

氏名	てらやまゆい 寺山由依
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	薬博甲 第32号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者
学位授与の年月日	平成29年3月24日
学位論文題目	Candida albicans 感染による 慢性炎症と発癌との関連性の解析
論文審査委員	（主査）矢部 武士 （副査）松浦 哲郎 （副査）尾崎 清和

## 論文内容の要旨

慢性炎症が癌の発生に関与することが、ピロリ菌や肝炎ウイルス感染による慢性炎症に起因する胃癌および肝細胞癌の症例から注目を浴び、慢性炎症と発癌の関係を解明するため様々な研究が行われている。常在真菌である *Candida albicans* (*C. albicans*) は、糖尿病患者や高齢者に対し、免疫能低下による感染症を誘発し、口腔・食道の慢性肥厚性カンジダ症患者の一部で癌へ進行することが報告されている。しかし、*C. albicans* 感染による慢性炎症と発癌との関係を解析した研究は非常に少ない。理由の一つは、ヒトと同様の病変を示す動物モデルが存在しないことであり、免疫抑制剤の投与では、効果が軽度であればカンジダ症は回復し、重度になると全身性カンジダ症を発症して動物は死亡するため、長期間持続する *C. albicans* 感染は成立しない。従って、扁平上皮過形成ならびに癌を発症する *C. albicans* 感染による慢性肥厚性カンジダ症モデルの作製は非常に困難を要する。本研究室では、アロキサン投与により糖尿病を誘発させたラットの前胃に、*C. albicans* 感染を伴った重度の慢性炎症および扁平上皮増殖性病変が形成され、その一部が扁平上皮癌に進行することを報告し、本ラットが扁平上皮過形成や癌を発症する慢性肥厚性カンジダ症のモデルであることを明らかにした。しかし、本モデルの病変の形成に長期の時間を要すること、また病変の程度が一定でなく、発癌率も低いという事実も指摘された。本研究では、*C. albicans* の強制経口投与またはプレドニゾロン間歇投与の2種類の方法により、高率かつ重症度の高い慢性肥厚性カンジダ症モデルの作製を試みるとともに、本モデルを用いプロバイオティクスであるヨーグルトの慢性肥厚性カンジダ症に対する予防および治療効果を調べた。さらに、*C. albicans* による慢性炎症から癌に至る発癌過程のメカニズム解析のために、病変の増悪化に関与する炎症細胞の同定ならびに癌抑制遺伝子・DNA 修復遺伝

子の DNA プロモーター領域のメチル化およびタンパク発現の関連性を解析した。

## 第 1 章 糖尿病ラットへの *C. albicans* 強制経口投与による慢性肥厚性カンジダ症モデル作製の試み

糖尿病ラットに *C. albicans* を強制経口投与することにより、*C. albicans* 感染による慢性肥厚性カンジダ症モデルを早期かつ効率的に作製することを目指した。本実験の試験群は、アロキサンを投与し糖尿病を誘発させた AL 群、糖尿病に加え *C. albicans* を投与した AC 群、糖尿病を誘発させず *C. albicans* のみを投与した C 群の計 3 群から構成された。その結果、AC 群ではほぼ全例に、AL 群では約 30%に、角化亢進を伴う前胃扁平上皮過形成が形成されたが、C 群では病変は認められなかった。AC 群の扁平上皮過形成の程度は、AL 群よりも有意に高度であり、うち 1 例は扁平上皮癌にまで進行していた。扁平上皮過形成を示した粘膜表層には、糜爛または潰瘍を伴った好中球やマクロファージを主体とする化膿性炎症が観察され、角質層には、細菌ならびに酵母型および菌糸型の *C. albicans* が認められた。粘膜固有層から粘膜下織にかけて、リンパ球や形質細胞が多数浸潤する慢性炎症がみられた。AC 群の炎症性変化ならびに感染の程度も、AL 群と比較すると有意に高度であった。結論として、アロキサン誘発糖尿病ラットに *C. albicans* の強制接種を行うことにより、ほぼ全例に扁平上皮増殖性病変を増悪化させた慢性肥厚性カンジダ症モデルを確立した。

## 第 2 章 糖尿病ラットへのプレドニゾロン間歇投与 -*C. albicans* 日和見感染誘発による慢性肥厚性カンジダ症モデル作製の試み-

糖尿病ラットに免疫抑制および抗炎症作用をもつプレドニゾロンを投与することによって、*C. albicans* 日和見感染による慢性肥厚性カンジダ症モデルの作製と扁平上皮増殖性病変の増悪化を試みるとともに、扁平上皮過形成から癌への進行に関与する炎症細胞も合わせて解析した。本実験の試験群は、アロキサンを投与し糖尿病を誘発させた A 群、糖尿病に加えプレドニゾロンを投与した AP 群、糖尿病を誘発させずプレドニゾロンのみを投与した P 群の計 3 群から構成された。その結果、前胃における扁平上皮過形成は AP 群と A 群のほぼ全例に認められ、AP 群の 1 例は扁平上皮癌にまで進行した。AP 群の扁平上皮過形成の程度は、3 群で最も高度であった。AP 群では A 群よりも粘膜固有層から粘膜下織における慢性炎症は有意に強く、特に CD4 陽性 T 細胞およびマクロファージの増加が顕著であった。結論として、糖尿病ラットにプレドニゾロンを間歇投与する従来にない方法により、*C. albicans* の直接投与なしに日和見感染を誘導し、高率にかつ長期間感染を持続できる慢性肥厚性カンジダ症モデルの作製に成功した。病変の微小環境には CD4 陽性 T 細胞およびマクロファージが関与し、扁平上皮過形成から連続する腫瘍形成を誘導する可能性が高いと考えら

