

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462775

研究課題名(和文) 口腔常在カンジダは腸管においてカンジダ特異的Tregを誘導するか

研究課題名(英文) Can oral *Candida albicans* induce *C. albicans* specific colonic regulatory T cells?

研究代表者

長谷部 晃 (Hasebe, Akira)

北海道大学・歯学研究科・助教

研究者番号：90281815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔カンジダ症の原因病原体の*Candida albicans*が、なぜ口腔内に常在できるのか不明である。

我々は、*C. albicans*の経口摂取がそれに対する経口免疫寛容が誘導するからではないかと考えた。経口免疫寛容とは、食物に免疫反応が起こらないのと同様に、口から摂取された異物に対して免疫反応が起こらないシステムのことである。そこで、経口的に*C. albicans*を若いマウスや高齢のマウス、TLR2遺伝子欠損マウスに摂取させたが*C. albicans*特異的血中抗体に対する免疫抑制を誘導せず、TLR2の有無も*C. albicans*に特異的な抗体産生誘導には影響しないとわかった。

研究成果の概要(英文)：*Candida albicans* is one of the causative of human oral candidiasis, although it is a commensal resident of human oral cavity. It is still unknown that why *C. albicans* can reside in the cavity.

We hypothesized that oral tolerance is induced against *C. albicans* by uptake of the organism orally. Oral tolerance is the state of local and systemic immune unresponsiveness that is induced by oral administration of innocuous antigen such as food proteins. *C. albicans* were orally administrated and vaccinated to mice, and the induction level of specific antibodies against the organism was examined to investigate whether the oral administration induces oral tolerance. Level of oral tolerance was determined by the titer of antibody specific to *C. albicans*. It was found that the titer of antibodies in young mice were generally lower than those in old mice. In addition, absence of TLR2 was not crucial for induction of *C. albicans* specific antibodies.

研究分野：微生物学

キーワード：経口免疫寛容 カンジダ症 *Candida albicans*

1. 研究開始当初の背景

口腔カンジダ症は代表的な日和見感染症であり、主に口腔粘膜に真菌である *Candida albicans* が感染・増殖することにより引き起こされる炎症性の疾患である。*C. albicans* は口腔常在性であり、加齢とともに検出率が上昇することが報告されているが、なぜ常在できるのかは不明のままであった。

そこで我々は、口腔における *C. albicans* の定着に制御性 T 細胞 (Treg) が関わっているのではないかと考えた。Treg は免疫の恒常性維持に重要な役割を果たす免疫抑制性の細胞であり、経口的に摂取された抗原に対しても腸管で誘導されることが知られている。具体的には、経口的に取り込まれた抗原は、腸管のパイエル板の M 細胞や腸管上皮間隙から突起を伸ばした樹状細胞 (DC) に取り込まれ、粘膜固有層 (LP) の T 細胞に抗原提示される。そして、T 細胞の中で IL-10、TGF- β あるいはレチノイン酸産生 DC から抗原提示を受けたものが Treg に変換される。このようにして腸管で誘導された Treg は、腸管膜リンパ節から全身のリンパ節へと循環するだけでなく、唾液腺にも存在することなどから、腸管で誘導された免疫抑制性の細胞が、口腔においても抑制的に作用している可能性がある。以上のことから我々は、口腔内常在の *C. albicans* が咀嚼、嚥下の過程で唾液などとともに飲み込まれることで、*C. albicans* に特異的な Treg が誘導されているのではないかと考えた。さらに、加齢により *C. albicans* の検出率が上昇するのは、加齢とともに *C. albicans* に特異的な Treg の割合が変化しているからではないかと予想した。実際に、ヒトとマウス両方において年齢とともに Treg の割合が増加するという報告もあり、加齢により *C. albicans* に特異的な Treg の割合が増加すれば、口腔においても *C. albicans* に対して免疫抑制状態となり、カンジダ症が発症しやすくなる可能性があると考えたのである。

また、我々人間は、人体にとって異物である食べ物を摂取しても、基本的にそれに対して免疫系が反応することはない。これは「免疫系に異常がない場合には、口から食べたものには免疫応答が起らない」という経口免疫寛容があるからであり、経口免疫寛容においても腸管関連リンパ組織 (GALT) における Treg の重要性が明らかになってきている。したがって、本研究では、マウスに *C. albicans* を持続的に経口的に摂取させ、マウスの GALT における *C. albicans* に特異的な Treg の誘導と、加齢がその誘導に及ぼす影響などを調べることで、*C. albicans* が口腔内に常在できるメカニズムを明らかにできると考えた。さらに、このことから口腔常在菌への経口免疫寛容についての一面も明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

