

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390263

研究課題名(和文) マウスモデルを用いたエイズ合併クリプトコックス症の内因性再燃発症に関する研究

研究課題名(英文) Study on the reactivation-induced development of AIDS-related cryptococcosis using a mouse model

研究代表者

川上 和義 (KAWAKAMI, Kazuyoshi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10253973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円、(間接経費) 3,870,000円

研究成果の概要(和文)：クリプトコックスはエイズの重要な日和見病原真菌であり、重篤な髄膜脳炎を引き起こす。近年、クリプトコックス症は免疫低下による内因性再燃として発症すると考えられており、その病態解明のために、マウスの潜伏感染モデルを用いてメモリーT(T<sub>m</sub>)細胞の動態を解析した。さらに、本真菌の主要なT細胞抗原に特異的なT細胞受容体を発現したトランスジェニック(T<sub>g</sub>)マウスの作製を試み世界に先駆けて成功した。このマウスでは、クリプトコックス感染後顕著なIFN- $\gamma$ 産生がみられ、真菌排除が促進した。このマウスを用いることで、感染後のT<sub>m</sub>細胞の動態及び内因性再燃時のT<sub>m</sub>細胞への影響をより正確に解析することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Cryptococcus neoformans is an important opportunistic fungal pathogen, which cause s severe meningoencephalitis in AIDS patients. Recently, it has been thought that cryptococcosis develops by reactivation of persistently infected pathogen under an immunocompromised condition. In this study, we examined the kinetics of memory T (T<sub>m</sub>) cells in the infected lungs using a mouse model with persistent infection with C. neoformans. In addition, we succeeded in establishing a novel transgenic mouse expressing T cell receptor which recognizes MP98, a major T cell antigen of this fungal pathogen. In this mouse, both IFN-gamma synthesis and clearance of C. neoformans were strikingly accelerated in the lungs after infection. This makes it possible to more accurately examine the kinetics of T<sub>m</sub> cells and the effect on the T<sub>m</sub> cell response during reactivation of persistently infected C. neoformans.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：クリプトコックス 内因性再燃 エイズ 免疫記憶 メモリーT細胞 自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

クリプトコックス髄膜炎は、エイズに合併する日和見真菌感染症である。合併頻度は、ニューモシスチス肺炎などに比べると少なく、わが国では2.9%程度と報告されている(厚生労働省科学研究費補助金エイズ対策研究事業平成15年度報告書)。しかし、一度発症すると極めて予後が悪く、世界のエイズ患者における死亡原因では、結核に次いで第2位と報告されている(Clin. Infect. Dis. 28: 82-92, 1999; AIDS 16: 1031-1038, 2002)。

クリプトコックス症の原因真菌 *Cryptococcus neoformans* は、鳩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感染する。これまでは、感染後一定の潜伏期間を経た後発症すると考えられてきたが、近年では、結核と同様に、不顕性感染後に潜伏感染し、免疫不全に伴って内因性再燃することを示すエビデンスが報告されつつある(Clin. Vacc. Immunol. 14: 1550, 2007; Pediatrics 107: e66, 2001; J. Clin. Microbiol. 37: 3204, 1999; J. Med. Vet. Mycol. 30: 395, 1992)。これに一致して、本真菌はマクロファージの殺菌作用に対するエスケープ機構を有し、細胞内寄生しうることが報告されている(Trends Microbiol. 9: 273-278, 2001)。このように、本症は内因性再燃によって発症するとの認識に変わりつつあり(Semin. Respir. Crit. Care Med. 25: 145-157, 2004)、エイズ合併クリプトコックス症の発症機序を見直す必要が出てきた。

しかし、この新たな発症様式については、全く病態解明がなされておらず、適切な動物モデルを用いた基礎研究が必須である。特に、持続感染には宿主の免疫記憶(メモリー免疫応答)が密接に関連することから(Nat. Immunol. 6: 873-879, 2005)、この観点からのアプローチは重要な研究課題であった。これまで、国内外を含めて、クリプトコックス症の持続感染モデルは、Casadevallらのラットを用いたモデルが報告されているが(Infect. Immun. 68: 832-838, 2000)、免疫記憶との関連については全く解析されていない。さらに、免疫不全状態下でのクリプトコックスに対する免疫記憶応答の研究はほとんどないのが現状であった。

