

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08967

研究課題名（和文）アスペルギルス感染におけるアレルゲン探索とアレルギー応答の解析

研究課題名（英文）Allergen search and analysis of allergic responses in Aspergillus infection

研究代表者

高塚 翔吾（Takatsuka, Shogo）

国立感染症研究所・真菌部・主任研究官

研究者番号：90609398

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では独自にスクリーニングしたアスペルギルスの分泌タンパク質を解析し、肺アスペルギルス症に係る病原性因子を特定した。さらに標的抗原Y69の抗体を作製してアレルギー性気管支肺アスペルギルス症（ABPA）におけるY69の機能を明らかにした。具体的にはY69を欠損させたアスペルギルスフミガーツス株は肺内での菌糸生育が著しく低下し、マウスの致死率が有意に低下した。またABPA誘導マウスにおいてY69は肺内のT細胞を積極的に活性化させることでIL-17A産生を誘導し、ABPAを重篤化させるメカニズムが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、環境中を漂うアスペルギルスを吸引することによって引き起こされる様々なアスペルギルス症が問題となっている。しかしながら気管支肺アスペルギルス症をはじめとしてアスペルギルス症を重篤化させる因子に関しては未解明な点が多い。特にタンパク質性の病原因子はほとんど明らかになっていないため、本研究課題では主にタンパク質性の病原因子を探索するスクリーニング法を採用し解析を進め、その機能を明らかにした。また独自のDNA免疫法を使用して標的抗原Y69に対するモノクローナル抗体を作製した。今後の解析結果次第となるが本研究課題で開発した抗体は将来的に抗体医薬や検査薬等への応用も見込めるものとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we analyzed secreted proteins of *Aspergillus fumigatus* screened independently and identified virulence factors related to pulmonary aspergillosis. We also generated antibodies against the target antigen Y69 to clarify the function of Y69 in allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). Specifically, we found that *Aspergillus fumigatus* strains lacking Y69 showed robustly reduced hyphal growth in the lungs and significantly reduced lethality in mice. In ABPA-induced mice, Y69 also induced IL-17A production by actively activating T cells in the lungs, which revealed a mechanism of ABPA-induced severity.

研究分野：感染免疫学

キーワード：Aspergillus ABPA 炎症 抗体 アレルギー アレルゲン IgE IPA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真菌は環境中のいたるところに存在し、私たちの生活の中でもその発酵の能力を応用してきた歴史がある一方で、日本の病院で亡くなる患者の 20 人に 1 人は真菌による感染症によって命を落としている。中でも近年アスペルギルスを紹介した真菌症による死因が最も高くなっており、アスペルギルス症の重症化メカニズムの解明が急務となっている。アスペルギルス症は幼児、免疫不全の患者においてその罹患率が高いが、宿主の免疫系が正常に働いていても気管支肺アスペルギルス症 (allergic bronchopulmonary aspergillosis : ABPA) という形で喘息様の気道閉塞をもたらす。この ABPA は治療が遅れた場合や再燃を繰り返した場合に肺の繊維化や気管支拡張症が進行し、不可逆的に肺機能が低下することで慢性呼吸不全に陥り、致命的になり得る。そのため、新規診断法や重症化につながる免疫応答メカニズムの解明が求められており、独自の標的抗原のスクリーニング技術や抗体作製技術を応用して、これらの課題にアプローチすることが可能であると考えた。

2. 研究の目的

これまで独自に進めてきたアスペルギルスの抗原スクリーニングや、独自開発した抗体作製技術、*in vitro*における B 細胞培養法、マウスにおける感染実験等を用いて ABPA を含めた肺アスペルギルス症の新規診断法や重症化につながる免疫応答メカニズムの解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肺アスペルギルス症モデルにおける抗原スクリーニングと病原性解析

Signal Sequence Trap (SST)法を用いて、YPD 寒天平板上で培養されたアスペルギルス フミガーツス由来の分泌タンパク質抗原の発現を解析し、全 110 遺伝子を抽出した。さらに SST 法で抽出された全遺伝子について、実際のマウスの感染肺内でアスペルギルス フミガーツスが発現しているかどうかを定量 RT-PCR で評価した。これらの評価系から抽出された標的抗原 Y69 について遺伝子欠損株とその遺伝子相補株を作製し、肺アスペルギルス症モデルにおける病原性の変化を評価した。

