

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860791

研究課題名(和文) 侵襲性接合菌症に対する特異的養子免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of the specific adoptive immunotherapy for the invasive mucormycosis

研究代表者

重村 倫成 (SHIGEMURA, Tomonari)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：70623916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞移植などの免疫抑制患者において接合菌症は重篤で致命率が高い疾患であるが、特徴的な臨床経過や特異的な画像所見がなく、血清補助診断法も確立されてない。診断するためには直接病巣組織を調べる必要があり、生検や手術による切除などの侵襲を伴う処置が必要であった。そこで、Laurenceらが報告した方法を改良しMucor/Rhizopus、Lichtheimia、Rhizomucor に対する接合菌DNAを定量的PCR法にて検出する方法を確立した。また接合菌溶菌液を精製し、代表的な糸状菌真菌であるアスペルギルスと樹状細胞を用いた真菌特異的T細胞を増幅することができた。

研究成果の概要(英文)： Although mucormycosis is a fatal complication in immunocompromised patients, there are no specific or useful serum biomarkers for diagnosing mucormycosis. A definitive diagnosis of mucormycosis is based on histopathological findings, molecular detection, and/or a positive culture in the affected tissue. We modified the qPCR assay (targeting Mucor/Rhizopus, Lichtheimia, and Rhizomucor) which Millon et al. had reported to indicate the absolute amount for the monitoring of activity of mucormycosis. In addition, we could purify Mucorales lysate and amplify fungus-specific T cells using aspergillus which were a representative filamentous fungi fungus and the dendritic cells.

研究分野：造血幹細胞移植

キーワード：接合菌症 養子免疫 接合菌血清診断 造血幹細胞移植 免疫不全症

1. 研究開始当初の背景

近年、臓器移植や免疫療法、集中治療などの医療技術の進歩に伴い重篤な侵襲性の深在性真菌症が増加している中で、ハイリスク患者を中心に *Mucor*、*Rhizopus*、*Lichtheimia*(以前の *Absidia*)、*Rhizomucor* を代表とする接合菌症が増加している。接合菌症は侵襲性アスペルギルス症以上に重篤で致死率が高い疾患である。しかしこれまで診断および治療に関する研究は進んでおらず、診断、治療、予防のすべての面で大きな問題を抱えている。これまで発生頻度の高かったカンジダ症やアスペルギルス症は血清診断法として疾患特異的なマンナン抗原やガラクトマンナン抗原を測定する方法が確立され、また真菌全般に共通して存在する細胞膜構成成分である(1-3)- β -D-グルカンを検出する β -D-グルカン試験により、真菌感染症全体の早期診断ができるようになった。しかし、接合菌は診断が極めて困難でこれまでも生前診断例は極めて少なく、大多数は剖検診断例である。特徴的な臨床経過や特異的な画像所見がなく、培養検査で検出されることは極めてまれで、血清補助診断法も確立されていない。さらに、接合菌は(1-3)- β -D-グルカンを保有しないため感染時に β -D-グルカンは上昇せず、生前には疑うことすらできない症例が多く存在する。そのため診断法の確立が急務と考えた。Laurenceらが2013年3月に報告した血清中の接合菌 DNA を検出する方法をもとに、接合菌症の代表的な菌種である *Mucor*、*Rhizopus*、*Lichtheimia*、*Rhizomucor* に対する特異的定量 PCR 法を構築した。従来は生前に診断するためには直接病巣組織を調べる必要があり、生検や手術による切除などの侵襲を伴う処置が必要であったが、この方法を用いることで血清にて早期に診断できる可能性が考えられた。

多くの抗真菌薬が開発され使用できるようになった今日でも本邦では本症に有効とされる薬剤はアムホテリシン B (脂溶製剤を含む)のみである。接合菌はアムホテリシン B に比較的耐性であり治療には高用量を必要とするため、高頻度に腎毒性やその他の有害作用を生じさせる。このため免疫状態が低下した移植後の患者では治療が奏功する例は極めて少ない。限局型の接合菌症は外科的な壊死組織切除と高用量アムホテリシン B を組み合わせても死亡率は 50%を超え、造血幹細胞移植後に好発する播種性接合菌症は、死亡率は 100%近くになる。この極めて高い致死感染を制御できる予防及び治療法の開発が望まれる。

