

研究経過報告書

1. 研究課題名：カンジダ腔炎の発症機序・病態の解明とより良い予防・治療法への応用研究
2. 研究代表者氏名：阿部 雅広
3. 研究発表（論文、著書、学会発表等があれば記載してください）

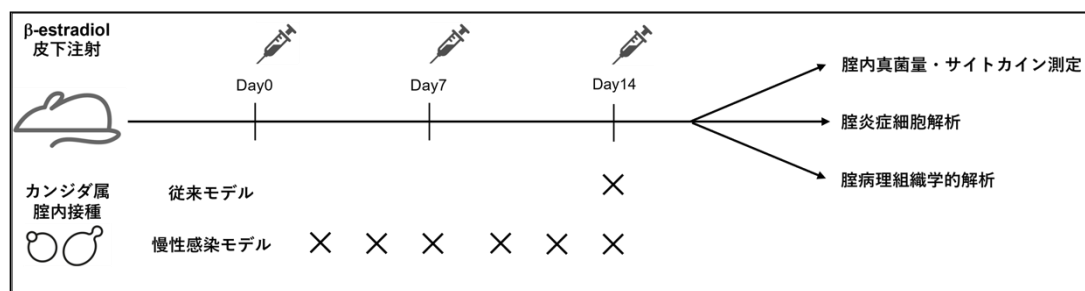
- **阿部 雅広**, 篠原 孝幸, 定本 聡太, 小泉 亜未, 名木 稔, 宮崎 義継. “*Candida albicans* complexとカンジダ腔炎の関連性 - *In vitro* / *In vivo* 両面からの評価 -” 2024年6月15日, 第43回関東医真菌懇話会, 口頭演題発表.
- **阿部 雅広**, 篠原 孝幸, 大谷 天人, 宮崎 義継. “マウスモデルを用いた *Candida auris* 腔感染に関与する因子の解析: *C. auris* cladeとインターロイキン 17Aに焦点を当てた評価” 2024年10月17日-19日, 第73回日本感染症学会東日本地方会・学術集会・第71回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会, 口頭演題発表予定.
- **Masahiro Abe**, Sota Sadamoto, Takayuki Shinohara, Minoru Shinozaki, Ami Koizumi, Sayoko Oiki, Amato Ohtani, Kazutoshi Shibuya, Yoshitsugu Miyazaki. “The relationship between *Candida auris* and interleukin-17A in murine vulvovaginal candidiasis model” 2024年10月6日-9日, The 8th Congress of Asia-Pacific Society for Medical Mycology, Oral Presentation.

4. 研究実績（必要であれば図を用いても構いません）

本研究では、カンジダ腔炎の発症機序・病態解明を目標とし、*in vivo* および *in vitro* 両面からの研究を実施した。具体的には、以下の各種実験を実施し、記載の通り研究成果を得た。

1. カンジダ腔炎に関与する腔内免疫細胞解析 (*In vivo* 実験)

In vivo 実験では、カンジダ腔炎マウスモデル (β -estradiolを週1回皮下注射し、偽妊娠状態を維持したマウスモデル: Abe M, et al. PLOS ONE 2021) を用い、従来用いられるカンジダ腔炎モデル実験系 (カンジダ属単回接種) と新たに構築した慢性カンジダ腔炎モデル実験系 (カンジダ属を複数回接種: 以下の図参照) を用い、*C. albicans* complex および non-*albicans Candida* (*C. tropicalis*・*C. auris*) 感染後の腔内真菌定着・腔内免疫細胞の種類・推移を評価し、モデル間およびカンジダ属間の差異を比較・解析することで腔内免疫応答を評価した。



[1]. 慢性カンジダ腔炎モデルにおける腔内真菌量・炎症細胞集積 (図1)

C. albicans (SC5314株), *C. tropicalis* (NIIDFTH00079株), *C. africana* (M1654株) を用い、従来のカンジダ腔炎モデルと新たに構築した慢性カンジダ腔炎モデルの両方で実験を実施し、結果の比較解析を行った。結果として、*C. albicans*・*C. tropicalis* を用いた実験では、慢性カンジダ腔炎モデルにおいてより長期の腔内真菌定着傾向が確認され、また、*C. albicans*・*C. africana* を用いた実験において、最終腔内接種後早期の腔洗浄液中の炎症細胞数が多い傾向が確認された。

