

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461526

研究課題名(和文) 高病原性クリプトコックス症の感染病態、病原因子の解明と治療法に関する研究

研究課題名(英文) Evaluation of pathology, virulence factor of, and effective chemotherapy against cryptococcosis caused by highly virulent *Cryptococcus gattii*.

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：C. neoformans株と高病原性C. gattii株では、感染に対するマウスモデルでの反応が異なっており、C. neoformans株は肺で炎症反応を惹起するのに対し、C. gattii株はほとんど炎症反応を惹起しないことが伺われた。また、C. gattii株における病原性は、従来から報告されている病原因子には依存しないのではないかと推測された。さらに、貪食能の結果より、C. gattii株においては細胞に貪食されにくい、すなわち生体に認識されにくい事が病原性を反映しているのではないかと考えられた。一方、IFN-gによる治療効果はC. neoformans株に対しては認められた。

研究成果の概要(英文)：Histopathology of mouse lung infected by *Cryptococcus gattii* showed low inflammatory response, whereas that of mouse lung infected by *Cryptococcus neoformans* indicated Th1 type inflammatory response. Additionally, several virulence factors of *C. neoformans*, such as capsule size or melanin production, were determined on *C. gattii* strains in order to evaluate the relationship between virulence for mice and those virulence factor. Consequently, it seemed no relation between virulence for mice and virulence factors. On the other hand, therapeutic effect of interferon gamma (IFN-g) on cryptococcus infection mouse model was determined. Fungal burden in the lung of *C. neoformans* infected mouse had reduced in IFN-g therapy group comparing to control group in this study.

研究分野：感染症内科学

キーワード：クリプトコックス症 高病原性 感染病態 病原因子

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%は健常者であり、40%弱では何らかの基礎疾患を有していたことが明らかとなった。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、新聞報道 (2010年4月26日朝日新聞)にもあるように致死率は 20%に達するとも云われている (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 *C. gattii* の浸淫地とされる熱帯～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 VGIIc 型は現在まで米国内でしか分離されていない。また、VGIIa, VGIIc 型はマウスの実験から *C. 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)、便宜上我々はこの 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症とし注意を喚起した (感染研ホームページ)。

一方、わが国でもその変異型 *C. gattii* 株の侵入・感染被害が危惧される場所であるが、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変異型 *C. gattii* 株 (VGIIa: JP01 株) 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)。この日本人患者の発生を受けて、我々は日本各地で分離された *Cryptococcus* 属についての血清型調査や監視を継続して行っているところであるが、同時に 1) 本 JP01 株はどのようにして日本に侵入したのか? (もしくは日本定住株なのか?)、2) 感染源は何か?、3) その病原性は北米株と同等なのか?、4) 高病原性クリプトコックス症の化学療法は *C. neoformans* 感染症と同様で良いのか? などの感染疫学上の疑問に答えるため、株を分離した東京大学感染症内科、明治薬科大学や真菌感染症病理に詳しい東邦大学病院病理学講座等とともに検討に着手した。その結果、以下の知見を得た。

1) 上記日本人 *C. gattii* 感染症例から VGIIa 型株 (JP01 株) に加え、新たに VGIIc 型株 (JP02 株) が分離された。

2) JP01 株、JP02 株は日本国内で独自に発生した可能性がある。

3) JP01 株 (VGIIa 型) は弱毒株、JP02 株 (VGIIc 型) は強毒株であった。

4) 変異型クリプトコックス株は特異な病態を示す可能性がある。

2. 研究の目的

新興感染症である高病原性クリプトコックス症と原因真菌である *C. gattii* についての研究を行う。日本人クリプトコックス症例から分離・発見された高病原性 (変異型) *C. gattii* 株、ならびに北米での感染流行型の原因真菌である高病原性 (変異型) *C. gattii* 株を用いて、1) これら *Cryptococcus* 属感染による高病原性クリプトコックス症の感染病態についてマウスモデルを用いて解明する、2) 高病原性の原因となる菌学的因子の解析、3) 高病原性クリプトコックス症のマウス感染モデルを用いて IFN-g などの炎症性サイトカインの治療効果、などを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 高病原性クリプトコックス症の病理組織学的、免疫学的感染病態評価。

