

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07009

研究課題名(和文) 偏性嫌気性菌-真菌共存下における病原因子発現調節の解析

研究課題名(英文) Regulation of virulence in fungi under coculture condition with anaerobic bacteria

研究代表者

仁木 満美子 (Niki, Mamiko)

大阪公立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20438229

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)：口腔内常在菌であるグラム陰性嫌気性菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) の培養上清に、同じく常在菌である *Candida albicans* (Ca) の菌糸形成に関する遺伝子の発現を増強させ、菌糸形成およびバイオフィーム形成を促進することが明らかになった。Pg培養上清を作用させたCaは上皮細胞への傷害性や薬剤への抵抗性が向上するのに対し、病原因子であるプロテアーゼの産生は抑制されることが示された。溶媒抽出および分子量分画により、培養上清中の高極性かつ低分子の物質によるものであることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カンジダ症の難治化にはバイオフィーム形成による菌の感染部位への定着および薬剤抵抗性の獲得が寄与していると考えられる。口腔内常在嫌気性菌による *C. albicans* バイオフィーム形成促進メカニズムの解明により、口腔カンジダ症の治療および予防法開発の一助となると考える。また、*P. gingivalis* と *C. albicans* 間のクオラムセンシング機構は報告がなく、相互作用解析により新たな異種間クオラムセンシングメカニズムの解明につながる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：The culture supernatant of the Gram-negative anaerobic bacterium *Porphyromonas gingivalis* (Pg) was found to induce mycelial and biofilm formation of *Candida albicans* (Ca). It was also revealed that Ca treated with Pg culture supernatant induced epithelial cell damage and showed increased drug resistance, while the production of protease, one of the virulence factors of Ca, was suppressed. We also found that farnesol, an anti-biofilm quorum sensing (QS) molecule of Ca, did not inhibit biofilm formation induced by Pg culture supernatant. In addition, it was shown that autoinducer-2, known as a QS molecule of Pg, was not involved in the induction of Ca biofilm formation. By solvent extraction and molecular weight fractionation, it was confirmed that this activity is caused by a highly polar and low molecular weight molecule in the culture supernatant.

研究分野：細菌学

キーワード：Candida albicans バイオフィーム 嫌気性菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

*Candida albicans* (Ca) は健常人の有する微生物叢にみられる常在酵母菌であり、軽度のものから重度の全身性感染症まで幅広く様々な疾患を引き起こすことが知られている。特に免疫不全患者においては重篤な感染症を引き起こし、高い死亡率に結びつくことが問題となっている。

Ca にみられる菌糸形成は菌の感染過程において重要な役割を有しており、本菌の病原性に関与する最も特徴的な性質の一つである。酵母型の Ca は周囲に拡散するのにより適しているのに対し、菌糸型は組織への侵入や傷害に関与するとされている。菌糸を形成する能力を持たない Ca の変異株は病原性の減弱もしくは喪失が認められることが明らかにされており、免疫不全患者から採取した Ca は健常人から分離された株と比較して菌糸を形成する細胞の割合が高いことが報告されている。

Ca の常在部位の一つである口腔内には 700 種以上の微生物が少なくとも 6 億以上存在しており、通常 Ca は他の微生物と競争し共生することで増殖・生存している。こういった環境下では、微生物は同種間あるいは異種間においてクオラムセンシングによる細胞間コミュニケーションを行い、病原性の発現や異種微生物との生存競争に必要な因子の発現、あるいは異種微生物との共存によるバイオフィーム形成や宿主攻撃への抵抗性の獲得などの能力を獲得することが知られている。これまでの研究から Ca は口腔内のいくつかの細菌と共凝集して口腔粘膜および硬組織にバイオフィームを形成することが明らかになっている。

一方、口腔内常在グラム陰性嫌気性菌である *Porphyromonas gingivalis* (Pg) は歯周病の主な原因菌として知られているが、慢性の歯周病患者からは Ca が他の真菌より多く分離されることが報告されていることに加え、歯周病患者から分離される Ca は健常人から分離されるものより上皮細胞への接着性が高く、Ca と Pg の共存が互いの病原性や宿主への抵抗性の獲得に何らかの影響を及ぼしている可能性が推測されている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、Pg が異種である Ca のバイオフィーム形成および病原性にどう関与するか、その分子機構を解明することである。近年の医療の高度化に伴い重篤な免疫不全状態を伴う疾患の罹患数が増加したことにより、口腔カンジダ症は増加傾向にある。感染部位への定着およびバイオフィーム内部における菌の薬剤抵抗性獲得がカンジダ症の難治化に寄与していることから、Pg が Ca の病原性発現をどう調節するか、そのターゲットとなる分子を明らかにすることによりカンジダ症の治療および予防法開発の一助となると考える。また、これまでの報告により、グラム陽性連鎖球菌が産生するシグナル分子を介したクオラムセンシングにより *Candida* 属真菌のバイオフィーム形成が促進されることが明らかになっている。しかしながら Pg と Ca 間のクオラムセンシング機構は報告がないことから、相互作用解析により新たな異種間クオラムセンシングメカニズムの解明を目指す。

### 3. 研究の方法

Pg 培養上清が Ca の病原性に与える影響

#### a バイオフィーム形成実験

Ca 菌体を YPD 液体培地にて調製し、Pg 培養上清を添加し 37°C で培養を行った。その後クリスタルバイオレット法により染色したバイオフィームについて定量解析を行った。

