

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19529

研究課題名(和文)抑制性受容体を介する免疫抑制に着目した播種性カンジダ症の病態解明及び治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of pathology of disseminated candida infection and development of new therapy by focusing on immune suppression with an inhibitory receptor

研究代表者

金城 雄樹 (KINJO, Yuki)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：20570831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：カンジダ属は口腔、腸管や泌尿生殖器に常在する真菌である。免疫低下症例では、カンジダが腸管から血中や臓器に播種することで、致命率の高いカンジダ血症や播種性カンジダ感染症をおこすと考えられている。本研究では動物モデルを用いて、腸管からのカンジダの播種機構を解析し、病態の理解に繋がる知見を得た。また、失明の危険性があるカンジダ眼内炎の発症機構および病態の一端を明らかにした。さらに、カンジダ血症の治療の標的となる可能性がある分子を見出した。加えて、健常女性で問題となるカンジダ膣炎に対する免疫賦活法の効果を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、動物モデルを用いて、カンジダ血症、播種性カンジダ感染症やカンジダ眼内炎の発症機構および病態を理解する上で有用となる知見を得ることができた。また、カンジダ血症の治療の標的となる可能性がある分子を見出すとともに健常女性で問題となるカンジダ膣炎に対する免疫賦活法の効果を明らかにしたことは学術的に意義があるものと考えられる。本研究の結果に基づき研究を進展させることで、カンジダ血症、播種性カンジダ感染症やカンジダ膣炎の制御法の開発に繋がる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Candida species are fungi that colonize in oral cavity, intestine and urogenital organs. In immunocompromised patients, Candida species disseminate to blood and several organs from intestine and cause candidemia and disseminated candida infection with high mortality rate. In this research, we analyzed the mechanisms of dissemination of Candida species from intestine by using an animal disease model and obtained useful data to understand the pathology of Candida dissemination. We also elucidated the mechanism of ocular candidiasis. Further, we found a candidate molecule that can be a target of treatment for candidemia. Moreover, we found the effect of an immune-stimulation against vulvovaginal candidiasis.

研究分野：感染免疫学

キーワード：カンジダ血症 腸管 カンジダ眼内炎 抑制性受容体 NKT

1. 研究開始当初の背景

カンジダ属真菌はアスペルギルス属と共に、二大深在性真菌感染症の原因である。カンジダ属は菌血症の主な原因真菌であり、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ている。カンジダ属の中で *Candida albicans* は最も頻度が高く、院内 ICU 部門のカテーテル関連血流感染症の原因菌の中で 3 番目に多い（2019 年度厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業 JANIS）。

カンジダ属は口腔、腸管や泌尿生殖器の常在性真菌である。健常人で問題となるカンジダ感染症としては膣カンジダ症や主に新生児・乳児でみられる口腔カンジダ症（鵝口瘡）があげられる。しかし、食道カンジダ症、カンジダ血症や播種性カンジダ感染症は、通常、健常人での発症は認められず、後天性免疫不全症候群（AIDS）、免疫抑制剤投与、好中球減少症、血液疾患領域などの悪性腫瘍性疾患などの免疫低下症例にて発症を認める。

ひとたび、カンジダ血症や侵襲性カンジダ感染症を発症すると抗真菌薬による積極的な治療においても、致命率が高いことが問題となっている。また、侵襲性真菌感染症に対する抗真菌薬の種類が少ないことも問題である。エキノキャ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おり、動向が注目されている（Alexander et al. Clin Infect Dis 2013, Verweij et al. Drug Resist Updat 2015, Sanglard. Front Med 2016）。さらに、近年、*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）。本邦では *C. auris* 感染症は現時点では大きな問題になってはいないものの、今後の動向に注意が必要である。

カンジダ血症の重要な合併症の 1 つにカンジダ眼内炎がある。未治療のままでは失明に至ることからカンジダ眼内炎のスクリーニングが必要である。カンジダ眼内炎の治療に際しては、少ない種類の抗真菌薬の中から、眼内移行性を考量して治療薬を選択する必要がある。このような背景から、カンジダ眼内炎の発症機構および病態解明は重要である。

