

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10214

研究課題名(和文) カンジダ菌による口腔粘膜炎発症における先天性免疫因子DMBT1の関与

研究課題名(英文) DMBT1 involvement in induction of oral mucositis by Candida

研究代表者

於保 孝彦 (Oho, Takahiko)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：50160940

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)：Candida albicansはDMBT1に結合し、SRCRP2ペプチドドメインに強く結合した。この結合反応はマンノースとシアル酸によって抑制された。C. albicansの菌体表層からDMBT1への結合に関与する成分を分離精製したところ、25 kDaおよび29 kDaのタンパク質が得られ、後者は、phosphoglycerate mutaseであった。これらのタンパク質は、菌体のSRCRP2への結合を抑制し、また、菌体表層に局在することが確認された。本結果から、C. albicansは、菌体表層のこれらのアドヘジンとDMBT1との反応を介して口腔粘膜表面に定着することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カンジダ菌は口腔粘膜炎の起原菌として知られているが、その口腔内定着における唾液タンパク質の関与は解明されていない。DMBT1は様々な機能を担う先天性免疫因子で、口腔粘膜を被覆する薄膜構成成分の1つである。今回、Candida albicansがDMBT1に結合することを認め、結合に関与する2つの菌体表層成分(25 kDaタンパク質およびphosphoglycerate mutase)を発見した。本結果は、C. albicansがこれらのアドヘジンとDMBT1との反応を介して口腔粘膜表面に定着をすることを示唆している。すなわちC. albicansの新たな口腔内定着機序を示したことに意義がある。

研究成果の概要(英文)：Colonization of Candida albicans on the oral mucosa is established via the interaction between C. albicans adhesins and salivary proteins, forming a film on the oral mucosa. DMBT1 is an innate immune factor, and immobilized DMBT1 on oral mucosa causes microbial adherence. We investigated the binding of C. albicans to DMBT1 and isolated the fungal components responsible for the binding. Candida albicans specifically bound to DMBT1 and strongly bound to the peptide domain SRCRP2. Binding to SRCRP2 was inhibited by N-acetylneuraminic acid and mannose. Two components isolated had molecular mass of 25 and 29 kDa, and the latter was found to be phosphoglycerate mutase. The isolated components inhibited C. albicans binding to SRCRP2. The localization of these components on the surface of C. albicans cell walls was confirmed by immunostaining. The results suggest that the isolated components function as adhesins for the establishment of C. albicans cells on the oral mucosa by binding to DMBT1.

研究分野：予防歯科学

キーワード：カンジダ菌 口腔粘膜炎 DMBT1

1. 研究開始当初の背景

我が国の近年の健康施策においては、生活習慣病予防に力点が置かれている一方で、新型コロナウイルス感染症の流行に伴い、様々な感染症の対策にも注目が集まっている。超高齢社会において感染症対策を図りながら健康寿命の延伸を目指すことは、今後の重要なテーマである。カンジダ菌は日和見感染の原因菌の一つであり、宿主の免疫能の低下にともなって様々な疾患を引き起こす。口腔内に棲息する代表的なカンジダ菌である *Candida albicans* は、口腔カンジダ症や真菌性口内炎等の口腔粘膜病を引き起こすことが知られている。また、肺炎患者の口腔内と肺組織から回収される *C. albicans* の DNA が一致することから、同菌は誤嚥性肺炎の原因菌とも考えられている。カンジダ菌による感染症を予防するためには、カンジダ菌の口腔内定着・増殖を早期に阻害することが重要である。

先天性免疫因子 DMBT1 は scavenger receptor cysteine-rich protein の一種で、様々な病原体と相互作用をする特徴を持ち、呼吸器や消化器などの病原体と頻りに接する臓器の上皮や腺組織で顕著に発現することが知られている。唾液中に分泌される唾液凝集素は DMBT1 と同等のタンパク質であり、エナメル質や口腔粘膜表面を覆う唾液由来被膜の構成成分としても知られている。DMBT1 は感染に際して発現が上昇し、様々な微生物に結合して凝集塊を作る。この現象は微生物凝集塊が局所から排除されて疾病予防に繋がる可能性と、逆に局所に微生物を集積させて疾病促進に繋がる可能性があることを示している。

