

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12053

研究課題名(和文) 高齢癌患者の免疫チェックポイント阻害剤使用時のカンジダ症発現機序と予防法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the mechanism and the prevention method of candidiasis when using immune checkpoint inhibitors in elderly cancer patients.

研究代表者

清浦 有祐 (Kiyoura, Yusuke)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：90194951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：口腔カンジダ症マウスモデルに抗IL-1抗体を投与した場合、抗体不投与群または抗IL-6抗体を投与した群と比較して糞中のCandida albicans菌数は有意に増加した。抗PD-1抗体の投与は腸管内へのC. albicansの定着菌数を他の実験群よりも有意に増加させた。コントロール群と比較したところ、プレドニゾロンの投与とテトラサイクリン含有水道水の飲水の両方を行った群は、Firmicutes門が減少し、Bacteroidetes門が増加した。さらに、C. albicansの腸管内への定着の亢進には、腸内細菌叢中のLactobacillus属の減少が関与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「免疫チェックポイント阻害剤」の副作用である過剰な免疫応答を抑制するために免疫抑制剤のプレドニゾロンが併用される。本研究では、プレドニゾロンによる腸内細菌叢の大きな変化がみられた。この結果は、癌治療時の同剤投与によるカンジダ症発症の予防に、腸内細菌叢の調整が有効である可能性を示す。さらに「免疫チェックポイント阻害剤」である抗PD-1抗体を投与した場合に、腸管内のCandida albicans数が有意に増加した。この結果は、免疫機能の過度な増強に対するフィードバックが働いたためと考えられるので、抗PD-1抗体を使用する際には免疫システムが体内で常に再構築を起こす可能性を考える必要がある。

研究成果の概要(英文)：(1) When anti-IL-1 antibody was administered to a mouse model of oral candidiasis, the number of Candida albicans in feces was significantly increased as compared with the group not administered with antibody or the group administered with anti-IL-6 antibody. (2) Administration of anti-PD-1 antibody significantly increased the colonization number of C. albicans in the intestinal tract compared with other experimental groups. (3) Compared to the control group, the group that received both prednisolone administration and drinking of water containing tetracycline had decreased Firmicutes and increased Bacteroidetes. Furthermore, the increase of colonization of C. albicans in the intestinal tract might be related to the decrease of Lactobacillus in the intestinal flora.

研究分野：口腔微生物学・免疫学

キーワード：口腔カンジダ症 免疫チェックポイント阻害薬 Candida albicans PD-1 IL-1 免疫抑制剤 腸内細菌 Lactobacillus

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

「免疫チェックポイント阻害剤」は、高齢者の癌治療において広く用いられ、適用範囲も急速に拡大している。免疫チェックポイントとは、T細胞を過剰に活性化させないための抑制性シグナルだが、癌細胞に対する攻撃まで抑制する。そこで、免疫チェックポイントを担う分子の PD-1 を抗体で阻害し、活性化した細胞傷害性 T 細胞に癌細胞を攻撃させて、癌の縮小が得られる。ところが、他の T 細胞まで活性化させ過剰な炎症を惹起する副作用がある。この副作用を抑えるために、免疫抑制剤のプレドニゾロンが用いられる。しかしながら、プレドニゾロンはサイトカイン産生を抑えて感染防御機能を低下させるので、口腔常在微生物の *Candida albicans* (*C. albicans*) が日和見感染を起こしてカンジダ症を誘発するリスクが高い。プレドニゾロンが、免疫抑制に働くメカニズムの一つとして、免疫担当細胞膜にある *C. albicans* の菌体成分を認識するレセプター発現に影響を与えることが考えられる。*C. albicans* の菌体成分を認識するレセプターとして Toll-like receptor (TLR) や C 型レクチン受容体が挙げられるが、プレドニゾロンがこれらレセプターの発現に与える影響は検討されていなかった。

(2) これまでの研究成果と着想に至った経緯

申請者は、プレドニゾロン投与による再現性の高い口腔カンジダ症マウスモデルの開発に成功した。すなわち、*C. albicans* が、宿主の感染防御機構破綻時に重篤な口腔カンジダ症を起こす可能性をマウスで示した。さらに、同マウスの鼻孔から *C. albicans* を感染させ、肺臓内に好中球の強い浸潤を特徴とした炎症像を得た。一方、同じく免疫抑制作用を示すメトトレキサートやシクロスポリンでは口腔内の炎症症状は低かった (日本老年歯科学会第 24 回学術大会発表(2013 年 6 月 6 日))。また、プレドニゾロン投与マウスの舌組織では、*C. albicans* 感染防御で重要な IL-17 の産生は増加せず、微生物感染の際に最も早期に産生される TNF- α は検出されなかった。*C. albicans* が誘導する各種サイトカインの産生に差があったので、プレドニゾロンによる菌体認識レセプター発現の増減を検討することを考えた。そして、「免疫チェックポイント阻害剤」を用いた癌治療におけるプレドニゾロンの投与がカンジダ症を起こすメカニズムを口腔カンジダ症マウスモデルによる *in vivo* 実験で解明し、プレドニゾロン以外の免疫抑制剤を用いてカンジダ症の発現を予防する方法を確立することを着想した。

