

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：12501
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K07063
研究課題名（和文）病原真菌 *Aspergillus fumigatus* に対する感染防御機構の解明

研究課題名（英文）Host defense mechanisms against *Aspergillus fumigatus*

研究代表者
西城 忍 (Saijo, Shinobu)

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授

研究者番号：60396877

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：*Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*)は、真菌（カビ）の一種で環境中に常在するため、ヒトは日常的に暴露されている。しかし、*A. fumigatus*に対する宿主防御の機構はこれまで不明な部分が多くありました。そこで、本研究では、マウスモデルを用いて、糖鎖を認識する分子群であるC型レクチン受容体がどのように真菌を認識し、その後の免疫応答を誘導し、最終的に排除するまでの機構について解析した。その結果、C型レクチン受容体ファミリー分子のDectin-1が全身性アスペルギルス症に対する防御機構に不可欠であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Dectin-1は、糖鎖を認識する分子群であるC型レクチンファミリーに属する分子である。本研究では、このDectin-1が病原性真菌 *A. fumigatus* の感染防御に非常に重要な役割を果たしていることを見出した。そのメカニズムとして、Dectin-1からのシグナルがIL-15の産生を誘導しNK細胞を介して菌体を排除していることを明らかにした。この結果は、大きな社会問題となっている真菌感染症に対する新たな治療戦略へつなげる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：*Aspergillus fumigatus* is a ubiquitous, yet potentially pathogenic, mold. The immune system employs innate receptors, such as dectin-1, to recognize fungal pathogens, but the immunological networks that afford protection are poorly explored. Here, we investigated the role of dectin-1 in anti-*A. fumigatus* response in an experimental model of acute invasive aspergillosis. Mice lacking dectin-1 presented enhanced signs of inflammation, with increased production of inflammatory cytokines and neutrophil infiltration, quickly succumbing to the infection. The main effector function of dectin-1 was the preservation of the NK cell population in the kidneys by the provision of the cytokine IL-15. While the depletion of NK cells impaired host defense in wild-type mice, IL-15 administration restored antifungal responses in dectin-1 deficient mice.

研究分野：免疫学

キーワード：サイトカイン 感染免疫 真菌感染 感染防御機構

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Aspergillus fumigatus (*A. fumigatus*) は、土壌中や大気中など自然界に広く存在している真菌で、ヒトは日常的に暴露されている。健常人では、通常気道の腺毛運動による排除などにより速やかに処理されるため感染が成立することはほとんどない。一方で、高齢者やがん患者、免疫不全症患者等では感染リスクが高いことが知られている。感染すると重篤な症状を引き起こす場合もあり、侵襲性アスペルギルス症の死亡率は 30~80% に達するという疫学調査結果もありハイリスク患者の死因の一つとなっている。近年の超高齢化社会では、白血病やがんに対する治療や高度医療の発達による免疫抑制状態の患者数の増加、あるいは薬剤耐性の株の出現などにより、*A. fumigatus* による感染症は急激に深刻化している。

A. fumigatus 感染に対するリスクファクターとして、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) や結核感染など、肺が構造的に破壊され空洞が形成されるような疾患があげられる。この場合、慢性肺アスペルギルス症と呼ばれる慢性肺疾患を発症するが、*A. fumigatus* が増殖しても肺に限局されれば生命を脅かされる危険性はさほど大きくはない。しかし、なんらかの理由によって侵襲性疾患となると病態は急激に進行し深刻な病態を呈する。また、侵襲性アスペルギルス症の発症に関しては、慢性肺アスペルギルス症とは異なり、肺に原疾患のない患者や、慢性肺アスペルギルス症に罹患していない患者などが多いことから、異なるリスクファクターが存在することが示唆されてきた。しかし、侵襲性アスペルギルス症に対する感染防御機構に関して、大きな問いとして残されており、決定的な治療方法が存在していないのが現状である。そこで、本研究計画では最終的に新たな創薬の標的を見出すことを目的とし、*A. fumigatus* に対する宿主防御機構を分子レベル及び個体レベルで解析することとした。

2. 研究の目的

本研究計画は、*A. fumigatus* に対する宿主防御機構を分子的に明らかにすることを目的として、1) *A. fumigatus* 細胞壁成分を認識する宿主側の認識レセプターを同定する、2) 1) で同定したレセプターの感染防御における役割を個体レベルで解明する、の3点について主に解析を行った。3) これらのレセプターの感染防御における役割を分子レベルで解明する、の3点に焦点を絞り解析を行った。

