

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860867

研究課題名(和文) C型レクチンにより誘導されるIL-17A/Fを介した皮膚真菌症防御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of host defense mechanism against dermatomycosis via IL-17A/F induced by C-type lectin

研究代表者

岩澤 真理 (IWASAWA, Mari)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70375723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：全身性カンジダ症や口腔咽頭カンジダ症のマウスモデルでは、C型レクチン、IL-17を介した好中球遊走により菌体を排除する生体防御機構が知られているが、経皮感染モデルは確立されておらず、皮膚におけるカンジダ防御機構は不明である。本研究は、経皮感染マウスモデルを作成し、皮膚におけるカンジダ防御機構を調べた。WTマウスでは菌を排除したが、Il17af^{-/-}マウスは菌を排除できず局所の炎症が持続しており、IL-17は皮膚カンジダ症防御に極めて重要な役割を演じていた。C型レクチンは既知のDectin-1/-2、Mincle、TLR4/2単独による認識は否定的で、全身性カンジダ症とは異なる防御機構であった。

研究成果の概要(英文)：IL-17 reportedly played a key role in mouse systemic candidiasis in C-type lectin dependent way. However, defense mechanisms to epicutaneous infection of *C. albicans*, termed epicutaneous candidiasis (ECC) remain unclear. Here, we developed ECC mouse model, in which *C. albicans* was inoculated occlusively on shaved skin for 7 days. In this model, skin inflammation reached a peak on day 2 with neutrophil infiltration and abated by day 7 in WT, while Il17af^{-/-} mice showed inflamed skin even on day 7 with high fungal burden, showing the importance of IL-17 for ECC defense. When analyzed in Clec7aClec4n^{-/-}, Tlr2^{-/-}, Myd88^{-/-}, Fcgr1g^{-/-} and Card9^{-/-} mice, none of these receptors or molecules was involved in ECC, suggesting unknown mechanisms of *C. albicans* recognition, contrary to the systemic infection. In conclusion, IL-17 plays a pivotal role in host defense to ECC.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚科学 真菌症

1. 研究開始当初の背景

*C. albicans*は酵母形と菌糸形の2種類の形態をとる二形成真菌で、健常人においては皮膚や粘膜に常在真菌として定着している。通常は症状を起こすことはないが、条件が整うと皮膚や粘膜表面で増殖しカンジダ症となる。AIDS、抗がん薬投与などによる免疫不全、留置カテーテルの存在下などでは、日和見感染症として粘膜カンジダ症や全身性カンジダ症が生じ問題となる。皮膚カンジダ症は、おむつなどの多湿や不衛生、抗生剤投与による菌交代現象などにより、主に間擦部に紅斑、小膿疱、びらん、鱗屑などを生じる。慢性皮膚粘膜カンジダ症 (chronic mucocutaneous candidiasis, CMC) は、再発性、難治性の皮膚・粘膜カンジダ症を生じる原発性免疫不全症のひとつである。CMCの病変部皮膚では、皮膚は発赤を伴って著明に肥厚し、病理組織学的には表皮の主に角層にカンジダの菌要素を多数認め、菌体の周囲には好中球浸潤がみられるにも関わらず菌が排除されず感染が持続する。近年、全身性カンジダ症や口腔咽頭カンジダ症のマウスモデルでは、IL-17を介した好中球遊走により菌体を排除する生体防御機構が知られるようになった。全身性カンジダ症のマウスモデルを用いた研究により、*C. albicans*の細胞壁構成成分であるβ-グルカンやα-マンナンが、それぞれDectin-1、Dectin-2で認識され、CARD9を介してNF-κBを活性化し強力にIL-6、IL-23、IL-1βなどのサイトカイン産生を誘導することが明らかとなった。これらのサイトカインによりTh17細胞がIL-17を産生する。粘膜カンジダ症のマウスモデルでは、Th17細胞のほかにγδT cellsやinnate lymphoid cellsがIL-17を産生する報告がある。放出されたIL-17は、粘膜上皮からの抗菌ペプチド産生や、好中球からのS100A8/A9複合体の産生を誘導する。好中球のS100A8/A9複合体は、クロマチンとともにNeutrophil extracellular traps (NETs) を形成し、細胞外へ放出してカンジダを殺菌するという報告がある。ヒトでは、CMC発症に関与する複数の遺伝子異常が報告されている。*C. albicans*のパターン認識受容体Dectin-1の遺伝子異常、その下流のアダプタータンパクCARD9の遺伝子異常、IL-12やSTAT3などTh17細胞への分化に関わる遺伝子の異常、IL-17FやIL-17レセプター遺伝子異常によるIL-17シグナル伝達の異常、autoimmune regulator遺伝子異常によるanti-IL-17自己抗体産生などである。これらのことから、皮膚でもIL-17を介

