

氏名（本籍）	<small>とよしま たかし</small> 豊嶋 隆志（山口県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 289 号
学位授与の日付	平成 30 年 7 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	外因性 β -glucan の <i>Aspergillus fumigatus</i> の薬剤感受性ならびに細胞壁構造への影響に関する研究
論文審査委員	（主査）教授 大野 尚仁 教授 野口 雅久 教授 平野 俊彦

論文内容の要旨

近年の医療の発達は目覚ましく、人々はより長生きできるようになった。しかしながら、高齢者または治療により免疫機能の低下した患者など易感染性患者が増加するにつれて、日和見感染症の脅威が増している。アスペルギルスは免疫機能が低下した人にとっては致命的な感染症を引き起こす、代表的な日和見感染症起因真菌である。剖検例による調査によると、アスペルギルスは日和見感染症起因真菌の中でカンジダ、クリプトコックスをおさえて、最多となっている。アスペルギルスの中でも *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) は胞子のサイズが小さく病原性が高く、臨床上非常に重要な真菌の 1 つである。アスペルギルスによる感染症は移植、悪性腫瘍などの基礎疾患を持つ患者に多く、進行例では余後が悪い。治療薬にはアゾール系の Voriconazole や Itraconazole, ポリエン系の Amphotericin B, キャンディン系の Micafungin, Caspofungin などが用いられる。現在のところ、本邦で利用できるアスペルギルス症の治療薬はこれら 3 系統、5 種類の薬剤だけである。そのような中、近年アゾール耐性株の報告が多く、問題となりつつある。

β -glucan は chitin や galactomannan とともに、真菌の代表的な細胞壁構成多糖成分である。真菌の細胞壁成分は成長過程で細胞外へ放出される。感染局所では、 β -glucan を含む細胞壁成分が血中よりも豊富に存在することが考えられる。 β -glucan は宿主において Dectin-1 などの受容体により認識され、食食促進、サイトカイン産生など様々な免疫応答を引き起こすことがよく知られている。一方、外因性の β -glucan の真菌に対する影響を検討した例はほとんどない。これまでに当教室の石橋らは外因性の β -glucan の真菌に対する成長促進作用、静置培養初期の菌糸形態変化作用などを報告している。しかしながら、 β -glucan が真菌感染症の増悪因子とな

るのかはいまだ不明な点が多い。そこで本研究では外因性の β -glucanが *A. fumigatus* 感染症の治療における増悪因子となるのかを検討することを目的とし、形態、抗真菌薬感受性および細胞壁構造への影響について検討した。

本研究では、第1章で外因性 β -glucanの抗真菌薬感受性について検討し、第2章では、外因性 β -glucanの *A. fumigatus* 細胞壁の構築への影響について、抗真菌剤の存在下ならびに非存在下条件で比較検討した。

第1章 外因性 β -glucanの *A. fumigatus* 抗真菌薬感受性への影響

第1節 抗真菌薬に対する感受性への影響

第1節では、外因性 β -glucanの *A. fumigatus* 抗真菌薬感受性への影響を検討することを目的に、C-limiting mediumを用い、炭素源の一部を Sucrose, Glucose, β -glucan [Laminarin (TCI社, 由来: *Eisenia bicyclis*)] に置換した培地を調製した。その培地を用い、抗真菌薬感受性を微量液体培地希釈法にて検討した。菌株には標準株 *A. fumigatus* NBRC33022 を用いた。薬剤には、アズール系の Voriconazole, ポリエン系の Amphotericin B, キャンディン系の Micafungin) を用いた。その結果、 β -glucanを培地中に添加するとキャンディン系抗真菌薬, Micafungin に対する感受性が低下した。一方、アズール系, Voriconazole, ポリエン系, AmphotericinB に対する感受性は変化しなかった。(Fig. 1)

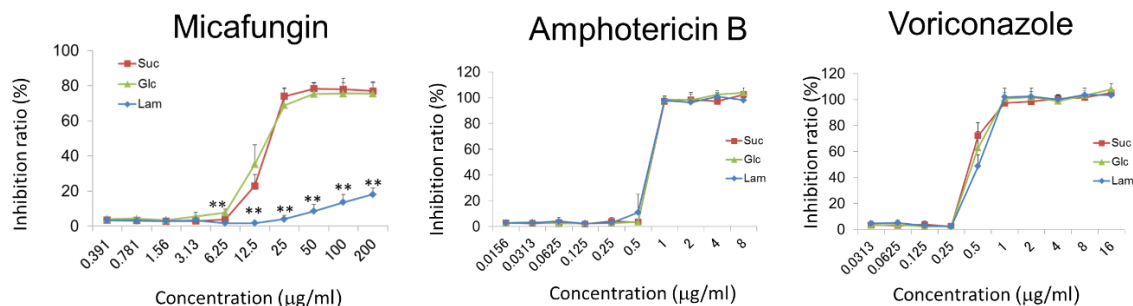


Fig. 1. Antifungal susceptibility of *A. fumigatus* cultured with β -glucan.