3. 研究の方法

1) *A. fumigatus* 細胞壁成分を認識するレセプターの同定

A. fumigatus は糸状菌で、複雑な細胞壁成分を有している (図1)。主な細胞壁構成成分は糖鎖であるため、まず糖鎖を認識する宿主受容体である C 型レクチンレセプター (CLR) ファミリー分子のライブラリーを用いてスクリーニングを行った。

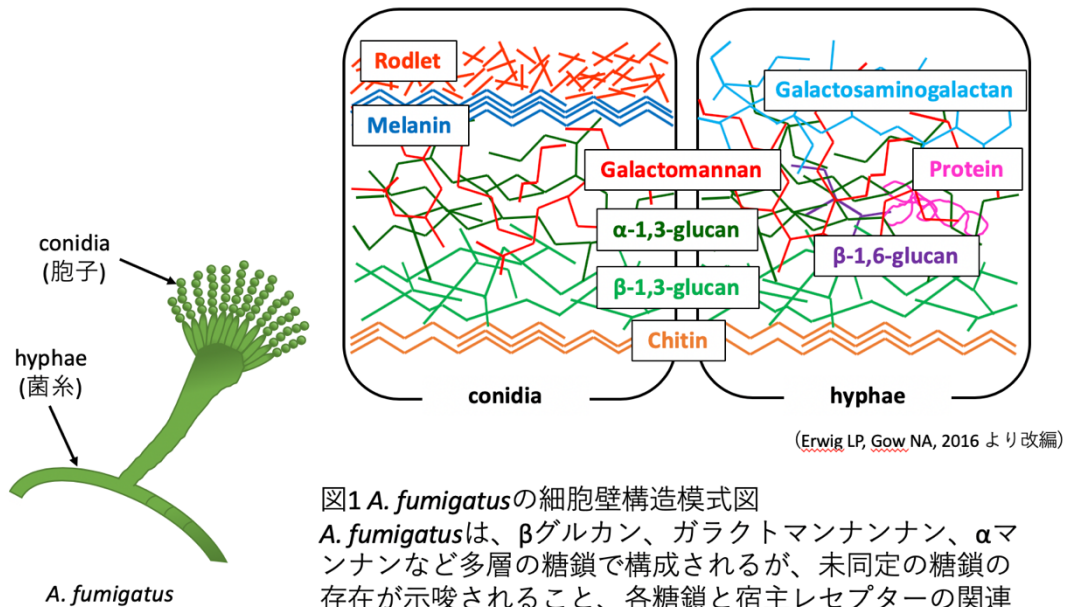


図1 *A. fumigatus*の細胞壁構造模式図

*A. fumigatus*は、 β グルカン、ガラクトマンナン、 α マンナンなど多層の糖鎖で構成されるが、未同定の糖鎖の存在が示唆されること、各糖鎖と宿主レセプターの関連など不明な点が多く残っている。

2) 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いた個体レベルでの *A. fumigatus* 感染防御機構の解析
 上記1)の解析の結果、*A. fumigatus* を認識する CLR が同定されたため、これら分子 (Dectin-1、Dectin-2、DCIR) の遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて感染実験を行い、これらの分子の *A. fumigatus* 感染防御における役割を個体レベルで検討した。

3) *A. fumigatus* 細胞壁成分を認識するレセプターの機能解析

野生型 (WT) マウスと上記3種類の KO マウスを用いて感染後の組織変化、免疫担当細胞の時空的变化などを解析し、Dectin-1、Dectin-2、DCIR がどの様に *A. fumigatus* を排除しているのかを検討した。

4. 研究成果

1) *A. fumigatus* 細胞壁成分を認識するレセプターの同定

CLR ファミリー分子の細胞外領域とヒト IgG の Fc を結合させたキメラタンパク質を用いたスクリーニングの結果、Dectin-1、Dectin-2、DCIR の細胞外領域が *A. fumigatus* の孢子と結合することが示された (図2)。

Aspergillus fumigatus MYA 4609 (resting conidia)

