

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02965

研究課題名（和文）新規動物モデルを用いたクリプトコックス症の潜在性感染と内因性再燃機序の解明

研究課題名（英文）Analysis of immunological mechanisms for persistent infection with *Cryptococcus neoformans* and its reactivation using a novel animal model

研究代表者

川上 和義（Kawakami, Kazuyoshi）

東北大学・医学系研究科・名誉教授

研究者番号：10253973

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,000,000円

研究成果の概要（和文）：近年、クリプトコックス症は潜在性感染後に免疫不全により内因性再燃すると考えられている。これまでの研究で、クリプトコックスに特異的なT細胞抗原受容体を高発現するトランスジェニックマウスを用いて潜在性感染（LCNI）モデルの作成に成功した。本研究では、このLCNIモデルに各種免疫抑制剤を投与することで内因性再燃モデルの作製を試みた。新規免疫抑制剤fingolimodをこのモデルに投与したところ、肺内真菌数の増加とともにTh1免疫応答の低下が観察された。このモデルを用いることで、LCNIから内因性再燃に至る免疫機序を明らかにするために肺内のエフェクターT細胞とメモリーT細胞を中心に解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、クリプトコックス症は潜在性感染後に免疫不全により内因性再燃すると考えられている。本研究では、我々が樹立した本真菌に特異的なT細胞受容体を高発現するトランスジェニックマウスを用いることで作製した潜在性感染モデルに免疫抑制剤を投与することで内因性再燃モデルの作製に成功した。今後、より詳細な免疫機序を明らかにすることで、臨床的に重要なクリプトコックス髄膜炎の発症病態の解明に迫ることができるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Recently, it has been considered that cryptococcosis may be developed by reactivation of latently infected *Cryptococcus neoformans* in lungs. In our previous study, we succeeded in creating a latent infection (LCNI) model using a transgenic mouse that highly expresses a cryptococcal-specific T cell antigen receptor. In the present study, we attempted to create an endogenous reactivation model by administering various immunosuppressants to this LCNI model. When fingolimod, a novel immunosuppressant, was administered to this model, an increase in the number of fungi in the lungs and a decrease in Th1 immune responses were observed. Using this model, we focused our analysis on effector T cells and memory T cells in the lungs to clarify the immune mechanisms leading from LCNI to endogenous reactivation.

研究分野：感染症学

キーワード：クリプトコックス 潜在性感染 内因性再燃 動物モデル 免疫機序

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クリプトコックスは厚い莢膜を有する酵母型真菌で、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的に感染し肺に病変を形成する。糖尿病、慢性腎不全、血液悪性疾患、エイズ、抗がん剤投与、免疫抑制剤投与、血液透析などにより細胞性免疫が低下すると、血行性に播種性感染し脳髄膜炎を発症することで難治化する(*Clin. Infect. Dis.* 28: 82, 1999)。世界的には結核に次いでエイズ死因の第 2 位を占めるとされる(*Clin. Epidemiol.* 6: 169, 2014)。

クリプトコックスは、莢膜多糖の産生やメラニン層の形成などによりマクロファージの殺菌に対するエスケープ機構を有し、細胞内増殖性を有することが知られている(*Trends Microbiol.* 9: 273-278, 2001)。ラットに経気道感染させると、6 ヶ月あるいは 1 年半経っても肺内で潜伏感染することや、マクロファージ内でクリプトコックスが活発に増殖することが報告されている(*Infect. Immun.* 68: 832-838, 2000)。このようなクリプトコックス感染には、好中球や抗体のみでは十分でなく、細胞性免疫による防御機構がより重要になると考えられている。そのためには、Th1、Th2 免疫応答のバランスの影響が大きく、Th1 優位な状況では肉芽腫による封じ込めによって感染は治癒に向かい、逆に Th2 優位になると肉芽腫が上手く形成できず感染の悪化に至る(*Int. Rev. Immunol.* 21: 423-438, 2002)。

