

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11702

研究課題名(和文) 新たな病原因子に着目した口腔カンジダ症発症・進行メカニズムの解明と治療法への展開

研究課題名(英文) Investigation of development and progression mechanism of oral candidiasis

研究代表者

柴山 和子 (Shibayama, Kazuko)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60408317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：病原性真菌カンジダ・アルビカンスの病原性発揮には菌糸型増殖がキーとなる。本菌に新規に見出した細胞表層タンパク(Csa2)は菌糸形増殖における栄養素獲得ネットワークに働く一連のタンパク群のファミリーメンバーであり、固有のモチーフ配列を共通して有する。細胞表層タンパクをコードする遺伝子を欠失した株と野生株および補完株を用いた研究により、本タンパクが血清誘導下で *C. albicans* の酵母形から菌糸形へのスイッチングに寄与する段階とバイオフィーム形成への関与を明らかにし、病原性を担うことが強く裏付けられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カンジダ・アルビカンスは多くの健康者より検出される常在性真菌であるが、防御機構に異常をもつ宿主に対しては真菌症を引き起こし、口腔咽頭カンジダ症を含む重篤な症状を呈する。本菌は、環境に適応して菌糸形になり菌糸を伸ばすことによって強い病原性を発揮し、粘膜下組織まで達し重篤化する。研究で明らかにした本菌の生体内増殖機構は、真菌の病原性の包括的理解と予防法および新規治療法確立への新たな基盤となるものである。

研究成果の概要(英文)：Surface antigen protein 2 (Csa2) is a member of the Candida albicans Common in Fungal Extracellular Membranes protein superfamily and we established its role in iron acquisition in this organism. To clarify further roles of Csa2, we compared growth, morphological transition, and biofilm formation among wild-type, Csa2-mutant, and complemented strains of *C. albicans*. Deletion of the Csa2 gene resulted in smaller and reduced colony growth, significant attenuation of the dimorphic transition under serum-inducing conditions, and reduced biofilm formation; complementation restored these levels to those of the wild-type. Our findings demonstrated that Csa2 participated in yeast-to-hyphae morphological switching under serum-inducing conditions and contributed to the biofilm formation of *C. albicans*. This work provided novel insights into the potential roles of Csa2 in virulence of *C. albicans*.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：Candida albicans 口腔カンジダ症 病原性 バイオフィーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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、防御機構に異常をもつ宿主に対しては真菌症を引き起こし、口腔咽頭カンジダ症を含む重篤な症状を呈する。*C. albicans* の病原因子については単独で病原性を説明することは困難で、未同定因子を含め複数の因子が複合的に作用し病原性を発揮すると推察されている。

C. albicans は通常酵母形で存在しているが、環境に適応して菌糸形になり菌糸を伸ばすことにより強い病原性を発揮し、粘膜下組織まで達し重篤化する。本菌が菌糸形で病原性を示すことから、酵母形から菌糸形への形態変換(二形性変換)に関する因子が検索されているが詳細解明の途上にある。また、細胞増殖に必須である鉄の獲得機構を含め本菌の生体内増殖機構も未だその全貌を明らかにするには至っていない。

我々は、*C. albicans* の病原性減弱が細胞表面タンパクをコードする遺伝子 CSA2 (cell surface antigen 2) のダウンレギュレーションに関連することを見出し、新規な病原因子であると考え本タンパクに着目した。Csa2 は、CFEM (Common in Several Fungal Extracellular Membranes) ドメインを有し鉄レセプターとしての機能を担うとされる Rbt5 タンパク質ファミリーメンバーであるが、その機能解析は数少ない。本タンパクは、*C. albicans* の菌糸形増殖における栄養素獲得ネットワークに働く一連のタンパク群のファミリーメンバーであり、固有のモチーフ配列を共通して有するが、モチーフ自体の役割はいずれのタンパクにおいても解明されていない。

2. 研究の目的

研究代表者の見出した病原真菌 *C. albicans* の細胞表面タンパクは病原性の強い菌糸形へのスイッチングと口腔粘膜侵入後の増殖機構に寄与しており、本タンパクが重要な病原因子であることを示唆する結果を得てきた。カンジダの複雑な病原性発揮メカニズムを探る新たな糸口となり得る可能性を秘めており、この細胞表面タンパクの役割をさらに詳細に明らかにすることは、口腔カンジダ症の進行・重篤化の初期段階での阻止につながり、病原性の抑制および口腔カンジダ症の治療法確立の新たなアプローチになると考えられる。

病原性真菌 *C. albicans* の病原性発揮には菌糸型増殖がキーとなる。本菌に新規に見出した細胞表面タンパク(Csa2)とその固有のモチーフ配列の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

C. albicans の細胞表面タンパク質コード遺伝子を欠失させた変異株(csa2)、親株(wild-type)、補完株(csa2 / ::CSA2)を供試し、以下の研究を遂行した。

(1) 二形成変換能

37 °C における血清存在下での酵母形から菌糸形への形態スイッチングを経時的に評価した。血清添加培地を用い、酵母形から菌糸形への形態変換の割合を経時的な変化として算出した。

