

令和元年6月23日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08790

研究課題名(和文) 常在性Candida albicansが腸管上皮から侵入・播種する微細機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the micro-mechanism that resident Candida albicans invades and disseminates from intestinal epithelium.

研究代表者

石島 早苗 (ISHIJIMA, SANAE)

帝京大学・医真菌研究センター・講師

研究者番号：80147214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：カンジダ感染初期の菌糸形発育を誘導するGlcNAcに着目し、重合体のキチン(Ishijima S;2017)、キチンオリゴ糖(Ishijima S;2018)とカンジダ菌との関係を解明した。また、形態変化に伴う高発現遺伝子を検出し(Ishijima S;2018)、消化管カンジダ症マウスモデルで網羅的に発現遺伝子解析を試みている(未発表)。解析の過程で使用した臨床分離株TIMM1768株の全ゲノム解析を行った(Panthee S;2019)。標準株SC5314株との比較から新たな悪化因子検出の可能性が示唆されている。さらに、消化管カンジダ症にデトックス効果のある薬品を見出し論文化している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスモデルを用いて、カンジダ菌が消化管粘膜から全身播種する経過を解析し、各臓器に感染拡大して発現する遺伝子を網羅的に解析(現在継続中)したことにより、新たな抗真菌薬開発の標的分子が選択され、真菌症の予防・治療効果に重要な役割を果たす可能性が得られた。また、高い抗真菌効果を持つ乳酸菌を添加することで、腸内細菌叢を正常化し、真菌感染症を制御することを検証し、有望な結果が得られたことから、真菌症の新たな予防・治療法開発の方向性が示唆された。真菌症は、今後さらに増加する傾向にあるので、本研究の成果は感染予防・治療法の開発の基礎として役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)： Focusing on GlcNAc which induces mycelial growth at the early stage of Candida infection, the relationship between Candida cells and chitin polymer (Ishijima SA; 2017) or chitin oligosaccharide (Ishijima SA; 2018) were elucidated. In addition, we detected high expression genes associated with morphological changes (Ishijima SA; 2018), and comprehensive analysis of infectious aggravating factors of Candida albicans in a murine gastrointestinal candidiasis model were performed (unpublished). Whole genome analysis of the clinical isolate TIMM 1768 strain used in the process of analysis was performed (Panthee S; 2019). Comparison with the standard strain SC5314 suggests the possibility of detecting a new deterioration factor. In addition, we have identified and developed a drug with a detoxifying effect on gastrointestinal candidiasis.

研究分野：微生物学、真菌学、生物学、細胞学

キーワード：Candida albicans 消化管カンジダ症マウスモデル 悪化因子 Leaky Gut アドヘシン N-アセチルグルコサミン キチンオリゴ糖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

医療技術の進歩に伴う抗生物質・抗癌剤治療の増加、また、高齢者の増加により、免疫力が低下した患者の真菌感染症が増加傾向にある。特に、カンジダ血症などの重篤な深在性真菌症が増加しており、常在真菌の *Candida albicans* が、消化管やカテーテルから血流を介して全身性(深在性)へ移行することに起因する。消化管からの移行機構は解明されていないが、腸の炎症・障害などにより消化管の透過性の増大した症状のリーキーガット(Leaky Gut)の関与が示唆されている。*C. albicans* 感染が Leaky Gut を誘導するのか、抗癌剤などの治療による腸管の障害が原因なのかは解明されていない。

*C. albicans* は抗真菌薬耐性菌が増加しており、新たな治療法開発は常に必要である。

*C. albicans* 感染の初期は、菌体の粘膜上皮への付着から始まる。細胞壁の最外側にあるアドヘシン(ALS, HWP1, IFF/HYR1 ファミリーなど)や、宿主の組織を溶解する酵素群(SAP など)で膜結合性のものが関与することが報告されている(Sundstrom P, 1999 年)。これらのアドヘシンは、定着環境で発現が変化する。培養系や一部の組織で遺伝子発現が研究されているが、消化管からの感染に関与する因子の研究はなされていない。小腸での炎症の関与が疑われるが、ヒトでは内視鏡で検査しにくく、マウスでは適切なモデルがなかったことによる(Koh AY, 2013 年)。

