

平成 30 年 5 月 20 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20371

研究課題名(和文) 全身での免疫応答による口腔内真菌の選択的制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of immune response against pathogenic fungus *Candida albicans*

研究代表者

永尾 潤一 (Nagao, Jun-ichi)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：30509047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：病原真菌 *Candida albicans* に対する生体防御機構として IL-17 産生を特徴とする Th17 細胞による獲得免疫応答が重要な役割を果たすことが分かっているが、そのメカニズムは不明な点が多い。Th17 細胞への分化を司る T 細胞エピトープを探索した結果、*C. albicans* 菌糸形細胞膜成分に高い Th17 分化誘導活性を見出した。さらに *C. albicans* 抗原特異的 Th17 細胞をマウスに移入することで、口腔カンジダ症が効果的に抑制されることが明らかとなった。また、*C. albicans* に対する Th17 細胞による免疫応答は消化管を介して全身性に応答することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)： *Candida albicans* is the most important fungal pathogen of humans and causes oral candidiasis. T helper 17 (Th17) cells have been known to mediate protective immunity against *C. albicans* infection. However, little is known about the regulatory mechanism to induce Th17 immune response by *C. albicans*. We focused on the T-cell antigens in *C. albicans* to induce Th17 cells. A membrane fraction of mycelial cells effectively induced differentiation of CD4+ T cells to Th17 cells. Mycelial membrane-differentiated Th17 cells adoptively transferred intravenously prevented oral candidiasis by oral infection of *C. albicans*.

研究分野：感染免疫学

キーワード： *Candida albicans* 獲得免疫 Th17

## 1. 研究開始当初の背景

口腔真菌感染症は、高齢者や免疫不全患者などの易感染宿主で発症する日和見感染症である。*Candida albicans* は病原性が高い真菌であり、舌や口腔粘膜に感染した場合に口腔カンジダ症の原因となる。高齢化が急速に進む我が国において、口腔カンジダ症の患者数は増加しており、社会的関心は高い。カンジダ感染症は難治性が高く、有効な化学療法が望まれているが、安全で有効な抗真菌薬は極めて少ない。

*C. albicans* に対する宿主の生体防御には獲得免疫が関与することが知られている。その中で、口腔内のインターロイキン17 (IL-17) 産生を特徴とするT細胞であるTh17細胞が重要な生体防御の役割を果たし、Th17欠損マウスでは口腔カンジダ症が重篤化することが報告されている (J. Exp. Med.206: 299-311, 2009)。*C. albicans* 自体がTh17への分化を誘導する抗原になると考えられるが、そのメカニズムは不明な点が多い。以上の背景から、申請者は、*C. albicans* 抗原に特異的なTh17細胞による免疫応答を理解し、さらにこれを制御できれば、口腔カンジダ症の制圧が可能になるのではないかと着想した。また、これまでの口腔カンジダ症研究は口腔内局所のみに限局されていた。近年、腸管が免疫応答の重要な場であり、Th17細胞への分化は腸管で生じることが明らかになっている (Cell. 140: 845-858, 2010)。よって、口腔カンジダ症を口腔内に限局した疾患でなく、腸管を主体とした全身を介した免疫応答という新しい視点で研究を展開する必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

上記の研究背景から、*C. albicans* に対する宿主の免疫応答を、腸管を主体とした全身での免疫応答として捉え、以下の項目について解析することで、口腔カンジダ症に対する新しい治療法や予防法の開発にむけた基盤を確立することを目的とする。

(1) T細胞の分化を司る *C. albicans* 由来 T細胞エピトープの同定

(2) *C. albicans* に対する腸管を介した免疫応答解析

(3) *C. albicans* 抗原特異的 Th17細胞による口腔カンジダ症の抑制効果の検証

## 3. 研究の方法

(1) T細胞の分化を司る *C. albicans* 由来 T細胞エピトープの同定

全ゲノムシーケンスが判明している *C. albicans* SC5314株を用いた。T細胞の分化の評価は以下の条件で行った。*In vitro* において、*C. albicans* 由来のタンパク質を抗原として提示させた野生型マウス (B6) 骨髄由来樹状細胞と B6 マウスの脾臓と末梢リンパ節から精製した CD4<sup>+</sup> T細胞を共培養後に、Th17細胞への分化をサイトカイン IL-17産生を指標に Flowcytometry により評価した。

