

令和元年6月3日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09925

研究課題名（和文）ABPM患者気道真菌叢（mycobiota）多様性と病態との関連

研究課題名（英文）Mycobiota in the airways of allergic bronchopulmonary mycosis

研究代表者

浅野 浩一郎（ASANO, Koichiro）

東海大学・医学部・教授

研究者番号：60192944

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：アレルギー性気管支肺真菌症例から分離した真菌計102株を遺伝子解析により同定し、*Aspergillus*属以外に真正担子菌や黒色真菌を検出した。網羅的に気道真菌叢を評価するため、気管支粘液栓から抽出したDNAを用いて真菌特異的ITS 1領域遺伝子をPCR増幅し、次世代シーケンサーを用いて評価するシステムを構築した。

*A. fumigatus*はヒト好酸球のCD11bやSykを介してextracellular trap cell deathを誘導することを明らかにした。この際に放出されるextracellular trapはDNaseによって溶解できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー性気管支肺真菌症の診断において、培養法による真菌の検出は用いられる培地・培養温度・培養期間に大きく影響されることもあり、しかも培養至適条件が真菌によって異なるため気道内に腐生している真菌の全体像を検出できず、信頼性に乏しかった。今回の研究によって気道の真菌叢解析が可能となった。

さらに*A. fumigatus*により好酸球のextracellular trap cell deathが直接誘導されることを明らかにし、粘稠な粘液栓が形成される機序の一部が明らかとなると共に、DNaseを用いた治療法の可能性が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：A total of 102 fungal strains isolated from clinical cases with allergic bronchopulmonary mycosis were identified by genetic analysis. In addition to *Aspergillus* spp., Basidiomycetes and black fungi were detected. We have established a system to evaluate airway mycobiome using PCR amplification of fungus-specific ITS1 region gene and next-generation sequencing.

*A. fumigatus* has been shown to induce extracellular trap cell death via CD11b and Syk in human eosinophils. Released extracellular traps could be dissolved with DNase.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：アレルギー性気管支肺真菌症 真菌 マイクロバイーム 好酸球

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

アレルギー性気管支肺真菌症（ABPM）は、気道内真菌に対する免疫・アレルギー応答により発症する重症アレルギー性気道疾患である。副腎皮質ステロイド薬や抗真菌薬の長期間にわたる全身投与を必要とし、再発を繰り返して肺の線維化から呼吸不全に至る。

しかし、ABPMに関する知見は環境真菌相や背景疾患の異なる海外のものがほとんどで、本邦での体系的検討は行われていなかったことから、申請者は平成25年度より厚生労働科学研究補助金（平成27年度は日本医療研究開発機構研究費）のもとに「アレルギー性気管支肺真菌症の診断・治療指針確立のための調査研究」班（以下、ABPM研究班）を組織し、本邦初のABPM全国調査等を実施した。

上記研究を行ってきた中で浮かび上がったのが ABPM における臨床像と原因真菌の多様性である。臨床像については、378 例の ABPM 症例の臨床データをもとにクラスター解析を行ったところ、発症年齢、喘息の合併率、血清 IgE 値、末梢血好酸球数、再燃頻度などが異なる 3 つの表現型が見いだされた。一方、真菌についても ABPM 研究班の真菌バンクに登録された臨床検体由来の真菌には空中浮遊真菌として一般的な *Aspergillus* 属や *Penicillium* 属に加え、様々な黒色真菌や真正担子菌（いわゆるキノコ類）が含まれていた。ただし培養法による真菌の検出率は用いられる培地・培養温度・培養期間に大きく影響され、しかも培養至適条件が真菌によって異なるため、気道内に腐生している真菌の全体像を検出できなかった可能性が高い。事実、臨床的には ABPM と診断されたにも関わらず、原因真菌を同定できなかった症例が半数以上存在した。

原因真菌によって生体応答が異なることは、申請者らの過去の検討からも示唆されている。この研究では複数の真菌粗抽出物を用いて気道上皮細胞を刺激し、DNA マイクロアレイ法で検討したが、真菌種によって発現遺伝子は大きく異なっていた。但し、この研究では市販されている標準粗抗原を用いており、臨床分離株を用いた検討が求められていた。

### 2. 研究の目的

(1) ABPM 患者における気道真菌叢（mycobiota）の実態を明らかにする。  
ランダム DNA バーコードを導入した PCR と次世代シーケンサを用いた気道真菌叢解析法を確立し、ABPM 患者の喀痰・気管支洗浄液での検討を行う。

(2) 気道真菌叢と ABPM の臨床像や病態生理との関連を明らかにする。  
ABPM 研究班でバンク化した患者由来の真菌を利用し、真菌種による免疫細胞（好酸球、自然リンパ球など）応答や動物モデルで生ずる気道炎症病態の違いを検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサを用いた気道真菌叢解析