(2) DNA 免疫法を用いた抗体作製と宿主内での標的抗原の発現解析

(1)のスクリーニングにおいて見出された標的抗原 Y69 に対するモノクローナル抗体を作製するため、独自開発した DNA 免疫法 (Takatsuka et al, *Nature Immunology* 2018 19: 1025-1034, Takatsuka et al, *Medical Mycology Journal* 2019;60:11-16, Takatsuka et al, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2011 63: 250)を用いた。C57BL/6 マウスを用いて標的抗原 Y69 をコードするプラスミドを免疫 (0, 1, 3, 4 週目) し、9 週目に追加免疫を行った後、72 時間後に PEG 法によるハイブリドーマ作製作業を行い、3 クローンのモノクローナル抗体を樹立した。さらにこれらの抗体を使用して肺アスペルギルス症マウスモデルにおける肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar Lavage Fluid : BALF) 中の Y69 抗原の検出を試みた。

(3) ABPA モデルにおける標的抗原の機能解析

当初、標的遺伝子の欠損株の培養上清や BALF を B 細胞培養系に添加して IgE 型の B 細胞の誘導率を解析したいと考えていた。しかし、アスペルギルスフミガーツスにはアレルゲンとなりうる

機能分子が複数存在しているため、特定の遺伝子欠損株の培養上清や BALF を用いた評価系では IgE 型 B 細胞の誘導率に明確な差異が認められなかった。そのため、標的抗原遺伝子欠損株を用いた ABPA モデルから得られた BALF をマルチプレックス ELISA に供して網羅的に解析し、ABPA の重症化に係る炎症性サイトカインやケモカインを中心に解析した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① まず肺アスペルギルス症マウスモデルの感染 4 日目の肺を用意し、肺内のアスペルギルス フミガーツスを含めた感染肺の cDNA ライブラリを作製した。この感染肺の cDNA ライブラリについて SST 法で抽出された全 110 遺伝子の発現を定量 RT-PCR で評価したところ、24 遺伝子の発現が認められた。さらに肺内は微好気環境であるため、微好気チャンバーで微好気状態 (0.2% O₂, Hypoxia) を再現してアスペルギルス フミガーツスの培養を行ない、酸素正常状態 (21% O₂, Normoxia) で培養したアスペルギルス フミガーツスと 24 遺伝子について発現上昇率を比較した (図 1)。図 1 のように微好気状態において発現上昇率が最も高かった遺伝子は抗原コード Y22 であり、発現の上昇率が 1.0 を超える抗原コード Y18B55 までの上位 15 遺伝子を標的抗原候補として遺伝子欠損株を作製した。

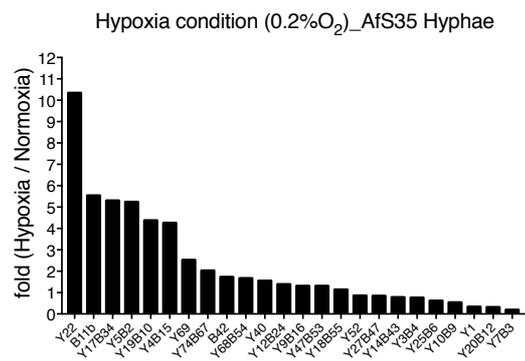


図 1. 微好気環境で発現上昇する遺伝子の評価

② 微好気環境において発現上昇の認められた全 15 遺伝子において、肺アスペルギルス症マウスモデルの系でその病原性を評価した。結果として、15 遺伝子の中で Y69 を欠損させたアスペルギルス フミガーツス株 (Δ Y69) においてのみ、生存率が有意に回復し、病原性の低下が認められた。また Δ Y69 に Y69 遺伝子を戻した Y69 相補株では野生型株 (Afs35) と同様に致死的となったため、Y69 遺伝子が病原因子として関わっていることが示唆された (図 2)。加えて感染後 4 日目の肺の病理切片を観察したところ、 Δ Y69 感染群は野生型群および Y69 相補群と比較して肺内での菌糸生育が著しく抑制されており肺内菌量もわずかであった。さらにこの Y69 に関して独自の DNA 免疫法を用いてモノクローナル抗体を作製した。このモノクローナル抗体 (クローン名: SYST) を使用して病理解析と同じ感染後 4 日目の肺のホモジネート中に Y69 が存在していることが見出された。

