

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792305

研究課題名（和文）口腔カンジダ症の自然免疫学的発生機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the natural immunologic generation mechanism of oral candidiasis

研究代表者

秦 浩信（HATA HIRONOBU）

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：70450830

研究成果の概要（和文）：ヒト末梢血単核球における Toll-like receptor (TLR)の発現と機能ならびに Natural killer (NK)活性の口腔カンジダ症との関連性ならびに加齢変化について検証した。その結果、加齢に伴い TLR の発現レベルが減少することはなかったが、TLR2 と TLR4 の機能は減少し、NK 活性は低下傾向を示した。55 歳以上の年齢層で、非カンジダ症群と口腔カンジダ症群で同様の比較解析を行ったところ、TLR の発現レベルには差は認められなかったが、TLR2 と TLR4 の機能ならびに NK 活性は口腔カンジダ症群で有意に減弱していた。本研究によって、TLR2 および TLR4 の機能ならびに NK 活性の低下が口腔カンジダ症の発症に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study was designed to investigate the roles of the expression and function of Toll-like receptors (TLRs) and natural killer (NK) activity in the development of oral candidiasis and in aging of healthy individuals. At first, we examined the relationship of the expression levels and function of TLR2 and its co-receptors (TLR1 and TLR6) and TLR4 and NK activity in aging of the non-candidiasis group. Any correlation was not observed between the expression levels of TLRs and aging in non-candidiasis group. However, it was found that the function of TLR2 and TLR4 significantly decreased and the NK activity slightly, but not significantly, decreased. Then, we compared the expression levels and function of these TLRs and NK activity of oral candidiasis group over 55 years of age with those of non-candidiasis group. It was found that significant differences in the expression levels of TLRs were not observed between them, but the function of TLR2 and TLR4 and the NK activity significantly decreased in oral candidiasis group. This study suggests that a decline of function of TLR2 and TLR4 as well as NK activity play important roles in the development of oral candidiasis in human.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：病態検査学

1. 研究開始当初の背景

近年、医療の高度化に伴って様々な基礎疾患を抱え、抗がん剤、ステロイド剤、免疫抑制剤などの投与により免疫力が低下した易感染宿主の日和見感染症が増加している。このような日和見感染症として、口腔領域では口腔カンジダ症が注目されている。口腔カンジダ症は主に *C. albicans* により引き起こされるが、健常人でも 100 人中 5 人～68 人の割合で検出される。*C. albicans* は酵母型と菌糸型の両方の形態をとる二形性真菌である。口腔カンジダ症は、本菌が舌あるいは頬粘膜表層において菌糸型で発育し、発赤、疼痛、味覚障害などの症状を呈する。また、口腔カンジダ症の中には、本菌が基礎疾患の悪化とともに全身へ播種し、誤嚥性肺炎など重篤な深在性真菌症をきたし、治療を困難にする場合もある。

これまで、口腔カンジダ症は全身的な免疫機構の異常により発症するものとされてきた。たとえば、口腔カンジダ症が HIV 感染者の 50～95%に見られるという報告、糖尿病や悪性腫瘍が口腔カンジダ症のリスクファクターであるという報告、また、抗菌薬が口腔カンジダ症のリスクファクターであるという報告などがある。しかしながら、近年、カンジダ培養検査が臨床に普及するのに伴って、義歯の使用や口腔乾燥などにより口腔常在菌叢が変化し、カンジダ属の菌数が増加し、口腔カンジダ症のリスクが高くなることがわかってきた。また、基礎疾患を持たない健常人においても、加齢とともにカンジダの陽性率が増加してくることや、口腔カンジダ症の発症が栄養状態の低下と関連することも明らかになってきた。

最近、病原体特有の分子構造を認識する受容体として Toll-like receptor (TLR) が注目を集めている。TLR はヒトでは約 10 種類同定されていて、自然免疫系において微生物の侵入を感知するだけでなく、自然免疫系と獲得免疫系の橋渡しをする重要な受容体である。TLR2 ならびに TLR4 は、それぞれ真菌の細胞壁構成成分である β -グルカンやマンナンを認識し、真菌に対する防御能を担うことが知られている。また、Natural killer (NK) 細胞は自然免疫系でウイルス感染細胞やがん細胞を殺傷するだけでなく、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害活性 (ADCC) により獲得免疫系においても重要な役割を果たしている。このように、TLR ならびに NK 細胞は自然免疫系ならびに獲得免疫系において重要な役割を果たしている。