以上の結果より、慢性カンジダ腔炎モデルは長期のカンジダ属腔内定着と、定着に伴う炎症誘導が生じるマウスモデルであると考えられ、ヒトにおけるカンジダ腔炎の病態をより正確に反映する可能性が示唆された。

[2]. 慢性カンジダ腔炎モデルにおける腔内免疫応答 (図 2)

腔内真菌定着・炎症細胞集積の傾向および臨床的な分離頻度を勘案し、*C. albicans* に焦点を当てて感染後早期の腔内免疫応答をフローサイトメトリーにて解析した。結果として、従来のカンジダ腔炎モデルと比較し、慢性カンジダ腔炎モデルにおいては好酸球数の増加が認められ、病態との関連が示唆される結果であった。また、腔内 CD4⁺ T 細胞・ $\gamma\delta$ T 細胞の割合の増加も認められ、病態への関与が示唆された。

上記結果より、好酸球の集積に関連する因子および腔内 CD4⁺ T 細胞・ $\gamma\delta$ T 細胞から産生されるサイトカインがカンジダ腔炎の病態・腔内免疫応答に強く関与しているものと想定された。

[3]. 腔内 CD4⁺ T 細胞・ $\gamma\delta$ T 細胞から産生されるサイトカイン解析 (図 3)

[2]の解析結果を受け、従来のカンジダ腔炎モデルおよび慢性カンジダ腔炎モデルの両方を対象として腔内 CD4⁺ T 細胞・ $\gamma\delta$ T 細胞の産生するサイトカインをフローサイトメトリー (細胞内染色) にて評価した。結果として、特に腔内 $\gamma\delta$ T 細胞は従来のカンジダ腔炎モデル、慢性カンジダ腔炎モデルの両方において IL-17A を強く産生することが確認された一方、CD4⁺ T 細胞は特に慢性カンジダ腔炎モデルにおいて強く IL-17A を産生していることが確認された。また、Th1 型 (IFN- γ) のサイトカイン産生はいずれの系においても有意ではなかった。Th2 型のサイトカイン産生に関しては、IL-4 は有意な所見を認めなかったが、IL-13 は慢性カンジダ腔炎モデルにおいて、一部の腔内 CD4⁺ T 細胞・ $\gamma\delta$ T 細胞からの産生を示唆する結果が認められた。

以上の結果よりマウスカンジダ腔炎においては IL-17A を中心とした免疫応答が病態に関与している可能性が高いと考えられたため、IL-17A 欠損マウスとの比較解析によりカンジダ腔炎の病態を評価する方針とした。

[4]. IL-17A 欠損マウスにおけるカンジダ腔炎の病態評価 (図 4, 5)

[1]~[3]の結果を受け、慢性カンジダ腔炎モデルおよび従来カンジダ腔炎モデルを用い *C. albicans* および *C. auris* の 2 菌種における野生型マウスと IL-17A 欠損マウスの差異を評価した。結果として、*C. albicans* を用いた場合には、慢性カンジダ腔炎モデルにおいては野生型マウスと IL-17A 欠損マウスの間に明らかな差異を認めなかった。また、*C. auris* 感染時には、慢性カンジダ腔炎モデルにおいては野生型マウスと IL-17A 欠損マウスの間に明らかな差異を認めなかった。一方、*C. auris* 感染の実験系では、従来カンジダ腔炎モデルにおいて、野生型マウスに比して IL-17A 欠損マウスにおいて腔内真菌定着量が多く長期間の定着認められるのに対し、腔洗浄液中の炎症細胞数は有意に少なく、両群間に大きな差が認められた。

以上の結果より、腔内における IL-17A を介する免疫応答は特に *C. auris* 感染時に重要な役割を果たすことが示唆された。現在、この詳細な機序等についてさらなる解析を追加して実施中である。

2. 腔内を模した環境下でのカンジダ属の腔上皮細胞への接着評価 (*In vitro* 実験)

