

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659477

研究課題名(和文)新興クリプトコックス・ガッティ感染症における高病原性機序の解析

研究課題名(英文) Mechanism of emerging infection with highly pathogenic *Cryptococcus gattii*

研究代表者

石井 恵子 (ISHII, Keiko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00291253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は高病原性のクリプトコックス・ガッティに対する防御免疫機能を明らかにすることを目的として行った。研究期間内に、厚い莢膜を持つ高病原性株は樹状細胞による認識を回避することを示した。また、ニワトリ由来のovalbumin(OVA)遺伝子を、バイオリスティック法を用いることで種々のクリプトコックス株に導入することに成功した。OVA発現クリプトコックス株とOVAを認識するT細胞受容体を発現するトランスジェニックマウスを用いることで、クリプトコックスに対する防御免疫の詳細を解析する新規の系が構築された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the protective immune responses to a highly pathogenic *Cryptococcus gattii*. During the study period, we found that highly pathogenic strains with thick capsule escaped from the recognition by dendritic cells. We also successfully transformed several kinds of cryptococcal strains with *Gallus ovalbumin* (OVA) gene by using the biolistic method. With the transformed cryptococcal strains and transgenic (Tg) mice expressing OVA-specific T cell receptors, we built a novel assay system for studies on protective immune response to *C. gattii*.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症防御学

キーワード：クリプトコックス・ガッティ 高病原性 オバルブミン T細胞サブセット 免疫応答性

1. 研究開始当初の背景

1999年にカナダのバンクーバー島で *Cryptococcus gattii* によるクリプトコックス症のアウトブレイクが発生し、その後アメリカ合衆国の北西沿岸地域を中心に拡大した (MMWR Vol. 59, No. 28, 2010)。2007年にはわが国でも国内感染と考えられる *C. gattii* によるクリプトコックス症例が報告された (Emerg. Infect. Dis. 2010)。このクリプトコックス症は通常の *C. neoformans* によるクリプトコックス症と異なり、健康者でも中枢神経感染症を発症し、致死率が高いことから、高病原性の新興感染症として、今後問題となることが懸念される

C. neoformans はマクロファージによる貪食・殺菌に抵抗し、マクロファージ内外で増殖することができるため、生体がこれを排除するには、マクロファージをインターフェロン (IFN- γ) によって活性化し、の殺菌能を高める必要がある。IFN- γ は自然免疫でNKT細胞や T細胞などから産生されるが、真菌の完全排除には不十分であるため、獲得免疫において1型ヘルパーT (Th1) 細胞が誘導され、IFN- γ が大量に産生される必要がある。クリプトコックス抗原を認識するTh1細胞は極めて少ない ($1/10^6$) ので、これまでTh細胞分化誘導の解析は困難であった。

2. 研究の目的

C. gattii 感染症は従来の *C. neoformans* による感染症とは全く異なった臨床的特徴を示しており、何らかの宿主免疫応答性の違いが関連している可能性が考えられる。本研究では、マウス感染モデルを用いて、*C. gattii* と *C. neoformans* に対する免疫応答性を比較することで、本感染症の病態解明の手掛かりを探ることを目的とした。中でも、獲得免疫における Th 細胞の分化誘導について明らかにすることに重点を置いた。そのため、真菌株による抗原性の違いを克服する目的で、ニワトリの ovalbumin を発現する真菌を作製し、ovalbumin (OVA) を特異的に認識する T細胞が高い割合で存在するトランスジェニック (Tg) マウスに感染させ、解析する系の構築を試みた。

3. 研究の方法

(1) 真菌株 (*C. gattii* と *C. neoformans* の臨床分離株、標準株および莢膜欠損株) のうち保有していないものを千葉大学真菌医学研究センターより入手した。OVA 特異的 T細胞受容体発現 Tg マウス (OT-II) は東北大学医学系研究科免疫学分野より分与を受けた。

(2) 墨汁染色によって莢膜の厚さを比較した。

(3) 野生型マウス骨髄細胞を GM-CSF 存在下で8日間培養し、骨髄由来樹状細胞 (BM-DC) を作製し、*C. gattii* と *C. neoformans* を認

識して産生される Th1 型サイトカイン (TNF- α および IL-12p40) を測定した。

(4) C型レクチン受容体の Dectin-2 欠損マウスおよびC型レクチン受容体のシグナル伝達アダプタータンパクである CARD9 欠損マウスより BM-DC を作製し、莢膜保有株と非保有株における TNF- α 産生を比較した。