Spores (2×10^4 conidia/ml) of *A. fumigatus* were inoculated into C-limited medium and incubated at 37°C with $5\% \text{CO}_2$ for 24 h (micafungin) or 48 h (amphotericin B, voriconazole). Then CellTiter-Blue solution was added and incubation was continued for an additional 4 h. After centrifugation, reduced dye was measured in the supernatant at 600 nm. Suc: C-limiting medium + 0.5% sucrose. Glc: C-limiting medium + 0.5% glucose. Lam: C-limiting medium + 0.5% laminarin.

Values represent the mean \pm standard deviation, $n = 3$ or 4. Significant difference from sucrose: $**p < 0.01$ (Suc vs Lam)

第2節 β -glucan 合成阻害薬に対する感受性の特徴

この現象について菌株間比較をするため、*A. fumigatus* NBRC33022 に加え、NBRC30870, NBRC31952, NBRC7080 について IC50 値を測定した。その結果、い

ずれの菌株においても β -glucan 添加により Micafungin に対する感受性が 4~8 倍低下した。次に、同類の薬剤である Caspofungin を用いて IC50 値を比較したところ、同様の効果が認められた。

これらのことから、外因性 β -glucan は *A.fumigatus* のキャンディン系抗真菌薬の感受性を低下することが明らかとなり、深在性真菌症の治療において注視すべき現象であることを示唆した。

第 2 章 外因性 β -glucan の *A. fumigatus* 細胞壁への影響

第 1 節 *A. fumigatus* の形態ならびに細胞壁多糖構造への影響

【*A. fumigatus* 菌糸の伸長ならびに分岐への影響】 これまでに当教室では培地中に β -glucan を添加することで、静置培養初期の菌糸形態が変化することを報告している。そこで本節では標準株 *A. fumigatus* NBRC33022 株における菌形態が外因性 β -glucan により受ける影響について検討した。

完全合成培地 C-limiting medium を用い、炭素源の一部を Sucrose または Laminarin に置換した培地を調整した。その培地を用い、静置培養し、培養初期ならびに中期に菌糸形態を観察した。その結果、培養初期において、 β -glucan 非添加条件では、放射状の分岐が多数見られたのに対し、 β -glucan 添加条件では分岐が少なく線状であった。培養中期において、 β -glucan 非添加条件では放射状にまっすぐ伸びた菌糸、 β -glucan 添加条件では網目状の菌糸となった。次に、振とう培養し菌糸形態を観察した。その結果、 β -glucan 非添加条件では粒子状、 β -glucan 添加条件ではふわっとした毬藻状となった。顕微鏡で観察したところ、 β -glucan 非添加条件での粒子状の菌形態の外側にはごく短い菌糸が見られた一方、 β -glucan 添加条件での菌糸は密度が低くほぐれていた。これらのことから、外因性 β -glucan は静置培養初期だけでなく、増殖期の菌に対しても、*A. fumigatus* の形態を変化させることが示された。

【低浸透圧耐性への影響】 次に、 β -glucan 添加時の *A. fumigatus* の浸透圧抵抗性への影響を低浸透圧条件下での色素の浸透性を指標に検討した。その結果、 β -glucan 添加群では低浸透圧においても色素の浸透性が低く、浸透圧ストレス抵抗性が増加することが明らかとなった。このことは、キャンディン系抗真菌薬に対する感受性低下と関連するものと推察される。

【*A. fumigatus* 細胞壁多糖構造への影響】 細胞壁は真菌の構造維持に重要な構成要素であることから、抗真菌薬のターゲットの 1 つとされている。これまでの当教室の研究で外因性 β -glucan 添加は、*A. fumigatus* NBRC30870 株の次亜塩素酸酸化処理菌体の β -glucan 含量を増加させることを報告している。そこで、外因性 β -glucan が *A. fumigatus* 細胞壁に対しどのような影響を及ぼすか標準株 NBRC33022 株を用いて、特異抗体、特異的レクチンの結合性ならびに β -glucan 合成酵素遺伝子発現の観点から検討した。

