

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04867

研究課題名(和文)クリプトコックス・ガッティ感染症における高病原性の免疫機序の解明

研究課題名(英文) Study on immunological mechanism for high pathogenicity of *Cryptococcus gattii* infection

研究代表者

川上 和義 (Kawakami, Kazuyoshi)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10253973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：*Cryptococcus gattii*は、*C. neoformans*と異なり健常人でも髄膜脳炎を発症し高い致死率を示す。*C. gattii*の高病原性機序を解明する目的で、両真菌種に対する宿主免疫応答性の違いについて解析した。*C. gattii*感染マウスでは肺でのTh1免疫応答が低下し、リンパ節におけるTh1細胞の分化障害がみられた。さらに、*C. gattii*のDNA及び莢膜多糖では、TLR9、Dectin-2との応答性が低下していた。これらの結果から、*C. gattii*と*C. neoformans*ではTh1免疫応答に重要なPAMPsの構造が異なり病原性の違いにつながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：*Cryptococcus gattii* causes meningoencephalitis leading to high fatality rate even in healthy individuals without immunodeficiency, which is contrary to *C. neoformans*. In this study, to clarify the mechanism for high pathogenicity of *C. gattii* infection, we addressed the possible difference in host immune response to these fungal species. Th1 immune response was attenuated in the lungs of mice infected with *C. gattii*, which was associated with impaired Th1 cell differentiation. In addition, different responsiveness mediated by TLR9 and Dectin-2, critical processes for Th1 cell differentiation from antigen-specific naive T cells, was found in DNA and capsular polysaccharides from *C. gattii* and *C. neoformans*. These results suggest that distinct PAMPs structures leading to lowered Th1 immune response may be involved in the high virulence of *C. gattii*.

研究分野：感染免疫学

キーワード：クリプトコックス・ガッティ 高病原性 免疫機序 トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

クリプトコックス症の病原体には *Cryptococcus neoformans* と *C. gattii* があり、わが国ではほとんどが前者による。*C. neoformans* は鳩など鳥類の堆積糞中に存在し、乾燥により舞い上がった酵母を吸入することで感染するが、多くは不顕性に終わりそのまま潜伏感染する。宿主の免疫能が低下した際に内因性再燃し、特にエイズでは高頻度に髄膜脳炎を発症し難治化することが少なくない。世界のエイズ死因では結核に次いで第2位とされている (AIDS 23: 525-530, 2009)。一方、*C. gattii* はユーカリの木に棲息し、コアラなどの動物に感染するとともに、ヒトでは呼吸器・中枢神経感染症を引き起こす。*C. gattii* は、その棲息環境から特異な地理的分布を示し、ほとんどがオーストラリア、東南アジアなど熱帯・亜熱帯地域に限られていたが、1999年にカナダのバンクーバー島でアウトブレイクが発生し状況が変わった。2007年までにバンクーバーを含むブリティッシュコロンビア州で218例の *C. gattii* 感染症が報告され、オーストラリアでの遺伝子型が VG1 であったのと異なり、ほとんどが VG11a であった。さらに、2004年からは米国ワシントン州、オレゴン州など北米太平洋沿岸地域でも患者がみられるようになり、2010年までに60例が報告されている (MMWR Vol.59, No.28, 2010)。その多くがバンクーバー型 VG11a であり、加えて新たな VG11c も出現している。*C. neoformans* と異なり、健常者でも中枢神経感染症を発症し、薬剤耐性傾向が強く、致死率も20%と高い(高病原性クリプトコックス症)。2007年には、わが国でも、国内感染と考えられるバンクーバー型 *C. gattii* によるクリプトコックス髄膜炎症例が報告されており、その後も新たな症例が増加しつつある (日本医真菌学会雑誌 55: 51-54, 2014)。