(5) Dr. Wormley (Texas 大) から分与された、クリプトコックス PLB1 プロモーターを持つ発現ベクターを用いた。このベクターについてシーケンシングを行い、遺伝子配列から制限酵素切断部位を特定した。購入した OVA プラスミド (Addgene) から PCR 法で ORF を増幅し、ベクターに組み込んで OVA 発現プラスミドを作製した。

(6) PLB1-OVA プラスミドからベクター部分を除いたのち、クリプトコックス各株に Biolistic 法で導入し、発現を mRNA レベルで確認した。

4. 研究成果

(1) 高病原性株の免疫回避性：野生型マウス由来の BM-DC は *C. neoformans* の低病原性株 B3501 を認識して菌量依存的に TNF- α を産生したが、*C. gattii* の高病原性株 R265 および *C. neoformans* の高病原性株 H99 に対して、TNF- α をほとんど産生しなかった (図1)。加熱死菌を用いた検討でも同様の結果であり、高病原性株は樹状細胞による認識を逃れていることが示唆された。

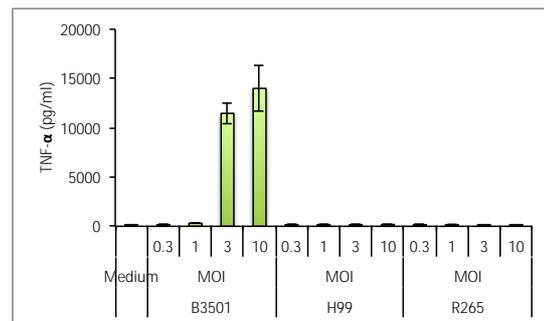


図1. 生菌刺激による野生型マウス由来 BM-DC の TNF- α 産生

(2) 莢膜による免疫回避性：クリプトコックスの莢膜は、貪食細胞による認識と貪食を回避するのに関わる重要な病原因子である。墨汁染色による解析で、高病原性株の莢膜が厚いことが示された (図2)。野生型マウスの BM-DC は莢膜保有株の刺激に対して応答しなかったが、莢膜欠損真菌に対しては応答して菌数依存的に IL-12p40 を産生した。一方、莢膜を認識すると予測されている C型レクチン受容体 Dectin-2 あるいはその受容体からのシグナル伝達に関わる CARD9 を欠損したマウスの BM-DC は莢膜欠損株でも刺激に対して応答しなかった (図3)。高病原性株は厚い

莢膜を有することで、マクロファージによる貪食・殺菌を回避することが知られるが、樹状細胞による認識も回避していることが明らかになった。このことから、樹状細胞によるナイーブT細胞への抗原提示も影響を受けることが推測される。

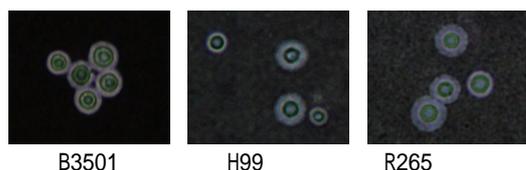


図2. 墨汁染色による莢膜の比較

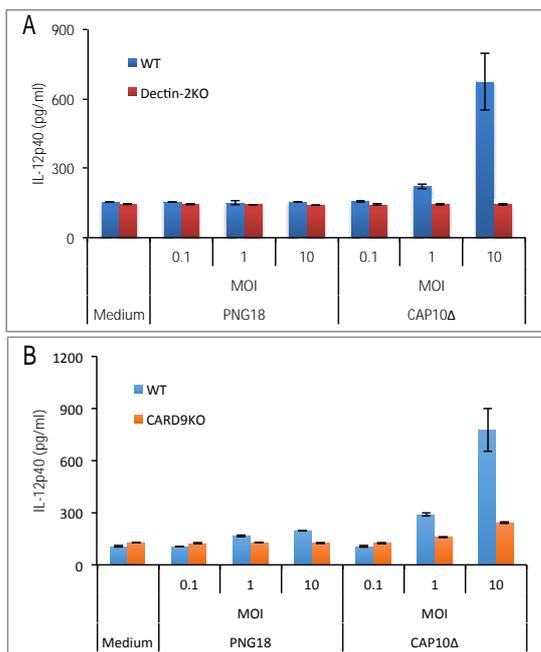


図3. 莢膜保有株(PNG18)と莢膜欠損株(CAP10)の刺激によるDectin-2(A)およびCARD9(B)欠損マウス由来BM-DCのIL-12p40産生

(3) PLB1-OVA プラスミドの作製とクリプトコックスへの形質転換: PLB1-OVA プラスミドの作製に際しては、薬剤耐性遺伝子として、真菌の選択に有用な nourseothricin を使用した。形質転換方法として、当初エレクトロポレーション法を用いたが、全くトランスフォーマントを得ることができなかつたため、Biolistic 装置を持つ千葉大学真菌医学研究センターに形質転換を依頼し、全ての真菌株についてOVA発現真菌を得ることができた。