マウス感染モデルにおける肺、脳などの臓器の病理組織学的検討を詳細に行い病態解析を行う。また、感染肺における炎症性サイトカイン (IFN-g, TNF- α , IL-12 など) 等の発現について検討した。

・使用菌株: *C. gattii* 株; JP01 株 (VGIIa)、JP02 株 (VGIIc)、R265 株 (VGIIa: 北米流行株)、*C. neoformans* H99 株 (ATCC208821: 標準株)、5815 株 (VGI)。
・使用マウス: C57BL/6J マウス、メス、9~10 週齢。

・検討サイトカイン: INF- γ 、TNF- α 、IL-12 (p40) など

それぞれのクリプトコックス株を液体培地で前培養し、 $3.0\text{-}5.0\times 10^3\text{CFU/mouse}$ を麻酔したマウスに経気管的に投与した。感染後 14 日目に肺の病理組織像や炎症性サイトカインの発現を検討した。

2) 変異型クリプトコックス株の病原因子解析。

・クリプトコックス属の病原因子として考えられている因子 (Nature Rev. Microbiol 9: 193-203, 2011) のなかで、主に major virulence factor (莢膜厚、37°C 発育能、メラニン産生能、菌体外酵素産生能、ウレアーゼ産生能等) について変異型株間、菌種間比較などを行う。その他、30°C、37°C における倍加時間や minor factor の一部についても検討を行った。

・対象株: 上記 1) と同じ株を対象とする。

- ・ 莢膜厚検討：人工培地上で発育した菌の莢膜厚について顕微鏡下観察にて検討を行う。
- ・ メラニン産生能：Ngamskulrungrroj らの方法 (Australasian Mycologist 28: 9-14, 2009) に従い、30°C、37°Cにおけるメラニン産生能について評価を行った。
- ・ 菌体外酵素産生能：protease (Clin Vaccine Immunol 3 570-4, 1996)、phospholipase (Infect Immun 65, 405-11, 1997)等の産生能について評価を行った。
- ・ R265 株と H99 株を用いて、マウス J774 細胞における貪食能を検討した。クリプトコックス株はそれぞれ通常の莢膜を形成したもの、菲薄化した莢膜を持つ株を使用し、IFN-g の存在の有無による貪食能の相違についても検討した。

3) 高病原性クリプトコックス症に対する炎症性サイトカインの治療効果

- ・ 1) で作成したクリプトコックス株感染マウスモデルに対し、IFN-g などのサイトカインを投与し、肺内菌数などの変化を観察した。(本研究で行った動物実験は国立感染症研究所動物実験員会の承認を得て実施した。)

4. 研究成果

1) 高病原性クリプトコックス症の病理組織学的、免疫学的感染病態評価。

クリプトコックス属感染 14 日後に肺の病理組織学的所見、肺でのサイトカインの発現等を検討した。肺の病理では H99 株では炎症細胞浸潤や肉芽腫形成が良好に行われていたが、JP02 株や R265 株の高病原性の *C. gattii* 株では肉眼的に肺容積の増大を認め、炎症細胞の集積、肉芽腫形成が極めて乏しい所見であった (図 1)。さらに、単位面積あたりの多核巨細胞数では H99 株接種群において最も多くの多核巨細胞が確認でき、R265 ならびに JP02 株接種群では多核巨細胞が出現しない結果であった。また、多核巨細胞ごとに含まれる核数では H99 株接種群で最も多く、R265 ならびに JP02 株接種群が最小という結果が得られ、クリプトコックス属の病原性は肺での炎症反応の惹起性と反比例するといった結果が認められた。一方、肺での IFN-g 以外のサイトカイン発現では、TNF-a、IL-12 等の発現においても同様に H99 よりも *C. gattii* 株で少ない傾向が認められた (図 2)。

