

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：37114

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06301・19K21389

研究課題名（和文）新しいワクチン開発を目指した口腔真菌感染症の免疫制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of immune regulation mechanism of oral fungal infection aiming at development of new vaccine

研究代表者

田崎 園子（Tasaki, Sonoko）

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：50824174

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト常在真菌であり、真菌感染症の代表的な原因菌であるCandida albicans はその免疫制御にTh17細胞が関与していることがよく知られています。今回の研究により申請者がマウスTh17細胞を強く分化誘導することを発見した野生株Candida albicans SC5314の菌糸形細胞膜画分タンパク質をHPLC、2次元ゲル電気泳動などを行いさらに分離し、一部はプロテオミクス解析、マウス免疫細胞との共培養を行いTh17細胞を強く誘導するいくつかの候補タンパク質の絞り込みを行うことが出来ました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Candida albicans (C. albicans) は健康なヒトの様々な部位に常在する主要な真菌であるが、高齢者や後天性免疫不全症候群（AIDS）などの易感染性宿主においては再発する難治性の真菌感染症を起こします。C. albicans はその病態の制御に獲得免疫系、なかでもインターロイキン17（IL-17）産生を特徴とするT細胞であるTh17細胞が深く関与していることがこれまでに知られており、今回行ったTh17細胞の分化誘導をもたらす抗原探索は未だ不明であったC. albicans の免疫制御機構の解明に寄与し、既存の治療法以外の治療法を模索するのに役立ちます。

研究成果の概要（英文）：It is well known that Th17 cells are involved in immune regulation of Candida albicans, a human resident fungus and a representative pathogen of fungal infections. In this study, we separated the proteins in the mycelial cell membrane fraction of the wild strain Candida albicans SC5314, which we found to strongly induce mouse Th17 cells to differentiate, by HPLC, two-dimensional gel electrophoresis, etc., and partially analyzed by proteomics. By co-culturing with mouse immune cells, we were able to narrow down some candidate proteins that strongly induce Th17 cells.

研究分野：医歯薬学/真菌感染症

キーワード：Candida albicans Th17 口腔カンジダ症 ワクチン CD4+T細胞 BM-DC

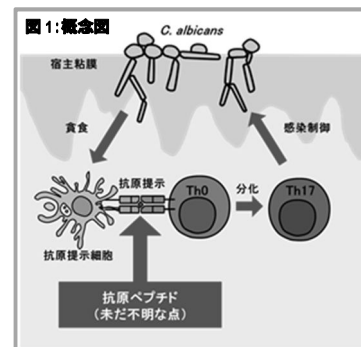
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Candida albicans (*C. albicans*) は、ヒトの様々な部位に常在する真菌ですが、高齢者や後天性免疫不全症候群 (AIDS) などの免疫機能が低下した者に対しては難治性の真菌感染症、口腔においては口腔カンジダ症を起こす原因菌としても有名な真菌です。また、申請者が所属する障害者歯科の臨床においては、諸々の遺伝性疾患による易感染性患者や、てんかんによる多剤服用患者、脳性麻痺といった含嗽・嚥下反射の困難な患者などにおいて、真菌感染症は確かな脅威となっています (障歯誌. 36:78-87, 2015)。現在、*C. albicans* による真菌感染症の治療は薬剤療法が主体ですが、一般的に真菌感染症は難治性であり、抗真菌薬の種類は抗菌薬と比較して非常に少なく、また開発には膨大な費用を伴うため、新薬の開発は望みにくい現状にあります。一方、口腔カンジダ症はその病態の制御に獲得免疫系、なかでもインターロイキン 17 (IL-17) 産生を特徴とする T 細胞である Th17 細胞が深く関与していることがこれまでに知られており、この Th17 細胞を欠損するマウスでは口腔カンジダ症が重篤化する (J. Exp. Med. 206:299-311, 2009) ことが既に知られています。しかしながら、*C. albicans* に対して Th17 細胞の分化誘導を行う責任抗原およびその免疫制御機構について詳しく解析した報告は認められていません。

