

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15383

研究課題名(和文) S-ニトロソ化蛋白を用いた侵襲性真菌感染症に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment against invasive fungal infection by S-nitrosated protein

研究代表者

金城 雄樹 (Kinjo, Yuki)

国立感染症研究所・真菌部・室長

研究者番号：20570831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： 侵襲性真菌感染症は抗真菌薬治療でも致命率が高い。本研究では新規治療薬の開発をめざし、菌の排除に重要な一酸化窒素の安定型供与体であるS-ニトロソ化蛋白を用いて、主要真菌のカンジダ属、クリプトコックス属及びアスペルギルス属に対する抗真菌活性を解析した。S-ニトロソ化蛋白は解析した全ての菌種に対して増殖抑制効果を示した。フローサイトメトリー解析及び走査型電子顕微鏡解析の結果から、S-ニトロソ化蛋白は真菌内の活性酸素産生を増加することで真菌の細胞死を誘導することが示唆された。S-ニトロソ化蛋白は薬剤耐性真菌に対しても抗真菌活性を認めたことから、新規抗真菌薬としての有用性が期待される。

研究成果の概要(英文)： Invasive fungal infections are associated with high mortality rates. The emergence of drug-resistant fungi is a great concern because of the limited number of antifungal drugs. In this study, we tested antifungal activities of S-nitrosated protein that had been developed as a stable donor of nitric oxide against major fungal pathogens including *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. and *Aspergillus fumigatus*. S-nitrosated protein inhibited the growth of these fungi including drug-resistant strains. S-nitrosated protein increased the production of reactive oxygen species and decreased the mitochondrial membrane potential in *C. albicans*, indicating cell death of this fungus. Furthermore, scanning electron microscopy showed morphological changes in *C. albicans* upon treatment with this protein. These results demonstrate that S-nitrosated protein has antifungal activities against major fungal pathogens, indicating that this protein is a potential candidate for a new class of antifungal drugs.

研究分野：感染症内科学

キーワード：感染症 真菌 抗真菌薬 S-ニトロソ化蛋白

1. 研究開始当初の背景

カンジダ属は菌血症の主な原因菌であり、国内のカンジダ血症の症例数は年間1万例以上と推計される。アスペルギルス属は院内での真菌性肺炎及び侵襲性真菌感染症の主な原因菌である。これらの主要真菌による侵襲性感染症は抗真菌薬治療においても致命率が20-40%と高い(Horn et al. Clin Infect Dis 2009, Dragonetti et al. Med Mycol 2017)。クリプトコックス属は、肺に感染後、免疫低下に伴い中枢神経系に播種する。特にヒト免疫不全症候群症例ではクリプトコックス髄膜炎の発症例が多く、その死亡者数は世界中で年間18万人と推計されている(Rajasingham et al. Lancet Infect Dis 2017)。また近年、北米にて高病原性 *Cryptococcus gattii* による集団発生がおり、健常人でも多くの感染例が報告されている(Galanis E et al. Emerg Infect Dis 2010)。

侵襲性真菌感染症に対する治療において、抗真菌薬の種類が少ないことが問題である。さらに、近年、エキノカンディン系やアゾール系などの主要抗真菌薬に耐性を示す真菌が出現していることから、その動向が注視されている(Alexander et al. Clin Infect Dis 2013, Verweij et al. Drug Resist Updat 2015, Sanglard. Front Med 2016)。また最近、*Candida auris* という新しい真菌の薬剤耐性や院内での患者間の伝播が世界各地から報告されている(Schelenz et al. Antimicrob Resist Infect Control 2016, Vallabhaneni et al. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2016)。このような背景から、これまでの抗真菌薬とは作用機序の異なる新規抗真菌薬の開発が強く求められている。