上述のように、カンジダ感染症の発症および病態には宿主の免疫能および炎症応答との関係が深いことから、免疫細胞および免疫応答に焦点をあてた解析も必要である。白血球単一免疫グロブリン様受容体 3（LMIR3, CD300f）はペア型免疫受容体のひとつで、細胞内に抑制性のアミノ酸配列をもつ抑制型受容体である。しかし、カンジダ感染症に対する免疫応答における LMIR3 の関与については明らかになっていない。

リンパ球のナチュラルキラー T（NKT）細胞は多様に乏しい T 細胞受容体により糖脂質抗原を認識する。NKT 細胞は糖脂質抗原の認識後速やかに、インターフェロン γ （IFN γ ）やインターロイキン 4（IL-4）などのサイトカインを大量に産生して、自然免疫応答を増強するとともに獲得免疫の誘導を促進する。そのような特徴により、NKT 細胞の活性化は炎症応答を増強することでカンジダ血症の増悪をもたらす（Tarumoto, Kinjo, et al. J Infect Dis 2014）。また、NKT 細胞はある種の腸内細菌の糖脂質抗原を認識する（Kinjo et al. Nature 2005）。しかし、糖脂質抗原による NKT 細胞の活性化が腸管からのカンジダ播種やカンジダ膣炎の経過に及ぼす影響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、カンジダ血症・播種性カンジダ症の病態解明および新規治療法の開発を目指し、播種性カンジダ症のマウスモデルの構築、発症機構および病態の解析を行った。また、カンジダ血症の合併症として重要なカンジダ眼内炎の病態解明を目指して、*C. albicans*、*Candida glabrata* と *Candida parapsilosis* を用いて、マウスでのカンジダ眼内炎の発症と病態を解析した。さらに、カンジダ感染症に対する治療標的の候補を検討することを目的として、カンジダ血症のマウスモデルを用いて、カンジダ感染に対する免疫応答における抑制性受容体 LMIR3 の役割を解析した。加えて、カンジダ膺炎の病態解明および治療法の検討を行うことを目的として、糖脂質抗原による NKT 細胞の活性化を介した抗真菌作用について解析を行った。

3. 研究の方法

(1) カンジダ属の腸管定着および播種に関するマウスモデルの解析

C57BL/6 マウスに、*C. albicans* 投与前に抗菌薬入り水を一定期間、自由飲水させた。一部の実験では、抗菌薬 2 剤（ゲンタマイシンおよびクリンダマイシン）飲水後に 1.5% デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）の飲水により腸管粘膜障害を誘導した。ゾンデを用いて、*C. albicans* (SC5314 株) を胃内投与した。また、ステロイドによる軽度免疫低下状態を構築するために酢酸コルチゾンを経口投与した。

Clostridium difficile と *C. albicans* の共感染の実験においては、*C. difficile* の定着を促す目的で腸内細菌を排除するために、5 剤の抗菌薬（バンコマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、メトロニダゾール、コリスチン）入りの水を自由飲水させた。さらに、クリンダマイシンを投与した後、嫌気条件下で培養した *C. difficile* を胃内投与した。

DSS 投与や *C. difficile* の投与を行わない実験では、抗菌薬 4 剤（バンコマイシン、ネオマイシン、アンピシリン、メトロニダゾール）のカクテルを用いた。また、anti-Gr-1 抗体を投与して好中球の除去による影響を検討するとともに、糖脂質抗原を胃内接種した。

C. albicans 感染後に糞便中、肝臓、腎臓の真菌数（および細菌数）を測定した。

(2) カンジダ眼内炎の解析

C. albicans および non-albicans *Candida* のカンジダ眼内炎の発症を比較検討するため、*C. albicans* (SC5314 株, SF-30 株), *C. glabrata* (CBS138 株, SF-31 株), *C. parapsilosis* (ATCC22019 株, TOR-1 株) を静脈内投与した。感染 3 日後に眼内における真菌数の測定を行うとともに、ELISA 法による炎症性サイトカインおよびケモカイン (IL-6, CXCL1, CXCL2 および CCL2) の産生を測定した。また、カンジダ感染後の眼内に集積する炎症細胞についてフローサイトメトリー解析を行った。さらに、眼の切片を作製し、HE 染色、PAS 染色および GMS 染色を行い、眼内炎の病理学的解析を行った。

