

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K15193

研究課題名(和文)真菌感染症におけるヒトC型レクチン受容体の役割の解明

研究課題名(英文)The role of human C-type lectin receptors in antifungal immunity

研究代表者

米川 晶子(YONEKAWA, AKIKO)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30792915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト末梢血由来の単核細胞におけるDectin-2の応答を評価し、マウスDectin-2の機能との類似性が示唆された。新たな遺伝子変異に関する報告からも、ヒトDectin-2はカンジダ症の感染防御において重要な役割を担う可能性が考えられた。さらに、ムーコル症に着目し、自施設症例について後方視的に臨床的特徴を検討した。高度の免疫不全因子の存在下で肺型の発症例が多く、予後は極めて不良であった。当該症例の臨床分離株を用いて、ムーコルと相互作用する宿主受容体を分析した。引き続きムーコルの機能的受容体の探索を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医療の高度化を背景として免疫抑制因子の存在下にある宿主は増加傾向である一方、免疫不全患者における侵襲性真菌症は依然として予後不良疾患で、診療戦略の発展が望まれる。ヒトDectin-2は、深在性カンジダ症をはじめとした真菌症において、臨床応用が期待される合理的な標的となる可能性がある。また、特に難治で致死率の高いムーコル症においても、宿主受容体を介した抗真菌免疫応答を解明することは、新規治療介入の開発の基礎につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The immune response by human Dectin-2 was evaluated in mononuclear cells derived from human peripheral blood. The results suggested that human Dectin-2 had the functional similarities to mouse Dectin-2. Considering a recent study on gene mutation, human Dectin-2 may play an important role in the protection against Candida infections. Furthermore, we focused on mucormycosis, and retrospectively analyzed the clinical characteristics of cases with mucormycosis at our institution. In many cases, lungs were involved under severe immunocompromised conditions and the prognosis was very poor. With the use of these clinical isolates, interactions of Mucorales with host receptors were assessed. We are continuing to search for functional receptors for Mucorales.

研究分野：感染症学

キーワード：抗真菌免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医療の複雑化、高度化を背景にして、深在性真菌症は増加傾向にある。特に、免疫不全患者における侵襲性真菌症は、未だ予後不良の疾患であり、その制御は臨床上大きな課題である。真菌に対する宿主の免疫応答において重要な役割を担っているパターン認識受容体として、C型レクチン受容体ファミリーが知られている。そのうち Dectin-2(Dendritic cell-associated C-type lectin-2)は、これまでの主にマウス Dectin-2 (*Clec4n*)を用いた研究成果により、*Candida* や *Malassezia* 等の真菌の細胞壁を構成する糖鎖を認識して、宿主の免疫応答を誘導し、真菌に対する感染防御に重要な役割を果たすことが示されている¹⁾。さらに我々は、結核菌を含む一部の *Mycobacteria* を認識し、免疫応答を誘導することを報告した²⁾。一方で、カンジダ症の感受性と関連したヒト Dectin-2 の遺伝子変異は報告されておらず、ヒト Dectin-2(*CLEC6A*)の機能は十分には解明されていなかった。Dectin-2 の下流のシグナル伝達分子である CARD9 の遺伝子変異をもつ家系では、重症の皮膚粘膜カンジダ症を含む侵襲性真菌症を発症することが報告されており³⁾、Dectin-2-Syk-CARD9 経路が、ヒトにおいても *Candida* に対する感染防御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

また、近年、増加傾向にあるムーコル症/接合菌症は、高度な免疫不全状態を背景に発症し、急速な経過を辿るが、有用な血清マーカーもなく、早期診断が一層困難で、極めて予後不良である。病型の特徴として、造血器悪性腫瘍患者では肺型、コントロール不良の糖尿病患者では脳型が多いとされるが、詳細な病態は解明されていない。全身性の抗真菌薬投与に加え、感染組織の外科的切除が望ましいが、背景疾患に伴う状況から外科的介入困難例も多く、新たな治療戦略の開発が急務である。そのなかで、ムーコル目真菌/接合菌と宿主の特異的受容体の相互作用及び免疫応答に関する研究は非常に限られていた。

2. 研究の目的

真菌感染症の臨床診療の質の向上、予後の改善を最終的な目標にして、最多の真菌症であるカンジダ症や、真菌症の中でも特に早期診断困難かつ難治であるムーコル症に注目し、抗真菌免疫に重要な役割を果たす C 型レクチン受容体を中心に、ヒト抗真菌免疫応答を解明することを目的とした。そこで本研究では、1) カンジダ感染防御におけるヒト Dectin-2 役割を明らかにするために、カンジダ属真菌に対するヒト Dectin-2 の応答を解析する。また、2) 接合菌に対する宿主の免疫応答解明を目指して、ムーコル症の臨床的特徴を分析し、接合菌の機能的な宿主受容体の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト Dectin-2 の *Candida* に対する応答を評価するために、ヒト免疫細胞を加熱殺菌された *Candida albicans*、またはマウス Dectin-2 のリガンドである α -mannan で刺激し、24 時間後、上清を回収し、サイトカイン濃度を enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)および multiplex assay により分析した。*In vitro* の解析には、健康成人ボランティアから血液を採取し、密度勾配遠心分離によって分離・回収した末梢血単核細胞(PBMC)、さらに PBMC からネガティブセレクションで単離した CD14+CD16-単球を用いた。Dectin-2 の寄与を評価するため、ヒト Dectin-2 中和抗体を用いた。