我々は、消化管に *C. albicans* が酷く感染し、炎症所見も観察されるマウスモデルを作製した(Ishijima SA; 2015)。このマウスモデルは、二形性酵母 *C. albicans* が N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) へのシグナル応答で酵母形から菌糸形へ形態変化する性質を *in vivo* で応用して感染悪化させたマウスモデルである。具体的には、抗生物質で細菌叢を破壊し、免疫抑制剤で宿主本来の免疫力を低下させて、栄養物でもある単糖の GlcNAc を飲料とともに自由摂取させた。その結果、胃・小腸に菌糸形発育した *C. albicans* が観察され、特に胃では、AIDS 患者の内視鏡検査で上部消化管に多い *Candida* による白い塊様の構造と類似の白塊が夥しい数観察された。また、炎症症状である組織の肥厚と血管透過性の亢進が観察された。このマウスモデルを用いて、消化管感染による全身播種がどのように起こるかを継続的に観察すること、抗癌剤を投与した場合との全身播種の経過の差を検討することで Leaky Gut の機構を解析することが可能となる。

抗生物質投与による腸内細菌叢の乱れが宿主の健康状態に多面的に影響することが報告されている(Blaser MJ, 2014 年)。宿主の健康に、マイコバイオーム (Mycobiome) と呼ばれる真菌叢も少なからず影響している。アトピーや喘息のみならず、自己免疫疾患のリウマチの悪化にも腸内での *C. albicans* の感染が影響する (Sonoyama K, 2011 年)。

腸内細菌叢と Mycobiome との関係は密接で、*C. albicans* の病原性の制御に重要である。*C. albicans* の産生する quorum sensing 物質 farnesol は酵母形を誘導するが、緑膿菌産生の homoserine lactone も類似の効果を持つ事、*C. albicans* の生育を増加または抑制する細菌の報告がある事などである (Peleg AY, 2010 年)。アドヘシンを介して細菌と直接付着する事、バイオフィーム形成して抗生物質・抗真菌薬抵抗性を示す一方、*C. albicans* に殺菌効果を持つ菌も報告されている。消化管組織や細菌への付着に関与するアドヘシンを理解し、制御する事で、予防・治療に役立てることができると考えられる。我々は3種類の乳酸菌 *S. salivarius*, *E. faecalis*, *L. pentosus* を検討し、*C. albicans* に直接付着して静菌的な効果を持つことを報告した(Ishijima SA; 2012, 2014)。以上を総合的に考えると、一度破綻した腸内細菌叢に、有効性の検証されている細菌群を投与して真菌症による脅威を軽減できる可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

抗生剤や抗癌剤治療が増加して、治療による免疫力の低下が内因性の真菌症の増加を誘発している。常在真菌 *Candida albicans* の感染は多く、治療法開発のためには感染増悪の機構を解明することが必要である。研究目的の第一は、感染初期の菌の消化管上皮組織への付着に着目し、解明することである。付着因子の報告は多数あるが、腸管での使用因子は未解明なので、*C. albicans* が酷く感染した独自開発マウスモデルを用いて解析する。目的の第二は、真菌が上記因子を使って腸管組織に侵入する機構の解明である。侵入経路を形態学的にまた分子レベルで解析し、炎症との関連も解明する。第三は、一・二の結果を踏まえて、「腸内細菌叢の乱れ」を、外部から新たな細菌を付加することによって真菌感染増悪の阻止効果を得られないか検討することである。

## 3. 研究の方法

独自開発の消化管カンジダ症マウスモデルを用いた実験をおこなった。実験を行うにあたり、研究計画書を本学動物実験倫理委員会に提出し、適切な審査と指導後の許可を受けて行った。

1) 全身播種の条件解析(時間経過と播種した臓器の解析)とその際の2) *C. albicans* 侵入箇所(形態学的解析と炎症; 宿主免疫系の解析(MPO 活性の検出、サイトカインの ELISA 法での検出))、3) 感染したマウス臓器から *C. albicans* を単離し、発現しているアドヘシン、タンパク分解酵素などの遺伝子発現を RT-PCR 法で検出した(さらに、継続研究として各臓器での発現遺伝子を次世代シーケンサーで網羅的な解析を行っている) 4) *C. albicans* 付着細菌の抗真菌効果の検討; 有効性の期待される乳酸菌投与後の感染状態の変化を解析した、また、5) *C. albicans* 感染に抗真菌効果、デトックス効果の期待される薬剤についてマウスモデルでの症状

