

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16176

研究課題名(和文)皮下空洞菌球留置による慢性アスペルギルス症マウスモデルの開発

研究課題名(英文)Development of a mouse model of chronic aspergillosis by air-filled subcutaneous cavity fungus ball implantation.

研究代表者

田代 将人(Tashiro, Masato)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：20713457

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):研究代表者は2018年から科研費に採択された課題により、世界初となるアスペルギローマの病態を再現した動物モデルの開発に挑み、成功した(アスペルギローマモデル非ヒト動物 出願番号特願2019-157354)。具体的には、菌球破碎液の腹腔内投与を週2回4週間継続し、前感作を成立させ、生菌と死菌から構成される人工的な菌球を試験管内で作成し、人工的に作成したマウス背部の皮下空洞に菌球を留置することで、アスペルギローマモデルマウスを作成した。本モデルは1ヶ月後にはヒトで観察されるアスペルギローマと同様の病理像が再現され、さらに実際の人の臨床像と同様に3ヶ月以上に渡り菌球が維持される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本モデルにより、アスペルギルスの菌体の排除にはマクロファージが主要な役割を果たしていることを見出した。さらに、アスペルギローマ表層で菌体を排除しているマクロファージは多くが泡沫化しており、その機能が低下していることが示唆され、マクロファージの泡沫化がアスペルギローマ難治化の原因である可能性が示唆された。最終年度の研究では、事前感作なしで死菌のみで構成される菌球を留置した場合でも、類似の現象の再現が確認できた。革新的な本モデルの確立により、病態の解明に伴う新たな治療ターゲットの発見や、動物モデルを用いた診断および治療研究が可能となり、新たな治療戦略の開発に必要な基礎研究の大幅な進展が見込まれる。

研究成果の概要(英文):The principal investigator has successfully attempted to develop the world's first animal model that reproduces the pathogenesis of Aspergilloma (Aspergilloma model non-human animal Application No. Patent Application 2019-157354) through a proposal adopted by the Grant-in-Aid for Scientific Research since 2018. Specifically, an aspergilloma model mouse was created by intraperitoneal administration of fungus ball crushing solution twice a week for 4 weeks to establish preimmunity, creating artificial fungus balls consisting of viable and dead cells in vitro, and implanting the fungus balls in the air-filled subcutaneous cavity of the back of the artificially created mouse. This model reproduced a pathological picture similar to that of aspergilloma observed in humans after one month, and furthermore, the fungus ball was maintained for more than three months, similar to the clinical picture in actual humans.

研究分野：感染症学

キーワード：アスペルギルス症 アスペルギローマ 動物モデル 病態

1. 研究開始当初の背景

(1) 代表的な難治性感染症である慢性アスペルギルス症

アスペルギルス属による深在性真菌症であるアスペルギルス症は、侵襲性アスペルギルス症、慢性アスペルギルス症、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症の3つの病型に区別することができる。この中でも慢性アスペルギルス症は、未だに明確な治療戦略が確立しておらず、5年生存率も50%と予後不良であり、現代の代表的な難治性感染症の1つとなっている。我々は今までに、患者から得られた臨床検体におけるアスペルギルス属の臨床的意義および解釈を明らかにし、慢性アスペルギルス症の病態を詳細に解析することで「慢性進行性肺アスペルギルス症」という新たな疾患概念を提唱し、既存の分類方法では臨床的な区別が困難であることを証明するなど、慢性アスペルギルス症の治療戦略の改善に向け様々な試みを行ってきた。我々はこれらの成果を元にした治療戦略を海外に向け発信し、本邦では各種ガイドラインに我々の成果が反映され、臨床現場へ一定の貢献を果たしてきた。さらに近年、我々は慢性アスペルギルス症の合併疾患としての肺非結核性抗酸菌症の重要性を明らかとした。肺非結核性抗酸菌症は今も増加傾向にあり、続発する慢性アスペルギルス症の増加が予想される。