以上の理由から、我々は TLR の発現と機能ならびに NK 細胞の活性の低下が口腔カンジダ症の発症に重要な役割を果たしているのではないかと考えた。そこで、本研究では、糖尿病、エイズ、自己免疫疾患、腫瘍等の既往歴がなく、抗菌薬や免疫抑制剤を投与されていないヒトを対象に、末梢血単核球 (Peripheral Blood Mononuclear Cell : PBMC) における TLR 2 とその補助レセプター (TLR1 および TLR6) ならびに TLR 4 の発現と機能、さらに NK 活性の加齢変化と口腔カンジダ症との関連性を調べた。

2. 研究の目的

「基礎疾患をもたない健常人に関して、栄養状態や、加齢に伴う全身的な免疫能の減弱を評価することで口腔カンジダ症の新たな発症因子を探る」ことが本研究の目的である。口腔カンジダ症など、粘膜表面からの感染に

対しては第一ステップとして自然免疫が主体に対応すると考えられており、本研究では、Toll-like receptor と、NK 活性の二つの因子の關係に着目した。

3. 研究の方法

<被験者>

口腔粘膜の疼痛や味覚障害などを主訴に北海道大学病院歯科診療センター口腔系歯科を受診した 25 歳から 89 歳までの口腔疾患患者ならびに同年代の北海道大学歯学部学生および教員のボランティアに対し、本研究目的について十分に説明を行ったうえで同意を得られた 114 名を対象とした。舌苔の有無に関わらず、口腔粘膜の疼痛や味覚障害などの口腔内症状の訴えがあり、さらにカンジダ培養検査で 1 平板当たり 10 個以上のコロニーが形成された場合に口腔カンジダ症と判定とした。なお、カンジダ培養検査は、舌背を滅菌したデンタルミラーで 10 回擦過して得られた試料をクロモアガー培地

(CHROMager™ Candida, 関東化学, 東京) に塗抹し、35°C で 48 時間好氣的に培養した。また、事前に問診を行い、糖尿病、エイズ、自己免疫疾患、腫瘍等の既往歴があり、また、抗菌薬と免疫抑制剤を投与されているヒトは対象より除外した。

年齢(歳)	25-34	35-44	45-54	55-64	65-74	75-	計
非カンジダ症(人)	21	9	11	15	11	8	75
カンジダ症(人)	1	1	3	8	13	13	39
計	22	10	14	23	24	21	114

<TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 の発現測定>

ヘパリン採血管で被験者より末梢血 20 ml を採血し、フィコール・パック (GE Healthcare Bioscience 社) 密度勾配法で PBMC を分離し、牛胎児血清や抗生物質を含まない RPMI1640 medium (SIGMA 社) で洗浄した後、1% (w/v) 牛血清アルブミンを含む PBS (PBS/BSA) に 1×10^6 細胞/ml になるように懸濁した。蛍光色素標識抗 TLR 抗体あ

るいはそれらのイソタイプコントロールと、4°C で 40 分間反応させ、PBS/BSA で 3 回洗浄後、1 ml の PBS/BSA に懸濁し、フローサイトメーター (FACS Calibur : BD Biosciences 社) でそれぞれの発現レベルを測定した。TLR の発現量はそれぞれの抗 TLR 抗体で得られた平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity : MFI) とそれぞれに対応したイソタイプコントロールの MFI の比で表した。なお、フローサイトメーターのデータは解析ソフト FlowJo (トミーデジタルバイオロジー社) を用いて解析した。

<TLR2 および TLR4 の機能測定>

PBMC 懸濁液 (1×10^6 個/ml) に TLR2 リガンドである FSL-1 (10, 100 ng/ml) あるいは TLR4 リガンドである大腸菌 LPS (100, 1000 ng/ml) を加え、CO₂ インキュベーターで 16 時間培養した後、400 g で 10 分間遠心し、得られた上清中の TNF- α 量を ELISA 法 (ELISA MAX® : BioLegend) で測定することにより評価した。

