

令和元年5月30日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19642

研究課題名(和文)糖脂質抗原を用いた新たな真菌ワクチンの開発

研究課題名(英文)Development of a novel fungal vaccine with glycolipid antigens

研究代表者

川上 和義 (Kawakami, Kazuyoshi)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10253973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：Cryptococcus neoformansは、エイズなど免疫不全患者に重症の髄膜炎を引き起こすことで臨床において問題となっている。本研究では、C. neoformansに対するワクチン開発を目的として、マウスモデルでの β -glucosylceramide (β -GlcCer) による抗体産生効果及び有効なアジュバントの探索を実施した。 β -GlcCerを非メチル化CpGオリゴDNAとともに投与することで、血清中に特異的IgM、IgG抗体が産生された。さらに、免疫細胞による β -GlcCerの認識及び感染初期の炎症反応制御へのMincleの関与を示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クリプトコックスはエイズなど免疫不全患者に髄膜炎を引き起こし、重症化することが少なくない。その発症予防は臨床上的重要な研究課題である。本研究は、未だ存在しない真菌感染症に対するワクチンとアジュバントの開発を目的として実施するもので、今回は、クリプトコックスの表面に発現する β -glucosylceramide (β -GlcCer)とTLR9のリガンドとして知られる非メチル化CpGオリゴDNAが β -GlcCerに特異的なIgM、IgG抗体の産生を誘導することを明らかにした。本研究により有効なワクチンを開発することで、クリプトコックス髄膜炎の発症予防につながる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Cryptococcus neoformans causes fatal meningitis in immunocompromised patients, such as AIDS. In this study, to develop anti-fungal vaccines against C. neoformans infection, we addressed the ability of β -glucosylceramide (β -GlcCer) to induce the specific antibody and explored the effective adjuvants for this vaccine using a mouse model. Administration of β -GlcCer together with unmethylated CpG containing oligo DNA, a TLR9 ligand, led to increase in the serum level of IgM and IgG antibody against β -GlcCer. In NFAT-GFP reporter cells expressing Mincle, β -GlcCer induced GFP expression, suggesting the possible involvement of Mincle in the immune recognition of this glycolipid. In addition, we obtained the results suggesting the involvement of this pattern recognition receptor in the regulation of inflammatory responses caused by C. neoformans infection.

研究分野：感染免疫学

キーワード：真菌ワクチン 糖脂質抗原 クリプトコックス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クリプトコックス症は、土壌や植物、鳥類の堆積糞中に存在する *Cryptococcus* 属の酵母様真菌によって引き起こされる感染症であり、ヒトでは *C. neoformans* と *C. gattii* が主要な病原菌である。*C. neoformans* はハトなど鳥類の堆積糞中で増殖し、乾燥して舞い上がった酵母を吸入することで経気道感染する。健常者では不顕性感染に終わることが多いが、糖尿病、腎疾患、膠原病、悪性腫瘍、血液悪性疾患、エイズなどの基礎疾患を有する場合は髄膜脳炎など播種性感染症を発症することも少なくない。特に、エイズに合併するクリプトコックス髄膜炎では、一度発症すると難治化して予後不良となることが多い。一方、*C. gattii* はユーカリの木に棲息しコアラなどの動物に感染するとともに、ヒトにおいても呼吸器・中枢神経感染症を引き起こす。*C. neoformans* と異なり、健常者でも中枢神経感染症を発症し、脳内に腫瘍形成(クリプトコックスコマ)を示すことが多い。薬剤耐性傾向が強く、死亡率も20%と高いため、高病原性クリプトコックス症とも呼ばれる。

