

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19098

研究課題名(和文) 肺真菌症における新規PAMPsの病態における意義と活性化メカニズムの検討

研究課題名(英文) Involvement and activation mechanism of novel PAMPs in lung mycoses

研究代表者

石橋 健一 (Ishibashi, Ken-ichi)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20453805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：-1,3-グルカンは、病原真菌であるアスペルギルス細胞壁の主要構成成分の一つである。本研究では、アスペルギルス細胞壁 -1,3-グルカン (ASAG, AspAG) を調製し、免疫学的活性を調べた。AspAGはin vivoおよび vitroにおいて炎症性サイトカイン産生を用量依存的に誘導した。ヒト血清中に抗ASAG抗体が検出された。アスペルギルス細胞壁 -1,3-グルカンは、アスペルギルス関連感染症の病態において重要な分子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Aspergillus is a medically important fungal genus that can cause a life-threatening infection called aspergillosis in immunocompromised patients. The -1,3-glucan is the one of main components of Aspergillus cell wall. However, the immunological activity of -1,3-glucan is not fully characterized. In this study, we prepared soluble and insoluble Aspergillus cell wall -1,3-glucan and examined the immunological activity. The Aspergillus cell wall insoluble and soluble -1,3-glucan (AspAG and ASAG) was prepared from acetone-dried mycelium. AspAG induced inflammatory cytokine production in a dose-dependent manner, but ASAG did not in vitro. AspAG induced inflammatory response such as increased vascular permeability and priming effect to PAMPs in vivo. Anti-ASAG antibody was detected in the serum of each human volunteer. From these findings, Aspergillus cell wall -1,3-glucan is important molecule in the pathology of Aspergillus related infectious diseases.

研究分野：感染免疫学

キーワード：病原真菌 アスペルギルス PAMPs 感染防御

1. 研究開始当初の背景

(1) アスペルギルス属による感染症は増加しており、剖検時における深在性真菌症の原因菌で第一位となっている。生体は感染微生物表面の分子パターン (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) を認識し、応答する。アスペルギルス細胞壁グルカンは、 α -1,3-グルカン (AG) と BG から構成されている。AG も主要構成成分であるにも関わらず、病原性または病態との関連性について明らかではなく、PAMPs としての意義づけは明確ではない。

(2) AG は、クリプトコックスや輸入真菌症であるヒストプラズマ、パラコクシジオオイデスの細胞壁構成成分として知られているが、それらの検討も十分されていない。

2. 研究の目的

α -1,3-グルカンをアスペルギルスの引き起こす病態における新たな PAMPs として意義づけを明確にする。

(1) アスペルギルス AG の免疫細胞への作用、病態誘発作用の検討：

AG の免疫細胞への作用、in vivo でのマウスモデルを用いた検討、血中抗体価を検討する。これらの結果から AG のアスペルギルスが引き起こす病態への関与を明らかにする。

(2) アスペルギルス AG の活性発現メカニズムの解明：

AG の活性発現がどのように起こるのかについて、どのような細胞群に作用し、どのような活性化が起こるのか明らかにする。さらに AG 認識分子を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) アスペルギルス AG の調製と物性の確認

アスペルギルス菌体 (*A. fumigatus* NBRC33022 IUMS 標準株) から、これまでに確立した調製法により、不溶性並びに可溶性アスペルギルス AG を調製する。得られた AG の精製度及び構造的な特徴について、元素分析、GLC を用いた糖組成解析、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、により化学的に解析する。菌種間での物性、構造の違いについても、比較検討する。

(2) アスペルギルス AG の免疫細胞活性化の検討

アスペルギルス AG をヒト PBMC 並びにマウス免疫細胞培養系へ添加し、白血球活性化作用について検討する。炎症性サイトカイン、アレルギー関連サイトカインについて ELISA 法にて測定する。対照として、 α -グルカン、LPS を用いる。また、アスペルギルス AG は不溶性、可溶性を用い、物性の生物活性への影響について比較検討する。マウス系統差につ

いても検討を行う。

(3) 血清における抗アスペルギルス AG 抗体価の検討

可溶性アスペルギルス AG を用い、ELISA による測定条件 (固相化、希釈倍率) を確立する。また、ヒト健常人血清、グロブリン製剤、マウス血清中の抗体価 (IgM, IgG, IgA) について検討する。

