

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07507

研究課題名(和文) 肺常在性記憶免疫と好酸球様環状核球の連鎖反応は、肺真菌症ワクチンの作用に必要なか？

研究課題名(英文) Lung resident memory Th2 cells ameliorates pulmonary cryptococcosis caused by *Cryptococcus gattii*

研究代表者

上野 圭吾 (Ueno, Keigo)

国立感染症研究所・真菌部・主任研究官

研究者番号：10550220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではGattij型クリプトコックス症に対する不活化経鼻ワクチンを開発した。このワクチンは、肺常在性記憶Th2細胞=lung TRM2と肉芽腫を誘導し病態を改善した。IL-4/IL-13二重欠損(DKO)マウスでは、肉芽腫形成が減弱しワクチン効果は消失した。Lung TRM2をRag-1欠損マウスに移入すると感染抵抗性が惹起された。抗原存在下でlung TRM2とマクロファージを共培養すると多核巨細胞(MGCs)が誘導され、DKOマウスのlung TRM2はMGCsを誘導しなかった。以上の結果から、lung TRM2が肉芽腫を誘導し感染を抑えると結論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は、肺常在性記憶Th2細胞=lung TRM2の肺クリプトコックス症に対する防衛的役割を明らかにした。lung TRM2は好酸球を誘導するものの、好酸球だけでは十分な感染防御効果は得られず、II型肉芽腫を誘導することでクリプトコックス症を制御した。Lung TRM2はマクロファージとの共培養で多核巨細胞を誘導した。これらの新しい知見は、クリプトコックス症ワクチンの開発において有益である。

研究成果の概要(英文)：The pathogenic fungus *Cryptococcus gattii* causes pulmonary cryptococcosis. In this study, we developed an intranasal vaccine against this infection. This vaccine induced lung resident memory Th2 cells =lung TRM2 and ameliorated the disease with granuloma formation. In IL-4/IL-13 double-deficient (DKO) mice, the granuloma formation and the protective effect was downregulated. The immunosuppressive agent FTY720 had no effect on this protection. Adoptive transfer of lung TRM2 rendered Rag1-deficient mice resistant to the infection. Coculture of lung TRM2 and macrophages in the presence of the antigen formed multinucleated giant cells (MGCs), while lung TRM2 from DKO mice did not induce MGCs. These MGCs phagocytosed live *C. gattii* cells independently of opsonization. Taken together, we concluded that the vaccine-related lung TRM2 induces granulomas via IL-4/IL-13 and suppresses *C. gattii* infection.

研究分野：医真菌学, 免疫学

キーワード：肺常在性記憶T細胞 クリプトコックス症 肉芽腫 多核巨細胞 Th2

1. 研究開始当初の背景

病原性真菌 *Cryptococcus gattii* はクリプトコックス症の原因菌である。この感染症の侵入門戸は肺であり、中枢神経系に播種する症例では難治性である。北米を中心に集団感染が報告され、本感染症が新興感染症として認知されたが、2024 年現在もワクチンは認可されていない。

クリプトコックス症ワクチンの基礎研究は 1950 年代から着手され、成分ワクチンまたは全粒子抗原を使った事例がある。抗原には、莢膜多糖や *C. neoformans* 由来のタンパク質、あるいは遺伝子組換え弱毒株それ自体が使われた (Ueno et al., Biol Pharm Bull, 2020)。2019 年の研究開始当時は、*C. gattii* 感染に有効なワクチンが少なく課題となっていた。

我々は、*C. gattii* 感染に有効な樹状細胞 (DC) ワクチンを開発した (Ueno et al., Mucosal Immunol, 2019)。このワクチンは、肺常在性記憶 Th17 細胞 = lung TRM17 を誘導し、感染後には好中球と肉芽腫の誘導を伴って感染を抑制した。DC ワクチンは、細胞の養子移入が必要であり拒絶反応の観点から臨床応用には多くの課題があった。そのため、養子移入に頼らず抗原を直接接種し肺常在性記憶 T 細胞を誘導するワクチンの開発が必要となった。我々は、高い免疫賦活性を有する全粒子抗原を開発し (Ueno et al., PLoS ONE, 2019)、予備データとしてこの抗原が経鼻ワクチンに利用できることを明らかにした。