腔内は低酸素・高二酸化炭素の環境条件であり、特殊な酸素・二酸化炭素濃度環境が真菌の定着・病原性などに影響する可能性が考えられる。従来の研究手法は主として好気条件での解析であるため、ヒト生体内における正確な挙動を評価できていない可能性が考えられた。それを受けて本研究項目では、腔上皮 VK2/E6E7 細胞を用い、通常の好気条件および腔内環境を模した微好気条件 (酸素濃度 5%、二酸化炭素濃度 5% : 酸素・二酸化炭素濃度を厳密に管理可能な微好気・嫌気ワークステーション内で実施) における各カンジダ属の腔上皮細胞への接着実験を実施し、条件間での比較解析を行なった。具体的には、腔上皮 VK2/E6E7 細胞を 24-well plate 上で培養し、各カンジダ属を接種した後、好気または微好気条件下で 2 時間静置培養し、接着させた。その後、上清除去・洗浄を行った後に細胞を剥離し、寒天培地上のコロニー形成数を計測し、接種菌量との比により接着量を評価した。

[1]. *C. albicans* complex の腔上皮細胞への接着能評価 (図 6)

C. albicans complex (*C. albicans* / *C. africana*) はヒトカンジダ腔炎で最も高頻度に分離される菌種であることから、各菌種複数株を用い、好気・微好気条件下での腔上皮細胞への接着能を評価した。結果として、株間の差異が大きいものの、*C. albicans* に比して接着性の高い *C. africana* 株の存在および微好気条件下で腔上皮細胞への接着性が強くなる傾向を示す株が確認され、ヒト生体内においてより強い接着性を示す可能性が示唆された。

[2]. *C. auris* の腔上皮細胞への接着能評価 (図 7)

In vivo 実験の結果より、*C. auris* は特に IL-17A 欠損状態などの免疫不全下において腔内に長期定着しカンジダ腔炎を生じる可能性が示唆された。本 *in vitro* 実験では、*C. auris* を clade ごとに複数株用い、*C. albicans*、*C. tropicalis* と比較解析する形で接着性を評価した。結果として、*C. auris* は特に微好気条件下において、*C. albicans* などと比して、*C. auris* (特に海外分離株) の腔上皮細胞への接着性が高い結果を認めた。

以上の *in vitro* / *in vivo* 解析より、カンジダ属の中でも *C. auris* は腔上皮細胞との接着性が高く、特に IL-17A を介する免疫機能が低下した患者において長期の腔内定着を示し、病態に関与する可能性が示唆された。これまでカンジダ腔炎に関する研究報告は寡少であったが、本研究結果はカンジダ腔炎の病態の一端を解明しうるものであると考えられ、さらなる解析を行うことで臨床に還元可能な成果に昇華することが可能と考えられた。