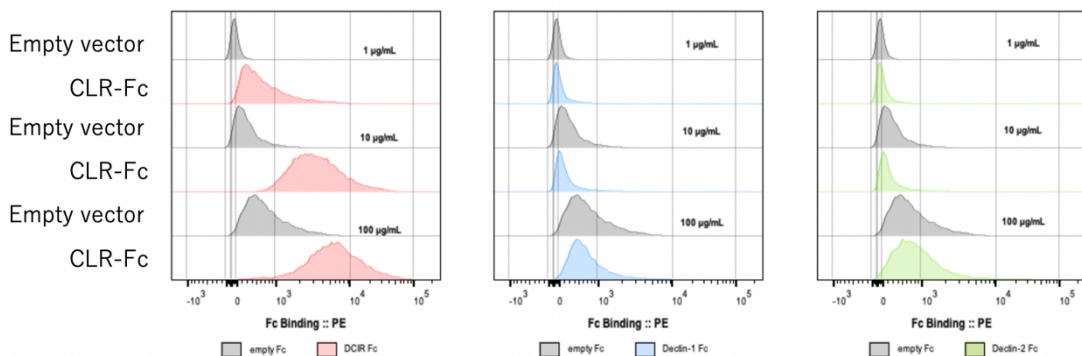


図2 DCIR、Dectin-1、Dectin-2は*A. fumigatus*孢子を認識する

種々のCLRの細胞外領域とヒトIgGのFc部分のキメラタンパク質を用いて、スクリーニングした結果、DCIR、Dectin-1、Dectin-2の3種類のCLRが*A. fumigatus*孢子と結合することがわかった。

2) 遺伝子欠損マウスを用いた感染実験

上記実験で、Dectin-1、Dectin-2、が *A. fumigatus* を認識することが明らかとなった。そ

ここで、Dectin-1 KO マウス、Dectin-2 KO、Dectin-1/Dectin-2 二重欠損 (DKO) マウスを用い感染実験を行った。その結果、肺に感染させるといずれの KO マウスでも WT マウスと同様に *A. fumigatus* を正常に排除できることがわかった (図 3)。

一方、侵襲性アスペルギルス症のモデルとなる経静脈感染後では、Dectin-1 KO マウスは感染に対する抵抗性が非常に低下しており、WT マウスと比較して有意に生存率が低下した (図 4)。

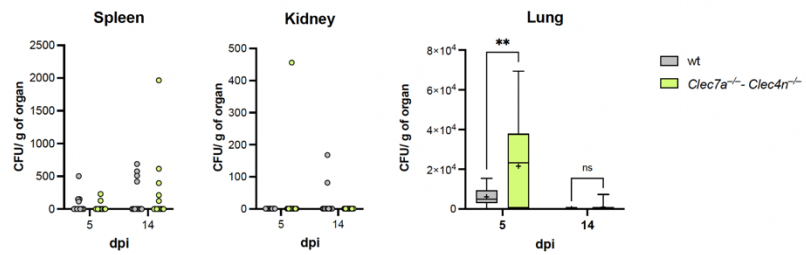


図3 Dectin-1/Dectin-2 DKOは *A. fumigatus* を正常に排除する
WTマウス、Dectin-1/Dectin-2 DKOの気道から *A. fumigatus* を感染させ、day5、day14に肺での菌数を計数した。その結果、day5ではDectin-1/Dectin-2 DKOマウスの肺で *A. fumigatus* の有意な増殖を認めたものの、day14ではWTマウスと同様にほぼ完全に排除していることがわかった。

Candida albicans (*C. albicans*)などの酵母型の真菌や細胞内寄生真菌である *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*)を感染させた状態と比較し、*A. fumigatus* 感染後では Dectin-1 KO マウスは急激な症状の変化が観察され、同じ宿主分子で認識された場合でも感染した

