

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08394

研究課題名(和文) ヒトに常在・定着する病原性酵母の病原因子解明と共生および感染メカニズム

研究課題名(英文) Clarification of the infection mechanism of normal fungal microbiota

研究代表者

市川 智恵 (Ichikawa, Tomoe)

明治薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60383288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：健常者にも常在・定着する病原真菌が感染を引き起こすメカニズムを明らかにすることを目的とした。代表的な病原真菌であるCandida属菌種の接着と細胞傷害性を解析し、宿主細胞の種類や菌種により応答性が異なることを見出した。トリコスポロン症の原因菌であるTrichosporon asahiiは多様なコロニー形態を生じる。本菌が感染症をおこす時には、コロニー形態を変えることで感染しやすくなる機序があるのではないかと考えた。本研究では、T. asahiiが赤血球凝集反応と溶血性を示し、凝集反応は接着性が高いコロニー形態で高いことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特異的な診断法や治療法がないT. asahiiの病原因子の探索を行い、いくつかの病原性状を示した。本研究では、T. asahiiが赤血球を凝集させることを新たに見出した。さらにコロニー形態により赤血球凝集能が異なり、培養プレートによく接着性を示すコロニー形態では赤血球凝集能も高いことが明らかとなり、コロニー形態変化が病原性に関与することを示した。Candidaの接着性や細胞傷害性も菌種により異なることから、これらの因子を同定することで、菌種特異的の新規診断や治療の標的分子となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The study's aim was to explain the mechanism of infection which is due to normal fungal microbiota. We have examined the ability to adhere as well as the cytotoxicity of Candida spp., which are archetypical pathogenic yeasts, and found that the responsiveness is different depending on the type of host cells and the Candida species. Particularly, *C. glabrata* selectively adheres to mammalian cells. *Trichosporon asahii*, the causative yeast of trichosporonosis, shows different colony morphologies. We have thought that yeast cells cause infection by colony switching when *T. asahii* cause infection. This study shows that *T. asahii* is the reason for hemagglutination as well as hemolysis and the ability of hemagglutination was contrasting between colony morphologies. The higher the adhesive colony morphology, the higher the hemagglutination ability.

研究分野：微生物学

キーワード：病原真菌 Trichosporon トリコスポロン症 接着性 コロニー形態変化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医療の高度化に伴い、高齢者や基礎疾患を有する患者、易感染性宿主は増加している。これら基礎疾患を有する患者における真菌感染症も増えており、その診断・治療の重要性が高まっている。常在酵母による全身感染症の他にも、誤嚥性肺炎の原因としても口腔の常在酵母が注目されている。また、ヒトに住み着いている酵母種が複数あることは知られており、*Candida* 属菌種が代表的な原因酵母として挙げられるが、近年では原因菌は多様化している。

さらに、近年の解析技術の向上により、これまではヒトとは共生していないと考えられていた酵母も、健常者から分離・同定されるようになってきた。申請者は、近年ヒトに定着することが明らかになった病原性酵母として、トリコスポロン症の原因菌に着目した。この菌種は担子菌のトリコスポロン・アサヒ(*T. asahii*)で、複数の抗真菌薬に耐性傾向を示すことから、抗真菌薬の使用にもかかわらず発症するブレイクスルー感染症の起病因菌として、臨床上重要な位置付けにある。しかし、誤診されたまま適切な治療が行われていない例が多いと指摘されており、診断法の改善や、*T. asahii* の病原因子・感染機序の解明が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究は、健常者にも常在・定着する病原真菌の共生・感染メカニズムを明らかにすることを目的とした。

代表的な常在真菌である *Candida* 属菌種の病原性の菌種による違いを解析するとともに、近年、健常者にも定着していることが報告された *T. asahii* の病原性を解析した。

T. asahii は自発的に多様なコロニー形態をおこし、例えば色調の変化を伴う、white 株(W)、off-white 株(O)、yellowish-white 株(Y)が得られる。健常者にも存在する *T. asahii* が感染症をおこすには、コロニー形態を変えることで感染しやすくなるメカニズムがあるのではないかと考え、そのメカニズムを探索した。

3. 研究の方法

(1) *Candida* 属菌種のヒト細胞に対する接着と細胞傷害性

Candida 属菌種として *C. albicans*、*C. glabrata*、*C. parapsilosis* を用いて比較解析した。培養プレート表面への接着性とヒト細胞存在下での接着性を解析した。ヒト細胞として肺胞上皮細胞 A549 とケラチノサイト HaCaT 細胞株を使用し、培養細胞への接着性を示した菌腫について、細胞傷害性を調べた。細胞障害性は乳酸脱水素酵素(LDH)活性を測定することで算出し、菌体と培養細胞を接触させた場合とチャンバーを入れて接触させない場合とを比較した。