2. 研究の目的

C. albicans は特性として環境に対応した増殖形態を示し、ヒトにおいて常在時は酵母形、病態時は菌糸形という 2 つの形態をとります。また、前述したように、*C. albicans* による真菌感染症の主な治療法は現在、抗真菌薬による薬物療法が主体となっていますが、*C. albicans* は常在真菌であり完治は難しく、薬剤耐性菌の問題もあり再発を繰り返すため既存の抗真菌薬療法には限界があります。これまでに申請者は、この *C. albicans* 構成成分のうち、菌糸形細胞膜画分に含まれるタンパク質が Th17 細胞を強く誘導し、その誘導された T 細胞を養子移入することで病態モデルマウスにおいて口腔カンジダ症の発症を抑制することが出来ることを発見しています (FEMS Yeast Res. 18:foy 018, 2018)。本研究の目的は日和見感染症の代表的な原因真菌である *C. albicans* を対象とし、この制御に携わるヘルパー T 細胞である Th17 を誘導する抗原ペプチドを探索、その免疫制御機構を解明し、薬物療法に代わる新規の治療法の基盤を確立することにあります (図 1)。

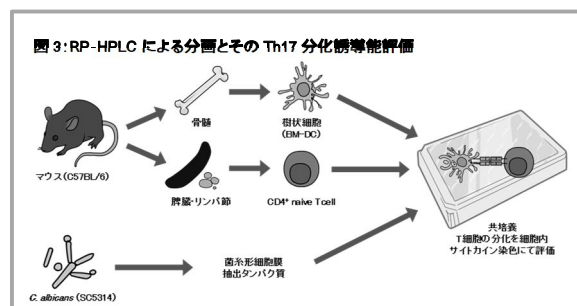
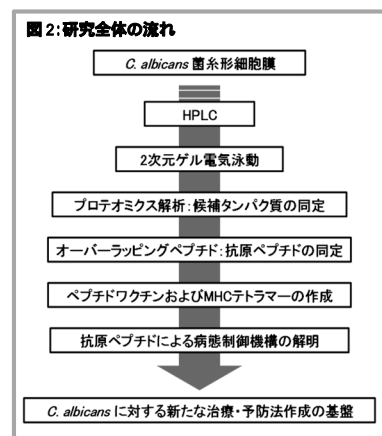


3. 研究の方法

研究計画全体の流れを図 2 に示します。

(1) Th17 細胞の分化を誘導する *C. albicans* 抗原候補タンパク質の分画

全ゲノムシーケンスが判明している *C. albicans* SC5314 株を用いました。*C. albicans* は酵母形と菌糸形の 2 つの形態を持つため、それぞれの形態の細胞をガラスビーズ破碎、超遠心、化学処理により、細胞壁、細胞膜、細胞質などの成分に分画しました。このうち、申請者が Th17 細胞を強く分化誘導させることを発見した菌糸形細胞膜画分タンパク質を逆相高速液体クロマトグラフィーと二次元ゲル電気泳動を用いてさらに分画し、プロテオミクス解析によりタンパク質を同定しました。T 細胞の分化の評価は以下の条件で行いました。*in vitro* において、*C. albicans* 由来のタンパク質を抗原として使用し、野生型マウス (C57BL/6) の骨髓由来樹状細胞 (BM-DC) を抗原提示細胞とし、これらの刺激によって野生型マウスの脾臓とリンパ節由来ナイーブ CD4⁺T 細胞を *in vitro* で分化誘導させ、Th17 細胞への分化をサイトカイン IL-17 産生を指標に flowcytometer にて解析しました (図 3)。



(2) *C. albicans* 抗原候補タンパク質の精製

上記の方法で分画し、解析を進めた候補タンパク質は、*C. albicans* 菌体からの大量精製が困難であったため、*Candida* Genome Database (<http://www.candidagenome.org/>) から候補タンパク質の cDNA ライブラリーを構築し、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、アフィニティークロマトグラフィーを利用して精製しました。

