

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：82603
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591115
 研究課題名（和文） 抗クリプトコックス細胞表面層蛋白抗体の持続感染診断法ならびに重症感染症治療への応用
 研究課題名（英文） Application of anti-cryptococcal cell surface protein antibody against latent infection diagnosis and control of severe diseases of cryptococcosis.
 研究代表者
 大野秀明（OHNO HIDEAKI）
 国立感染症研究所・生物活性物質部・室長
 研究者番号：20325640

研究成果の概要（和文）：シグナルシーケンストラップ法（SST 法）を用いてクリプトコックス細胞表面層蛋白、分泌蛋白を同定し、それに対するモノクローナル抗体を作成し診断、治療への可能性を検討した。得られた 6 種類の抗体を利用し ELISA 系を構築するとともに、その抗体の菌増殖に及ぼす影響を検討したところ、今回標的とした蛋白においては菌増殖への影響は低いと考えられたが、好気条件下、嫌気条件下でも細胞外への分泌が推定されたことから、潜伏感染検出の標的蛋白となりうる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Cell surface and secretory proteins of *Cryptococcus neoformans* were detected using signal sequence trap (SST) method, and monoclonal antibodies against one of those proteins were obtained. In addition, the possibility of detection of latent infection diagnosis and controlling severe cryptococcal diseases applying with antibodies were also evaluated. Consequently, the protein was confirmed on cell wall and to be secreted outside cell under both aerobic and anaerobic conditions, and it speculated that it was a candidate protein on diagnosis of *Cryptococcus* latent infection, however, that protein seemed to have no relevance with cell growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	0	1,200,000
2011 年度	1,000,000	0	1,000,000
2012 年度	900,000	0	900,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	0	3,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、感染症内科学

キーワード：日和見感染症

1. 研究開始当初の背景

Cryptococcus neoformans によるクリプトコックス症は主として日和見感染症としてみられることが多いが、健常人にも十分発病するなど *C. neoformans* そのものは病原性の高い真菌である。また、クリプトコックス症に

は肺、中枢神経、皮膚など幾つかの病型があげられるが、中枢神経系クリプトコックス症は極めて重篤な病態であり、全クリプトコックス症例の 80～90%を占めるとされている（山口英世：病原真菌と真菌症、南山堂）。さらに、HIV 感染者など免疫不全患者では容易

に中枢神経系クリプトコックス症を合併し致死的となり、HAART 時代が標準の現在でさえ極めて重要な臨床的課題である (Lortholary O, et al. AIDS 20, 2006 ほか)。

近年、*C. neoformans* は結核菌と同じように生体内で潜伏感染することが明らかとなり (Dromer F, et al. J. Med. Vet. Mycol 30, 1992)、ステロイド使用や HIV 感染など免疫不全に伴っておこるクリプトコックス症は、潜伏感染していた *C. neoformans* の再活性化により発病することが考えられている (Hermoso DG et al. J Clin Microbiol 37, 3204-3209, 1999)。また、現在の高度医療の発達は、同時に日和見真菌感染症の増加をもたらしている。例えば、米国における臓器移植患者に認められた移植後合併感染症ではクリプトコックス症が真菌症では第三位であると報告されている (Chiller TM. The 17th ISHAM, 2009)。この臓器移植後に発病してくるクリプトコックス症についても諸研究結果から、移植前に感染し生体内で潜伏感染していた *C. neoformans* の再活性化が原因であるとの見方が大きい (Saha DC et al. Clin. Vaccine Immunol 14: 1550-1554, 2007)。さらに、この臓器移植後に発病するクリプトコックス症は播種型や中枢神経系クリプトコックス症を伴うことが多く (53-72%) (Singh N, et al. Clin Infect Dis 47: 1321-7, 2008)、予後も死亡率が 50%に達するなど、極めて重要な合併日和見感染症であり、今後わが国でも問題となってくるものと予測される。

