

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17920

研究課題名(和文)ハイリスク状態におけるクリプトコックスに対する易感染性の免疫機序の解明

研究課題名(英文)The effects of high-risk conditions on the immune response to cryptococcal infection

研究代表者

佐藤 光 (Sato, Ko)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20832124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：クリプトコックスは経気道に肺へと感染する酵母型真菌であり、免疫の低下した宿主では重篤な脳髄膜炎を引き起こす。本感染症のリスク因子として、糖尿病(DM)、長期ステロイド投与などが知られているが、それらが直接的に免疫応答に与える影響については不明な点が多い。  
本研究では、これらのリスク因子が本真菌の感染防御に与える影響について解析した。DMでは急性期と慢性期で免疫応答へ与える影響が異なり、急性期ではTh1型免疫応答が亢進する一方で、慢性期では低下し、感染を悪化させることが明らかとなった。また長期ステロイド投与はTh1型免疫応答を抑制することで感染を悪化させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、易感染性を呈する疾患は数多く存在するが、クリプトコックス症においてリスク因子が免疫応答に与える直接的な影響については不明な点が多い。  
本研究により、慢性糖尿病及び長期ステロイド投与がクリプトコックスに対する免疫応答を抑制することが明らかとなった。特に糖尿病では、急性期と慢性期で異なる結果が得られ、そこには糖の代謝異常が関与する可能性が示唆された。今後、クリプトコックス症の発症予防・新規治療薬の開発につながる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：Cryptococcus neoformans is a yeast-type opportunistic fungal pathogen, which infects lungs via an airborne route and causes life-threatening meningoencephalitis in immunocompromised hosts. Diabetes mellitus (DM) and long-term steroid administration are risk factors for this infection, but there are not well known about their direct effects on the immune response.

In this study, we analyzed the effects of these risk factors on the immune response to cryptococcal infection. It was revealed that the DM condition had different effects on the immune response in the acute phase and the chronic phase. The Th1 immune response was enhanced in the acute phase. On the other hand, the fungal burden was increased in the chronic phase with decreasing the Th1 immune response. In addition, long-term steroid administration led to increasing the fungal burden by suppressing the Th1 immune response.

研究分野：感染免疫学

キーワード：クリプトコックス 糖尿病 ステロイド 感染免疫

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) クリプトコックス症の臨床的背景とリスク因子

*Cryptococcus neoformans* は経気道に肺へと感染することで肺クリプトコックス症を引き起こす酵母型真菌である。特に AIDS などの基礎疾患を持つ患者では中枢神経系に播種し、重篤な脳髄膜炎を引き起こす。我が国の HIV 感染陰性者を対象とした、肺クリプトコックス症の解析では、半数以上が基礎疾患を有しており、そのうち糖尿病 (DM) (32.1%) が最も多く、ステロイド使用者は全体の 37% であった。特に DM 患者や長期ステロイド投与では髄膜炎症例も多く報告されている。これらのリスク因子による感染悪化は、宿主の免疫不全状態が原因であると考えられているが、それらが直接的に感染防御免疫に与える影響については不明な点が多い。

#### (2) クリプトコックス症と感染制御

*C. neoformans* の感染防御には Th1/Th2 バランスが重要である。自然免疫細胞から産生される IL-12、IFN- $\gamma$  等の作用によって、クリプトコックス特異的 Th1 応答が誘導されると、感染局所で IFN- $\gamma$  が産生され、殺菌及び肉芽腫形成が促進される。一方、IL-4 によって誘導される Th2 細胞は IL-4 等を産生し、肉芽腫形成を阻害し感染は悪化に向かう。

この Th1/Th2 バランスは樹状細胞によるパターン認識受容体を介した菌の認識とその後の免疫応答によって決定づけられる。申請者らは TLR9 及び Dectin-2 がクリプトコックスの認識に関与することを報告した。同様に、TLR2、4、NLRP3、MR、DC-SIGN が本真菌の認識に関与することが報告されている。

