

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09917

研究課題名(和文) 口腔カンジダはどのようにして腸炎を増悪するのか

研究課題名(英文) How oral candidiasis can exacerbate colitis?

研究代表者

長谷部 晃 (Hasebe, Akira)

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：90281815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔常在真菌であるCandida albicansが、嚥下により腸内細菌ならびに全身的にどのような影響を与えるのかということについて、マウスを用いて研究を行った。口腔のC. albicansは腸内細菌叢に影響をあたえることがメタゲノム解析により明らかとなり、また、C. albicansの常時嚥下が腸炎の増悪を誘導するが、そのメカニズムとして腸管上皮細胞間接着因子の発現状況を変えることが重要であることが示唆された。消化管の組織学的解析では、腸内細菌叢の変化との関連は不明であるがC. albicansの常時嚥下により胃の委縮が生じていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌叢の異常が宿主の健康に影響を与えることがすでにわかっていたが、さらにヒトにおける代表的常在菌である口腔常在菌も、腸内細菌叢のdysbiosisを通して宿主の健康状態に影響を与える可能性があることを明らかにし、さらに口腔常在菌による腸炎の増悪のメカニズムの一端を明らかにした。このことから全身の健康には口腔の健康が重要であることがわかり、口腔衛生状態を正常に保つことがQuality of Lifeにおいても大きな力ギとなることを示した。

研究成果の概要(英文)：We studied the effects of swallowing Candida albicans, a member of oral commensal microbes, on the gut microbiota and systemic effects in mice. Metagenomic analysis revealed that oral C. albicans affects the intestinal microflora, and that constant swallowing of C. albicans induces exacerbation of colitis, suggesting the importance of altering the expression of intestinal epithelial cell adhesion molecules as a mechanism. Histological analysis of the gastrointestinal tract revealed that constant swallowing of C. albicans caused gastric atrophy, although the relationship to changes in the intestinal microflora was unclear.

研究分野：細菌学

キーワード：口腔常在菌 腸内細菌叢 Candida albicans dysbiosis

1. 研究開始当初の背景

ヒトは膨大な数の微生物と共生しており、皮膚や口腔・腸管などの消化管、腔などに多くの細菌が常在していることが知られている。その中でも腸内細菌叢は、腸管だけでなく全身の状態に大きく影響を及ぼしていることが明らかとなってきた。腸内細菌叢は、腸管に常在していることから炎症性腸疾患などの腸の疾患に関わるが、それだけではなく、糖尿病などの代謝疾患、自閉症やうつ・不安障害などの神経疾患においても発症や増悪に関わるとの報告が増えている。さらに、薬物代謝においても、薬物の効果に個人差がある場合に、その個人差は腸内細菌の違いによるものである場合があることがわかっている。具体的には、腸内細菌の個体差により、ある特定の薬物を分解できる細菌を腸内に保有している人としていない人とは、薬物の効果に個人差が出てしまうということである。このように、これまでは腸内細菌叢が影響を及ぼしていると考えられてきていなかったことにまで腸内細菌叢が関与していることが明らかとなってきた。dysbiosis と呼ばれる腸内細菌叢の乱れは全身の健康状態に大きく影響していると言える。

口腔には口腔常在菌が存在し、総数は腸内細菌より少ないとはいえ多くの種類が棲息しているが、ヒトはたえず口腔微生物を食物とともに嚥下しており口腔に常在する微生物が腸内細菌叢に影響を与える可能性が示唆されている。実際に、動物実験により、ヒトの歯周病減菌の経口摂取が腸内環境を変化させることも示唆されており、我々もこれまでマウスを用いて口腔常在性の真菌である *Candida albicans* の常時摂取により腸内細菌叢に変化が生じることを明らかにしていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔に常在する *C. albicans* が腸内細菌叢ならびに腸炎に与える影響とそのメカニズムを明らかにすることにより、口腔カンジダ症患者の Quality of Life 向上の一助となることである。

