

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K15154

研究課題名（和文）肺線維症患者の真菌マイクロバイーム解析と真菌が上皮間葉転換に与える影響の検討

研究課題名（英文）Analysis of the fungal microbiome in the lungs of patients with pulmonary fibrosis and the impact of certain fungi on epithelial-mesenchymal transition.

研究代表者

串間 尚子（Kushima, Hisako）

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：90642497

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：Aspergillus fumigatusの胞子を接触させたA549細胞および3T3細胞を3次元培養すると前者ではスフェロイド形成が阻害され、後者ではスフェロイドが増大していた。また前者ではMX1、RSAD2、OASL、TRIM22などのインターフェロンシグナリングに関与する遺伝子の発現が増加していた。これらの結果からA. fumigatusは、上皮のアポトーシスと間質細胞への刺激を介して、間接的に肺の線維化に関与するかもしれないとの知見を見出した。もう一つの研究では、気管支肺胞洗浄液の真菌叢解析を行い、特発性肺線維症の患者では真菌叢のdysbiosisが起こっている可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究では、二つの成果を得た。まず、Aspergillus属の肺への定着が肺の線維化を進展させる原因の一つである可能性を示し、さらに、肺内真菌叢解析の結果から特発性間質性肺炎患者における肺内真菌叢のdysbiosisを確認した。これらは事象の確認に留まるというlimitationはあるが、未だに根本原因が不明で難病の範疇である肺線維症について、真菌という切り口から新たな原因究明や治療方法の新しいアプローチ方法を見出す契機となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Three-dimensional culture of A549 and 3T3 cells contacted with Aspergillus fumigatus spores inhibited spheroid formation in the former and increased spheroid in the latter. In addition, expression of genes involved in interferon signaling, such as MX1, RSAD2, OASL, and TRIM22, was increased in the former. These results led to the finding that A. fumigatus may be indirectly involved in lung fibrosis through epithelial apoptosis and stimulation of stromal cells. Another study analyzed the fungal flora of bronchoalveolar lavage fluid and found that dysbiosis of the fungal flora may occur in patients with idiopathic pulmonary fibrosis.

研究分野：感染症

キーワード：真菌叢 肺線維症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

根本的な原因が明らかになっていない難治性疾患の一つに特発性肺線維症があり、本疾患の根本的な治療法としては肺移植しかないのが現状である。特発性肺線維症の治療薬として、2008年にピルフェニドン、2015年にニンテダニブの2種類の抗線維化薬が発売されるようになったが、この2剤は一部判明している線維化の過程を阻害するもので、根治を期待できるものではない。

また、我々は、2010年から2013年に、呼吸器検体(喀痰、気管支肺胞洗浄液など)の培養でアスペルギルス属が検出された48例を対象とし、基礎疾患、肺アスペルギルス症の病型や定着などについて解析したところ、特発性肺線維症を含む間質性肺炎症例が9例(19%)であった。アスペルギルスが検出された間質性肺炎症例の臨床的背景をみると、間質性肺炎の発症からアスペルギルス検出までの期間は、0から120ヶ月と短期から長期まで幅広く、さらに、一般的に真菌感染のリスク因子となるステロイドの投与歴がない間質性肺炎患者でも、アスペルギルスの定着や慢性進行性肺アスペルギルス症の症例がみられた。

2. 研究の目的

上記のような背景から、一般的に、間質性肺炎の罹病期間が長期に及び、疾患が進行し既存肺構造が破壊された結果としてアスペルギルスが定着し、慢性肺アスペルギルス症を発症すると考えられているが、慢性肺アスペルギルス症は単なる間質性肺炎の終末像ではなく、アスペルギルスそのものが間質性肺炎の発症や病勢進行に関わっているのではないかとの仮説を検証することを目的として研究を開始した。また、従来、肺内は無菌であると考えられていたが、大気中に浮遊している無数の真菌の胞子は肺内に常時取り込まれていることに着目し、間質性肺炎患者における肺内真菌叢の解析も行い他疾患と比較することで、その特徴を見出すことも必要であると考えた。

3. 研究の方法

研究

II型肺胞上皮細胞のin vitroモデルとして広く使用されているA549細胞とマウス肺線維芽細胞3T3細胞に、*Aspergillus fumigatus*の胞子を熱処理して接触させた。培養細胞と胞子を1:10、1:100の割合で接触させ、二次元、三次元の二種類のプレートを用いて培養した。day3、day7の形態の観察、上皮間葉転換やアポトーシスの有無の検証、RNA-sequencing、オントロジー解析を行った。

