

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17650

研究課題名(和文)新規ニューモシスチス肺炎モデルマウスの確立と発症に寄与する免疫不全機構の解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of spontaneous pneumocystis pneumonia in Caspase8 and Ripk3 double deficient mice

研究代表者

三好 嗣臣 (Miyoshi, Shion)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：60833192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、細胞死を制御する因子であるCaspase8 とRipk3 の二重遺伝子欠損マウスがニューモシスチス肺炎(Pneumocystis pneumonia: PCP)を自然発症することを見出した。本マウスではCD3(+)/B220(+)⁺の異常リンパ球の割合が増加し、類似した表現型を呈するlprマウスではPCPは発症せず、本マウスに特異的な現象と考えられた。DKOマウスのT細胞系でPD-1等のExhaustion Markerの発現が上昇しており、PCPの発症には本マウスの加齢あるいは免疫系の減弱が関与していることが示唆された。本マウスはPCPのモデルマウスとして有用と考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新規PCPモデルマウスの確立とニューモシスチス肺炎発症機序、その原因となる免疫不全機構の解明を目的とし、研究をおこなった。ニューモシスチスは真菌の一種だが、培養系や簡易に作成できる肺炎モデルマウスが確立されていないことから、その生態や肺炎の病態生理は未だに不明な点が多い。本来、PCPは容易に自然発症するような病態ではないが、本研究ではDKOマウスが免疫不全を有しており、再現性をもってPCPを発症することが示された。ニューモシスチスの簡易な肺炎発症モデルとして有用であり、致死的であるPCPの学術研究および臨床応用を目指した研究いずれにおいても意義深い。

研究成果の概要(英文)：We established that pneumocystis pneumonia (PCP) occurs in old double knockout mice (DKO mice) of Casp8 and Ripk3. The proportion of CD3(+)/B220(+)⁺ aberrant lymphocytes was increased in these mice, and PCP did not develop in lpr mice, which exhibit a similar phenotype. Therefore, we considered the spontaneous onset of lung inflammation to be a phenomenon specific to this mouse. Comparison of lung RNA sequencing showed that PD-1 expression was elevated in the T-cell lineage in old infected DKO mice. These findings suggest that aging or weakening of the immune system of these mice may be involved in the pathogenesis of pneumonia. This DKO mice may be useful as a model mouse for PCP.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：ニューモシスチス肺炎 Caspase8 Ripk3 細胞死 アポトーシス ネクロトーシス

1. 研究開始当初の背景

ニューモシスチス肺炎(Pneumocystis pneumonia: PCP)は AIDS が世界的に蔓延した際に、その最頻かつ重篤な合併症として注目されるようになった、致死的な肺炎である。病原菌は真菌の一種とされているが、培養系やモデルマウスが確立されていないことから、その生態や病態生理は不明な点が多い。そのような現況下で、申請者らは細胞死を制御する因子である *Caspase8* と *Ripk3* の二重遺伝子欠損マウス(Double knock out マウス: DKO マウス)が PCP を自然発症することを見出した。

2. 研究の目的

本研究は、新規 PCP モデルマウスの確立とニューモシスチスの増殖機構、さらにはその原因となる免疫不全機構の解明を主目的とする。ニューモシスチスは真菌の一種とされるが、培養系や簡易に作成できる肺炎モデルマウスが確立されていないことからその生態や肺炎の病態生理は不明な点が多い。本来、PCP は容易に自然発症するような病態ではないが、前述した DKO マウスにおいては老齢化に伴い、通常の飼育条件下で自然発症することが見出されている。したがってこの DKO マウスを用いた研究には独自性があり、まだ未解明なニューモシスチスの増殖機構の解明や簡易な肺炎発症モデルが作成できれば、学術研究及び臨床応用を目指した研究いずれにおいても大変意義深い。

3. 研究の方法

(1) 前述の DKO マウスが PCP モデルマウスとなりうるか詳細に性状解析を行い、さらには *Casp8* と *Ripk3* の遺伝子欠損がどのような機構で免疫に影響を及ぼしているのかを明らかにする。

(2) DKO マウス表現型の既報告との相違点や免疫機能との関係を明らかにするため、コントロールマウス肺、感染した DKO マウス肺、感染していない DKO マウス肺の 3 群で網羅的な RNA シーケンス等を行い、発現遺伝子の比較をする。