既述のように、口腔カンジダ症は加齢とともに検出率の上昇する口腔常在性の *C. albicans* が原因となるが、なぜ *C. albicans* が常在できるのか不明のままである。我々は、口腔の *C. albicans* が唾液などとともに飲み込まれることで、*C. albicans* に対して特異的な Treg が誘導されており、さらに加齢とともに T 細胞における Treg の割合が変化して *C. albicans* の検出率が上昇する一因となっているのではないかと考えた。本研究課題では、経口摂取された *C. albicans* により誘導される GALT における免疫抑制性の細胞について調べることで、*C. albicans* が口腔に定着し、加齢により *C. albicans* の検出率が上昇するメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

C. albicans の経口摂取により免疫抑制状態を誘導するかどうかを、まず *C. albicans* に対する特異抗体の抗体価を調べることにした。具体的には、*C. albicans* の経口投与が、*C. albicans* 免疫による特異的 IgG、IgA、IgM ならびに IgE の産生誘導に及ぼす影響を調べた。

・ *C. albicans* の培養

C. albicans pACT1-GFP を蔗糖添加 SD 培地で、pACT1-GFP の親株である CAI4 をさらにウリジンを添加した同培地で培養、遠心し、PBS で菌体を洗浄後、使用時まで - 80 に凍結保存する。

・ *C. albicans* のマウスへの経口投与

マウス腸管に確実に *C. albicans* を投与するため、ゾンデを用いた。投与開始前の血液、糞便ならびに唾液を採取し、20 日間の経口投与とその間に 3 回背部皮下に *C. albicans* をフロイントの不完全アジュバントとともに免疫した。唾液はマウスの腹腔への塩酸ピロカルピン注射により得た。使用したマウスは C57BL/6 野生型ならびに C57BL/6 の TLR2KO である。TLR2 は真菌成分の認識において重要な役割を果たすことが知られているパターン認識受容体のひとつである。なお、それぞれ若いマウスとして 7 週齢、高齢のマウスとして野生型は 42 週齢、TLR2KO マウスでは 33 週齢のものをを用いた。

・ 抗体価の測定

マウス血清ならびに唾液は必要に応じて希釈して用い、糞便は重量比を揃えて PBS に懸濁し、遠心上清を用いて ELISA 法により抗体価を測定した。具体的には 96 well plate の底面に *C. albicans* を固定し、血清などのサンプルを段階希釈して加え、サンプル中の特異抗体を anti mouse IgG、anti mouse IgA、anti mouse IgM あるいは anti mouse IgE で検出した。

・ マウス DC ならびにマクロファージにおけ

る IL-18 産生誘導について

マウス DC 系細胞 XS106 ならびにマクロファージ系細胞 J774.1 を LPS でプライミング後に *C. albicans* で刺激し、成熟型の IL-18 の産生誘導を調べた。