このような背景の中で、*C. gattii* 感染症は、何故健常者でも中枢神経感染症を発症するのか、何故高病原性なのかなど、臨床的に解明すべき重要課題が山積している。しかし、まだ臨床症例が多くない現状では、動物モデルを用いた病態解明へのアプローチが重要となる。近年、この点にアプローチする研究が報告され始めており、Angkasekwini らは、マウス感染モデルを用いた検討から、*C. gattii* 感染では *C. neoformans* と比べ Th1 及び Th17 細胞への分化が低下することを明らかにした (Infect. Immun. 82: 3880-3890, 2014)。また、ヒト末梢血単球由来の樹状細胞を用いた検討では、*C. gattii* は樹状細胞の成熟化を誘導しないとの報告がみられる (J. Immunol. 191: 249-261, 2013)。最近、*C. gattii* による髄膜炎患者の血清に GM-CSF に対する自己抗体が検出されるとの報告があり (MBio. 5: e00912-14, 2014)、発症病態への関与が推察されている。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトの病原真菌として重要な *C. neoformans* と *C. gattii* に対する感染防御免疫における Th1 免疫応答の解析を行うとともに、両真菌種の pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) と pattern recognition receptors (PRRs) との相互作用に関する解析を行い、*C. gattii* に高病原性をもたらす要因およびその機序の解明を試みることを目的として、研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) クリプトコックスに対する T 細胞免疫応答の解析

C. neoformans として H99 株、*C. gattii* として R265 株を用いた。これらの真菌を、クリプトコックスの主要な T 細胞抗原 MP98 に対する抗原受容体を高発現するトランス

ジェニックマウス (CnT-II マウス) または C57BL/6 マウスの気管内に接種することで感染モデルを作成した。感染肺の真菌数やサイトカイン産生を調べるとともに病理学的解析を行った。感染後の肺内やリンパ節における Th1 細胞をフローサイトメトリーにて解析した。また、感染肺における CXCL9, CXCL10 産生を ELISA, RT-PCR にて解析した。

(2) クリプトコックスに対する Th1 細胞分化の解析

感染マウスの傍気管リンパ節中の Th1 細胞をフローサイトメトリーにて解析した。CnT-II マウスの脾細胞から MACS にてナイーブ T 細胞を精製し、*C. neoformans*, *C. gattii* の破砕物 (lysates) 存在または非存在下で骨髄由来樹状細胞 (BM-DCs), MP98 抗原ペプチドとともに培養し、産生される IFN- γ を ELISA にて測定した。

(3) 好中球反応の解析

感染させたマウスの肺内から白血球を採取しフローサイトメトリーで好中球分画の解析を行い、肺ホモジネート中の CXCL1, CXCL2 を ELISA, RT-PCR にて測定した。好中球を除去するために抗 Gr-1 抗体を投与し、*C. gattii* 感染経過への影響を解析した。

(4) 真菌由来 DNA に対する免疫応答の解析

OVA 特異的 T 細胞受容体を高発現する OT-II マウスの脾細胞を、*C. neoformans*, *C. gattii* から抽出した DNA の存在または非存在下で抗原ペプチドとともに培養し、産生される IFN- γ を ELISA にて測定した。TLR9 遺伝子欠損 (KO) マウス、野生型 (WT) マウス由来の BM-DCs をこれらの DNA で刺激し、産生される IL-12 を ELISA にて測定した。さらに、両真菌由来の DNA における TLR9 刺激モチーフ (GACGTT, GTCGTT) の出現頻度、シトシンのメチル化の頻度を解析した。

(5) 莢膜多糖に対する免疫応答の解析

C. neoformans, *C. gattii* の培養上清から CTAB 結合または非結合莢膜多糖を採取し、さらに非結合多糖から ConA 結合分画を精製し、Dectin-2-Fc 融合タンパクへの結合性、Dectin-2-NFAT-GFP リポーターアッセイ、BM-DCs 刺激活性を解析した。また、*C. neoformans* (Cap67 株) から採取した galactoxylomannan (GalXM) でマウスを免疫して得られた抗血清を用いて各多糖分画への結合性について解析を行った。

4. 研究成果

(1) クリプトコックスに対する T 細胞免疫応答の解析

C. gattii 感染マウスでは、*C. neoformans* と比較し、肺内における真菌の排除が低下するとともに、病理学的解析で肉芽腫反応に乏しく肺胞腔内に充満した真菌が観察され、*C. gattii* の高病原性が確認された。感染 14 日、21 日後の肺ホモジネート中のサイトカインを測定したところ、*C. gattii* 感染マウスで Th1 サイトカインの有意な低下が観察されたが、Th2, Th17 サイトカインではそのような違いはみられなかった。この結果に一致して、感染 14 日後における肺内の Th1 細胞が有意に減少していた。