カンジダ菌は口腔内において多種類の細菌と共存しながらその病原性を発揮している。カンジダ菌と口腔内細菌の中で最も多く存在する口腔レンサ球菌との作用は相乗的であり、*C. albicans* は口腔レンサ球菌との共感染によって口腔粘膜病を増悪させることが報告されている。その機序については代謝的側面や炎症因子の誘導についての検索が主になされているが、口腔内で常に両菌種と共存する唾液の作用については未だ明らかにされていない。申請者らは、唾液由来の DMBT1 が齶蝕細菌である *Streptococcus mutans* と相互作用することを報告した。一方で *C. albicans* と唾液タンパク質との相互作用については、高プロリン含有タンパク質やスタセリンとの反応は報告されているものの、DMBT1 との反応を調べたものはこれまでにない。

このような背景から、まず *C. albicans* が口腔内定着をするにあたり DMBT1 がどう関わるのか、また口腔レンサ球菌が共存する場合、DMBT1 はそれぞれの菌体にどう働き口腔粘膜病の増悪に関与するのかを解明することとした。

2. 研究の目的

本研究では *C. albicans*、口腔レンサ球菌、および口腔粘膜上皮細胞を用いて、以下の項目について研究を行った。

1. *C. albicans* と DMBT1 の相互作用
2. DMBT1 との反応に関わる *C. albicans* 菌体表層成分の分離精製
3. *C. albicans* による口腔粘膜上皮細胞からの DMBT1 の発現誘導および炎症誘導
4. *C. albicans* と口腔レンサ球菌の相互作用に及ぼす DMBT1 の作用

3. 研究の方法

菌株は、*C. albicans* については、主に NBRC1385 を用いた。口腔レンサ球菌としては、*Streptococcus sanguinis* ATCC10556、*Streptococcus oralis* ATCC10557、*Streptococcus gordonii* ATCC10558、*S. mutans* MT8148 を用いた。また、口腔粘膜上皮細胞 (HOK) を用いた。

(1) *C. albicans* の DMBT1 への結合

① *C. albicans* をビオチンで標識し、マイクロプレートに固定した DMBT1 への結合を ELISA 法で調べた。また、この反応に及ぼす 2 価陽イオン、*C. albicans* 菌体表層および DMBT1 を構成する糖、レクチンの影響も検討した。

② DMBT1 の SRCR ドメインに由来する 7 つのペプチド (SRCRP1-7) および SID22 ペプチドへの *C. albicans* の結合を同様に ELISA 法で調べた。

(2) DMBT1 との反応に関わる *C. albicans* 菌体表層成分の分離精製

DMBT1 由来ペプチドのうち、*C. albicans* がもっとも強く結合した SRCRP2 を用いて、同ペプチドへの菌体結合を阻害する成分の分離精製を行った。

① *C. albicans* 菌体を zymolyase-100T で処理し、遠心分離によって得られた上清を各濃度硫酸沈殿によって分画した。

② これらの画分について、菌体の SRCRP2 への結合を阻害する効果を調べた。

③ 菌体結合阻害効果をもつ画分を各種クロマトグラフィーでさらに分画し、各画分の菌体結

合阻害効果を調べた。

④菌体結合阻害効果をもつ画分を SDS-PAGE で解析し、精製されたタンパク質を質量分析や N 末端アミノ酸分析で同定した。

⑤精製されたタンパク質の菌体表層での局在を、免疫蛍光染色と cell ELISA で確認した。

⑥精製されたタンパク質が菌体の細胞壁成分と細胞質成分のいずれに存在するかをウェスタンブロットで確認した。

(3) *C. albicans* の刺激による HOK からの DMBT1 の発現誘導

①菌体と HOK を、様々な混合比率で共培養した後、HOK を回収した。

②HOK から mRNA を抽出し、DMBT1 の RNA レベルでの発現をリアルタイム PCR 法で調べた。

(4) DMBT1 による *C. albicans* の凝集誘導、および *C. albicans* と口腔レンサ球菌の共凝集誘導作用

①DMBT1 による *C. albicans* の凝集を、 A_{550} を経時的に測定して評価した。

②*C. albicans* と各種口腔レンサ球菌の混和液に DMBT1 を加え、共凝集の発生状態を位相差顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) *C. albicans* の DMBT1 への結合

C. albicans は菌数依存性に DMBT1 に結合した (図 1A)。また、この反応は assay 系に DMBT1 を加えると濃度依存性に抑制されたことから、この結合反応には DMBT1 が特異的に関与することが明らかとなった (図 1B)。各種 2 価陽イオンがこの結合反応に及ぼす影響を調べたところ、カルシウムイオンが対照 (PBS) と比べて有意に反応を高めることが認められた。