(2) *T. asahii* の病原性とコロニー形態

T. asahii の病原性を明らかにするために、溶血性と赤血球凝集能、赤血球に対する菌体の付着性を調べた。コロニー形態によりこれらの性状が異なるかを明らかにするため、M9435 株の各コロニー形態(W, Y, O-type)の菌体、菌体表層分子、さらに培養液に放出される菌体外高分子を調整してウサギ保存血を使用して赤血球凝集反応を調べた。菌体表層分子は塩化リチウムによるマイルドな抽出法を用い、菌体外分泌分子は培養上清から調整した。溶血性は羊血液寒天培地に菌を接種し、37℃、あるいは37℃・5% CO₂ 存在下で4-5日培養して判定した。

4. 研究成果

(1) *Candida* 属菌種のヒト細胞に対する接着と細胞傷害性

Candida 属菌種のヒト細胞に対する接着性を解析した結果、宿主細胞の種類や菌種によって接着性が異なることが示された。*C. albicans* は培養プレートにもヒト細胞にもよく接着した。*C. parapsilosis* は培養プレートにはよく接着したが、ヒト細胞株にはほとんど接着しなかった(図1)。

C. glabrata はプラスチック素材よりも哺乳動物細胞に選択的に接着することが明らかとなった(図2)。そこで、*C. albicans* と *C. glabrata* について細胞傷害性を調べた結果、両菌種とも細胞傷害性は宿主細胞と菌体が直接接する条件で発現することが示された。また、*C. glabrata* はヒトの細胞の種類が異なると接着性にも差があることが示された。この結果から、菌体とヒト細胞の接着の関与が大きく、菌種と組織の組み合わせでも病原性の強度に違いがあることが示された。これらは論文として報告した。

図1

Candida 属菌種のヒト細胞モノレイヤーへの接着性

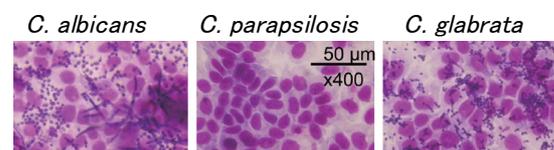
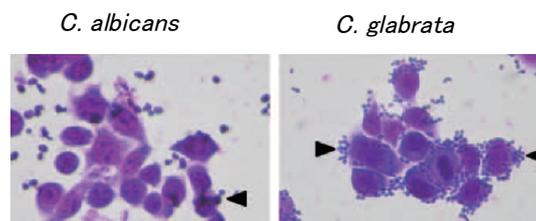


図2

Candida 属菌種のヒト細胞と培養プレートへの接着性



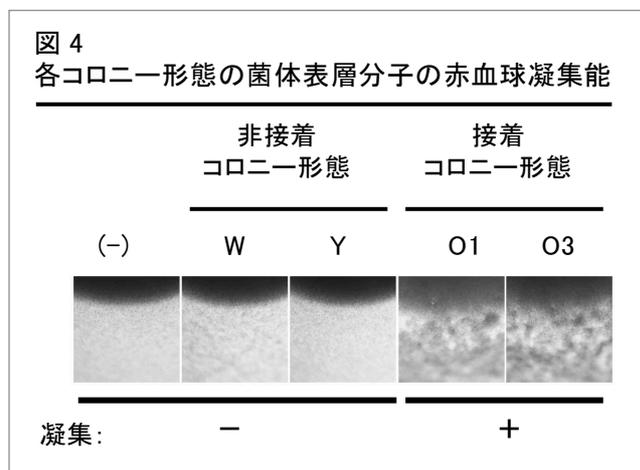
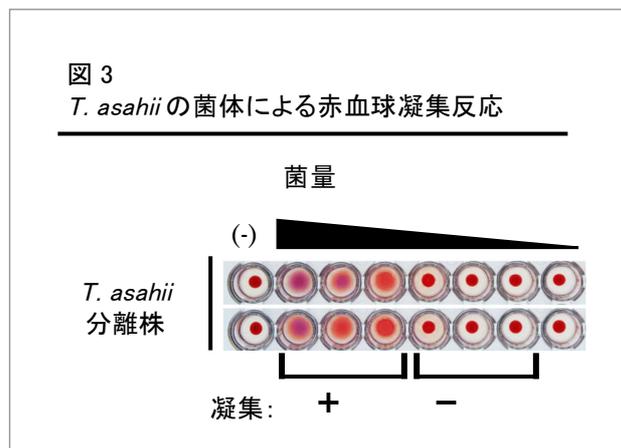
(2) *T. asahii* の病原性とコロニー形態

本研究の結果、*T. asahii* は赤血球凝集性の両方を示すことが明らかとなった (図 3)。*T. asahii* の赤血球凝集能には株差が存在するものの、使用した菌株すべてで凝集を認めた。また菌量を増やすことで凝集能は高くなった。さらに、*T. asahii* 菌体が赤血球に付着することを示した。その際、赤血球は酵母形には強い接着は示さず、*T. asahii* の菌糸系に強く付着した。比較として用いた *C. albicans* よりも全ての株で高い付着性を示した。

