

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21791797

研究課題名（和文） 新規なバイオフィーム形成遺伝子から探る口腔カンジダ症の発症・進行メカニズム

研究課題名（英文） Analyses of *Candida albicans* gene encoding cell surface protein involved in its virulence

研究代表者

柴山 和子 (SHIBAYAMA KAZUKO)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60408317

研究成果の概要（和文）：カンジダ症発症・進行メカニズムを探る新たな糸口として、病原性真菌 *Candida albicans* の細胞表層分子コード遺伝子の機能解析を行った。この遺伝子を欠失すると菌糸形成やバイオフィーム形成能等が減弱することから、新規な病原性因子であることが示唆された。生体組織への侵襲傷害さらに宿主組織内に侵入した *C. albicans* の増殖機構の解明から、真菌の病原性の包括的理解への一助が得られた。

研究成果の概要（英文）：*Candida albicans* possesses multiple determinants which contribute to its survival and virulence. One such factor is its ability to undergo a dimorphic shift, from growth as a yeast cell to hyphal growth in response changes in the host environment. The functional importance of *C. albicans* putative cell surface antigen, suggested to contribute to this organism's fungal virulence and growth element acquisition ability, was investigated. The results suggest that cell surface antigen plays a role in the virulence of *C. albicans* and contributes to its dimorphism. It is also suggested to function as a growth element receptor on the cell surface of this microorganism.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2010年度 | 59,427 | 17,828 | 77,255 |
| 2011年度 | 640,573 | 192,171 | 832,744 |
| 2012年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 959,999 | 4,159,999 |

研究分野：口腔微生物学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯学

キーワード：*Candida albicans*, 病原性

1. 研究開始当初の背景

Candida albicans は多くの健常者より検出される常在性真菌であるが、免疫力の低い高齢者等の易感染性宿主に対しては口腔咽頭カンジダ症を含む重篤な真菌症を引き起こす。

高齢化社会の進展、広域スペクトラムの抗菌剤の使用等の多様な因子により真菌症

は増加の一途を辿っている。

真核生物である *C. albicans* には一般の抗生物質は効果がなく抗真菌活性物質の多くがヒトに対して毒性を有するため、新しい抗真菌薬の開発も難しい状況である。

近年、高齢者の誤嚥性肺炎をはじめとする全身疾患が、口腔内環境・微生物と関連することが指摘され、口腔が全身疾患のリザーバ

一となり、高齢者のQOL低下を招くのみならず生命をも脅かすことが懸念されている。高齢化社会を迎えている我が国では、重要な感染症の一つである。

カンジダ症の成立機序やそれに関与する遺伝子を分子生物学レベルで詳細に追う研究が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

C. albicans の病原性発現のメカニズムは、未同定因子を含め種々の要素が複合的に関連するものと推察されており、その解明は抗真菌薬開発、カンジダ症の全貌解明に急務とされる。

C. albicans は、環境に応じて酵母形あるいは菌糸形の発育を示すユニークな二形性変換菌種であり、環境変化への多様な適応応答機構を持つ。

カンジダ症成立には菌糸形成とそれに続く組織侵襲が重要となる。また、この形態変換能は *C. albicans* の作るバイオフィームとも密接な関係を持つと考えられている。

真菌には、細胞外の膜蛋白質に固有のモチーフが存在する。報告者が着目するタンパクもこのモチーフをもち、細胞表面でのレセプターおよび病原因子のシグナルトランスデューサーとしての働きや、付着分子としての機能、宿主-菌体間の相互作用、クオラム・センシングを担い、真菌のバイオフィーム形成・維持への関与により病原性に寄与することや、本菌の口腔粘膜組織への侵襲能の減弱、バイオフィーム形成能の低下およびクオラム・センシング機構に影響を与えることが予想される。非常に興味深いターゲットであり、このタンパクの機能解析が口腔カンジダ症の発症・進行メカニズム解明への足がかりにもなるはずである。