#### (3) リスク因子と免疫応答

高グルコース環境や DM ではリンパ球の増殖抑制や、IFN- $\gamma$  産生低下が報告されており、DM では Th1 細胞の誘導が阻害される可能性が考えられる。DEX は C 型レクチン受容体の 1 つである Dectin-1 を介したサイトカイン産生や、Toll 様受容体の発現を抑制することが報告されており、ステロイド投与によってパターン認識受容体の発現やその下流の免疫応答が抑制される可能性が考えられる。

#### (4) クリプトコックス特異的 T 受容体を高発現するトランスジェニックマウスの確立

これまでに申請者らは、本真菌の主要な T 細胞抗原 Cda2 を認識する受容体を高発現するトランスジェニックマウス (CnT-II) を作製した。本マウスの T 細胞は Cda2 刺激により Th1 細胞に分化する。本マウスを用いることで本真菌特異的 Th 細胞の解析が可能である。

### 2. 研究の目的

本研究では、臨床上特に問題となる DM 及び長期ステロイド投与がクリプトコックスの感染防御に与える影響について解析する。モデルとして、ストレプトゾトシン (STZ) 投与による DM マウスモデル、ステロイドとしてデキサメタゾン (DEX) 投与マウスモデルを用いて、以下の点について明らかにする。

1. 高グルコース環境、DEX 投与が免疫応答に与える影響を *in vitro* 解析を通して、樹状細胞の活性化に与える影響、PRRs 特異的なシグナル伝達への影響について明らかにする。
2. STZ、DEX 投与マウスを用いて、肺クリプトコックス症の悪化機序を *in vivo* 解析を通して、感染の臨床経過、感染防御免疫に与える影響について明らかにする。
3. CnT-II マウスを用いて、クリプトコックス特異的 Th 細胞の誘導へのハイリスク状態の影響を明らかにする。

### 3. 研究の方法

<病原体> *C. neoformans* H99 株 (血清型 A)、B3501 (血清型 D) 及びその胸膜欠損株 Cap67

<実験動物> C57BL/6 マウス及び CnT-II マウス

<培養細胞> マウスマクロファージ細胞株 MH-S 細胞及び RAW264.7 細胞

#### (1) 高グルコース環境、DEX 投与が樹状細胞、マクロファージの活性化に与える影響

##### 樹状細胞への影響

C57BL/6 マウスの大腿骨より骨髓細胞を採取し、GM-CSF とともに 8 日間培養することで骨髓由来樹状細胞 (BM-DC) を作成した。同様に、高グルコース (HG) 環境下、DEX 存在下で BM-DC を作成した。作成した BM-DC を、クリプトコックスの生菌で 24 時間刺激し、培養上清中の IL-12p40 を測定した。

##### マクロファージへの影響

HG 環境下及び DEX 存在下で MH-S 細胞、RAW264.7 細胞を培養後、クリプトコックスの菌体成分とともに IFN- $\gamma$  で 24 時間刺激し、培養上清中に産生された一酸化窒素 (NO)、細胞内の NO 合成酵素 (iNOS) mRNA の発現の解析を行った。同様に培養したマクロファージ細胞株をクリプトコックス菌体と IFN- $\gamma$  とともに 24 時間培養し、菌の殺菌能の解析を行った。

(2) DM、DEX 投与がクリプトコックス特異的 Th1 免疫応答に与える影響

CnT-II マウスに STZ を投与することで作成した DM マウス及び、DEX を連日投与した DEX 投与マウスの脾臓より脾細胞を採取し、Cda2 で 48 時間刺激し、培養上清中の IFN- $\gamma$  を測定した。

(3) DM、DEX 投与がクリプトコックスの排除に与える影響

CnT-II マウスに STZ を投与することで作成した DM マウス及び、DEX を連日投与した DEX 投与マウスに、クリプトコックスを感染させ、感染 2 週後の肺における生菌数の解析及び、肺ホモジネート上清中の IFN- $\gamma$  を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 高グルコース環境、DEX 投与が樹状細胞、マクロファージの活性化に与える影響