## 2. 研究の目的

我々は、マウスを用いたクリプトコックス持続感染モデルの作製に成功しており、本研究では、このモデルを用いることで、クリプトコックスの潜伏感染におけるメモリーT細胞応答の誘導・維持機構を明らかにするとともに、免疫不全によるクリプトコックスの内因性再燃とその免疫機序を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

1) 潜伏感染モデルを用いた免疫記憶機構の解析

C57BL/6 マウスの気管内に *C. neoformans* B3501 株 ( $1 \times 10^6$ /マウス) を摂取し感染モデルを作製した。このマウスは、感染後経時的に肺内生菌数が減少するものの、3~6か月後においても約  $10^2$  CFU の真菌が検出されることから、本研究ではクリプトコックス潜伏感染モデルとして用いた。このモデルにおいて、肺ホモジネートから比重遠心法により採取したリンパ球を抗 CD4、CD8、CD44、CD127、CD62L、CD69、CD103 抗体で染色後、フローサイトメトリーを用いて解析した。CD44<sup>bright</sup>CD127<sup>-</sup>細胞をエフェクターT (Teff) 細胞、CD44<sup>bright</sup>CD127<sup>+</sup>細胞をメモリーT (Tm) 細胞、CD62L<sup>-</sup>細胞をエフェクターTm (Tem) 細胞、CD62L<sup>+</sup>細胞をセントラル Tm (Tcm) 細胞とした。さらに、CD69<sup>+</sup>、CD103<sup>+</sup> Tm 細胞を、近年注目されつつある tissue-resident Tm (Trm) 細胞として解析した。これらの Tm 細胞の機能について検討するために、細胞内の IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17A を染色し、フローサイトメトリーで解析を行った。一部の実験では、多糖の認識に重要な C タイプレクチン (CLRs) 受容体を介したシグナル伝達で下流分子として機能する CARD9 を欠損した (CARD9KO) マウスを用いた。

2) 内因性再燃モデルの作製と免疫記憶応答の解析

上記のクリプトコックス潜伏感染マウスに、感染 6~7 か月後にデキサメサゾン腹腔内に1週間連日投与することで免疫不全状態を導入した。このマウスでは、コントロールとして生食を投与したマウスと比べ、新たにクリプトコックスを感染していないにも関わらず肺内生菌数が約 100~1000 倍程度増加したことから、内因性再燃モデルとして用い免疫記憶応答について解析を行った。

3) クリプトコックス特異的 T 細胞受容体遺伝子を発現するトランスジェニックマウスの作製

これまでの解析は、C57BL/6 マウスを用い、表面抗原解析のみで Tm 細胞の同定を行っていることから、必ずしもクリプトコックス抗原特異的な Tm 細胞を検出していない。そこで、クリプトコックス特異的な Tm 細胞の解析を行うために、本真菌の主要な T 細胞抗原であるマンノプロテイン (MP98) に特異的に応答する T 細胞ハイブリドーマ P1D6 から T 細胞受容体 鎖、鎖遺伝子のクローニングを試み成功した。MP98 を認識する P1D6 の TCR 鎖の構成は V 17-D 50-C、鎖は V 1-D 2-J 2-7-C 2であった。これらの TCR 鎖および鎖の発現ベクターを BDF1 マウスの受精卵に導入し、導入遺伝子を有するトランスジェニックマウス (CnT-II) を得ることができた。

## 4. 研究成果

1) 潜伏感染モデルにおける免疫記憶応答

クリプトコックス感染1ヶ月後までの肺内では、Teff細胞とともに、Tm細胞が検出された。そのほとんどはTem細胞であり、Th1のみならずTh2、Th17細胞機能を有することが明らかになった。傍気管リンパ節では、感染7日後でCD4<sup>+</sup>Tm細胞数がピークとなり、CD8<sup>+</sup>Tm細胞は感染5日後で減少し、7日後で回復した。

また、肺内におけるIFN- $\gamma$ CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>Tm細胞数は、潜伏感染期の3ヶ月、7ヶ月後も安定して存在していた。傍気管リンパ節は潜伏感染期へと向かうにつれて縮小し肉眼的に観察できなくなるため、同じ二次リンパ組織である脾臓でのTm細胞を解析した。脾臓におけるCD4<sup>+</sup>Tm細胞、CD8<sup>+</sup>Tm細胞内IFN- $\gamma$ 発現も大きな変動はなく安定して存在していた。

