

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：82713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860774

研究課題名(和文) C. gattii感染症における高病原性機序の解明と臨床応用への基盤形成

研究課題名(英文) Systemic studies of murine pulmonary cryptococcosis: Candidate virulence factors against cryptococci

研究代表者

大久保 陽一郎 (Okubo, Yoichiro)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・医長

研究者番号：40516267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：世界的感染拡大を契機にCryptococcus gattii (C. gattii) 感染症が注目されているが、本感染症に関する知見は乏しく、本研究ではC. gattii感染症の病原機構解明ならびに臨床応用への基盤形成を目的とした。

各種解析の結果、高病原性C. gattii株接種マウス肺では生体防御反応がほとんど惹起されておらずIFN やCD4陽性リンパ球の関与も限定的であるが、樹状細胞ワクチンで一定の治療効果が得られることが判明した。さらに、DNAマイクロアレイ法により、病原性に関与し得る遺伝子も抽出し得た。得られた成果は本感染症の病原機構解明ならびに臨床応用への基盤形成に貢献し得る。

研究成果の概要(英文)：Cryptococcus gattii R265, which was responsible for the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island, can cause life-threatening infectious diseases. However, putative mechanisms of its high virulence remain unclear. To elucidate factors affecting high virulence of this yeast, we conducted the systemic examinations using the lungs of the mice infected with C. gattii R265 and 5815 and C. neoformans H99. In addition, microarray assay with gene ontology analysis was also carried out.

Results showed that C. gattii R265 can easily proliferate in alveoli due to the poor cryptococcal yeast-cell recognition by macrophages and/or other antigen-presenting cells. Furthermore, microarray data suggested C. gattii R265 may have high adherence ability to the alveolar epithelium.

In conclusion, our investigations revealed that C. gattii R265 induces less macrophage response and severe structural alteration of the lungs. These characteristics may be candidates for virulence factor of this yeast.

研究分野：病理学

キーワード：Cryptococcus gattii Cryptococcus neoformans DNAマイクロアレイ 肉芽腫 Pgc1 樹状細胞ワクチン CD4

### 1. 研究開始当初の背景

クリプトコックス属菌は本邦に常在する病原性真菌であるが、北米大陸でのアウトブレイクを契機に *Cryptococcus gattii* (*C. gattii*)が注目されていた。

*C. gattii* は健康者でも高病原性を示す等、従来の *C. neoformans* とは異なる臨床的特徴を示す上、渡航歴のない日本人の感染例も報告され、世界的な感染拡大も危惧されていた。

### 2. 研究の目的

高病原性 *C. gattii* の感染機序には不明な点が多い。本研究の目的は、クリプトコックス症感染モデルマウスの解析を基盤とした、(1) *C. gattii* の病原因子解明、(2) 臨床応用への基盤形成である

### 3. 研究の方法

研究基盤となるクリプトコックス症感染モデルマウスは国立感染症研究所にて作製したが、具体的には *C. neoformans* H99 株、*C. gattii* 5815 株ならびに R265 株等を用いて、菌液 50  $\mu$  l (5.0  $\times$  10<sup>3</sup> CFU/mouse に調整) を C57BL/6、9 週令、雄マウスへ経気管的に接種することで作製した。尚、*C. gattii* R265 株はアウトブレイク株であり、いわゆる病原性 *C. gattii* である。