(3) 抑制性受容体 LMIR3 欠損マウスを用いた抗真菌・抗細菌活性の解析

野生型および LMIR3 欠損マウスに *C. albicans* (SC5314 株) を静脈内投与し、感染後の生存期間を観察するとともに腎臓内真菌数を比較解析した。また、これらのマウスに緑膿菌 (PAO1 株) を腹腔内投与し、感染後の生存期間を観察するとともに腎臓内および肝臓内の真菌数を比較

解析した。さらに、野生型および LMIR3 欠損マウスの骨髄から精製した好中球を緑膿菌または *C. albicans* と培養し、抗細菌活性および抗真菌活性を解析した。

(4) カンジダ膣炎マウスモデルにおける糖脂質抗原投与効果の解析

C57BL/6 雌マウスにカンジダ膣炎をおこし、NKT 細胞を活性化する糖脂質抗原を投与した。糖脂質投与の有無で感染後の膣内カンジダ数を比較解析するとともに、膣内に集積する炎症細胞についてフローサイトメーターを用いて比較解析を行った。

4. 研究成果

1) 軽度免疫低下マウスでのカンジダ播種の解析

播種性カンジダ症例では、ステロイド投与による免疫抑制や腸管粘膜障害を認めるケースも多い。ステロイド投与により軽度細胞性免疫低下状態を誘導したマウスを用いて、腸管からのカンジダ播種を解析した。ステロイド投与マウスへの *C. albicans* の胃内接種により、肝臓や腎臓への真菌の播種を認めた。これまで高度の好中球減少や免疫低下状態での解析報告が多かったが、本研究にて好中球非減少・軽度細胞性免疫低下マウスを用いたカンジダ播種モデルを構築することができた。

2) 細菌・カンジダ共感染マウスモデルでの腸炎および真菌播種の解析

C. albicans の播種性感染症の症例では、発症時には抗菌薬が投与されているケースが多い。腸管内常在菌の *C. difficile* は、抗菌薬投与症例にて偽膜性大腸炎などをおこすことから、*C. albicans* 感染症の病態への関与の可能性が考えられる。マウスへの胃内接種により *C. albicans* および *C. difficile* を腸管内に定着させ、体重の推移、便の性状および、腸管内や糞便中の細菌数や真菌数の推移を解析するとともに、肝臓や腎臓などの臓器への播種を解析した。*C. albicans*・*C. difficile* (CA/CD) 共感染では、単独感染と比較して体重減少が顕著で、感染の増悪を認めた。また、CA/CD 共感染の病態解明を目的として、リンパ球の natural killer T (NKT) 細胞を欠損したマウスを用いて解析を行った。その結果、CA/CD 共感染の病態に NKT 細胞が関与する可能性が示唆された。近年、市中発症型の *C. difficile* 感染症の増加が注目されている。*C. albicans* 感染の発症および増悪における *C. difficile* 感染症の関与については今後も解析が必要と考えられた。

3) カンジダ腸管定着および播種マウスモデルの条件再検討

腸管における *C. albicans* の定着を促すための抗菌薬の種類および投与期間の再検討を行った。また、ステロイド投与に加えて、anti-Gr-1 抗体投与による好中球除去の効果を解析した。さらに、糖脂質抗原を胃内に投与し、*C. albicans* の腸管からの播種の解析を行った。以上の解析および前述の解析の結果から、各実験条件での特徴を確認することができ、腸管からの *C. albicans* の播種の解析を行う上で、有用な知見が得られた。また、糖脂質抗原を介した腸管の NKT 細胞の活性化が *C. albicans* の播種に影響をもたらす可能性が示唆された。

