

学位論文題名

口腔カンジダ症と加齢における Toll-like receptors の発現
・機能ならびにNK活性

学位論文内容の要旨

近年、医療の高度化に伴って様々な基礎疾患を抱え、抗がん剤、ステロイド剤、免疫抑制剤などの投与により免疫力が低下した易感染宿主の日和見感染症が増加している。このような日和見感染症として、口腔領域では口腔カンジダ症が注目されている。口腔カンジダ症は基礎疾患や薬剤等による全身的な免疫機構に異常のあるヒトに高頻度で発症すること、また、加齢に伴いその発症率が高くなることが報告されている。しかしながら、糖尿病、エイズ、自己免疫疾患、腫瘍等の既往歴のないヒト、また、抗菌薬と免疫抑制剤を投与されていないヒトにも口腔カンジダ症は発症しているが、そのような口腔カンジダ症の発症にどのような免疫能の異常・低下が関わっているかについては殆ど明らかにされていない。最近、病原体特有の分子構造を認識する受容体として **Toll-like receptor (TLR)** が注目を集めている。TLR はヒトでは約 10 種類同定されていて、自然免疫系において微生物の侵入を感知するだけでなく、自然免疫系と獲得免疫系の橋渡しをする重要な受容体である。TLR2 ならびに TLR4 は、それぞれ真菌の細胞壁構成成分である β -グルカンやマンナンを認識することが知られている。また、**Natural killer (NK)** 細胞は自然免疫系でウイルス感染細胞やがん細胞を殺傷するだけでなく、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害活性 (ADCC) により獲得免疫系においても重要な役割を果たしている。このように、TLR ならびに NK 細胞は自然免疫系ならびに獲得免疫系において重要な役割を果たしている。

以上の理由から、我々は TLR の発現と機能ならびに NK 細胞の活性の低下が口腔カンジダ症の発症に重要な役割を果たしているのではないかと考えた。そこで、本研究では、糖尿病、エイズ、自己免疫疾患、腫瘍等の既往歴がなく、抗菌薬や免疫抑制剤を投与されていないヒトを対象に、末梢血単核球

(**Peripheral Blood Mononuclear Cell : PBMC**) における TLR 2 とその補助レセプター (TLR1 および TLR6) ならびに TLR 4 の発現と機能、さらに NK 活性の加齢変化と口腔カンジダ症との関連性を調べた。

口腔粘膜の疼痛や味覚障害などを主訴に北海道大学病院歯科診療センター口腔系歯科を受診した 25 歳から 89 歳までの口腔疾患患者ならびに同年代の北海道大学歯学部学生および教員のボランティアに対し、本研究目的について十分に説明を行ったうえで同意を得られたものを対象とした。舌苔の有無に関わらず、口腔粘膜の疼痛や味覚障害などの口腔内症状の訴えがあり、さらにカンジ

ダ培養検査で1平板当たり10個以上のコロニーが形成された場合に口腔カンジダ症と判定とした。なお、カンジダ培養検査は、舌背を滅菌したデンタルミラーで10回擦過して得られた試料をクロモアガー培地に塗抹し、35℃で48時間好氣的に培養した。また、事前に問診を行い、糖尿病、エイズ、自己免疫疾患、腫瘍等の既往歴があり、また、抗菌薬と免疫抑制剤を投与されているヒトは対象より除外した。なお、腫瘍患者とは、問診の際に悪性腫瘍の担癌状態ならびに腫瘍既往のあると判明したヒトを意味する。PBMCはヘパリン採血管で被験者より末梢血20 mlを採血し、フィコール・パック密度勾配法で分離・調製した。

TLR2とその補助セプターであるTLR1とTLR6，ならびにTLR4の発現量はそれぞれの特異抗体を用いてフローサイトメトリーで測定した。TLR2ならびにTLR4の機能は産生されたサイトカイン量により評価できる。そこで、本研究では、PBMCをTLR2リガンドであるジアシルリポペプチド Fibroblast-stimulating lipopeptide 1 (FSL-1)あるいはTLR4リガンドである大腸菌 lipopolysaccharide (LPS)で刺激し、産生されたTNF- α の量をELISA法で測定することにより、TLR2ならびにTLR4の機能として評価した。NK活性はPBMCとK562細胞を3種のE/T比で反応させ、細胞外に放出された乳酸脱水素酵素をCytotox96キットで測定し、得られた3点の%細胞障害毒性活性をグラフ上にプロットし、その傾きにより評価した。なお、本研究は北海道大学大学院歯学研究科・歯学部倫理審査委員会の承認のもとで行った。

本研究の被験者では、55歳未満の口腔カンジダ症患者は非常に少なく、55歳未満の年齢層では非カンジダ症との比較解析ができなかった。そこで、我々は、まず非カンジダ症群の各年齢層【25-34歳(n=21), 35-44歳(n=9), 45-54歳(n=11), 55-64歳(n=15) 65-74歳(n=11), 75歳-(n=8)】において加齢に伴いTLR1, TLR2, TLR4およびTLR6の発現レベルと機能ならびにNK活性が変動するかどうかを検証した。その結果、加齢に伴い、これらの4種のTLRの発現レベルが減少することはなかったが、TLR2とTLR4の機能は有意に低下し、有意差はないもののNK活性は加齢と共に減弱する傾向を示した。次に、55歳以上の年齢層で、口腔カンジダ症群(n=34)と非カンジダ症群(n=34)との比較・解析を行った。その結果、4種のTLRの発現レベルには有意な差はみられなかったが、TLR2とTLR4の機能ならびにNK活性は非カンジダ症群に比べて口腔カンジダ症群で有意に減弱していた。