これらの結果から、同じクリプトコックス属でも *C. neoformans* 株と *C. gattii* 株では、感染に対する生体の反応が異なっており、*C. neoformans* 株は Th1 型の炎症反応を惹起するのに対し、*C. gattii* 株はほとんど炎症反応を惹起しないことが伺われた。この原因についてはまだ解明できていないが、生体での認識に違いがあるのではないかと推測している。

図 1

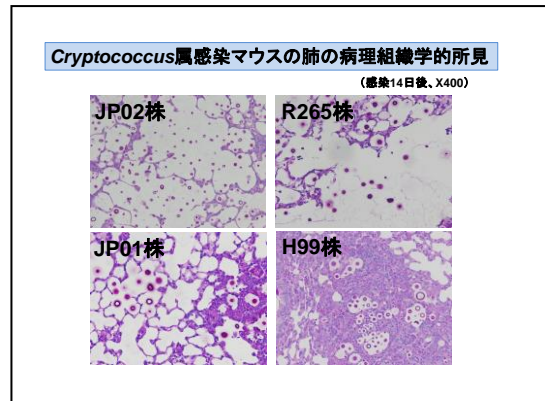
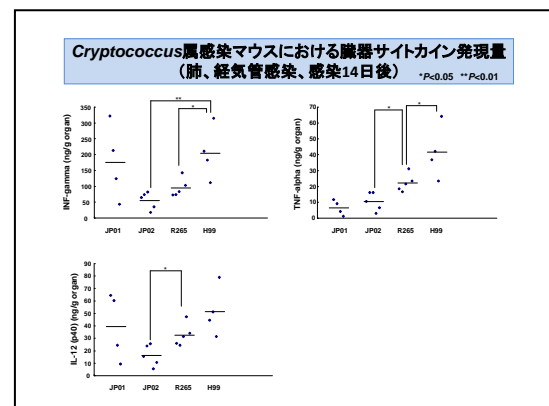


図 2



2) 変異型クリプトコックス株の病原因子解析。

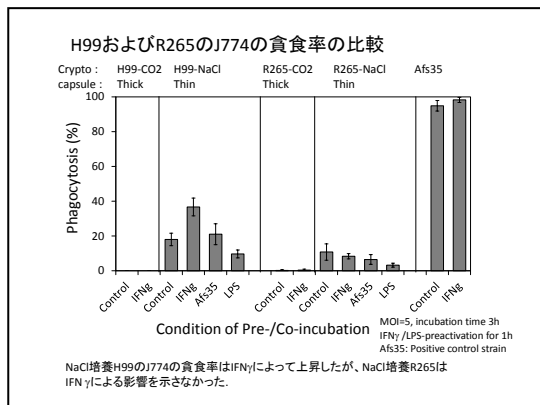
供試したクリプトコックス株について、まず莢膜厚、37°Cでの発育能、メラニン産生能について検討した。莢膜の厚さについては 5815 株が最も厚く、H99 株が最も薄かった。また、37°Cでの倍加時間では 5815 株が最も遅かった (約 6 時間) が他は 3-4 時間であった。メラニン産生はいずれの株でも認められた。次に、菌体外酵素の産生やウレアーゼ活性、倍加時間について検討した。ホスホリパーゼ活性、プロテアーゼ活性はいずれの菌株でも発現はなく、ウレアーゼ活性はすべての菌株で陽性であり、マウスに対する病原性と相関は認めなかった。一方、37°Cでの倍加時間では 5815 株が最も遅かった (約 6 時間) が他は 3-4 時間であり、これも病原性とは相関が低いと考えられた。