<NK 細胞の細胞障害活性測定>

K562 細胞 (ヒト慢性骨髄性白血病細胞株) を、 2×10^4 細胞/100 μ l に調製し、3 種の細胞比 (E/T=1 : 20, 1 : 10, 1 : 5) となるように標的細胞に加え、CO₂ インキュベーター中で 4 時間反応させた。遠心により上清を回収し、上清中の乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase : LDH) 量を Cytotox96® (Promega USA) を使用して測定した。

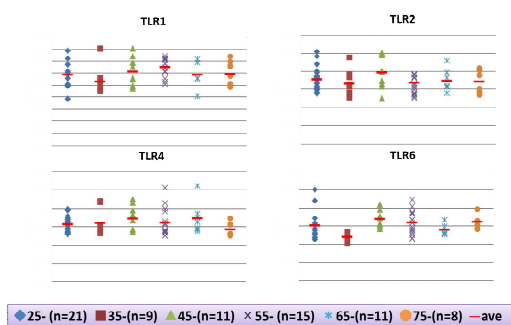
4. 研究成果

(1) 非カンジダ症における自然免疫能の加齢変化

① TLR の発現

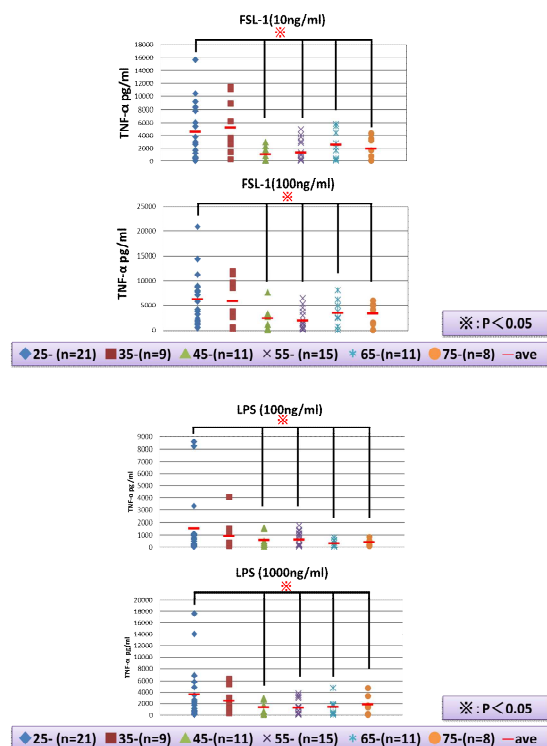
ヒト PBMC における TLR2 とその補助レセプター (TLR1 と TLR6) ならびに TLR4 の発現レベルの加齢変化を調べた。PBMC を各 TLR に対する抗体で染色し、フローサイ

トメーターで解析した。FSC-SSC の分布図をもとに、いくつかのゲートに分け、発現レベルの加齢変化を解析したが、いずれのゲートにおいても有意な差は認められなかった。



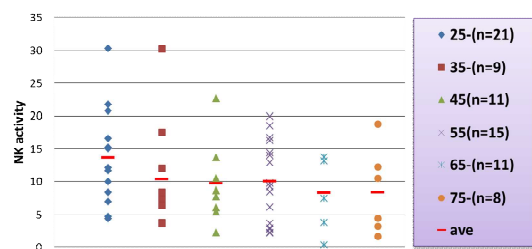
② TLR2 および TLR4 の機能

TLR1 , TLR2 , TLR4 および TLR6 の発現レベルにおいて、加齢との関連性は認められなかったことから、次に TLR2 ならびに TLR4 の機能に着目した。TLR2 ならびに TLR4 はそれぞれ細菌細胞壁成分であるリポタンパク質ならびにリポ多糖体を認識し、それらのシグナルは転写因子 NF-κB の活性化に導かれ、種々のサイトカインを誘導することが知られている。したがって、TLR2 ならびに TLR4 の機能は産生されたサイトカイン量により評価できる。そこで、本研究では、PBMC を TLR2 リガンドであるジアシルリポペプチド FSL-1 あるいは TLR4 リガンドである大腸菌 LPS で刺激し、産生された TNF-α の量を測定することにより、TLR2 ならびに TLR4 の機能の評価した。その結果、TLR2 および TLR4 の機能は共に、25-34 歳群と 35-44 歳群の間には有意差は認められなかったが、45-54 歳群、55-64 歳群、65-74 歳群および 75 歳以上群では有意に減少していることがわかった。