#### b プロテアーゼおよびリパーゼの発現

*Candida* 属菌のプロテアーゼ活性およびリパーゼ活性の評価に用いる培地であるウシ血清アルブミン寒天培地および卵黄加寒天培地を用いて Pg 添加 / 非添加条件下で菌を培養し、活性の強度を比較した。

#### c 宿主細胞に対する傷害性および貪食率への影響

ヒト喉頭癌由来細胞株 HEp-2 に Pg 添加 / 非添加条件下で培養した Ca を感染させ、細胞への接着および放出 LDH 活性による細胞傷害性を観察した。また、ヒト単球由来細胞株 THP-1 を PMA 存在下で培養しマクロファージに分化させたのち、Pg 培養上清添加 / 非添加条件下で 6 時間振盪培養した Ca を感染させ、マクロファージによる貪食への影響を観察した。

#### d 薬剤抵抗性獲得への影響

Ca 菌体を Pg 培養上清存在下で培養後、各種抗真菌薬を添加し XTT 法により菌の生存率を測定した。

#### e 病原遺伝子の発現解析

Pg 培養上清存在下 / 非存在下で培養した Ca より total RNA を抽出し、逆転写反応を行いリアルタイム PCR によりバイオフィーム形成関連遺伝子の発現量を比較した。

既知のクオラムセンシング分子によるバイオフィーム形成制御への影響

バイオフィーム形成抑制に関与するCaのクオラムセンシング分子として知られるfarnesolをPg培養上清と同時に添加し、菌糸形成およびバイオフィーム形成への影響を観察した。また、Pgのクオラムセンシング分子として知られるオートインデューサー-2 (AI-2) の関与について検討するため、AI-2をコードするluxS遺伝子の欠失株より培養上清を調製した。その後Caを得られた培養上清存在下で培養し、Caのバイオフィーム形成誘導作用を野生株上清と比較した

Pg 培養上清中のCa バイオフィーム形成誘導分子の探索

Pg 培養上清を溶媒抽出および限外ろ過により分画したのち、陰イオン交換クロマトグラフィーにより活性画分を分離した。

### 4 . 研究成果

Pg培養上清存在下で培養したCaは菌糸形成およびバイオフィーム形成が促進されることが明らかになった。リアルタイムPCRによる発現解析では、バイオフィーム形成初期の接着及び菌糸形成に関与する遺伝子EAP1、ALS3、HWP1等の発現がPg培養上清添加により増強することが明らかになった。一方、細胞外マトリックス形成を抑制する遺伝子CSH1の発現については減少が認められた。菌糸形成の促進による細胞傷害性への影響について、Pg培養上清存在下で3時間培養後の菌体をHep-2細胞に感染させ、放出LDH活性の測定を行った結果、Caの細胞傷害性が増強することが明らかになった。一方、PMA刺激によるTHP-1由来マクロファージによる貪食については、Pg培養上清処理の有無による貪食率への影響は認められなかった。バイオフィーム形成促進による薬剤感受性への影響については、Pg培養上清存在下で24時間培養した後にFLCZを添加した場合には菌の生存率が上昇する一方で、Pg培養上清とFLCZを同時に添加して培養した結果では、菌の生存率が逆に低下することが明らかになった。

Pg培養上清によるCaの菌糸形成およびバイオフィーム形成促進活性について、Caのクオラムセンシングによるバイオフィーム形成制御に影響を与える可能性について検討するために、バイオフィーム形成抑制作用を持つシグナル分子であるFarnesolをPg培養上清と同時に添加した際のCaのバイオフィーム形成について観察した結果、FarnesolはPg培養上清によるバイオフィーム形成を阻害しないことが明らかになった。また、PgのluxS遺伝子欠失株より培養上清を

調製し、Caのバイオフィーム形成誘導作用を野生株上清と比較した結果、両者に差は認められなかった。このことから、Pg上清中のCaバイオフィーム形成誘導はAI-2によるものではないことが明らかになった。

さらに、活性物質を精製するため、Pg培養上清を乾固したのち各種有機溶媒を用いた溶媒抽出を行った結果、ジメチルスルホキシド不溶性画分に活性を認めた。こうして得られた画分に対し限外濾過による分子量分画を行ったところ、分子量3kDa未満の画分に活性を認めたためこれを回収した。得られた画分についてさらにSep-Pak C18カラムを用いた固相抽出を行い、カラムに吸着しなかった画分にバイオフィーム形成誘導活性を認めたため、これを回収した。

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 1件）

1. 著者名 Yamane Kenshi, Niki Mamiko, Tsubouchi Taishi, Watanabe Tetsuya, Asai Kazuhisa, Oinuma Ken-ichi, Sakiyama Arata, Saren Chaogetu, Matsumoto Yuki, Makimura Koichi, Kaneko Yukihiro, Kawaguchi Tomoya	4. 巻 64
2. 論文標題 A Culture Supernatant from an Actinomycete sp. Affects Biofilm Formation and Virulence Expression of <i>Candida auris</i>;	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Medical Mycology Journal	6. 最初と最後の頁 7~17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3314/mmj.22-00026	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 仁木 満美子
2. 発表標題 真菌のバイオフィルム形成における嫌気性菌の役割
3. 学会等名 第50回日本嫌気性菌感染症学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021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 分担者	坪内 泰志  (Tsubouchi Taishi)  (30442990)	大阪公立大学・大学院医学研究科・准教授   (24405)	

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