* 本研究経過報告書に関する不明点・質問等は国立感染症研究所 真菌部 阿部雅広 (masa-a@niid.go.jp) にご連絡いただけますと幸いです。

図 1. 従来カンジダ腔炎モデル・慢性カンジダ腔炎モデルにおける腔内真菌定着および腔洗浄液中の炎症細胞数

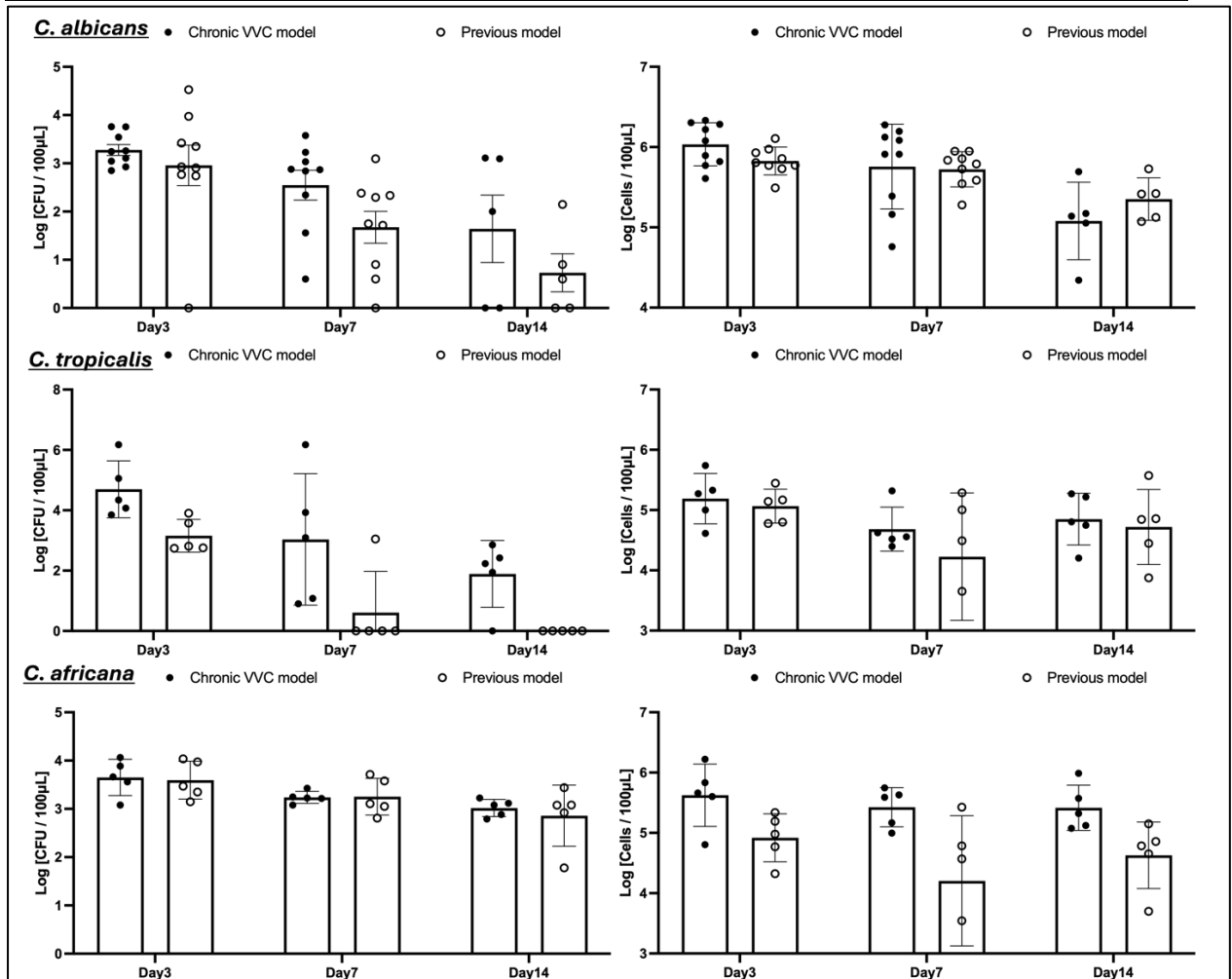