(2) 薬剤耐性アスペルギルスの増加

近年、薬剤耐性アスペルギルスの増加が危惧されている。慢性アスペルギルス症は長期の抗真菌薬治療を要するため、その治療経過中に起こるアスペルギルスの薬剤耐性化が懸念される。研究代表者は本邦における薬剤耐性 *Aspergillus fumigatus* の実態を初めて疫学的に明らかとし、長期の抗真菌薬投与により患者体内で *A. fumigatus* が耐性化した症例を初めて発見するだけでなく、その耐性機序は標的蛋白 CYP51A の G54 変異にあることを見出した。加えて、抗真菌薬の投与期間と患者から分離される *A. fumigatus* の薬剤耐性化に相関関係が存在することを初めて明らかとし、抗真菌薬の長期投与が耐性化を誘導することを証明した。さらに、我々は現在、特定の輸入農産物を介して海外の環境由来の薬剤耐性 *A. fumigatus* が本邦に流入していることを発見している。このように、薬剤耐性アスペルギルスが世界的な拡がりを見せる中、抗真菌薬による従来の治療法に依存しない新たな治療戦略の開発は世界的な喫緊の検討課題である。

(3) 限られた治療の選択肢と未解明の病態

アスペルギルス症の治療に使用される主要な抗真菌薬は、ポリエン系、アゾール系、エキノキサンチン系の3クラスに限られている。それぞれ異なる作用機序を示すが、安全性に優れ、高い有効性を示す薬剤は少ない。また慢性アスペルギルス症で使用される経口薬はアゾール系抗真菌薬のみに限られている。新たな抗真菌薬の開発は他の全ての抗微生物薬と同様に滞っており、ここ数年の間に新たな抗真菌薬の実用化は望めない状況にある。そこで研究代表者は視点を変えて、放射性同位体を用いた新たな治療戦略の開発を試みた。この一連の基礎的研究の中で、アスペルギルス症の診断における肺血流 SPECT (single photon emission computed tomography) の有用性を明らかとすることができた。本研究成果を元に、さらに臨床研究へとすすめ実用化を目指す予定である。このように、新たな治療戦略の開発のためには多方面からのアプローチが必要である。そのアプローチ法を検討する上で必須なものは病態の詳細な理解に他ならないが、慢性アスペルギルス症の病態解析は進んでおらず、新たな治療戦略を考えるための基礎的情報が圧倒的に不足しているのが現状である。

(4) 慢性アスペルギルス症の基礎研究が進展しない理由

慢性アスペルギルス症の病態の解析が進展していない原因は基礎研究が行われていないためであり、その理由は病態の複雑な成立過程にある。慢性アスペルギルス症は破壊された肺や副鼻腔といった物理的空洞を基礎として発症とする。すなわち臨床症例は、空洞の形成と菌球の形成の2段階を踏んでおり、年単位の長い年月をかけて病態が形成されている。基礎研究のモデルも同様の期間をかけて作成することは不可能ではないが、効率のとはいえず、実験結果の再現性確認や科学的な検討は困難である。このように慢性アスペルギルス症の病態を再現している適切なモデルの欠如が、基礎研究の進展を阻む最大の要因となっている。

(5) 慢性アスペルギルス症動物モデルの必要性

慢性アスペルギルス症のモデルには、大別して試験管内モデルと動物モデルが考えられる。我々は試験管内モデルの開発も取り組んでおり、空洞内の嫌気環境が病態の形成に重要な役割を果たしていることを明らかとした。しかし、菌体と生体の長期相互作用を再現するためには試験管内モデルでは限界があり、動物モデルの確立が必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、生体内の物理的な空洞内に菌球が存在し、生体と菌球の長期相互作用を再現する動物モデルを確立すること、および同モデルを用いて慢性アスペルギルス症の病態を解明することを目的とする。

アスペルギルス属は糸状真菌であり、分生子（無性孢子）と菌糸の2つの形態をとる。分生子の継続暴露による動物モデルはアレルギー疾患の研究領域で既に確立しているが、菌糸が生体内で長期存在する動物モデルは確立していない。に示すように、分生子と菌糸は細胞表面の構造や抗原性が大きく異なり、免疫学的な反応が著しく異なることはよく知られた事実である。すなわち、本研究により確立する動物モデルは全く新しい現象を再現することになり、新規動物モデルを作成する学術的独自性および創造性のみならず、その発展性においても大きな期待が持てる研究と言える。具体的には、病態の解明に伴う新たな治療ターゲットの発見や、動物モデルを用いた診断や治療研究が可能となり、本モデルの確立に成功すれば、新たな治療戦略の開発に必要な基礎研究の大幅な進展が見込まれる。

