

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461508

研究課題名(和文)クリプトコックスに対する免疫応答の解明と、菌の臓器指向性と免疫応答の関係の解明

研究課題名(英文) Evaluation of the host immune response to Cryptococcus and of the association between fungal organ directivity and host immune reaction.

研究代表者

河野 茂 (KOHNO, Shigeru)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：80136647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：クリプトコックス症は免疫不全者のみならず、免疫正常者にも深在性真菌症を起こす真菌であるが、その発症メカニズムについては、菌の病原因子、宿主の防御因子ともに不明な点が多い。また、診断においては血清や髄液のクリプトコックス抗原が用いられるが、肺クリプトコックス症において小さい病変の場合は、血清抗原が陰性であることもしばしば経験する。今回、クリプトコックス髄膜炎の発症において、宿主因子として抗GM-CSF抗体が関与している可能性が示唆された。また、肺クリプトコックス症では、特に直径25mm以下の小さな病変において、気管支洗浄液中のクリプトコックス抗原の陽性率が血清抗原よりも高いことが示された。

研究成果の概要(英文)：Cryptococcus is a pathogenic yeast which causes serious invasive fungal disease not only in immunocompromised patients but also in immunocompetent patients, while the mechanism of the development of cryptococcosis in terms of both fungal virulence factors and host defense systems have much remained unknown. Although detection of cryptococcal glucuronoxylomannan (GXM) antigen in the serum and/or in the cerebrospinal fluid is a useful method for the diagnosis of cryptococcosis, GXM antigen in the serum sometimes remains negative in a patient with a small lesion of pulmonary cryptococcosis. We evaluated that anti GM-CSF auto antibodies in the host serum are associated with the development of cryptococcal meningitis. The rate of GXM-positive BALF samples was higher than the rate for serum samples, especially for patients with pulmonary lesion diameters <25 mm.

研究分野：感染症学

キーワード：クリプトコックス髄膜炎 抗GM-CSF抗体 クリプトコックス抗原 肺クリプトコックス症 BALF中クリプトコックス抗原

1. 研究開始当初の背景

(1) クリプトコックスは、免疫不全患者のみならず、免疫正常者においても深在性真菌症を引き起こす重要な真菌である。また、その病型も肺に限局する軽症のものから髄膜炎を起こす重症なものまで様々である。クリプトコックスの病原因子については、遺伝子変異菌株を用いた研究により徐々に知見が集積されつつあるもののまだ十分とはいえず、クリプトコックス症に対する宿主の免疫反応に関する研究はまだ始まったばかりであり、クリプトコックス症発症・進展の機序については不明な点が多い。

近年、抗インターフェロン- $\gamma$  抗体や抗 GM-CSF 抗体などの抗サイトカイン自己抗体が抗酸菌感染症や真菌感染症に与与することが示唆されている。また、クリプトコックスは菌の遺伝子型の違いにより病原性や臓器指向性が異なることが報告されている。クリプトコックス症の病型、抗サイトカイン抗体、および原因菌種について比較検討することで、クリプトコックス症の発症・進展機序の解明につながることを期待される。

(2) クリプトコックス症の診断においては、血清や髄液のクリプトコックスグルクロノキシロマンナン (GXM) 抗原の検出が有用であるが、肺クリプトコックス症で病変が小さい場合には血清クリプトコックス抗原が陰性であることはしばしば経験される。また、血液や気管支鏡検査で得られた検体の真菌培養検査は陰性であることが多い。肺クリプトコックス症の早期診断において有用な検査法の確立が期待されている。

2. 研究の目的

(1) クリプトコックス髄膜炎症例における抗 GM-CSF 抗体の保有率を評価する。また、クリプトコックス髄膜炎の原因菌についても併せて評価を行う。

(2) 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の GXM 抗原が肺クリプトコックス症の早期診断に有用かどうかを評価する。