図 2. *C. albicans* 膣炎モデルにおける膣免疫細胞の種類・数

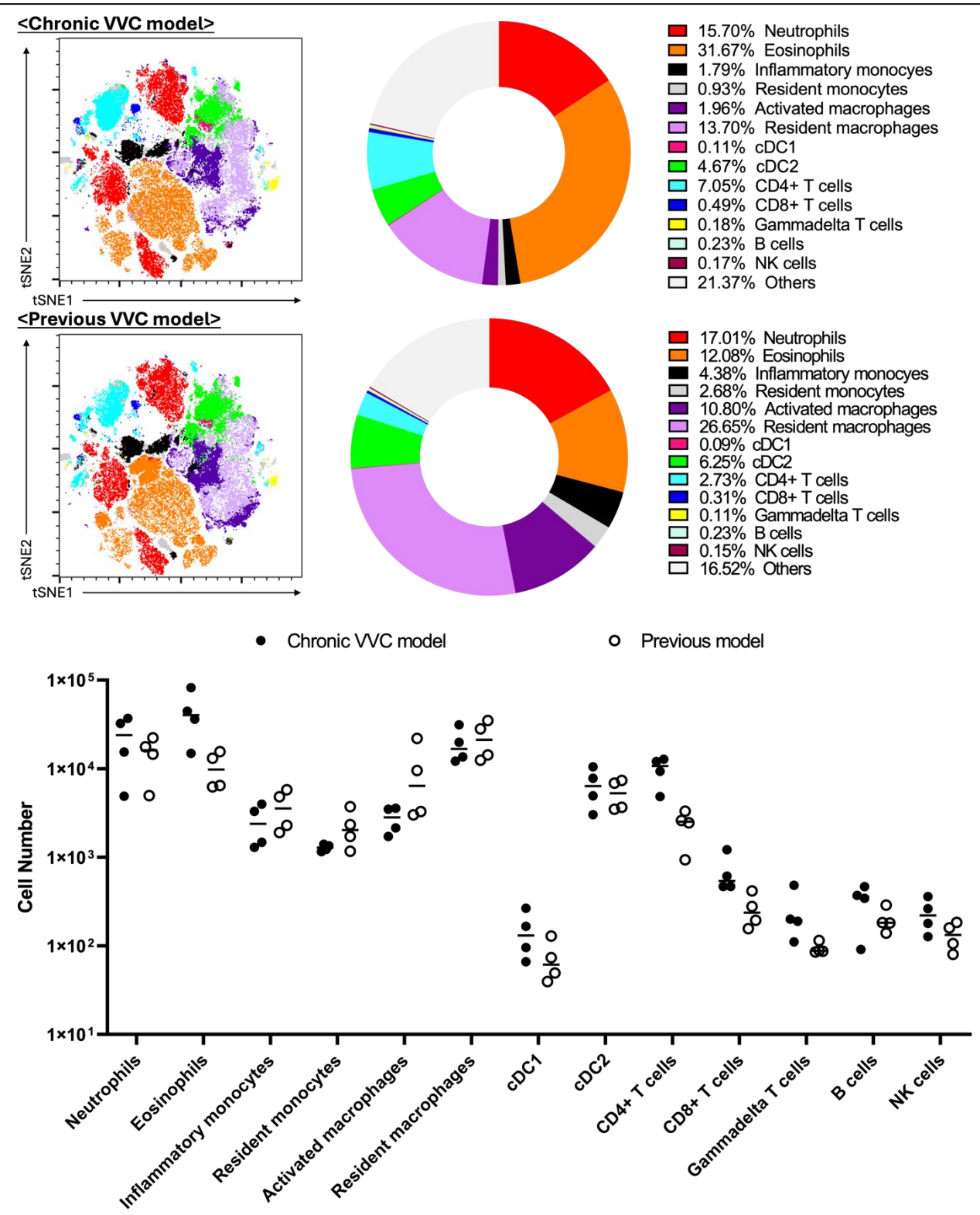


図 3. 腔内 CD4⁺ T 細胞・ $\gamma\delta$ T 細胞の産生するサイトカイン評価 (細胞内染色)

