

研究経過報告書

1. 研究課題名 重症新型コロナウイルス感染症に合併する真菌感染症の病態解明
2. 研究代表者氏名 覺野 重毅
3. 研究発表

<学会発表予定>

2023年10月6日 第67回日本医真菌学会総会・学術集会

2023年11月9日～11日 第93回日本感染症学会西日本地方会学術集会

4. 研究実績

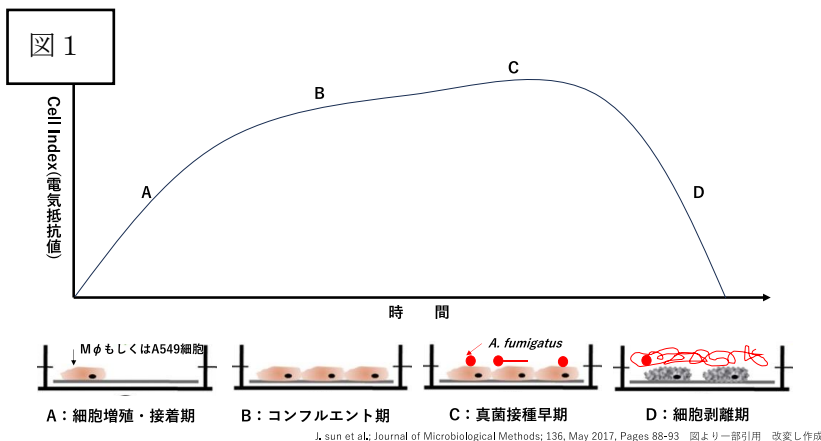
【背景・目的】

新型コロナウイルス (COVID-19) 感染症は 2020 年より全世界で猛威を振るった感染症であり、その重症化事例には真菌感染症、特に *Aspergillus fumigatus* の合併事例の報告も散見されている。COVID-19 自体がサイトカインストームを起こすなど、免疫に対して影響を及ぼすことが知られており、それにより *A. fumigatus* 感染症を引き起こしていることが予想される。本研究では基礎研究により再現できる系の確立はまだない。今回は COVID-19 と *A. fumigatus* との関係に関して *in vitro* での実験系の確立を最終的な目標とし、まずは前段階として *A. fumigatus* と免疫細胞および肺胞上皮細胞モデルを用いた肺内微小環境モデルとの真菌-細胞間相互作用評価モデル確立を目的とした。

【方法】

免疫細胞は THP-1 誘導 Macrophage (Mφ) を使用した。肺胞上皮細胞モデルとしては A549 細胞を利用した。THP-1 細胞 (JCRB0112) および A549 細胞 (JCRB0076) は JCRB 細胞バンクより購入した。

真菌としては国立感染症研究所より mCherry 発現 *A. fumigatus* を譲渡いただいたものを利用した。



蛍光イメージングおよび電気抵抗値の測定に関しては xCelligence eSight (Agilent 社) を用いて行った。電気抵抗値が測定できる e-plate 96 (専用の 96 well plate) 上で細胞を培養し、イメージングと電気抵抗値を測定した。電気抵抗値の測定の意義は接着細胞が plate 底面に接着し電気抵抗値が上昇し、真菌などを加えることで細胞障害が生じ、細胞が剥離することで電気抵抗値が低下する (図 1 の A から D を参照)。つまり、電気抵抗値の低下が細胞障害の進行を意味しており、連続的に測定することで、その経過をリアルタイムで評価をすることができる実験系である。またその際に蛍光イメージングも同時に測定でき、真菌の成長と細胞障害をリアルタイムでの相関関係を把握することができる。

THP-1 細胞は RPMI 1640+10% FBS で培養・継代、A549 細胞は DMEM+10% FBS で培養・継代を行った。

e-plate 96 上で培地は RPMI1640+10%FBS を利用した。THP-1 細胞は 1.0×10^4 /well となるように well に接種した。A459 も同様に 1.0×10^4 /well となるように接種をした。THP-1 細胞の well には分化のために PMA を 100 ng/ml 添加した。96well plate 上は合計 200 μ l となるように培地量は調整し