真菌の特徴に応じた免疫応答が引き起こされていることが示唆されている。さらに、*C. albicans* 感染に対しては、Dectin-1 による真菌の認識が

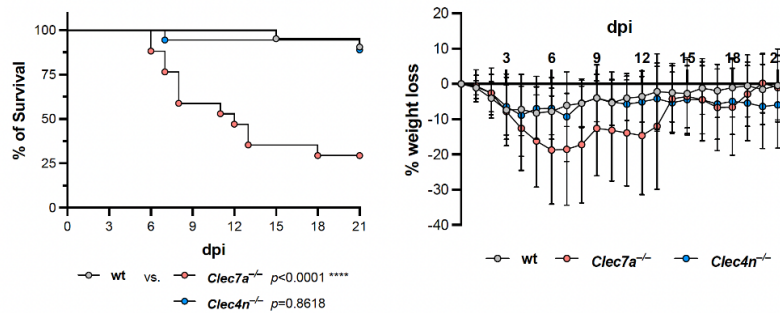


図4 Dectin-1 KOマウスは全身性 *A. fumigatus* 感染時の生存率が低下する
WTマウス、Dectin-1 KOマウス、Dectin-2 KOマウスのそれぞれに尾静脈から *A. fumigatus* を感染させ、その後の体重変化と生存率を観察した。

CD4 陽性 T 細胞 (Th17 細胞) や ILC からの IL-17 産生を誘導することで、感染防御を担っていることをこれまでに明らかにしてきたが、*A. fumigatus* 感染の

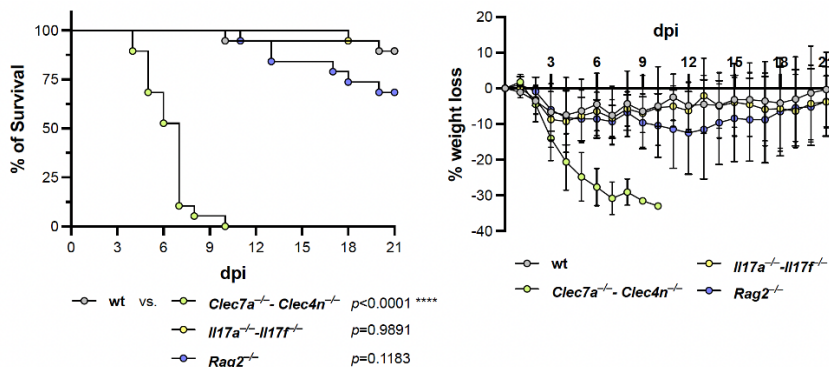


図5 IL-17A/IL-17F およびT細胞は *A. fumigatus* の排除に関与しない
WTマウス、IL-17A/IL-17F DKOマウス、Rag2 KOマウスのそれぞれに尾静脈から *A. fumigatus* を感染させ、その後の体重変化と生存率を観察した。

場合、IL-17A/IL-17F DKO マウスでも感染後の生存率は WT マウスと同様で、IL-17 は感染防御に全く関与していないことを明らかにした。さらに、T 細胞を欠損する Rag2 KO マウスでも *A. fumigatus* 感染後の生存率は WT マウスと同等で、T 細胞非依存的にこの真菌を排除していることが示された (図 5)。

そこで、Dectin-1 による *A. fumigatus* 排除のメカニズムを明らかにする目的で、Dectin-1 KO マウス、WT マウスのそれぞれの骨髄から好中球を単離し in vitro で *A. fumigatus* に対する貪食能力を測定した。その結果、Dectin-1 KO マウス由来の好中球

は WT マウス由来好中球と同等の貪食能力を有することが示された。次に、ナチュラルキラー（NK）細胞に着目し解析を行った。まず、*A. fumigatus* 感染後に菌体の集積が見られた腎臓における NK 細胞の状態を解析した。その結果、Dectin-1 KO マウスの腎臓では、NK 細胞のメーカーである CD69 の発現強度は WT マウスと同等であったものの、CD94 の発現強度は顕著に低下していた。また、Dectin-1 KO マウスの腎臓では、NK 細胞の死細胞の割合が有意に上昇していることもわかった。そこで、NK 細胞が *A. fumigatus* 排除に関与しているかどうかを明らかにする目的で、WT マウスに抗 NK1.1 抗体を投与し、NK 細胞を除去し *A. fumigatus* を感染させた。その結果、NK 細胞を除去した群では感染後の体重減少、腎臓での *A. fumigatus* の菌体数などの指標がいずれも有意に低下していた。これらの結果から、Dectin-1 からのシグナルが NK 細胞の生存に寄与することで、*A. fumigatus* の排除を担っていることが示唆された。