③ NK 細胞の細胞障害活性

NK 活性を 25-34 歳群とその他の年齢群で比較したところ、有意差は認められなかったが、加齢とともに低下していく傾向を示した。



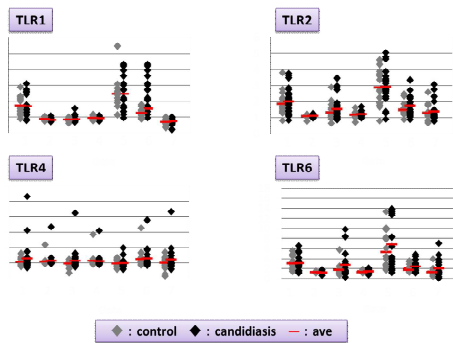
(2) 口腔カンジダ症と自然免疫の関連性

口腔カンジダ症発症と自然免疫系で重要な役割を果たしている TLR2 および TLR4 の発現レベルと機能ならびに NK 活性との関連性を検証した。55 歳未満では口腔カンジダ症患者は少なかったため、口腔カンジダ症群と非カンジダ症群とを比較する際には、55 歳以上の被験者を対象とした。

① TLR の発現

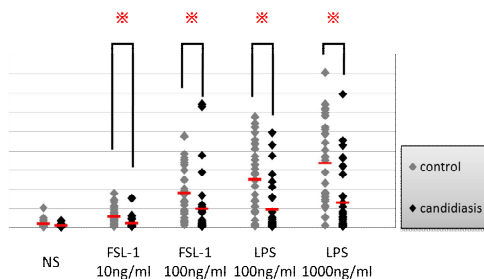
TLR2 とその補助レセプター (TLR1 と

TLR 6) ならびに TLR4 の発現レベルを口腔カンジダ症群と非カンジダ症群で比較した。PBMC を各 TLR に対する抗体で染色し、55 歳以上の口腔カンジダ症群と非カンジダ症群でいくつかのゲートで分け解析したが、いずれのゲートにおいても TLR の発現レベルに有意な差は認められなかった。



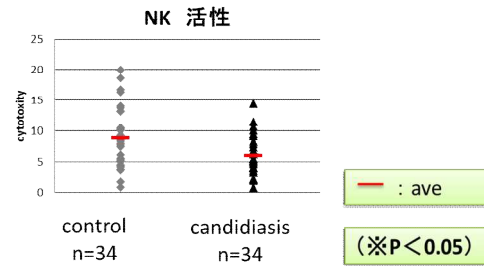
② TLR2 および TLR4 の機能

TLR1 , TLR2 , TLR4 および TLR6 の発現量において、口腔カンジダ症との関連性は認められなかったため、次に TLR2 と TLR4 の機能を FSL-1 ならびに LPS の 2 種の濃度で刺激し比較検討した。TLR2 ならびに TLR4 の機能は共に、同年代の口腔カンジダ症群の方が、非カンジダ症群よりも有意に低下していた。



③ NK 細胞の細胞障害活性

口腔カンジダ症群と非カンジダ症群との NK 活性を比較したところ、カンジダ症群において有意に NK 活性が低下していることがわかった。



4. 研究成果

(1)非カンジダ症群では、加齢により TLR1 , TLR2 , TLR4 ならびに TLR6 の発現は変化しないが、TLR2 ならびに TLR4 の機能は有意に減弱し、また、NK 活性は、有意差はないが、低下傾向を示した。