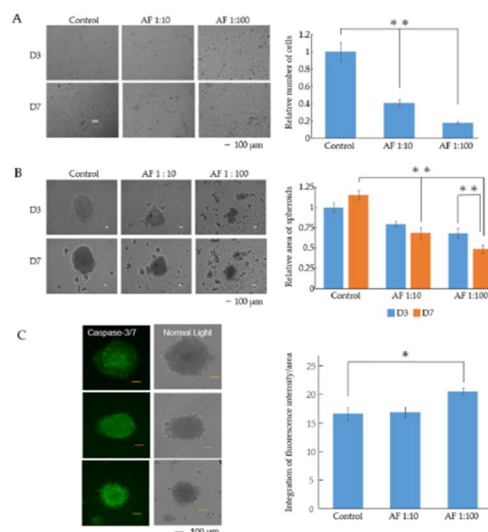
研究

2018年4月~2020年3月、福岡大学病院において、診断のために気管支肺胞洗浄を施行したびまん性肺疾患185症例を対象とした。気管支肺胞洗浄液(BALF)は、回収後速やかに-80で冷凍し保管した。慢性過敏性肺炎、薬剤性肺炎、放射線肺炎など特定の原因が疑われた症例、悪性疾患、ニューモシスティス肺炎や非結核性抗酸菌症などの感染症と最終診断された143例は除外した。最終的に特発性間質性肺炎(IIP)と診断された20例、膠原病関連間質性肺疾患(CTD-ILD)8例、サルコイドーシス8例、および最終的に未診断で自然に陰性が消失した6例を含め、42例を抽出した。BALFからDNAを抽出し、バーコードを付加したITS2領域特異的プライマーを用いてITS2領域を増幅した。増幅産物の得られた29サンプルについて次世代シーケンサを用いて250 bp, paired endでシーケンスを行った。各クラスターの代表配列はGeneDatabaseを元に生物種分類を行い、解析ソフトを用いて各種解析を行った。

4. 研究成果

研究

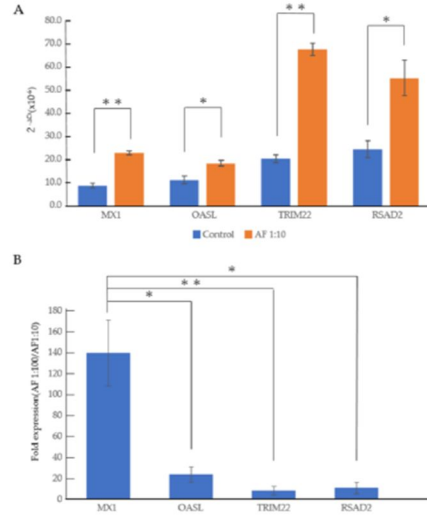
A. fumigatus (AF) と接触させたA549細胞は有意に増殖が抑制された(右図A)。また、3次元培養してスフェロイドを形成させたところ、AFと接触させたA549のスフェロイドは不完全なものとなった(右図B)。これらの結果から、アスペルギルスがA549細胞の増殖を抑制することが示唆された。さらに、カスパーゼ-3/7を測定すると、1:100の割合で細胞とAFを接触させた群でコントロールの1.2倍のシグナルがでていた(右図C)。この結果から、AFのA549細胞に対する増殖抑制にはA549のアポトーシスが関与していることを示唆していると考えた。上皮間葉転換関連のマーカーであるZ0-1、e-カドヘリン、ビメンチンのウエスタンブロットを行ったところ、一貫した変化はみられなかった。



a

一方、AF との接触により 3T3 細胞の増殖は促進され、アポトーシスは誘導されないことを確認した。

RNA シークエンスを行い、オントロジー解析を行ったところ、インターフェロンシグナルに関連する遺伝子 (MX1, OASL, RSAD2, TRIM22) の発現が増加していた。さらに、発現が増強していたこの 4 種の遺伝子間で比較をすると、MX 1 の発現が特に強かった (右図)。