C. neoformans は、マクロファージの殺菌からエスケープし細胞内増殖する (Trends Microbiol 9: 273-278, 2001)。一方で、*C. neoformans* は肺胞腔内で細胞外増殖し、脳への播種性感染に重要な特性であることが知られている。Del Poeta らは、細胞外増殖には菌体表面の β -glucosylceramide (β -GlcCer) が必須であり、 β -GlcCer 合成酵素の欠損株 (Δ gcs1) では細胞内増殖やマクロファージの食胞内環境(酸性 pH、低 CO₂ 濃度)での増殖に何ら影響を示さないものの、肺胞腔内環境(中性 pH、高 CO₂ 濃度)での増殖が極度に低下することを報告している。また、 Δ gcs1 株をマウスに感染させると、肺内感染では完全に病原性を消失するのに対して、静脈感染では影響がみられない (J Clin Invest 116: 1651, 2006; PLoS ONE 6: e15572, 2011)。さらには、クリプトコックス症患者の血清中には抗 β -GlcCer 抗体が検出され、本抗体によって *C. neoformans* の増殖が抑制されることが報告されている (Mycopathologia 173: 419, 2012)。また、*C. neoformans* 感染マウスに抗 β -GlcCer 抗体を投与することで生存期間が延長することが報告されている (Clin Vacc Immunol 14: 1372, 2007)。

これらの知見から、 β -GlcCer がクリプトコックス症を予防するためのワクチン抗原となりうる可能性が期待される。これまでに我々は、致死性のクリプトコックス感染モデルマウスで β -GlcCer の感染防御効果を明らかにし報告している (PLoS One 11: e0153853, 2016)。このような背景から、本研究では、 β -GlcCer による真菌ワクチン開発を目指した基礎的研究を実施する。

2. 研究の目的

免疫不全患者における重要な日和見原因菌であるクリプトコックスなどの病原真菌に対するワクチンの開発を目指す。本ワクチンは、真菌の増殖や病原性に重要な β -GlcCer を抗原とするものであり、これまでに申請者らのグループは、致死性のクリプトコックス感染モデルマウスを用いて β -GlcCer の感染防御効果を明らかにし報告している (PLoS One 11: e0153853, 2016)。

本研究では、未だ存在しない真菌ワクチンの開発を目指し、マウスモデルでの β -GlcCer ワクチン投与の最適化とアジュバントの選択、そしてその免疫機序の解明を目的として解析を実施する。

3. 研究の方法

(1) 糖脂質

β -GlcCer は *Candida utilis* から精製したものをを用いた。図1に示す i)、ii)の構造を有する β -GlcCer が、それぞれ全体の15%、80%を占める。実験によっては、特異的なNKT細胞活性化剤の α -galactosylceramide (α -GalCer) をを用いた。

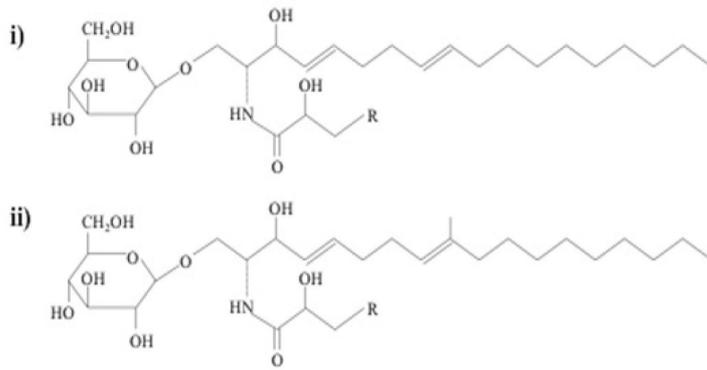


図 1 . β -GlcCer の構造

(PLoS One 11: e0153853, 2016
より引用)

(2) ワクチン投与

C57BL/6 マウスの腹腔内に種々のスケジュールで β -GlcCer を投与し、最終投与の 1 ~ 3 週後に血清を採取し、抗 β -GlcCer IgM、IgG 抗体を ELISA にて測定した。アジュバントとして、 α -GalCer や、TLR9 リガンドである非メチル化 CpG オリゴ DNA (S 化修飾 CpG1826) を用い、 β -GlcCer と同時に腹腔内に投与した。

(3) NFAT-GFP レポーターアッセイ

Dectin-1、Dectin-2、Mincle 遺伝子を導入した NFAT-GFP レポーター細胞を、*C. neoformans* 菌体破砕物や β -GlcCer で刺激し、GFP の発現をフローサイトメトリーにて解析した。