(2) 接合菌に対する宿主の免疫応答の解明を目指して、当施設において、2013 年 4 月～2024 年 1 月に、培養検査で接合菌が検出され、ムーコル症と診断された症例を対象とした。診療録情報より、患者背景、診断・治療の実態、検出菌種、予後に関する情報を後方視的に収集し、その特徴を分析した。さらに、当該症例の臨床分離株の凍結検体を、培養後、発育した生菌を回収した。加熱による死滅処理を行ない、これらを用いて細胞株を刺激した。

4. 研究成果

(1) PBMC を加熱殺菌された *Candida albicans* で刺激すると、炎症性サイトカインの産生が誘導された。抗 Dectin-2 抗体はサイトカイン産生を阻止できず、他のレクチンが関与している可能性が示唆された。続いて、PBMC から単球を単離し、抗ヒト Dectin-2 モノクローナル抗体で染色し、フローサイトメトリーにより Dectin-2 の発現を検出した。ヒト単球は、 α -mannan に応答して TNF- α を産生し、抗 Dectin-2 抗体処理によりサイトカイン産生は減少した。

これまでヒトにおいては、小児の造血器悪性腫瘍患者におけるアスペルギルス症に対する関連する感受性遺伝子変異として、イントロン変異 (*CLEC6A* rs12099687)⁴⁾、また、non-HIV 患者における肺クリプトコックス症との遺伝的関連として、5' 隣接領域に位置する一塩基多型 (rs11045418)⁵⁾が報告されていたが、Dectin-2 の機能への影響は不明であった。最近、新たに、侵襲性アスペルギルス症患者において、Dectin-2 の exon 6 にホモ接合性欠失変異(507delC)が同定され、これによりフレームシフト(N170I)と未成熟終止が引き起され、*Aspergillus fumigatus* 及び *Candida albicans* に対する防御能が低下することが示された⁶⁾。

以上から、Dectin-2 は、ヒトにおいても抗真菌免疫に重要な役割を果たしていることが示唆された。CARD-9 や Dectin-2 のような、真菌症の感受性変異を特定できれば、免疫不全患者の中でも特にハイリスク患者を標的とした、個別化された予防管理につながる可能性がある。その一方で、ヒトではマウスでの報告とは異なり、Dectin-2 と MCL のヘテロ二量体の形成は認めず、種間の差異が示された⁷⁾。実際の感染時の宿主内の真菌の細胞壁構造は動的であり、さらに、CLR は感染制御において、個々に作用するだけでなく、協調して作用し効果的な免疫応答を誘導していると考えられる¹⁾。ヒトにおいても単独の受容体に関する *in vitro* のデータの蓄積は進んでいるが、今後は、複合体形成と誘起される機能的な違いに関する検討も必要であると考えられる。

(2) 当施設にて該当期間に培養陽性により診断されたムーコル症の症例は 11 例であった。患者の年齢中央値は 54 歳、男女比は男性:女性 5:6、基礎疾患は、造血器悪性腫瘍、AML 非寛解期移植を含む造血幹細胞移植後、GVHD (移植片対宿主病) 併発、肝臓移植後、膠原病疾患、糖尿病であった。免疫抑制療法として、副腎皮質ステロイド(パルス療法含む)、カルシニューリン阻害剤、cyclophosphamide、azathioprin などの投与歴や、細胞障害性化学療法施行歴、背景疾患の治療過程で重度の好中球減少症(既往を含む)を有した。分離菌は、*Cunninghamella spp.*、*Mucor spp.*、*Rhizomucor spp.*、*Rhizopus spp.*であった。罹患臓器は、肺が最多の 8 例(72.7%)であり、その他、口腔粘膜、副鼻腔(いずれも眼窩・脳への波及はなし)、皮膚であり、2 臓器以上にわたる播種性感染は 2 例であった。肺の重複感染病原菌として、ムコイド型 *Pseudomonas aeruginosa*、*Aspergillus terreus*、非結核性抗酸菌がみられた。主に抗真菌薬 L-AMB で治療され、全身状態不良に加えて急速な経過から外科的介入は困難な例がほとんどで、7 例は感染コントロール不良にて死亡した。研究期間中に、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の世界的大流行が発生し、2021 年初頭から COVID-19 関連のムーコル症の報告が増加し注目されている⁸⁾。当施設では、本邦での COVID-19 流行当初から重症例を含む COVID-19 患者の入院診療を行い、約 1,300 例の診療実績があるが、これまで COVID-19 関連ムーコル症は経験しなかった。

