

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791138

研究課題名(和文) アスペルギルス・バイオフィルムに対する宿主免疫応答メカニズムの解明

研究課題名(英文) Interaction of Aspergillus biofilm and host immune cells.

研究代表者

今村 圭文 (Imamura, Yoshifumi)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：90467960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：慢性肺アスペルギルス症は難治性疾患であるが、その原因としてバイオフィルム(BF)形成が挙げられる。本研究ではBFの構造解析と、宿主細胞との免疫応答に関する解析を行った。In vitroにおけるアスペルギルスBFモデルを作成し観察した所、BF形成時の菌体表面には $\alpha$ -グルカンが強く発現していた。そこで $\alpha$ -グルカン溶解酵素を発育段階の菌に添加した所、BFの初期段階である菌同士の接着が強く阻害できた。また、同酵素と共培養した分生子は宿主細胞からのサイトカイン産生をより強く誘導した。以上のことから、 $\alpha$ -グルカンはBF形成において重要な役割を果たしており、その溶解酵素はBF抑制に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Biofilm formation of fungus has been thought to play an important role in chronic pulmonary aspergillosis. In this study, I analyzed the structure of Aspergillus BF, and the interaction of BF with host immune cells. In vitro Aspergillus fumigatus biofilm model,  $\alpha$ -glucan was present on the surface of fungal cells. Next, when the fungal cells were treated with  $\alpha$ -glucanase, aggregation of cells was strongly inhibited. When the fungal cells were co-incubated with  $\alpha$ -glucanase, cytokines production, such as IL-8 and TNF- $\alpha$ , from host immune cells (THP-1 cells) was increased. These results suggest that  $\alpha$ -glucan plays an important role in biofilm formation of Aspergillus fumigatus, and  $\alpha$ -glucanase might be utilized for inhibition of biofilms.

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：アスペルギルス バイオフィルム 免疫応答  $\alpha$ -グルカン

## 1. 研究開始当初の背景

肺に感染症を引き起こす真菌の中で、アスペルギルスは最も重要な病原体の一つである。本邦において、剖検時に判明した深在性真菌症ではアスペルギルス症が最も頻度の高い原因真菌と報告されている。

細菌や真菌などの微生物はカテーテル等の医療器具表面に接着し、菌周囲に自身を保護する菌体外マトリックスの膜を作り、宿主免疫や抗菌薬に対して抵抗性を亢進させるバイオフィームと呼ばれる形態をとる性質がある。アスペルギルスは成長段階により細胞壁表面の主成分が経時的に変化し、発芽からバイオフィーム形成までの種々の段階で、感染免疫に様々な影響を及ぼしていると推察されるが、バイオフィームに対して宿主免疫がどのように応答するのか、逆にバイオフィームは宿主免疫に対してどのように反応するのか、どのような因子がバイオフィームを抑制するのかといった点については不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

アスペルギルスの各成長段階における宿主免疫との相互作用、アスペルギルス・バイオフィームの主成分のひとつである  $\alpha$ -1,3-グルカンの役割について特に注目して解析し、その溶解酵素である  $\alpha$ -グルカナーゼが菌系の成長、バイオフィームの形成、感染免疫に与える影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) アスペルギルスの成長とバイオフィームの形成

アスペルギルス (*Aspergillus fumigatus*, B-5233) をサブロー寒天培地で 35 $^{\circ}$ C 3 日間発育させ、培地から分生子を回収した。回収した分生子を PBS にて洗浄後、 $1.0 \times 10^5$  個/ml に調整して細胞培養プレートに接種し、RPMI 液体培地にて 48 時間まで培養を行った。また、成長過程の変化を光学顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡で観察した。さらに、 $\alpha$ -glucan 抗体および  $\beta$ -glucan 抗体を用いて、菌の成長過程における細胞壁の変化を観察した。

### (2) $\alpha$ -グルカナーゼがアスペルギルスの成長過程に与える影響

*A. fumigatus*  $1.0 \times 10^5$  個/ml をサブロー液体培地で振盪培養し、conidia の凝集に与える影響を観察した。また、48 時間まで培養

を継続し、 $\alpha$ -グルカナーゼを添加した場合に菌系の成長やバイオフィームの形成に影響を与えるかを観察した。また、ヒト気道上皮細胞 H292 細胞層の上にアスペルギルスを接種し、 $\alpha$ -グルカナーゼの有無での気道上皮細胞への接着能の違いを評価した。

### (3) アスペルギルスの各成長段階における宿主免疫の反応

(1) に準じて in vitro で事前にアスペルギルスを培養した。0、6、12、24、48 時間事前培養し、それぞれの時点からヒト末梢血単核球 THP-1 との共培養を行い、炎症性サイトカインを測定した。また、 $\alpha$ -グルカナーゼを添加してサイトカイン産生に与える影響を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) アスペルギルスの成長とバイオフィームの形成

アスペルギルスは休止分生子 膨化分生子 発芽および菌系の伸長 バイオフィームの形成、と変化していき、24 時間後にはバイオフィームの形成が確認できた (図 1)。細胞壁表面の  $\alpha$ -glucan および  $\beta$ -glucan に対する抗体を用いた検討では、休止分生子では  $\alpha$ -glucan を認めず、培養開始後に  $\beta$ -glucan が表面に曝露されていた。