以上の結果から、非カンジダ症群では、加齢によりTLR2ならびにTLR4の機能の有意な減弱、ならびにNK活性の低下傾向が起こるが、口腔カンジダ症群では同年代の非カンジダ症群よりもさらにTLR2ならびにTLR4の機能およびNK活性が減弱していることがわかった。すなわち、口腔カンジダ症の発症には、主にTLR2およびTLR4の機能ならびにNK活性の減弱が関与している可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 川 善 政
副 査 教 授 柴 田 健一郎
副 査 教 授 進 藤 正 信

学 位 論 文 題 名

口腔カンジダ症と加齢におけるToll-like receptors の発現 ・機能ならびにNK活性

審査は、審査担当者全員の出席の下に行われた。まず申請者に提出論文の概要の説明を求め、次いで口頭試問形式で提出論文の内容及び関連分野について試問した。申請者は論文の概要を以下のように説明した。

近年、医療の高度化に伴って様々な基礎疾患を抱え、免疫力が低下した易感染宿主の日和見感染症が増加している。このような日和見感染症として、口腔領域では口腔カンジダ症が注目されている。以前より、口腔カンジダ症は基礎疾患や薬剤等による全身的な免疫機構に異常のあるヒトに高頻度で発症すること、また、加齢に伴いその発症率が高くなることが報告されている。しかしながら、糖尿病、エイズ、自己免疫疾患、腫瘍等の既往歴のないヒト、また、抗菌薬や免疫抑制剤を投与されていないヒトにも口腔カンジダ症は発症しているが、そのような口腔カンジダ症の発症にどのような免疫能の異常・低下が関わっているかについては殆ど明らかにされていない。そこで、本研究では、ヒト末梢血単核球(PBMC)における Toll-like receptor (TLR)の発現と機能ならびに Natural killer (NK)活性の加齢変化と口腔カンジダ症との関連性について検証した。

口腔粘膜の疼痛や味覚障害などを主訴に北海道大学病院歯科診療センターを受診した 25 歳から 89 歳までの口腔疾患患者ならびに同年代の北海道大学歯学部学生および教員のボランティアに対し、本研究目的について十分に説明を行ったうえで同意を得られたものを対象とした。ただし、糖尿病、エイズ、自己免疫疾患、腫瘍等の既往歴のあるヒト、また、抗菌薬や免疫抑制剤を投与されているヒトは対象より除外した。口腔粘膜の疼痛や味覚障害などの口腔内症状の訴えがあり、さらにカンジダ培養検査で 1 平板当たり 10 個以上のコロニーが形成された場合に口腔カンジダ症と判定とした。PBMC はヘパリン採血管で被験者より末梢血 20 ml を採血し、フィコール・パック密度勾配法で分離・調製した。TLR2 とその補助セレプターである TLR1 と TLR6 , ならびに TLR4 の発現量はそれぞれの特異抗体を用いてフローサイトメトリーで測定した。TLR2 ならびに TLR4 の機能は PBMC を TLR2 リガンド FSL-1 あるいは TLR4 リガンド大腸菌

LPS で刺激し、産生された TNF- α を ELISA 法で測定し、その産生量で評価した。NK 活性は PBMC と K562 細胞を 3 種の E/T 比で反応させ、細胞外に放出された乳酸脱水素酵素を Cytotox96 キットで測定し、得られた 3 点の %細胞障害毒性活性をグラフ上にプロットし、その傾きにより評価した。

本研究の被験者では、55 歳未満の口腔カンジダ症患者は非常に少なく、55 歳未満の年齢層では非カンジダ症群との比較解析ができなかった。そこで、我々は、まず非カンジダ症群の各年齢層において加齢に伴い TLR1, TLR2, TLR4 および TLR6 の発現レベルと機能ならびに NK 活性が変動するかどうかを検証した。その結果、加齢に伴い、これらの 4 種の TLR の発現レベルが減少することはなかったが、TLR2 と TLR4 の機能は有意に低下し、有意差はないものの NK 活性は加齢と共に減弱する傾向を示した。次に、55 歳以上の年齢層で、口腔カンジダ症群と非カンジダ症群との比較・解析を行った。その結果、4 種の TLR の発現レベルには有意な差はみられなかったが、TLR2 と TLR4 の機能ならびに NK 活性は非カンジダ症群に比べて口腔カンジダ症群で有意に減弱していた。

以上の結果から、非カンジダ症群では、加齢により TLR2 ならびに TLR4 の機能の有意な減弱、ならびに NK 活性の低下傾向が起こるが、口腔カンジダ症群では同年代の非カンジダ症群よりもさらに TLR2 ならびに TLR4 の機能および NK 活性が減弱していることがわかった。すなわち、口腔カンジダ症の発症には、主に TLR2 および TLR4 の機能ならびに NK 活性の減弱が関与している可能性が示唆された。

続いて、審査担当者から本研究およびその関連事項について質問がなされた。主な質問内容は、以下の通りであった。

- 1) これまで報告されている全身的な防御機構の異常と口腔カンジダ症について
- 2) TLR が自然免疫系と獲得免疫系の橋渡しをする理由
- 3) 微生物の認識と食食シグナルのクロストークについて
- 4) TLR の発現量測定の原理について
- 5) TLR の機能が TNF- α の産生で評価できる理由
- 6) フローサイトメーターでどのような細胞群にゲートをかけたか
- 7) NK 細胞の機能について：正常細胞を傷害しない理由
- 8) 本研究の今後の展望について

以上の質問に対して申請者から適切かつ明快な回答が得られた。審査担当者との質疑応答をとおして、申請者が本研究ならびに関連分野に対する理解が十分なされており、幅広い知識を有していることが明らかになり、本研究のさらなる発展・今後の研究が期待された。

以上のことから、審査委員は全員、本研究が学位論文として十分値し、申請者が歯学博士の学位を授与される資格を有するものと認めた。