

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10030

研究課題名(和文)高病原性クリプトコックス感染症における宿主感染防御機構に関する研究

研究課題名(英文)Evaluation of host defense mechanism against highly virulent *Cryptococcus gattii* infection

研究代表者

大野 秀明(OHNO, HIDEAKI)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：20325640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：高病原性である*Cryptococcus gattii*株のR265株(米国株)、JP02株(国内分離株)においてはマクロファージによる貪食能が*C. neoformans* H99株(標準株)に比較し低下していた。またR265株、JP02株ともにIFN-g添加による貪食率への影響はほとんど認められなかった。マウスクリプトコックス髄膜炎モデルにおいて、*C. neoformans* H99株を接種したマウスに、INF-gを投与すると、生存期間の延長が認められたが、*C. gattii* R265株を接種したマウスに、INF-gを投与しても、非投与マウスと比較し生存期間の延長は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新興感染症である高病原性*Cryptococcus gattii*感染症において、*Cryptococcus neoformans*感染症と極めて異なり、肺などの感染局所での宿主炎症反応が極めて乏しいとい現在までの研究結果に関して、*C. gattii*株がどのようにして宿主感染防御機構を回避しているかについて検討を行った。その結果、これらは*C. gattii*が自然免疫から逃避していることが関与していること、またこれは炎症性サイトカインであるインターフェロンガンマによっても影響が認められないことが解明された。これらの結果は、高病原性であることの病態解明に大いに貢献するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：We investigated the interaction of *Cryptococcus neoformans* (H99 strain, standard strain) and highly virulent *C. gattii* R265 strain (VG11a, an outbreak strain in North America), JP02 strain (VG11c, isolated in Japan) with murine macrophages. Phagocytosis by macrophages were observed on *C. neoformans* H99, but not on *C. gattii* R265 and JP02. Recombinant interferon-gamma; (rIFN-g) enhanced phagocytosis of *C. neoformans* H99, however, rIFN-g did not promote phagocytosis of *C. gattii* R265 and JP02 also. In addition, we studied the efficacy of rIFN-g for cryptococcal meningoencephalitis. Compared to *C. gattii*, rIFN-g significantly improved the survival in experimental meningoencephalitis due to *C. neoformans*.

研究分野：感染症学

キーワード：感染防御 感染病態 自然免疫 高病原性クリプトコックス症

1. 研究開始当初の背景

1999年から現在に至るまでカナダ・バンクーバー島周辺部から米国北太平洋岸部にかけて新型の高病原性クリプトコックス症の感染流行が継続している。カナダでの発病者218例を対象とした疫学調査 (Emerg Infect Dis 16: 251-257, 2010)では、死亡率8.7%、中枢神経感染を伴うものでは予後不良であること、感染者うち約60%は健常者であった。また、米国オレゴン州などでの本クリプトコックス症感染流行では、致死率は20%に達するとともに云われている(MMWR. July 23, 2010)。これら感染流行事例の原因真菌は *Cryptococcus gattii* であるが、従来から熱帯～亜熱帯地方で分離される *C. gattii* (VGI型)とは遺伝型を異にし、北米流行型 *C. gattii* の遺伝型は VGIIa、VGIIb (PNAS 101: 17258-263, 2004)、VGIIc型 (J Infect Dis 199: 1081-6, 2009)と分類され、従来認められなかった遺伝子変異型の新型の *C. gattii* 株であることが判明した。なかでも VGIIa、VGIIc型はマウスの実験から *Cryptococcus neoformans* よりも遥かに致死性の高い株であることが報告され (Nature 437, 2005)、便宜上、国立感染症研究所ではこの2つの遺伝型の *C. gattii* 株を高病原性(変異型) *C. gattii* 株、これによるクリプトコックス症を高病原性クリプトコックス・ガッティ感染症とし注意を喚起している(国立感染症研究所ホームページ)。