一般的に病原真菌に対する防御機構は好中球を中心とした貪食殺菌機構とリンパ球を介した細胞性免疫機構が重要である。多くの臨床医、研究者らの報告からも真菌感染症には好中球防御免疫が重要であることが明らかである。しかし造血幹細胞移植後の真菌症、特に接合菌症は好中球減少時よりも好中球

造血が回復した後の移植片宿主病 (GVHD) に対して細胞性免疫抑制を強化した際に多く報告されている。つまり感染防御には好中球免疫防御機能以外にもリンパ球 (主に T 細胞) を介した真菌特異的細胞性免疫機構が重要である。研究代表者はこれに着眼し、接合菌に対する特異的細胞傷害性 T 細胞を臨床応用が可能なレベルまでに増幅することで、本症に対する新たな予防と治療法の開発につながるかと考え着想に至った。

2. 研究の目的

高度免疫不全状態で発症した接合菌症は極めて予後不良である。早期に診断し治療することが望まれるが、特徴的な臨床経過や特異的な画像所見がなく、これまで血液診断法も確立されてないため、これまで診断が困難であった。接合菌 DNA を定量的 PCR 法にて検出する方法を開発し、早期診断法の確立を目指す。

これまで真菌に対する生体内の真菌特異的 T 細胞を体外で増幅してから輸注する養子免疫療法の開発はアスペルギルスを中心に進められてきた。2005 年、試験的研究として臨床応用され、アスペルギルスとサイトメガロウイルスに対する特異的細胞傷害性 T 細胞を、HLA 半合致移植後の患者に輸注し一定の効果があつたと報告された (Perruccio K, et al. Blood, 2005)。その後の研究でより効果的で、安全性の高い方法が開発され、臨床での研究が進められている。これらアスペルギルスへの特異的 T 細胞を増幅する方法を基に、臨床的に施行されている癌に対する樹状細胞療法を改変し、接合菌に対する養子免疫療法の開発を行う。治療効果を高めるため、接合菌に対する特異性を強化し、臨床応用できる数の接合菌特異的 T 細胞を大量にクリニカルグレードで増幅する。

3. 研究の方法

< 血清診断法の確立 >

Mucor/Rhizopus、*Lichtheimia*、*Rhizomucor* に対する primer, probe をそれぞれ作成する。接合菌 PCR 産物をプラスミドに組み込み真菌 DNA プラスミドを設計し、接合菌プラスミド $10^2 \sim 10^5$ を用いて絶対定量スタンダードとし、接合菌特異的定量 PCR を確立する。血清から微量の接合菌 DNA を検出するため、精製度の高い方法で DNA を抽出する。抽出した DNA を接合菌特異的 real-time PCR を用いて、定量解析し、経時的血清サンプルを定量系で解析し、臨床経過とあわせて評価する。

< 接合菌養子免疫療法の開発 >

1) 接合菌抗原成分を有する接合菌溶菌液の作製

代表的な接合菌である *Mucor*、*Rhizopus*、*Lichtheimia*、*Rhizomucor* 菌種から抗原タンパク質を抽出し、接合菌溶菌液を作製する。

2) 接合菌特異的樹状細胞の樹立

臨床的に施行されている癌に対する樹状細胞療法を改変し、腫瘍抗原の代わりに接合菌溶菌液を用いる。末梢血から単核球を分離し、CD14 陽性の単核細胞をマグネットビーズによるネガティブ選択あるいはプラスチック付着法にて採取する。Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) / インターロイキン (IL)-4 添加培地にて未熟樹状細胞へ分化後、接合菌溶菌液を添加する。さらに Lipopolysaccharide (LPS) / Tumor necrosis factor (TNF)- α / IL-1、IL-6 を添加し培養することで接合菌抗原提示能を有する単核由来樹状細胞を樹立する。