れた。

### 第3章 *Lactobacillus gasseri* OLL2716 株を含むプロバイオティクスは糖尿病ラットの慢性肥厚性カンジダ症を抑制する

我々が確立した *C. albicans* 接種による慢性肥厚性カンジダ症モデルを用い、胃に定着性を有するプロバイオティクス (*Lactobacillus gasseri* OLL2716 を含む LG21 ヨーグルト) が、前胃の *C. albicans* 感染および増殖性病変を抑制するか否かを検討した。本実験の試験群は、アロキサン誘発による糖尿病ラットに *C. albicans* を投与した DC 群、DC 群の処置に加え LG21 ヨーグルトを投与した DC+LG21 群の計 2 群から構成された。その結果、扁平上皮過形成の程度は、DC+LG21 群で有意に低く、DC 群では中等度から高度病変が約 70%であったのに対し、DC+LG21 群では高度病変は認められず、中等度病変も 20%にとどまった。また、粘膜表層の化膿性炎症は、DC 群と比べ僅かに抑制されていた。結論として、*Lactobacillus gasseri* OLL2716 株を含むプロバイオティクスは *C. albicans* 感染による慢性肥厚性カンジダ症の扁平上皮過形成を有意に抑制することが明らかとなり、*C. albicans* 感染により誘発される増殖性および炎症性病変を予防もしくは治療できる可能性を示した。

### 第4章 慢性肥厚性カンジダ症から癌に至る発癌メカニズムの解析-p16, RAR- $\beta$ 2, TIMP3, ERCC1 および BRCA1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化とタンパク発現の関連性の欠如-

*C. albicans* 感染による腫瘍発生では、扁平上皮過形成から癌に至る発癌過程の進行に伴い、癌抑制遺伝子および DNA 修復遺伝子のプロモーター領域にメチル化異常が誘導され、これによってそのタンパク発現が抑制されている可能性があるのではないかと考え、我々が確立した慢性肥厚性カンジダ症モデルを用い、発癌過程に沿ってプロモーター領域のメチル化ならびにそのタンパク発現の解析を行った。その結果、発癌過程の進行とともに、p16 プロモーターのメチル化が増強しているにもかかわらず、核の p16 タンパクは過剰発現していた。TIMP3 および RAR- $\beta$  2 プロモーターのメチル化は、前癌段階まで増加するが癌化に伴い消失した。一方、TIMP3 タンパク発現は癌化に伴い抑制され、RAR- $\beta$  2 タンパク発現は、発癌過程の進行に伴い、細胞質で減弱し、核で増強した。ERCC1 および BRCA1 のプロモーター領域は、いずれの段階でもメチル化されず、これらのタンパク発現は早い段階で消失していたが、ERCC1 タンパクは発癌過程の進行に伴い再発現した。従って、プロモーターのメチル化に伴うタンパク発現の消失は起こらなかったが、タンパク発現が大きく変動した。すなわち、過形成段階で DNA 修復遺伝子である ERCC1 および BRCA1 タンパク発現は消失し、続いて細胞周期およびアポトーシスに関与する p16 および RAR- $\beta$  2 タンパク発

現の異常蓄積が生じ、さらに癌化に伴い細胞浸潤に関与する TIMP3 タンパク発現が減少した。結論として、p16、RAR- $\beta$  2、TIMP3、ERCC1 および BRCA1 のタンパク発現の異常はプロモーターのメチル化状態とは関係なく生じ、これらが *C. albicans* 感染によって引き起こされる炎症性発癌を促進している可能性を示唆していた。

結語：アロキサン誘発糖尿病ラットに *C. albicans* を強制経口投与またはプレドニゾロンを間歇投与する 2 種類の方法により高率かつ高度に発症する慢性肥厚性カンジダ症モデルを確立した。いずれも少数例ながら早期に扁平上皮癌に進行することから、希に扁平上皮癌に進行するヒトの口腔および食道の慢性肥厚性カンジダ症と極めて類似していることが判明した。次に、この慢性肥厚性カンジダ症モデルを用い、*Lactobacillus gasseri* OLL2716 株を含むプロバイオティクスが *C. albicans* 感染によって引き起こされる増殖性および炎症性病変に対し、予防および治療効果があることを明らかにした。さらに、*C. albicans* 感染による扁平上皮過形成から癌に至る発癌過程の形態学的解析から、慢性肥厚性カンジダ症の増悪化には CD4 陽性 T 細胞およびマクロファージの増加が深く関与していることが示され、発癌メカニズム解析から、p16、TIMP3、RAR- $\beta$  2、ERCC1 および BRCA1 のタンパク発現異常が、DNA プロモーター領域のメチル化状態とは関係なく生じていることを見出した。