一部の真菌類は、共通して、グルカン、高マンノース構造、キチンを有している。C 型レクチン受容体ファミリーは広範囲の真菌種を認識することから、接合菌の構造・組成に関する研究は少ないが、接合菌の感知に関わる受容体の有力な候補ではないか考えた。前述の症例のうち 10 症例の臨床分離株について、加熱殺菌処理を行なった菌体を用いて、様々な受容体を発現させたレポーター細胞株を刺激し、活性化をモニタリングしたが、接合菌の機能的な受容体候補の同定には至らなかった。今後、菌体から溶媒抽出により、活性成分の分画化を行う。文献的には、*Rhizopus delemar* は、胞子外皮タンパク質 CotH3 と鼻上皮細胞上のグルコース調節タンパク質 78 (GRP78) の相互作用を介して、鼻上皮細胞に侵入して損傷すること、対照的に、肺胞上皮細胞では、真菌 CotH7 は受容体としてインテグリン $\alpha 3\beta 1$ を認識し、上皮成長因子受容体 (EGFR) の活性化を引き起こし、宿主細胞の侵入を引き起こすことが報告された⁹⁾。ここでも、両臓器において、*R. delemar* の宿主細胞への接着や侵入の相互作用には、両経路以外の他の宿主受容体や真菌リガンドが関与している可能性が示唆されており、機能的な受容体の探索を続ける。

今後研究を進展させ、宿主受容体と接合菌リガンドの免疫応答を明らかにすることは、極めて致死性の高いムーコル症に対する新規治療介入の開発の基礎につながる可能性があると考えられる。

< 引用文献 >

- 1) Reis E Sousa C, Yamasaki S, Brown GD. Myeloid C-type lectin receptors in innate immune recognition. *Immunity*. 2024;57(4):700-717.
- 2) Yonekawa A, Saijo S, Hoshino Y, Miyake Y, Ishikawa E, Suzukawa M, Inoue H, Tanaka M, Yoneyama M, Oh-Hora M, Akashi K, Yamasaki S. Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria. *Immunity*. 2014;41(3):402-413.
- 3) Glocker EO, Hennigs A, Nabavi M, Schäffer AA, Woellner C, Salzer U, Pfeifer D, Veelken H, Warnatz K, Tahami F, Jamal S, Manguiat A, Rezaei N, Amirzargar AA, Plebani A, Hanneschläger N, Gross O, Ruland J, Grimbacher B. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *N Engl J Med*. 2009;361(18):1727-35.
- 4) Skonieczna K, Styczyński J, Krenska A, Stawiński P, Płoski R, Derwich K, Badowska W, Wysocki M, Grzybowski T. Massively parallel targeted resequencing reveals novel genetic variants associated with aspergillosis in paediatric patients with haematological malignancies. *Pol J Pathol*. 2017;68(3):210-217.
- 5) Hu XP, Wang RY, Wang X, Cao YH, Chen YQ, Zhao HZ, Wu JQ, Weng XH, Gao XH, Sun RH, Zhu LP. Dectin-2 polymorphism associated with pulmonary cryptococcosis in HIV-uninfected Chinese patients. *Med Mycol*. 2015;53(8):810-6.
- 6) Griffiths JS, White PL, Czubala MA, Simonazzi E, Bruno M, Thompson A, Rizkallah PJ, Gurney M, da Fonseca DM, Naglik JR, Ingram W, Wilson K, van de Veerdonk FL, Barnes R, Taylor PR, Orr SJ. A Human Dectin-2 Deficiency Associated With Invasive Aspergillosis. *J Infect Dis*. 2021 13;224(7):1219-1224.
- 7) Blankson V, Lobato-Pascual A, Saether PC, Fossum S, Dissen E, Daws MR. Human macrophage C-type lectin forms a heteromeric receptor complex with Mincle but not Dectin-2. *Scand J Immunol*.

2022;95(5):e13149.

- 8) Hoenigl M, Seidel D, Carvalho A, Rudramurthy SM, Arastehfar A, Gangneux JP, Nasir N, Bonifaz A, Araiza J, Klimko N, Serris A, Lagrou K, Meis JF, Cornely OA, Perfect JR, White PL, Chakrabarti A; ECMM and ISHAM collaborators. The emergence of COVID-19 associated mucormycosis: a review of cases from 18 countries. *Lancet Microbe*. 2022;3(7):e543-e552.
- 9) Alqarihi A, Gebremariam T, Gu Y, Swidergall M, Alkhazraji S, Soliman SSM, Bruno VM, Edwards JE Jr, Filler SG, Uppuluri P, Ibrahim AS. GRP78 and Integrins Play Different Roles in Host Cell Invasion during Mucormycosis. *mBio*. 2020;11(3):e01087-20.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------