

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21644

研究課題名(和文) 真菌ワクチンが誘導する肺常在性記憶型T細胞は感染制御に寄与するか？

研究課題名(英文) Dendritic cell-based systemic vaccination induces lung resident memory Th17 that contributes to long-term protection against pulmonary fungal infection

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、病原性真菌Cryptococcus gattiiに対する感染制御機構を解明する目的で、樹状細胞(DC)ワクチンを独自に開発し、その作用機序を解析した。DCワクチンは、長寿命性の肺常在性記憶型Th17細胞“Lung TRM17”を誘導し、感染後の肺内菌数や生存率を有意に改善することが明らかになった。この感染制御効果は、肺内のIL-17Aの産生を伴い、FTY720投薬下でも同様に観察されたが、IL-17A欠損マウスではDCワクチン投与群でも感染後の好中球集積が乏しく、感染制御効果は有意に減弱した。これらの結果は、Lung TRM17が本菌の感染制御に必要であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We analyzed vaccine-mediated immunity using dendritic cell-based (DC) vaccine to elucidate the protective immunity against a fungal pathogen Cryptococcus gattii. In this study, we identified the novel lung resident memory Th17 cells (Lung TRM17) in the immunized mice, which has characteristic marker profiles and a long-lived trait. DC vaccine significantly ameliorated fungal burden and survival rate after infection, and it upregulated IL-17A production in lungs of immunized mice after infection. The protective effect of DC vaccine was significantly reduced in IL-17A deficient mice, but not in mice treated by the immunosuppressive agents FTY720. The infection control in the immunized mice was correlated with IL-17A dependent neutrophil activation and accumulation in the lungs after infection. These results suggested the Lung TRM17 contributed to the infection control against C. gattii in the vaccinated mice.

研究分野：感染免疫学

キーワード：Tissue Resident Memory CD4+ Memory T cells vaccine fungal infection Cryptococcus gattii cytokine granuloma

1. 研究開始当初の背景

Cryptococcus gattii は肺や中枢神経系に病巣を形成する病原性真菌であり、免疫が正常な健康人に感染する。1999年以降、北米を中心に本菌によるクリプトコックス症が多数報告されたことから本菌による感染症が新興感染症の一つとして認知されるようになった。しかし、本菌に対するワクチンは開発されておらず、ワクチンの開発に資するような生体防御機構も殆ど不明であった。結核のように、ワクチンを投与することで記憶型T細胞を誘導することが感染制御に有効であると推察されていたが、*C. gattii* は感染後に殆ど炎症応答を誘導しないことから、どのような記憶型T細胞を誘導すれば本菌の感染を制御できるかは不明であった。

当研究グループでは、本菌に対する生体防御機構を明らかにする目的で、独自に樹状細胞 (Dendritic cells: DC) ワクチンを開発した (Ueno et al., Infect Immun, 2015)。その後の解析で、肺常在性CD4+記憶型T細胞 (Tissue Resident Memory: Lung CD4 TRM) がDCワクチンにより誘導されることが示唆されて、この集団が感染制御に寄与するという仮説を得るようになった。

呼吸器ウイルス感染症の領域では、Lung CD4 TRMはインフルエンザ経鼻感染後に誘導されることが示されたが、この集団がどう感染症の制御にどのように寄与するかは特定されていなかった (Turner et al., Mucosal Immuno, 2013)。

以上の背景から、DCワクチンをモデルとして、Lung CD4 TRMの生理学的意義を明らかにすることは、本感染症に対するワクチン開発に重要な基盤情報を提供するだけでなく、免疫学領域においても新しい知見を発信できると考えた。

2. 研究の目的

C. gattii に対する樹状細胞 (DC) ワクチンを解析モデルとして、肺常在性CD4+記憶型T細胞 (Lung CD4 TRM) の性状解析及び機能解析を行う。特に、本菌の経気道感染モデルにおけるLung CD4 TRMの役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) DCワクチンの調製

マウスの大腿骨と脛骨から骨髓細胞を採取し、その骨髓細胞をGM-CSF存在下にて6日間培養した。非接着性の細胞を回収し、骨髓由来樹状細胞 (Bone marrow-derived dendritic cells: BMDC) とした。このBMDCに、熱処理で死滅化した*C. gattii* 莢膜欠損株 CAP60Δをワクチン抗原として添加し、1日培養することで、BMDCにCAP60Δを貪食させた。培養後、熱処理死菌を含めて、培養容器に接着していない全細胞を回収し、DCワクチンとした。DCワクチンは、 5×10^5 cells/mouseの割合でC57BL/6の尾静脈内に接種し、14日間隔で合計2回実施した (Ueno et al., Infect Immun, 2015)。