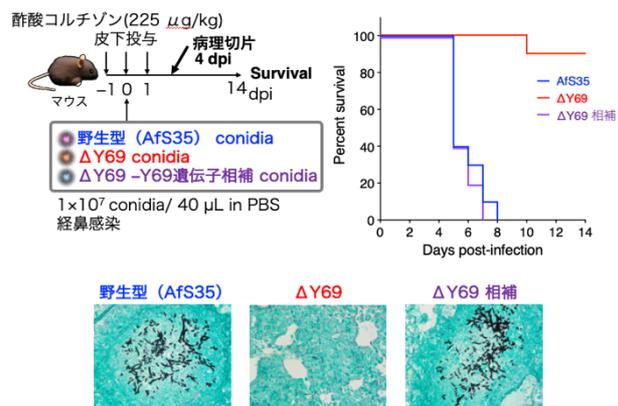


図 2. Y69 欠損アスペルギルスを用いた生存率の推移と病理解析

③ 抗原コード Y69 は肺内における生育環境において病原性に関わることが示唆されたことから、次に ABPA マウスモデルを用いて肺内の炎症性サイトカインをマルチプレックス ELISA で評価した。図 2 と同様に Δ Y69 に加えて Y69 相補株も含めて ABPA モデルに供したところ、 Δ Y69 の最終感染から 1 日後の BALF 中の炎症性サイトカインの中では IL-17A が低値を示していた (図 3)。その他 IL-6 についても、ある程度の低下を認めたが、アレルギー応答において中心的な役割を果たす IL-4 に関しては変化を認めなかった。

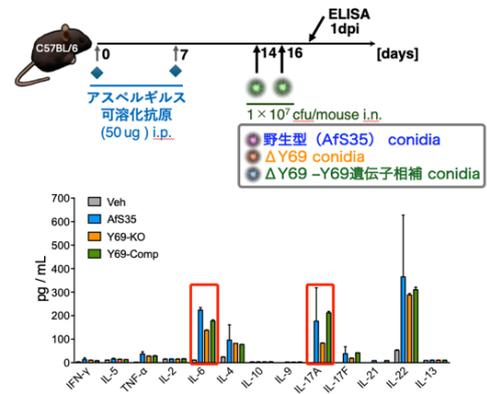


図 3. BALF 中の炎症性サイトカインの評価

④ ABPA マウスモデルにおける Y69 の機能として、IL-17A 産生を上昇させる可能性が示唆されたため、肺内の IL-17A 産生細胞の候補として調べた細胞群の中で T 細胞集団に変化が認められた。主に $CD4^+$ T 細胞の集団において $CD44^+$ となる活性化型の集団の割合が Δ Y69 感染群で有意に低下しており、Y69 相補群では野生型群と同様に $CD44^+$ となる活性化型の $CD4^+$ T 細胞集団の割合が回復していた (図 4)。また $CD8^+$ T 細胞においても $CD4^+$ T 細胞と同様の結果が得られており、IL-17A 産生細胞は主に T 細胞集団の中に存在する可能性が示唆された。

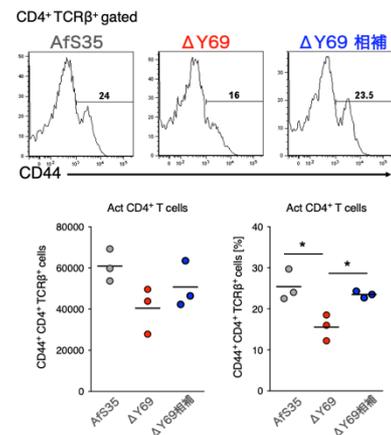


図 3. 肺内の $CD4^+$ T 細胞の評価

(2) 得られた成果の国内外における位置付けとインパクト

これまでアスペルギルス由来の病原性物質として見出されてきたものは化合物がほとんどであり、分泌型のタンパク質抗原による病原性を示した報告はない。病原因子も定義が広く基準が曖昧な部分が多いが今回見出された抗原コード Y69 は初めてのタンパク質性の病原因子としての報告になる可能性がある。そして、今回の特異的抗体の開発によって直接的に in vivo で Y69 が機能していることを証明できたことが重要である。Y69 の機能面においてはこれまでの結果から直接上皮細胞にアクセスして増殖を抑制している可能性が示唆されており、細胞の接着阻害や細胞周期の停止という形で機能しうることが考えられる。また Y69 はアレルギー性の疾患である ABPA においても病原性を発揮していることからこれらの上皮細胞との相互作用によって生み出されるデンジャーシグナルが $CD4^+$ T 細胞や $CD8^+$ T 細胞の分化を誘導し、肺内の IL-17A 産生を促進するものと考えられる。IL-17A は通常の喘息はもとより ABPA においても重篤化に関わる液性因子として知られており、持続的な IL-17A の活動は、気道の組織損傷を誘導し、気道のリモデリングや線維化に寄与する。Y69 が ABPA における IL-17A 産生に寄与するというのであれば機能面と表現系がリンクし、その病原性としてのインパクトは非常に高いものとなるはずである。