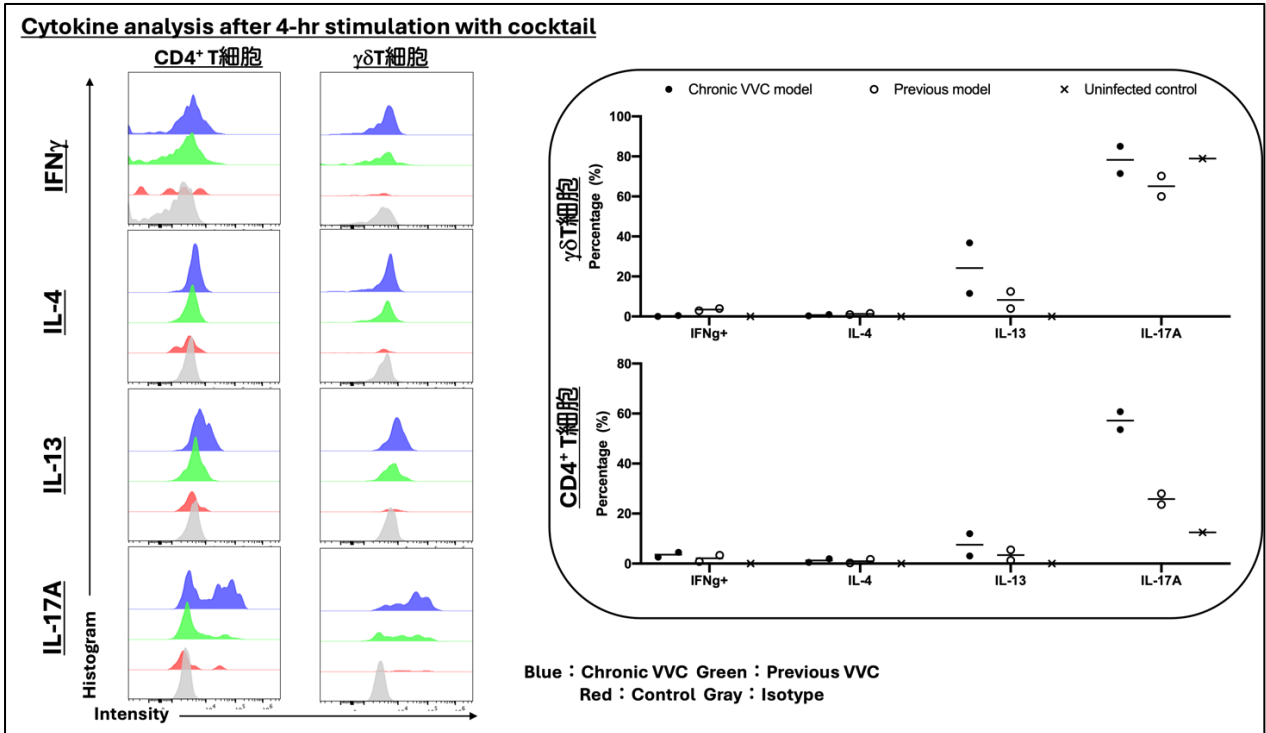


図 4. 野生型マウス・IL-17A 欠損マウスにおけるカンジダ腔炎比較解析

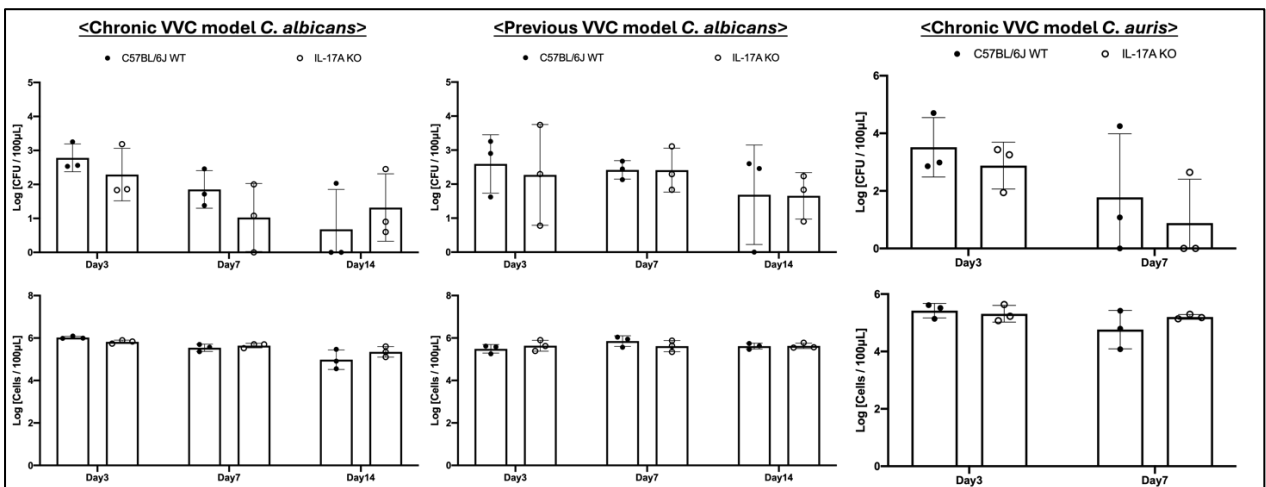


図 5. 従来のカンジダ腔炎モデルを用いた *C. auris* 感染時における野生型マウス・IL-17A 欠損マウス比較解析