2. 研究の目的

本研究は、「免疫チェックポイント阻害剤」を用いた高齢者の癌治療時のプレドニゾロン投与が誘因となるカンジダ症の発症メカニズムを、口腔カンジダ症マウスモデルによる *in vivo* 実験で解明する。具体的には、口腔カンジダ症のマウスモデルを用いて、「免疫チェックポイント阻害剤」と免疫抑制剤のプレドニゾロンを併用した癌治療が宿主の感染防御システムに与える変化を捉え、その変化が *C. albicans* の感染をどのように増悪していくかを明らかにする。

3. 研究の方法

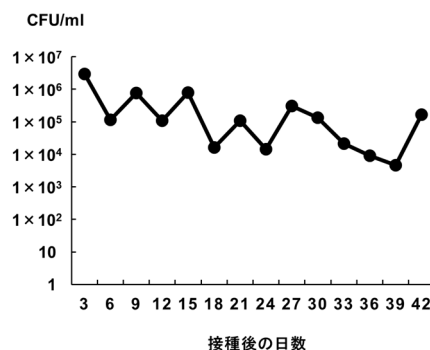
「免疫チェックポイント阻害剤」である抗 PD-1 抗体と免疫抑制剤プレドニゾロンをマウスに投与後、口腔内に *C. albicans* を感染させる。そして、口腔の炎症状態、*C. albicans* の口腔粘膜への定着率および口腔細菌と腸内細菌の数と種類を抗 PD-1 抗体不投与群と比較した。具体的には、雌 4 週令の ICR マウスに抗 PD-1 抗体を腹腔注射した。抗体の投与はプレドニゾロンを投与する前日に行った。プレドニゾロン投与 24 時間後に、*C. albicans* 菌液 (1×10^9 /ml) に浸した綿棒でマウスの口腔内を拭って口腔内に菌を定着させる。感染 9 日後まで経的にマウスの頸椎を脱臼させてから、舌を摘出する。マウスは 1 実験群につき 5 匹使用した。供試した *C. albicans* は申請者が高齢者の口腔内から分離・保存したもので、マウスの実験的口腔カンジダ症を起こすことができる。

口腔内の *C. albicans* および口腔細菌の菌数測定：摘出した舌をホモジネートし、その希釈液を、(i) カンジダ GS 培地に塗布し、*C. albicans* の菌数を測定した。(ii) GAM 培地に塗布し、好気または嫌気培養して口腔細菌の菌数を検討した。

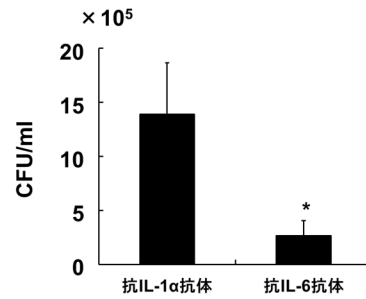
糞便の採取と腸内細菌の同定：「免疫チェックポイント阻害剤」は腸内細菌の修飾を受けて効果を発揮することから、受託サービスで腸内細菌叢を解析した。

4. 研究成果

- (1) 口腔から腸管内に移行した *C. albicans* を糞中から検出したところ、感染 42 日後でも多数が検出された。検出された *C. albicans* が、マウスの腸管内に元々常在していた可能性が考えられたが、プレドニゾロンを皮下注射し、テトラサイクリン含有水道水を飲水させただけでは、糞中から *C. albicans* は検出されなかった (右図)。



(2) 腸管内に定着する *C. albicans* の菌数をさらに増加させる手段として、炎症性サイトカインに対する抗体を *C. albicans* 感染マウスの腹腔に投与した。抗 IL-1 抗体を *C. albicans* 接種の翌日に投与した場合、対照群に比較して糞中の *C. albicans* の菌数は有意に増加した。IL-1 と同じく炎症性サイトカインである抗 IL-6 抗体を投与した場合には、抗 IL-1 抗体投与と比較して糞中の *C. albicans* の菌数は有意に低かった (右図)。



