、30 日間の生存率を観察。

### (4) *C. albicans* 感染における血清中各種サイトカインの変動を ELISA 法を用いて測定

BALB/c WT マウスに *C. albicans* を約  $4 \times 10^4$  CFU/0.2ml 尾静脈注射で感染後、1、3、5、7 日後の血清中 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-6、IL-17A を ELISA 法にて測定。使用した抗体はすべて eBioscience 社のもので、IFN- $\gamma$  : Mouse IFN- $\gamma$  ELISA Ready-SET-Go!、IL-4 : Anti-Mouse IL-4 Purified (Capture Ab), Anti-Mouse IL-4 Biotin (Detection Ab), Mouse IL-4 Single Use ELISA RSG Standard (Standard)、IL-6 : Anti-Mouse IL-6 Purified (Capture Ab), Anti-Mouse IL-6 Biotin (Detection Ab), Mouse IL-6 Single Use ELISA RSG Standard (Standard) である。

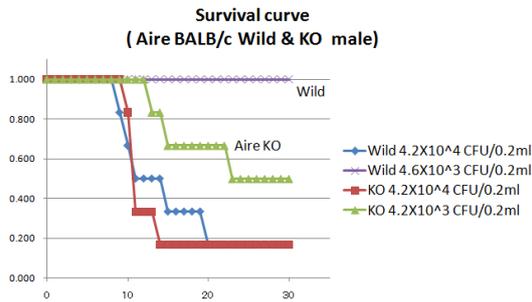
### (5) 末梢リンパ系組織における Aire 遺伝子発現検討を RT-PCR 法にて確認

WT マウスの脾臓、胸腺を摘出後、B 細胞、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞は脾細胞より MACS 磁気ビーズを用い各リンパ球を分取した。その後それぞれの組織および細胞より、RNA を抽出し cDNA 合成を行い、PCR にて Aire の発現を確認。

## 4. 研究成果

### (1) *Candida albicans* 感染による生存率の検討

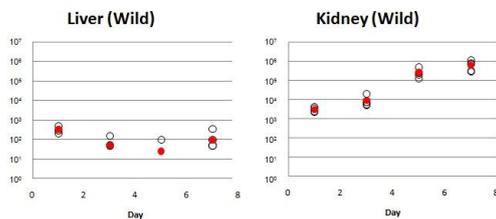
Aire KO マウスおよび WT マウスに *C.albicans* を尾静脈注射で感染後、30 日間の生存率を観察した。



$4.2 \times 10^3$  CFU/0.2ml の感染では WT が 100%生存に対し、Aire KO では 50%生存という結果を得た。このことより Aire KO マウスはカンジダ感染に特異的に感受性であることが明らかであった。さらにこの結果より Aire KO マウスが、感染防御においても、ヒト APECED の優れた疾患モデル動物であることを示唆している。

### (2) *Candida albicans* の感染確認

Wild type (WT) BALB/c マウスへ *C. albicans*  $4.2 \times 10^4$  CFU を尾静脈注射し、各臓器（肝臓、腎臓、脾臓）の臓器内菌数の変化を感染後 7 日まで観察した。



肝臓および脾臓では臓器内菌数の変化がほとんど認められなかったが、腎臓において感染 5 日後より菌数の増加が確認され、マウスへの *C.albicans* 感染が確認できた。

### (3) Aire KO および各種免疫不全マウスでの *Candida albicans* 感受性

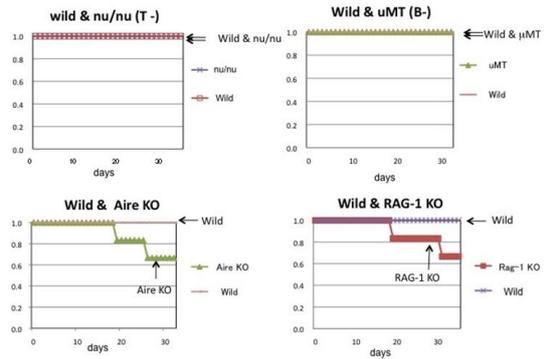
Aire KO マウスおよび各種免疫不全マウスとして BALB/c 遺伝背景の  $\mu$  MT マウス (B 細胞欠損)、nu/nu マウス (T 細胞欠損) および Rag-1 マウス (T および B 細胞欠損) に  $4.0 \times 10^4$  CFU/0.2ml の *C.albicans* を尾静脈注射で感染させ、30 日間の生存率を観察した。