さらに、J774 細胞のクリプトコックス株を標的とした貪食能の検討において、通常の莢膜を形成した株に対しては H99 株、R265 株とも極めて貪食能が悪く、莢膜を菲薄化した H99 株にのみ若干の貪食能が認められた。また、細胞に IFN-g を添加すると、莢膜を菲薄化した H99 株に対しては貪食能の上昇が認められたが、R265 株においては、通常の莢膜株、菲薄化莢膜株ともに全く変化は認められなかった (図 3)。

以上の結果から、*C. gattii* 株における病原性は、従来から報告されている病原因子には

依存しないのではないかと推測された。また、食食能の結果より、*C. gattii* 株においては細胞に食食されにくい、すなわち生体に認識されにくい事が病原性を反映しているのではないかと考えられた。

図 3



3) 高病原性クリプトコックス症に対する炎症性サイトカインの治療効果

H99 株を感染させたマウスに対し、IFN-g 5,000U/回を 14 日間で 9 回接種したマウスにおいて、肺内での菌数の減少を認めたが。一方、R265 感染マウスにおいては結論は出ていないが、恐らく菌数を減少させる効果はないのではないかと推測された。

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 14 件)

- 1) Urai M, Kaneko Y, Ueno K, Okubo Y, Aizawa T, Fukazawa H, Sugita T, Ohno H, Shibuya K, Kinjo Y, Miyazaki Y. Evasion of innate immune responses by the highly virulent *Cryptococcus gattii* by altering capsule glucuronoxylomannan structure. *Frontiers in Microbiology* January 2016 vol 5, 査読有, article 101, 2016.
- 2) Kodana M, Tarumoto N, Kawamura T, Saito T, Ohno H, Maesaki S, Ikebuchi K. Utility of the MALDI-TOF MS method to identify nontuberculous mycobacteria. *J Infect Chemother*, 査読有, 22: 32-35, 2016.
- 3) Ikeda-Dantsuji Y, Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Ueno K, Nagi M, Yamagoe S, Kinjo Y, Miyazaki Y. Interferon- γ promotes phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* but not *Cryptococcus gattii* by murine macrophages. *J Infect Chemother*, 査読有, 21: 831-836, 2015.
- 4) Hisao Yoshida, Masafumi Seki, Takashi Umeyama, Makoto Urai, Yuuki Kinjo, Isao Nishi, Masahiro Toyokawa, Yukihiko Kaneko, Hideaki Ohno, Yoshitsugu

Miyazaki, Kazunori Tomono. Invasive pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus lentulus*: Successful treatment of a liver transplant patient. *J Infect Chemother*, 査読有, 21: 479-481, 2015.

5) Asano M, Mizutani M, Nagahara Y, Inagaki K, Kariya T, Masamoto D, Urai M, Kaneko Y, Ohno H, Miyazaki Y, Mizuno M, Ito Y. Successful treatment of *Cryptococcus laurentii* peritonitis in a patient on peritoneal dialysis. *Internal Medicine*, 査読有, 54 (8): 941-944, 2015.

6) Ueno K, Kinjo Y, Okubo Y, Aki K, Urai M, Kaneko Y, Shimizu K, Wange DN, Okawara A, Nara T, Ohkuchi K, Mizuguchi Y, Kawamoto S, Kamei K, Ohno H, Niki Y, Shibuya K, Miyazaki Y. Dendritic cell-based immunization ameliorates pulmonary infection with highly virulent *Cryptococcus gattii*. *Infect Immun*, 査読有, 83: 1577-1586, 2015.

7) Kimura M, Maenishi O, Enoki E, Chikugo T, Umeyama T, Ohno H, Miyazaki Y. Aspergillus fungal ball in central cavity of a pulmonary cryptococcal nodal lesion. *Pathology International*, 査読有, 65: 329-331, 2015.

8) Takemura T, Ohno H, Miura I, Takagi T, Ohyanagi T, Kunishima H, Okawara A, Miyazaki Y, Nakashima H. The first reported case of central venous-related fungemia caused by *Cryptococcus liquefaciens*. *J Infect Chemother*, 査読有, 21: 392-394, 2015.