一方、このような免疫不全者や臓器移植患者などに合併するクリプトコックス症対策を考える場合、結核症と同様に、*C. neoformans* の潜伏感染を移植前に検出し、適切な抗真菌薬の投与などの方法が考えられるが、その検出法は無い。現在用いられている血清診断法はクリプトコックス症の診断法として感度、特異度の高い検査法であるが (深在性真菌症の診断・治療ガイドライン 2007)、ある程度病勢が進行したものでないと陽性にならない、潜伏感染菌検出には全く効果が無いなどの面をもつため、潜伏感染の検出系の開発はこれらの患者の予後の改善には必要なものと考えられる。加えて、臓器移植患者に限らず、HIV 感染者などにおこる中枢神経系クリプトコックス症の生存率改善のための新たな対策や新規抗真菌薬の開発も重要な課題と考えられる。

以上の背景から、われわれは *C. neoformans* の分泌蛋白ならびに細胞壁表層に存在する蛋白分子を標的にし、ELISA 法を組合わせたクリプトコックス属の潜伏感染検出系の確立と、これら蛋白に対するモノクローナル抗体を用

いた感染症の治療法、とくに予後不良な中枢神経系クリプトコックス症を主な対象とした抗体療法の検討を行うことを目的とした。

2. 研究の目的

C. neoformans の分泌蛋白ならびに細胞壁表層に存在する蛋白分子を網羅的に検索しこれらを標的とする抗体作製を行い、*C. neoformans* 持続 (潜伏) 感染菌の *in vitro* 検出系を開発することを第一の目的とする。さらに、これら細胞壁表層蛋白のリコンビナント蛋白ならびに蛋白抗原を標的としたモノクローナル抗体の系統的な開発を行い、免疫不全者に合併する予後不良な (中枢神経系) クリプトコックス症に対する新たな抗体療法開発の基盤的研究を行うことを第二の目的とした。

3. 研究の方法

1) 真菌の細胞表層蛋白・分泌蛋白の同定

クリプトコックス属に対して、細胞の膜表面蛋白、分泌蛋白を網羅的に解析する方法である SST-REX (signal sequence trap by retrovirus-mediated expression screening) 法を用いて分泌蛋白等の同定を行った。

①クリプトコックス属 RNA 抽出

C. neoformans ATCC90112 株を 100 ml の brain heart infusion (BHI) 液体培地 (pH7.4) で 24 時間培養し、遠心にて集菌後 1 回洗浄を行った。その後等量の BHI 培地に再懸濁し、500 ml のカルチャーボトルへ注入し、嫌気ジャーにカルチャーボトルを蓋を開放したままの状態で収納した後、アネロパック® (三菱ガス化学) を添えジャーを密封した。カルチャーボトルを収納した嫌気ジャーを 37°C で 14 時間ゆっくりと攪拌しながら培養したのち、集菌を行い ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて total RNA を抽出した。

②SST-REX 法

トランスフェクション: 抽出した *C. neoformans* total RNA から cDNA を作成し、MPL^V を含む発現ベクターを用いて cDNA ライブラリーを作成した。リポフェクションを用いてマウス由来 BAF 細胞にトランスフェクションし、自律増殖可能な細胞をスクリーニングした。増殖可能な細胞からトランスフェクションにより導入したベクター配列を確認し、*C. neoformans* 由来遺伝子と推定される遺伝子断片のシーケンスを行った。

③*C. neoformans* SST クローンに対するモノクローナル抗体の作成

得られた SST クローンのうち、発現数が最も多かった SST クローンに対しモノクローナ

ル抗体を作成した。

・免疫方法

動物：マウス (Balb/c, male, 9w あるいは Balb/c, female, 10w) 、免疫原：*Cryptococcus neoformans* 由来クローン遺伝子と MPL 遺伝子との融合遺伝子を導入、発現させた Ba/F3 細胞、細胞免疫原は $1 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$ cells/回にて、隔日で 3 回、あるいは 4 回免疫した。

・細胞融合

採取したリンパ球をミエローマ細胞と PEG 法にて融合した。

得られたハイブリドーマを HAT 培地にて選択し、コロニーを形成させた。

・ハイブリドーマスクリーニング

免疫原に対する反応性をフローサイトメトリにより検証した。免疫原に反応し、かつ陰性コントロール細胞に対して反応しない候補を選抜し、2 次スクリーニングで得られた候補をクローニングした。