(2) DCワクチンで誘導される記憶型T細胞の解析

DCワクチン投与後のマウスをSpecific pathogen free (SPF)条件の飼育室にて、2ヶ月以上飼育した。その後、非感染状態のまま肺・脾臓・骨髓を摘出し、各臓器中に含まれる白血球を調製した。白血球中の記憶型T細胞は、フローサイトメトリー (Flow cytometry: FCM) にて解析した。一部の解析では、回収後の細胞をphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)及びionomycinで刺激した後に実施し、記憶型T細胞のサイトカイン生産性を評価した。各種白血球の調製方法と各種解析方法は、既報 (Ueno et al., Infect Immun, 2015)に倣った。

(3) *C. gattii* の経気道感染実験

高病原性の臨床分離株として知られる*C. gattii* R265株を用いた。Yeast-extract Peptone Dextrose (YPD) 培地にて1日培養した菌体をリン酸緩衝生理食塩水にて2-3回洗浄し、その後 3×10^3 cells/mouseの割合で経気道接種した (Ueno et al., Infect Immun, 2015)。

一部の感染実験では、C57BL/6を背景とするIL-17A遺伝子欠損 (knock-out: KO)マウス (東京理科大学 生命医科学研究所 岩倉 洋一郎 教授より分与) を使用した。また、血管循環性リンパ球を枯渇させるために、感染3日前から免疫抑制剤FTY720 (fingolimod) を投与した。2.5 mg/L FTY720を含む飲水を自由飲水させるとともに、2-3日毎に1 mg/kg FTY720を腹腔投与した。

(4) 感染後の肺に集積する白血球の解析

Iwata et al., Int Immunol, 2013やSlonov et al., PLoS Pathogen, 2015を参考に、感染後の肺に集積している各種白血球をFCMにて評価した。この解析では、主に好中球・好酸球・マクロファージ・樹状細胞を定量した。

4. 研究成果

(1) DCワクチンは、肺常在性記憶型Th17細胞“Lung TRM17”を誘導する

DCワクチンをマウス尾静脈内に接種し、2ヶ月以上経過した後各臓器に含まれる記憶型T細胞を評価した。その結果、ワクチン投与群の肺では組織常在性記憶型T細胞 (Lung CD4 TRM)のプロファイルを示す集団が有意に増加することが明らかになった。同様の集団は脾臓や骨髄では増加を認めなかった。肺で観察されたこの集団は血管内染色陰性であり、FTY720の投与で枯渇しない集団であることから、血液循環性の集団ではなく組織溜滞性の集団であることが裏付けられた。さらに、Lung CD4 TRMは、PMA-ionomycinによる再刺激や抗原の再刺激に応答して、IL-17Aを産生する集団であることも明らかになった。その他性状解析の結果から、この集団が長寿命性であり、既存の集団とは異なる新規の肺常在性記憶型Th17細胞“Lung TRM17”であることが明らかとなった。

(2) Lung TRM17はDCワクチンによる感染制御効果に寄与する

DCワクチン投与2ヶ月後に高病原性の臨床分離株 R265株を経気道感染させ、DCワクチンによる感染制御効果の持続性を評価した。その結果、ワクチン投与群では感染後の生存率が有意に改善し、感染14日目における肺内菌数も有意に減少した。DCワクチン投与6ヶ月後に感染させた場合もDCワクチンによる感染制御効果は消失せず、感染14日目における肺内菌数は有意に減少した。この結果は、DCワクチンによる感染制御効果に持続性があり、その持続性がLung TRM17の長期維持と関連していることを示している。

同様の実験をIL-17A KOマウスで実施すると、DCワクチン非投与群では、野生型 (Wild-type: WT) マウスとKOマウスで同等の肺内菌数を示したが、KOマウスでは、

DCワクチンの効果は消失し、DCワクチンによる感染14日目の肺内菌数減少は認めなかった。一方、FTY720投与下では、DCワクチンの効果は消失せず対照群と同等の感染制御効果を示した。これらの結果は、DCワクチンの感染制御効果は、IL-17A依存性であるが循環型リンパ球には依存していないことを意味しており、Lung TRM17がDCワクチンの感染制御作用への関与を強く示唆している。