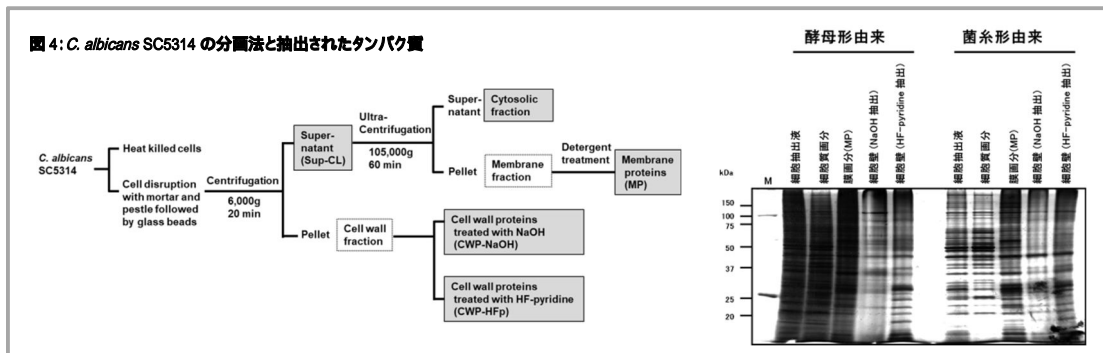
(3) *C. albicans* 抗原候補タンパク質の細胞増殖能と Th17 分化誘導の解析

大腸菌発現系を用いて得られた抗原候補タンパク質が、CD4⁺T 細胞に対して細胞増殖能と Th17 分化誘導能を示すかどうかを調べました。野生型マウスに *C. albicans* 生菌を投与し、感作させました。その 10 日後、マウス脾臓と末梢リンパ節から CD4⁺T 細胞を単離し、*C. albicans* 抗原候補タンパク質を提示させた BM-DC と共培養し、抗原刺激による細胞増殖能を Cell Counting Kit-8 (DOJINDO) で、Th17 細胞への分化を flowcytometer で解析しました。

4. 研究成果

(1) Th17 細胞の分化誘導を引き起こす *C. albicans* 抗原候補タンパク質の分画

C. albicans の細胞を分画し、各種成分に分離しました (図 4)。この中で、Th17 細胞の分化誘導能が高い成分として菌糸形細胞膜画分を見出しました。



菌糸形細胞膜画分タンパク質を、逆相高速液体クロマトグラフィーによって 6 つの画分に分画し、それぞれの画分について Th17 細胞分化誘導能の評価を行い、分画する前の *C. albicans* 菌体全体や、菌糸形細胞膜タンパク質よりも高く Th17 細胞を分化誘導する 3 つの画分を得ました。続いて、これらの 3 つの画分を二次元ゲル電気泳動によってさらに分画し比較しました。それぞれの画分に特異的なスポットを回収し、プロテオミクス解析を行い、分画 1 からは 156 個、分画 2 からは 200 個、分画 3 からは 62 個のタンパク質を得ました。このうちスコア値が高い 7 個のタンパク質を選出し、*C. albicans* 抗原候補タンパク質としました。

(2) *C. albicans* 抗原候補タンパク質の精製

上記の方法で、得られた 7 種類の抗原候補タンパク質の cDNA ライブラリーを構築して大腸菌発現系を用いて His-tag 融合タンパク質として発現させ、アフィニティークロマトグラフィーを利用して大量精製を行いました (図 5)。



(3) *C. albicans* 抗原候補タンパク質の細胞増殖能と Th17 分化誘導の解析

大腸菌から得られた抗原候補タンパク質の CD4⁺T 細胞に対する増殖と Th17 分化誘導能を調べた結果、*C. albicans* 生菌を投与したマウスの T 細胞で増殖を促進し、また Th17 細胞の分化を誘導する候補タンパク質をしぼり込むことができました。