樹状細胞への影響

HG は骨髄細胞から BM-DC への分化を阻害しなかったが、DEX 存在下では BM-DC への分化が阻害された。BM-DC を生菌で刺激することで産生された IL-12p40 は、HG、DEX の影響を受けなかった。

マクロファージへの影響

DEX 存在下では MH-S 細胞は多核巨細胞化し、LPS 刺激による NO 産生が亢進した。一方で、長期間 HG、DEX 存在下で培養した MH-S では LPS 刺激による NO 産生が低下した。MH-S 細胞では菌体成分刺激による NO 産生がみられなかったことから、RAW264.7 細胞を用いて解析を行った。短期間 HG 環境下で培養した RAW264.7 細胞では菌体成分刺激による NO 産生が亢進したが、長期間 HG 環境下で培養した RAW264.7 細胞では NO 産生、iNOS mRNA 発現、菌の殺菌効率が低下した。長期 HG 培養 RAW264.7 細胞の NO 産生低下は還元型グルタチオン (GSH) 添加によって回復した。

(2) DM、DEX 投与がクリプトコックス特異的 Th1 免疫応答に与える影響

血糖値の上昇がみられた直後の急性期 DM マウスの脾細胞を、Cda2 で刺激することで産生された IFN- $\gamma$  は産生が亢進したが、慢性期では細胞集団の変化を介さずにその産生が低下した。この IFN- $\gamma$  産生低下は GSH を添加することで回復した。DEX 投与マウスの脾細胞を Cda2 で刺激することで産生された IFN- $\gamma$  はコントロールマウスと同程度であったのに対し、コントロールマウスの脾細胞を DEX 存在下で Cda2 で刺激すると IFN- $\gamma$  産生は消失した。

(3) DM、DEX 投与がクリプトコックスの排除に与える影響

慢性期の DM マウスではコントロールマウスと比較して、クリプトコックス感染後の体重の有意な減少、肺重量体重比の有意な増加、肺内生菌数の有意な増加、IFN- $\gamma$  の有意な産生低下が観察された。特に、これら感染悪化の指標はマウスの血糖値と相関がみられ、血糖値の高いマウスほど感染の悪化がみられた。DEX 投与マウスでも同様に、クリプトコックス感染後、肺内生菌数の増加傾向、IFN- $\gamma$  産生の減少傾向が観察された。