9) Urai M, Kaneko Y, Niki M, Inoue M, Tanabe K, Umeyama T, Fukazawa H, Ohno H, Miyazaki Y. Potent drugs that attenuate anti-*Candida albicans* activity of fluconazole and their possible mechanisms of action. *J Infect Chemother*, 査読有, 20: 612-615, 2014.

10) Seki M, Ohno H, Gotoh K, Motooka D, Nakamura S, Iida T, Miyazaki Y, Tomono K. Allergic bronchopulmonary mycosis due to co-infection with *Aspergillus fumigatus* and *Schizophyllum commune*. *IDCases*, 査読有, 1: 5-8, 2014.

11) Norkaew T, Ohno H, Sriburee P, Tanabe K, Tharavichitkul P, Takarn P, Puengchan T, Burmrungsri S, Miyazaki Y. Detection of environmental sources of *Histoplasma capsulatum* in Chiang Mai, Thailand by nested PCR. *Mycopathologia*, 査読有, 176 (5): 395-402, 2013. DOI: 10.1007/s11046-013-9701-9.

12) Okubo Y, Tochigi N, Wakayama M, Shinozaki M, Nakayama H, Ishiwatari T, Shimodaira K, Nemoto T, Ohno H, Kaneko Y, Makimura K, Uchida K, Miyazaki Y,

Yamaguchi H and Shibuya K. How histopathology can contribute to an understanding of defense mechanisms against Cryptococci. Mediators of Inflammation, 査読有, volume 2013, article ID 465319, 2013. doi:10.1155/2013/465319.

13) Okubo Y, Wakayama M, Ohno H, Yamamoto S, Tochigi N, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Umeyama T, Shinozaki M, Nemoto T, Nakayama H, Sasai D, Ishiwatari T, Shimodaira K, Yamamoto Y, Kamei K, Miyazaki Y, Shibuya K. Histopathological study of murine pulmonary cryptococcosis induced by *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. Jpn J Infect Dis, 査読有, 66: 216-221, 2013.

14) Kaneko Y, Miyagawa S, Takeda O, Hakariya M, Matsumoto S, Ohno H, Miyazaki Y. Real-time microscopic observation of *Candida* biofilm development and effects due to micafungin and fluconazole. Antimicrob Agents Chemother, 査読有, 57: 2226-2230, 2013.

〔学会発表〕(計 13 件)

1) 上野圭吾、金城雄樹、浦井 誠、大久保陽一郎、清水公德、金子幸弘、亀井克彦、大野秀明、二木芳人、渋谷和俊、宮崎義継。樹状細胞ワクチンを用いた高病原性 *Cryptococcus gattii* に対する感染防御機構の解析。第 59 回日本医真菌学会総会・学術集会、2015. 10. 9-10、ホテルさっぽろ芸文館(北海道・札幌市)。

2) 上野圭吾、金城雄樹、金子幸弘、大野秀明、亀井克彦、二木芳人、宮崎義継。*Cryptococcus gattii* の感染を制御する樹状細胞療法はサイトカイン産生 CD4+T 細胞を誘導する。第 63 回日本化学療法学会総会、2015. 6.4-5、京王プラザホテル(東京都・新宿区)。

3) 大野秀明。シンポジウム 4「深在性真菌症の病態と治療」1 クリプトコックス症。第 63 回日本化学療法学会総会、2015. 6.4-5、京王プラザホテル(東京都・新宿区)。

4) 浦井 誠、金子幸弘、上野圭吾、田辺公一、梅山 隆、山越 智、金城雄樹、大野秀明、杉田 隆、宮崎義継。高病原性 *Cryptococcus gattii* の荚膜多糖成分が免疫細胞に及ぼす影響。第 58 回日本医真菌学会総会・学術集会、2014. 11.1-2、ワークピア横浜(神奈川県・横浜市)。