(2)口腔カンジダ症群は同年代の非カンジダ症群よりも TLR2 ならびに TLR4 の機能および NK 活性が有意に減弱していることがわかった。

(3) 健常ヒトにおける口腔カンジダ症の発症には、主に TLR の機能ならびに NK 活性の減弱が関連していることを示唆している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① 加藤卓己, 山崎 裕, 佐藤 淳, 秦 浩信, 大内 学, 守屋信吾, 北川善政: 在宅自立高齢者における口腔カンジダ菌の保菌状態に関する再調査 北海道歯学雑誌 33 巻 72-89 査読有 (2013)
- ② Moriya S, Yamazaki Y, Hata H, Kitagawa Y, Inoue N, Miura H : Relationships between higher-level functional capacity and dental health behaviors in community-dwelling older adults. Gerodontology 30(2) 133-140 査読有(2012)
- ③ 坂田健一郎, 山崎 裕, 佐藤 淳, 秦 浩信, 水谷篤史, 大内学, 北川善政 : 味覚異常の自覚症状と血清亜鉛値の関連についての研究 日本口腔内科学会雑誌 18 巻 2 号 39-43 頁 査読有(2012)
- ④ Nakamura M, Kitagawa Y, Yamazaki Y, Hata H, Kotsuji M, Fujibayashi, Y Okazawa H, Yonekura Y, Sano K. : Increased glucose metabolism by FDG-PET correlates with reduced tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. Odontology 100(1) 87-94 査読有 (2011)
- ⑤ Associations between self-assessed masticatory ability and higher brain function among the elderly. Moriya S Hata H Journal of Oral Rehabilitation. 38(10) 746-53 査読有 (2011)
- ⑥ Relationships between perceived chewing ability and muscle strength of the body among the elderly. Moriya S Hata H Journal of Oral Rehabilitation. 38(9) 674-679 査読有 (2011)
- ⑦ 後藤隼, 山崎 裕, 佐藤 淳, 秦 浩信, 大内学, 守屋信吾, 北川善政: 在宅自立高齢者における口腔カンジダ菌の保菌状態に関する調査 北海道歯学雑誌 32 巻 2 号 210-221 項 査読有 (2011)
- ⑧ 山崎 裕, 佐藤 淳, 大内 学, 秦 浩信, 北森正吾, 小野寺麻記子, 浅香卓哉, 佐藤健彦, 北川善政: カンジダ性味覚異常の臨床的検討 日本口腔外科学会誌 57 巻 9 号 493-500 項 査読有 (2011)
- ⑨ 山崎 裕, 佐藤 淳, 秦 浩信, 後藤 隼, 大内学, 北川善政: 義歯に定着したカンジダ菌種の評価 オゾン水を用いた義歯洗浄効果 日本口腔粘膜学会雑誌 17 巻 2 号 44-49 項 査読有 (2011)
- ⑩ 山崎 裕, 佐藤 淳, 村田 翼, 秦 浩信, 北川善政: 舌痛症、口腔カンジダ症、味覚異常における臨床検査(総説) 日本口腔検査学会雑誌 3 巻 1 号 3-8 頁 査読有 (2011)
- ⑪ 秦 浩信, 山崎 裕, 佐藤健彦, 阿部貴洋, 進藤正信, 北川善政: 下顎管拡大を伴った下歯槽神経由来の神経周膜腫の 1 例 日本口腔外科学会雑誌, 57 巻 7 号 419-423 項 査読有 (2011)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 山崎 裕, 坂田健一郎, 佐藤 淳, 大内 学, 秦 浩信, 水谷篤史, 北川善政: 北海道大学病院口腔内科における味覚異常患者 210 例の臨床的検討 第 25 回日本口腔診断学会 (平成 24 年 9 月 21 日) 学術総合センター 東京
 - ② 大内 学, 瀬川 卓, 秦 浩信, 山崎 裕, 長谷部晃, 北川善政, 柴田健一郎 : Toll-like receptor の発現・機能ならびに NK 活性の加齢変化と口腔カンジダ症の関連性 第 79 回日本細菌学会北海道支部学術総会 (平成 24 年 8 月 28 日) とかちプラザ 帯広市
 - ③ Hironobu Hata, Yutaka Yamazaki, Tlsubasa Murata, Kazuhito Yoshikawa, Katsuhiko Uesaka, Yojiro Ota, Yoshimasa Kitagawa: A case of dysgeusia caused by zinc deficiency after Pancreaticoduodenectomy MASCC New York 2012 June29
 - ④ 杉山正博, 山崎 裕, 佐藤 淳, 秦 浩信, 後藤 隼, 大内 学, 北川善政: 加齢に伴う口腔カンジダ菌叢の変化に関する検討 第 21 回日本口腔粘膜学会総会・学術講演会 (平成 23 年 9 月 24 日) 鹿児島大学・鶴陵会館 鹿児島
6. 研究組織
(1) 研究代表者 秦 浩信 (HATA HIRONOBU)
北海道大学 大学院歯学研究科 助教
研究者番号: 70450830