*C. albicans* は酵母形と菌糸形の2つの形態を示す二形性真菌である。それぞれの形態の細胞をガラスビーズ破砕、超遠心、化学処理などにより分画し、細胞壁、細胞膜、細胞質画分に分画した。Th17分化応答が確認された細胞成分は、逆相 HPLC と二次元電気泳動により分画し、プロテオミクス解析により候補となる抗原タンパク質を同定した。同定したタンパク質は、大腸菌発現系を用いて His-tag 融合タンパク質として大量発現させ精製した。

(2) *C. albicans* に対する腸管を介した免疫応答解析

GFP発現ベクターを *C. albicans* に導入した GFP発現 *C. albicans* 株を構築した。構築した菌株の酵母形細胞 ( $2 \times 10^8$  cells) を B6 マウスに胃ゾンデにより投与した。投与 10日後にマウスの脾臓と末梢リンパ節から CD4<sup>+</sup> T細胞を単離し、*C. albicans* 抗原を提示させた骨髄由来樹状細胞と共培養し、Th17細胞への分

化を Flowcytometry により解析した。投与した菌株の腸管への定着は、糞便懸濁液のカンジダ選択培地でのコロニー形成とその GFP 発現により評価した。

### (3) *C. albicans* 抗原特異的 Th17 細胞による口腔カンジダ症の抑制効果の検証

既知のマウス口腔カンジダ症モデルとは異なり、抗生物質および免疫抑制剤を使用しないモデルを構築した。クロルプロマジンの筋肉内注射による鎮静後に *C. albicans* 酵母形細胞の菌液 ( $2 \times 10^9$  cells/ml) を滅菌綿棒を用いて舌表面に塗布した。

実験(1)により分画した菌体成分が T 細胞抗原として機能するかを確認するために、ドナーとなる IL-17-GFP レポーターマウスのリンパ節および脾臓より  $CD4^+$  T 細胞を単離し、分画した菌体成分で刺激することで *C. albicans* 抗原特異的 Th17 細胞を分化させた。レシピエントとなる B6 マウスに *C. albicans* 抗原で刺激した Th17 細胞を尾静脈より移入した 1 日後、構築した口腔カンジダマウスモデルにより口腔カンジダ症を発症させた。3 日後に口腔カンジダ症の病態抑制効果を臨床スコア値と PAS 染色により評価した。

## 4. 研究成果

### (1) T 細胞の分化を司る *C. albicans* 由来 T 細胞エピトープの同定

*C. albicans* の酵母形と菌糸形の両形態の細胞から抗原を探索した。その結果、両形態の細胞からそれぞれ Th17 分化誘導能がある菌体成分を見出した。その中で、*C. albicans* 菌糸形細胞膜成分 (9.0%) は他の成分 (0.7 ~ 4.4%) と比較して強い Th17 分化誘導能を示した(図1)。このことから *C. albicans* の菌糸形細胞膜には  $CD4^+$  T 細胞を Th17 へ分化させる抗原タンパク質が存在する可能性が示唆された。次に Th17 分化誘導が確認された菌糸形細胞膜成分を逆相 HPLC により分画し、

Th17 細胞への分化を指標に評価した。さらに、分画サンプルを二次元電気泳動に供して、応答が見られた分画特異的に見られるスポットをゲルから切り出し、マスマスペクトロメトリによる質量分析によりタンパク質を同定した。同定したタンパク質の中で、スコアが高かった 7 種のタンパク質に関して、大腸菌発現系を用いて大量発現させ精製した。現在、精製タンパク質を用いて Th17 細胞への分化誘導能を評価している。その中で、Th17 応答性が高いタンパク質を見出すことができている。今後、解析を進めて同定したタンパク質を基にペプチドレベルで T 細胞エピトープの同定を進める予定である。