一方、クリプトコックス感染3日後という獲得免疫が成立するはずのない超早期においても肺内でIFN- $\gamma$ を発現するTm細胞が顕著に増加した。我々は、この自然免疫の時期に増加するTm細胞をmemory-phenotype T (MPT)細胞と呼びその動態について解析した。このMPT細胞は、CARD9KOマウスにおいて、クリプトコックス感染後の肺内集積が有意に低下していた。さらに、CARD9KOマウスでは、肺内でのCCL3、4、5のようなケモカイン産生が低下していたことから、本真菌の何らかの多糖成分がCLR受容体によって認識され、IFN- $\gamma$ を発現するMPT細胞が速やかに肺内に集積することで、早期の感染防御において重要な役割を担う可能性が考えられた。さらに、MPT細胞の一部のポピュレーションではCD69やCD103を発現しており、近年注目されているT<sub>rm</sub>細胞である可能性が明らかとなった。

## 2) 免疫不全にともなう内因性再燃と免疫記憶機構への影響

クリプトコックス感染後の肺内生菌数は、Day0で10<sup>6</sup>CFU、1週後で10<sup>5</sup>CFU、1ヶ月後で10<sup>4</sup>CFUと減少し、3ヶ月、7ヶ月では10<sup>2</sup>CFU程度で維持された。3ヶ月後の病理学的解析では、肺内に潜伏するPAS陽性の酵母細胞が観察された。さらに、7ヶ月の時点でデキサメサゾン投与を1週間投与し免疫不全状態にすると、コントロール群と比較して肺内生菌数が約100~1000倍程度増加し内因性再燃することを確認した。

一方、Tm細胞が安定的に存在する感染7ヶ月のマウスにデキサメサゾン投与したところ、肺内でのCD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>Tm細胞は両群間では有意な差は認められなかったが、脾臓におけるTm細胞はコントロール群と比較してデキサメサゾン投与群で顕著に減少することが明らかになった。このことから、免疫不全時には2次リンパ組織からのTm細胞の供給が減少することにより内因性再燃する可能性が示唆された。

## 3) クリプトコックス特異的T細胞受容体遺伝子を発現するトランスジェニックマウスの作製とメモリーT細胞の解析

CnT-IIマウスの脾臓ではMP98特異的TCR / のmRNAの発現が認められた。この脾細胞をMP98で刺激すると細胞増殖およびIL-2、IFN- $\gamma$ 産生が認められたが、遺伝子を導入していないコントロールマウスの脾細胞ではこれらの反応は認められなかった。このことから、このマウスは機能的にもMP98を特異的に認識するT細胞受容体を発現していることが明らかとなった。

このマウスの肺内にクリプトコックスを感染させると、コントロールマウスと比べ肺内でのIFN- $\gamma$ 産生及び真菌排除の明らかな亢進が観察された。感染後のTm細胞の解析では、感染前の肺内T細胞のほとんどがナイーブT細胞であったのに対して、感染3日後にはこれまでの解析と同様に顕著なIFN- $\gamma$  Tm細胞の増加が観察され、さらにその多くがT<sub>rm</sub>細胞であることが確認された。一方、感染7~14日後にはT<sub>rm</sub>細胞が減少し、代わりにCD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>Tm細胞が増加したことから、獲得免疫の時相で抗原特異的なTm細胞の出現を観察できたものと思われた。今後は、このマウスを用いることで、クリプトコックス感染後のTm細胞の動態についてより抗原特異的な解析を行い、内因性再燃の際にTm細胞がどのような影響を受けるのか詳細に検討していく予定にしている。

## 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 6件)

1. Yamamoto H, Nakamura Y, Sato K, Takahashi Y, Nomura T, Miyasaka T, Ishii K, Hara H, Yamamoto N, Kanno E, Iwakura Y, Kawakami K: Defect of CARD9 leads to impaired accumulation of IFN- $\gamma$ -producing memory-phenotype T cells in lungs and increased susceptibility to pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*, Infect. Immun. 82: 1606-1615, 2014. doi: 10.1128/IAI.01089-13. (査読有り)

2. 川上和義: クリプトコックス症の診断と治療, 深在性真菌症を学ぶ, 臨床検査 58: 90-96, 2014. URL: <https://www.igaku-shoin.co.jp/journalDetail.do?journal=35841>. (査読無し)