一酸化窒素(nitric oxide; NO)は種々の微生物の殺菌において重要な役割を担って

り、真菌感染に対してもその重要性が示されている。しかし、NOは速やかに亜硝酸塩や硝酸塩に代謝されるため、薬剤として応用するためには蛋白などの安定型供与体が必要である。ヒト血清アルブミン(human serum albumin, HSA)は血中に豊富に存在し、NOが結合可能なフリーのシステイン残基を有していることから、血中でのNOの貯蔵体としての役割を担っている。また、HSAは炎症部位や腫瘍への集積を認めることから、炎症部位や腫瘍にNOを運ぶキャリア蛋白として着目されており(Neumann et al. Expert Opin Drug Deliv 2010)、HSAにNOを結合させたS-ニトロソ化蛋白(S-nitrosated HSA, SNO-HSA)が癌細胞や細菌に対して増殖抑制効果を示すことが報告されている(Ishima et al. J Pharmacol Exp Ther 2007)。これらの報告から、SNO-HSAが抗真菌作用を示す可能性が考えられるが、その作用については明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、侵襲性真菌感染症に対する、現行の抗真菌薬とは作用機序の異なる新しい治療法の開発を目指し、医学研究者と薬学研究者が協力して解析を行った。真菌の排除に重要なNOの安定型供与体として開発したSNO-HSAを用いて、カンジダ属、アスペルギルス属やクリプトコックス属などの侵襲性真菌感染症の主な原因真菌に対する抗真菌活性を解析した。

3. 研究の方法

(1) 主要真菌に対するSNO-HSAの増殖抑制効果の解析

SNO-HSAの主要真菌に対する増殖抑制効果を調べるために、カンジダ属4菌種(*Candida albicans*, SC5314株, *Candida*

glabrata, CBS 138 株, *Candida parapsilosis*, ATCC 22019 株, *Candida auris*, JCM 15448 株)、クリプトコックス属 2 菌種 (*Cryptococcus neoformans*, H99 株, *Cryptococcus gattii*, R265 株)、アスペルギルス属 1 菌種 (*Aspergillus fumigatus*, Af293 株) を用いた。SNO-HSA は購入した HSA (平均分子量 66.5KDa) を用いて、これまでに報告した方法で作製した (Ishima et al., J Biol Chem 2008)。SNO-HSA の真菌増殖抑制効果は、標準的薬剤感受性試験の Clinical and Laboratory Standards Institute 法を一部変更して行った。Potate-dextrose 培地 (PDA) にて前培養した真菌を 165 mM 3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS buffer, pH 7.0) 添加 RPMI を用いて調整し、段階希釈した SNO-HSA または HSA 存在下に培養した。カンジダ属は 24 時間後、クリプトコックス属とアスペルギルス属は 48 時間後に真菌の増殖を評価した。一部の実験では、カンジダ属は 48 時間後、クリプトコックス属は 72 時間後にも増殖の評価を行った。*C. albicans* 及び *A. fumigatus* については XTT 細胞増殖キットを用い、他の菌種についてはキットを使用せずに吸光度を測定して、50% 増殖阻害濃度を判定した。また、各菌株の主要抗真菌薬 (フルコナゾール、イトラコナゾール、アンホテリシン B やミカファンギン) に対する薬剤感受性についても解析を行った。

(2) 薬剤耐性真菌に対する SNO-HSA の抗真菌活性の解析

SNO-HSA の薬剤耐性真菌に対する抗真菌活性を調べるため、ミカファンギン耐性 *C. glabrata* (NIID Cg211) 及びアゾール耐性 *A. fumigatus* (IFM 62871) を用いて、前述の方法と同様に薬剤感受性試験を行った。

(3) *C. albicans* の活性酸素量及びミトコンドリア膜電位の測定

SNO-HSA による抗真菌活性の機序を明らかにするため、侵襲性感染症の原因真菌としてカンジダ属で最も多い *C. albicans* を用いて、SNO-HSA または HSA を処理した真菌内の活性酸素の産生とミトコンドリア膜電位を解析した。Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) 液体培地にて一晩振とう培養した *C. albicans* (4×10^4 細胞) を SNO-HSA または HSA 存在下に 3 時間培養し、15 μ M の dihydroethidium (DHE) と 175 nM の 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide [DiOC₆(3)] を用いて染色した後、細胞内の活性酸素量とミトコンドリア膜電位を BD FACSCalibur にて解析した。FCS データは FlowJo を用いて解析を行った。