### (2) *C. albicans* に対する腸管を介した免疫

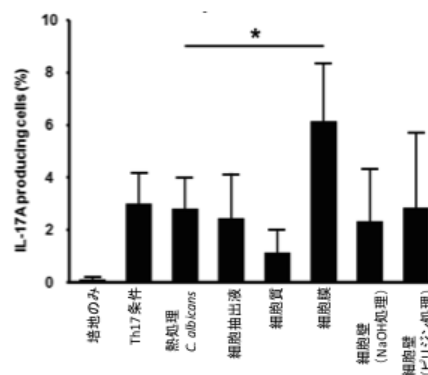


図1. 菌糸形細胞成分による Th17 分化誘導

### 応答解析

GFP発現 *C. albicans* は胃ゾンデ投与により、腸管に定着することが分かった。また、ペニシリンを飲料水として投与することで、菌の腸管への定着が高くなった。また、胃ゾンデ投与10日後に脾臓と末梢リンパ節由来  $CD4^+$  T 細胞を実験(1)で同定した菌糸由来細胞膜成分で抗原刺激した結果、胃ゾンデ非投与群と比べ、高い Th17 応答が確認された。これにより、*C. albicans* に対する Th17 細胞による免疫応答は、口腔を介さずに消化管を介して全身性に応答することが示唆された。

### (3) *C. albicans* 抗原特異的 Th17 細胞による

## 口腔カンジダ症の抑制効果の検証

実験(1)で同定した Th17 誘導能がある菌糸形細胞膜成分により分化させた Th17 細胞が口腔カンジダ症を抑制することができるかを検証した。口腔カンジダ症における Th17 細胞の養子移入の効果を検証するにあたり、既知の口腔カンジダ症モデルで使用される免疫抑制剤を使用しない系を構築した。その結果、鎮静剤であるクロルプロマジンの筋肉内投与後に *C. albicans* を舌に塗布することで口腔カンジダ症を発症させる系を構築することができた。

*Ex vivo* において菌糸形細胞膜成分で分化させたドナーの Th17 細胞を B6 マウスに静脈注射により養子移入して、口腔カンジダ症発症の有無を検討した。その結果 Th17 細胞を養子移入した群は、対照群と比較して、口腔カンジダ症臨床スコアを有意に低下させた(図2)。

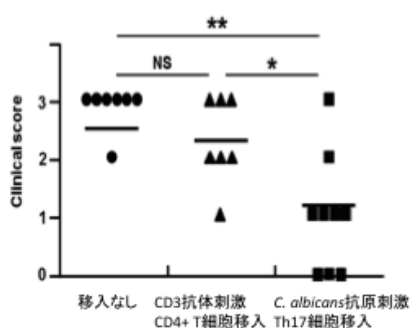


図2. T 細胞移入による口腔カンジダ症の抑制効果

また、Th17 細胞を養子移入した群のマウス頸部リンパ節には他のリンパ節と比較して移入細胞の集積が見られた。舌組織のPAS染色による組織学的評価においては Th17 細胞を養子移入した群では上皮層への菌糸の侵入および多核白血球の浸潤が減少していた。以上の結果から、菌糸形細胞膜に存在する *C. albicans* 抗原により分化させた Th17 細胞は、口腔カンジダ症を抑制することが明らかとなった。本研究で絞り込んだ菌糸形細胞膜成分中の候補タンパク質は、口腔カンジダ症の

ワクチン開発に発展すると期待される。

## 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)

[雑誌論文](計 3件)

1. Tasaki S, Cho T, Nagao J, Ikezaki S, Narita Y, Arita-Morioka K, Yasumatsu K, Toyoda K, Kojima H, Tanaka Y. Th17 cells differentiated with mycelial membranes of *Candida albicans* prevent oral candidiasis. *FEMS Yeast Res.* 18: foy018, 2018(査読あり). doi:10.1093/femsyr/foy018.
2. Nagao J, Cho T, Mitarai M, Iohara K, Hayama K, Abe S, Tanaka Y. Antifungal activity *in vitro* and *in vivo* of a salmon protamine peptide and its derived cyclic peptide against *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 17: pii:fow099, 2017(査読あり). doi: 10.1093/femsyr/fow099.
3. Hashimoto M, Nagao J, Ikezaki S, Tasaki S, Arita-Morioka K, Narita Y, Cho T, Yuasa K, Altman A, Tanaka Y. Identification of a novel alternatively spliced form of inflammatory regulator SWAP-70-like adapter of T cells. *Int. J. Inflamm.* Article ID 1324735, 10 pages, 2017(査読あり). doi: 10.1155/2017/1324735.