口腔カンジダ症は、主に *C. albicans* の感染によるものであり、舌などにおける白苔状の付着物が生じる偽膜性のものや紅斑性、あるいは委縮性の病変が生じるものである。口腔カンジダ症は例えば図1のような病態を示す舌や口腔粘膜における炎症による疼痛など多くの不快感を伴う。*C. albicans* は、ヒト口腔や腸管から検出されることもある真菌であり、加齢とともに検出率が上昇することが知られている。口腔常在性真菌であることから口腔カンジダ症は免疫不全者に発症しやすく、また、抗菌薬の服用により優勢となることから、結果として抗菌薬服用者の腸管内で増殖して dysbiosis を誘導する。しかしながら、必ずしも口腔カンジダ症を発症した患者が抗菌薬を服用しているとは限らないことから、我々はマウスを用いた実験においても、抗菌薬を用いない状態で *C. albicans* を常時経口摂取させることとした。これにより、口腔カンジダ症を再現し、また抗菌薬による影響を排除した状態での腸内細菌叢に与える影響を明らかにし、口腔カンジダ症患者の Quality of Life の向上を、そしてさらに口腔衛生の維持・管理の重要性を訴えることを目的とした。



図1. 口腔カンジダ症. カンジダ感染による舌表面の白苔。

3. 研究の方法

C. albicans を経口的に常時摂取するマウスモデルにおいて、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 接種による腸炎の増悪が見られたが、そのメカニズムを調べるために、*C. albicans* を定着させたマウスにおける腸管上皮細胞間の接着分子の発現状況をウェスタンブロッティング法で調べた。具体的にはマウスにおいて16時間絶食後に経口的に *C. albicans* を接種することで食道から胃の噴門部付近に *C. albicans* を定着させた。その後マウスの腸管を摘出し、occludin と ZO-1 などの上皮間接着分子の発現レベルを調べた。用いた抗体等については以下のとおりである。anti occludin (abcam) と anti ZO-1 (Santa Cruz) とそれぞれ適切な二次抗体を用いて化学発光により発現レベルの変化を調べた。また、同様に *C. albicans* を定着させたマウスの消化管を摘出し、様々な部位における組織切片を作成し、PAS 染色ならびにヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色により顕微鏡下で *C. albicans* と腸管の組織を観察した。

さらに、C57BL/6 マウスと Toll-like receptor (TLR) 2 の遺伝子をノックアウトした C57BL/6 マウスにおける腸内細菌叢を糞便のメタゲノム解析により行った。というのも TLR2 は真菌のザイモザンなどの認識に関わり、難治性のカンジダ症においては TLR2 の発現レベルが低下しているなどの報告があるからである。

4. 研究成果

これまで我々は *C. albicans* の常時摂取によりデキストラン硫酸ナトリウム誘導性の腸炎の増悪を誘導すること、腸内細菌叢に変化が生じることならびに *C. albicans* の生菌が糞便中か

ら検出されるようになることなどを明らかにしていた。そこで腸炎の増悪のメカニズムのひとつとして腸管における上間の細胞間接着因子の発現の変化についてウェスタンブロッティング法により確認した。その結果、occludin については *C. albicans* 摂取 6 週間後に発現が減少していることがわかり(図 2)、また ZO-