カンジダ症発症・進行メカニズムを探る新たな糸口として、二形成変換に関与しレセプターとしての可能性を有する細胞表面分子に焦点を当て、生体組織への侵襲傷害さらに宿主組織内に侵入した *C. albicans* の増殖機構の解明から、遺伝子発現制御を含めた、口腔領域および全身における真菌の病原性の包括的理解を目指した。

3. 研究の方法

C. albicans の細胞表面タンパク質コード遺伝子の欠失変異株、野生株および親株、補完株を供試し、以下の研究を遂行した。

欠失変異株は他の研究グループより供与された。

- (1) 菌糸形増殖能測定
血清誘導条件における増殖を、クリスタルバイオレットを用いて測定した。
- (2) 二形成変換能、菌糸形態の観察
血清添加培地を用い、酵母形⇄菌糸形の増殖形態の割合の変化、およびその形態的特徴を観察した。
- (3) 増殖必須因子の獲得能の評価
増殖必須因子を含まない培地での増殖と、同因子への結合能を測定した。
- (4) バイオフィーム形成能の評価
Perez らの方法 (FEMS Yeast Res. 2006;6(7):1074-84.) を参照しポリスチレン製細胞培養プレートでのバイオフィーム形成の観察を行った。
マイクロタイタープレート上で *C. albicans* にバイオフィームを形成させ、Alamar blue アッセイを用いたカイネティクス解析を行った。
- (5) 補完株の構築
URA3 選択マーカーを利用し、これを組み込んだプラスミドを用いて栄養要求性を指標に、作製を行った。
この補完株についても、上記(1)~(4)の実験を行った。

4. 研究成果

- (1) 野生株および親株比べ、*C. albicans* の細胞表面タンパク質コード遺伝子の欠失変異株では、血清誘導条件における菌糸形増殖が低下した (図1参照)。
- (2) 野生株および親株比べ、*C. albicans* の細胞表面タンパク質コード遺伝子の欠失変異株では、二形成変換能に減弱がみられ、不完全な菌糸形態を呈した (図2参照)。
- (3) 野生株および親株比べ、*C. albicans* の細胞表面タンパク質コード遺伝子の欠失変異株では、増殖必須因子の獲得能にも影響が確認された。増殖の抑制が、必須因子の獲得能の低下と関連することが示唆された。
- (4) 野生株および親株比べ、*C. albicans* の細胞表面タンパク質コード遺伝子の欠失変異株では、バイオフィーム形成量が減少した。加えて、その構造も粗であった。この細胞表面タンパク質が、本菌のバイオフィーム形成に量・質ともに関与していると考えられる。
- (5) 形質転換効率が非常に低く、補完株の作

製に困難を極めたが、試薬や培養方法に改良を重ね、構築に至った。この手技は新たに欠損株や補完株を作製する際に有効であり応用可能であると考えられる。この補完株において、菌糸形増殖、二形成変換能、菌糸形態、増殖必須因子の獲得能、バイオフィーム形成能は、野生株および親株と同程度に回復あるいは、同様の形態を呈することが確認された。

本研究では *C. albicans* の二形成変換を血清誘導条件下で評価した。その他の誘導条件（培養温度、中性 pH、窒素源制限および栄養欠乏等）における野生株および親株との比較にも興味を持たれる。各々の菌糸形成誘導条件において関与する異なる複数の遺伝子とそのシグナル経路が報告されている。今後、マイクロアレイによる網羅的解析を行うことにより、二形成変換シグナル経路の詳細を探る一助になると考えられる。

カンジダ症成立には菌糸形成とそれに続く組織侵襲が重要であり、この形態変換能が *C. albicans* の作るバイオフィームと関連すると考えられている。野生株および親株と比較し、*C. albicans* の細胞表層タンパク質コード遺伝子の欠失変異株において、バイオフィーム形成能の減弱、増殖必須因子の獲得能の低下がみられた。共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた解析を行い、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いてバイオフィーム形成過程の解析の詳細を追う予定である。