4. 研究成果

(1) アスペルギルス AG の調製と物性の確認

A. fumigatus NBRC33022 を YPD 培地で 5 日間培養し、脱脂乾燥菌体を得た。これを NaClO 溶液に懸濁し 1 夜酸化し、次亜塩素酸酸化菌体 OX-Asp を得た。この OX-Asp を 8M Urea に懸濁し、121 °C 20min 処理した。この反応液を遠心分離し、上清と沈殿に分けた。沈殿画分を DMSO に懸濁し、超音波処理によって可溶化し、*Aspergillus* 細胞壁 α -1,3-glucan を得た。これを糖組成分析したところ、主要構成糖はグルコースであり、元素分析したところ、窒素含量は 0.5% であった。また 1D および 2D-NMR 解析も行ったところ、 α -1,3-glucan を主要構成成分とすること事が明らかとなった。

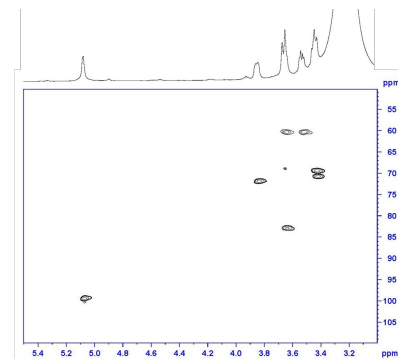


Fig. 1 ^1H , ^{13}C -HSQC spectra of AspAG in DMSO- d_6

次に調製した *Aspergillus* 細胞壁 α -1,3-glucan の可溶化を検討した。酸及びアルカリによる可溶化を検討したところ、酸が最も高い可溶化率を示した。加えて、どのような条件で反応させると適切なのかについても検討した。至適条件であることを明らかにした。酸処理後は中和、透析を行い、試料を凍結乾燥し、可溶性 *Aspergillus* 細胞壁 α -1,3-glucan を得た。この分子量をサイズ排除クロマトグラフィーにより検討したところ、平均分子量 6000 だった。

(2) マウス脾臓細胞におけるアスペルギルス AG の生物活性

調製した不溶性と可溶性の *Aspergillus* 細胞壁 α -1,3-glucan (以後 AspAG と ASAG とする) の生物活性を検討した。系統の異なるマウス (C57/BL, DBA/2, Balb/c, C3H/HeN) の

脾臓細胞にこれらを刺激物として添加し、48h 培養した。この培養上清中のサイトカイン産生の測定を試みた。最初に各系統マウスの炎症性 (TNF- α) 及び抗炎症性 (IL-10) サイトカイン産生の測定を行った。AspAG が用量依存的に TNF- α を誘発したが、ASAG は多くにおいて誘発しなかった。また、AspAG と ASAG のどちらにおいても IL-10 の産生誘発は殆どみられなかった。ただ、C57BL/6 に関しては、AspAG で顕著に誘発されていた。次に各系統マウスの Th1/Th2 活性化について IL-4 を測定し、検討した。AspAG と ASAG のどちらにおいても、IL-4 の産生誘発はみられなかった。

(3) ヒトおよびマウス白血球におけるアスペルギルス AG の生物活性

Aspergillus 細胞壁 -1,3-glucan をマウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞および J774.1 細胞の in vitro 培養系で刺激し、上清中の TNF- α 産生を検討した。J774.1 細胞では産生が認められたが、RAW264.7 細胞では産生が認められなかった。さらにヒト単球細胞株である HL-60 細胞および THP-1 細胞における IL-8 産生を検討した。HL-60 で濃度依存的 IL-8 の産生誘導が認められた。Aspergillus 細胞壁 -1,3-glucan は、ヒト及びマウス白血球に認識され、炎症性サイトカイン産生誘導を引き起こすことが示された。

(4) アスペルギルス AG の in vivo における生物活性

Aspergillus 細胞壁 -1,3-glucan を尾静脈内投与し、末梢血白血球数並びに血清 TNF- α 産生の比較検討を行ったところ、投与後 6h において、末梢血白血球数が増加した。投与後、24h 後において、血清 TNF- α 産生量の上昇が認められた。侵襲性アスペルギルス症では、血中に -1,3-glucan, galactomannan などの抗原が検出される。Aspergillus 細胞壁 -1,3-glucan を腹腔内投与し、30 分後の血管透過性を検討したところ、透過性の亢進が認められた。今研究では、-1,3-glucan も侵襲性アスペルギルス症において炎症反応に関与している可能性が考えられた。

(5) アスペルギルス AG 気管内投与マウスにおける炎症反応の検討

Aspergillus 細胞壁 -1,3-glucan を気管内投与し、肺胞洗浄液中の白血球数並びに炎症サイトカイン産生の比較検討を行ったところ、肺胞中の白血球数の増加、TNF- α 、IL-6 産生の上昇が認められた。