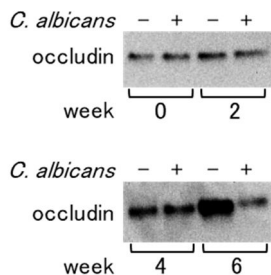


図2. *C. albicans*常時摂取(0~6週)の有無が腸管上皮細胞における occludin 発現に及ぼす影響。

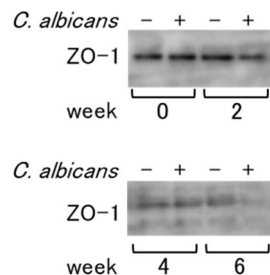


図3. *C. albicans*常時摂取(0~6週)の有無が腸管上皮細胞における ZO-1 発現に及ぼす影響。

1 については摂取後 2 週間から発現レベルの低下が認められ 6 週間では著しく低下していることが確認された(図 3)。したがって、腸管における細胞間接着因子の発現が低下していることが明らかとなり、これによりいわゆる Leaky gut となっていることが腸炎の増悪につながっていることが示唆された。さらに、*C. albicans* の常時摂取による腸管の組織学的変化を調べるため、各部位の組織切片を作製し HE 染色と PAS 染色を行った。その結果、胃において *C. albicans* の菌体が PAS 染色により確認でき、さらに胃全体に委縮が生じていること(図 4A)が明らかとなった。さらに *C. albicans* の摂取のないマウスと比較して胃の粘膜における上皮の著しい肥厚があり(図 4B)、炎症性細胞の浸潤が生じている部位があることも確認された。これらのことから、*C. albicans* の摂取により直接的あるいは間接的に胃においても炎症などの異常を誘導していることが明らかとなった。したがって、腸炎の増悪は、*C. albicans* の生菌による腸内細菌叢の攪乱、あるいは胃における炎症による腸内環境の変化などにより結果として生じる Leaky gut の誘導によるものと推測される。

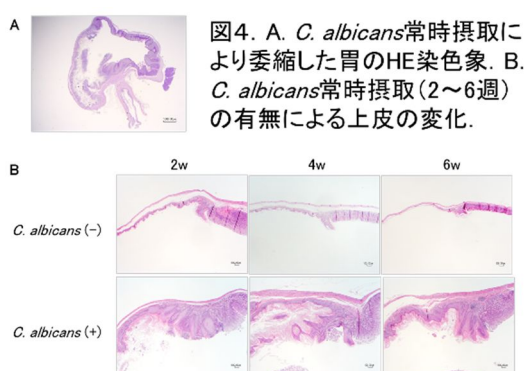


図4. A. *C. albicans*常時摂取により委縮した胃の HE 染色象. B. *C. albicans*常時摂取(2~6週)の有無による上皮の変化。

さらに TLR2 の遺伝子をノックアウトした C57BL/6 マウスにおける腸内細菌叢を糞便のメタゲノム解析により行った。TLR2 は多くの Pathogen associated molecular patterns を認識するが、真菌由来成分においてもザイモザン(zygomycin)を認識するなど重要な自然免疫受容体のひとつである。この実験においては、まずは *C. albicans* を摂取させずに、飼育環境を完全に統一するために TLR2 (+/+)マウスと TLR2 (-/-)マウスを同じケージで 2 週間飼育し、その後糞便中の細菌叢をメタゲノム解析により調べた。その結果 TLR2 (-/-)マウスにおいては TLR2 (+/+)マウスに比べて *Akkermansia* 属の細菌の検出割合が著しく低いこと、また、*Lactobacillus* 属も同様の傾向がみられることなど、明らかに異なる特徴があることがわかった(図 5)。*Akkermansia* 属には肥満抑制や血糖値の上昇を抑制するなどの性質を有するものが存在することから非常に興味深い結果となった。TLR2 は *C. albicans* の認識においても重要であるだけでなく、TLR2 の発現の有無は腸内細菌叢の形成に影響を及ぼしていることが明らかとなったので、*C. albicans* 摂取による腸炎の増悪における TLR2 の役割や腸内細菌叢の変化についてもさらなる解析が必要であることがわかった。

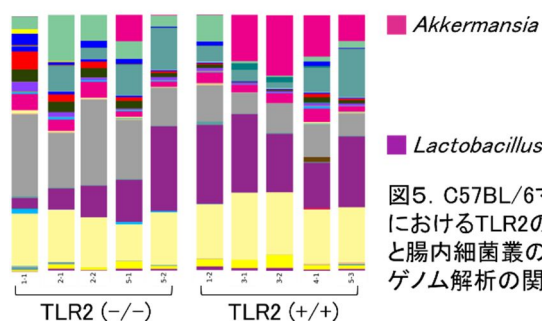


図5. C57BL/6マウスにおけるTLR2の有無と腸内細菌叢のメタゲノム解析の関係。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Chisato Oouchi, Akira Hasebe
2. 発表標題 Comparison of the properties of Candida albicans derived from patients with oral candidiasis and without oral candidiasis
3. 学会等名 第63回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大内 千里、長谷部 晃、北川 善政、坂田 健一郎
2. 発表標題 口腔カンジダ症患者と非口腔カンジダ症患者由来の Candida albicansの病原性の比較
3. 学会等名 第86回 日本細菌学会北海道支部学術総会
4. 発表年 2021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
研究分担者	佐伯 歩 (Saeki Ayumi) (70638345)	北海道大学・歯学研究院・助教 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------