NK 細胞の生存に必要なサイトカインの一つとして、IL-15 が挙げられる。そこで、私たちは Dectin-1 による NK 細胞の生存/活性化に IL-15 が関与しているのではないかと考えた。そこで、まず *A. fumigatus* 感染後のマウスの腎臓における IL-15 の量を測定した。その結果、Dectin-1 KO マウスの腎臓における IL-15 の量は WT マウスと比較し有意に低下していることが明らかとなった。さらに、IL-15 の産生量の少ない個体では腎臓で *A. fumigatus* が有意に増殖していることもわかった。そこで、次に *A. fumigatus* 感染前に Dectin-1 KO マウスに IL-15 を投与することで、感染抵抗性が回復できるかどうかを検討した。その結果、予想通りに IL-15 投与群では NK 細胞数の増加が認められた。さらに、*A. fumigatus* 感染後の体重減少が回復し、腎臓における菌体数は非投与群と比較し有意に減少していた（図 6）。これらの結果から、Dectin-1 は *A. fumigatus* を認識し、IL-15 の産生を誘導することで、NK 細胞の生存を支持し感染防御を担っていることが示された。これらの研究成果は、*A. fumigatus* 感染症に対する新たな治療戦略へとつながるものであり、現在のグローバル社会、高齢化社会で問題となっている真菌感染症における有効な解決手段となる可能性が示された。