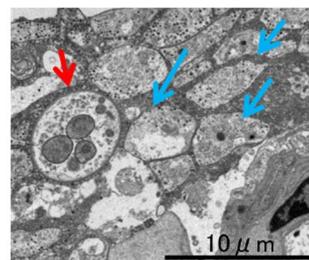
4. 研究成果

(1) DKO マウスとコントロールマウスの免疫細胞の解析を行った。各臓器(肺、脾臓、リンパ節、血液、骨髄)に対するフォローサイトメトリーを行い、特に DKO マウスの脾臓とリンパ節では CD3(+)B220(+)の異常リンパ球が増加しており獲得免疫系の異常が疑われた。また DKO マウスは週齢とともに脾臓やリンパ節が腫大していた(図1)。マウスの血液データの比較では、DKO マウスはコントロールマウスと比較して白血球数の低下と貧血がみられた。以上より、DKO マウスでは免疫系細胞の構成が変化することが示された。



図1 上段：脾臓 下段：リンパ節

(2) DKO マウスは老齢化により肺炎を発症し、肺の重さが増加することを、再現性をもって確認した。また DKO マウスに類似した表現型を呈する *lpr* マウスを用いて 30 から 40 週齢まで観察したが、ニューモシスチス肺炎は 1 例も発症しなかった。よって肺炎の自然発症は本マウスに特異的な現象の可能性が高い。感染肺の顕微鏡観察ではグルコット染色陽性の真菌が多量に観察され、PCR やダイレクトシーケンスの結果、増殖している菌がニューモシスチスであることを確定した。また著明に肥大したマクロファージが多数認められた。感染したマウス肺の電子顕微鏡像では、肺に存在している菌体の大半がニューモシスチスの栄養体であり、シスト



赤矢印:シスト 青矢印:栄養体

図2 感染マウス肺の電子顕微鏡像

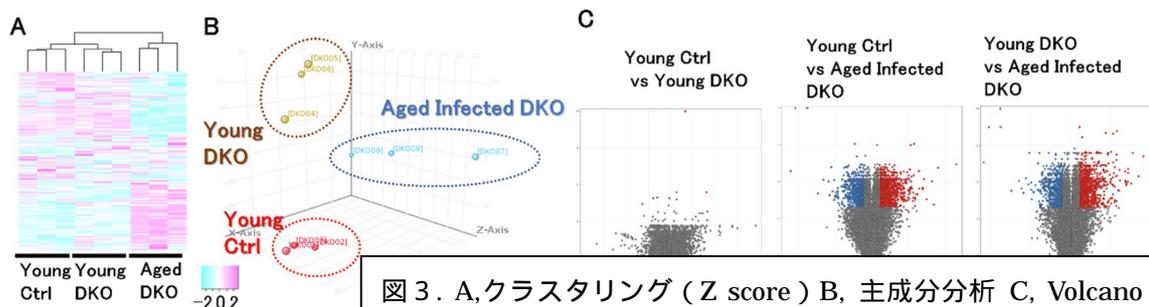


図3. A,クラスタリング (Z score) B, 主成分分析 C, Volcano

は一部であった(図2)。また栄養体は 型上皮細胞に付着している像が確認された。

(3)PCP 発症に関わる因子を検討するため、PCP を発症した老齡 DKO マウスの肺、若齡の DKO マウスの肺、若齡のコントロールマウスの肺を用いて RNA シーケンスを行い、網羅的解析を行った(図3)。3 群の全発現遺伝子のクラスタリング、主成分分析、Valvano plot による解析を行ったところ、PCP を発症した老齡 DKO マウスの肺とそれ以外の 2 群で特徴が異なっていた。さらに PCP を発症する代表的疾患である AIDS 患者では、疲弊マーカーの発現が上昇していることが報告されていることから、本マウスにおける疲弊マーカーの発現に関して解析を行った。代表的な疲弊マーカーである、PD-1、LAG-3、TIM-3 といった因子やリガンドである PD-L1、PD-L2 の発現を確認したところ、RNA シーケンスにおいて発現の上昇が確認された(図4A)。さらに定量的 PCR を行い、PD-1、PD-L1、PD-L2 の mRNA 解析をおこなったところ、これらの因子の発現が上昇していた(図4B)。以上より、PCP を発症した老齡 DKO マウスの肺では疲弊マーカーの発現が上昇していることが分かった。