このような微生物と宿主の関係からは結核との類似性が想定される。結核では感染しても多くは不顕性に終わり、潜在性結核(LTBI: Latent Tuberculosis Infection)として潜伏感染する。その後、免疫不全を契機として内因性再燃により結核を発病する。この過程を免疫学的にみると、初感染後結核菌に特異的なエフェクター T 細胞、Th1 細胞が誘導され、肉芽腫によって感染を封じ込め、その後メモリー T 細胞が誘導・維持され LTBI の状態に至る。この状態が続いた後、種々の原因により免疫が低下しコンプロマイズドホストになると、免疫記憶が破綻することで結核菌が再活性化し内因性再燃に至ると考えられる(*Immunity* 29: 567-577, 2010)。

クリプトコックス症においても内因性再燃を示唆する臨床的事項が報告されていることから(*Pediatrics* 107: e66, 2001; *Clin. Vaccine Immunol.* 14: 1550, 2007; *J. Clin. Microbiol.* 37: 3204, 1999; *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 25: 145, 2004)、結核と同様な発症機序が想定される。クリプトコックスが感染しても不顕性となり潜在性感染(LCNI: Latent *Cryptococcus neoformans* Infection)に至る。この状態は特異的メモリー応答によって維持されるが、エイズなどにより細胞性免疫不全を来すと、特異的免疫記憶の破綻から内因性再燃し髄膜炎を発症する(図 1)。この仮説を検証するためには、適切な動物モデルの作成が必要となる。

これまでに我々は、マウスを用いることで潜在性感染・内因性再燃モデルの作成に成功している。C57BL/6 マウスの気管内に莢膜を欠損した弱毒株を感染させることで半年に渡り少数ながらクリプトコックスが肺内で検出され、このマウスにデキサメサゾン

を投与し免疫不全を誘導することで肺内菌数の増加が観察された(データ未発表)。このモデルでは、LCNI から免疫不全により内因

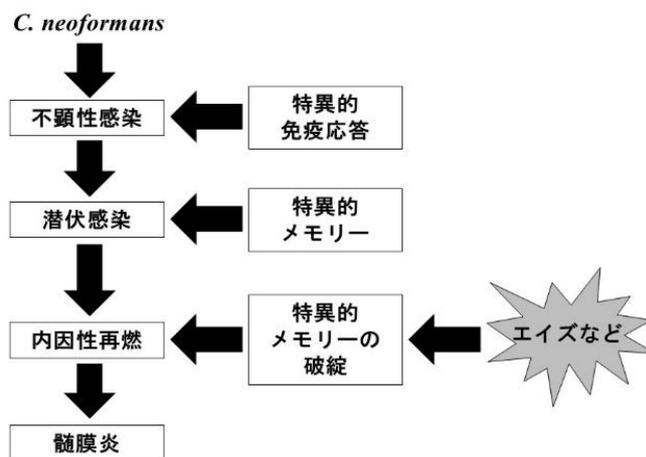


図 1. クリプトコックス髄膜炎の内因性再燃発症(仮説)

性再燃が誘導されたものと考えられた。しかし、本モデルで用いたクリプトコックスが病原因子として重要な莢膜を欠いた弱毒株であり通常の感染状態を反映しない可能性があるため、我々は各種有莢膜株を用いて再度実験を行ったところ、潜伏感染とならずいずれかの時点でマウスが死亡してしまった。そこで、我々が独自に開発した主要なクリプトコックス抗原に特異的な T 細胞受容体を発現するトランスジェニックマウス (CnT-II) (*J. Immunol.* 205: 686, 2020) に有莢膜株を感染させてみたところ、本真菌が長期に渡り肺内に潜伏感染するモデルを作製することに成功し、これまでに病理学的応答性や免疫細胞の導体について解析を行ってきた。本モデルは、通常の感染と同様に有莢膜株を用いている点と、本真菌抗原特異的な T 細胞免疫応答性を容易に解析することが可能な点がメリットとしてあげられる。

2. 研究の目的

CnT-II マウスを用いて作製した LCNI モデルマウスに各種免疫抑制剤を投与することで、肺内に潜伏する本真菌が再活性化し増殖する内因性再燃モデルの作製を試みた。併せて、免疫抑制剤投与による内因性再燃の免疫機序を明らかにするために、肺内におけるエフェクター T 細胞やメモリー T 細胞の動態への影響、さらにナイーブ T 細胞からエフェクター T 細胞、メモリー T 細胞への分化過程への影響について解析を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究に用いたマウス