(4) 本研究の意義: 本研究ではOVA特異的T細胞受容体発現Tgマウス(OT-II)の入手が遅かつたために、OVA発現真菌を感染させ、病原性の違いとTh細胞の分化誘導の違いの関係を検討するに至らなかつた。しかし、PLB1-OVA プラスミドを作製し、クリプトコックスに形質転換する方法を確立したため、今後多様な病原性を持つクリプトコックスについて、獲得免疫の成立の機序を解析することができるようになった。今回構築した in

vivoのT細胞解析系は、最近注目を集めているクリプトコックス潜伏感染の内因性再燃の解析にも利用することができることから、今後のクリプトコックスに対する生体防御研究に有用なツールとなりうる。

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7件)

石井恵子、川上和義: クリプトコックス感染における防御免疫機構のup to date, 医真菌雑誌(日本医真菌学会), 査読あり, 2014(印刷中)

石井恵子、川上和義: 肺クリプトコックス症におけるTh1、Th2、Th17免疫応答と1型インターフェロンによる制御, 呼吸器内科, 査読なし, 2014(印刷中)

Yamamoto H, Nakamura Y, Sato K, Takahashi Y, Nomura T, Miyasaka T, Ishii K, Hara H, Yamamoto N, Kanno E, Iwakura Y, Kawakami K: Defect of CARD9 leads to impaired accumulation of IFN- γ -producing memory-phenotype T cells in lungs and increased susceptibility to pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*, *Infect. Immun.* 2014; 82: 1606-15. doi:10.1128. 査読あり.

Tanno D, Akahori Y, Toyama M, Sato K, Kudo D, Abe Y, Miyasaka T, Yamamoto H, Ishii K, Kanno E, Maruyama R, Kushimoto S, Iwakura Y, Kawakami K: Involvement of Gr-1dull+ cells in the production of TNF- α and IL-17 and exacerbated systemic inflammatory response caused by lipopolysaccharide. *Inflammation* 2014; 37: 186-195.

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10753-013-9729-5> 査読あり.

石井恵子、川上和義: 真菌感染における自然免疫活性化の分子機構, 化学と生物(日本農芸化学会), 査読あり, 2014; 52: 83-90.

Miyasaka T, Akahori Y, Toyama M, Miyamura N, Ishii K, Saijo S, Iwakura Y, Kinjo Y, Miyazaki Y, Oishi K, Kawakami K: Dectin-2-dependent NKT cell activation and serotype-specific antibody production in mice immunized with pneumococcal polysaccharide vaccine. PLoS One 2013; 8:e78611. doi: 10.1371. 査読あり.

石井恵子、川上和義：真菌に対する免疫学の防御機構，臨床免疫・アレルギー科，査読なし，2013；60：411-418.

〔学会発表〕(計 6 件)

Yamamoto H, Nakamura Y, Sato K, Matsumura K, Ishii K, Hara H, Kawakami K: CARD9-mediated IFN- γ production and host defense to cryptococcal infection: involvement of memory-phenotype T cells. 日本免疫学会 (Workshop), 2013 年 12 月 11 日～13 日, 千葉

Sato K, Yamamoto H, Ishii K, Kawakami K: Defect of type I interferon receptor leads to improved infection with *Cryptococcus neoformans* in parallel to increased production in IFN- γ and MUC5AC in lungs. 日本免疫学会 (Workshop), 2013 年 12 月 11 日～13 日, 千葉

Matsumura K, Ishii K, Miyamura N, Nakamura Y, Tamura T, Kawakami K: Generation of transgenic mice expressing TCR $\alpha\beta$ specific for mannoprotein from *Cryptococcus neoformans*. 日本免疫学会, 2013 年 12 月 11 日～13 日, 千葉

石井恵子、川上和義：クリプトコックス感染防御とサイトカインによる制御，日本医真菌学会 (招待講演)，2013 年 9 月 27 日～29 日，東京

佐藤光、松村香菜、石井恵子、川上和義：Cryptococcus neoformans 感染免疫応答における I 型インターフェロン受容体欠損の影響，日本医真菌学会，2013 年 9 月 27 日～29 日，東京

松村香菜、佐藤光、石井恵子、安達禎之、大野尚仁、川上和義：免疫細胞の *Cryptococcus neoformans* 認識における C-type lectin receptors の役割：Mincle を中心とした検討，日本医真菌学会，2013 年 9 月 27 日～29 日，東京

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.infect-immun.med.tohoku.ac.jp/?FrontPage>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

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