の変化を指標に解析検討を行った。

これらの研究の部分を構成する研究として、培養系でのカンジダ菌の形態変化に伴う遺伝子発現を次世代シーケンサーで解析した。それに伴い、全ての実験に使用している、当研究センターで単離した臨床分離株 TIMM1768 株の全ゲノム解析を行った。具体的には、ショートリードシーケンス (Ion PGM sequencing) とロングリードシーケンス (MinION sequencing) 結果を組み合わせることで、より精度の高いゲノム解析を行った。

#### 4. 研究成果

消化管カンジダ症マウスモデルを用いて、カンジダ菌が感染初期から全身播種する際の各臓器での炎症症状、生菌数の変化の時間的変化を解析した (未発表)。その際に臓器を凍結し、各臓器に播種したカンジダ菌を回収して、カンジダ菌で発現している遺伝子を解析している。解析の過程で、使用した臨床分離株 TIMM1768 株の全ゲノム解析を行った (Panthee S; 2019)。標準株 SC5314 株との比較から新たな悪化因子検出の可能性が示唆されている (Panthee S; 2019)。また、培養系で形態変化に伴う遺伝子発現を TIMM1768 株で検出し (Ishijima SA; 2018)。その後、網羅的発現遺伝子解析を行い、菌糸形発育で発現が高くなっている遺伝子を得た (未発表データ)。

また、菌糸形発育については、カンジダ感染初期の菌糸形発育を誘導する GlcNAc に着目し、重合体のキチン (Ishijima SA; 2017) とキチンオリゴ糖とカンジダ菌との関係を解明し (Ishijima SA; 2018)、消化管カンジダ症にデトックス効果のある薬品を見出し現在論文化している。

#### 5. 主な発表論文等

- (1) 浜本洋、Suresh Panthee、Atmika Paudel、石島早苗、関水久  
*Candida albicans* TIMM1768 株の全ゲノム配列の解析。  
Medical Mycology Research 査読有 9(1):37-40 (2018)
- (2) Suresh Panthee, Hiroshi Hamamoto, Sanae A. Ishijima, Atmika Paudel, Kazuhisa Sekimizu. Utilization of hybrid assembly approach to determine the genome of an opportunistic fungus, *Candida albicans* TIMM1768.  
Genome Biology and Evolution 査読有 10(8); 2017-2022 (2018)
- (3) 石島早苗、浜本洋、山田剛、安部茂、関水久。  
*Candida albicans* TIMM1768 株の酵母形、菌糸形での発現遺伝子解析。  
第 61 回日本医真菌学会総会 (2018 年 9 月 8~9 日)
- (4) Sanae A. Ishijima, Tamo Fukamizo, Kimihiko Satoh, Takako Noguchi, Yu Guo, Tsuyoshi Yamada, Shigeru Abe. Chitin oligosaccharides (oligomer of GlcNAc) protect mycelial growth of *Candida albicans* *in vitro* and *in vivo*.  
ISHAM 2018 アムステルダム (オランダ) 2018 年 6 月 30 日~7 月 4 日。
- (5) Sanae A. Ishijima, Tsuyoshi Yamada, Naho Maruyama, Shigeru Abe.  
*Candida albicans* adheres to chitin by recognizing N-acetylglucosamine (GlcNAc).  
Medical Mycology Journal 査読有 58E; E15-E21 (2017)
- (6) Toshihiro Maekawa, Sanae A. Ishijima, Masayuki Ida, Takayuki Izumo, Yoshiko Ono, Hiroshi Shibata, Shigeru Abe.  
Prophylactic effect of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 on *Candida* infection and gastric inflammation in a murine gastrointestinal candidiasis model.  
Medical Mycology Journal 査読有 57E; E81-E92 (2016)

[雑誌論文](計 4 件)