これまでに我々が作製した、クリプトコックスの主要な T 細胞抗原であるキチンデアセチラーゼ 2 (chitin deacetylase 2: Cda2) に特異的な MHC class II 拘束性抗原受容体を高発現した CnT-II トランスジェニックマウス (*J. Immunol.* 205: 686, 2020) を用いた。

(2) クリプトコックスに対する T 細胞免疫応答の解析

C. neoformans として B3501 株 (血清型 D) を用いた。本真菌 10^6 CFU を CnT-II マウスの気管内に接種することで感染モデルを作成した。本モデルでは、感染後 1~3 か月に渡り $10^2 \sim 10^3$ CFU の生菌が検出され、潜在性感染 (LCNI) モデルと考えられた。

(3) 各種免疫抑制剤を用いた内因性再燃モデル作製の試み

クリプトコックスの内因性再燃モデルを作製するために、臨床の場でも免疫抑制剤としてしばしば用いられるデキサメサゾンやカルシニューリン阻害薬であるシクロスポリン A (CsA)、FK506 を LCNI モデルマウスに投与することで肺内生菌数や Th1 免疫応答について影響を解析した。さらに、近年、多発性硬化症の治療薬として用いられるようになった新規免疫抑制剤 Fingolimod についても同様な解析を試みた。

(4) LCNI モデルマウスにおける肺内白血球の解析

潜在性感染後経時的に肺内白血球を採取し、ナイーブ T 細胞、エフェクター T 細胞、メモリー T 細胞、エフェクターメモリー T 細胞の動態についてフローサイトメトリーを用いて解析するとともに、免疫抑制剤投与による影響についても解析を行った。

(5) ナイーブ T 細胞からのエフェクター T 細胞、メモリー T 細胞への分化過程の解析

CnT-II マウスの脾細胞から磁気細胞分離装置を用いて分離した CD4 陽性 T 細胞を Th1 細胞分化メディウムとともに培養し、T 細胞の増殖反応、ナイーブ T 細胞からエフェクター T 細胞への

分化過程を *in vitro* にて解析した。併せて、エフェクターT細胞からメモリーT細胞マーカーを発現する細胞分化を可能とする培養条件についても検討を試みた。

4. 研究成果

(1) デキサメサゾンを用いた内因性再燃モデル作製の試み

免疫抑制剤として臨床で用いられることが多いデキサメサゾン将我々の LCNI モデルマウスに投与することで内因性再燃モデルの作製を試みたところ、肺内における潜伏感染真菌の増加が観察された。この結果から、デキサメサゾン投与することで、本真菌が再活性化される可能性が示唆された。そこで、このマウスにおける免疫機序を解析するために肺内白血球を採取したところ、デキサメサゾン投与されたマウスでは肺内白血球に対する強い細胞障害性が観察されることが明らかになった。このように、本モデルでは LCNI から内因性再燃に至る過程での免疫機序の解析が困難であることが分かりこれ以上の解析を実施しなかった。

(2) カルシニューリン阻害薬を用いた内因性再燃モデル作製の試み

カルシニューリン阻害薬として知られているシクロスポリン A (CsA) や FK506 は臨床の場でも免疫抑制剤として用いられる。最初に、Cda2 で刺激された CnT-II マウス由来脾細胞からの IFN- γ 産生、あるいは菌体で刺激した骨髄由来樹状細胞からの IL-12 産生を調べる際に、CsA あるいは FK506 を添加することで各サイトカインの産生が抑制されることを確認した。そこで、LCNI モデルマウスに FK506 を投与して肺内生菌数への影響を解析したところ、期待とは反対に菌数が減少する傾向を示し内因性再燃モデルの作製には至らなかった。これまでにカルシニューリン阻害薬が真菌に対して抗菌活性を示すことが報告されており、本研究でもクリプトコックスの増殖に対する CsA や FK506 の影響を解析したところ、これらの薬剤が直接的な抗真菌活性を示すことが明らかになった。そのため、臨床の場で免疫抑制剤として用いられることが多いカルシニューリン阻害薬を用いた内因性再燃モデルを作製することは困難と考えられた。