3. 研究の方法

初年度は、マウスの皮下空洞の作成手技の確立および、皮下空洞内の菌球の維持について検討を行った。マウスの皮下空洞は人為的に皮下に空気を注入して作成した。しかし、時間経過と共に空洞内の空気は吸収されていき、空洞の維持が困難となったため、3Dプリンターで作成した人工構造物を留置することで空洞を維持することを試みたが、人工構造物そのものによる侵襲が大きく、皮膚の切開創の治癒にも支障をきたしたため、断続的に空気を注入することで空洞を維持する方法へ切り替えた。液体培地内で作成した *A. fumigatus* の菌塊を皮下空洞に直接留置したところ、健常マウスであっても予想に反して著明な組織侵襲を示すことが明らかとなった。よって、空洞内で菌球が組織に侵襲することなく長期間維持されながら増殖していくためには、「空洞」以外の要素について探索しなければならないことが判明した。まずは宿主側の因子として、慢性の病態ではアスペルギルスに対する IgG が陽性となっており、このような液性免疫が侵襲の抑制に重要な役割を持つと仮説を立てた。そこで、菌球をホモジナイズした菌液を定期的にマウスに腹腔内投与することでマウスを感作し、沈降抗体が陽性となることを確認して菌球を留置した。組織侵襲の程度は軽減したものの、それでも組織侵襲は残存した。そこで、今度は菌体側の因子を検討していることとした。

2年目は、事前に *A. fumigatus* 菌糸破砕液の腹腔内投与により行いマウスを免疫し、*A. fumigatus* の死菌と生菌で構成された菌球を人工的に作成し、マウスの皮下空洞内に留置し、観察を行った。3ヶ月後に皮下空洞に残存していた菌球を病理学的に評価すると、菌球は組織に侵襲することなく、菌球表面には生菌に対する殺菌反応を示す好中球を認め、空洞壁側には異物に対する貪食、免疫反応を示すマクロファージ、慢性炎症反応を示すリンパ球の浸潤を認めた。本研究により、単純性肺アスペルギローマの病理学的特徴の実験的再現に成功し、3ヶ月以上の持続感染を世界で初めて動物モデルで再現した。本研究の成果で現在特許出願中である（発明の名称 アスペルギローマモデル非ヒト動物 出願番号特願 2019-157354 出願日令和元年8月29日）。

3年目は、本モデルの病理学的解析を進め、アスペルギルスの菌体の排除にはマクロファージが主要な役割を果たしていることを見出した。さらに、アスペルギローマ表層で菌体を排除しているマクロファージは多くが泡沫化しており、その機能が低下していることが示唆され、マクロファージの泡沫化がアスペルギローマ難治化の原因である可能性が示唆された。

最終年度では、事前感作なしで死菌のみで構成される菌球を留置した場合でも、類似の現象の再現が確認できた。

4. 研究成果

肺や副鼻腔など体内の空洞に形成されるアスペルギローマを特徴とした慢性アスペルギルス症の病態や治療戦略については基礎的検討が不足していた。研究代表者は2018年から科研費に採択された課題により、世界初となるアスペルギローマの病態を再現した動物モデルの開発に挑み、成功した。革新的な本モデルの確立により、病態の解明に伴う新たな治療ターゲットの発見や、動物モデルを用いた診断および治療研究が可能となり、新たな治療戦略の開発に必要な基礎研究の大幅な進展が見込まれている。来年度以降もさらに本研究を発展させていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田代将人
2. 発表標題 アスペルギルス症の未来と課題
3. 学会等名 第89回感染症学会西日本地方会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田代将人
2. 発表標題 アスペルギルス症の最新の話題～基礎から臨床まで～
3. 学会等名 第5回難治性呼吸器感染症マネジメント研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田代将人
2. 発表標題 皮下空洞菌球留置による慢性アスペルギルス症モデルマウスの開発
3. 学会等名 第63回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田代将人
2. 発表標題 慢性肺アスペルギルス症の臨床的特徴
3. 学会等名 第94回日本結核病学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 アスペルギローマモデル非ヒト動物	発明者 田代将人、泉川公一、中野裕一郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019 157354	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------