(2) クリプトコックスに対する Th1 細胞分化の解析

C. gattii 感染マウスでは、14 日後の所属リンパ節における Th1 細胞が有意に減少していた一方で、Th1 細胞の肺へのマイグレーションに重要な CXCL9, CXCL10 の産生には有意差がみられなかった。CnT-II マウスの脾細胞から採取したナイーブ T 細胞を *C. neoformans* または *C. gattii* 由来 lysates の存在、非存在下で樹状細胞, MP98 とともに培養し IFN- γ 産生を測定したところ、*C. gattii* 由来 lysates ではほとんど IFN- γ の

産生増加が認められなかった。これらの結果から、*C. gattii*では*C. neoformans*と比較して、感染後にリンパ節でのTh1細胞分化が十分に起こらない可能性が示唆された。

(3) 好中球反応の解析

*C. gattii*では、*C. neoformans*と比較し、感染後の肺内で有意な好中球の増加がみられ、好中球遊走に重要なCXCL1, CXCL2の産生が有意に増加していた。しかし、*C. gattii*感染マウスで好中球を除去しても感染経過に影響がなかったことから、好中球の増加は*C. gattii*の病原性と直接的には関係しないものと考えられた。

(4) 真菌由来DNAに対する免疫応答の解析

これまでに我々は、TLR9がクリプトコックス感染後のTh1免疫応答の成立に重要なことを報告した。そこで、OT-IIマウス由来のナイーブT細胞からOVA特異的Th1細胞への分化における両真菌由来DNAの影響について比較したところ、*C. gattii*では*C. neoformans*と比較してIFN- γ 産生の低下が観察された。この結果と一致して、真菌由来DNA刺激によるBM-DCsからのIL-12産生は*C. gattii*で有意に低下しており、この反応はTLR9に完全に依存していた。これらの結果から、両真菌由来DNAにおけるTLR9刺激モチーフ(GACGTT, GTCGTT)の出現頻度、あるいはシトシンのメチル化の頻度が異なる可能性を想定し解析したところ、明らかな違いを見出すことはできなかった。現時点では、PAMPsとしてのDNAのTh1細胞分化誘導活性が異なる機序は不明であるが、*C. gattii*の病原性に関与する可能性があるためさらなる解析が必要と考えられた。

(5) 莢膜多糖に対する免疫応答の解析

これまでに我々は、樹状細胞によるクリプトコックスの認識にDectin-2が重要なこ

とを報告した。そこで、*C. neoformans*または*C. gattii*から採取した各種莢膜多糖成分によるDectin-2刺激活性を解析したところ、CTAB非結合ConA結合分画に活性が検出され、本活性は*C. gattii*において有意に低値を示した。この結果に一致し、同分画で刺激されたBM-DCsからのサイトカイン産生も*C. gattii*において有意に低下していた。また、同分画にはmannoprotein, GalXMが含有されるため、GalXM抗血清への結合性を解析したところ、明らかな結合を示さなかった。一方、Cap67株から精製したMP98がDectin-2-NFAT-GFPリポーター活性を有することを確認している。これらの結果から、莢膜または細胞壁のmannoproteinが活性成分であり、両真菌で構造が異なり*C. gattii*の病原性に関与する可能性が示唆された。クリプトコックスにおけるDectin-2リガンドを特定するために、今後さらなる解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. 佐藤 光, 川上和義: クリプトコックス感染における宿主認識と生体防御機構, Med. Mycol. J. 58: 83-90, 2017. (査読あり)
2. Mor V, Singh A, Farnoud AM, Rella A, Tanno H, Ishii K, Kawakami K, Sato T, Del Poeta M: Glucosylceramide administration as a vaccination strategy in mouse models of cryptococcosis. PLoS One, 11: e0153853, 2016 (査読あり)
3. 川上和義: 感染とC型レクチン受容体, 臨床免疫・アレルギー科 66: 100-107, 2016. (査読なし)
4. Nakamura Y, Sato K, Yamamoto H, Matsumura K, Matsumoto I, Nomura T, Miyasaka T, Ishii K, Kanno E, Tachi M, Yamasaki S, Saijo S, Iwakura Y, Kawakami K: Dectin-2 deficiency promotes Th2

response and mucin production in the lungs after pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. Infect. Immun. 83: 671-681, 2015. (査読あり)