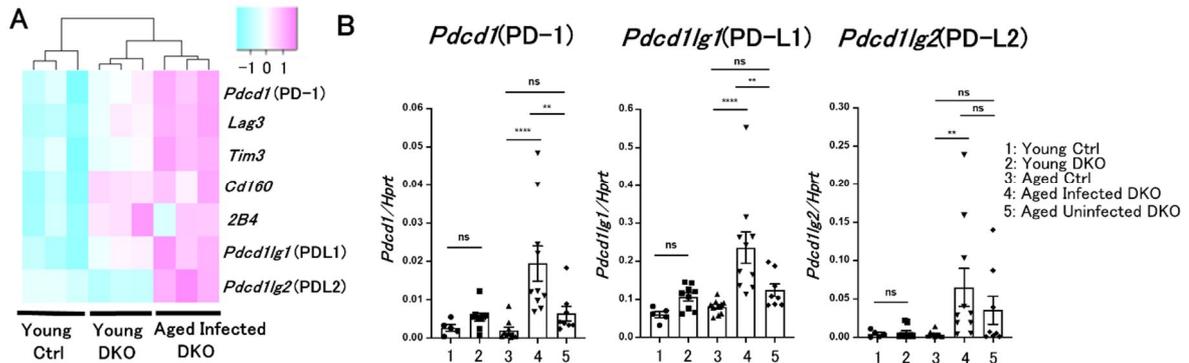


図4. A, 代表的疲弊マーカーの Heat map B, Quantitative PCR

(4)発現が上昇している PD-1 や PD-L1 といった因子がどのような細胞に発現しているかを調べるためにフローサイトメトリー解析を行った。PCP を発症した老齡マウスの肺を用いて調べたところ、PD-1 の発現は CD4 あるいは CD8 陽性 T 細胞で発現レベルが高いことがわかった(図5)。AIDS の患者においても、リンパ球の PD-1 発現上昇が報告されており、本マウスとヒトの PCP には類似点があることが分かった。

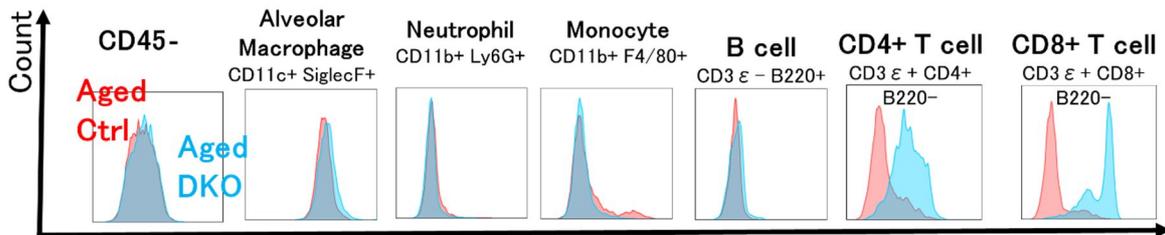


図5. PD-1 のフローサイトメトリー解析

(5)簡易的な感染モデルマウスの検索のため、肺からニューモシスチスの菌体採取を試みた。感染したマウス肺に気管支肺胞洗浄を行い、菌の回収を試みたが、その他の雑菌も回収されてしまう問題が生じた。結果、培地でのコンタミネーションが問題となり、培養方法の検索自体が困難であった。

さらに PCP を発症したマウスから採取した肺胞洗浄液を、若齡の DKO マウスへ気管内投与し感染させ、加齢を待たずして PCP 発症を早期に発症させることができるかを検討した。8-12 週で気管内投与を行い、8 週後に解剖し肺を観察したが、PCP の発症はみられなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三好 嗣臣
2. 発表標題 細胞死抑制マウスにおけるニューモシスチス肺炎自然発症機序の解明（学術部会賞候補演題）
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Soh Yamazaki
2. 発表標題 Mice lacking death ligand-induced cell death spontaneously develop Pneumocystis pneumonia
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shion Miyoshi
2. 発表標題 Spontaneous development of Pneumocystis pneumonia in mice lacking death ligand-induced apoptosis and necroptosis
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------