- (1) 浜本洋、Suresh Panthee、Atmika Paudel、石島早苗、関水久  
*Candida albicans* TIMM1768 株の全ゲノム配列の解析。  
Medical Mycology Research 査読有 9(1):37-40 (2018)
- (2) Suresh Panthee, Hiroshi Hamamoto, Sanae A. Ishijima, Atmika Paudel, Kazuhisa Sekimizu. Utilization of hybrid assembly approach to determine the genome of an opportunistic fungus, *Candida albicans* TIMM1768.  
Genome Biology and Evolution 査読有 10(8); 2017-2022 (2018)
- (3) Sanae A. Ishijima, Tsuyoshi Yamada, Naho Maruyama, Shigeru Abe.  
*Candida albicans* adheres to chitin by recognizing N-acetylglucosamine (GlcNAc).  
Medical Mycology Journal 査読有 58E; E15-E21 (2017)
- (4) Toshihiro Maekawa, Sanae A. Ishijima, Masayuki Ida, Takayuki Izumo, Yoshiko Ono, Hiroshi Shibata, Shigeru Abe  
Prophylactic effect of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 on *Candida* infection and gastric inflammation in a murine gastrointestinal candidiasis model.  
Medical Mycology Journal 査読有 57E; E81-E92 (2016)

〔学会発表〕(計 8 件)

- (1) 浜本洋、Suresh Panthee, 石島早苗、Atmika Paudel, 関水久.  
「ナノポアシークエンサーを用いた *Candida albicans* TIMM1768 株の全ゲノム解析  
第 40 回関東医真菌懇話会 (2019 年 6 月 1 日)
- (2) 石島早苗、浜本洋、山田剛、安部茂、関水久. *Candida albicans* TIMM1768 株の酵母形、  
菌糸形での発現遺伝子解析. 第 61 回日本医真菌学会総会 (2018 年 9 月 8~9 日)
- (3) 浜本洋、スレス パンシー、石島早苗、関水久.  
ナノポアシークエンサーを用いた *Candida albicans* TIMM1768 株の全ゲノム解析  
第 61 回日本医真菌学会総会 (2018 年 9 月 8~9 日)
- (4) Sanae A. Ishijima, Tamo Fukamizo, Kimihiko Satoh, Takako Noguchi, Yu Guo, Tsuyoshi  
Yamada, Shigeru Abe. Chitin oligosaccharides (oligomer of GlcNAc) protect mycelial growth  
of *Candida albicans* *in vitro* and *in vivo*.  
ISHAM 2018、アムステルダム (オランダ) (2018 年 6 月 30 日~7 月 4 日)
- (5) 岩佐広行、只野武、石島早苗、羽山和美、山崎正利、安部茂. 乳酸菌 *Enterococcus faecalis*  
EF2001 加熱死菌体によるマウス口腔カンジダ感染の防御とその機序について.  
第 21 回日本補完代替医療学会学術集会. (2018 年 11 月 10 日~11 日)
- (6) 石島早苗、深溝慶、佐藤公彦、野口貴子、郭宇、山田剛、安部茂.  
N Acetylglucosamine (GlcNAc) は *Candida albicans* の菌糸形発育を促進するが、オリゴマー  
であるキチンオリゴ糖は抑制する  
第 38 回関東医真菌懇話会 (2017 年 6 月 10 日)
- (7) Ishijima SA, Fukamizo T, Satoh K, Noguchi T, Guo Y, Yamada T and Abe S.  
Protective activities of oligomer of GlcNAc against mycelial growth of *Candida albicans*  
*in vitro* and *in vivo*.  
第 90 回日本細菌学会総会 (2017 年 3 月 19 日~21 日)
- (8) Ishijima SA, Fukamizo T, Satoh K, Noguchi T, Guo Y, Yamada T and Abe S.  
キチンオリゴ糖(GlcNAc)2-6 はモノマーと異なり *Candida albicans* 感染を増悪しない.  
第 13 回ファンクショナルフード学会学術集会 (2017 年 2 月 11 日)

〔図書〕(計 1 件)

出雲貴幸、前川敏宏、石島早苗、安部茂.

技術情報協会、「腸内細菌叢を標的にした医薬品と保健機能食品の開発- 糖尿病、腎臓病、大腸  
炎、がん、肥満、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎 -」(第 11 章 生体機能を高める乳酸菌・  
ビフィズス菌の研究開発と応用展開) P.377-387, 2018 年 9 月 28 日発刊  
( I S B N : 978-4-86104-724-4 )

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：安部 茂  
ローマ字氏名：ABE SHIGERU  
所属研究機関名：帝京大学  
部局名：医真菌研究センター  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：10125974

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。