(2) 菌糸形態の観察

血清添加培地を用い、コロニーの形態的特徴を観察した。

(3) バイオフィーム形成能の評価

ポリスチレン製細胞培養プレート上に形成されたバイオフィームを XTT アッセイにより定量した。

(4) CFEM 固有モチーフの欠失

モチーフ部分のみの欠損株構築のため、選択マーカーカセットを用いた fusion PCR 技術の利用を試みた。ゲノム中の特定の遺伝子を切断できるゲノム編集ツールを取り入れた対処を検討した。

4. 研究成果

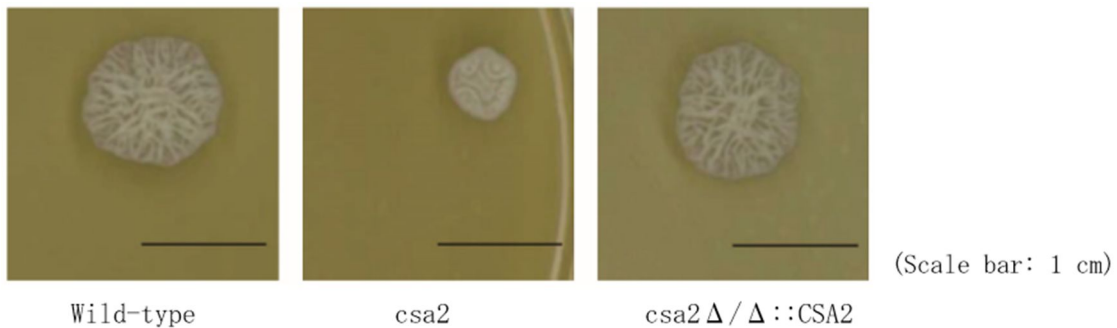
(1) 二形成変換能

菌糸形成誘導開始 1、3、5 時間において、野生株と比較し欠損株ではスイッチングが各々約 50、70、85%に留まっていたが、補完株では野生株と同様のスイッチング率に回復することが明らかになった。

Strain	Incubation time (h)	Hyphae ratio (%)
wild-type	1	77.6 ± 1.40
	3	93.91 ± 0.15
	5	96.76 ± 2.11
<i>csa2</i> Δ / Δ	1	47.31 ± 1.55*
	3	65.81 ± 0.45*
	5	83.19 ± 0.34*
<i>csa2</i> Δ / Δ::CSA2	1	80.97 ± 1.02
	3	95.72 ± 1.70
	5	97.60 ± 0.65

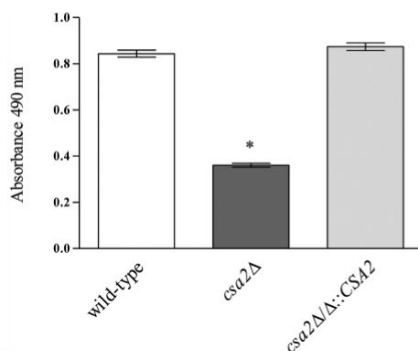
(2) 菌糸形態の観察

欠損株は血清を含む寒天培地上での増殖観察においても野生株および補完株と比較してコロニー径が小さく、襲が疎な形状を呈した。



(3) バイオフィーム形成能の評価

24 時間培養時のバイオフィーム形成は、野生株と比較し欠損株では形成量が約 50%であったが、補完株では野生株と同程度に回復した。



(4) CFEM 固有モチーフの欠失

モチーフ部分のみの欠損株構築にあたり、二倍体であるカンジダはゲノムの複雑さと染色体分離の不安定性のため組換え体構築に困難が生じた。克服手段として異なる選択マーカーセットを用いた fusion PCR を試みたが構築には至らなかった。

ゲノム中の特定の遺伝子を切断できるゲノム編集ツールを取り入れた対処を試み、モチ

ーフ部分のみの欠損株の構築および切断箇所への新たな配列による挿入による補完株の構築に注力したが、ノックアウトプラスミドの作成に至らなかった。また、ゲノム編集ツールの使用を検討し、ノックアウトプラスミドの作成等に注力したが、構築に至らなかった。

生体環境に類似した血清誘導条件における上記の実験から、細胞表層タンパクが *C. albicans* の菌糸形増殖へのスイッチングに重要な役割を担い、病原性発揮に関与することが裏付けられた。血清誘導下で *C. albicans* が酵母形から菌糸形へのスイッチングを経時的に評価したことにより、細胞表層タンパクが寄与する段階が明らかになった。モチーフ部分欠失の過程は、は欠損株の構築が困難な真菌において、新たな方法模索の一資料となると考えられる。また、固有モチーフが本菌の増殖維持に必須である可能性が高いことが示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okamoto-Shibayama Kazuko, Kikuchi Yuichiro, Kokubu Eitoyo, Ishihara Kazuyuki	4. 巻 58
2. 論文標題 Possible Involvement of Surface Antigen Protein 2 in the Morphological Transition and Biofilm Formation of <I>Candida albicans</I>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Med Mycol J.	6. 最初と最後の頁 E139 ~ E143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3314/mmj.17-00008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	石原 和幸 (Ishihara Kazuyuki) (00212910)	東京歯科大学・歯学部・教授 (32650)	
研究分担者	柴原 孝彦 (Shibahara Takahiko) (50178919)	東京歯科大学・歯学部・教授 (32650)	