(3) Lung TRM17は感染後の好中球誘引に寄与する

Lung TRM17による感染制御作用を調べる目的で、感染後の肺における各種白血球をFCMにて解析した。血管循環性の記憶型T細胞/B細胞による影響を排除するために、この実験は感染3日前からFTY720を投与し、血管循環性リンパ球が枯渇する条件で実施した。その結果、感染7日目のWTマウスでは、DCワクチンの投与により肺の好中球・好酸球・炎症性DC・Lung CD4 TRMの数が有意に増加した。一方で、このIL-17A KOマウスでは、DCワクチンによる好中球の増加を認めなかった。感染7日目のLung CD4 TRMは、感染前や感染1日目に比べると有意に増加し、CD25やCD69の発現量も増加していた。このことは、Lung TRM17を含むLung CD4 TRMは、*C. gattii*の感染を認識して活性化・増殖したことを意味している。好中球の増加は、感染1日目では乏しく、感染7日目にIL-17A依存的に観察された。このことは、好中球の増加がLung CD4 TRMの活性化・増加と関連していることを示しており、Lung TRM17が好中球の誘引に関与していたことを示唆している。IL-17Aは、好中球の活性化や遊走を担うサイトカインであり、Th17細胞の活性化は一般的に好中球の増加を伴うこととも矛盾しない。

真菌症の中でもカンジダ症やアスペルギルス症は、好中球の減少は危険因子であり、病態の悪化と関連していることが知られている。一方で、クリプトコックス症の病態改善には好中球は必須でないとする報告 (Mednick et al., Eur J Immunol, 2003)もあるが、IL-17A産生と好中球の誘導が病態改善と関連していることを指摘した報告もある (Murdock et al., Infect Immun, 2014:

Slonov et al., PLoS Pathogen, 2015)。この文献を参考にすれば、DCワクチンにより誘導されたLung TRM17は、感染後に好中球を誘導することで、*C. gattii*の増殖を抑制したと考えられる。好中球が直接的に菌体増殖を抑制したのか、好中球の集積が感染後期の炎症応答を誘導し間接的に菌体増殖を抑制したのかは、現時点で不明である。DCワクチン投与群では感染14日目に多核巨細胞を誘導したことから、肉芽腫形成が菌体の増殖抑制の主たる因子である可能性も考えられた。

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8件)

- ① Ueno K, Urai M, Takatsuka S, Abe M, Miyazaki Y, and Kinjo Y, “Immunization with antigen-pulsed dendritic cells against highly virulent *Cryptococcus gattii* infection: Analysis of cytokine-producing T cells” **Meth in Mol Biol**, 査読なし, in press, 2017
- ② 宮崎 義継, 中村 茂樹, 壇辻 百合香, 福田 恵子, 梅山 隆, 浦井 誠, 上野 圭吾, 金城 雄樹, “クリプトコックス症の診断と治療” **呼吸器内科**, 査読なし, 30(3) 204-206, 2016
- ③ 中村 茂樹, 上野 圭吾, 宮崎 義継 “クリプトコックス症の菌種による病態の違いと治療戦略” **化学療法の領域**, 査読なし, 32(7) 1352-1359, 2016
- ④ Nagi M, Tanabe K, Nakayama H, Ueno K, Yamagoe S, Umeyama T, Ohno H, and Miyazaki Y “Iron-depletion promotes mitophagy to maintain mitochondrial integrity in pathogenic yeast *Candida glabrata*” **Autophagy**, 査読あり, 1-13, 2016
- ⑤ Urai M, Kaneko Y, Ueno K, Okubo Y, Aizawa T, Fukazawa H, Sugita T, Ohno H, Shibuya K, Kinjo Y, and Miyazaki Y “Evasion of Innate Immune Responses by the Highly Virulent *Cryptococcus gattii* by Altering Capsule Glucuronoxylomannan

Structure” **Front Cell Infect Microbiol**, 査読あり, オンライン, 2016

- ⑥ Ueno K, Urai M, Ohkouchi K, Miyazaki Y, and Kinjo Y “Dendritic Cell-Based Vaccine Against Fungal Infection” **Methods Mol Biol**, 査読なし, 1403 537-549, 2016
 - ⑦ 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**, 査読あり, 12 831-836, 2015
 - ⑧ 金城 雄樹, 田辺 公一, 上野 圭吾, 北野 尚樹, 名木 稔, 浦井 誠, 星野 泰隆, 梅山 隆, 山越 智, 宮崎 義継 “侵襲性カンジダ感染症の発症、炎症反応および薬剤耐性に関する基盤的研究” **化学療法の領域**, 査読なし, 31(5) 813-819, 2015
- 〔学会発表〕 (計12件)
- ① 上野 圭吾, 浦井 誠, 大谷 淑子, 阿部 雅広, 高塚 翔吾, 清水 公德, 片岡 紀代, 齋藤 典子, 宮崎 義継, 金城 雄樹 “病原性真菌クリプトコックスの病原性の解析とその応用: ワクチン開発から新規記憶型T細胞の同定まで” **第9回 日本細菌学会総会**, 2017年3月21日, 仙台 (招待講演)
 - ② 大谷 淑子, 上野 圭吾, 浦井 誠, 清水 公德, 片岡 紀代, 齋藤 典子, 宮崎 義継, 金城 雄樹 “高病原性真菌 *Cryptococcus gattii* の環境適応と免疫回避における荚膜合成の生理的意義” **第90回 日本細菌学会総会**, 2017年3月20日, 仙台
 - ③ 上野 圭吾, 浦井 誠, 高塚 翔吾, 阿部 雅広, 大谷 淑子, 清水 公德, 宮崎 義継, 金城 雄樹 “樹状細胞ワクチンによる肺常在性記憶型 Th17細胞の誘導: 高病原性クリプトコックス症をモデルとして” **第90回日本細菌学会総会**, 2017年3月19日, 仙台
 - ④ Keigo Ueno, Shogo Takatsuka, and