(4) 走査型電子顕微鏡を用いた *C. albicans* の形態解析

SNO-HSA の抗真菌活性を調べるため、走査型電子顕微鏡を用いて、SNO-HSA または HSA にて処理した *C. albicans* の形態を解析した。PDA にて培養した *C. albicans* (5×10^4 細胞) を SNO-HSA または HSA 存在下に 4 時間または 10 時間培養した。そのサンプルをグルタルアルデヒド及びパラホルムアルデヒドにて固定後、四酸化オスミウムにて再固定し、エタノール溶液にて脱水後に、tert-ブタノールに懸濁して凍結乾燥した。そのサンプルを走査型電子顕微鏡 (日立ハイテクノロジーズ、SU6600 モデル) にて解析した。

4. 研究成果

SNO-HSA は容量依存性に抗真菌作用を示し、解析したカンジダ属 4 菌種、クリプトコックス属 2 菌種、及びアスペルギルス属 1 菌

種全てに対して増殖抑制効果を認めた。SNO-HSA のカンジダ属、クリプトコックス属及びアスペルギルス属に対する 50%増殖阻害濃度は、それぞれ 0.12-1、0.5 及び 1-2 μM と良好であった。また、SNO-HSA はミカファンギン耐性 *C. glabrata* 及びアゾール耐性 *A. fumigatus* に対しても薬剤感性菌と同様に増殖抑制効果を示し、50%増殖阻害濃度はそれぞれ 0.25 及び 2 μM と良好であった。

SNO-HSA を処理した *C. albicans* では、HSA を処理した場合と比較して、細胞内の活性酸素量が有意に増加した。また、SNO-HSA 処理にてミトコンドリア膜電位が消失することが明らかになった。さらに、走査型電子顕微鏡を用いた解析にて、PBS または HSA 存在下で培養した *C. albicans* は細胞構造が保たれているのに対し、SNO-HSA 存在下で培養した場合には真菌の細胞構造の破壊を認めた。そのことから、SNO-HSA は *C. albicans* に対して形態的变化をもたらすことが明らかになった。

本研究にて、侵襲性真菌感染症の 2 大原因真菌の *C. albicans* 及び *A. fumigatus*、高病原性真菌の *C. gattii* を含む主要真菌(カンジダ属、クリプトコックス属及びアスペルギルス属)に対して、SNO-HSA が抗真菌作用を示すことが明らかになった(論文投稿中)。また、最近、薬剤耐性及び患者間の伝播で問題となっている *C. auris* や、薬剤耐性真菌に対しても、SNO-HSA が良好な抗真菌活性を示したことから、新たな抗真菌薬としての可能性が示唆された。

SNO-HSA は *C. albicans* に対して細胞内の活性酸素の産生を誘導し、ミトコンドリア膜電位を消失させた。これまでに、カスポファンギンやミコナゾールなどの *C. albicans* に対する殺真菌活性を示す抗真菌薬は、真菌

内の活性酸素産生を誘導することが報告されている (Kobayashi et al. Antimicrob Agents Chemother 2002, Hao et al. Antimicrob Agents Chemother 2013, Delattin et al. Future Med Chem 2013)。対照的に、フルコナゾールなどの静菌的作用を示す抗真菌薬では真菌内の活性酸素産生の誘導が低い。また、カスポファンギンにて処理した *C. albicans* では、活性酸素の産生が誘導され、ミトコンドリア膜電位が消失し、細胞死に至る(Hao et al. Antimicrob Agents Chemother 2013)。SNO-HSA においても、カスポファンギンと同様に、活性酸素の産生誘導及びミトコンドリア膜電位の消失を認めたことから、活性酸素の産生を介して抗真菌作用をもたらすことが示唆された。