[学会発表](計 15件)

1. 長環, 永尾潤一, 田中芳彦. Alternative antifungal candidates against *Candida albicans* infection. 第91回日本細菌学会総会(招待講演), 2018年
2. 田崎園子, 長環, 永尾潤一, 成田由香, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 安松香奈江, 有田(森岡)健一, 小島寛, 田中芳彦. *Candida albicans* に対する T細胞免疫機構の解明. 第61回日本医真菌学会総会, 2017年.
3. 池崎晶二郎, 長環, 田崎園子, 安松香奈江, 成田由香, 永尾潤一, 有田(森岡)

- 健一, 田中芳彦. Mild heat stress 条件下における *Candida albicans* の遺伝子発現と細胞応答. 第 61 回日本医真菌学会総会, 2017 年.
4. Tasaki S, Cho T, **Nagao J**, Narita Y, Hashimoto M, Ikezaki S, Yasumatsu K, Toyoda K, Arita-Morioka K, Kojima H, Tanaka Y. Investigation of mechanisms underlying the T cell response in oral candidiasis. 第 46 回日本免疫学会学術集会, 2017 年.
  5. 長環, 池崎晶二郎, 田崎園子, 安松香奈江, 成田由香, 有田 (森岡) 健一, **永尾潤一**, 田中芳彦. Mild heat stress 下の *Candida albicans* バイオフィルムと宿主免疫応答の解析. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 2017 年.
  6. 田崎園子, 長環, **永尾潤一**, 成田由香, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田 (森岡) 健一, 安松香奈江, 小島寛, 田中芳彦. 口腔カンジダ症に対して T 細胞応答を誘導する抗原探索. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 2017 年.
  7. 田崎園子, 長環, **永尾潤一**, 成田由香, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田 (森岡) 健一, 小島寛, 田中芳彦. 口腔カンジダ症を制御する免疫制御機構の解明. 第 23 回日本歯科医学会総会, 2016 年.
  8. Tasaki S, Cho T, **Nagao J**, Narita Y, Hashimoto M, Ikezaki S, Yasumatsu K, Toyoda K, Arita-Morioka K, Kojima H, Tanaka Y. Investigation of mechanisms of T cell response in oral candidiasis. 第 45 回日本免疫学会学術集会, 2016 年.
  9. 田崎園子, 長環, **永尾潤一**, 成田由香, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田 (森岡) 健一, 小島寛, 田中芳彦. *Candida albicans* に対する T 細胞免疫を誘導する表面抗原の探索. 第 60 回日本医真菌学会総会, 2016 年.
  10. 池崎晶二郎, 長環, 田崎園子, 成田由香, **永尾潤一**, 有田 (森岡) 健一, 田中芳彦. Mild heat stress 条件下における *Candida albicans* の遺伝子発現と細胞応答. 第 60 回日本医真菌学会総会, 2016 年.
  11. 田崎園子, 長環, **永尾潤一**, 成田由香, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田 (森岡) 健一, 小島寛, 田中芳彦. 口腔カンジダ症を制御する T 細胞応答の誘導. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016 年.
  12. 池崎晶二郎, 長環, 田崎園子, 橋本麻利江, 成田由香, **永尾潤一**, 有田 (森岡) 健一, 池邊哲朗, 田中芳彦. *Candida albicans* バイオフィルム形成における mild heat stress の影響. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016 年.
  13. 長環, 田崎園子, **永尾潤一**, 成田由香, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田 (森岡) 健一, 田中芳彦. *Candida albicans* 由来 CD4+T 細胞分化誘導画分の解析. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016 年.
  14. 田崎園子, 長環, **永尾潤一**, 成田由香, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田 (森岡) 健一, 小島寛, 田中芳彦. 口腔カンジダ症を選択的に標的とする免疫制御機構の解明. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会, 2015 年.
  15. 長環, 田崎園子, **永尾潤一**, 成田由香, 橋本麻利江, 池崎晶二郎, 有田 (森岡) 健一, 田中芳彦. *Candida albicans* の新規 T 細胞分化誘導抗原の探索. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会, 2015 年.
- 〔その他〕
- ホームページ等  
<http://www.fdcnet.ac.jp/col/info/teacher/kouza/kinou.html#kansen>
- 6 . 研究組織  
 (1)研究代表者

永尾 潤一 (NAGAO Jun-ichi)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：30509047