一方、わが国でもその変異型 *C. gattii* 株 (JP01株: VGIIa型)が、カナダ・北米など流行地域へは渡航歴のない日本人男性クリプトコックス症患者からが2007年に分離されていたことが2010年に報告された (Emerg Infect Dis 16: 1155-7, 2010)。さらに、我々は同じ症例から VGIIc型の変異型 *C. gattii* 株 (JP02株)も分離したことを報告し (Frontiers in Microbiology: 2016 vol 5, article 101, 2016) その後も *C. gattii* 国内感染例の報告が続いている。

しかし、高病原性クリプトコックス症においては感染病態、クリプトコックス症の標準的な治療法に対する反応の悪さ、サイトカイン、ケモカインの感染病態における役割、中枢神経系感染症における治療法など解明されていない部分が極めて多く、その解明は世界的に急務な課題である。これを受けて我々は以下のように現在まで感染病態や宿主免疫との関係などについて検討し報告してきた(播種性クリプトコックス症は2014年に5類感染症(全数把握)に指定された)。

2. 研究の目的

新興感染症である高病原性 *C. gattii* 感染症においては、*C. neoformans* 感染症と病態が極めて異なり、肺などの感染局所での宿主炎症反応に極めて乏しいということがわかってきた。本研究では、なぜ高病原性 *C. gattii* 感染症では炎症反応に乏しいのか、生体感染防御機構の面について検討を行う。内容として高病原性(変異型) *C. gattii* 株を用いて、1)高病原性 *C. gattii* 株に対するマクロファージ様細胞の貪食能に関する検討、2)高病原性クリプトコックス症のマウス感染モデル(肺炎、脳髄膜炎モデル)における炎症性サイトカインの発現や感染制御に与える効果の検討、3)感染マウスモデルにおける局所での宿主遺伝子発現の検討などの検討を行い、本課題に対する考察を行う。

3. 研究の方法

1) 自然免疫回避が高病原性クリプトコックス症の感染病態解析の本態か?ならびにインターフェロン (IFN-g) が *C. gattii* 株貪食に与える影響は?

我々の研究結果では、*C. gattii* 株の R265 株、JP02 株肺感染マウスにおける肺局所の乏しい炎症反応が観察され、R265 株での検討ではマクロファージによる貪食能が *C. neoformans* H99 株に比較し低下している事象が観察された。本検討では *C. neoformans* H99 株、*C. gattii* R265 株、JP02 株を対象に、*C. gattii*-マクロファージの interaction、すなわちマクロファージによる貪食回避が感染病態であるのかを検討し、さらに IFN-g 添加の有無別で貪食能の変化があるのかを検討した。

方法としては、マウスマクロファージ様の cell line である J774 細胞を 5×10^5 cell/well となるように 24 穴プレートにまき、培養液に IFN-g (10ng/ml) を添加した培養液と添加しない培養液とで 1 時間全培養を行った。その後、Calcofluor white で染色した各クリプトコックス株を 2.5×10^6 cell/well 接種し、5%CO₂ 存在下、37℃、3 時間培養した。その後、以前の報告 (Ikeda-Dantsuji Y, et al. J Infect Chemother 2015) の方法と同様に細胞を固定し、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、貪食細胞を同定した。

さらに、上記培養により、炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6 の産生について、培養液上清を対象に ELISA 法を用いてその濃度を測定した。

2) 炎症性サイトカインが高病原性クリプトコックス症の感染防御に与える影響の解析 (生体レベル解析: 脳髄膜炎モデル)

C. neoformans 感染症においては IFN-g が感染防御に重要な役割を果たしていることが知られ、感染マウスに IFN-g を投与すると臓器菌数の減少などが観察される (Kawakami K, et al. FEMS Immuno Med Microbiol 1996) が、*C. gattii* 感染症に対する効果はまだ確立していない。さらに、高病原性クリプトコックス症、とくに難治性とされている脳髄膜炎において IFN-g が感染病態改善に与える影響を検討し、IDSA ガイドラインでも評価が定まっていない中枢神経系 *C. gattii* 感染症の治療における IFN-g の位置づけを検証した。

