

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	病態制御科学領域 感染生体防御学教育研究分野 氏名 藤 巍
<p>(論文題目)</p> <p><b>Heat Shock Protein SSA1 Enriched in Hypoxic Secretome of <i>Candida albicans</i> Exerts an Immunomodulatory Effect via Regulating Macrophage Function</b></p> <p>(低酸素条件で <i>Candida albicans</i> のセクレトームに豊富に含まれる熱ショックタンパク質 SSA1 がマクロファージの機能制御を介して免疫調節効果を発揮する)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p><b>【緒言】</b></p> <p><i>Candida albicans</i> はヒトと共生する酵母であり、口腔カンジダ症や膣カンジダ症などの表在性感染症から生命を脅かす全身性感染症を引き起こす可能性がある。他の微生物と同様に、<i>C. albicans</i> は、secretome と呼ばれる多様な分子群を分泌する。Secretome のタンパク質群については、宿主の様々な生物学的プロセスに影響を与えることが報告されてきた。<i>C. albicans</i> は酸素濃度 2% から 8% の低酸素環境を示すヒトの消化管に常在する微生物叢に含まれるため、低酸素環境への適応能力は、その生存と病原性にとって重要と考えられる。本研究では、低酸素環境下で放出される <i>C. albicans</i> の secretome が宿主の免疫調節にどのように関与しているか明らかにすることを目的とした。この中で熱ショックタンパク質 SSA1 (Ssa1) が低酸素下の secretome で増加することを見出し、さらにこのタンパク質の免疫調節作用について検討した。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>正常および低酸素条件下で培養した <i>C. albicans</i> の secretome (normal secretome; NS および hypoxic secretome; HS) を超遠心分離法により採取した。液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) により、NS と HS の定量的プロテオーム解析を行い、タンパク質プロファイルの差異を解析した。リコンビナント Ssa1 は pET15b 発現プラスミドおよび大腸菌を用いて作製した。NS、HS および/または Ssa1 が宿主免疫応答に及ぼす影響についてはマウスマクロファージ RAW264.7 細胞、マウス脾細胞および骨髄由来マクロファージ (BMMs) を用いて解析した。細胞のサイトカイン産生は ELISA で定量し、細胞生存率は WST-1 細胞増殖試薬で評価した。さらに Ssa1 処理および非処理 BMMs の定量的プロテオーム解析を LC-MS/MS により行い、Ssa1 処理後のタンパク質プロファイルの変化を解析した。変化がみられたタンパク質の機能を GO および KEGG パスウェイのエンリッチメント解析で推定した。マクロファージ関連遺伝子の発現は qRT-PCR で定量した。また、BMMs による <i>C. albicans</i> の取り込みにおける Ssa1 の機能について検討するため、CRISPR-Cas9 ゲノム編集により <i>C. albicans</i> の Ssa1 欠損変異体 (<i>Ssa1<sup>-</sup></i>) を構築した。この <i>Ssa1<sup>-</sup></i> を Ssa1 処理 BMMs に感染させ、BMMs への取り込みを評価した。</p> <p><b>【結果】</b></p> <p>NS と HS の比較において、RAW264.7 細胞では HS が IL-10 および IL-6 の産生を有意に強く刺激し、マウス脾細胞でも HS が IL-10、IL-6 および TNF-<math>\alpha</math> の産生を有意に強く刺激した。HS と NS のプロテオミクス解析では、HS の 17 種類のタンパク質が NS に比べ有意に増加していた。パスウェイエンリッチメント解析の結果、熱ショックタンパク質 Ssa1 が宿主の免疫応答に関与していることが示唆された。このことから、<i>C. albicans</i> は低</p>	

酸素環境下で Ssa1 を放出し宿主の免疫応答を調節することが推察された。これを検証するためリコンビナント Ssa1 を作製し BMMs に作用させた結果、Ssa1 は BMMs の増殖を亢進し、IL-10、IL-6、TNF- $\alpha$  の産生を有意に強く刺激した。さらにプロテオーム解析と qRT-PCR により、Ssa1 が M2b マクロファージマーカーの CD86、CD274 および TNFSF14 の産生を刺激し、マクロファージの M2b 様表現型への分化を促進した。また、Ssa1 で処理した BMMs のプロテオーム解析から、Ssa1 は炎症関連因子 (IL-18-binding protein, IL-1 receptor antagonist protein, OX-2 membrane glycoprotein および cis-aconitate decarboxylase) を減少させ、抗炎症反応に関与するタンパク質 (CMRF35-like molecule 3 および macrophage colony-stimulating factor 1 receptor) を増強することが明らかになった。加えて *C. albicans* 感染に対する Ssa1 の効果についても検討した結果、Ssa1 は BMMs による *C. albicans* の取り込みを有意に減少させた。

#### 【考察・結論】

本研究は、*C. albicans* が正常酸素条件下と低酸素条件下で放出する secretome でのサイトカイン刺激およびタンパク質組成の違いを初めて示した。特に、低酸素条件下の secretome に多く含まれる Ssa1 は、M2b 様マクロファージの分化と炎症反応を調節し、マウス BMMs の *C. albicans* 排除能力を低下させた。これらの結果は、*C. albicans* が低酸素環境下でのストレス耐性と生存優位性を高めるため、プロテオームプロファイルを変化させることを示唆している。本研究で得られたこれらの知見は、*C. albicans* の細胞間コミュニケーションや疾患メカニズムの解明や治療法の開発に寄与すると考えられる。