

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16314

研究課題名(和文) 糖尿病によるクリプトコックス感染悪化の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) The effects of diabetes 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) 3,600,000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臨床上特に問題となる糖尿病による易感染性のメカニズムについては不明な点が多い。

本研究では、糖尿病が本真菌の感染防御に与える影響についてマウスモデルを用いて解析した。糖尿病では、樹状細胞の機能は変化しておらず、クリプトコックス特異的Th1応答の低下及びTreg細胞の増加、マクロファージの活性化抑制、T細胞のexhaustionの増加によって、感染を増悪させている可能性が示唆された。また、これらの変化の一部はGSHの添加により改善がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、基礎疾患を有する患者における易感染性については世界的に重要な問題である。本研究により、糖尿病ではクリプトコックス特異的なTh1応答の低下とTreg細胞の増加を引き起こし、感染を増悪させていることが明らかとなり、その原因の一端にGSHの変化を含む糖の代謝異常が直接免疫応答を変化させている可能性が示唆された。これらの研究成果は今後、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 airborne route and causes life-threatening meningoencephalitis in immunocompromised hosts. The detailed mechanism of susceptibility to diabetes mellitus (DM), which is a clinically significant risk factor for this infection, is not well known.

In this study, we analyzed the effects of DM on host defense against cryptococcal infection using an appropriate mouse model. In DM mice, the functions of dendritic cell were not changed. On the other hand, DM mice showed decreased Cryptococcus-specific Th1 responses, increased Treg cells, suppressed macrophage activation, and increased T cell exhaustion. These may exacerbate the infection by DM. Moreover, some of these changes were ameliorated by the addition of GSH.

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 感染免疫 T細胞

## 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

クリプトコックスは莢膜を持つ酵母型真菌であり、経気道的に感染することで肺クリプトコックス症を引き起こし、さらに中枢神経系に播種することで重篤な脳髄膜炎を引き起こす。本邦における疫学調査では、**HIV** 非感染クリプトコックス症発症者のうち半数以上が何らかの基礎疾患を有しており、その中でも糖尿病 (**DM**) が最も多く (**32.1%**)、死亡率も高い。

### (2) クリプトコックス症と感染制御

本真菌の感染防御には **Th1** 型の免疫応答が重要である。自然免疫細胞から産生される **IL-12** 等の作用によって、本真菌特異的 **Th1** 応答が誘導されると、感染局所で **IFN- $\gamma$**  が産生され、殺菌に重要な一酸化窒素 (**NO**) を産生する **M1** マクロファージ (**M $\phi$** ) の誘導や肉芽腫の形成が促進される。

### (3) 糖尿病によるクリプトコックス感染の悪化機序

臨床上特に問題となる **DM** は、宿主の免疫不全状態が感染悪化の原因と考えられているが、**DM** が直接的に免疫応答に与える影響は不明な点が多い。急性期の **DM** では還元型グルタチオン (**GSH**) を高発現する **M1M $\phi$**  が増加し、対照的に慢性期では **GSH** 発現低下と **M2M $\phi$**  の誘導が起こることが報告されている。本真菌の **T** 細胞抗原 (キチンデアセチラーゼ **2 (Cda2)**) を認識する **T** 細胞受容体を高発現したトランスジェニックマウス (**CnT-II**) にストレプトゾトシン (**STZ**) を投与することで作成した **DM** マウスの脾細胞や、高グルコース (**HG**) 環境下で培養したマウスマクロファージ (**RAW264.7**) 細胞株を用いた、申請者らの *in vitro* の解析では、急性期では **Th1** 型の免疫応答が亢進するのに対し、慢性期では低下することが明らかとなった。以上より、**HG** 刺激によって急性期と慢性期で本真菌に対する免疫応答が異なり、そこには **GSH** が関与する可能性が示唆される。

**DM** では間質液の **pH** が低下することが知られている。申請者らの解析では、気道上皮細胞間の結合に重要な **Claudin-18** が欠損することで肺腔内の **pH** が低下すること、低 **pH** では本真菌の増殖能が亢進することを明らかにしている。**DM** によって **Claudin-18** の **DNA** メチル化が亢進することも報告されており、**DM** では感染局所の **pH** 低下により本真菌の増殖能が亢進し、そこには **Claudin-18** の発現低下が関与する可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、**GSH** と本真菌特異的 **Th1** 免疫応答、**Claudin-18** 発現と感染局所の **pH** の変化に注目し、**DM** によるクリプトコックス感染悪化の分子メカニズムについて、以下の点について明らかにする。