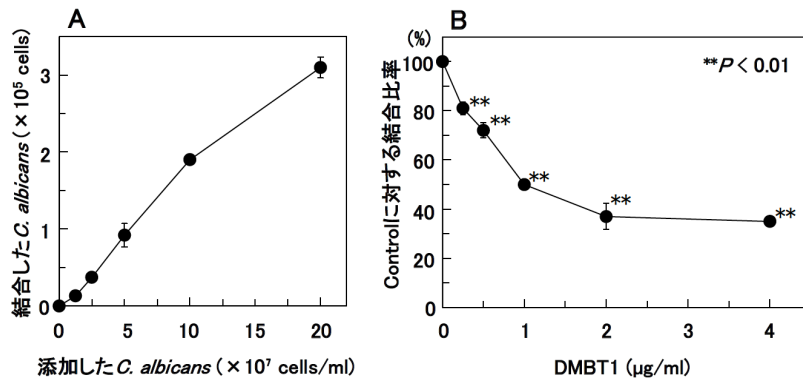


図1 *C. albicans*のDMBT1への結合(A)とDMBT1による結合抑制(B)

次に *C. albicans* の DMBT1 由来ペプチドへの結合を調べたところ、SRCRP2 へもっとも強く結合することが明らかになった。この反応に対する *C. albicans* 菌体表層および DMBT1 を構成する糖の影響を調べたところ、マンノースと *N*-アセチルノイラミン酸が菌体の結合を比較的強く抑制することが認められた (表 1)。さらに、マンノースを認識するレクチンである ConA、および *N*-アセチルノイラミン酸を認識するレクチンである MAM, SSA を用いて *C. albicans* の SRCRP2 への結合に及ぼす作用を調べたところ、いずれのレクチンも濃度依存性に結合反応を抑制した (図 2)。

表1 *C. albicans*のSRCRP2への結合に及ぼす糖の作用

糖	抑制率(%)
フコース	5.0 \pm 2.2
ガラクトース	14.0 \pm 2.6
マンノース	31.7 \pm 0.3
<i>N</i> -アセチルガラクトサミン	12.3 \pm 5.2
<i>N</i> -アセチルグルコサミン	11.0 \pm 2.4
<i>N</i> -アセチルノイラミン酸	41.7 \pm 1.5

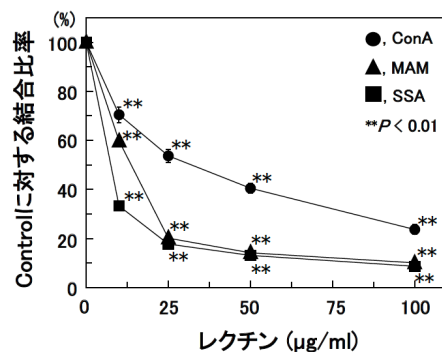


図2 レクチンによる*C. albicans*のSRCRP2への結合抑制

(2) DMBT1 との反応に関わる *C. albicans* 菌体表層成分の分離精製

①25-kDa タンパク質

30%硫酸沈殿物に *C. albicans* 菌体の SRCRP2 への結合を阻害する効果が認められ、さらに Mono Q™ 5/50 QL カラムを用いて陰イオン交換クロマトグラフィーによる分画を行った。菌体の SRCRP2 への結合阻害効果をもつ画分を検索した結果、SDS-PAGE で 25 kDa の単一バンドとして認められた (図 3A)。このタンパク質はレクチンブロットにおいて、マンノースや *N*-アセチルノイラミン酸を認識するレクチンである ConA、MAM、SSA によって認識された。また、この精製された 25-kDa タンパク質は、菌体の SRCRP2 への結合を濃度依存性に抑制した (図 4)。MALDI-TOF 質量分析により、この 25-kDa タンパク質は、*C. albicans* の 60S リボソームタンパク質 L10a と 56%のタンパク質相同性を示すことが分かった。