した生体防御機構が*C. albicans*排除に重要であることが示唆される。しかしながら、マウスの経皮感染モデルは確立されておらず、経皮感染における皮膚での*C. albicans*に対する防御機構は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究は、経皮感染マウスモデル (epicutaneous candidiasis model; ECCモデル) を確立し、皮膚における*C. albicans* 防御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の動物実験に関する実験プロトコルは、千葉大学動物実験委員会の承認を得た (動物実験 No. 動 27-161)。剃毛したマウスの背部に *C. albicans* (1×10^7 CFU/cm²) を浸したガーゼを 2-7 日間貼付し、皮膚症状、病理組織所見 (H&E、PAS、好中球数)、*C. albicans* の菌数、局所のサイトカイン・ケモカインの変動を調べた。各種ノックアウトマウス (WT、*Il17a*^{-/-}、*Il17f*^{-/-}、*Il17af*^{-/-}、*Rag2*^{-/-}、*Rag2Il2rg*^{-/-}、*Trl2*^{-/-}、*Myd88*^{-/-}、*Clec7aClec4n*^{-/-}、*Fcer1g*^{-/-}、*Card9*^{-/-})、抗体投与マウス (anti-Ly6G 抗体、Isotype IgG 抗体 500 μg/mouse i.p. 感染前日から隔日投与) で上記の実験を施行した。さらに、IL-17A 陽性細胞が eGFP で標識された IL-17A-eGFP レポーターマウスを用いて、感染局所から分離した細胞の FACS を行い、IL-17 産生細胞を同定した。*in vitro* では、WT、*Il17af*^{-/-} マウスから分離した好中球をそれぞれ *C. albicans* と共培養し、*C. albicans* の成長が抑制されるかを顕微鏡下で経時的に観察した。また、共培養後、PDA 培地に移し、発育する *C. albicans* コロニー数を計測した。

4. 研究成果

WT マウスでは感染 2 日後をピークに炎症を生じ、7 日後までに菌を排除し炎症が治まった。感染 2 日目では、WT、*Il17a*^{-/-}、*Il17f*^{-/-}、*Il17af*^{-/-} マウスで、病理組織所見や *C. albicans* の菌数に差がなかった。感染 2 日目の炎症性サイトカイン (IL-1β、IL-6、TNF-α) やケモカイン (MCP-1、MIP-1α、MIP-1β) の量は、*Il17af*^{-/-} マウスでも組織の炎症を反映して、他のマウスと同等に産生されていた。感染 7 日後では、他のマウスが *C. albicans* を排除したのに対し、*Il17af*^{-/-} マウスは排除できず感染が持続していた。IL-17 産生細胞は、Group3 innate lymphoid cells (ILC3) と γδT cells であった。γδT cells は、Vγ3⁺ の dendritic epidermal T cells

(DETCs), $V\gamma 2^+$ の dermal $\gamma\delta$ T cells, $V\gamma 1^+$ の peripheral $\gamma\delta$ T cells のいずれも、*C. albicans* 感染により IL-17A を発現していた。IL-17A 産生細胞は Gr-1 陰性であり、ECC モデルにおいて好中球は IL-17A を発現していなかった。

Rag2^{-/-}マウス (T、B cell 欠損) は *C. albicans* を排除できたが、*Rag2Il2rg*^{-/-}マウス (T、B cell、ILC3 欠損) は排除できないことから、 $\gamma\delta$ T cells がどれほど寄与しているかは不明であるが、ILC3 が皮膚カンジダ症防御に重要であることが示された。

次に、皮膚での *C. albicans* の認識機構について調べるため、パターン認識受容体やその下流のシグナル伝達分子の欠損マウス (*Clec7aClec4n*^{-/-}、*Tlr2*^{-/-}、*Myd88*^{-/-}、*Fcer1g*^{-/-}、*Card9*^{-/-}マウス) を用いた感染実験を行った。これらのマウスはすべて *C. albicans* を排除できたことから、ECC モデルでは Dectin-1/-2、Mincle、TLR4/2 単独による認識は否定的であった。

in vitro では、WT マウスから分離した好中球と *C. albicans* を 30 で共培養すると、*C. albicans* は酵母形の形態となり好中球は菌の発育を抑制することができなかったが、37 の条件下では *C. albicans* は菌糸形の形態となり、好中球は速やかに菌糸に集簇し菌の発育を抑制する様子が観察された。一方、*Il17af*^{-/-}マウス由来好中球は、37 で菌糸形の形態をとる *C. albicans* に対しても集簇せず菌糸は発育し、それを反映しコロニー数が増加した。*Il17af*^{-/-}マウス由来好中球にリコンビナント IL-17A を添加すると、WT マウス由来好中球と同等の *C. albicans* 抑制能を発揮することができた。

anti-Ly6G 抗体投与マウスの感染 7 日後の皮膚は、好中球減少を反映して皮膚の炎症所見は肉眼的にも組織学的にも *Il17af*^{-/-}マウスより軽度であったが、感染局所の *C. albicans* の菌数は Isotype IgG を投与した WT マウスよりも有意に多く、*Il17af*^{-/-}に近い結果であった。

全身性カンジダ症や粘膜カンジダ症においては、*C. albicans* を含む微生物に対する感染防御機構に Th17、 $\gamma\delta$ T cells、CD8⁺ T cells や ILC3 から産生される IL-17 が重要な役割を演じていることが明らかになってきた。一方皮膚ではこれまでに、菌体を皮下注射したものや、表皮をサンドペーパーで損傷後に菌体を貼付し感染させるマウスモデルの報告はあるが、これらは実際の皮膚カンジダ症の病態とは異なるモデ