2) 分泌蛋白の細胞局在の検討

C. neoformans を 10 ml で液体培養 (BHI, YPD, 30°C, 2 日, 150 rpm) を行い、集菌後、培養上清は 0.45 μ m のフィルターをかけ、菌体は 2 分し液体窒素で凍結し、ミルで破碎、1 ml の lysis buffer (25 mM Tris (pH 7.2), 150 mM NaCl, 0.001 M EDTA, 1 % NP40) に溶かして、4°C, 1h, 回転混和し、最高回転数で遠心後、上清 (細胞質画分)、沈殿にわけた。沈殿は、1 ml の SDS sample buffer (+DTT) に溶かし、RT, 1h, 回転混和し、100°C で 5 分加熱後、最高回転数で遠心後、上清 (細胞壁画分) を回収した。その後、それぞれ 10 μ l をゲルにロードし、SDS-PAGE (5-20 %ゲル) を行い、ウェスタンブロット (WB) を行った。検出のための抗体は上記方法で作成した抗体を用いた。

3) 細胞表面蛋白抗体の細胞増殖に与える影響の検討

1) で作成したモノクローナル抗体の菌増殖への影響を検討した。*C. neoformans* を YPD 液体培地 (pH5.6) 10ml、30°C で 48 時間培養し、集菌、上清を捨てた後 RPMI で洗浄後、再度 RPMI に懸濁した。菌濃度を 5.0×10^5 CFU/ml に調整し、96 ウェルプレートに 100 μ l 接種した。その後菌液 100 μ l あたり、各モノクローナル抗体を約 2 μ g、20 μ g 添加し、72 時間ならびに 168 時間培養し、その時点の吸光度を抗体無添加のウェルの吸光度と比較検討した。

4. 研究成果

1) 真菌の細胞表面蛋白・分泌蛋白の同定

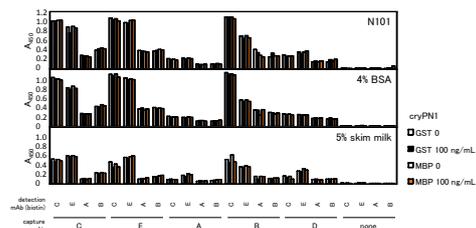
SST 法により、クローン総数 286 個、取得因子 72 個の結果が得られ、これらから計 46 遺伝子が同定された。このうち 41 遺伝子については細胞表面もしくは分泌蛋白であることが推測された (表)。また機能的には糖代謝に関与すると推測される遺伝子が比較的多く、機能不明な遺伝子も 16 遺伝子検出された。この SST 法で情報が得られた遺伝子のうちクローン発現数が多いものを見ると、hypothetical protein が多く認められ、これらの蛋白が *C. neoformans* の低酸素条件下での生存や潜伏感染に関与しているのではないかと考えられた。この SST 法で得られたクローンのうち、発現数が 29 個と最も多かったものクローン (CnSST-1) を検討対象とした。この CnSST-1 は嫌気条件下で菌発育が抑制された状態での発現が多いと推測されたため、本検討での標的遺伝子、標的分子とした。この CnSst-1p に対するモノクローナル抗体作成は ACTGen 社との共同で行った。この方法で最終的に計 6 種類のモノクローナル抗体 (A-F) を得ることができた。一方、得られた抗体について、感度、特異度を検討したところ、抗体 E、抗体 B については感度は高いが特異性が低く、一方抗体 A、抗体 D は特異性は高いが感度がやや低い結果であった。またこれら抗体を組み合わせ、ELISA 検出系の構築を行ったが、いずれの組合せの検討でも非特異的な結合が極めて強く (図 1)、現在その低減に向け検討を継続している。

表 SST-REX法により同定された *Cryptococcus* 遺伝子

(膜もしくは分泌と推定)	
蛋白質分解	1
糖代謝	16
蛋白質モチーフ	6
リポ蛋白質	1
その他	1
Hypothetical protein	16

細胞内オルガネラ膜	3
細胞質	2

図1. サンドイッチ系に達したブロッキング溶液の検討



2) 分泌蛋白の細胞局在の検討

WB法で得られた結果より、反応が認められた分子量から推定すると、このCnSst-1pは糖鎖修飾を受けることが予想された(データベース上では33kDa)。また、好気、嫌気条件(好気条件下で増菌後、18時間嫌気条件下で培養)下の双方において細胞壁、培養上清ともに発現が確認され、嫌気条件下ではより一層の細胞壁への蓄積が見られたが、培養上清ではほとんど差が認められなかった(図2)。さらに上記嫌気培養上清を用い、免疫沈降法を行ったところ、いずれの抗体とも免沈が出来た。以上の結果から、CnSst-1pは細胞壁に主に存在するが、細胞外へも好気条件、嫌気条件に関わらず分泌されることが確認された。