SNO-HSA 以外の *S*-ニトロソ化蛋白を用いた抗真菌活性の解析も行っており、SNO-HSA よりもさらに低濃度で抗真菌作用をもたらすことが示唆された。また、シクロフォスファミド投与白血球減少マウスでのカンジダ感染モデルを用いて、*S*-ニトロソ化蛋白の治療効果を解析する予備的解析も行った。本研究にて得られた結果を基に、SNO-HSA 及び他の *S*-ニトロソ化蛋白の抗真菌活性について更なる解析を行い、その効果及び作用機序の解明に繋げたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

Ikeda-Dantsuji Y, Nakamura S, Ohno H, Inukai T, Nagi M, Ueno K, Umeyama T, Kinjo Y, Yamagoe S, Shibuya K, Miyazaki Y. Intraspecies variation in the efficacy of adjunctive recombinant interferon- γ therapy against cryptococcal meningoencephalitis in mice. *Med Mycol.* in press. 査読有.

宮崎 義継, 中村 茂樹, 金城 雄樹 . クリプトコックス症の診断と治療 . 日本医師会雑誌 146(3):495-498, 2017. 査読無
<http://www.med.or.jp/cme/jjma/newmag/14603/14603.html>

Ueno K, Urai M, Takatsuka S, Abe M, Miyazaki Y, Kinjo Y. Immunization with antigen-pulsed dendritic cells against highly virulent *Cryptococcus gattii* infection: Analysis of cytokine-producing T cells. *Methods Mol Biol.* 1625:327-339, 2017. 査読無.
DOI:10.1007/978-1-4939-7104-6_22.

Urai M, Kaneko Y, Ueno K, Okubo Y, Aizawa T, Fukazawa H, Sugita T, Ohno H, Shibuya K, Kinjo Y and Miyazaki Y. Evasion of innate immune responses by the highly virulent *Cryptococcus gattii* by altering capsule glucuronoxylomannan structure. *Front Cell Infect Microbiol.* 5:101, 2016. 査読有.
DOI:10.3389/fcimb.2015.00101.

宮崎 義継, 中村 茂樹, 壇辻 百合香, 福田 恵子, 梅山 隆, 浦井 誠, 上野 圭吾, 金城 雄樹 . クリプトコックス症の診断と治療 . 呼吸器内科 30(3) : 204-206, 2016. 査読無.
<http://www.kahyo.com/item/KO201609-303>

Ueno K, Urai M, Ohkouchi K, Miyazaki Y, Kinjo Y. Dendritic cell-based vaccine against fungal infection. *Methods Mol Biol.* 1403:537-49, 2016. 査読無.
DOI:10.1007/978-1-4939-3387-7_30.

Ikeda-Dantsuji Y, Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Ueno K, Nagi M, Yamagoe S,

Kinjo Y, Miyazaki Y: Interferon- γ promotes phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* but not *Cryptococcus gattii* by murine macrophages. *J Infect Chemother.* 21(12): 831-836, 2015. 査読有.
DOI:10.1016/j.jiac.2015.08.001.

Maeda H, Hirata K, Watanabe H, Ishima Y, Chuang VTG, Taguchi K, Inatsu A, Kinoshita M, Tanaka M, Sasaki Y, Otagiri M, Maruyama T. Polythiol-containing, recombinant mannosylated-albumin is a superior CD68⁺/CD206⁺ Kupffer cell-targeted nano-antioxidant for the treatment of two acute hepatitis models. *J Pharmacol Exp Ther.* 352, 244-57, 2015. 査読有.
DOI:10.1124/jpet.114.219493.

Kinoshita R, Ishima Y, Ikeda M, Kragh-Hansen U, Fang J, Nakamura H, Chuang VTG, Tanaka R, Maeda H, Kodama A, Watanabe H, Maeda H, Otagiri M, Maruyama T. S-Nitrosated human serum albumin dimer as novel nano EPR enhancer applied to macromolecular anti-tumor drugs such as micelles and liposomes. *J Control Release.* 217:1-9, 2015. 査読有. DOI:10.1016/j.jconrel.2015.08.036.

