

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年8月27日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591109

研究課題名（和文） 宿主自然免疫の解析による新しい深在性真菌症診断法の開発

研究課題名（英文） Development of new diagnostic technique for deep mycosis by analyzing host innate immunity

研究代表者

田代 隆良 (TASHIRO TAKAYOSHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40163456

研究成果の概要（和文）：

我々は新たな深在性菌真菌症診断法の開発のために、同疾患における宿主免疫応答の解析を行った。深在性真菌症患者の静脈血中の単球膜上のマーカーを測定したところ、健常ボランティアと比較して dectin-1、CD64 の平均値は高い傾向にあり、特に慢性肺アスペルギルス症では CD64 値が有意差をもって高値を示した。以上の結果より、肺真菌症の診断法として宿主免疫反応を測定する有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To develop a new diagnostic technique for deep mycosis, we analyzed host innate immunity against fungal infection. Expression levels of dectin-1 and CD64 on monocytes from pulmonary mycosis patients were measured. Both of dectin-1 and CD64 levels in pulmonary mycosis were higher than that of health volunteers. Especially, expression levels of CD64 in chronic pulmonary aspergillosis patients were significantly higher than those of healthy volunteers. These results suggest that analysis of host immune system might be utilized for diagnosis of pulmonary mycosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：深在性真菌症、肺真菌症、感染症診断学、dectin-1

## 1. 研究開始当初の背景

深在性真菌症の診断は困難を極め、一般に最適検体を得るには侵襲的アプローチが必要になるが重篤な病態にある患者では実施困難なことも多い。また最適と考えられる検体を用いたとしても、原因菌の分離培養の成功率は必ずしも高くなく、分離培養成功例においても原因菌が同定されるまでには、かなりの日数を要する。さらには、カンジダといった常在性の日和見真菌については、たとえ分離されたとしても、それだけで診断を確定する根拠にはならない。したがって、現在臨床の場において求められている深在性真菌症の検査法は 1. 非侵襲的で 2. 特異度・感度に優れ 3. 迅速性にも優れる検査法である。しかし現在用いられている血清検査では表 1 にあげるように問題点が多く、不十分である。

(表 1)

真菌	PAMP(病原体関連分子)	パターン認識レセプター
<i>Candida albicans</i>	マンナン、ホスホリボマンナン、 $\beta$ -1,3-グルカン	TLR4、 TLR2、 dectin-1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	分生子および菌糸の細胞壁多糖、 $\beta$ -1,3-グルカン	TLR2、 TLR4、 dectin-1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	グルクロノキシロマンナン、 $\beta$ -1,3-グルカン	TLR2、 TLR4、 dectin-1
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	$\beta$ -1,3-グルカン	dectin-1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	マンナン、サイモザン、 $\beta$ -1,3-グルカン	TLR4、 TLR2、 TLR6、 dectin-1

近年、宿主が感染早期に病原菌を認識し免疫応答する自然免疫が注目されている。自然免疫では担当細胞(マクロファージなど)が、種々のパターン認識レセプターを介して生体に侵入した病原真菌をいち早く認識し、食細胞の活性化や白血球の遊走・集積(炎症細胞)を促進する重要な役割を担う。

真菌症においては、マクロファージ細胞膜上の補体レセプター、Fc $\gamma$ レセプター(CD64)や、Toll様受容体 Toll-like receptor (TLR)、dectin-1 などのパターン認識レセプターが

真菌の認識に関与し、いくつかの病原真菌についてはその細胞壁または細胞表層に存在する病原体関連分子(PAMP)がリガンドとして同定されている(表 2)。

(表 2)

## 2. 研究の目的

対象疾患	検査項目名	問題点
真菌症全般	$\beta$ -D-グルカン	クリプトコックス症では上昇しない アスペルギルス症での感度が低い 特異度が低い
カンジダ症	カンジダ抗原	感度・特異度ともに低い
アスペルギルス症	アスペルギルス抗原 アスペルギルス抗体	特異度が低い 感度が低い
クリプトコックス症	クリプトコックス抗原	治療効果判定に向かない
ニューモシスチス症	$\beta$ -D-グルカン	病原体特異的でない