3) 細胞表面蛋白抗体の細胞増殖に与える影響の検討

得られたモノクローナル抗体のクリプトコックス菌体の発育に与える影響を、マイクロプレート発育にてみたところ、6種類すべてで低濃度(2 μ g/well)、高濃度(20 μ g/well)のいずれでも発育に与える影響は認められず、CnSST-1は菌増殖への関与が低いことが推測された。

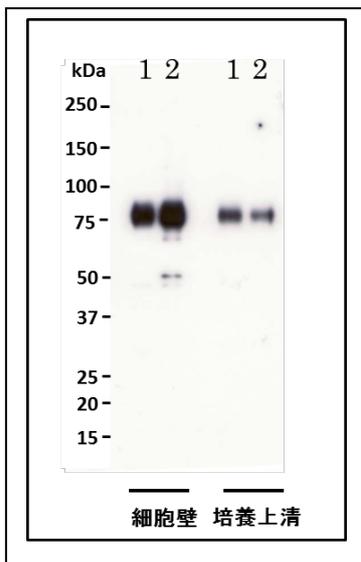


図2

1 : 好気条件
2 : 嫌気条件

4) まとめと今後の展望

本検討ではSST法によって検出された遺伝子のうち、発現クローン数が最も多かった遺伝子を対象にその蛋白に対するモノクローナル抗体を作成し、ELISA検出系の作成ならびに菌増殖に対する効果を検討した。本検討で得られたCnSst-1pに対するモノクローナル抗体について、感度、特異度を検討したとこ

ろ、抗体E、抗体Bについては感度は高いが特異性が低く、一方抗体A、抗体Dは特異性は高いが感度がやや低い結果であった。これらを組み合わせてサンドイッチELISAの構築を行ったが、バックグラウンド抑制が今後の大きな課題となった。またこのCnSst-1pは嫌気時に細胞壁への集積ならびに細胞外への分泌が推定されたことから、嫌気条件下に存在すると考えられる潜伏感染や肉芽腫形成時の菌検出標的としては有用ではないかと考える。さらに、本検討でCnSst-1pの菌増殖への関与を検討したが、結果をみると関連は否定的であった。しかし、同様な方法で検出した他の真菌においては、細胞表面蛋白抗体による菌増殖抑制効果が認められていることより、今後同様な蛋白を同定することでクリプトコックス属への応用が十分期待されるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計11件)

1) Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, Miyazaki Y. Determination of epidemiology of clinically isolated *Cryptococcus neoformans* strains in Japan by multilocus sequence typing. Jpn J Infect Dis 66: 51-55, 2013.

2) Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrungrroj P, Umeyama T, Takazono T, Tashiro M, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Ohno H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. Med Mycol 51 (3): 252-260, 2013.

3) Sugiura K, Sugiura N, Yagi T, Iguchi M, Ohno H, Miyazaki Y, Akiyama M. Cryptococcal cellulitis in patient with bullous pemphigoid. Acta Derm Venereol 93 (3): 187-188, 2013.

4) Kobayashi T, Kakeya H, Miyazaki T, Izumikawa K, Yanagihara K, Ohno H, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S. Synergistic antifungal effect of lactoferrin with azole antifungals against *Candida albicans* and a proposal for a new treatment method for invasive candidiasis. Jpn J Infect Dis 64: 292-296, 2011.