た。その上で、37度、5%CO₂の条件下で72時間培養を行った。Mφへの分化およびA549細胞のコンフルエントを形態学的に確認および細胞の接着を電気抵抗値の上昇をもって確認した(図3の左側を参照)。その後 *A. fumigatus* を MOI 1.0 (1.0×10⁴ condi/well) および 0.1 (1.0×10³ condi/well) と なるように接種した。さらに72時間、同条件で培養を行い、評価をした。蛍光イメージングに 関しては200倍の倍率で露光時間は500 msecで1時間毎に撮像した。

【結果】

<Mφの蛍光イメージングおよび電気抵抗値>

下記にMφのイメージングの一部を図2に示す。①の *A. fumigatus* 投与前は THP-1 細胞より PMA 添加後74時間経過した画像を示す。THP-1細胞がMφへと形態学的に変化をしているのがわかる。その直後に *A. fumigatus* の孢子を MOI 1.0 で播種し、さらに培養を進めた6時間後の画像が②である。*A. fumigatus* の孢子が膨化し蛍光が強くなっているのがわかる。一部Mφによる孢子の貪食も確認が できる。さらに培養を進め、③は12時間後の画像である。膨化した孢子は菌糸を成長させている。M

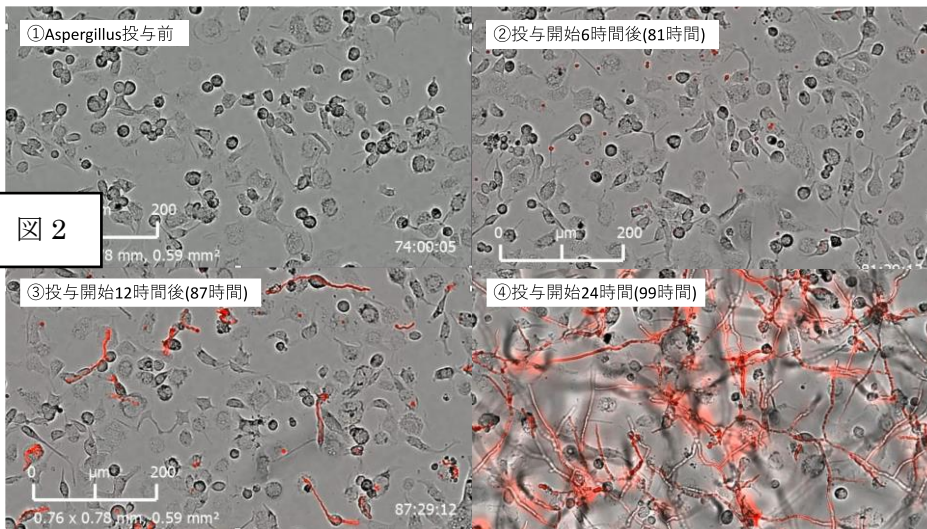


図2

φに貪食されている孢子に関しては、菌糸の成長を認めていないものも多いが、一部はMφ内部からも貪食されているはずの孢子から菌糸が成長し細胞外へと伸展している。さらに培養を進めると菌糸は複雑に絡み合った上、④の24時間経過の図のように最終的に画像は停滞し、変化は見られなくなる。