(1) 高病原性クリプトコックス症 (脳髄膜炎モデル) 作成

マウスの高病原性クリプトコックス症 (肺炎モデル) は既に現在までの検討で確立されているため、脳髄膜炎モデルを新たに作成する。方法としては、マウスの頭蓋内に *C. gattii* 株を接種する (Schwarz P, et al. Antimicrob Agents Chemother. 2012)。脳髄膜炎発症の確認は脳組織の培養および病理標本にて行った。まず、6 週齢のメス、C57BL/6 マウスを用い、液体培養し、洗浄した *C. neoformans* H99 株、*C. gattii* R265 株、JP02 株を頭蓋内に接種した。接種菌量はそれぞれ 100 cfu/animal、1000 cfu/animal、50 cfu/animal に設定した。菌を接種したマウスにおいては生存率や脳、肺の臓器菌数について検討した。

(2) 高病原性クリプトコックス症 (脳髄膜炎モデル) に対する炎症性サイトカイン (の効果検証)

(1) で作成したマウスクリプトコックス脳髄膜炎モデルに対し、IFN-g を接種し、生存率、臓器内菌数の変化について検討した。菌接種 2 時間後に 2 μ g のリコンビナント IFN-g を 1 日 1 回腹腔内に投与し、これを計 7 日間投与した。

なお、本検討での内容は、国立感染症研究所の動物実験委員会の承認を得て実施されている。

4. 研究成果

1) 自然免疫回避が高病原性クリプトコックス症の感染病態解析の本態か? ならびにインター

フェロン（IFN-g）が *C. gattii* 株貪食に与える影響は？

C. neoformans H99 株での貪食率（平均±標準偏差）は、IFN-g 無添加では 3.0±1.1%であったが、IFN-g の添加により 22.0±3.2%まで有意に増加した（図 1）。一方、*C. gattii* 株においては、R265 株、JP02 株とも IFN-g 無添加では 2.0%程度であり、IFN-g の添加によっても貪食率の増加は認めなかった（図 1（A））。

一方、J774 細胞から産生される TNF- α 、IL-6 については *C. neoformans* H99 株においては、IFN-g 無添加ではそれぞれ 132.6±17.4 pg/ml、10.8±0.7 pg/ml であったが、IFN-g 添加ではそれぞれ 359.7±66.0 pg/ml、22.2±3.1 pg/ml と有意に増加した。しかし、貪食率と同様に、R265 株、JP02 株では IFN-g の有無での産生量の変化は認めなかった（図 1（B））。

2) 炎症性サイトカインが高病原性クリプトコックス症の感染防御に与える影響の解析（生体レベル解析：脳髄膜炎モデル）

マウスクリプトコックス髄膜炎モデルを用いた各種検討を行った。この髄膜炎モデルにおいて、*C. neoformans* H99 株を接種したマウスに、INF-g を投与すると、生存期間の延長が認められた。一方、*C. gattii* R265 株を接種したマウスに、INF-g を投与しても、非投与マウスと比較し生存期間の延長は認められなかった。さらに、*C. gattii* JP02 株を接種したマウスでは、若干ではあるが生存期間が延長した（図 2（A））。これらのマウスにおける臓器菌数の比較では、脳から H99 株では 10^6 CFU/g 以上の菌数が分離されたが、R265 株、JP02 株では 10^4 - 10^5 CFU/g の菌数が分離され、IFN-g の有無による菌数の変動を認めなかった（図 2（B））。一方、肺からの分離菌数についても、H99 株、JP02 株感染マウスにおいて IFN-g の有無による菌数の有意な変動は認めなかった（図 2（C））。また、脳・髄膜の病理組織像を検討した所、H99 株と R265 株、JP02 株間に大きな相違は認められなかった。

以上の結果から、*C. neoformans* 株においては、自然免疫をはじめとする生体防御能に炎症性サイトカイン、なかでも IFN-g が重要な役割を担っていることが推測されたが、*C. gattii* 株においては IFN-g によっても貪食能、生存率に変化が見られなかったことから、自然免疫が働きにくく、*C. neoformans* 株とは別の生体防御能が働いている可能性が示唆され、この自然免疫からの逃避が高病原性をもたらしているものと考えられた。今後更なる検討が望まれる。