2. 研究の目的

高病原性 *C. gattii* の感染を抑制する新しい不活化経鼻ワクチンの検証とその作用機序の解明を目的とした。

3. 研究の方法

3.1. 経鼻ワクチン

C. gattii 莢膜欠損株の熱処理死菌をワクチン抗原とした。アジュバントを使用する場合は、添付文書に従った。抗原 $1e+07$ cells/200 μ L/mouse を鼠径部の皮下に投与した。その後 2 週間毎に抗原 $1e+07$ cells/15 μ L/mouse を深麻酔下にて経鼻投与した。

3.2. 感染実験

C. gattii R265 株を YPD 培地で 1 日培養し、PBS で菌体を洗浄した。PBS に懸濁した菌液を希釈し、 $3e+03$ cells/30 μ L/mouse の R265 を深麻酔下にて経鼻接種した。FTY720 の投与・肺内菌数の測定・生存率の評価は、先行研究と同様に実施した (Ueno et al., Mucosal Immunol, 2019)。

3.3. フローサイトメトリー

コラゲナーゼ D・ヒアルロニダーゼ・DNaseI の酵素混合液を用いて、GentleMACS[®] にて肺組織を分散した。肺の白血球は、比重遠心法 (70%・44%・30% パーコール) で濃縮した。脾臓は、70- μ m セルストレーナーで分散させた後、DNaseI を加えて細胞の凝集を解消し、白血球画分とした。再刺激実験では、丸底の 96 穴プレートで白血球と熱処理死滅菌体を各 $1e+06$ cells/well

添加し 1 日培養した。蛍光抗体による細胞の標識・細胞内染色の方法・フローサイトメトリーでの解析方法は、先行研究に準じた (Ueno et al., Mucosal Immunol, 2019)。

3.4. CD4⁺ T 細胞の移入実験

感染 7 日目にワクチン群及び非ワクチン群の肺から白血球を回収し、CD4⁺ 磁気ビーズを用いて純度 95% の CD4⁺ T 細胞を得た。Rag-1 欠損マウスの尾静脈より 1e+06 cells/mouse の CD4⁺ T 細胞を移入した。移入した T 細胞が Rag-1 マウス体内で生着するまで 3 週間待ち、その後 R265 を感染させた。CD4⁺ T 細胞のみが生着し、B 細胞や CD8⁺ T 細胞は存在しないことは、フロー解析で確認した。

3.5. 病理解析

感染 14 日目の肺を中性緩衝ホルマリンで 1 日以上固定した。パラフィン切片の作製及び染色はバイオ病理研究所に依頼した。

3.6. in vitro における多核巨細胞 (MGCs) の誘導

骨髄細胞を GM-CSF または M-CSF 存在下で 6-7 日間培養し、骨髄由来樹状細胞 (BMDCs) や骨髄由来マクロファージ (BMM) を得た。ワクチン群及び非ワクチン群の肺から非感染状態の白血球を回収し、上述の方法で CD4⁺ T 細胞を得た。96 穴ウェルプレート内で各細胞と熱処理死菌を 1e+05 cells ずつ混合し、6 日間培養した。MGCs はディフ・クイック™染色により可視化した。ウェル内の細胞をすべて撮影するために、KEYENCE BX-X810 のイメージサイトメーターモジュールを使用した。細胞融合し核を 5 つ以上含む細胞を MGCs と定義し、ウェル内の MGCs を計測した。計測には ImageJ のカウント・モジュールを使用した。

MGCs の貪食アッセイでは、IL-4 存在下で 6 日間培養した MGCs を用いた。貪食アッセイは、過去の方法に従った (Ueno et al., PLoS ONE, 2019)。AF488 で蛍光標識した R265 の生菌を 6e+05 cells/well 添加しさらに 1 日培養した。培養 7 日目、貪食されずに細胞外に存在していた菌体は洗浄除去。ウェル底や細胞に付着した菌体は、Calcofluor White (CFW) で染色した。その後、中性緩衝ホルマリンで固定し、MGCs の核をヨウ化プロピジウムで染色した。貪食されずに細胞外にいる菌体は CFW で青く標識され、細胞内に貪食された菌体は AF488 の標識で検出される。蛍光観察は、KEYENCE BX-X810 で行った。

4. 研究成果

4.1. 不活化経鼻ワクチンは、C. gattii の感染病態を改善した

最終ワクチンから 1 ヶ月以上経過した後に R265 株を経鼻感染させた。非ワクチン群に比べて、ワクチン群では感染 14 日目の肺内菌数が有意に低下し、感染後の生存率も有意に改善した。