(4) クリプトコックス感染実験

C57BL/6 マウスの気管内に *C. neoformans* を感染させ、肺内における Mincle mRNA の発現を RT-PCR にて解析した。クリプトコックス感染防御免疫応答における Mincle の役割を調べるために、Mincle 遺伝子欠損 (KO) マウス、野生型コントロール (C57BL/6) マウスの気管内に *C. neoformans* を感染させ、肺内生菌数や、肺ホモジネート中の各種サイトカイン・ケモカイン、転写制御因子、抗菌ペプチドの発現・産生を ELISA、RT-PCR にて測定した。

4 . 研究成果

(1) β -GlcCer のワクチン効果

これまでに申請者らは、*C. utilis* 由来の β -GlcCer が *C. neoformans* 感染モデルマウスにおいて感染防御効果を示すことを明らかにし報告した (PLoS One 11: e0153853, 2016)。しかし、この報告では β -GlcCer が感染前後 2 週間に渡って投与されており、ワクチンへの応用を考える場合現実的ではない。そのため本研究では、 β -GlcCer の感染後投与をしない、よりワクチンに近いスケジュールでの投与を実施し、血清中に産生される β -GlcCer 特異的な IgM、IgG 抗体価を測定した。最初に、我々が同じ胸腺非依存性抗原である肺炎球菌荚膜多糖ワクチンを用いて実施した投与スケジュール (PLoS One, 8:e78611, 2013) を参考にし、 β -GlcCer の 1 回投与 2、3 週後の抗体価を測定したが、IgM、IgG とともにコントロールと比較してほとんど産生が検出できなかった。

次に、 β -GlcCer が同じ胸腺非依存性抗原である多糖とは異なる機序で抗体産生を誘導する可能性を考慮し、糖脂質に対する抗体産生を検討した報告 (Blood 125: 1256-1271, 2015) を参考に投与スケジュールについて検討した。そこで、 β -GlcCer を 1 週間隔で 3 回投与し、最終投与の 1 週後に血清中の IgM、IgG 抗体を測定したところ、コントロールと比較して有意な産生が検出できた。

さらに、 β -GlcCer による抗体産生を増加させる目的でアジュバントの効果について検討した。これまでの我々の研究では、肺炎球菌荚膜多糖ワクチンによる抗体産生に NKT 細胞が重要な

役割を担うことを明らかにしてきた (PLoS One, 8:e78611, 2013)。そこで本研究では、特異的な NKT 細胞の活性化剤である α -GalCer のアジュバントとしての可能性について解析を行ったが、明らかな効果は得られなかった。次に、近年ワクチンアジュバントとしての可能性が期待されている TLR9 アゴニストである非メチル化 CpG オリゴ DNA (CpG) について影響を検討した。 β -GlcCer を投与する際に CpG1826 を併用する群としない群を用意し、血清中の抗 β -GlcCer IgM、IgG 抗体産生を比較すると、図 2 に示すように有意差は得られな

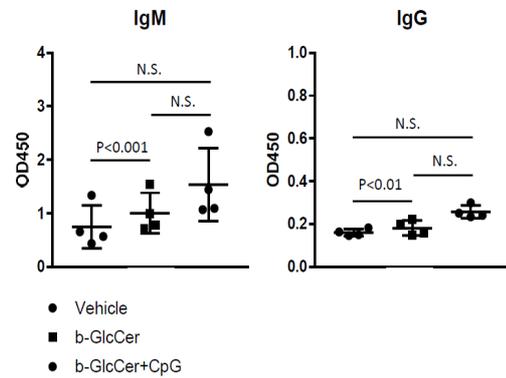


図 2. β -GlcCer による抗体産生と CpG のアジュバント効果

かったが CpG1826 によって抗体産生が増強される可能性が示された。今後、CpG1826 の投与条件などを検討することで、そのアジュバント効果について検証していきたい。

(2) β -GlcCer による Mincle の活性化

これまでに我々は、肺炎球菌莢膜多糖ワクチンによる抗体産生に樹状細胞に発現する C 型レクチン受容体 Dectin-2 が重要な役割を担うことを明らかにし報告した (PLoS One, 8:e78611, 2013)。そこで本研究では、樹状細胞による β -GlcCer の認識への C 型レクチン受容体の関与について、Dectin-1、Dectin-2、Mincle を発現させた NFAT-GFP レポーター細胞を用いて検討した。図 3 に示すように、Mincle レポーター細胞において、陽性コントロールの BCG ほどではないものの、 β -GlcCer 刺激により明らかな GFP の発現が検出されたことから、 β -GlcCer による抗体産生へ Mincle が関与する可能性が考えられた。