深在性真菌症における宿主免疫応答反応を下記のように解析することで、深在性菌真菌症の診断や治療効果判定に役立つ診断ツールを開発する。

- (1) *in vitro* において真菌に対する宿主細胞の免疫応答(主にサイトカイン産生)を解析する
- (2) 深在性真菌症患者の臨床検体からスクリーニングに優れた血液マーカー(単球膜上のレセプターである dectin-1 発現量を中心に)を検出し、実際の臨床例においても有用かどうかを検討する。

## 3. 研究の方法

- (1) *in vitro* における真菌に対する宿主細胞の免疫応答

ヒト単球 THP-1 細胞を異なる成長期(resting conidia の状態から培養 0、12、24、48 時間後)の *Aspergillus fumigatus* 菌体で刺激した。刺激開始 6

時間後の培養上清中の各種サイトカイン量を、市販の ELISA キットを用いて測定した。

(2) 深在性真菌症患者の単球膜上の dectin-1 発現量の測定

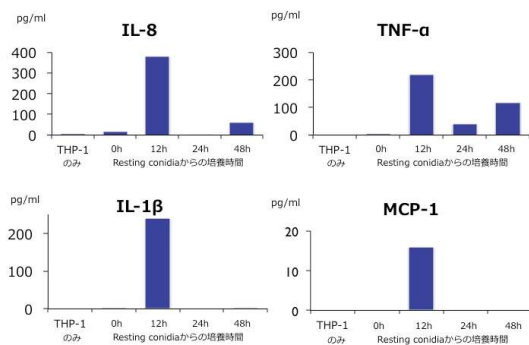
同意が得られた深在性真菌感染症患者から、ヘパリン採血管を用いて末梢静脈採血 10 ml を採取した。この検体より単核球を分離し、(特願 2006-332671) 記載の方法に従って、単球上 dectin-1 と CD64 の発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) in vitro における真菌に対する宿主細胞の免疫応答

IL-8、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP-1 を測定したところ、いずれのサイトカインも resting conidia の状態から 12 時間培養した菌体で刺激した場合に最も産生量が増加した。特に、IL-8、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  の産生量が増加していた (図 1)。

(図 1)



この状態の *Aspergillus fumigatus* 菌体は germination (菌糸伸長) を行っており、菌体表面に抗原性が強い  $\beta$ -D-グルカンが多く発現している状態である。従って、この時期の菌体を生体は最も認識し、免疫反応としてサイトカイン産生を増加させていたものと考えられる。

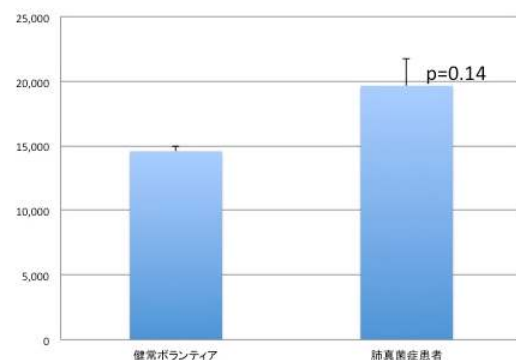
一方、この時期を過ぎると菌量自体は増加するにも関わらず、サイトカイン産生量は著明に低下しており、 $\alpha$ -グルカンなどの成分が菌体表面を覆うことで、抗原性を低下していることが推測された。