B 細胞を欠損している  $\mu$  MT マウスおよび T 細胞欠損ヌードマウスでは、WT との明確な感受性の変化は認められなかった。しかしながら、Aire KO マウスと Rag-1 KO マウス (T 細胞欠損 & B 細胞欠損) においてカンジダ感受性の亢進が認められた。

これらのことより、*Candida albicans* 感染防御において、B 細胞もしくは T 細胞単独で

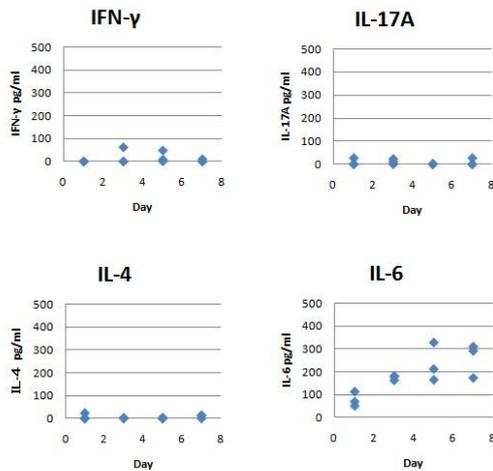
はなく、B 細胞および T 細胞両方の存在が重要であることが示唆された。

T- (nu/nu), B- ( $\mu$ MT), Aire KO, Rag-1 KO. マウスにおけるカンジダ感染 ( $4.0 \times 10^4$  CFU/0.2ml i.v.) に対する感受性



### (4) *Candida albicans* 感染における血清中各種サイトカインの変動

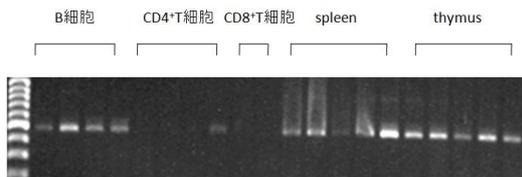
BALB/c WT マウスに *C.albicans* を約  $4 \times 10^4$  CFU/0.2ml 尾静脈注射で感染後、1、3、5、7 日後の血清中サイトカインを ELISA 法にて測定した。Th1、Th2、Th17 応答の代表的なサイトカインとして、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-6、IL-17A の血清中における変動を測定した。



IFN- $\gamma$ 、IL-17A、IL-4 は変化が認められなかったが、IL-6 においては上昇することが確認された。このように、IL-6 が、*C. albicans* 感染により血清での濃度の上昇が認められたことから、IL6 が関与する自然免疫における貪食細胞の動員や炎症の誘導、また、Th17 細胞の分化がカンジダ感染防御に重要であると考えられた。

### (5) 末梢リンパ系組織における Aire 遺伝子発現検討

WT マウスの脾臓、胸腺を摘出後、B 細胞、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞は脾細胞より MACS 磁気ビーズを用い各リンパ球を分取した。その後それぞれの組織および細胞より、RNA を抽出し cDNA 合成を行い、PCR にて Aire の発現を確認した。



RT-PCR法にて確認

マウスの末梢リンパ系組織における Aire の発現を検討したところ、ヒトでは樹状細胞に強く発現しているのに対し、マウスでは特に B 細胞で強く、CD4+T 細胞にも弱い発現が認められた。

末梢血免疫細胞における Aire 遺伝子の発現とその制御、機能については、さらなる検討が必要である。

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

① 栗崎宏憲、Aire 欠損マウスを用いた *Candida albicans* の感染防御機構の解析、第 83 回日本感染症学会総会、2009 年 4 月 24 日、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

栗崎 宏憲 (KURISAKI HIRONORI)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：70403962