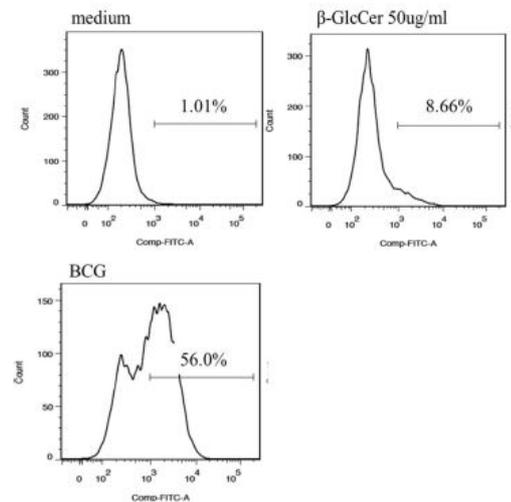


図 3. β -GlcCer による Mincle の活性化

一方で、肺炎球菌莢膜多糖ワクチンとは異なり、骨髄由来樹状細胞を β -GlcCer で刺激しても有意なサイトカイン産生が誘導されなかったことから、より複雑なメカニズムの関与が想定され、今後さらなる解析を実施していきたい。

(3) クリプトコックス感染防御免疫応答における Mincle の役割

これまでの報告から、クリプトコックス症患者の血清中には抗 β -GlcCer 抗体が検出されることから (Mycopathologia 173: 419, 2012)、本真菌に感染することで β -GlcCer に対する免疫応答が誘導されることが考えられる。さらに本研究で、 β -GlcCer によって Mincle を介したシグナル経路が活性化されたことから、Mincle がクリプトコックス感染防御において何らかの役割を担う可能性が予想される。そこで本研究では、Mincle 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いることで、クリプトコックス感染防御における影響について解析を行った。

野生型マウスでは、*C. neoformans* 感染 3 日後の Mincle の発現が増強し、7 日後には感染前のレベルに低下したことから、Mincle は本真菌感染後早期に機能するパターン認識受容体であることが考えられた。一方で、Mincle KO マウスにおける菌排除や Th1、Th2、Th17 サイトカイン産生への明らかな影響は認められなかったが、感染早期の IL-22、TNF- α 、IL-6 産生の有意な低下が認められた。感染後の抗菌ペプチド発現を解析したところ、Mincle 欠損による影響は

認められなかった。Mincle NFAT-GFP レポーターアッセイでは、本真菌の菌体破砕物によって GFP の発現が誘導され、 β -GlcCer による Mincle の活性化と一致する結果であった。以上の結果より、Mincle は *C. neoformans* 感染防御に必須ではないが、感染早期の炎症性サイトカインや IL-22 の産生に関わることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) 川上和義: 深在性真菌症の感染危険因子と病態, 化学療法の領域, 34: 71-79, 2018. (査読なし)
- (2) 佐藤 光, 川上和義: クリプトコックス感染における宿主認識と生体防御機構, Med. Mycol. J. 58: 83-90, 2017. doi: 10.3314/mmj.17.011. (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) Sato Y, Kanno E, Ishii K, Yamasaki S, Kawakami K: Effect of Mincle-deficiency on the host immune response against *Cryptococcus neoformans* infection. 第 46 回日本免疫学会学術集会, 仙台, 2017.
- (2) 佐藤佑樹, 丹野大樹, 宮原杏奈, 宗 童, 景澤貴史, 菅野恵美, 石井恵子, 川上和義: クリプトコックス感染防御における Mincle の役割, 第 91 回日本感染症学会総会・学術講演会, 東京, 2017.

〔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 :
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 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 山本 秀輝

ローマ字氏名 : YAMAMOTO HIDEKI

所属研究機関名 : 新潟大学

部局名 : 研究推進機構超域学術院

職名：助教

研究者番号（8桁）：90799082

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。