今後、見出した候補タンパク質を基に、さらにペプチドレベルで T 細胞のエピトープペプチドの同定を進めます。

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 0件）

1. 著者名 Ikezaki Shojiro, Cho Tamaki, Nagao Jun-ichi, Tasaki Sonoko, Yamaguchi Masashi, Arita-Morioka Ken-ichi, Yasumatsu Kanae, Chibana Hiroji, Ikebe Tetsuro, Tanaka Yoshihiko	4. 巻 60
2. 論文標題 Mild Heat Stress Affects on the Cell Wall Structure in <i>Candida albicans</i> Biofilm	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Mycology Journal	6. 最初と最後の頁 29 ~ 37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3314/mmj.19-00001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasumatsu Kanae, Nagao Jun-ichi, Arita-Morioka Ken-ichi, Narita Yuka, Tasaki Sonoko, Toyoda Keita, Ito Shoko, Kido Hirofumi, Tanaka Yoshihiko	4. 巻 69
2. 論文標題 Bacterial-induced maternal interleukin-17A pathway promotes autistic-like behaviors in mouse offspring	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 250 ~ 260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.19-0156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有田（森岡）健一、永尾潤一、成田由香、池崎晶二郎、安松香奈江、豊田馨大、田崎園子、長環、田中芳彦
2. 発表標題 Regulation of extracellular amyloid fibril dependent bio film formation using Myricetin delivertives
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田崎園子、長環、永尾潤一、池崎晶二郎、成田由香、有田（森岡）健一、安松香奈江、豊田馨大、小島寛、田中芳彦
2. 発表標題 The effect of <i>Candida albicans</i> components-specific T cells on the prevention of oral candidiasis
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池崎晶二郎、長環、永尾潤一、田崎園子、安松香奈江、豊田馨大、成田由香、有田（森岡）健一、池邊哲郎、田中芳彦
2. 発表標題 Mild heat stress response mechanism in <i>Candida albicans</i> biofilm formation
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊田馨大、成田由香、永尾潤一、有田（森岡）健一、安松香奈江、池崎晶二郎、田崎園子、長環、城戸寛史、田中芳彦
2. 発表標題 Identification of antigenic proteins involved in T cell responses to periodontal pathogenic bacteria
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安松香奈江、永尾潤一、豊田馨大、成田由香、有田（森岡）健一、池崎晶二郎、田崎園子、長環、城戸寛史、田中芳彦
2. 発表標題 Influence of maternal immune activation by bacterial infection on the fetal brain development
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長環、田崎園子、池崎晶二郎、永尾潤一、成田由香、有田（森岡）健一、安松香奈江、豊田馨大、田中芳彦
2. 発表標題 Analysis of T cell antigen-candidates from the membrane protein fraction of mycelial cells in <i>C. albicans</i> .
3. 学会等名 歯科基礎医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永尾潤一、成田由香、豊田馨大、有田（森岡）健一、安松香奈江、池崎晶二郎、田崎園子、長環、田中芳彦
2. 発表標題 Investigation of regulatory mechanism of T-cell immune response against periodontal pathogenic bacteria
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田崎 園子、長環、永尾潤一、池崎晶二郎、成田由香、有田（森岡）健一、安松香奈江、豊田馨大、小島寛、田中芳彦
2. 発表標題 Candida albicans構成タンパク質を特異的に認識するTh17細胞による口腔カンジダ症抑制効果の検討
3. 学会等名 第62回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池崎晶二郎、長環、永尾潤一、田崎園子、安松香奈江、豊田馨大、成田由香、有田（森岡）健一、池邊哲郎、田中芳彦
2. 発表標題 病原真菌Candida albicans のmild heat stress 条件応答機構の解明
3. 学会等名 第62回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田崎園子、長環、小島寛、田中芳彦
2. 発表標題 口腔カンジダ症を制御するTh17細胞を介した免疫応答の解析
3. 学会等名 第35回日本障害者歯科学会総会および学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田崎 園子、長環、永尾潤一、成田由香、池崎晶二郎、安松香奈江、豊田馨大、有田（森岡）健一、小島寛、田中芳彦
2. 発表標題 Exploration of a novel T cell antigen of Candida albicans against oral candidiasis
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安松香奈江、永尾潤一、成田由香、有田（森岡）健一、池崎晶二郎、田崎園子、豊田馨大、長環、城戸寛史、田中芳彦
2. 発表標題 The influence of maternal inflammation by bacterial infection on fetal brain development
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田崎園子、長環、永尾潤一、池崎晶二郎、成田由香、有田（森岡）健一、安松香奈江、小島寛、田中芳彦
2. 発表標題 口腔カンジダ症を制御するTh17細胞応答を誘導するT細胞抗原探索
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sonoko Tasaki, Tamaki Cho, Jun-ichi Nagao, Kenichi Arita-Morioka, Yuka Narita, Kanae Yasumatsu, Yoshihiko Tanaka
2. 発表標題 Exploration of the major T cell antigen in oral candidiasis
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田崎園子, 長 環, 永尾潤一, 池崎晶二郎, 成田由香, 有田(森岡)健一, 安松香奈江, 小島 寛, 田中芳彦
2. 発表標題 Th17細胞を介して口腔カンジダ症を抑制するCandida albicans 表層抗原の探索
3. 学会等名 第63回日本医真菌学会総会・学術集会
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
--	---------------------------	-----------------------	----