C-limiting medium を用い、炭素源の一部を Sucrose または Laminarin とした。それぞれの培地で *A. fumigatus* を培養し、メタノール固定後、抗 β -1,3-glucan 抗体、Dectin-1、Wheat Germ Agglutinin (WGA) を用い蛍光染色し、顕微鏡観察した。その結果、抗 β -1,3-glucan 抗体の結合性は外因性 β -glucan により増加した。一方、Dectin-1 の結合性は外因性 β -glucan により減少した。また、WGA の結合性は外因性 β -glucan の有無にかかわらず同様であった。これらのことから、外因性 β -glucan は *A. fumigatus* 細胞壁 β -glucan の構造を変化させていることが示唆された。

次に、 β -glucan 合成酵素（触媒サブユニット Fks1, 調節サブユニット Rho1）の遺伝子発現に及ぼす外因性 β -glucan の影響について検討した。その結果、*fks1* 発現量に違いは見られなかったが、*rho1* 発現量は増加した。これらのことから、細胞壁 β -glucan の増加、および Micafungin 感受性低下は薬剤のターゲット Fks1 ではなく、その調節サブユニットの発現調節への影響によるものであることが示唆された。

第 2 節 β -glucan 合成阻害薬の *A. fumigatus* 細胞壁多糖構造への影響

第 1 節では通常培養時における *A. fumigatus* の外因性 β -glucan による細胞壁構造への影響を検討した。そこで第 2 節では Micafungin 存在下における外因性 β -glucan の *A. fumigatus* 細胞壁への影響を検討した。C-limiting medium を用い、炭素源の一部を Sucrose または Laminarin に置換した培地を調整した。それぞれの培地で *A. fumigatus* を培養し、メタノール固定後、抗 β -1,3-glucan 抗体、Dectin-1、WGA を用い蛍光染色し、顕微鏡観察した。まず、胞子を Micafungin (10 μ g/ml) で処理した後に培養し、メタノール固定後、抗 β -1,3-glucan 抗体、Dectin-1、WGA を用い蛍光染色し、顕微鏡観察した。その結果、外因性 β -glucan の有無のいずれの菌糸においても、抗 β -1,3-glucan 抗体および Dectin-1 の結合はほとんど認められなかった。一方、WGA の結合は、いずれも菌糸においても認められた。次に、成長中の菌糸に Micafungin (10 μ g/ml) を添加し、同様に顕微鏡観察した。その結果、外因性 β -glucan 存在条件下で、Micafungin 処理時に菌糸側面からの新生分岐が多数見られ、その分岐は抗 β -1,3-glucan 抗体および Dectin-1 とは結合せず、WGA と結合した。(Fig.2) これらのことから、 β -glucan 合成阻害時において、*A. fumigatus* は chitin を主構成多

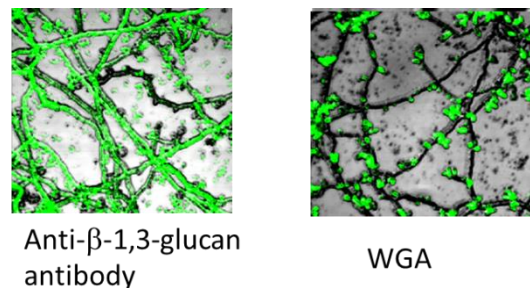


Fig. 2. Localization of cell wall β -glucan and chitin of *A. fumigatus* when *A. fumigatus* growing hyphae were cultured with micafungin in the presence of β -glucan.

A. fumigatus spores (2×10^4 conidia/ml) were cultured at 37°C for 15-16 hours, and micafungin (10 μ g/mL) was added to *A. fumigatus* growing hyphae. Then, *A. fumigatus* growing hyphae was cultured with micafungin for 4 hours, and the cells were fixed with methanol, and localization of β -glucan and chitin in the cell walls were assessed by staining with Alexa Fluor 488-conjugated anti- β -1,3-glucan antibody (1A5) or FITC conjugated wheat germ Agglutinin (WGA), and assessed by fluorescence microscopy.
WGA: Chitin binding lectin

糖とした細胞壁構造へと変化していると考えられた。

総括

本論文では，外因性 β -glucan の *A. fumigatus* 抗真菌薬感受性への影響を検討し，外因性 β -glucan が *A. fumigatus* のキャンディン系抗真菌薬 Micafungin および Caspofungin に対する感受性を低下させることを明らかにした（第 1 章）．そのメカニズムに 1) 外因性 β -glucan による浸透圧ストレスに対する抵抗性の増加，2) β -glucan 合成酵素の調節サブユニット Rho1 の遺伝子発現増強，3) chitin の合成促進，ならびに 4) 新生分岐の増加に伴う菌糸全体の構造変化が関連することを示唆した（第 2 章）．*A. fumigatus* 細胞壁は多種の PAMPs (pathogen associated molecular patterns) を含むことから宿主免疫応答にも影響を与えるものと考えれる．以上，本研究で得られた知見は，アスペルギルス感染症における新たな治療戦略を考える一助となることが期待される．