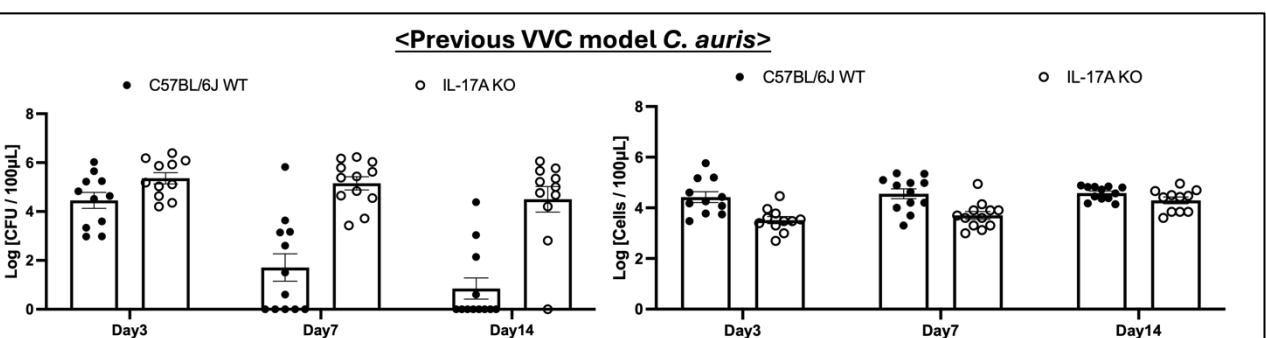


図 6. *C. albicans* complex の腭上皮細胞への接着能評価

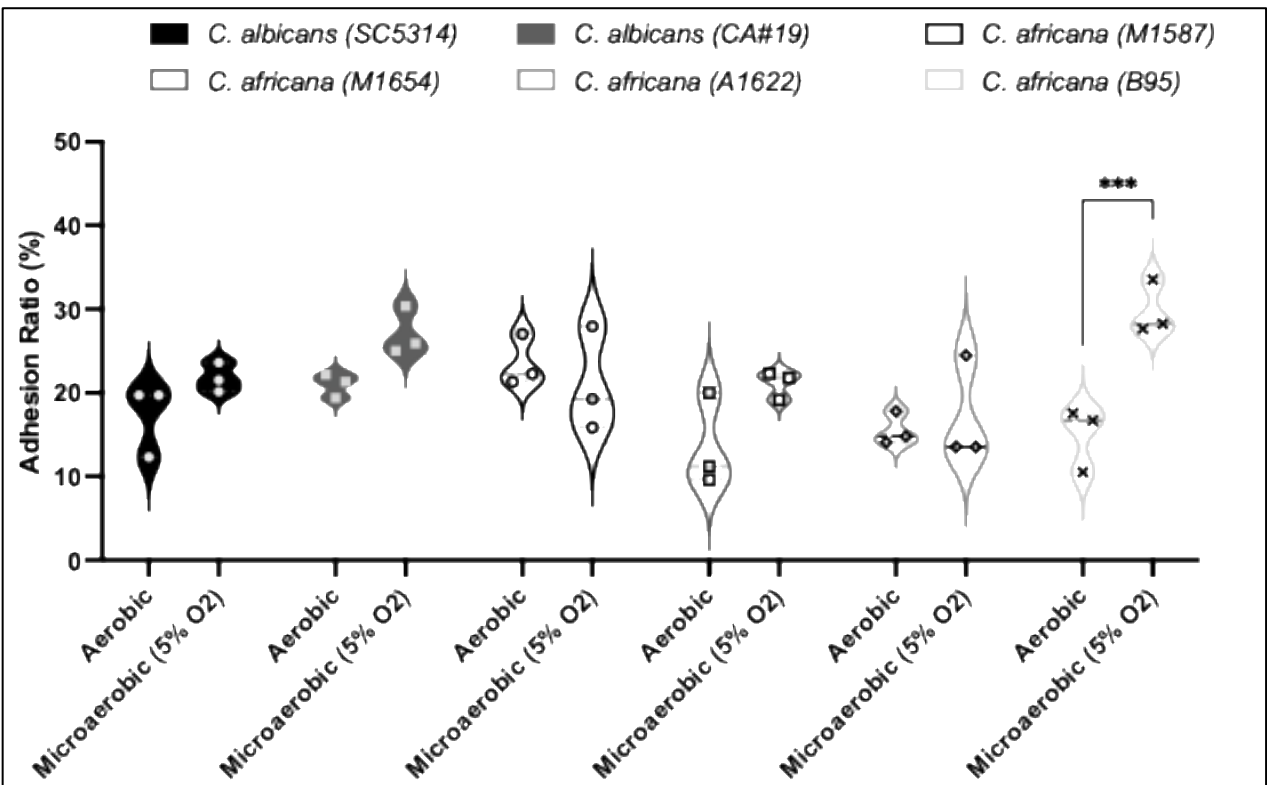


図 7. *C. auris* の腭上皮細胞への接着能評価