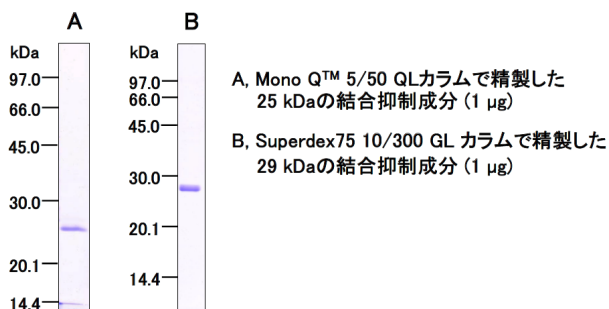


図3 *C. albicans*のSRCRP2への結合抑制成分のSDS-PAGE像

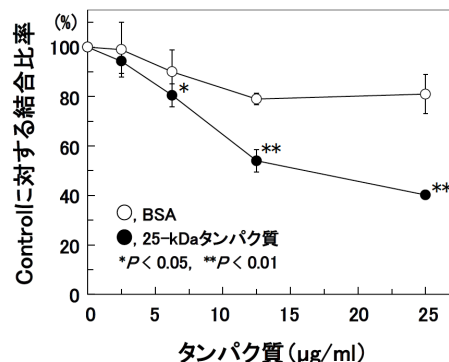


図4 25-kDaタンパク質による*C. albicans*のSRCRP2への結合抑制

次に、この 25-kDa タンパク質の菌体表層での局在を調べた。免疫蛍光染色の結果、25-kDa タンパク質に対するマウス抗血清は、このタンパク質を認識することが判明した (図 5 上段)。また、cell ELISA によれば、25-kDa タンパク質に対するマウス抗血清は免疫前血清に比べてより強く *C. albicans* 菌体を認識することが認められた。さらに、25-kDa タンパク質が菌体の細胞壁成分と細胞質成分のいずれに存在するかをウェスタンブロットで調べたところ、細胞壁成分中に存在することが明らかになった。

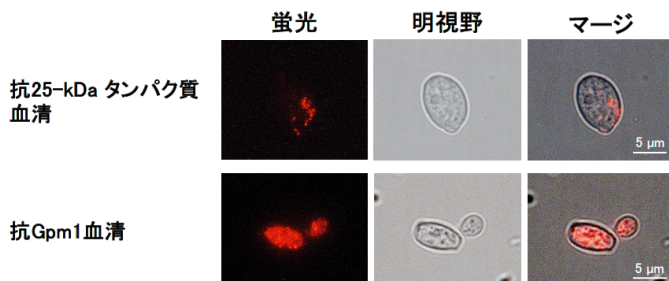


図5 25-kDaタンパク質およびGpm1の菌体表層での局在

②29-kDa タンパク質

45%硫酸沈殿物にも *C. albicans* 菌体の SRCRP2 への結合を阻害する効果が認められ、さらに Superdex75 10/300 GL カラムを用いてゲル濾過クロマトグラフィーによる分画を行った。菌体の SRCRP2 への結合阻害効果をもつ画分を検索した結果、SDS-PAGE で 29 kDa の単一バンドとして認められた (図 3B)。この精製された 29-kDa タンパク質も菌体の SRCRP2 への結合を濃度依存性に抑制した (図 6)。N 末端アミノ酸分析により、この 29-kDa タンパク質は、*C. albicans* の phosphoglycerate mutase (Gpm1) であることが明らかになり、その酵素活性を持つことが認められた。

精製された Gpm1 は、SRCRP2 に濃度依存性に結合することが認められた (図 7)。また、精製された Gpm1 の菌体表層での局在を免疫蛍光染色で調べたところ、Gpm1 に対するマウス抗血清は、このタンパク質を認識することが明らかとなった (図 5 下段)。