(3) 新規免疫抑制剤 Fingolimod を用いた内因性再燃モデルの作製

近年、多発性硬化症の治療薬として用いられるようになった新規の免疫抑制剤である Fingolimod (FTY720) が投与された患者に播種性クリプトコックス症が散見されるようになり、2015 年頃から症例報告されるようになった (JAMA Neurol. 72: 1203, 2015; Intern. Med. 55: 3383, 2016; JAMA Neurol. 73: 355, 2016; Mult. Scler. Relat. Disord. 9: 158, 2016; Clin. Imaging 54: 53, 2019; BMC Neurol. 20: 158, 2020)。

FTY720 は体内でリン酸化されスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) と類似した構造となり、S1P 受容体に作用することで種々の作用を発揮する。免疫系への作用として、胸腺から末梢血へのナイーブT細胞の移送やリンパ節からのエフェクターT細胞の遊走を抑制することが知られている。我々の LCNI モデルマウスでは、肺内に形成された肉芽腫でマクロファージやリンパ球に S1P 受容体 1、そしてマクロファージ、リンパ球、気管支上皮細胞に S1P 受容体 3 が発現されることを確認している。

そこで、潜在性感染 3 ヶ月後のマウスに飲水に混ぜた FTY720 を毎日 28 日間投与したところ、肺内での生菌数の増加とともに、Th1 免疫応答が低下することを見出した。このことから、多発性硬化症の患者でみられたように、新規免疫抑制剤 Fingolimod (FTY720) を用いることで LCNI から内因性再燃するモデルマウスを作製できたと考えられた。

(4) LCNI マウスにおける肺内エフェクターT 細胞、メモリーT 細胞、エフェクターメモリーT 細胞の動態へのFTY720 投与の影響

これまでの研究で我々は、LCNI マウスの肺内にはエフェクターT 細胞に加えて、メモリーT 細胞やエフェクターメモリーT 細胞が経時的に増加することを見出してきた。そこで、FTY720 による内因性再燃誘発の免疫機序を明らかにする目的で、これらの T 細胞動態への FTY720 投与の影響について解析した。FTY720 またはコントロールとして蒸留水投与 1 週間後にはいずれの T 細胞サブセットでもコントロール群と比較して FTY720 投与群で影響がみられなかったが、2 週間後にはエフェクターT 細胞への影響はみられなかったものの、メモリーT 細胞及びエフェクターメモリーT 細胞は FTY720 投与によって有意に抑制された。一方、投与 3 週間後にはメモリーT 細胞、エフェクターメモリーT 細胞に加えて、エフェクターT 細胞までが FTY720 投与によって有意に抑制されることが明らかになった。これらの結果から、メモリーT 細胞による潜在性感染の維持機構が破綻するとともに、再活性化した真菌抗原による新たな Th1 細胞の所属リンパ節から感染局所への遊走が抑制されることでエフェクターT 細胞の減少が起こり、これらが FTY720 による内因性再燃に寄与する可能性が示唆された。