3. 研究の方法

(1) クリプトコックス髄膜炎患者の血漿、および健康人コントロール血漿から、抗 GM-CSF 抗体を Bio-Plex<sup>®</sup> マルチプレックスシステムで検出した。実際の方法としては、Bio-Rad 社製マルチプレックスアッセイ用ビーズにリコンビナントヒト GM-CSF を吸着させ、抗 GM-CSF 抗体検出用のビーズを製作した。患者血漿にビーズを加えてインキュベートした後、ビオチン標識抗ヒト IgG 抗体、および蛍光色素 (Streptavidin-PE) を加え、Bio-Plex<sup>®</sup> マルチプレックスシステムで蛍光強度を測定した。次に、その抗 GM-CSF 抗体が、中和抗体であるかどうかを、フローサイトメトリーを用いて検討した。実際には、健康者の末梢血単核細胞 (PBMCs;

Peripheral blood mononuclear cells) を抗 GM-CSF 抗体を含有する患者血清、もしくは抗 GM-CSF を含有しないコントロール血清と共培養し、そこに GM-CSF を加えて PBMCs の内部の STAT 5 がリン酸化されるかどうかを確認した。抗 GM-CSF 抗体を有さない場合は、GM-CSF により細胞内の STAT 5 はリン酸化されるはずであるが、抗 GM-CSF 抗体により GM-CSF が中和される場合は、細胞内の STAT 5 は GM-CSF による刺激でリン酸化されない。この STAT 5 のリン酸化の有無を、フローサイトメトリーで確認した。また、各々のクリプトコックス髄膜炎症例の原因菌種を、制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP 法) で評価した。

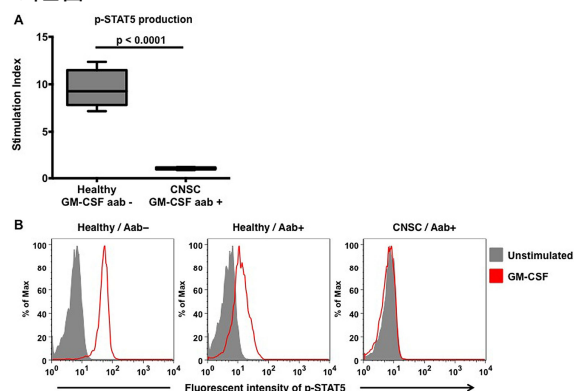
(2) 長崎大学病院に 2008 年 3 月から 2014 年 12 月の間に、血清および BALF の GXM 抗原を測定した症例 429 例のうち、実際にクリプトコックス症と診断された症例における血清、および BALF 中の GXM 抗原の感度と特異度を算出した。また、クリプトコックス病変の広がりや基礎疾患を含めた宿主の病状と GXM 抗原の陽性率との関連について評価した。

4. 研究成果

(1) 健康人 20 人のうち、抗 GM-CSF 抗体が陽性であったのは 1 例であった。クリプトコックス髄膜炎患者 30 人のうち、7 人で抗 GM-CSF 抗体が陽性であった。クリプトコックス髄膜炎患者の原因菌種は、*C. gattii* によるクリプトコックス髄膜炎患者は 9 人であり、抗 GM-CSF 抗体陽性患者 7 人の原因菌は全て *C. gattii* であった。一方、*C. neoformans* による髄膜炎患者 21 人では、抗 GM-CSF 抗体陽性者は認めなかった。以上より、*C. gattii* によるクリプトコックス髄膜炎に抗 GM-CSF 抗体が関与している可能性が示唆された。

検出された抗 GM-CSF 抗体が中和抗体かどうかを調べたところ、(図 1) に示すように STAT 5 のリン酸化は抗 GM-CSF 抗体により妨げられた。以上から、抗 GM-CSF 抗体は中和抗体であることが示唆された。