Yuki Kinjo “Dendritic cell-based systemic vaccination induces lung resident memory Th17 that contributes to long-term protection against pulmonary fungal infection” **The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology**, 7th December 2016, Okinawa

⑤ **上野 圭吾**, 金城 雄樹, 二木 芳人, 宮崎 義継 “高病原性クリプトコックス症に対する樹状細胞ワクチンは、長寿命の肺常在性記憶型T細胞を誘導する” **第63回 日本化学療法学会東日本地方会**, 2016年10月27日, 新潟

⑥ **上野 圭吾**, 金城 雄樹, 浦井 誠, 栃木 直文, 篠崎 稔, 清水 公德, 亀井 克彦, 大野 秀明, 二木 芳人, 澁谷 和俊, 宮崎 義継 “肺常在性記憶型T細胞は高病原性クリプトコックス症の感染制御に寄与するか?” **第60回 日本医真菌学会総会**, 2016年10月1日, 東京

⑦ **上野 圭吾**, 浦井 誠, 栃木 直文, 篠崎 稔, 高塚 翔吾, 澁谷 和俊, 宮崎 義継, 金城 雄樹 “病原性真菌 *Cryptococcus gattii* に対する樹状細胞ワクチン - ワクチンが誘導する肺常在性CD4+記憶型T細胞は感染制御に寄与するか? -” **第27回 日本生体防御学会総会**, 2016年7月9日, 福岡

⑧ **上野 圭吾**, 金城 雄樹, 浦井 誠, 金子 幸弘, 亀井 克彦, 大野 秀明, 二木 芳人, 澁谷 和俊, 宮崎 義継 “肺クリプトコックス症に対する樹状細胞ワクチン: 感染制御効果の持続性に関する検討-” **第90回 日本感染症学会総会**, 2016年4月15日, 仙台

⑨ **上野 圭吾**, 金子 幸弘, 金城 雄樹 “肺真菌症に対する樹状細胞ワクチン: 肺で誘導される記憶型T細胞の解析” **第89回 日本細菌学会総会**, 2016年3月23日, 大阪

⑩ **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, 澁谷 和俊, 宮崎 義継 “樹状細胞ワクチンを用いた高病原性 *Cryptococcus gattii* に対する感染制御機構の解析” **第59回 日本医真菌学会総会**, 2015年10月9日, 札幌

⑪ **上野 圭吾**, 浦井 誠, 水口 裕紀, 大河内 香代, 宮崎 義継, 金城 雄樹 “病原性真菌 *Cryptococcus gattii* に対する樹状細胞ワクチンとその感染制御作用 - ワクチンで誘導されるTh1/Th17応答と多核巨細胞の形成について-” **第26回 日本生体防御学会総会**, 2015年7月10日, 東京

⑫ **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* 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年6月6日, 東京

〔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

① <http://researchmap.jp/k5-k5/>

② <http://www.nih.go.jp/niid/ja/bioact-director/476-departments/bioact/494-bioact-3rdlab.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

上野 圭吾 (UENO, Keigo)

国立感染症研究所・真菌部3室・主任研究官
研究者番号：10550220

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

金城 雄樹 (KINJO, Yuki)

国立感染症研究所・真菌部3室・室長

岩倉 洋一郎 (IWAKURA, Yoichiro)

東京理科大学・生命医科学研究所・教授

澁谷 和俊 (SHIBUYA, Kazutoshi)

東邦大学・医学部・病院病理学講座・教授

高塚 翔吾 (TAKATSUKA, Yuki)

国立感染症研究所・真菌部3室・研究員

阿部 雅広 (ABE, Masahiro)

国立感染症研究所・真菌部3室・協力研究員

大谷 淑子 (OTANI, Yoshiko)

国立感染症研究所・真菌部3室・実習生