喀痰、気管支洗浄液などの臨床検体から DNA を抽出後、rRNA 遺伝子の internal transcribed spacers (ITS) large subunit の D1、D2 領域を PCR 増幅し、次世代シーケンサとパイオインフォマティクス解析を用いて真菌叢全体を同時解析する。次世代シーケンサは東海大学医学部生命科学統合支援センターの IonPGM または MiSeq を用い、パイオインフォマティクス解析は連携研究者の今西教授らが開発した 15,800 種以上の生物のゲノム配列を収集したデータベース GenomeSync を用いる。

(2) 気道内真菌叢と気道免疫応答との関連

（自然アレルギー性気道炎症、グループ 2 自然リンパ球（ILC2）活性化に及ぼす影響）

真菌は気道において強力かつ多様な免疫応答を引き起こす。申請者は *A. fumigatus* の粗抽出物をマウス気道内に投与することで、投与後 4 日をピークとする Th2 サイトカイン（IL-5、IL-13）の産生亢進と好酸球性気道炎症、気道上皮杯細胞化生をきたす自然アレルギー性気道炎症モデルを作成した。しかし、同じ *A. fumigatus* であっても同様の反応をおこさない菌株も存在する。さらにこの *Aspergillus* 属を用いたモデルは、*Alternaria* 属の粗抽出物を用いたモデルとは異なり、ILC2 の活性化を伴わない。ABPM 研究班で真菌バンク登録済みの 30 種以上の臨床分離真菌株とその粗抽出物を用いて、好酸球や ILC2 活性化（細胞増殖、サイトカイン産生）能を比較検討する。

### 4. 研究成果

ABPA/ABPM 症例から分離した真菌計 102 株をバンク化した。菌種を遺伝子解析により同定したところ、*Aspergillus* 属 38 株、真正担子菌 31 株、*Penicillium* 属 16 株、黒色真菌 7 株が主要な分離菌であった。*Aspergillus* 属の内、*A. fumigatus* 21 株、*A. niger* とその関連種が 8 株であった。真正担子菌の内訳は *Trametes* 属と *Bjerkandera* 属（6 株ずつ）、*Phanerochaete* 属（5 株）、スエヒロタケ（4 株）の 4 菌群が多かった。

より網羅的に気道真菌叢を評価することを目指すため、18S rRNA 遺伝子と 5.8S rRNA 遺伝子に挟まれた internal transcribed spacer 1 (ITS 1) 領域をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅し、次世代シーケンサーを用いて気道分泌物中の真菌を評価するシステムを構築した。ABPM 9 例および好酸球性副鼻腔炎 2 例について解析し、ABPM のうち 4 例からは *A. fumigatus* が主に検出され、1 例では *A. lentulus* と真正担子菌 *Hypsizygus marmoratus* が検

出された。一方、培養で *A. fumigatus* が検出されたにも関わらず次世代シーケンサー解析では真正担子菌 *Trametes* 属が優勢 (84%) で検出された症例があった。

*A. fumigatus* に対するヒト好酸球の反応を *in vitro* で検討した。この結果、好酸球は細胞表面の CD11b や細胞内の Syk を介して extracellular trap cell death (ETosis) に至り、extracellular traps を放出して *A. fumigatus* を捕捉することが明らかになった。Extracellular traps は DNase によって消失することも確認された。また、好酸球 ETosis は種々の殺菌作用を有する蛋白を放出するが、*A. fumigatus* はこれらに耐性を有していた。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

浅野浩一郎 アレルギー性気管支肺真菌症のバイオマーカー **アレルギー・免疫** 26(1): 36-40, 2019、査読なし

K. Watai, Y. Fukutomi, C. Mistui, H. Hayashi, K. Sekiya, Y. Kamide, K. Asano, M. Taniguchi De novo sensitization to *Aspergillus fumigatus* in adult asthma over a 10-year observation period. **Allergy** 73(12):2385-2388, 2018、査読有

S. Ueki, A. Hebisawa, M. Kitani, K. Asano, J. S. Neves. Allergic bronchopulmonary aspergillosis – A luminal hypereosinophilic disease with extracellular trap cell death. **Front Immunol** 9: 2346, 2018、査読有

K. Asano, K. Kamei, A. Hebisawa. Allergic bronchopulmonary mycosis – pathophysiology, histology, diagnosis, and treatment. **Asia Pac Allergy** 8(3):e24, 2018、査読有

K. Harada, T. Oguma, A. Saito, Y. Fukutomi, J. Tanaka, K. Tomomatsu, M. Taniguchi, K. Asano. Concordance between *Aspergillus*-specific precipitating antibody and IgG in allergic bronchopulmonary aspergillosis. **Allergol Int** 67: S12-S17, 2018、査読有