3) 接合菌溶菌液と樹状細胞を用いた接合菌特異的 T 細胞の培養

末梢血に、接合菌溶解液を加え 12 時間培養する。抗 CD3/CD28 抗体で刺激し IL-2/IL-15 添加培地で 11-14 日間培養する。培養開始 4 日目と 7 日目に接合菌特異的樹状細胞を添加する。増殖能、特異性は ELISPOT アッセイにて評価を行う。

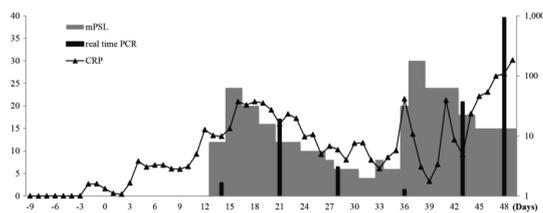
4. 研究成果

< 血清診断法の確立 >

Mucor/Rhizopus, Lichtheimia, Rhizomucor に対する primer, probe をそれぞれ作成した。接合菌 PCR 産物をプラスミドに組み込み真菌 DNA プラスミドを設計し、接合菌プラスミド $10^2 \sim 10^5$ を用いて絶対定量スタンダードとし、接合菌特異的定量 PCR を確立した。10 施設、103 検体の患者造血幹細胞移植後、白血病、免疫不全症患者で接合菌感染症が疑われた症例に対して検査を施行した。Mucor/Rhizopus, Lichtheimia, Rhizomucor 3 種類に対して合計 309 回解析を行い、6 検体で接合菌 DNA を検出した。

(臨床の評価)

A. 3 歳の慢性肉芽腫症に対して非血縁骨髄移植し、原因不明の腎臓、肺、脳梗塞のため永眠された。確立した定量 PCR にて血清中にて Rhizomucor が検出され、腎臓の autopsy の PCR と一致した。この系では移植早期に検出することが確認され、また病勢と一致していることが判明し、早期診断、病勢マーカーになることを報告した。

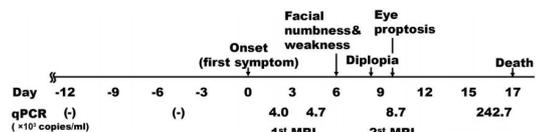


(A. 経過と Rhizomucor 特異的 PCR の評価)

B. 白血病に対する化学療法後、肺炎後の頭蓋内病変が判明し、経過から播種性接合菌症が疑われた。血清、髄液にて接合菌定量 PCR

にて Lichtheimia が検出された。髄液中の定量値は血清中より 10 倍以上高値であり、また治療による画像改善と一致した経過をとった。

C. 造血幹細胞移植後の GVHD のため大量のステロイド治療中、右眼球の突出が出現し、接合菌 PCR を施行した。接合菌定量 PCR にて血清中から Rhizopus が検出された。臨床的に鼻脳型接合菌症が疑われ耳鼻科に生検が依頼されたが、易出血のため生検が困難であった。その後、頭蓋内まで病変が広がり永眠された。亡くなる直前の生検病理検査にて接合菌症と診断され、組織中の接合菌 DNA は血清診断と一致した。残血清から解析を行い、眼球突出が出現する前の疼痛症状の時点で DNA は検出することが確認できた。この方法では鼻脳型接合菌症に対しても早期診断として有用であり、生検が困難な患者に極めて有用であった。



(C. 経過と Rhizopus 特異的 PCR の評価)