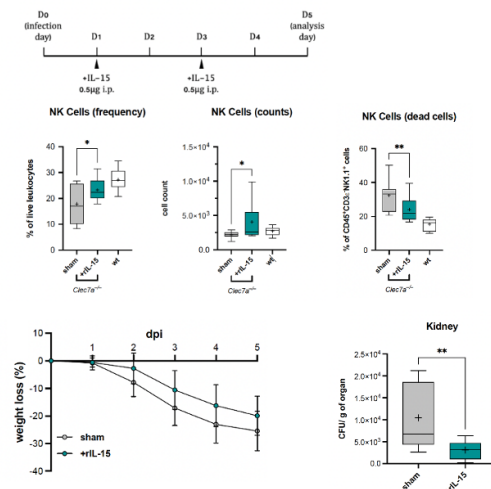


図6 IL-15投与によりDectin-1 KOマウスの感染抵抗性が回復する
Dectin-1 KOマウスにIL-15を投与し、その後*A. fumigatus*を感染させた。その結果、腎臓でのNK細胞数は非投与群と比較し有意に増加した。また、感染後の体重減少は非投与群と比較し有意に抑制され、腎臓での菌体数は有意に減少した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Muraosa Yasunori, Hino Yutaro, Takatsuka Shogo, Watanabe Akira, Sakaida Emiko, Saijo Shinobu, Miyazaki Yoshitsugu, Yamasaki Sho, Kamei Katsuhiko	4. 巻 20
2. 論文標題 Fungal chitin-binding glycoprotein induces Dectin-2-mediated allergic airway inflammation synergistically with chitin	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 1011878-1011879
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1011878	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshikawa Fabio S.Y., Wakatsuki Maki, Yoshida Kosuke, Yabe Rikio, Torigoe Shota, Yamasaki Sho, Barber Glen N., Saijo Shinobu	4. 巻 1
2. 論文標題 Dectin-1/IL-15 Pathway Affords Protection against Extrapulmonary Aspergillus fumigatus Infection by Regulating Natural Killer Cell Survival	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Innate Immunity	6. 最初と最後の頁 1~15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000527188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Makusheva Yulia, Chung Soo-Hyun, Akitsu Aoi, Maeda Natsumi, Maruhashi Takumi, Ye Xiao-Qi, Kaifu Tomonori, Saijo Shinobu, Sun Haiyang, Han Wei, Tang Ce, Iwakura Yoichiro	4. 巻 71
2. 論文標題 The C-type lectin receptor Clec1A plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by enhancing antigen presenting ability of dendritic cells and inducing inflammatory cytokine IL-17	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 288~304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.21-0191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Iwasawa Mari T, Miyachi Hideaki, Wakabayashi Seiichiro, Sugihira Takashi, Aoyama Reika, Nakagawa Seitaro, Katayama Yuki, Yoneyama Mitsutoshi, Hara Hiromitsu, Iwakura Yoichiro, Matsumoto Masanori, Inohara Naohiro, Koguchi-Yoshioka Hanako, Fujimoto Manabu, Nunez Gabriel, Matsue Hiroyuki, Nakamura Yuumi, Saijo Shinobu	4. 巻 34
2. 論文標題 Epidermal clearance of Candida albicans is mediated by IL-17 but independent of fungal innate immune receptors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 409~420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxac019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yabe Rikio, Chung Soo-Hyun, Murayama Masanori A., Kubo Sachiko, Shimizu Kenji, Akahori Yukiko, Maruhashi Takumi, Seno Akimasa, Kaifu Tomonori, Saijo Shinobu, Iwakura Yoichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 TARM1 contributes to development of arthritis by activating dendritic cells through recognition of collagens	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20307-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyachi Hideaki, Wakabayashi Seiichiro, Sugihira Takashi, Aoyama Reika, Saijo Shinobu, Koguchi-Yoshioka Hanako, Fujimoto Manabu, Nunez Gabriel, Matsue Hiroyuki, Nakamura Yuumi	4. 巻 223
2. 論文標題 Keratinocyte IL-36 Receptor/MyD88 Signaling Mediates Malassezia-Induced IL-17-Dependent Skin Inflammation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1753 ~ 1765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jiab194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 YAMAMOTO Hideki, TOMIYAMA Chikako, SATO Ko, KASAMATSU Jun, TAKANO Kazuki, UMEKI Aya, NAKAHATA Nana, MIYASAKA Tomomitsu, KANNO Emi, TANNO Hiromasa, YAMASAKI Sho, SAIJO Shinobu, IWAKURA Yoichiro, ISHII Keiko, KAWAKAMI Kazuyoshi	4. 巻 42
2. 論文標題 Dectin-2-mediated initiation of immune responses caused by influenza virus hemagglutinin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 53 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.42.53	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitai Yuki, Sato Ko, Tanno Daiki, Yuan Xiaoliang, Umeki Aya, Kasamatsu Jun, Kanno Emi, Tanno Hiromasa, Hara Hiromitsu, Yamasaki Sho, Saijo Shinobu, Iwakura Yoichiro, Ishii Keiko, Kawakami Kazuyoshi	4. 巻 89
2. 論文標題 Role of Dectin-2 in the Phagocytosis of Cryptococcus neoformans by Dendritic Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/IAI.00330-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Kenji, Kanno Emi, Tanno Hiromasa, Sasaki Ayako, Kitai Yuki, Miura Takayuki, Takagi Naoyuki, Shoji Miki, Kasamatsu Jun, Sato Ko, Sato Yuka, Niiyama Momoko, Goto Yuka, Ishii Keiko, Imai Yoshimichi, Saijo Shinobu, Iwakura Yoichiro, Tachi Masahiro, Kawakami Kazuyoshi	4. 巻 141
2. 論文標題 Distinct Roles for Dectin-1 and Dectin-2 in Skin Wound Healing and Neutrophilic Inflammatory Responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 164 ~ 176.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2020.04.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Fabio Seiti Yamada Yoshikawa, Shinobu Saijo
2. 発表標題 Dectin-1/IL-15 pathway affords protection against acute invasive aspergillosis by regulating NK cell survival.
3. 学会等名 The 51th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fabio Seiti Yamada Yoshikawa, Shinobu Saijo
2. 発表標題 The C-type lectin receptor Dcir1 counterbalances the antifungal response against Aspergillus fumigatus infection
3. 学会等名 The 51th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fabio Seiti Yamada Yoshikawa, Shinobu Saijo
2. 発表標題 Dcir1 modulates the antifungal response against Aspergillus fumigatus infection
3. 学会等名 JSICR MNCB 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fabio Seiti Yamada Yoshikawa, Shinobu Saijo
2. 発表標題 Dcir1 regulates the antifungal response of neutropils against <i>Aspergillus fumigatus</i>
3. 学会等名 JSICR MMCB 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fabio Seiti Yamada Yoshikawa, Sandro Rogerio de Almeida, Shinobu Saijo
2. 発表標題 The C-type lectin receptor Dectin-1/Dectin-2 and the cytokine IL-17 are critical for protection against the fungal pathogen <i>Sporothrix brasiliensis</i>
3. 学会等名 The 52th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学真菌医学研究センター http://www.pf.chiba-u.ac.jp/research/scientists_list/saijo.html

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