(2) 深在性真菌症患者の単球膜上の dectin-1 発現量の測定

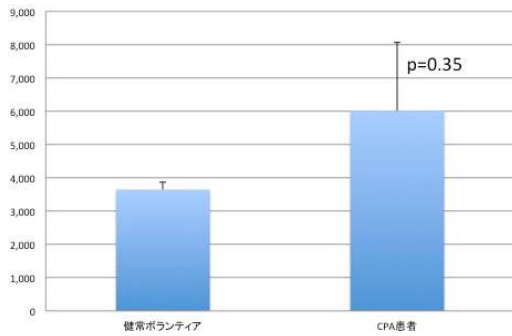
健常ボランティア 5 名の dectin-1 発現量の平均値が  $3650 \pm 487$  であるのに対し、肺真菌症 11 名 (アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 1 名、ニューモシスチス肺炎 2 名、肺クリプトコックス症 2 名、慢性肺アスペルギルス症 6 名) の平均値は  $5143 \pm 3797$  と高い傾向にあるものの、統計学的な有意差は認められなかった (図 2a)。また、CD64 発現量についても同様に比較したところ、健常ボランティアの平均値が  $14591 \pm 356$  であるのに対し、肺真菌症では  $19658 \pm 2121$  と高い傾向を示したが、統計学的な有意差は認められなかった (図 2b)。

(図 2) 健常ボランティアと肺真菌症患者の比較

a. 単球上の dectin-1 発現量の比較



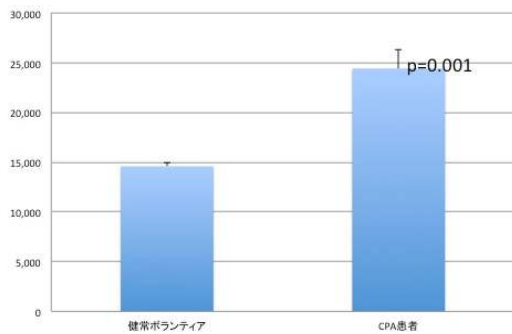
## b. 単球上の CD64 発現量の比較



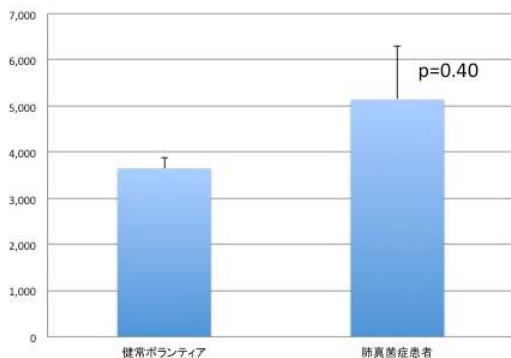
次に、上記の肺真菌症患者の中で慢性肺アスペルギルス症 (CPA) 患者のみを健常ボランティアと比較した。dectin-1 については CPA 患者の平均値は  $6018 \pm 2055$  と、健常ボランティアよりも高い傾向を示すものの統計学的な有意差は認められなかったが (図 3a)、CD64 については CPA 患者の平均値が  $24425 \pm 1937$  であり、健常ボランティアよりも有意に高い結果となった (図 3b)。

(図 3) 健常ボランティアと CPA 患者の比較

## a. 単球上の dectin-1 発現量の比較



## b. 単球上の CD64 発現量の比較



以上の結果より、肺真菌症、なかでも CPA 症例では単球上の dectin-1、CD64 が高い傾向 (一部は統計学的有意に) が認められた。今回は症例数が十分ではなかったが、今後症例数を増やすことで、より正確な情報が得られることが期待される。

本研究の結果より、宿主細胞の免疫応答を解析することによる深在性真菌症の新しい診断法の可能性が示唆されたといえる。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

第 87 回日本感染症学会学術講演会・第 61 回日本化学療法学会総会 合同学会  
一般演題「肺真菌症診断における宿主免疫細胞表面 Dectin-1 測定の有用性の検討」

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田代 隆良 (TASHIRO TAKAYOSHI)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：40163456

### (2) 研究分担者

掛屋 弘 (KAKEYA HIROSHI)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：40398152

今村 圭文 (IMAMURA YOSHIFUMI)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：90467960

### (3) 連携研究者

折原 弘治 (ORIHARA KOJI)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教  
研究者番号：90457664