< 接合菌抗原成分を有する接合菌溶菌液の作製 >

Carberry S らが 2006 年 Biochem Biophys Res Commun. に掲載した Aspergillus fumigatus から溶菌液を作製した方法を基に代表的な接合菌である Rhizomucor pusillus から接合菌溶菌液を作製した。Rhizomucor pusillus (ATCC46883, NBRC4578) をサブロー培養液 500 ml、200 rpm、37 度の条件下で培養を行い、培養菌体約 1g を回収した。Phosphate-Buffered Saline (PBS) で洗浄し Lysis buffer (100 mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 20mM EDTA, 10% glycerol 30mM DTT, 1mM PMSF, 1 μ g/ml pepstatin A) に溶解後、液体窒素にて凍結し、超音波破碎を行った。その後、10,000 g、30 分間の遠心後上清を回収し溶菌液を作製した。溶菌液の作製は ATCC46883 と NBRC4578 の二株から行い精製したものはそれぞれ 0.23mg protein/ml, 0.31 mg protein/ml であった。

- 接合菌に対する養子免疫療法の開発にあたり、代表的な糸状菌真菌であるアスペルギルスを用いた真菌特異的 T 細胞の樹立 -

< 樹状細胞 DC の樹立 >

健常者血液を採取し、 $2-3 \times 10^6$ 個の末梢血単核球 (PBMC) を DC medium にて 37 度にて 2-4 時間培養後、非接着細胞を 3 回 DC medium にて洗浄にて除去した接着細胞を回収した。GM-CSF 10 ng/ml, IL-4 10ng/ml 添加 DC medium にて培養を行い、day2 再度同様のサイトカイン添加培地を加えアスペルギルス溶菌液とコントロール液を添加し培養を続けた。day5 GM-CSF 10ng/ml, IL-4 10ng/ml, IL-6

10ng/ml, TNF- 10ng/ml, IL-1 10 ng/ml を加えた DC medium にて半量の液替えを行い、day6 に成熟 DC を回収した。

<特異的 T 細胞の樹立>

同一健康者から PBMC を採取し、PBMC 2×10^6 に対して作製した DC 1×10^5 を加えた。IL-4 10 ng/ml, IL-7 10ng/ml 添加した。(day0)。Day9 に IL-4 10gng/ml, IL-7 10ng/ml 添加し、培養 T 細胞 1×10^6 に対して再度 DC を加えた。Day13 に IL-15 10 ng/ml 加えた。Day17、アスペルギルス溶菌液 +/- (Ag+/-) で比較検討した。day9 での細胞数は Ag+; 2.45 ± 1.41 , A-; 1.65 ± 1.01 、Day17 では Ag+; $+ 4.32$, Ag-; $- 1.0$ であった。Day17 で解析した。Elispot assay による抗原特異的評価は困難であったが、樹状細胞の 2 度のパルスにより抗原刺激した T 細胞増殖は優位であり、アスペルギルス特異的 T 細胞が増加したと考えられた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. Shigemura T, Nishina S, Nakazawa H, Matsuda K, Yaguchi T, Nakazawa Y. Early detection of Rhizopus DNA in the serum of a patient with rhino-orbital-cerebral mucormycosis following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Int J Hematol. 2016 Mar;103(3):354-5. 査読有
2. Shigemura T, Nakazawa Y, Amano Y, Sudo A, Watanabe M, Kobayashi M, Kobayashi N, Koike K, Agematsu K, Nishimura K. Subcutaneous abscess due to the basidiomycete *Phellinus mori* in a patient with chronic granulomatous disease. Infection. 2015;43(3):371-5. 査読有
3. Shigemura T, Nakazawa Y, Matsuda K, Motobayashi M, Saito S, Koike K. Evaluation of Mucorales DNA load in cerebrospinal fluid in a patient with possible cerebral mucormycosis treated with intravenous liposomal amphotericin B. Int J Infect Dis. 2014;29:200-2. 査読有

[学会発表](計 1 件)

1. 本林光雄、重村倫成、倉田敬、平林耕一、齋藤章治、西村貴文、中沢洋三、坂下一夫、稲葉雄二、小池健一、「当科で経験した中枢神経接合菌症の 2 例」、第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会、金沢 2014 年 9 月 4 日発表、演者「本林光雄」

6 . 研究組織

(1)研究代表者

重村 倫成 (SHIGEMURA, Tomonari)
信州大学・学術研究院医学系・助教
研究者番号 : 70623916