(5) エフェクターT 細胞及びメモリーT 細胞への分化過程における FTY720 の影響

CnT-II マウスの脾細胞から磁気細胞分離装置を用いて精製したナイーブ T 細胞を Th1 細胞分化メディウムとともに培養することでエフェクターT 細胞への分化を誘導するとともに、さらに培養条件を工夫することでメモリーマーカーを発現するメモリーT 細胞にまで分化させることが可能であることを見出した。この *in vitro* 培養系を用いることで FTY720 の影響について解析したところ、ナイーブ T 細胞の活性化から引き続く増殖反応や、エフェクターT 細胞への分化過程には影響しないことを示唆する結果が得られつつある。現在、FTY720 がエフェクターT 細胞からメモリーT 細胞への分化誘導にどのような影響を与えるのかについて解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ko Sato, Kazuyoshi Kawakami	4. 巻 63
2. 論文標題 PAMPs and Host Immune Response in Cryptococcal Infection.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Med. Mycol. J.	6. 最初と最後の頁 133-138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3314/mmj.22.005	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 笠松 純, 川上和義	4. 巻 63
2. 論文標題 クリプトコックス感染における防御免疫応答とその破綻	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本医真菌学会雑誌	6. 最初と最後の頁 47-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11534/ishinkin.22.005	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, Matsumoto I, Suzuki K, Tamura A, Shiraiishi A, Kiyonari H, Kasamatsu J, Yamamoto H, Miyasaka T, Tanno D, Miyahara A, Zong T, Kagesawa T, Oniyama A, Kawamura K, Kitai Y, Umeki A, Kanno E, Tanno H, Ishii K, Tsukita S, Kawakami K	4. 巻 11
2. 論文標題 Deficiency of lung-specific claudin-18 leads to aggravated infection with Cryptococcus neoformans through dysregulation of the microenvironment in lungs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-00708-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kitai Y, Sato K, Tanno D, Yuan X, Umeki A, Kasamatsu J, Kanno E, Tanno H, Hara H, Yamasaki S, Saijo S, Iwakura Y, Ishii K, Kawakami K	4. 巻 89
2. 論文標題 Role of Dectin-2 in the phagocytosis of Cryptococcus neoformans by dendritic cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e0033021
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/IAI.00330-21	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 Miyahara A, Umeki A, Sato K, Nomura T, Yamamoto H, Miyasaka T, Tanno D, Matsumoto I, Zong T, Kagesawa T, Oniyama A, Kawamura K, Yuan X, Yokoyama R, Kitai Y, Kanno E, Tanno H, Hara H, Yamasaki S, Saijo S, Iwakura Y, Ishii K, Kawakami K	4. 巻 93
2. 論文標題 Innate phase production of IFN- by memory and effector T cells expressing early activation marker CD69 during infection with Cryptococcus deneoformans in the lungs	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e0002424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/iai.00024-24	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5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川上和義
2. 発表標題 潜在性感染からの内因性再燃機序：クリプトコックス感染モデルを用いた解析
3. 学会等名 第95回日本感染症学会総会・学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sato K, Kawakami K
2. 発表標題 Host immune response to fungal infection
3. 学会等名 第65回日本医真菌学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 篠宮岳志, 梅木彩, 野末彩文, 佐藤光, 笠松純, 石井恵子, 川上和義
2. 発表標題 Poly(I:C)をアジュバントとしたクリプトコックス酸化鉄ナノ粒子ワクチンによるTh1型抗体産生の誘導
3. 学会等名 第95回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Michiko Yoshida, Nana Nakahata, Takeshi Shinomiya, Hayato Sato, Ko Sato, Jun Kasamatsu, Emi Kanno, Hiromasa Tanno, Keiko Ishii, Kazuyoshi Kawakami
2. 発表標題 Immunological mechanism for reactivated cryptococcosis in persistently infected mice after treatment with FTY720
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田美智子, 中畑那奈, 篠宮岳志, 佐藤隼人, 佐藤 光, 菅野恵美, 丹野寛大, 石井恵子, 川上和義
2. 発表標題 クリプトコックス潜伏感染モデルにおけるFingolimod (FTY720) 投与による内因性再燃の免疫機序の解明
3. 学会等名 第97回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Ko Sato, Kazuyoshi Kawakami	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer-Verlag New York Inc.	5. 総ページ数 -
3. 書名 Mouse model of latent cryptococcal infection and reactivation. In: Anti-Fungal Immunity, Methods in Molecular Biology (Ed. Drummond, R.)	

1. 著者名 Man Shun Fu, Kazuyoshi Kawakami K, Rebecca Drummond	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer-Verlag New York Inc.	5. 総ページ数 -
3. 書名 Adoptive transfer of Cryptococcus neoformans-specific CD4 T-cells to study anti-fungal lymphocyte responses in vivo. In: Anti-Fungal Immunity, Methods in Molecular Biology (Ed. Drummond, R.)	

〔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
---------	---------