5) 壇辻百合香、大野秀明、梅山 隆、上野圭吾、大久保陽一郎、田辺公一、名木 稔、山越 智、金城雄樹、杉田 隆、渋谷和俊、宮崎義継。マクロファージの貪食を指標と

した *Cryptococcus gattii* 感染病態の評価。第 58 回日本医真菌学会総会・学術集会、2014. 11.1-2、ワークピア横浜(神奈川県・横浜市)。

6) 上野圭吾、金城雄樹、大久保陽一郎、清水公德、金子幸弘、浦井 誠、川本 進、亀井克彦、大野秀明、渋谷和俊、宮崎義継。高病原性 *Cryptococcus gattii* の感染防御に寄与する樹状細胞ワクチンの作用。第 58 回日本医真菌学会総会・学術集会、2014. 11.1-2、ワークピア横浜(神奈川県・横浜市)。

7) 大久保陽一郎、大野秀明、安藝恭子、篠崎 稔、石渡誉郎、栃木直文、若山 恵、根本哲生、下平佳代子、中山晴雄、田辺公一、山越 智、金子幸弘、宮崎義継、亀井克彦、渋谷和俊。*Cryptococcus gattii* 株における病原性発現機構の解明。第 58 回日本医真菌学会総会・学術集会、2014. 11.1-2、ワークピア横浜(神奈川県・横浜市)。

8) 大野秀明、名木 稔、田辺公一、梅山 隆、山越 智、宮崎義継。*Cryptococcus gattii* の現状。衛生微生物技術協議会第 35 回研究会、2014. 6. 26-27、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)。

9) 浦井 誠、金子幸弘、田辺公一、梅山 隆、山越 智、金城雄樹、大野秀明、杉田 隆、宮崎義継。高病原性 *Cryptococcus gattii* 由来荚膜多糖の免疫細胞に及ぼす影響。第 88 回日本感染症学会、第 62 回日本化学療法学会総会合同学会、2014. 6. 18-20、ホテルヒルトンシーホーク(福岡県・福岡市)。

10) 大久保陽一郎、大野秀明、篠崎 稔、宮崎義継、根本哲生、若山 恵、栃木直文、石渡誉郎、中山晴雄、下平佳代子、安藝恭子、亀井克彦、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、渋谷和俊。アウトブレイク型 *Cryptococcus gattii* 株に対する組織学的ならびに網羅的遺伝子解析。真菌症フォーラム第 15 回学術集会、2014. 2. 8、第一ホテル東京(東京都・港区)。

12) 上野圭吾、金城雄樹、金子幸弘、大川原明子、水口裕紀、清水公德、川本 進、大野秀明、宮崎義継。*Cryptococcus gattii* の肺感染モデルにおける樹状細胞ワクチンの効果。真菌症フォーラム第 15 回学術集会、2014. 2. 8、第一ホテル東京(東京都・港区)。

13) 大野秀明、大久保陽一郎、金子幸弘、田辺公一、梅山 隆、山越 智、亀井克彦、渋谷和俊、宮崎義継。*Cryptococcus gattii* 感染症の病態解析(シンポジウム 4)。第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会、2013. 9. 27-28、京王プラザホテル(東京都・新宿区)。

〔図書〕(計 4 件)

1) 梅山 隆、大野秀明。真菌感染症とその治療。化学療法の領域 30: 1559-1565, 2014.

2) 大野秀明、金子幸弘、田辺公一。

Cryptococcus neoformans 感染の各種病態：
免疫不全において.感染症内科 2 (6): 567-574,
2014.

3) 大野秀明、宮崎義継. 日本にも現れたク
リプトコックス・ガッティ. 日経サイエンス
44 (5)、p76、日本経済新聞出版社、東京、2014.

4) 大野秀明、金子幸弘、田辺公一、梅山 隆、
宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 感染症 -新
興・再興感染症 up to date-. 化学療法の領域
29 S-1: 1144-1151, 2013.

[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：なし

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者：なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者：なし
()

研究者番号：