また、*T. asahii* は溶血性も示した。溶血性は 37°C に比較して CO₂ 存在下ではやや弱いものの、4 日培養時には、菌の増殖したまわりに赤血球が溶血した環が認められた。溶血環はその後拡散し、培地全体を溶血するように広がった。溶血も使用した全ての株で認められ、*T. asahii* が赤血球凝集と溶血の両方の作用を示すことを明らかにした。

次に、赤血球凝集能について、コロニー形態の違いにより、凝集能に差があるのか、また、菌体を用いない系でも赤血球凝集能を維持するかどうかを調べることにした。W-type、Y-type、O-type 株の菌体表層分子および菌体外分泌分子を用いて赤血球凝集能を調べた。菌体表層分子の凝集反応の結果、いずれも培養プレートに対する接着性の高い O-type のコロニー形態の菌体や高分子が強く赤血球凝集を示した (図 4)。図 4 は各 well の中央部分の顕微鏡写真を示しており、O-type 株では血球が中央に沈まずに凝集することで周囲へ広がっている様子が確認できる。また、菌体外分泌分子においても赤血球凝集反応様の像が認められた。しかし、菌体表層分子で強い凝集が認められたことから、菌体表層の分子が凝集に関与しており、その一部が培養上清へ遊離している可能性が考えられた。これらの結果から、接着性が高い O-type 株で赤血球凝集能が高いことが示され、これが病原因子の一つであると考えられた。特定の接着因子は明らかでないが、宿主の組織細胞や血球に付着する能力では O-type 株での感染が有利であることが示唆された。

この研究で示された様に、*T. asahii* の感染時には溶血と赤血球凝集の総合的な効果が出ていると考えられた。また、*T. asahii* のコロニー形態の多様性と病原性について、今回新たな知見が得られた。これらは論文として報告した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ichikawa Tomoe, Kutsumi Yuri, Sadanaga Jumpei, Ishikawa Moeko, Sugita Daisuke, Ikeda Reiko	4. 巻 60
2. 論文標題 Adherence and Cytotoxicity of Candida spp. to HaCaT and A549 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Mycology Journal	6. 最初と最後の頁 5～10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3314/mmj.18-00011	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 Ichikawa Tomoe, Uchiyama Kota, Yoshizawa Yuta, Arai Yuka, Shimizu Atsuyo, Ikeda Reiko	4. 巻 57
2. 論文標題 Hemagglutination ability and hemolytic activity of Trichosporon asahii	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Mycology	6. 最初と最後の頁 510～514
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/mmy/myy077	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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 貞永淳平、市川智恵、川村昂平、菊池綾乃、森田雄二
2. 発表標題 Trichosporon asahii 菌体表層のヘパリン結合タンパク質の探索
3. 学会等名 第40回関東医真菌懇話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市川智恵、水村友弥、森田雄二
2. 発表標題 Trichosporon asahii 菌体と相互作用するヒト分子の探索
3. 学会等名 第40回関東医真菌懇話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市川智恵、森田雄二、池田玲子
2. 発表標題 病原性酵母の菌体表層に結合する宿主血中分子の探索
3. 学会等名 第63回医真菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 章、三浦真紀、小嶋健太、森田雄二、池田玲子、市川智恵
2. 発表標題 Trichosporon asahii のコロニー形態と栄養飢餓ストレス
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青柳達也、米須文香、酒井瑶実、高橋佳奈、柳澤和輝、久富香蓮、森田雄二、池田玲子、市川智恵
2. 発表標題 有機酸による病原真菌の増殖抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市川智恵、池田祐香、貞永淳平、川村昂平、菊池綾乃、池田玲子
2. 発表標題 Trichosporon asahii のヘパリン結合タンパク質の同定
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市川智恵、池田玲子、森田雄二
2. 発表標題 Trichosporon asahii の高接着株に特徴的な菌体分子の探索
3. 学会等名 第62回医真菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市川智恵、川村昂平、菊池綾乃、内山晃太、吉澤雄太、森田雄二
2. 発表標題 Trichosporon asahii細胞表層のヘパリン結合タンパク質の同定
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小嶋健太、中村章、三浦真紀、市川智恵、森田雄二
2. 発表標題 Trichosporon asahiiのコロニー形態における栄養飢餓ストレス
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水村友弥、市川智恵、森田雄二
2. 発表標題 病原性酵母Trichosporon asahiiおよびCandida albicansの菌体表層に結合するヒト生体分子の探索
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市川智恵、池田玲子
2. 発表標題 Trichosporon asahii の高接着株に特徴的な菌体分子の同定
3. 学会等名 第61回医真菌学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉澤雄太、内山晃太、市川智恵、池田玲子
2. 発表標題 Trichosporon asahiiの溶血性と赤血球凝集能
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川萌子、杉田大輔、市川智恵、池田玲子
2. 発表標題 Candida albicansおよびCandida glabrataの接着性
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市川智恵、小林 巧、坂巻 ひかり、佐藤 有華、池田玲子
2. 発表標題 Trichosporon asahii の高接着コロニー形態に特徴的な分子の探索
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大学内個人ページ
<https://u-lab.my-pharm.ac.jp/~kansen/type2/ichikawa.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
--	---------------------------	-----------------------	----