図1. バイオフィーム形成の過程

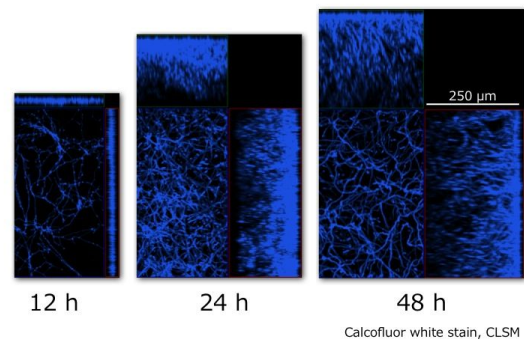
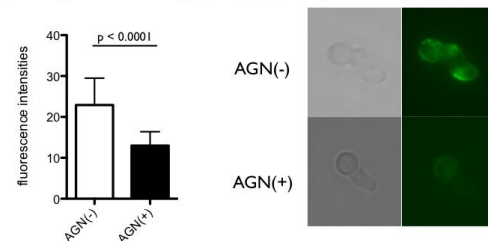


図2.  $\alpha$ -glucanaseは細胞壁表面の $\alpha$ -glucan量を減らす



*A. fumigatus* を  $\alpha$ -glucanase の添加あり/なしで 6 時間培養。抗  $\alpha$ -glucan 抗体で蛍光染色し、NIH ImageJ を用いて 'Analyze particle' で蛍光強度を比較した。 $\alpha$ -glucanase 添加群では、 $\alpha$ -glucan の蛍光強度が低下していた。

(2) -グルカナーゼがアスペルギルスの成長過程に与える影響

-グルカナーゼの添加により、細胞表面に曝露される -glucan の量は低下していた (図2)

-グルカナーゼを添加して振盪培養を行った場合、-グルカナーゼ添加群では分生子の凝集および真菌塊の形成が抑制された (図3)。また、-グルカナーゼは気道上皮細胞への分生子接着も抑制した (図4)。

図3. α-グルカナーゼは分生子の凝集を抑制する

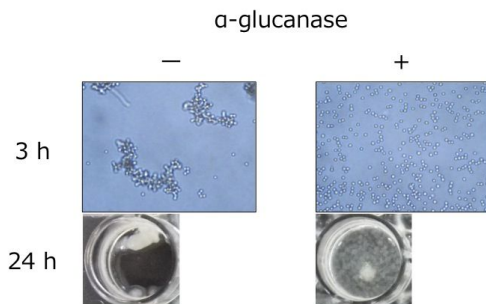
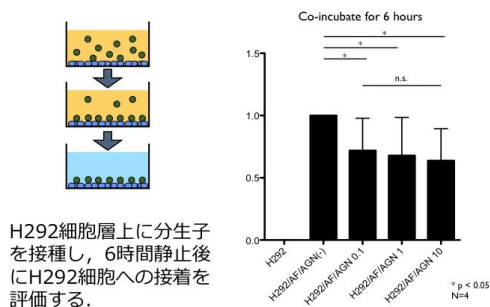


図4. α-グルカナーゼは気道上皮細胞への分生子接着を抑制する



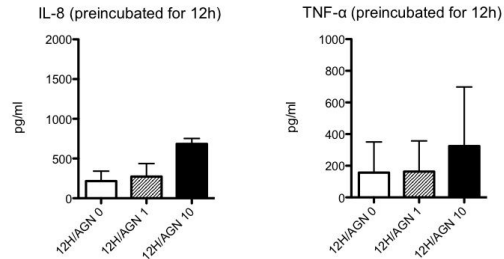
(3) アスペルギルスの各成長段階における宿主免疫の反応

アスペルギルスを 12 時間事前に培養して THP-1 と共培養した場合に、IL-8 や TNF- $\alpha$  といった炎症性サイトカインの産生量が最も高かった。バイオフィルムを形成した 24 時間後から THP-1 と共培養した場合は、逆にサイトカインの産生は低下していた。上記の 12 時間事前培養したアスペルギルスに、-グルカナーゼを添加して THP-1 と共培養を行った場合、-glucanase 添加群でサイトカイン産生量が上昇した (図5)。

膨化分生子から菌糸が伸長していく段階では、真菌細胞壁表面に -glucan が多く曝露され、バイオフィルム形成後は -glucan といった細胞外マトリックスにより

-glucan が覆われるため、宿主免疫によるサイトカイン誘導が阻害されているのではないかと推察される。

図5. α-グルカナーゼはアスペルギルスの刺激による炎症性サイトカインの産生を高める



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

井手昇太郎、今村圭文他．アスペルギルス研究会，-glucanase が *Aspergillus fumigatus* の成長に与える影響についての検討．東京．2012 年 9 月 1 日

井手昇太郎、今村圭文他．日本医真菌学会総会，-glucanase が *Aspergillus fumigatus* の成長に与える影響についての検討．東京．2012 年 11 月 10 日～11 日

井手昇太郎、今村圭文他．日本感染症学会総会，-glucanase が *Aspergillus fumigatus* の成長に与える影響．東京．2013 年 6 月 5 日～6 日

井手昇太郎、今村圭文他．アスペルギルス研究会，-glucanase が *Aspergillus fumigatus* の成長と宿主免疫に与える影響．東京．2013 年 9 月 7 日

井手昇太郎、今村圭文他．日本医真菌学会総会，-glucanase が *Aspergillus fumigatus* の成長に与える影響についての検討．東京．2013 年 9 月 27 日～28 日

井手昇太郎、今村圭文他．真菌症フォーラム，-glucanase が *Aspergillus fumigatus* の成長と宿主免疫に与える影響．東京．2014 年 2 月 8 日

井手昇太郎、今村圭文他 . 6<sup>th</sup>  
Advances Against Aspergillosis,  
 $\alpha$ -glucanase Inhibits Conidial  
Agglutination of *Aspergillus*  
*fumigatus* and Promote  
Inflammatory Cytokine Production  
from THP-1 . スペイン . 2013 年 2  
月 27 日～3 月 1 日