(3) 今後の展望

本研究課題において Y69 の病原性が初めて明らかとなり、特異的抗体 SYST の作製にも成功した。この特異的抗体 SYST を改良すれば将来的に抗真菌薬耐性のアスペルギルス症に対して抗体医薬という形で治療できる可能性がある。またアスペルギルス症は早期診断が非常に重要となる。そ

のため、免疫クロマトキット等の新規迅速診断薬への応用ができれば、早期の治療方針の決定に貢献できるかもしれない。Y69の病原性解析においては今後上皮細胞との相互作用をメカニズムの面からより深く証明する必要がある。抗Y69抗体SYSTも用いて、分子の局在等、より分子生物学的な面からY69と宿主細胞の相互作用を明らかにしたい。またABPAにおいてY69の作用によってCD4⁺T細胞がTh17細胞へ、またCD8⁺T細胞がTc17細胞へ分化誘導されるという証拠を見出すことができれば肺内のIL-17A産生がY69の影響によるものであることが強く示唆される結果となり、直接的にABPAにおける病原性への寄与を証明するものとなる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shogo Takatsuka
2. 発表標題 A Study of Host Response in post-Influenza Aspergillus superinfection
3. 学会等名 第10回感染症研究グローバルネットワークフォーラム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮澤拳, 高塚翔吾, 壇辻百合香, 犬飼達也, 梅山隆, 星野泰隆, 村長保憲, 山越智, 宮崎義継
2. 発表標題 Aspergillus fumigatusの細胞死誘導因子の機能解析
3. 学会等名 第 22 回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 篠原孝幸, 梅山隆, 高塚翔吾, 阿部雅広, 名木稔, 村長保憲, 星野泰隆, 宮崎義継
2. 発表標題 治療方針決定に必要な糸状菌感染症の診断と展望
3. 学会等名 第67回日本医真菌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮崎義継, 宮澤拳, 高塚翔吾, 村長保憲, 星野泰隆, 梅山隆
2. 発表標題 アスペルギルスの基礎研究
3. 学会等名 第97回 日本感染症学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮崎義継、高塚翔吾、山越智、宮澤拳、阿部雅広、篠原孝幸、定本聡太、名木稔、梅山隆、上野圭吾、村山そう明、村長保憲、星野泰隆、荒岡秀樹
2. 発表標題 真菌検査における新しい潮流 新規アスペルギルス症検査の開発
3. 学会等名 第66回日本医真菌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎義継、名木稔、阿部雅広、梶原俊毅、篠原孝幸、定本聡太、梅山隆、宮澤拳、高塚翔吾、上野圭吾、村山そう明、村長保憲、星野泰隆、菅井基行
2. 発表標題 深在性と表在性の真菌症原因菌を繋ぐ抗真菌薬耐性化 抗真菌薬耐性overview
3. 学会等名 第66回日本医真菌学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梅山隆、高塚翔吾、宮澤拳、星野泰隆、村長保憲、宮崎義継
2. 発表標題 アスペルギルス症の診断と治療はもう限界か 基礎医学の側面からアスペルギルス症を考える
3. 学会等名 第96回 日本感染症学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高塚翔吾、壇辻百合香、宮澤拳、犬飼達也、阿部雅広、上野圭吾、梅山隆、星野泰隆、山越智、宮崎義継
2. 発表標題 真菌と生存空間を共有する微生物から見た真菌学 インフルエンザ続発性肺アスペルギルス症モデルの宿主応答メカニズムに関する研究
3. 学会等名 第94回日本細菌学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 壇辻百合香, 星野泰隆, 阿部雅広, 名木稔, 上野圭吾, 中山靖子, 福島深雪, 越川拓郎, 橋本ゆき, 宮澤拳, 高塚翔吾, 梅山隆, 山越智, 石川淳, 宮崎義継
2. 発表標題 病原真菌の培養検査における培養条件に関する検討
3. 学会等名 第31回日本臨床微生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 壇辻百合香, 星野泰隆, 名木稔, 阿部雅広, 上野圭吾, 中山靖子, 橋本ゆき, 東祥嗣, 犬飼達也, 高塚翔吾, 梅山隆, 山越智, 宮崎義継
2. 発表標題 注意すべき糸状菌
3. 学会等名 第31回 日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高塚翔吾, 壇辻百合香, 犬飼達也, 阿部雅広, 上野圭吾, 梅山隆, 星野泰隆, 山越智, 宮崎義継
2. 発表標題 インフルエンザ続発性肺アスペルギルス症モデルの確立と宿主応答メカニズムに関する研究
3. 学会等名 第64回日本医真菌学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究課題の研究期間は国立感染症研究所においてCOVID-19に係る研究もしくは業務等を優先する必要があるため、最終年度の期限を延長して課題に取り組んだ。

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
---------	---------