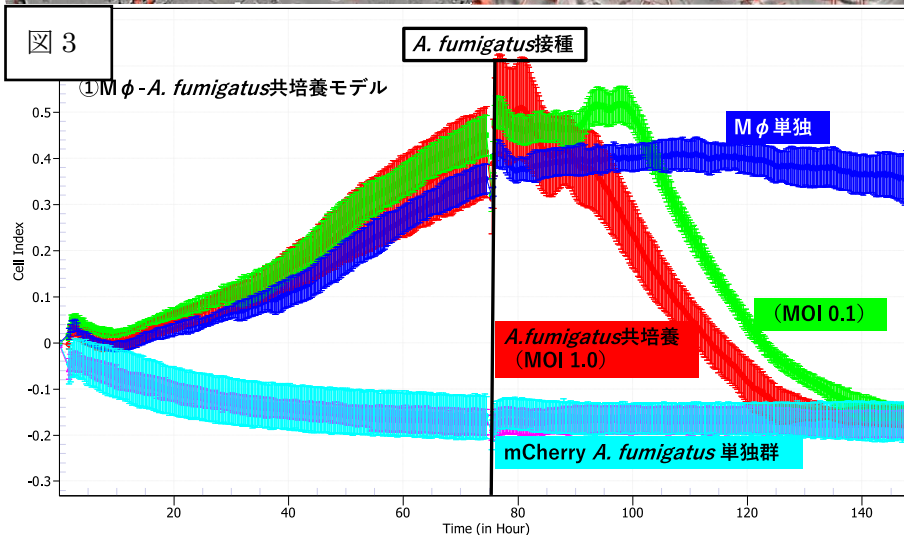


図3

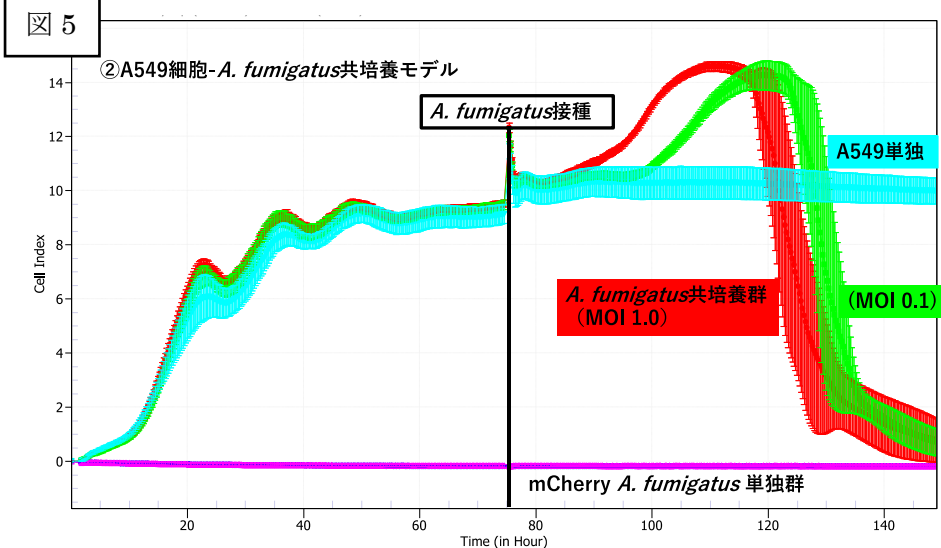
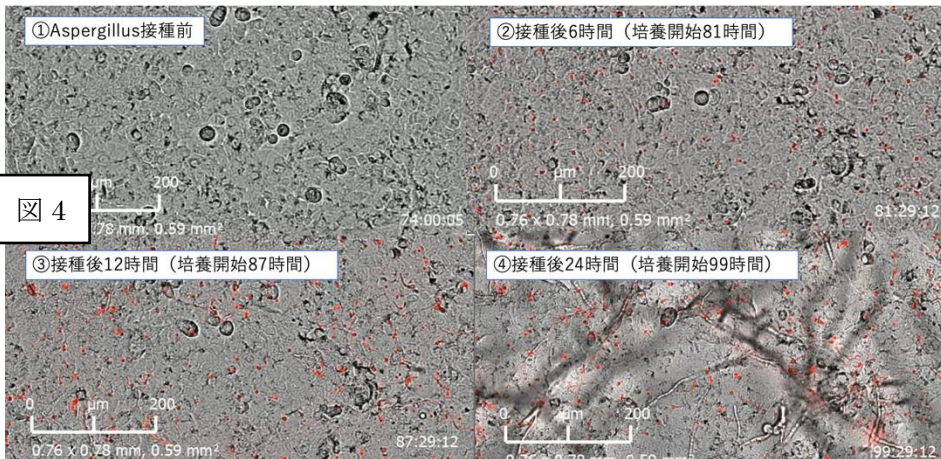
電気抵抗値に関しては図3にグラフを示す。*A. fumigatus* 孢子の接種前には徐々に電気抵抗値であるCI (cell index 値) が徐々に上昇している。つまりは浮遊細胞であるTHP-1細胞からMφへと分化し、底面に接着したため、電気抵抗値が上昇している。74時間経過後に *A. fumigatus* の孢子の接種をしたが、抵

抗値の低下のタイミングは MOI 1.0 で約90時間 (*A. fumigatus* 接種からは約15時間経過した点)、MOI 0.1 では約100時間 (*A. fumigatus* 接種から約25時間経過した点) から低下が始まっている。真菌でも孢子量に比例し、細胞死のスピードが速くなっていた。

<A549細胞のイメージングおよび電気抵抗値>

A549細胞のイメージングを図4に電気抵抗値を図5に示す。A549細胞は増殖をし、図4①のように confluent の状態となる。その状態で *A. fumigatus* を接種した。孢子量としてはMφと統一する

ために初期播種量に応じて MOI 1.0 は 1.0×10^4 、MOI 0.1 は 1.0×10^3 としている。図 4②は Mφ と同様に膨化が始まっているのがわかる。しかし、図 4③になると菌糸は細胞間の隙間を這うように菌糸を成長させており、Mφ と比較し菌糸の成長は遅くなっている。また蛍光されていない菌糸つまり垂直方向への菌糸の成長も認められている。また図 4④の接種後 24 時間経過時には底面にある孢子は菌糸をあまり成長させずに孢子のまま存在しているものも多く見られている。垂直方向への菌糸が上空で菌糸が成長し、画像上は黒い陰影として捉えられている。その後画像は成長が A549 細胞に関して電気抵抗値が低下するのは MOI 1.0 で約 115 時間 (*A. fumigatus* 接種より約 40 時間後)、MOI 0.1 では約 125 時間 (*A. fumigatus* 接種より約 50 時間後) で急速な低下を認めた。イメージングでは菌糸自体は変わらないものの細胞がその時間になり底面から全体的に剥離していくのが観察された。



【考察】

Mφ は免疫細胞であり A549 は肺胞上皮細胞モデルであるため単純な比較はできないが、*A. fumigatus* 共培養下では A549 細胞の方が細胞の生存期間は孢子数が同量であればいずれにしても約 24 時間長かった。Mφ に関しては真菌を貪食し、成長を阻害する。A549 細胞は接着後も増殖するため、細胞数は Mφ より多いことも影響はあるが、A549 細胞は底面に confluent となることで *A. fumigatus* の菌糸の水平方向へ成長するための空間を提供できないため、菌糸の成長が阻害された上で、さらに菌糸自体の直接の

細胞障害の速度が Mφ と比べて軽度であることが予想される。24 時間経過後も A549 細胞内に内在化により孢子を取り込んで、菌糸の成長を抑制している可能性が示唆される。

A. fumigatus のリスク因子として、陳旧性肺結核や肺気腫など肺胞構造が破壊されるような肺疾患がリスク因子の 1 つとされているが、今回の実験のように A549 細胞が層構造を形成すると *A. fumigatus* は菌糸を成長させにくいことが確認された。また免疫不全宿主も大きなリスク因子となるが、Mφ による貪食が妨げられている影響と考えられる。また A549 細胞に関しても TNF- α などのサイトカインを分泌していることがわかっており、免疫不全宿主は Mφ のように免疫担当細胞の不全だけではなく、A549 細胞自体にも影響を及ぼしている可能性がある。

重症の COVID-19 において、広範囲に肺炎を起こし、肺障害を引き起こし、さらにサイトカインストームによる免疫不均衡を起こすことが知られているが、そのいずれも *A. fumigatus* 感染のリスク増

加につながっていることが示唆される。今後の追加の基礎研究において証明を目指していく。

【今後の展望】

肺内微小環境のモデルに関して、A549 細胞および M ϕ の細胞と *A. fumigatus* との相互関係に関して、評価できる実験系を今回で確立ができた。今後に関して A549 細胞+M ϕ の共培養系に *A. fumigatus* を接種することで、より肺内微小環境に近づいたモデルをこの実験系で確立を行う。その上で SARS-CoV-2 をさらに共培養させたところに *A. fumigatus* を接種させることにより SARS-CoV-2 ウイルスがあるかないかでの電気抵抗による細胞障害評価および蛍光イメージングによる *A. fumigatus* の菌糸成長を観察することにより、SARS-CoV-2 ウイルスによる肺胞上皮細胞の障害や免疫不均衡により *A. fumigatus* が正常時と比較し菌糸の成長が促進することを証明していく。

また分子生物学的評価も追加で行い、TNF- α などの炎症性サイトカインの mRNA の発現推移を精査することにより、SARS-CoV-2 ウイルスが肺微小環境下で *A. fumigatus* の成長にどのように関与しているのか、また *A. fumigatus* 側への影響を調べ、電気抵抗値や蛍光イメージングと合わせて評価を行っていく予定としている。