- 5) Tomita H, Muroi E, Takenaka M, Nishimoto K, Kakeya H, Ohno H, Miyazaki Y, Utani A. *Rhizomucor variabilis* infection in human cutaneous mucormycosis. Clin Exp Dermatol 36 (3): 312-314, 2011.
- 6) Nagi M, Nakayama H, Tanabe K, Bard M, Aoyama T, Okano M, Higashi S, Ueno K, Chibana H, Niimi M, Yamagoe S, Umeyama T, Kajiwara S, Ohno H, Miyazaki Y. Transcription factors CgUPC2A and CgUPC2B regulate ergosterol biosynthetic genes in *Candida glabrata*. Genes Cells 16: 80-89, 2011.
- 7) Kaneko Y, Ohno H, Kohno S, Miyazaki Y. Micafungin alters the expression of genes related to cell wall integrity in *Candida albicans* biofilms. Jpn J Infect Dis 63: 355-357, 2010.
- 8) 大野秀明. 中枢神経系真菌感染症における最近の動向. 最新医学 66: 997-1004, 2011.
- 9) 大野秀明. 多剤耐性結核感染症. 呼吸器内科 20 (6): 507-513, 2011.
- 10) 大野秀明. 髄膜炎、脳炎. 新版 感染症診療実践ガイド 有効な抗菌薬の使い方のすべて (Medical Practice 臨時増刊号). 文光堂、352-358、東京、2011.
- 11) 宮崎義継、大野秀明. 真菌症に関する診断法の現状と展望. 最新医学 67 (11): 2566-2571, 2012.

〔学会発表〕(計 11 件)

- 1) 大野秀明. 真菌感染症制御のポイント. 第 28 回日本環境感染学会総会、横浜、2013.
- 2) 大野秀明、宮崎義継. 真菌感染症について. 平成 24 年度希少感染症診断技術研修会、東京、2013.
- 3) 大野秀明、大川原明子、泉川公一、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、金城雄樹、掛屋 弘、岸 一馬、藤井 毅、竹村 弘、渡邊 浩、河野 茂、宮崎義継. 日本国内で分離された *Cryptococcus* 属臨床分離株の遺伝学的血清型解析と抗真菌薬感受性. 真菌症フォーラム第 14 回学術集会、東京、2013.
- 4) 木村雅友、大野秀明、梅山 隆、宮崎義継. アスペルギルスとクリプトコックスによる肺混合感染の 2 手術例. 第 56 回日本医真菌学会学術集会、東京、2012.
- 5) 大野秀明、田辺公一、杉田 隆、畠山修司、大久保陽一郎、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、金城雄樹、渋谷和俊、亀井克彦、宮崎義継. 北米流行型 *Cryptococcus gattii* 株の病原性、病原因子の解析-国内臨床分離株を中心に-

- 第 86 回日本感染症学会総会、長崎、2012.
- 6) 大野秀明、宮崎義継. シンポジウム「深在性真菌症、病像の背景を探る」ミニレクチャー「注意したいクリプトコックス症」. 真菌症フォーラム第 13 回学術集会、東京、2012.
- 7) 大野秀明. 高病原性クリプトコックス症の現状とその病態 ワークショップ 3、深在性真菌症の新たな展開-重症例、難治症例の病態と治療-. 第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、山形、2011.
- 8) 大野秀明、宮崎義継. 真菌症診断の現状と課題. 第 128 回 ICD 講習会、東京、2011.
- 9) 大野秀明、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、杉田 隆、畠山修司、亀井克彦、渋谷和俊、宮崎義継. 本邦初の北米流行型 *Cryptococcus gattii* 臨床分離株の実験的病原性解析. 第 55 回日本医真菌学会学術集会、東京、2011.
- 10) 梅山 隆、大野秀明、棚町千代子、橋本好司、佐川公矯、田辺公一、山越 智、宮崎義継. 福岡県筑後地区周辺におけるクリプトコックス症多発発生例の疫学的検討. 第 22 回日本臨床微生物学会総会、岡山、2011.
- 11) 大野秀明. ガイドラインをふまえた中枢神経系真菌感染症の治療法. 第 17 回新潟神経疾患研究会、新潟、2010.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 秀明 (OHNO HIDEAKI)

国立感染症研究所・生物活性物質部・室長
研究者番号：20325640

(2) 研究分担者

山越 智 (YAMAGOE SATOSHI)

国立感染症研究所・生物活性物質部・主任
研究官
研究者番号：00212283

(3) 連携研究者

()

研究者番号：