Figure 1 (Ikeda-Dantsuji Y, Nakamura S, Ohno H, et al. Med Mycol 2018)

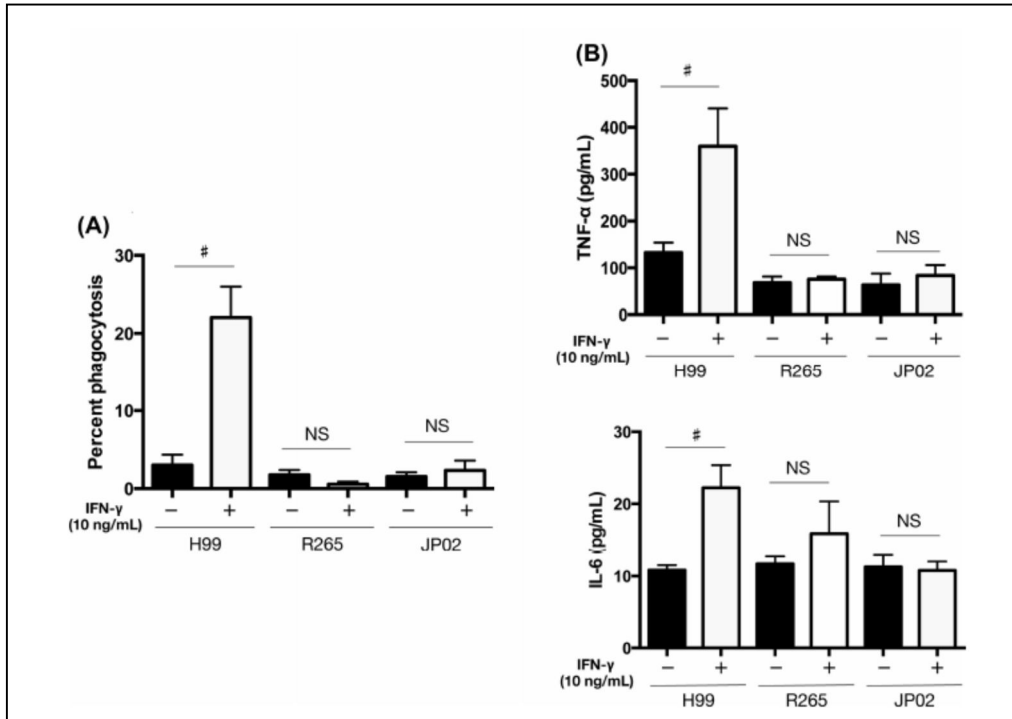
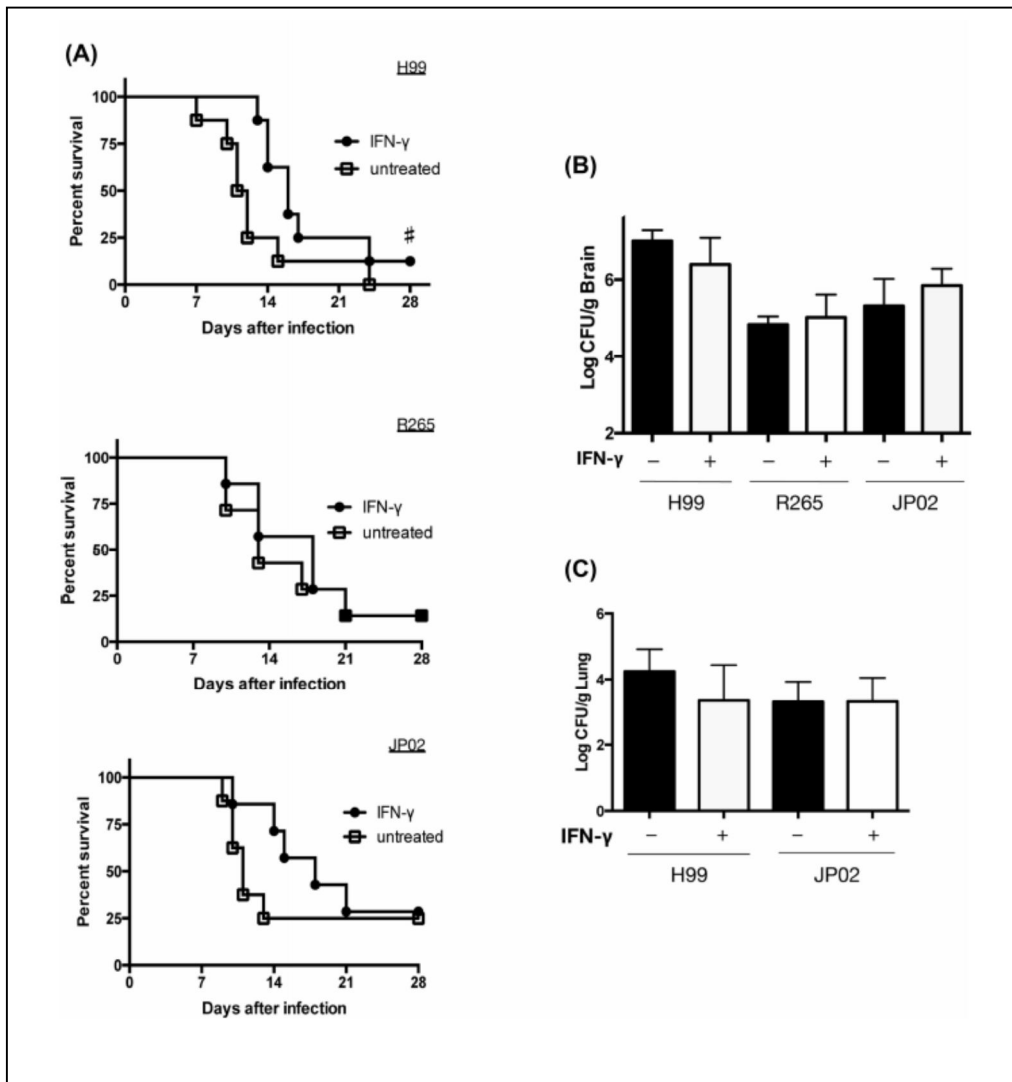