- (1) **HG** 環境が免疫応答に与える影響を *in vitro* 解析を通して、**M $\phi$**  の活性化に与える影響について明らかにする。
- (2) **STZ** 投与による **DM** マウスモデルを用いて、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 **RAW264.7** 細胞

### (1) **HG** 環境が **M $\phi$** の活性化に与える影響

**25mM** のグルコースを含む **HG** 環境で **RAW264.7** 細胞を培養後、**Cap67** の lysate とともに **IFN- $\gamma$** 、**GSH** 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。同様に培養した細胞を **IFN- $\gamma$**  及び **LPS** で **24** 時間刺激し活性化させた後、クリプトコックス **H99** 菌体、**IFN- $\gamma$** 、**GSH** とともに **24** 時間培養し、菌の殺菌能の解析を行った。さらに **GSH** 添加による影響の解析も行った。

### (2) **DM** 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** マウスの脾臓より脾細胞を採取し、**Cda2**、**GSH** で **48** 時間刺激し、培養上清中の **IFN- $\gamma$**  を測定した。同様に、脾細胞より **CD11c<sup>+</sup>** 樹状細胞と **CD4<sup>+</sup>T** 細胞を **MACS** を用いて単離し、**CD4<sup>+</sup>T** 細胞を **CFSE** で染色後、同様に刺激し、細胞の分裂能及び培養上清中の **IFN- $\gamma$**  を測定した。また、**Th1** 細胞と制御性 **T (Regulatory T: Treg)** 細胞の割合についてフローサイトメトリーで解析した。脾細胞より **CD4<sup>+</sup>T** 細胞を **Th1** 分化条

件で培養し、培養後の IFN- $\gamma$ 、IL-12 受容体 (IL-12R)  $\beta$ 2、T-bet の発現、exhaustion maker 発現について解析した。

### (3) DM 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 マウスに、クリプトコックス H99 株を感染させ、感染 2 週後の肺における生菌数の解析、肺ホモジネート上清中の IFN- $\gamma$ 、肺病理解析を行った。また、BALF を採取し、肺腔内 pH の測定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) HG 環境が M $\phi$ の活性化に与える影響

Raw264.7 細胞を HG 培地で 2 週間培養した細胞では、Control と比較して、HG で培養した細胞で有意に高い NO 産生能を示した。一方で、2 ヶ月間培養した細胞では、Control と比較して NO 産生能が有意に低下した。HG で長期培養した Raw264.7 細胞で低下した NO 産生能および iNOS mRNA 発現は、GSH の添加によって有意に増加した。次に、HG による Raw264.7 細胞の NO 産生低下が、クリプトコックスの殺菌能に関連するか検討した結果、HG で培養した細胞では Control と比較して生菌数は有意に増加した。また、GSH の添加は HG で培養した細胞の NO 産生低下を回復させたが、クリプトコックスの殺菌能を十分に回復するには至らなかった。

### (2) DM 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 マウスでは末梢血中の GSH の濃度が低下した。このマウスの脾細胞を Cda2、GSH で刺激した結果、DM マウスでは Control と比較して IFN- $\gamma$  産生が有意に低下し、この低下は GSH の添加により回復した。DM マウスの脾細胞から樹状細胞と CD4<sup>+</sup>T 細胞を単離し、同様に刺激した結果、樹状細胞ではなく、CD4<sup>+</sup>T 細胞の機能が低下していた。CD4<sup>+</sup>T 細胞の分裂能は DM と Control とで差はみられなかった。脾細胞を刺激後の CD4<sup>+</sup>T 細胞をフローサイトメトリーで解析した結果、DM マウスでは Control と比較して、Th1 細胞が低下し Treg 細胞が増加した。CD4<sup>+</sup>T 細胞のみを刺激し Th1 に分化させた結果、Th1 分化能及び IL-12R 発現には DM マウスと Control とで差はみられなかったが、exhaustion maker の 1 つである PD-1 が DM マウスで有意に発現が増加した。