4. 研究成果

マウスに経口的に *C. albicans* を投与した場合における *C. albicans* 特異的抗体産生誘導を調べたところ以下のようなことがわかった。

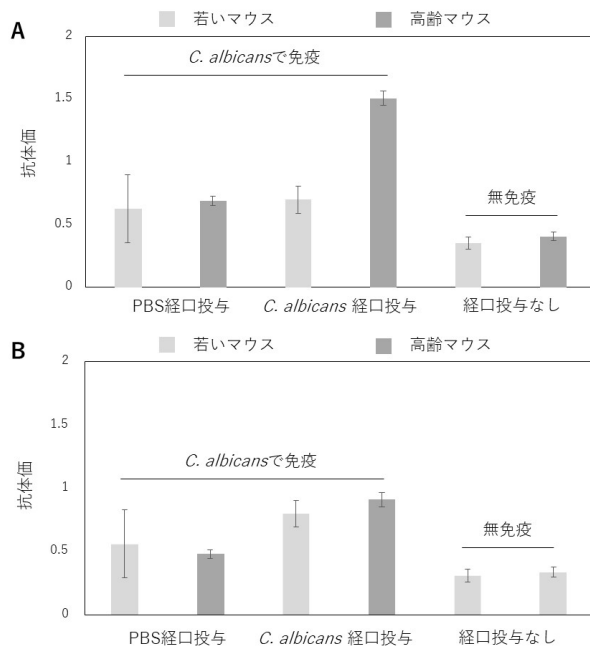


図 1. 野生型マウス (A) と TLR2KO マウス (B) に対する血清中の *C. albicans* 特異的 IgG の抗体価

野生型のマウスならびに TLR2KO マウスにおいて、血清中の IgG の誘導は同じ傾向を示した (図 1)。すなわち、経口投与も免疫もないコントロールと比べ、PBS を経口投与した場合に *C. albicans* 特異的 IgG の抗体価の上昇がみられたが、若いマウスの高齢マウスの間では差がなかったこと、また *C. albicans* を経口投与した場合に、若いマウスよりも恒例のマウスで *C. albicans* 特異的 IgG の抗体価の上昇がみられたことである。

また、IgG とともに感染防御において重要な役割を果たす IgM についても同様に調べたところ、野生型マウスでは IgG の場合と似た傾向を示した。面白いことに TLR2KO マウスの場合は、PBS 経口投与においても *C. albicans* 経口投与においても高齢マウスの方が *C. albicans* 特異的 IgM の抗体価の上昇がみられた (図 2)。これらは予想に反して起きたことであるが、より高齢のマウスを使用すると異なった結果が得られた可能性があると思われる。

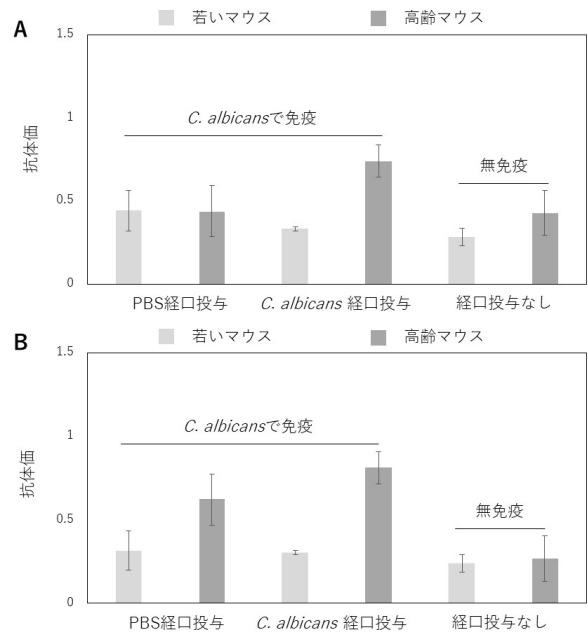


図 2. 野生型マウス (A) と TLR2KO マウス (B) に対する血清中の *C. albicans* 特異的 IgM の抗体価

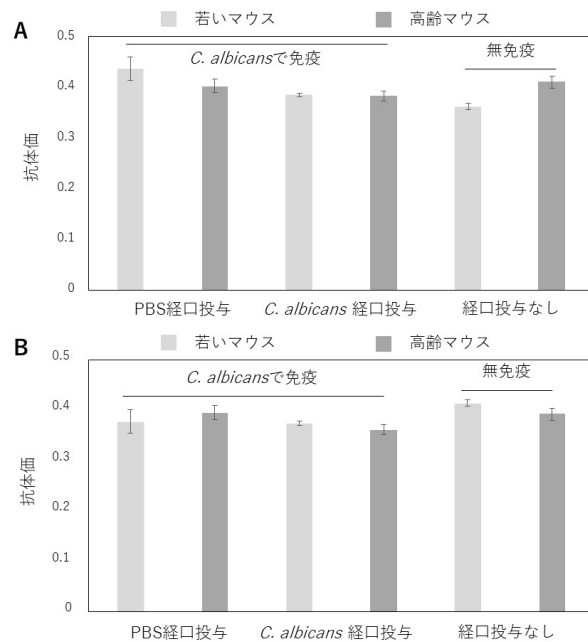


図 3. 野生型マウス (A) と TLR2KO マウス (B) に対する糞便中の *C. albicans* 特異的 IgA の抗体価

また、唾液中の IgA はまったく検出されなかったため、糞便中の *C. albicans* 特異的 IgA を調べた (図 3)。マウスの糞便を回収し、重量比で一定となるように PBS を加え、上清を回収しその中に含まれる特異的 IgA の抗体価を調べた。

その結果、野生型マウスにおいて、*C. albicans* を免疫した場合、高齢マウスでは無免疫の場合と比較して抗体価の上昇はなく、若いマウスでは PBS を経口投与し *C. albicans* を免疫した場合に抗体価の上昇がみ