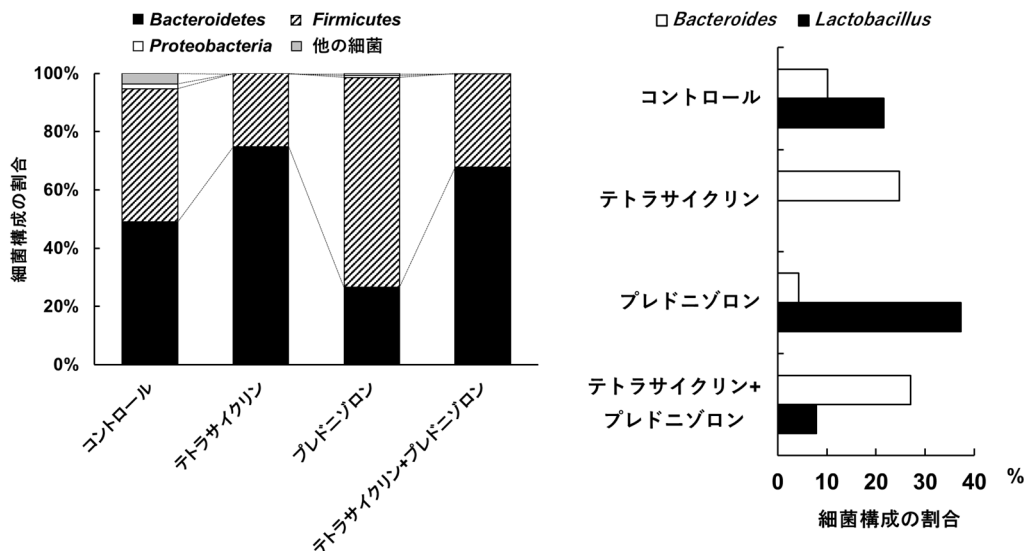
上記の結果から、抗 IL-1 抗体の投与は腸管内への *C. albicans* の定着を高めるが、抗 IL-6 抗体の投与では抗 IL-1 抗体のような定着促進効果は認められないことが示唆された。したがって、*C. albicans* の感染に際して産生される IL-1 は感染防御に極めて重要なサイトカインであり、*C. albicans* の定着を妨げるサイトカインであることと考えられる。

(3) マウスに対する免疫抑制剤及び広域抗菌スペクトルを有する抗菌薬の投与が、*C. albicans* の腸管内への定着に及ぼす影響：口腔内に *C. albicans* を感染させて5日後のマウス糞中の *C. albicans* 数はコントロール群に比較して、プレドニゾロン投与群、テトラサイクリン飲水群、プレドニゾロン投与+テトラサイクリン飲水群はいずれも腸管内に定着した *C. albicans* 数が有意に増加していた。最も定着菌数が多いのは、プレドニゾロン投与+テトラサイクリン飲水群であった。

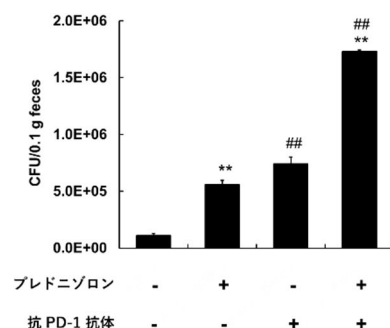
(4) *C. albicans* 以外の *Candida* spp. の腸管内への定着：前述と同様な方法で、*C. albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* を別々のマウスに感染させた場合、糞中から検出された菌数は3菌種ともほぼ同数であった。

(5) マウスに対する免疫抑制剤及び広域抗菌スペクトルを有する抗菌薬の投与が腸内細菌に及ぼす影響：マウスにプレドニゾロンを投与し、テトラサイクリン含有水道水を飲水させた場合、コントロール群に比較してプレドニゾロン投与群は好気性細菌数と嫌気性細菌数のどちらも有意に増加した。一方、テトラサイクリン含有水道水を飲水させた群では好気性細菌数は有意に減少したが、嫌気性細菌数の減少は認められなかった。

(6) マウスに対する免疫抑制剤及び広域抗菌スペクトルを有する抗菌薬の投与が腸内細菌叢構成細菌に及ぼす影響：コントロール群に比較してプレドニゾロンの投与とテトラサイクリン含有水道水の飲水の両方を行った群は、*Firmicutes* 門が減少し、*Bacteroidetes* 門が増加した。さらに、マウスにプレドニゾロンを投与すると共にテトラサイクリンの飲水も行った群では、*Lactobacillus* 属が低下していた (下図)。



(7) 免疫修飾が *C. albicans* の腸管内への定着に及ぼす影響：マウスにプレドニゾロンを投与すると共にテトラサイクリン含有水道水を飲水させ、さらに抗 PD-1 抗体を腹腔投与した。その結果、抗 PD-1 抗体の投与は腸管内への *C. albicans* の定着菌数を他の実験群よりも有意に増加させた (右図)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 服部宗太郎、玉井利代子、清浦有祐	4. 巻 45
2. 論文標題 Candida albicans の定着に及ぼすサイトカインの影響ーカンジダ血症のマウスモデル開発の試みー	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 奥羽大学歯学誌	6. 最初と最後の頁 13-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清浦有祐
2. 発表標題 革新的な抗癌剤治療に伴う高齢者の口腔カンジダ症及びカンジダ血症を予防するヒト唾液由来の新たな抗菌因子の開発
3. 学会等名 第33回「歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い（平成29年度）」
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 服部宗太郎
2. 発表標題 Candida albicans の定着に及ぼすサイトカインの影響
3. 学会等名 第64回奥羽大学歯学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森下貴祥
2. 発表標題 腸内細菌叢構成細菌及び免疫機能の変化と Candida albicans の腸管内への定着
3. 学会等名 第68回奥羽大学歯学会
4. 発表年 2019年

〔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
連携研究者	玉井 利代子 (Tamai Riyoko) (90367566)	奥羽大学・歯学部・准教授 (31602)	
連携研究者	小林 美智代 (Kobayashi-Sakamoto Michiyo) (80316265)	奥羽大学・歯学部・講師 (31602)	平成30年度まで