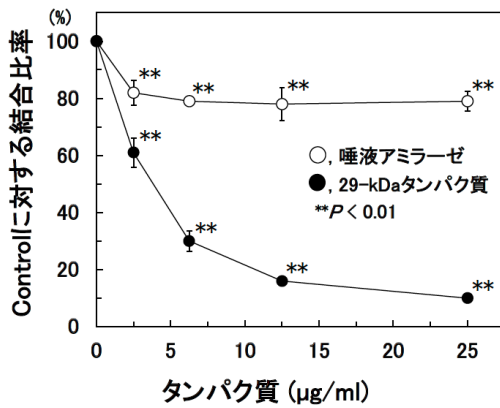


図6 29-kDaタンパク質による*C. albicans*のSRCRP2への結合抑制

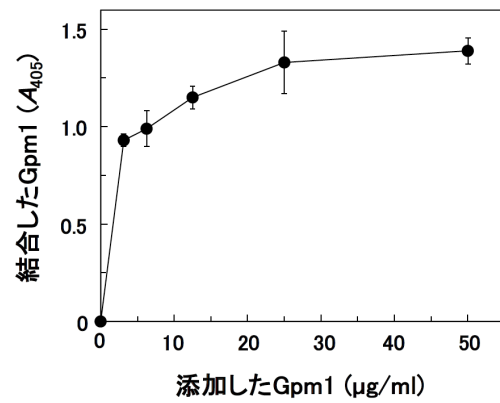


図7 精製したGpm1のSRCRP2への結合

(3) *C. albicans*の刺激によるHOKからのDMBT1の発現誘導および炎症誘導

*C. albicans*とHOKを共培養した後のHOKからのDMBT1の発現をmRNAレベルで調べた。*C. albicans*とHOKを混合比率0.01で24時間共培養した場合、DMBT1の発現は対照に比べて1.03倍となり、ほぼ変化はなかった。また、両者の混合比率を0.1、1と高めるにしたがってDMBT1の発現は低下した。顕微鏡観察によれば、混合比率の増大とともにHOKの形態変化が進んでおり、*C. albicans*の病原性によりHOKの傷害が進んだためと推察された。混合比率1で8時間培養した場合、HOKの傷害は軽度であったが、DMBT1の発現は対照に比べて0.88倍となり、低いレベルであった。さらに、*C. albicans*の4菌株を用いてHOKとの共培養を行ったところ、DMBT1の発現は対照に比べて1.12~1.56倍となり、大差はなかった。これらの結果から、*C. albicans*刺激によるHOKからのDMBT1の発現誘導は弱いと考えられた。

次に、*C. albicans*とHOKを各種混合比率で24時間培養した後の培養上清中のIL-8を定量した。混合比率0.1、1では、対照に比してIL-8の産生量は低下したが、混合比率0.01では産生量が上昇した。混合比率が高い場合はHOKの傷害が大きかったためと考えられた。これらの結果から、適度な条件での*C. albicans*刺激によりHOKの炎症誘導が起こることが確認された。

(4) DMBT1による*C. albicans*の凝集誘導、および*C. albicans*と口腔レンサ球菌の共凝集誘導作用

*C. albicans*の懸濁液にDMBT1を加えて、 A_{550} の低下を指標にして菌体凝集を評価したが、対照と比較して差は認められなかった。*C. albicans*自体の自然沈下が大きかったためと考えられたので、位相差顕微鏡にて観察を行ったが、DMBT1による菌体凝集は顕著ではなかった。次に、*C. albicans*と各種口腔レンサ球菌の懸濁液を等量混和して位相差顕微鏡にて観察を行ったが、いずれの菌も共凝集は生じなかった。また、各菌体混和液にDMBT1を添加しても共凝集は生じなかった。DMBT1は*S. mutans*の凝集を誘導したが、*C. albicans*を共存させても、両菌の共凝集は誘導しなかった。

以上の結果から、*C. albicans*はDMBT1に結合し、特にDMBT1由来ペプチドであるSRCRP2に強く結合することが明らかになった。DMBT1との反応には、菌体表層に存在する25-kDaタンパク質およびGpm1が関与し、25-kDaタンパク質については、その構成成分であるシアル酸やマンノースが重要な役割を演じることが示された。*C. albicans*は、これらの菌体表層タンパク質をアドヘジンとして機能させ、DMBT1に被覆された口腔粘膜表面に定着して、炎症を誘導することが示唆された。

<引用文献>

- ① Setoguchi D, Nagata E, and Oho T: A novel mannose-containing sialoprotein adhesin involved in the binding of *Candida albicans* cells to DMBT1. *Mol Oral Microbiol*, 37: 154-163, 2022.
- ② Oho T, Setoguchi D, and Nagata E: Surface-expressed phosphoglycerate mutase of *Candida albicans* binds to salivary DMBT1. *Arch Microbiol*, 205: 263, 2023.

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 Setoguchi D, Nagata E, Oho T	4. 巻 37
2. 論文標題 A novel mannose-containing sialoprotein adhesin involved in the binding of <i>Candida albicans</i> cells to DMBT1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Oral Microbiol	6. 最初と最後の頁 154-163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/omi.12374	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 Oho T, Setoguchi D, Nagata E	4. 巻 205
2. 論文標題 Surface-expressed phosphoglycerate mutase of <i>Candida albicans</i> binds to salivary DMBT1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Arch Microbiol	6. 最初と最後の頁 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00203-023-03605-w	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 於保孝彦、瀬戸口大介、長田恵美
2. 発表標題 <i>Candida albicans</i> 菌体表層 phosphoglycerate mutase の唾液 DMBT1 への結合
3. 学会等名 第72回日本口腔衛生学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 瀬戸口大介、於保孝彦
2. 発表標題 <i>Candida albicans</i> の DMBT1 への結合に関わる菌体因子の解明
3. 学会等名 第71回日本口腔衛生学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瀬戸口大介、於保孝彦
2. 発表標題 Candida albicans のDMBT1への結合因子の検索
3. 学会等名 第70回日本口腔衛生学会総会
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	長田 恵美 (Nagata Emi) (00304816)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師 (17701)	

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
---------	---------