5. Sato K, Yamamoto H, Nomura T, Matsumoto I, Miyasaka T, Zong T, Kanno E, Uno K, Ishii K, Kawakami K: *Cryptococcus neoformans* infection in mice lacking type I interferon signaling leads to increased fungal clearance and IL-4-dependent mucin production in the lungs. PLoS One 10: e0138291, 2015 (査読あり)

[学会発表](計 13 件)

1. Oniyama A, Kawamura K, Kitai Y, Ishii K, Kawakami K: Immunological analysis of the mechanism for higher virulence of *Cryptococcus gattii* infection using a transgenic mouse expressing T cell antigen receptor for 98 kDa mannoprotein. 第 46 回日本免疫学会学術集会, 2017.

2. Kawamura K, Oniyama A, Kitai Y, Ishii K, Adachi Y, Ohno N, Yamasaki S, Kawakami K: Activation of Dectin-2-mediated signaling by cryptococcal capsular polysaccharides: Comparison between *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. 第 46 回日本免疫学会学術集会, 2017.

3. Tanno D, Yokoyama R, Kawamura K, Kitai Y, Ishii K, Adachi Y, Ohno N, Yamasaki S, Kawakami K: Dectin-2-mediated signaling triggered by the cell wall structures of *Cryptococcus neoformans*. 第46回日本免疫学会学術集会, 2017.

4. Kitai Y, Kawamura K, Oniyama A, Ishii K, Saijo S, Iwakura Y, Kawakami K: Involvement of Dectin-2 in the recognition and phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by dendritic cells. 第 46 回日本免疫学会学術集会, 2017.

5. Sato Y, Kanno E, Ishii K, Yamasaki S, Kawakami K: Effect of Mincle-deficiency on the host immune response against *Cryptococcus neoformans* infection. 第 46 回日本免疫学会学術集会, 2017.

6. Oniyama A, Miyahara A, Kawamura K, Ishii K, Kawakami K: Differentiation of effector helper T cells in response to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* in transgenic mice expressing T cell receptor for 98kD mannoprotein. 第 45 回日本免疫学会学術集会, 2016.

7. Kawamura K, Zong T, Oniyama A, Ishii K, Kawakami K: Effect of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* on helper T cell response in OT-II mice. 第 45 回日本免疫学会学術集会, 2016.

8. Sato Y, Tanno D, Kanno E, Ishii K, Yamasaki S, Kawakami K: Contribution of Mincle to host cell recognition of *Cryptococcus neoformans*. 第 45 回日本免疫学会学術集会, 2016.

9. 宮原杏奈, 鬼山明穂, 石井恵子, 川上和義: クリプトコックス感染後の肺内における組織滞在型メモリーT細胞の集積と IFN- γ 産生. 第 90 回日本感染症学会総会・学術講演会, 2016.

10. Zong T, Miyahara A, Kawamura K, Ishii K, Kawakami K: Immune response to OVA-expressing *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* in OT-II mice. 第 90 回日本感染症学会総会・学術講演会, 2016.

11. Miyahara A, Nomura T, Yamamoto H, Sato K, Ishii K, Matsumoto I, Zong T, Kagesawa T, Hara H, Kawakami K: Accumulation of tissue resident memory T cells expressing IFN- γ in lungs during infection with *Cryptococcus neoformans*. 第 44 回日本免疫学会学術集会, 2015.

12. Matsumoto I, Ishii K, Miyahara A,

Miyamura N, Matsumura K, Nomura T, Zong T, Tamura T, Kawakami K: Analysis of immune response to *Cryptococcus neoformans* in transgenic mice expressing T cell receptor specific for 98kD mannoprotein. 第44回日本免疫学会学術集会, 2015.

13. Kagesawa T, Nomura T, Sato K, Ishii K, Matsumoto I, Miyahara A, Zong T, Iwakura Y, Kawakami K: IL-17A-mediated inhibition of Th1 immune response and host defense to infection with *Cryptococcus neoformans*. 第44回日本免疫学会学術集会, 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 和義 (KAWAKAMI KAZUYOSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 10253973

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

石井 恵子 (ISHII KEIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 00291253