### (3) DM がクリプトコックスの排除に与える影響

DM マウスにクリプトコックス H99 株を感染させた結果、肺における生菌数の増加と IFN- $\gamma$  産生の低下を認めた。さらに病理学的解析では、DM マウスにおいて Control と比較して、マクロファージや CD4<sup>+</sup>T 細胞の集積の低下に伴う、肉芽腫の形成不良がみられた。BALF の pH は両群間で有意差はなく、DM マウスでの感染悪化への Claudin の関与は否定できてあった。

以上の結果より、DM ではクリプトコックス特異的な Th1 型免疫応答が低下し、クリプトコックス感染が増悪することが示された。Th1 型免疫応答の低下には Th1 細胞自体の低下だけでなく Treg 細胞の増加が関与していた。また DM マウスでは Th1 分化能が低下していなかったが、PD-1 の発現増加を認めたことより、T 細胞の exhaustion による免疫応答の低下が、感染悪化に寄与している可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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<br>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<br>89             |
| 2. 論文標題<br>Role of Dectin-2 in the Phagocytosis of Cryptococcus neoformans by Dendritic Cells  | 5. 発行年<br>2021年        |
| 3. 雑誌名<br>Infection and Immunity   | 6. 最初と最後の頁<br>e0033021 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1128/IAI.00330-21  | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>-              |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Sato K, Matsumoto I, Suzuki K, Tamura A, Shiraishi 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<br>11          |
| 2. 論文標題<br>Deficiency of lung-specific claudin-18 leads to aggravated infection with Cryptococcus deneoformans through dysregulation of the microenvironment in lungs  | 5. 発行年<br>2021年     |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>21110 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41598-021-00708-6  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Sato K, Kawakami K.                                       | 4. 巻<br>63              |
| 2. 論文標題<br>PAMPs and Host Immune Response in Cryptococcal Infection | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Medical Mycology Journal                                  | 6. 最初と最後の頁<br>133 ~ 138 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3314/mmj.22.005                       | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔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<br>佐藤光, 笠松純, 篠宮岳志, 山本秀輝, 石井恵子, 川上和義 |
| 2. 発表標題<br>クリプトコックス感染防御におけるClaudin欠損の影響     |
| 3. 学会等名<br>第95回日本感染症学会学術講演会・第69回日本化学療法学会総会  |
| 4. 発表年<br>2021年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>篠宮 岳志, 梅木 彩, 佐藤 光, 笠松 純, 石井 恵子, 川上 和義                  |
| 2. 発表標題<br>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<br>第95回日本感染症学会学術講演会・第69回日本化学療法学会総会                        |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|                                    |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>佐藤光                     |
| 2. 発表標題<br>クリプトコックス感染防御における免疫応答の解析 |
| 3. 学会等名<br>第32回日本生体防御学会総会（招待講演）    |
| 4. 発表年<br>2021年                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ko Sato, Kazuyoshi Kawakami              |
| 2. 発表標題<br>Host immune response to fungal infection |
| 3. 学会等名<br>第65回日本医真菌学会総会学術集会・真菌症フォーラム2021（招待講演）     |
| 4. 発表年<br>2021年                                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>篠宮 岳志, 佐藤 光, 笠松 純, 石井 恵子, 川上 和義                                  |
| 2. 発表標題<br>Cda2酸化鉄ナノ粒子ワクチンによる気道粘膜免疫の活性化とアジュバントによるTh1免疫応答の誘導：真菌ワクチンの開発へ向けた検討 |
| 3. 学会等名<br>第5回東北医真菌研究会  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

〔図書〕 計1件

|                               |                 |
|-------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>Sato K, Kawakami K. | 4. 発行年<br>2023年 |
| 2. 出版社<br>Humana Press        | 5. 総ページ数<br>226 |
| 3. 書名<br>Antifungal Immunity  |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-------|-------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 川上 和義<br>(Kawakami Kazuyoshi) |                       |    |
| 研究協力者 | 笠松 純<br>(Kasamatsu Jun)       |                       |    |
| 研究協力者 | 菅野 恵美<br>(Kanno Emi)          |                       |    |
| 研究協力者 | 丹野 寛大<br>(Tanno Hiromasa)     |                       |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|