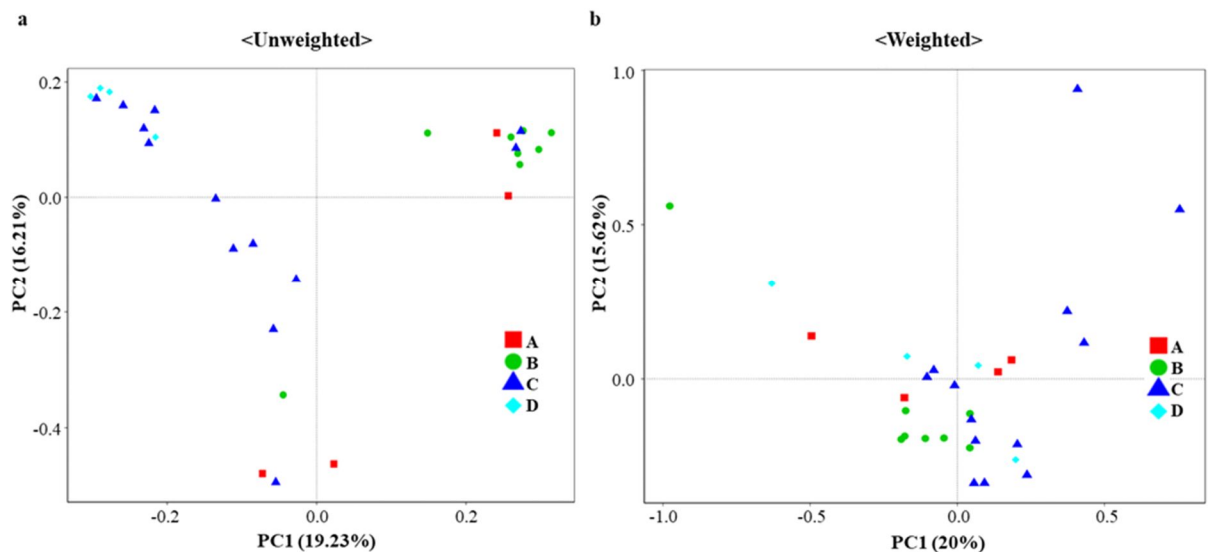
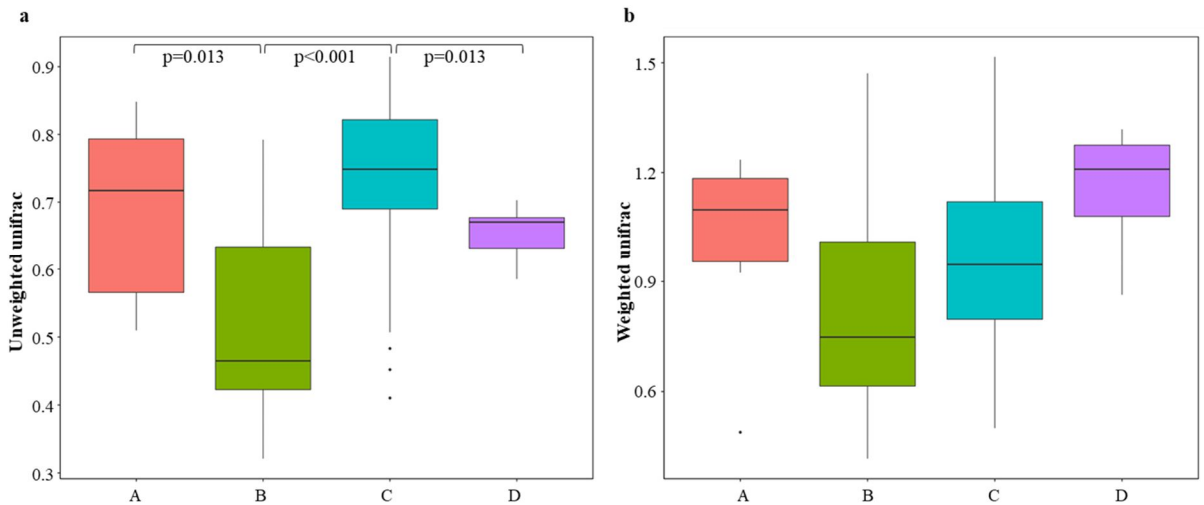


研究

下図に diversity 解析の結果を示す。

- A: 膠原病関連間質性肺炎
- B: サルコイドーシス
- C: 特発性間質性肺炎
- D: 自然消失

UniFrac法を用いてUniFrac距離を出し、各疾患群を比較するとサルコイドーシスのUniFrac距離平均値は他の疾患群より有意に低く、特発性間質性肺炎では相当に異なることが分かった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kushima Hisako, Tsunoda Toshiyuki, Matsumoto Taichi, Kinoshita Yoshiaki, Izumikawa Koichi, Shirasawa Senji, Fujita Masaki, Ishii Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Effects of <i>Aspergillus fumigatus</i> Conidia on Apoptosis and Proliferation in an In Vitro Model of the Lung Microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1435 ~ 1435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms9071435	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 申間尚子
2. 発表標題 びまん性肺疾患における肺内真菌叢解析
3. 学会等名 第64回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 申間尚子
2. 発表標題 <i>Aspergillus fumigatus</i> が肺の微小環境モデルに与える影響
3. 学会等名 真菌症フォーラム2020学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 申間尚子
2. 発表標題 びまん性肺疾患における肺内真菌叢解析
3. 学会等名 第90回九州真菌懇話会・第5回日本医真菌学会九州・中四国支部会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------