4) カンジダ眼内炎の病態解析

カンジダ血症の重要な合併症であるカンジダ眼内炎の病態解明を目指して、*C. albicans*, *C. glabrata* と *C. parapsilosis* を用いて、マウスの眼内炎の発症と病態を解析した。眼内の真菌数は *C. albicans* 感染群で他の 2 群と比較して有意に多かった。また、病理学的解析およびフローサイトメトリー解析の結果、*C. albicans* 感染群では眼内に好中球や炎症性単球の浸潤を認めたと対し、*C. glabrata* 感染群および *C. parapsilosis* 感染群では、炎症細胞の集積をほとんど認めなかった。*C. albicans* 感染群では、眼内の IL-6、CXCL1、CXCL2 および CCL2 の有意な上昇を認めるとともに、これらのサイトカイン・ケモカインの産生と真菌数の間に強い正の相関を認めた(発表論文 1)。以上の結果より、*C. albicans* は血流感染に伴い、眼内へ浸潤して増加することで、サイトカイン・ケモカイン産生を誘導し、好中球や炎症性単球を集積させることにより眼内炎を引き起こすことが示唆された。マウスモデルおよび臨床症例での解析から、*C. albicans* は non-*albicans Candida* と比較して、眼内炎の発症と深く関与することが示唆された。本研究にて構築したマウス眼内炎モデルは、眼内炎の病態の解析や抗真菌薬の効果の判定など種々の解析に有用と考えられる。

5) カンジダ感染に対する免疫応答における抑制性受容体 LMIR3 の役割の解析

好中球や B 細胞などに発現する抑制性受容体の LMIR3 分子に着目して解析を行った。LMIR3 欠損マウスの好中球を用いて解析を行ったところ、*C. albicans* や緑膿菌に対する殺菌活性が高いことを見出した。その結果と一致して、*C. albicans* や緑膿菌の感染実験にて、LMIR3 欠損マウスでは野生型マウスと比較して感染抵抗性を示した(発表論文 2)。抑制性受容体 LMIR3 はカンジダや緑膿菌に対する好中球の殺菌作用を抑制的に制御する役割を担うことが示唆された。

6) 糖脂質抗原を介した NKT 細胞の活性化がカンジダ膣炎の経過に及ぼす影響の解析

カンジダ属は主に免疫低下症例にカンジダ血症や播種性カンジダ感染症をおこすが、カンジダ膣炎は比較的多くの健常女性に問題をおこす。カンジダ膣炎の病態解明および治療法の開発を目指し、マウスモデルを構築して解析を行った。*C. albicans* を膣内投与したマウスにおいて、NKT 細胞を活性化する糖脂質の投与効果について対照群と比較した。その結果、糖脂質投与群では膣内の炎症細胞浸潤の増加およびカンジダ数の減少を認めた。糖脂質投与による NKT 細胞の活性化は、*C. albicans* 膣炎の改善をもたらすことが示唆された(論文投稿済み)。

本研究では、カンジダ血症および播種性カンジダ症の病態の解明、特に腸管からのカンジダ播種機構の解明を目指し、種々の異なる条件のもと解析を行い、有用な知見が得られた。しかし、臨床症例の病態をよく反映した実験系の構築のため、さらなる検討が必要である。また、カンジダ血症の治療法の開発を目指し、治療標的の候補として、抑制性受容体 LMIR3 の役割について解析を行い、LMIR3 を標的とすることでカンジダ血症の改善をもたらす可能性を示唆する結果を得た。さらに、カンジダ膣炎に対する糖脂質抗原による免疫活性化の有用性を示唆する結果を得た。本研究にて得られた知見をもとに、さらなる解析を行い、カンジダ血症および播種性カンジダ症の病態の解明および治療法の開発に繋げたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Abe M, Nakamura S, Kinjo Y, Masuyama Y, Mitsuyama J, Kaku M, Miyazaki Y.	4. 巻 74
2. 論文標題 fficacy of T-2307, a novel arylamidine, against ocular complications of disseminated candidiasis in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Antimicrob Chemother	6. 最初と最後の頁 1327-1332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jac/dkz020.	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 -
1. 著者名 Abe Masahiro, Kinjo Yuki, Ueno Keigo, Takatsuka Shogo, Nakamura Shigeki, Ogura Sho, Kimura Muneyoshi, Araoka Hideki, Sadamoto Sota, Shinozaki Minoru, Shibuya Kazutoshi, Yoneyama Akiko, Kaku Mitsuo, Miyazaki Yoshitsugu	4. 巻 9
2. 論文標題 Differences in Ocular Complications Between Candida albicans and Non-albicans Candida Infection Analyzed by Epidemiology and a Mouse Ocular Candidiasis Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 2477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2018.02477	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 Ueno Keigo, Urai Makoto, Izawa Kumi, Otani Yoshiko, Yanagihara Nao, Kataoka Michiyo, Takatsuka Shogo, Abe Masahiro, Hasegawa Hideki, Shimizu Kiminori, Kitamura Toshio, Kitaura Jiro, Miyazaki Yoshitsugu, Kinjo Yuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Mouse L1MR3/CD300f is a negative regulator of the antimicrobial activity of neutrophils	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-35699-4	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 Takahashi Mariko, Izawa Kumi, Urai Makoto, Yamanishi Yoshinori, Maehara Akie, Isobe Masamichi, Matsukawa Toshihiro, Kaitani Ayako, Takamori Ayako, Uchida Shino, Yamada Hiromichi, Nagamine Masakazu, Ando Tomoaki, Shimizu Toshiaki, Ogawa Hideoki, Okumura Ko, Kinjo Yuki, Kitamura Toshio, Kitaura Jiro	4. 巻 12
2. 論文標題 The phytosphingosine-CD300b interaction promotes zymosan-induced, nitric oxide?dependent neutrophil recruitment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaar5514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aar5514	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 -