これらの結果から、着目した細胞表層タンパク質が *C. albicans* の生体内での増殖過程で重要な役割を担うことが示唆された。

本研究で得られた成果は、着目した細胞表層タンパク質が *C. albicans* の病原性を理解するための非常に興味深いターゲットである事を示し、この解析を通してカンジダ症の発症・進行メカニズム解明への足がかりを掴みつつあると言える。

今後の展望として、生体組織への侵襲傷害さらに宿主組織内に侵入した *C. albicans* の増殖機構の解明から、遺伝子発現制御を含めた、口腔領域および全身における真菌の病原性の包括的理解を目指すため、*in vivo* 研究や網羅的ゲノム解析、メタゲノム解析を視野に入れている。

3次元ヒト口腔粘膜モデルを用いた、付着・侵襲能の評価を行う予定である。さらに、口腔咽頭カンジダ症および全身性カンジダ症モデルマウスを用い、この細胞表層タンパク質の *in vivo* での機能を探る予定である。

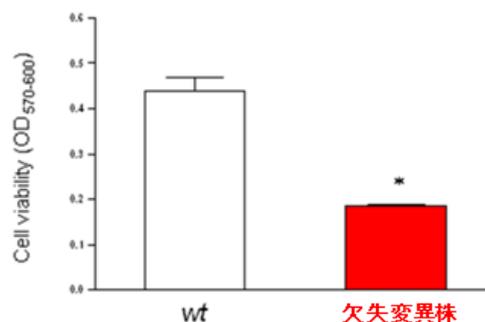


図 1. 菌糸形発育

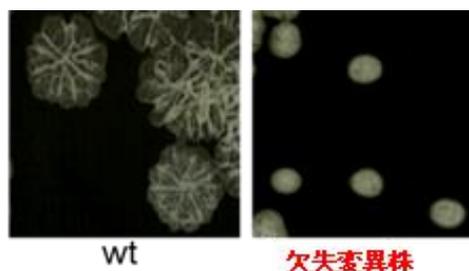


図 2. 血清誘導条件下での菌糸形態

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）

〔雑誌論文〕（計 1 件）

① Okamoto-Shibayama K, Sato Y, Azuma T. Resveratrol impaired the morphological transition of *Candida albicans* under various hyphae-inducing conditions. *J Microbiol Biotechnol.* 2010May; 20(5): 942-5.

<http://www.jmb.or.kr/journal/viewJournal.html?year=2010&vol=20&num=5&page=942>

〔学会発表〕（計 4 件）

① *Candida albicans* による感染の成立と進行メカニズムに関与する遺伝子解析
柴山 和子, 佐藤 裕, 東 俊文
第 82 回日本生化学会大会, 平成 21 年, 神戸市

② *Candida albicans* の病原性に関与する細胞表層蛋白質遺伝子の解析
柴山 和子, 佐藤 裕, 東 俊文
第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 平成 22 年, 東京都

③ *Candida albicans* の鉄獲得に関与する細胞

表層タンパク質コード遺伝子

柴山和子, 菊池有一郎, 国分栄仁, 佐藤裕,
石原和幸

第 54 回歯科基礎医学会学術大会, 平成 24 年,
福島県

④ *Candida albicans* の病原性に関与する細胞
表層タンパク質コード遺伝子

柴山和子, 菊池有一郎, 国分栄仁, 石原和
幸

第 86 回日本細菌学会総会, 平成 25 年, 千葉
県

[図書] (計 1 件)

① 柴山和子, 他, CMC 出版, レスベラトロール
の基礎と応用 (監修: 坪田一男) 第 14 章 レ
スベラトロールの抗菌・抗真菌作用

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴山 和子 (SHIBAYAMA KAZUKO)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号: 60408317

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: