專　欄

DOI: 10.6526/ICJ.202002_30(1).0007

2019 年致病性黴菌研討會紀實 (2019 Symposium of Medical Mycology)

林晉玄[1]　林俐岑[1]　羅秀容[2]

[1]國立臺灣大學　生命科學院生化科技學系
[2]國家衛生研究院　感染症與疫苗研究所

2019 年致病性黴菌研討會 (2019 Symposium of Medical Mycology) 於 10 月 25 日假國立臺灣大學生命科學館 322 室舉辦。免疫不全病患人數增加及壽命延長，黴菌感染日益增加。致病性黴菌不僅是醫療照護相關感染的主要病原菌之一，一旦造成系統性感染，也帶來高死亡率 (40%) 或其它併發症。加上目前抗黴菌藥物選項有限，如何防治黴菌感染是一個刻不容緩的課題。本研討會邀請國內外專家，針對黴菌感染之基礎研究、環境的影響、診斷治療以及抗藥性監測等議題進行深入探討。並藉此提供國內學者與國外專家在致病性黴菌相關研究學術交流的平台。本次邀請到美國布朗大學 (Brown University) Dr. Richard J. Bennett 與國內學者交流。Dr. Bennett 是國際上研究念珠菌 (*Candida* spp.) 知名的學者，對於念珠菌型態轉換、致病機轉與基因體都有深入著墨。

以下是介紹每個演講主題的內容：

1. 變色龍念珠菌：型態的轉換如何使念菌珠能夠適應宿主環境 (Candida the chameleon-how shifting cell states enables host adaptation)

白色念珠菌所引起血液感染具有高致死率，白色念珠菌對不同的環境訊息會轉換不同的型態，並且在基因上也會有相對應的變化。Dr. Bennett 的精彩演講主要分為兩個部分，第一個部分為白色念珠菌 Parasexual life cycle，第二部分為白色念珠菌的多型性。

在第一部分，Dr. Bennett 提到了白色念珠菌的細胞會在不同型態之

間轉換 (White-Opaque transition)，而其中只有 Opaque 細胞才具有高的有性生殖能力。經過 RNA-sequencing 分析這 White 與 Opaque 兩種細胞基因表現差異，發現調控白色念珠菌 Pheromone MAPK cascade 的相關基因在不同型態中具有不同的表現量。Pheromone MAPK cascade 為一能夠促進 Mating genes 表現的信號通路，而這些基因在 Opaque 細胞的表現量較 White 細胞高出許多。Dr. Bennett 的研究團隊將在 Opaque 細胞表現量高的 *Gβ* 與 *CST5* 基因分別或同時表現於 White 細胞中，發現 *Gβ* 或/與 *CST5* 基因能夠顯著提高 White 細胞有性生殖的能力。此研究結果證實 *Gβ* 與 *CST5* 基因在調控白色念珠菌有性生殖的能力上扮演重要角色。有趣的是，這兩個基因在其他念珠菌種是否有扮演同樣的角色值得進一步探討。

在白色念珠菌中並沒有觀察到傳統的減數分裂的現象，細胞如何從 4 套染色體回到一般常見的 2 套染色體是科學家多年來都很好奇及致力想解開的謎題。Dr. Bennett 的研究團隊將白色念珠菌培養於 *S. cerevisiae* pre-spo medium，會使染色體倍性下降 (Ploidy reduction)，此培養基為一葡萄糖含量高的培養基，推測可能是由影響代謝造成染色體的不穩定性。在經過 RNA sequencing 及海馬儀分析，發現在 4 套染色體狀態下的細胞受到的氧氣壓力、代謝活動與產生的 DNA 斷裂比 2 套染色體多。因此，推測隨著代謝通量提高，細胞內的活性氧化物質 (Reactive oxygen species, ROS) 上升，進而造成 DNA 斷裂，並提高染色體的不穩定性，使白色念珠菌染色體倍性的下降。Dr. Bennett 推測這樣的現象可能不只在黴菌中發生，哺乳類細胞可能也會有相同的機制。

在第二部分中，Dr. Bennett 提到了白色念珠菌的多樣性主要是來自基因上的差異，這些差異可能來自單核苷酸多態性 (Single nucleotide polymorphism, SNP)、雜合性丢失 (Lost of Heterozygosity, LOH) 或非整倍體 (Aneuploidy)。Dr. Bennett 主要討論雜合性丢失對白色念珠菌造成的影響。就算是同一株的白色念珠菌也可以有不同的型態，一般白色念珠菌主要形成兩種型態，分別是 White 與 Opaque，但是之前發現有些白色念珠菌會有第三種型態——Gray。經過 RNA Sequencing 分析，發現白色念珠菌中一個重要轉錄因子 (transcriptional factor) *EFG1* 的突變會造成 Gray 細胞的產生。進一步大量分析從臨床檢體中分離出的白色念珠菌，發現許多 *EFG1* 的突變出現在 N 端或者 DNA binding domain，而這些突變都會降低 *EFG1* 的功能，推測 *EFG1* 可能是突變發生率相當高的熱點，並且大部分來自 ChrR 的基因轉換 (Conversion) 或者突變 (*de novo* mutation)，當基因型 *efg1-/efg1-*

時，便會產生 Gray 與 Opaque-like 的型態。在小鼠的動物腸道適應實驗中從小鼠糞便中採樣塗盤分析，發現後期都是 Gray cell dominant，顯示 Gray cell 有在小鼠腸道較好的適應性 (Fitness effect)。這個分享提醒我們微生物在體外培養基和體內可能有截然不同的基因表現。

2. 白色念珠菌對人體抗微生物胜肽的反應機制 (Responses of Candida albicans to the human antimicrobial peptide)

清大藍忠昱博士則分享 LL-37 抗微生物胜肽 (Antimicrobial peptide, AMP)。AMP 為黏膜細胞免疫的第一道防線，而 LL-37 為一多功能的抗微生物胜肽，前兩個胺基酸為兩個 Cysteine，具有一醣胺聚醣結合位 (Glycosaminoglycan binding domain, GAG)，能夠在表皮細胞、巨噬細胞等細胞中表現，目前發現高劑量的 LL-37 可以殺死白色念珠菌，而低劑量的 LL-37 會抑制白色念珠菌的附著力 (adhesion ability)，藍忠昱博士分別從 LL-37 對白色念珠菌的影響及分子機制做探討。實驗室發現高劑量 (>= 20 μg/mL) 的 LL-37 可以殺死白色念珠菌隨著濃度提高，效果越好。雖然白色念珠菌對低劑量 (5, 10 μg/mL) 的 LL-37 具有抗性，但是會喪失其附著能力。藍博士進一步發現，在加入甘露聚糖 (Mannan) 時，可以回復白色念珠菌的附著力，並且降低白色念珠菌的聚集。推測 LL-37 可能藉由結合在白色念珠菌的表面影響附著。利用 Phage display screening 找到跟 LL-37 高度結合的蛋白質序列，經比對後發現與 Xog1 蛋白質同源度高，利用 ELISA 及 Pull down 實驗進一步確認 LL-37 與 Xog1p 確實有結合，Xog1p 為與細胞壁重塑 (Cell wall remodeling) 相關的蛋白質。以穿透性電子顯微鏡觀察白色念珠菌細胞壁，發現加入 LL-37 後，導致細胞壁較薄，同時也發現 LL-37 會降低 Xog1 的 Exogluconase 活性，並且會增加白色念珠菌細胞壁上 β-葡聚糖 (β-Glucan) 的暴露，使宿主免疫反應增強。

此外，發現 LL-37 會活化 Mkc1，並且會誘發內質網壓力反應 (ER stress response)，進而影響細胞壁。藍博士同時也提出可能參予此反應之轉錄因子及其調控之目標基因。總結來說，在低劑量的狀況下，LL-37 會結合白色念珠菌導致細胞聚集並改變細胞壁構造，進而抑制白色念珠菌附著，而白色念珠菌利用基因調控與不同訊號傳遞路徑對抗 LL-37 的影響。而在高劑量的情況下，LL-37 藉由增加白色念珠菌細胞壁上 β-葡聚糖的暴露增強免疫系統，使白色念珠菌細胞死亡。

3. 感染爬蟲類的致病黴菌 (Fungal infections is Reptiles)

對於致病黴菌的研究大多以

哺乳類或作物感染為主，孫培倫醫師分享感染爬蟲類的致病黴菌。以往認為主要導致爬蟲類黴菌疾病的菌株為 *Chrysosporium* anamorph of *Nannizziopsis vriesii*, CANV，但經由分子親源關係 (molecular phylogenetic) 分析之後，發現過去所稱 CANV，實際上包含來自 *Nannizziopsis, Paranannizziopsis* 及 *Ophidiomyces* 三屬的 17 種黴菌，且這些黴菌具有宿主專一性。其中 *Nannizziopsis* 屬除了爬蟲的致病菌之外，也包含了 3 種感染人類的黴菌。在歐美，蛇的黴菌感染相關報告越來越多，在臺灣則因為研究剛起步，目前還無法推斷爬蟲類黴菌疾病的現況，但由於外來種的入侵日益漸增，為了本土特有種的爬蟲類保育，未來應深入了解並監控爬蟲類的黴菌流行病學。

4. 探討白色念珠菌之致病力與微衛星序列 (microsatellite CAI) 基因分型之相關性 (Association of microsatellite CAI and the pathogenesis of Candida albicans)

白色念珠菌分子分型 (Molecular typing) 的方式有許多種，王紹鴻博士分享利用 Microsatellite-based 的分型方式，不僅具有鑑別度，也有價格優勢。Microsatellite CAI 為位在 *RLM1* 基因的基因標記 (Genetic marker)，CAI 重複序列由麩醯胺酸的密碼子 (CAA/G) 所組成，*RLM1* 為一與細胞壁完整性相關的轉錄因子。從林口長庚醫院血液感染病患檢體中分離出菌株，以多位點序列分型 (Multilocus sequence typing, MLST) 及 CAI microsatelitte 分析基因序列，發現在高致死率的菌株其 CAI CAA/G 重複相當多，並且落在 MLST clade 17 中，利用斑馬魚為模型，發現 CAI CAA/G 重複多的菌株，對斑馬魚幼體的致死率較高。觀察不同 CAI 的 *RLM1* 及 *ECE1* 基因表現，發現 CAI 較高的菌株會有較多致病相關基因被開啟，而較高 CAI 的菌株，對於 Caspofungin 及 Fluconazole 的抗性較低，顯示 *RLM1* 基因的多型性可能與細胞壁訊號路徑及致病力有關，並且 CAI genotyping 可以做為菌株致病力辨別的一種方式。相對地，*RLM1* 基因表現多寡是否也可以應用為一個快速辨別致病力強弱的標的值得進一步探討。

5. 從基礎生物到抗黴菌藥物的開發 (From basic biology to antifungal drug discovery)

侵入性的黴菌感染對免疫不全的患者來說為一大威脅，目前針對侵入性黴菌感染的藥物大致有三種類，Polyene、Triazoles 與 Echinocandins，但是這些藥物都有其限制。例如：黴菌抗藥性的產生與毒性等，因此發展新的抗黴菌藥物為當務之急。陳穎練博士主要研

究的主題為 Calcineurin 訊號路徑、Protein Kinase A 及 SAGA 複合物。人類 Calcineurin 訊號路徑的活化會啟動 IL-2 與活化 T 細胞，黴菌也有相似的路徑。但是藥物 FK506 與 CsA 會抑制 Calcineurin 訊號路徑，為了使藥物只針對黴菌而不抑制人類的 Calcineurin 訊號路徑，透過分析 CN-FK506-FKBP12 的結構，希望找出對藥物進行改良的位置。在進一步比較人類與黴菌的 CN-FK506-FKBP12 結構後，在 C-22 加上 acetohydrazine，成功降低 FK506T 降低 T 細胞活化的能力。在 SAGA 複合物的研究部分，陳博士發現若將 SAGA complex 中的 *ADA2* 基因剔除，會使白色念珠菌的致病性上升，但是對於抗黴菌藥物的感受度也會上升。顯示此複合物可能為新抗黴菌藥物潛在的標靶之一。此外，陳博士也發展舊藥新用 (Old drug new trick)，發現免疫性血小板減少紫斑症 (Immune thrombocytopenic purpura) 用藥 Eltrombopag 與抗生素 Polymyxin B 具有抗黴菌的效果。

6. 探討幾丁聚醣抗黴菌機制與其應用的潛力 (Antifungal mechanism of chitosan and its potential application)

越來越多黴菌產生對抗黴菌藥物的抗性，因此新藥的發展十分重要。林晉玄博士則以幾丁聚醣 (Chitosan) 為研究材料。幾丁聚醣是一多醣類，在 pH 值小於 6.5 的環境下帶正電，能夠與細胞膜作用，達到抑制黴菌的效果。此外，其生物相容性高、易分解且毒性低，具有成為抗黴菌藥物的潛力。幾丁聚醣對白色念珠菌也具有抑菌作，為了解其抗菌的分子機制。林博士透過突變株庫篩選 (mutant library screening)，發現有 38 個轉錄因子與 11 個調控細胞壁的基因與白色念珠菌對幾丁聚醣的抗性有關。其中一個基因為 *Crz1*，*Crz1* 為 Calcineurin 路徑的轉錄因子，而此路徑主要調控細胞壁生成，此路徑受到鈣離子啟動。此外，將 FK506 (Calcineurin 抑制物) 與幾丁聚醣合併使用具有更好的抑菌效果。這些結果顯示幾丁聚醣可能還影響 Calcineurin 路徑以外的路徑。

此外，林博士也發現 SAGA complex 組成之一的 *ADA2* 基因也與幾丁聚醣的感受度有關。幾丁聚醣作用下，白色念珠菌的表面構造會些微受損；然而，在 *ada2* 突變株受損更嚴重。林博士更發現，*ada2* 突變導致白色念珠菌細胞壁構造比一般狀況更薄，與加入 Chitosan 後細胞壁變薄的型態類似。推測幾丁聚醣可能透過抑制 SAGA complex 來達到抑菌的效果。

此外，*ZCF31* 的剔除會提高菌株對幾丁聚醣感受性。*ZCF31* 剔除的細胞構造相較於正常細胞較破碎，且細胞壁較厚，而這樣的細胞壁使其對 CFW 及 CSF 兩種針對細胞壁作用的抗黴菌藥物產生抗性，顯示 *ZCF31*

剔除加強了細胞對細胞壁壓力的承受度，但是對細胞膜壓力 (SDS) 的抗性下降。推測幾丁聚醣的作用位置可能位於細胞膜，而非細胞壁。

將幾丁聚醣與其他不同抗黴菌藥物合併使用後觀察抑菌效果，發現幾丁聚醣可以加強 Fluconazole 的抑菌效果，但是會降低 Amphotericin B 的抑菌效。未來或許可藉由此方式治療黏膜或皮膚感染。不過，由於幾丁聚有不同的大小，且其抑菌的能力取決於其去乙醯化 (Deacetylation) 程度與 pH 值，因，幾丁聚醣對黴菌的影響路徑與抗菌機制仍需要更進一步的研究與了解。

這一系列探討與開發抗黴菌藥物的演講，提醒大家因為具抗藥性菌株的產生，新 (具不同殺/抑菌機制) 且有效的抗黴菌藥物開發在還是很急迫需要的！多一些臨床用藥來輪替，希望能降低具抗藥性菌株產生的頻率。今後我們將更密切合作，發揮團隊力量，加速開發新藥的腳步！

7. 臨床抗唑類 (azole) 麴菌感染案例來自於環境中使用唑類藥物導致 (Azole-resistant Aspergillosis, a health threat arose from the environment)

侵入性麴菌感染 (Invasive aspergillosis, IA) 大多是由 *Aspergillus fumigatus* 所引起，死亡率極高。Triazole 為治療 *A. fumigatus* 感染症的首選藥物，吳綺容醫師分析由環境與臨床上分離的 *A. fumigatus* 菌株之 azole 抗藥性盛行率及抗藥機轉。全國多中心臨床菌株監測結果顯示 *A. fumigatus* azole 抗藥性盛行率約 4.4%，八成抗藥菌株帶有和 azole 殺真菌劑使用相關的 *CYP51A* 基因 TR34/L98H 或 TR46/Y121F/T289A 突變機轉。全國環境監測發現約 7.5% 的環境菌株具 azole 抗藥性，其中八成抗藥菌株抗藥機轉為 TR34/L98H 突變。值得注意的是，有一主要本土流行型別 TR34/L98H 菌株分佈台灣北中南東各區環境，並已造成兩例致命肺麴菌症。此觀察顯示 TR34/L98H 菌株已適應台灣環境，廣泛散佈各地，並帶來人類健康的威脅。研究也呼應農委會「化學農藥 10 年減半」政策，期望能藉由減少特定 azole 殺真菌劑的使用，以減少作物病原真菌及人類致病真菌 azole 抗藥性的出現，確保 azole 藥物於對治植物病害及人類麴菌症的療效。

8. 侵入性念珠菌對醫學臨床的重大挑戰：從亞洲分析念珠菌的基因分型角度切入探討 (Clinical challenges of invasive candidiasis: Asian perspectives)

台灣為亞洲中 Candidamia 發生率最高的國家，而白色念珠菌為造成 Candidemia 的主要菌株，熱帶念珠菌則次之。陳抱宇醫師針對臺灣熱帶念珠菌對 Azole 的抗性分析。結果發現熱帶國家或亞熱帶的熱帶念珠菌對

Azole 的抗性比在溫帶國家來得高。進一步以多位點序列分型 (Multilocus sequence typing, MLST) 分析台灣熱帶念珠菌血液感染的臨床檢體，顯示有越來越多熱帶念珠菌對 Fluconazole 藥物產生抗藥性，並且有一半以上來自未接受 azole 類藥物治療的病人。經比較發現這些具抗藥性的熱帶念珠菌基因型雖然相似，但是這樣的相似性卻與時間及地點無關，其中 DST225 先前在台灣的水果及北京的醫院被報導過，而 DST376、505-507 則曾經在上海的醫院被分離出來，表示熱帶念珠菌抗藥性可能來自農業用藥與甚至跨國的傳遞，顯示抗藥性問題的嚴重性。

吳綺容與陳抱宇醫師的結果，提醒大家關注「One health」的概念，不但要強調正確使用少有的臨床抗黴菌藥物，也要瞭解農業抗黴菌藥物，尤其是與臨床相同的azole類的，輪替使用以降低篩選環境具抗藥性人類致病菌的重要性。

9. 聚落形成或侵入感染：宿主腸道粘液分泌決定念珠菌的感染模式 (Colonization or invasion: a decision - making for Candida at host mucosal surfaces)

白色念珠菌在免疫正常的人體腸道內主要以酵母菌 (yeast form) 的方式存在，但是在粘膜組織感染時多以菌絲體 (Hyphae form) 的方式呈現。近年來發現白色念珠菌在腸道的附著可連結到許多非感染性的發炎相關疾病，例如：克隆氏症 (Crohn's disease)，異位性疾病 (Atopic disease) 等，而這些疾病的患者的確無念珠菌侵入性感染之病徵。為了研究白色念珠菌共生於宿主腸道對宿主的影響，蔡雨寰實驗室將白色念珠菌以口服餵給小鼠一周後，發現白色念珠菌會以酵母菌型態聚集在小鼠小腸腔室，並且會增加小腸黏液的分泌。為了進一步研究小腸粘液分泌的即時反應，實驗室將一段小腸前後紮起 (Ligation)，把白色念珠菌打入該段小腸，發現四十分鐘內小腸就會開始分泌黏液，且黏液會將白色念珠菌推到小腸絨毛上端腔室內並困住。該實驗室更進一步發現 Caspase-1 發炎體 (inflammasome) 蛋白的抑制物會顯著降低白色念珠菌引起的粘液分泌，指出宿主發炎體 (inflammasome) 在黏液分泌扮演重要的角色。值得注意的是，在抑制 Caspase-1 蛋白的狀況下，白色念珠菌會以酵母菌的型態入侵到小腸絨毛的固有層 (lamina propria)，指出小腸粘液分泌在維持念珠菌腸道共生的重要性。

10. 腸道組織發炎與熱帶念珠菌感染的相關性 (Linking Candida tropicalis and intestinal homeostasis)

白色念珠菌為一伺機性感染的黴菌，為人類腸道中常見的共生菌。但是當患者免疫力低下或者腸黏膜

表面受到發炎反應破壞時，白色念珠菌就有機會侵入黏膜組織造成更嚴重的發炎反應。因此，炎症性腸病 (Inflammatory Bowel Disease, IBD) 患者的腸內菌中經常有較多的白色念珠菌。在 2016 年，發現患有家族性遺傳克隆氏病 (Chorn's disease) 的患者中熱帶念珠菌的比例較白色念珠菌高發現熱帶念珠菌是唯一可能會造成腸道發炎的菌種；顯示熱帶念珠菌可能與 IBD 的成因有關。有趣的是，有研究指出，在 IBD 的病患中的腸內菌相與健康的人相比，酵母菌的量較多，而此種菌大多來自所攝取的食物，推測 IBD 患者腸道中的熱帶念珠菌可能經由食物攝入。江皓森博士利用熱帶念珠成功建立小鼠腸內中熱帶念珠菌動物模式發現 MYA3404 的移生 (colonization) 並不會引發結腸炎。然而，若 Dextran sulfate sodium (DSS) 持續誘導結腸炎發生的小鼠，會使小鼠結腸炎惡化，並且降低小鼠的生存率，並提高促炎性 胞激素 (Proinflammatory cytokine) 的分泌。

11. 抗藥性熱帶念珠菌與宿主免疫、腸道菌相間的交互作用 (Interactions of drug-resistant Candida tropicalis with host immunity and gut microbiota in an immunodeficient mouse model)

熱帶念珠菌為繼白色念珠菌後致病性最高的念珠菌，並且對越來越多抗黴菌藥物產生抗藥性，但是其抗藥性與宿主之間的交互關係還需要更近一步的研究。有報導指出，一些與抗藥性相關的基因，例如：*CDR1, CDR2, MDR1* 及 *EFG11* 等，可能也與致病性相關。為釐清兩者間的關係，潘建雄博士使用 RAG 免疫不全鼠進行實驗，餵食對 azole 藥物感受性高的熱帶念珠 RAG 鼠及 B6 鼠，發現只有在 RAG 鼠的腸道中才會有熱帶念珠菌的移生，但是並沒有侵入性及轉移性感染發生，小鼠體重也沒有減輕。但是在餵食三種不同抗藥性熱帶念珠菌的組別中，卻有不同的結果，其中一組餵食 YM990490 的組別產生了胃侵入性的感染，但是血液中發炎相關的細胞激素並沒有顯著提升，餵食 YM990579 的小鼠體重短暫減輕，且偵測到 IL-10 及 IL-22 的分泌增加，而餵食 YM990659 後小鼠體重不變，糞便中黴菌數目也並無增加，但是其腸道中組織的黴菌數明顯增加，且 APC-derived 的細胞激素的分泌量提高。由以上結果顯示，不同的抗藥性熱帶念珠菌株所引起的細胞反應及致病能力皆不同，推測這些差異可能來自不同抗藥性基因所調控的反應。

此一系列應用小鼠模式的研究，也呼應 Dr. Bennett 一開始分享的，微生物在體內體外基因不同表現，導致不同表徵與特性。因為黴菌是否引起感染，宿主的個體狀況是一個重要的決定因子，很高興台灣有這三位專家

致力於黴菌與宿主間的相互作用。

每兩年舉辦一次的致病性黴菌研討會，很高興看到台灣致病性黴菌研究團隊越來越茁壯，大家以自己專長與興趣扮演著不可或缺的角色，期待大家一起合作，讓台灣走向全球黴菌感染研究重鎮！

最後，特別感謝主辦單位國家衛生研究院、國立台灣大學生命科學院、中央研究院分子生物研究所、謝維銓教授感染醫學文教基金會、科技部及協辦單位衛生福利部疾病管制署的支持及所有工作人的協助，使得會議得以順利進行。