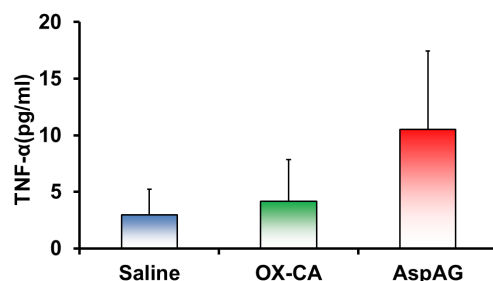


Fig.2 TNF- α production in BALF of ICR mice administrated with AspAG

(6) 抗アスペルギルス AG 抗体価測定法の確立および力価の検討

Aspergillus 菌体から調製された可溶性 -1,3-glucan (ASAG) を用い、ELISA 法で抗体価を測定することができ、反応性は濃度依存的に上昇を示した。ヒト血清中の抗体によって認識され、反応性は濃度依存性を示した。抗 ASAG 抗体の反応性は ASBG および dextran の存在によって阻害されなかった。抗体の中でも ASAG に対する反応性はアイソタイプの中でも IgG 抗体、それも IgG2 が最も高力価を示したアイソタイプであった。ヒト免疫製剤を用いた場合は抗 ASAG 抗体の反応性は抗 ASBG 抗体よりも低い結果を示したが、健康人の血清を用いた場合、抗 ASAG 抗体の反応性が抗 ASBG 抗体より高い例が存在した。従って、抗 ASAG 抗体の反応性には個人差が見られ、ASAG 特異的抗体の存在が示唆された。動物血清を用いた検討により、抗 ASAG 抗体はヒト以外にも存在することが示唆された。従って、抗 ASAG 抗体は遺伝的要因以外の要因の影響も受けている可能性が示唆された。

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 8 件)

水上亜友美, 石橋健一, 山中大輔, 安達禎之, 大野尚仁, Aspergillus 細胞壁 -1,3-グルカン抗体の反応性, 第 59 回日本医真菌学会総会・学術集会, 2015 年 10 月 9 日~10 日, ホテル さっぽろ文芸館 (北海道・札幌)

石橋健一, 西村祐亮, 水上亜友美, 柳井千穂, 山中大輔, 安達禎之, 大野尚仁, アスペルギルス細胞壁 -1,3-グルカンの調製と生物活性の検討, 第 89 回日本細菌学会総会, 2016 年 3 月 23 日~25 日, 大阪国際センター (大阪府・大阪市)

西村祐亮, 石橋健一, 柳井千穂, 山中大輔, 安達禎之, 大野尚仁, アスペルギル

ス細胞壁 -1,3-グルカンの精製とその物性及び生物活性の検討, 日本薬学会第136 年会, 2016年3月26日~29日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 西村祐亮, 石橋健一, 柳井千穂, 山中大輔, 安達禎之, 大野尚仁, Aspergillus 細胞壁不溶性及び可溶性 -1,3-glucan の調製と生物活性, 第37回関東医真菌懇話会, 2016年6月18日, 京王プラザホテル(東京都・新宿区) 西村祐亮, 石橋健一, 山中大輔, 安達禎之, 大野尚仁, Aspergillus 細胞壁不溶性及び可溶性 -1,3-glucan の刺激によるサイトカイン産生の検討, 第60回日本医真菌学会総会・学術集会, 2016年10月1日~2日, 東京都立産業貿易センター台東館(東京都・台東区) 佐藤恵理子, 石橋健一, 山中大輔, 安達禎之, 大野尚仁, Aspergillus 細胞壁 -1,3-glucan の白血球活性化作用の検討, 日本薬学会第137 年会, 2017年3月24日~27日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市) 中嶋唯, 石橋健一, 山中大輔, 安達禎之, 大野尚仁, Aspergillus 細胞壁 -1,3-glucan 投与マウスの炎症反応誘発作用の検討, 日本薬学会第137 年会, 2017年3月24日~27日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市) Ken-ichi Ishibashi, Yusuke Nishimura, Ayumi Mizukami, Chiho Yanai, Daisuke Yamanaka, Yoshiyuki Adachi, Naohito Ohno, Preparation and immunological characterization of Aspergillus -1,3-glucan, BSI/ NVVI congress 2016, 2016年12月6日~9日, Liverpool, UK

〔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

石橋 健一 (ISHIBASHI, Ken-ichi)
東京薬科大学・薬学部・講師
研究者番号: 20453805

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()