4.2. 不活化経鼻ワクチンは、肺常在性記憶 Th2 細胞 = lung TRM2 を誘導した

最終ワクチンから 1 ヶ月以上経過した後に肺と脾臓を回収し、フロー解析にて免疫細胞のプロファイルを評価した。経鼻ワクチン群では、CD4⁺ TCR-⁺ CD44⁺ CD62L⁻ CD45^{iv-} CD69⁺

ST-2⁺ Gata-3⁺ の集団が肺で増加し, FTY720 投与後も肺でその数が維持された. 脾臓の CD4⁺ T 細胞はワクチンの有無で増減しなかった. ワクチン群の肺 CD4⁺ T 細胞は, 細気管支と血管が隣接する間質に局在し小さい濾胞を形成した. この小濾胞は, 非ワクチン群では観察されず, ワクチン群ではワクチン投与後 5 ヶ月しても観察された. ワクチン群の肺から回収した CD4⁺ T 細胞を *C. gattii* で再刺激すると IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 を産生した. この応答は, *Candida albicans* で刺激した場合には見られず, 非ワクチン群の CD4⁺ T 細胞や脾臓の CD4⁺ T 細胞でも見られなかった. これらの結果から, 今回の不活化経鼻ワクチンが肺常在性記憶 Th2 細胞 = lung TRM2 を誘導すると判断した.

4.3. Lung TRM2 は感染制御に関与する

Lung TRM2 は, 経鼻ワクチンの生体防御作用を担うか? 感染チャレンジ前から FTY720 を投与し, 循環リンパ球が著減した条件でワクチンの生体防御作用を評価したところ, 循環リンパ球が枯渇してもワクチン群では十分に肺内菌数が減少した. つまり, 循環リンパ球がワクチンの肺内菌数抑制作用に不要であり, lung TRM2 が感染防御に関与する. 次に, 免疫した肺の CD4⁺ T 細胞を Rag-1 欠損マウスに移入し, T 細胞再構築後に感染実験を行った. ワクチン群の肺 CD4⁺ T 細胞を移入した場合は感染抵抗性を獲得し, 非ワクチン群の T 細胞を移入した場合は感染に屈した. 第三に, IFN γ ・IL-5・IL-4/IL-13 欠損マウスを使って, ワクチンの生体防御作用が消失するか検証した. IFN γ 欠損マウスや IL-5 欠損マウスでは, 野生型と同様に経鼻ワクチンの防御効果が観察された. 一方, IL-4/IL-13 二重欠損 (DKO) マウスでは経鼻ワクチンの生体防御作用が消失した. これらの結果から, lung TRM2 が経鼻ワクチンの感染制御作用に関与すると考えた.

4.4. ワクチン群では感染後に好酸球の集積と II 型肉芽腫が見られる

Lung TRM2 がワクチン群の感染制御に必要なのであれば, 感染後も II 型の免疫応答が惹起されるか? 感染 7 日目の肺を回収しフロー解析を行った. ワクチン群では, 好酸球 (Siglec-F^{hi} Ly6G^{lo} CD11c⁺ CD11b^{hi})・lung TRM2 (CD4⁺ TCR β ⁺ CD44⁺ CD62L⁻ CD69⁺ ST-2⁺ CD127⁺)・II 型 DC/M (Siglec-F⁻ Ly6G⁻ CD11c^{hi} MHC-II^{hi} CD206⁺)が増加した. DKO マウスのワクチン群では, 好酸球の増加を認めず, ST-2 や CD206 の発現も増加しなかった. 感染 14 日目のワクチン群の肺から CD4⁺ T 細胞を回収し, *C. gattii* の抗原で再刺激すると IFN γ は産生せず IL-13 を産生した. *C. albicans* の刺激ではサイトカイン産生はなく, 非ワクチン群でもサイトカイン産生は見られなかった.

感染 14 日目の肺を病理解析した. 非ワクチン群では, 炎症性細胞の浸潤は乏しく, 肺胸腔内で菌体が増殖する様子が見られた. ワクチン群では炎症性細胞の著明な浸潤があり, 菌体周囲に MGCs を認めた. PAS 染色, Sirius Red 染色の所見で, ワクチン群の気管支周囲に膠原線維の沈着・気管支の肥厚及び粘液産生も見られ, 喘息に似た病理像も観察された. DKO マウスでは, ワクチン群の MGCs は少なく喘息様病理像も解消された. この MGCs は, IFN γ 欠損マウスでは野生型と同様に観察された. これらの結果から, ワクチン群では II 型肉芽腫が形成され, 菌体の増殖が抑制されると推察した.