られた。しかしながら全体的にどのマウスにおいても大きな抗体価に大きな差はなかった。

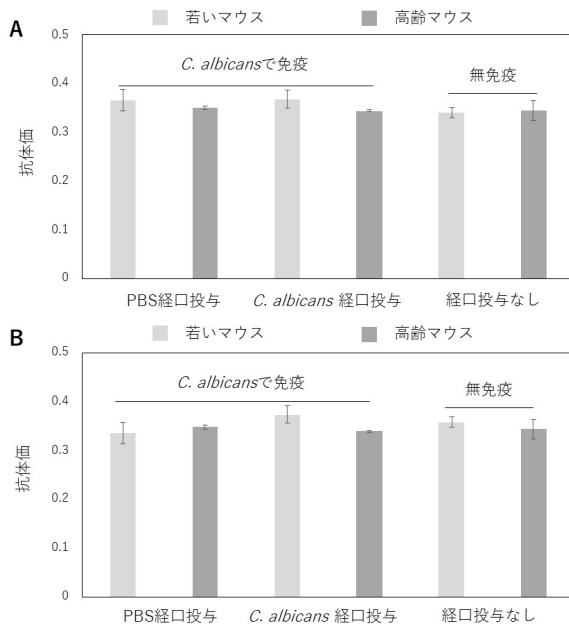


図4. 野生型マウス (A) と TLR2KO マウス (B) に対する血清中の *C. albicans* 特異的 IgE の抗体価

腸管におけるカンジダの定着でアレルギーが増悪するという報告もあることから、アレルギー関連の抗体である *C. albicans* 特異的 IgE の抗体価を調べた。その結果、*C. albicans* 特異的 IgE はどのマウスにおいても大きな差見られなかった (図4)。

これらのことを総合すると、今回の実験条件下では *C. albicans* 経口投与で *C. albicans* 特異的抗体の産生誘導が抑制されなかったことから、*C. albicans* 経口投与では *C. albicans* に対する免疫抑制が生じなかったと言える。ただ、*C. albicans* を経口しなかった場合でも *C. albicans* 免疫で抗体価の上昇が確認できなかったことも問題であり、今後はこれらの原因を含めてどのようなことが起きていたのか解析することが課題となるだろうと思われる。

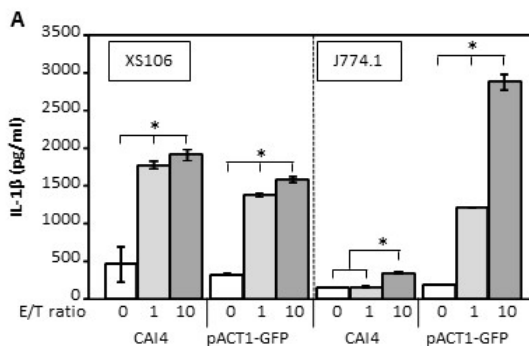


図5. *C. albicans* pACT1-GFP あるいは CAI4 刺激による XS106 ならびに J774.1 による IL-1β 産生誘導の違い

また、マウス DC 系細胞 XS106 ならびにマクロファージ系細胞 J774.1 を LPS でプライミング後に *C. albicans* で刺激し、成熟型の IL-1β の産生誘導を調べたところ、XS106 と J774.1 では *C. albicans* 刺激による IL-1β の産生誘導のメカニズムが異なることがわかった (図5)。これらのメカニズムがどのように異なっているのかについても非常に興味深い。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

長谷部 晃、佐伯 歩、亀崎 良助、柴田 健一郎、樹状細胞とマクロファージ細胞に対する *Candida albicans* の IL-1β 産生誘導の違い. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2016 年 8 月 24~26 日. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)。

長谷部 晃、佐伯 歩、柴田 健一郎、IL-1β production-inducing activity of *Candida albicans* toward dendritic cells and macrophages. 第 90 回日本細菌学会総会. 2017 年 3 月 19~21 日. 仙台国際センター (宮城県・仙台市)。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷部 晃 (HASEBE AKIRA)
北海道大学大学院歯学研究科・助教
研究者番号：90281815

(2) 研究分担者

()

(3) 連携研究者

佐伯 歩 (SAEKI AYUMI)

北海道大学大学院歯学研究科・助教
研究者番号：70638345

(4) 研究協力者

()