図 1 抗 GM-CSF 抗体による STAT 5 リン酸化の阻害



(2) 429 症例はいずれも HIV 陰性であり、

クリプトコックス症と確定診断されたのは23例であった。クリプトコックス症の確定診断症例において、血清およびBALF中のGXM抗原の感度、特異度は(表1)の通りであった。また、病変のサイズと血清、もしくはBALF中のGXM抗原は正の相関を認めたと、血清GXM抗原の方がより相関が強かった。一方で、直径25mmの肺病変を呈する肺クリプトコックス症では、血清よりもBALFのGXM抗原の陽性率が高かった。以上より、BALFのGXM抗原測定は、肺クリプトコックス症の早期診断に有用であることが示唆された。

表1 GXM抗原の感度、特異度

	感度	特異度
血清	73.9%	98.5%
BALF	82.6%	97.8%

## 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)

Oshima K, Takazono T, Saijo T, Kohno S, Izumikawa K, et al. Examination of cryptococcal glucuronoxylomannan antigen in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing pulmonary cryptococcosis in HIV-negative patients. *Med Mycol* 2017; doi: 10.1093/mmy/myx010. 査読有

Nishikawa H, Saijo T, Kohno S, Izumikawa K, et al. In vitro and in vivo antifungal activities of T-2307, a novel arylamidine, against *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72(6): 1709-1713. 査読有

Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Kohno S, et al. The Case for Adopting the "Species Complex" Nomenclature for the Etiologic Agents of *Cryptococcosis*. *mSphere*. 2017 Jan 11;2(1). pii: e00357-16. doi: 10.1128/mSphere.00357-16. 査読有

Kohno S, Izumikawa K, et al. Executive Summary of Japanese Domestic Guidelines for Management of Deep-seated Mycosis 2014. *Med Mycol J.* 2016; 57(4): E117-E163. 査読有

Takazono T, Sawai T, Saijo T, Izumikawa K, Kohno S, et al. Relapsed Pulmonary Cryptococcosis during Tumor Necrosis Factor Inhibitor Treatment. *Intern Med.* 2016; 55(19): 2877-2880. 査読有

Kwon-Chung KJ, Saijo T. Is *Cryptococcus gattii* a Primary Pathogen? *J Fungi (Basel)*. 2015; 1(2): 154-167. Epub 2015 Jul 29. 査読有

Saijo T, Kwon-Chung KJ, et al. Anti-Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Autoantibodies Are a Risk Factor for

Central Nervous System Infection by *Cryptococcus gattii* in Otherwise Immunocompetent Patients. *MBio*. 2014 Mar 18; 5(2): e00912-14. doi: 10.1128/mBio.00912-14. 査読有

[学会発表](計5件)

河野 茂, West meets East -シーボルトの歩いた街で医真菌を語る-, 2016年10月01日、第60回日本医真菌学会総会・学術集会、東京都立産業貿易センター(東京都・台東区)

西條 知見, *Cryptococcus gattii*によるクリプトコックス脳髄膜炎の危険因子としての抗GM-CSF抗体、第22回真菌症フォーラム学術集会、2016年5月21日、TFTビルホール500(東京都・江東区)

泉川 公一, ガイドライン up to date-深在性真菌症の診断・治療 2014 発刊から2年たった今-, 第22回真菌症フォーラム学術集会、2016年5月21日、TFTビルホール500(東京都・江東区)

河野 茂, 真菌感染症研究の進歩と将来展望、2016年4月15日、第90回日本感染症学会総会・学術講演会、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

河野 茂, 医真菌学会の将来展望、第59回日本医真菌学会総会・学術集会、2015年10月10日、ホテル札幌芸文館(北海道・札幌市)

[図書](計1件)

西條 知見 他, 抗サイトカイン自己抗体と真菌感染症、医薬ジャーナル社、化学療法の領域、2016年7月号

[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

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

河野 茂 (KOHNO, Shigeru)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・客員研究員

研究者番号：80136647

#### (2) 研究分担者

泉川 公一 (IZUMIKAWA, Koichi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・教授

研究者番号：20404212

#### (3) 連携研究者

なし

#### (4) 研究協力者

西條 知見 (SAIJO, Tomomi)