4.5. 抗原存在下で lung TRM2 とマクロファージを共培養すると MGCs ができる

Lung TRM2 は MGCs を直接誘導する活性があるのか？本解析では、BMDCs や BMM を用い、抗原存在下で肺の CD4⁺ T 細胞と共培養した際に、MGCs が観察されるか検証した。抗原非存在下では、共培養で MGCs は誘導されなかった。抗原存在下で BMDCs または BMM をワクチン群由来の肺 CD4⁺ T 細胞と 6 日間共培養すると、MGCs が 1 ウェルあたり 200 個程度観察された。DKO マウス由来の肺 CD4⁺ T 細胞は、抗原存在下で共培養しても MGCs は誘導されなかった。従って、抗原に応答した lung TRM2 は IL-4/IL-13 の産生に依存して MGCs を誘導すると考えられる。

II 型の MGCs 及び肉芽腫は、*C. gattii* に対して防衛的か？この解析では、GM-CSF と IL-4 で 6 日間培養し得られる MGCs が、R265 株の生菌を貪食するか検証した。通常、*Cryptococcus* spp の貪食にはオプソニン化が必要である (Ueno et al., Med Mycol, 2019)。GM-CSF 単独で 6 日間培養した場合は、MGCs は誘導されず貪食効率は低かった。一方、GM-CSF と IL-4 で 6 日間刺激し、BMDCs から MGCs を誘導した場合は、MGCs は R265 株を貪食した。この貪食には血清によるオプソニン化を必要としなかった。

4.6. 結論

本研究で開発した不活化経鼻ワクチンは、*C. gattii* 感染症に対して防衛的な lung TRM2 を誘導し、II 型の免疫応答と肉芽腫形成を伴い感染を制御する。肺常在性 CD4⁺ 記憶 T 細胞 = lung CD4⁺ T_{RM} は、再感染に応答して速やかに炎症応答を惹起する集団と考えられていた。本研究では、lung TRM2 が MGCs 形成に直接関与しうることを示しており、躍動的な感染防衛機構に lung TRM2 が関与する側面が見えたと言える。これらの研究成果は、国際誌に投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Ueno Keigo, Tsuge Soichiro, Shimizu Kiminori, Miyazaki Yoshitsugu	4. 巻 67
2. 論文標題 Promising whole cell vaccines against cryptococcosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 211 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.13056	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 Ueno Keigo, Otani Yoshiko, Yanagihara Nao, Urai Makoto, Nagamori Akiko, Sato Fukushima Miyuki, Shimizu Kiminori, Saito Noriko, Miyazaki Yoshitsugu	4. 巻 x
2. 論文標題 Cryptococcus gattii evades CD11b mediated fungal recognition by coating itself with capsular polysaccharides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 x
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.202049042	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 6件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Keigo Ueno , Kiminori Shimizu , Yun Chang , June Kwon-Chung , Yoshitsugu Miyazaki
2. 発表標題 Vaccine-inducing lung resident CD4+ memory T cells are protective against Cryptococcus gattii infections.
3. 学会等名 21st Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keigo Ueno , Yoshitsugu Miyazaki
2. 発表標題 Two intranasal vaccines against Cryptococcus gattii induce protective lung resident memory Th2 cells
3. 学会等名 The 9th Global Network Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上野 圭吾, 宮崎 義継
2. 発表標題 高病原性クリプトコックス症に対する獲得免疫とワクチンの研究: 米国NIHへの留学を経験して
3. 学会等名 第95回 日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上野 圭吾, 宮崎 義継
2. 発表標題 クリプトコックス症に対するワクチンの基盤研究: 感染制御に寄与する獲得免疫の新知見
3. 学会等名 第65回日本医真菌学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上野 圭吾, 清水 公德, 山越 智, 宮崎 義継
2. 発表標題 Cryptococcus gattiiは荚膜による抗原被覆作用でCD11bによる菌体認識を回避する
3. 学会等名 第65回日本医真菌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上野 圭吾, 宮崎 義継
2. 発表標題 クリプトコックス症ワクチンの基盤研究から見えてきた肺常在性記憶型T細胞の重要性
3. 学会等名 第70回 日本感染症学会東日本地方会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上野 圭吾, 宮崎 義継
2. 発表標題 高病原性クリプトコックス症に対するワクチン開発とその生体防御機構について
3. 学会等名 第64回 日本医真菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野 圭吾, 山越 智, 宮崎 義継
2. 発表標題 肺常在性記憶型T細胞による高病原性クリプトコックス症の制御
3. 学会等名 第94回 日本感染症学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020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		
米国	NIAID		