1. 著者名 Morino S, Kitagami E, Nakayama H, Koizumi Y, Tanaka-Taya K, Kinjo Y, Oishi K.	4. 巻 38
2. 論文標題 Seroepidemiological analysis of anti-pneumococcal surface protein A (PspA) immunoglobulin G by clades in Japanese population	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 7479-7484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2020.09.068	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 -

1. 著者名 Hoshina T, Aonuma H, Ote M, Sakurai T, Saiki E, Kinjo Y, Kondo K, Okabe M, Kanuka H	4. 巻 40
2. 論文標題 Intensive diagnostic management of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in academic settings in Japan: challenge and future	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-020-00147-2	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 Sugimoto S, Yamanaka K, Niwa T, Terasawa Y, Kinjo Y, Mizunoe Y, Ogura T	4. 巻 433
2. 論文標題 Hierarchical Model for the Role of J-Domain Proteins in Distinct Cellular Functions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 166750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2020.166750	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 Chang B, Kinjo Y, Morita M, Tamura K, Watanabe H, Tanabe Y, Kuronuma K, Fujita J, Oshima K, Maruyama T, Abe S, Kasahara K, Nishi J, Kubota T, Ohnishi M, Suga S, Oishi K, and the Adult IPD Study Group	4. 巻 11
2. 論文標題 Distribution and variation of serotypes and pneumococcal surface protein A	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 617573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2021.617573	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 阿部雅広, 金城雄樹, 上野圭吾, 賀来満夫, 宮崎義継
2. 発表標題 ステロイド投与下の免疫抑制マウスにおける腸管からのCandida属播種モデル構築に関する研究
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部 雅広, 金城 雄樹, 上野 圭吾, 澁谷 和俊, 賀来 満夫, 宮崎 義継
2. 発表標題 Candida albicans 眼内炎マウスモデルの構築及び同モデルを用いた眼内炎発症機序に関する解析
3. 学会等名 第67回日本感染症学会東日本地方学術集会・第65回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部 雅広, 名木 稔, 東 祥嗣, 金城 雄樹, 宮崎 義継
2. 発表標題 ステロイド投与下の免疫Vulvovaginal candidiasisにおけるNKT細胞の役割解析
3. 学会等名 第64回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 金城 雄樹	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 690
3. 書名 グラム陽性偏性嫌気性球菌. アクチノミセス属(放線菌属). 敗血症の病態. 監修 神谷 茂、編集 錫谷 達夫、松本 哲哉. 標準微生物学 第14版	

〔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
研究分担者	高塚 翔吾 (Takatsuka Shogo) (90609398)	国立感染症研究所・真菌部・主任研究官 (82603)	
研究分担者	阿部 雅広 (Abe Masahiro) (10865174)	国立感染症研究所・真菌部・研究員 (82603)	

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