以上の結果より、DM では急性期と慢性期で免疫応答へ与える影響が異なり、急性期では Th1 応答が亢進し、慢性期では低下する可能性が示唆された。また Dex は Th1 応答を抑制することで感染を悪化させる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Y, Sato K, Yamamoto H, Kasamatsu J, Miyasaka T, Tanno D, Miyahara A, Kagesawa T, Oniyama A, Kawamura K, Yokoyama R, Kitai Y, Umeki A, Ishizuka S, Takano K, Shiroma R, Nakahata N, Kawakami K, Kanno M, Tanno H, Yamasaki S, Hara H, Ishii K, Kawakami K	4. 巻 88
2. 論文標題 Limited Role of Mincle in the Host Defense against Infection with <i>Cryptococcus deneoformans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e00400-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/IAI.00400-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dobashi-Okuyama K, Kawakami K, Miyasaka T, Sato K, Ishii K, Kawakami K, Masuda C, Suzuki S, Kasamatsu J, Yamamoto H, Tanno D, Kanno E, Tanno H, Kawano T, Takayanagi M, Takahashi T, Ohno I	4. 巻 181
2. 論文標題 Novel Toll-Like Receptor 9 Agonist Derived from <i>Cryptococcus neoformans</i> Attenuates Allergic Inflammation Leading to Asthma Onset in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Archives of Allergy and Immunology	6. 最初と最後の頁 651 ~ 664
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000508535	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato K, Yamamoto H, Nomura T, Kasamatsu J, Miyasaka T, Tanno D, Matsumoto I, Kagesawa T, Miyahara A, Zong T, Oniyama A, Kawamura K, Yokoyama R, Kitai Y, Ishizuka S, Kanno E, Tanno H, Suda H, Morita M, Yamamoto M, Iwakura Y, Ishii K, Kawakami K	4. 巻 205
2. 論文標題 Production of IL-17A at Innate Immune Phase Leads to Decreased Th1 Immune Response and Attenuated Host Defense against Infection with <i>Cryptococcus deneoformans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 686 ~ 698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1901238	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤光、笠松純、佐藤祐樹、菅野恵美、丹野寛大、石井恵子、川上和義
2. 発表標題 クリプトコックス感染防御におけるMincleの役割
3. 学会等名 第4回東北医真菌研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤光、川上和義
2. 発表標題 クリプトコックスの内因性再燃発症の可能性：結核との類似性
3. 学会等名 第95回日本結核・非結核性抗酸菌症学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤光、笠松純、山本秀輝、石井恵子、川上和義
2. 発表標題 クリプトコックス感染防御におけるClaudins欠損の影響
3. 学会等名 第64回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤光、川上和義
2. 発表標題 クリプトコックス及び結核菌感染に対するTh1免疫応答を介した感染防御機構
3. 学会等名 第64回日本医真菌学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笠松純、佐藤光、北井優貴、川上和義
2. 発表標題 グルコシルセラミドを標的としたクリプトコックスワクチン開発のための基礎的検討
3. 学会等名 第64回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤光、笠松純、山本秀輝、石井恵子、川上和義
2. 発表標題 クリプトコックス感染防御におけるTight junctionタンパク質欠損の影響
3. 学会等名 第94回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中畑那奈、梅木彩、佐藤光、笠松純、山本秀樹、石井恵子、川上和義
2. 発表標題 クリプトコックス感染の自然免疫時相におけるメモリー、エフェクターT細胞からのIFN- $\gamma$ 産生
3. 学会等名 第94回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梅木彩、笠松純、佐藤光、白田薫、石井恵子、川上和義
2. 発表標題 クリプトコックス内因性再燃モデルマウスの作成と免疫機序の解析
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤光, 笠松純, 山本秀輝, 石井恵子, 川上和義
2. 発表標題 クリプトコックス感染におけるIL-17Aを介したTh1免疫応答の制御と防御機構への影響
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤光, 笠松純, 山本秀輝, 石井恵子, 川上和義
2. 発表標題 クリプトコックス感染におけるIL-17Aによる免疫応答の制御と防御機構への影響
3. 学会等名 第73回日本細菌学会東北支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤光, 笠松純, 山本秀輝, 石井恵子, 川上和義
2. 発表標題 クリプトコックス感染におけるIL-17AによるTh1免疫応答の制御と防御機構への影響
3. 学会等名 第63回日本医真菌学会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅木彩, 中畑那奈, 篠宮岳志, 佐藤光, 笠松純, 山本秀輝, 石井恵子, 川上和義
2. 発表標題 クリプトコックス感染の自然免疫時相におけるIFN- $\gamma$ 産生機序の解析
3. 学会等名 第68回日本感染症学会東日本地方海学術集会・第66回日本化学療法学会東日本支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato K, Kasamatsu J, Ishii K, Tsukita S, Kawakami K
2. 発表標題 Effect of Claudin-18 deficiency on the host defense to pulmonary infection with <i>Cryptococcus neoformans</i> .
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Umeki A, Nakahata N, Shinomiya T, Sato K, Kasamatsu J, Ishii K, Yamamoto H, Hara H, Kawakami K
2. 発表標題 CARD9-dependent accumulation of CD69+ effector and memory T cells expressing IFN- $\gamma$ in the lungs at the early phase of infection with <i>Cryptococcus neoformans</i>
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤光, 笠松純, 松本郁美, 石井恵子, 月田早智子, 川上和義
2. 発表標題 クリプトコックス感染におけるTight junctionタンパク欠損の影響
3. 学会等名 第3回東北医真菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅木彩, 中畑那奈, 篠宮岳志, 佐藤光, 笠松純, 山本秀輝, 石井恵子, 川上和義
2. 発表標題 クリプトコックス感染早期におけるIFN- $\gamma$ 産生機序の解析
3. 学会等名 第13回リトリート大学院生研究発表会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------