Figure 2 (Ikeda-Dantsuji Y, Nakamura S, Ohno H, et al. Med Mycol 2018)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 1) Sakai J, Imanaka K, Kodana M, Ohgane K, Sekine S, Yamamoto K, Nishida Y, Kawamura T, Matsuoka T, Maesaki S, Oka H and Ohno H.	4. 巻 19
2. 論文標題 Infective endocarditis caused by <i>Capnocytophaga canimorsus</i> ; a case report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 927
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Ikeda-Dantsuji Y, Nakamura S, Ohno H, Inukai T, Nagi M, Ueno K, Umeyama T, Kinjo Y, Yamagoe S, Shibuya K, Miyazaki Y.	4. 巻 56
2. 論文標題 Intraspecies variation in the efficacy of adjunctive recombinant interferon- therapy against cryptococcal meningoencephalitis in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Med Mycol	6. 最初と最後の頁 382-386
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/mmy/myx063	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 Motokawa N, Miyazaki T, Hara A, Fukuda Y, Morino S, Nakamura H, Iwasaki K, Soda H, Izumikawa K, Yanagihara K, Ohno H, Miyazaki Y, Kohno S, Mukae H.	4. 巻 57
2. 論文標題 Pulmonary <i>Scedosporium apiospermum</i> infection with pulmonary tumorlet in an immunocompetent patient.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Intern Med	6. 最初と最後の頁 3485-3490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.1239-18	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 Kazuo Imai, Norihito Tarumoto, Lucky Ronald Runtuwene, Jun Sakai, Kyoko Hayashida, Yuki Eshita, Ryuichiro Maeda, Josef Tuda, Hideaki Ohno, Takashi Murakami, Shigefumi Maesaki, Yutaka Suzuki, Junya Yamagishi, Takuya Maeda.	4. 巻 29
2. 論文標題 An innovative diagnostic technology for the codon mutation C580Y in <i>kelch13</i> of <i>Plasmodium falciparum</i> with MinION nanopore sequencer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Malaria J	6. 最初と最後の頁 217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12936-018-2362-x	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 Kimura M, Araoka H, Yamamoto H, Asano-Mori Y, Nakamura S, Yamagoe S, Ohno H, Miyazaki Y, Abe M, Yuasa M, Kaji D, Kageyama K, Nishida A, Ishiwata K, Takagi S, Yamamoto G, Uchida N, Izutsu K, Wake A, Taniguchi S, and Yoneyama A.	4. 巻 182
2. 論文標題 Clinical and microbiological characteristics of breakthrough candidemia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients in a Japanese hospital.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Antimicrob. Agents Chemother	6. 最初と最後の頁 847-853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.01791-16	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 Ota H, Yamamoto H, Kimura M, Araoka H, Fujii T, Umeiyama T, Ohno H, Miyazaki Y, Kaji D, Taya Y, Nishida A, Ishiwata K, Tsuji M, Takagi S, Asano-Mori Y, Yamamoto G, Uchida N, Izutsu K, Masuoka K, Wake A, Yoneyama A, Makino S, Taniguchi S.	4. 巻 61
2. 論文標題 Successful Treatment of Pulmonary Mucormycosis Caused by Cunninghamella bertholletiae with High-Dose Liposomal Amphotericin B (10 mg/kg/day) Followed by a Lobectomy in Cord Blood Transplant Recipients.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mycopathologia	6. 最初と最後の頁 e01791-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11046-017-0149-1	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 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大塚聖也、酒井 純、大野秀明
2. 発表標題 Bordetella hinziiが検出された敗血症の一例
3. 学会等名 第31回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下裕敬、川村隆之、西田祐介、山本 慧、野崎由迅、小野大輔、酒井 純、三村一行、岡 秀昭、大野秀明
2. 発表標題 絞扼性イレウスを契機として診断された腸結核の1例
3. 学会等名 第68回日本感染症学会東日本地方会総会学術集会、第66回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井 純、西田祐介、山本 慧、中村茂樹、宮崎義継、岡 秀昭、大野秀明
2. 発表標題 病理組織検体からの病原真菌遺伝子検出を通じたAntifungal Stewardshipに関する検討
3. 学会等名 第63回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原 竜也、長山直美、大澤雄一郎、近藤正巳、酒井 純、大野秀明
2. 発表標題 VCM投与中に血小板減少を来した1例
3. 学会等名 第67回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井 純、岡 秀昭、前崎繁文、大野秀明
2. 発表標題 慢性肉芽腫症に合併した難治性筋膿瘍の一例
3. 学会等名 第92回日本感染症学会総会、第66回日本化学療法学会学術集会合同学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 酒井 純、山本 慧、西田祐介、中村茂樹、植松和嗣、宮崎義継、大野秀明
2. 発表標題 多発空洞を呈し、L-AMBで軽快した肺ムーコル症の1例
3. 学会等名 第67回日本感染症学会東日本地方会総会学術集会、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 大野秀明、岡 秀昭
2. 発表標題 シンポジウム10 スペイン風邪から101年：インフルエンザの診断・治療・予防 4. 感染対策の基本と応用
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 深井麻澄、原 竜也、菊地明子、長山直実、大澤雄一郎、岡 秀昭、大野秀明、近藤正巳
2. 発表標題 当院におけるポリコナゾール（VRCZ）の血中濃度測定の実状とその評価
3. 学会等名 第87回日本感染症学会西日本地方会学術集会、第60回日本感染症学会中日本地方会学術集会、第65回日本化学療法学会西日本支部総会 合同学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 樽本憲人、大野秀明	4. 発行年 2017年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 321
3. 書名 神経内科・神経感染症（亀井 聡編）クリプトコッカス髄膜炎はどのような病気で、どのように診断・治療するのですか？	

〔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	宮崎 義継 (Miyazaki Yoshitsugu) (00311861)	国立感染症研究所・真菌部・部長 (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
---------	---------