3. 石井恵子, 川上和義: 真菌感染における自然免疫活性化の分子機構, 化学と生物 (日本農芸化学会) 52, 83-89, 2014. URL: [http://www.jsbba.or.jp/pub/journal\\_kasei/kasei\\_contents/vol52\\_2\\_2014.html](http://www.jsbba.or.jp/pub/journal_kasei/kasei_contents/vol52_2_2014.html). (査読無し)

4. 石井恵子, 川上和義: 真菌に対する免疫学的防御機構, 臨床免疫・アレルギー科, 60: 411-418, 2013. URL: <http://www.kahyo.com/>

item/M201310-604。(査読無し)

5. 石井恵子, 川上和義: *Cryptococcus neoformans* 感染におけるパターン認識と感染防御, 日本医真菌学会雑誌, 53: 247-254, 2012. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/mmj/53/4/53\\_247/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/mmj/53/4/53_247/_article) (査読有り)

6. Tanaka M, Ishii K, Nakamura Y, Miyazato A, Maki A, Abe Y, Miyasaka T, Yamamoto H, Akahori Y, Fue M, Takahashi Y, Kanno E, Maruyama R, Kawakami K: TLR9-dependent activation of bone marrow-derived dendritic cells by URA5 DNA from *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 80: 778-786, 2012. doi: 10.1128/IAI.05570-11. (査読有り)

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Matsumura K, Ishii K, Miyamura N, Nakamura Y, Tamura T, Kawakami K: Generation of transgenic mice expressing TCR specific for mannoprotein from *Cryptococcus neoformans*. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2013 年 12 月 11 日 ~ 13 日.

2. Yamamoto H, Nakamura Y, Sato K, Matsumura K, Ishii K, Hara H, Kawakami K: CARD9-mediated innate IFN- production and host defense to cryptococcal infection: involvement of memory-phenotype T cells, 第 42 回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2013 年 12 月 11 日 ~ 13 日.

3. Kawakami K: C-type lectin receptors and memory T cell response in cryptococcal infection. Gordon Research Conference. Galveston, TX, USA, January 13-18, 2013.

4. Nakamura Y, Sato K, Yamamoto H, Ishii K, Kawakami K: Memory T cells response after infection with *Cryptococcus neoformans* in mice. 第 41 回日本免疫学会学術集会, 神戸, 2012 年 12 月 5 日 ~ 7 日.

5. Yamamoto H, Nakamura Y, Sato K, Matsumura K, Yamamoto N, Ishii K, Hara H, Kawakami K: Role of Card9-mediated signaling in innate-phase IFN- production and Th17 differentiation in the host defense to cryptococcal infection. 第 41 回日本免疫学会学術集会, 神戸, 2012 年 12 月 5 日 ~ 7 日.

6. Matsumura K, Yamamoto H, Nakamura Y, Sato K, Ishii K, Saijo S, Iwakura Y, Kawakami K: Effect of Dectin-2 deficiency on the host inflammatory response during infection with *Cryptococcus neoformans*. 第 41 回日本免疫学会学術集会, 神戸, 2012 年 12 月 5 日 ~ 7 日.

7. 佐藤 光, 山本秀輝, 中村優里, 石井恵子, 松村香菜, 館 正弘, 原 博満, 川上和義: CARD9 欠損によるクリプトコックス感染の増悪機序. 第 23 回日本生体防御学会学

術総会, 東京, 2012 年 7 月 9 日 ~ 11 日.

8. Yamamoto H, Nakamura Y, Takahashi Y, Sato K, Yamamoto N, Ishii K, Hara H, Kawakami K: Signaling via an adapter molecule CARD9 is essential for the host defense to infection with *Cryptococcus neoformans*. 99<sup>th</sup> Annual Meeting, American Association of Immunologists, Boston, MA, USA, May 4-8, 2012.

9. Yamamoto H, Yamamoto N, Nakamura Y, Ishii K, Hara H, Yamasaki S, Kawakami K: Indispensable role for an adaptor molecule, CARD9 in the host defense against infection with *Cryptococcus neoformans*. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2011 年 11 月 27 日 ~ 29 日.

〔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:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等  
特記なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 和義 (KAWAKAMI KAZUYOSHI)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 10253973

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

石井 恵子 (ISHII KEIKO)  
東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 00291253