ルであった。本研究では、ヒトの皮膚カンジダ症とほぼ同様の病態を再現するため、角層を温存した皮膚に菌体を貼付し、密封して湿潤状態とする経皮感染マウスモデル (ECC モデル) を確立した。この ECC モデルにおいて、ILC3 と、 $V\gamma 3^+$ の DETC、 $V\gamma 2^+$ の dermal $\gamma\delta$ T cells、 $V\gamma 1^+$ の peripheral $\gamma\delta$ T cells を含む $\gamma\delta$ T cells から産生される IL-17 が、角層内で菌糸型に増殖する *C. albicans* の排除に重要な役割を演じていることが示された。感染 7 日後に WT、*Il17a*^{-/-}、*Il17f*^{-/-}マウスが *C. albicans* を排除し炎症が治まったのに対し、*Il17af*^{-/-}マウスでは強い炎症とともに多数の *C. albicans* 菌体を認めたことから、IL-17A と IL-17F が皮膚カンジダ症感染防御において非常に重要かつ重複した役割をもつことが明らかとなった。カンジダの認識機構については、表皮をサンドペーパーで損傷後に菌体を貼付し感染させるマウスモデルにおいて、真皮内に存在する温度や痛みを受容体 TRPV1⁺ nociceptive receptors であるという報告 (Kashem et al., 2015) があるが、ECC モデルのように表皮が保たれ *C. albicans* が角層内に留まる病態では菌体が真皮内で認識されることは考えにくく、表皮内に存在する抗原提示細胞によりパターン認識受容体を介して認識される可能性を考えた。そこで、*Clec7aClec4n*^{-/-}、*Tlr2*^{-/-}、*Myd88*^{-/-}、*Fcer1g*^{-/-}、*Card9*^{-/-}マウスを用いた ECC モデルの感染実験を行ったが、驚いたことにこれらのパターン認識受容体とその下流のシグナル伝達分子の欠損マウスはすべて、*C. albicans* を排除することができた。この結果から、Dectin-1/-2、Mincle、TLR4/2 単独による認識は否定的であり、複数のレセプターが重複して関与している、あるいは、未知のレセプターやレセプターを介さない認識機構が存在するなどの可能性が考えられた。

ヒトの皮膚カンジダ症と同様に、ECC モデルにおいても *C. albicans* 感染により表皮内への好中球浸潤、角層下膿疱形成がみられ、WT では感染 7 日後までに *C. albicans* を排除できたが、*Il17af*^{-/-}マウスでは多数の好中球浸潤がみられるにもかかわらず *C. albicans* を排除できなかったことから、IL-17 は好中球が *C. albicans* を排除する能力を発揮するために重要な働きを持っていると考えられた。*in vitro* の実験で、WT マウス由来好中球は酵母形の *C. albicans* を排除できないが、菌糸形の *C. albicans* には速やかに集簇し排除することができた。一方、*Il17af*^{-/-}マウス由

来好中球は菌糸形の*C. albicans*であっても集簇せず菌糸の発育を抑制できなかったが、リコンビナントIL-17A添加により、WTマウス由来好中球と同等に*C. albicans*を抑制したことから、好中球による*C. albicans*抑制にはIL-17が必要であり、非感染時から微量に存在するIL-17が好中球に直接作用して活性化し、菌糸形の*C. albicans*菌体への遊走と貪食に関わっている可能性が示唆された。anti-Ly6G抗体投与実験では、抗体により好中球が減少したマウスでは、感染7日後の局所皮膚の炎症は肉眼的および組織学的に*Il17af*^{-/-}マウスより軽度であったが、*C. albicans*の菌数はIsotype IgG投与WTマウスよりも有意に多く*Il17af*^{-/-}マウスに近い結果であり、好中球がECCに重要な役割を担っていることについては明らかであった。結論として、ILC3と $\gamma\delta$ T cellsから産生されるIL-17は、好中球活性化を介し皮膚カンジダ症防御に極めて重要な役割を演じていた。

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2件)

IL-17 produced by group 3 innate lymphoid cells (ILC3) and $\gamma\delta$ T cells is pivotal for host defense against epicutaneous candidiasis via neutrophil activation

Mari T. Iwasawa, Yuumi Nakamura, Seiichiro Wakabayashi, Shinobu Saijo, Hiroyuki Matsue (45th Annual ESDR Meeting, 2015, September 9-12, Rotterdam, Nederland)

IL-17 produced by group 3 innate lymphoid cells (ILC3) and $\gamma\delta$ T cells is pivotal for host defense against epicutaneous candidiasis via neutrophil activation

Mari T. Iwasawa, Yuumi Nakamura, Seiichiro Wakabayashi, Shinobu Saijo, Hiroyuki Matsue (The 40th Annual Meeting of the Japanese Society of Investigative Dermatology, 2015,

December 11-13, 岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩澤 真理 (Iwasawa, Mari)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70375723