Ishima Y, Inoue A, Fang J, Kinoshita R, Ikeda M, Watanabe H, Maeda H, Otagiri M, Maruyama T. Poly-S-nitrosated human albumin enhances the antitumor and antimetastasis effect of bevacizumab, partly by inhibiting autophagy via the generation of nitric oxide. *Cancer Sci.* 106(2):194-200, 2015. 査読有.
DOI:10.1111/cas.12577.

金城 雄樹, 梅山 隆, 宮崎 義継, 金子 幸弘. クリプトコックス症の概要. IASR 36: 185-186, 2015. 査読無.

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-sp/2318-related-articles/related-articles-428/5993-dj4281.html>

Yoshida H, Seki M, Umeyama T, Urai M, Kinjo Y, Nishi I, Toyokawa M, Kaneko Y, Ohno H, Miyazaki Y, Tomono K. Invasive pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus lentulus*: Successful treatment of a liver transplant patient. *J Infect Chemother.* 21(6):479-81, 2015. 査読有
DOI:10.1016/j.jiac.2015.02.010.

金城 雄樹, 田辺 公一, 上野 圭吾, 北野 尚樹, 名木 稔, 浦井 誠, 星野 泰隆, 梅山 隆, 山越 智, 宮崎 義継. 侵襲性カンジダ感染症の発症, 炎症反応および薬剤耐性に関する基盤的研究. 化学療法の領域 31(5): 113-119, 2015. 査読無.

https://www.iyaku-j.com/iyaku-j/system/M2-1/summary_viewer.php?trgid=29824

〔学会発表〕(計 2 件)

金城 雄樹. 特別講演「侵襲性真菌感染症の病態の基礎的解析」. 第 7 回 小児 Febrile Neutropenia 研究会, 2017 年 4 月 14 日, TKP ガーデンシティ品川 (東京)

異島 優, 井上 亜希, 小田切 優樹, 渡邊 博志, 丸山 徹. Poly-S-ニトロソ化ヒト血清アルブミンの HIF-1 α 抑制効果. 第 31 回 日本 DDS 学会学術集会, 2015 年 7 月 2 日-3 日, 京王プラザホテル (東京)

〔図書〕(計 1 件)

金城 雄樹. クリプトコックス症. 編集 岡部 信彦, 岩本 愛吉, 大西 真, 西條 政幸,

谷口 清州, 野崎 智義, 宮崎 義継. 感染症 予防必携 第 3 版, p262, 日本公衆衛生協会, 2015 年

〔その他〕
ホームページ等
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/bioact-3rdlab.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

金城 雄樹 (KINJO, YUKI)
国立感染症研究所・真菌部・室長
研究者番号: 20570831

(2) 研究分担者

丸山 徹 (MARUYAMA, TORU)
熊本大学・薬学部・教授
研究者番号: 90423657

(3) 連携研究者

異島 優 (ISHIMA, YU)
徳島大学大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号: 00457590

上野 圭吾 (UENO, KEIGO)
国立感染症研究所真菌部第三室・主任研究官
研究者番号: 10550220

(4) 研究協力者

酒井 純 (SAKAI, JUN)
国立感染症研究所真菌部第三室・協力研究員

齋藤 典子 (SAITOH, NORIKO)
国立感染症研究所電顕室・職員

高塚 翔吾 (TAKATSUKA, SHOGO)
国立感染症研究所真菌部第三室・研究員

阿部 雅広 (ABE, MASAHIRO)
国立感染症研究所真菌部第三室・協力研究員

仲原 真貴子 (NAKAHARA, MAKIKO)
国立感染症研究所真菌部第三室・研究生

川久保 俊 (KAWAKUBO, SHUN)
国立感染症研究所真菌部第三室・実習生