【研究結果の掲載誌】

Med Mycol J, 58(1):E39-E44 (2017)

論文審査の結果の要旨

超高齢社会の到来と、高度先進医療の発達により、免疫機能が低下した易感染患者が増加している。そのような背景の中、深在性真菌症は増加傾向を示し、アスペルギルス症は最多となっている。 β -glucan は真菌の代表的な細胞壁多糖成分であり成長過程で細胞外へ放出される。宿主は特異的な β -glucan 分解系を持たないので感染局所では β -glucan は高濃度に蓄積している可能性がある。すでに β -glucan は *Aspergillus fumigatus* の増殖促進効果を示すことを共同研究者らが見出しているため、外因性の β -glucan は真菌感染症の増悪因子となる可能性がある。そこで本研究では β -glucan が *A. fumigatus* 感染症の増悪因子となるか検討することを目的とし、外因性 β -glucan の抗真菌薬感受性について検討し（第1章）、次に細胞壁の構築への影響について抗真菌剤の存在・非存在下で比較検討した（第2章）。

第1章では、 β -glucan 添加培地を用い、抗真菌薬感受性を微量液体培地希釈法にて検討した。菌株には標準株 *A. fumigatus* NBRC33022 を用いた。薬剤には、アスペルギルス感染症の代表的な3薬剤（アゾール系の Voriconazole、ポリエン系の AmphotericinB、キャンディン系の Micafungin）を用いた。その結果、 β -glucan 添加によりキャンディン系の Micafungin に対する感受性が低下したが、アゾール系の Voriconazole、ポリエン系の AmphotericinB に対する感受性は変化しなかった。このことは、*A. fumigatus* 4 菌株で同様に認められるとともに、同系の Caspofungin でも認められたことから、 β -glucan 合成阻害活性を示すキャンディン系抗真菌剤に特異的な現象であることが明らかとなった。

第2章では、外因性 β -glucanの作用機構について検討した。まず、浸透圧ストレスについて検討したところ、外因性 β -glucan添加条件で培養した菌体は浸透圧ストレス耐性が増加していることが明らかとなった。次に、 β -glucan 合成酵素（触媒サブユニット Fks1, 調節サブユニット Rho1）の遺伝子発現に及ぼす外因性 β -glucan の影響について検討し *fks1* 発現量は変化せず *rho1* 発現量が増加することを見出した。これらのことから、細胞壁 β -glucan の増加、および Micafungin 感受性低下は β -glucan 合成の調節サブユニットの発現調節への影響によるものであることが示唆された。

抗 β -1,3-glucan 抗体、Dectin-1、WGA を用い蛍光染色し、顕微鏡で観察した。まず、胞子を Micafungin 処理し顕微鏡観察したところ、 β -glucan 添加・非添加時の菌糸において、どちらも抗 β -1,3-glucan 抗体および Dectin-1 の結合はほとんど見られず、WGA の結合は、 β -glucan 添加・非添加時のどちらの菌糸においても見られた。次に、成長中菌糸を Micafungin 処理し、同様に顕微鏡観察したところ、 β -glucan 添加条件で、Micafungin 処理時に菌糸側面からの新生分岐が多数見られ、その分岐は抗 β -1,3-glucan 抗体および Dectin-1 とは結合せず、WGA と結合した。これらのことから、 β -glucan 合成阻害時において、*A. fumigatus* は chitin を責任多糖とした細胞壁構造へと変化していると考えられた。

以上、本論文では、外因性 β -glucan の *A. fumigatus* 抗真菌薬感受性への影響を検討し、外因性 β -glucan が *A. fumigatus* のキャンディン系抗真菌薬 Micafungin および Caspofungin

に対する感受性を低下させることを明らかにした（第 1 章）。そのメカニズムに1) 外因性 β -glucan による浸透圧ストレスに対する抵抗性の増加,2) β -glucan 合成酵素の調節サブユニット Rho1 の遺伝子発現増強, 3) chitin の合成促進, ならびに 4) 新生分岐の増加に伴う菌糸全体の構造変化が関連することを示唆した（第 2 章）。*A. fumigatus* 細胞壁は多種の PAMPs (pathogen associated molecular patterns) を含むことから宿主免疫応答にも影響を与えるものと考えれる。以上, 本研究で得られた知見は, アスペルギルス感染症における新たな治療戦略に関する重要な知見を含むことから博士 (薬学) の学位論文として価値あるものと評価する。