V. S. Muniz, J. C. Silva, Y. A. V. Braga, R. C. N. Melo, S. Ueki, M. Takeda, A. Hebisawa, K. Asano, R. T. Figueiredo, J. S. Neves. Eosinophils release extracellular DNA traps in response to *Aspergillus fumigatus*. **J Allergy Clin Immunol** 141: 571-585.e7, 2018、査読有

T. Oguma, M. Taniguchi, T. Shimoda, K. Kamei, H. Matsuse, A. Hebisawa, N. Takayanagi, S. Konno, K. Fukunaga, K. Harada, J. Tanaka, K. Tomomatsu, K. Asano. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in Japan: a nationwide survey. **Allergol Int** 67: 79-84, 2018、査読有

M. Matsusaka, K. Fukunaga, H. Kabata, K. Izuhara, K. Asano, T. Betsuyaku. Clinical Communication. Sub-phenotypes of type 2 severe asthma in adults. **J Allergy Clin Immunol: In Practice** 6:274-276, 2018、査読有

浅野浩一郎 アレルギー性気管支肺真菌症の新知見 **呼吸 eレポート** 2(2):59-66, 2018、査読なし

K. Masaki, K. Fukunaga, M. Matsusaka, H. Kabata, T. Tanosaki, T. Mochimaru, T. Kamatani, K. Ohtsuka, R. Baba, S. Ueda, Y. Suzuki, F. Sakamaki, Y. Oyamada, T. Inoue, T. Oguma, K. Sayama, H. Koh, M. Nakamura, A. Umeda, K. Kamei, K. Izuhara, K. Asano, and T. Betsuyaku. Characteristics of moderate to severe asthma with fungal sensitization. **Ann Allergy Asthma Immunol** 119:253-257, 2017、査読有

S. Mitsuhashi, K. Kryukov, S. Nakagawa, J. Takeuchi, Yo. Shiraishi, K. Asano, T. Imanishi. A portable system for rapid bacterial composition analysis using a nanopore-based sequencer and laptop computer. **Sci Rep** 7(1):5657, 2017、査読有

[学会発表](計 8 件)

浅野浩一郎 アレルギー性気管支肺真菌症を正しく診断するために 口頭発表(教育講演) 第 59 回日本呼吸器学会学術講演会, 2019. 4. 14, 東京

浅野浩一郎 環境真菌とアレルギー性気道疾患、口頭発表(教育講演) 日本職業・環境アレルギー学会、2018. 7、横浜

T. Oguma, J. Tanaka, K. Harada, K. Tomomatsu, K. Asano, and Japan ABPM research program. Three distinct clinical phenotypes of allergic bronchopulmonary aspergillosis identified by cluster analysis. ATS2018 Annual meeting of American Thoracic Society、ポスター、2018. 5. 20 San Diego, USA

K. Asano, A. Hebisawa, N. Takayanagi, M. Taniguchi, Y. Nakamura, T. Ishiguro, J.

Suzuki, J. Tanaka, K. Watai, Y. Fukutomi, T. Oguma, and Japan ABPM research program. Clinical Diagnostic Criteria for Allergic Bronchopulmonary Mycosis. ATS2018 Annual meeting of American Thoracic Society、ポスター、2018. 5. 20 San Diego, USA

T. Oguma, J. Tanaka, K. Harada, K. Tomomatsu, K. Asano, and Japan ABPM research program. Three distinct clinical phenotypes of allergic bronchopulmonary aspergillosis identified by cluster analysis. 8th Advances Against Aspergillosis. ポスター、2018. 2. 1, Lisbon, Portugal

K. Asano, A. Hebisawa, N. Takayanagi, Y. Nakamura, T. Ishiguro, J. Suzuki, J. Tanaka, T. Oguma, and Japan ABPM research program. Clinical Diagnostic Criteria for Allergic Bronchopulmonary Mycosis. 8th Advances Against Aspergillosis. 口頭発表、2018. 2. 1, Lisbon, Portugal

K Asano, Clinical characteristics of allergic bronchopulmonary mycosis/aspergillosis in Japan. 口頭発表( シンポジウム ), East Asia Allergy Symposium 2017. 2017.6.16, Tokyo  
浅野浩一郎 真菌と気道アレルギー 口頭発表( 特別講演 ) 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会 2017. 4. 23 東京

〔図書〕(計 2 件)

浅野浩一郎 アレルギー性気管支肺真菌症( ABPM ) p340-342 呼吸器疾患 最新の治療 2019-2020 門田淳一、弦間昭彦、西岡安彦編集、南江堂、2019.4

浅野浩一郎、蛇澤晶 アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 p173-177 呼吸器疾患 Clinical-Radiological-Pathological アプローチ 藤田次郎、大拙祐治編集、南江堂、2017

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：白石良樹

ローマ字氏名：SHIRAISHI, Yoshiki