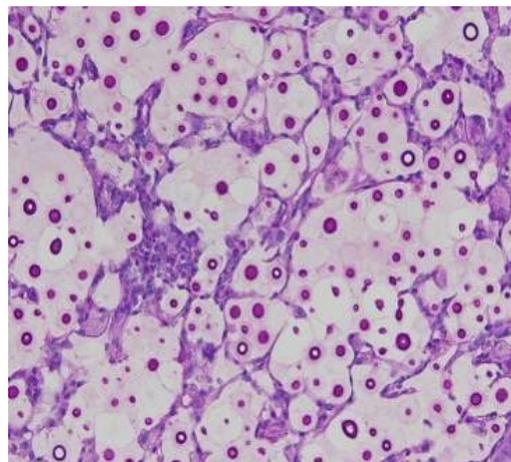
次いで、国立感染症研究所にて、マウス骨髄細胞を GM-CSF (顆粒球単球コロニー刺激因子) 存在下で 6 日間培養して得られた非接着細胞を樹状細胞とし、この樹状細胞に *C. gattii* の荚膜欠損株の死菌を抗原として貪食させることで樹状細胞 (DC) ワクチンとした。DC ワクチンは菌体接種 14 日前と接種前日に尾静脈から投与し、研究代表者は DC ワクチン投与マウスに対する、組織学的解析を行った。免疫機構の観点からは、CD4 陽性リンパ球欠損状態のマウスを活用し、*C. gattii* に対する CD4 陽性リンパ球の感染制御効果を組織学的な観点から解析した。

さらに、*C. gattii* の病原因子解明を目的として、網羅的な遺伝子情報解析を施行した。具体的には、RNA later 溶液へ感染肺組織を一晩浸漬し RNA 情報を保護した後に、TRIZOL 試薬に浸漬かつ液体窒素で凍結し、Affymetrix® 社製 GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array® にて DNA マイクロアレイ法を施行し、高病原性 *C. gattii* 接種群で大きく発現変動している遺伝子を抽出した。

### 4. 研究成果

組織学的には *C. neoformans* H99 株接種マウス肺では剖面において多発性の結節性病変がみられ、同部で多数の肉芽腫が認められた。一方、*C. gattii* 5815 株ならびに R265 株接種マウス肺では結節性病変が不明瞭あるいは形成されず、菌体が広範囲に分布し、肺胞腔は不規則な大小不同を呈していたが、肉芽腫は少数かつ小型であった (図 1)。すなわち、*C. gattii* 株接種マウス肺では本来

図 1. *C. gattii* 接種マウス肺の組織像 (PAS 染色、400 倍) : 菌体はびまん性分布を示し、肺胞空は不規則な大小不同を示しているが、肉芽腫形成は認められない。



の生体防御反応がほとんど惹起されておらず、結果的に肺の構築改変が著しくなることが組織学的に証明された。

また、CD4 陽性リンパ球欠損状態のマウスを用いた解析では、*C. neoformans* H99 株接種マウス肺では CD4 陽性リンパ球が維持されていれば肉芽腫が形成され病変も限局されるのに対して、CD4 陽性細胞が欠損した状態では肉芽腫が形成難しく、肺病変自体も広範囲に分布した。一方、高病原性 *C. gattii* 接種マウス肺では CD4 陽性リンパ球が維持されていようがいが、肉芽腫の形成がほとんど確認できず、菌体がびまん性に分布していた。これらの事実より、*C. gattii* は通常のクリプトコックス症防御機構で重要な役割を担っている CD4 陽性リンパ球活性や INF  $\gamma$  を含む各種サイトカイン応答を誘導させにくくする特徴を有しているものと推測された。

一方、DC ワクチン投与群の肺では、高病原性 *C. gattii* 接種マウス肺であっても肉芽腫が多数集積し菌体を貪食しており、肺の構築改変も抑制された。すなわち、DC ワクチンで各種サイトカイン応答を増強すれば、高病原性 *C. gattii* 感染後の肉芽腫形成を誘導することが可能となり、菌体の増殖を抑制し得ることが判明した。

加えて、DNA マイクロアレイ法では *C. gattii* R265 株接種マウス肺のみで Log2 変換後に 2 倍以上の発現亢進を示す 281 遺伝子を解明した (図 2)。この 281 遺伝子の中では Pgl1 が最も発現亢進しており (図 3)、当該遺伝子が高病原性 *C. gattii* の病原機構に関与している可能性が示唆された。

以上、*C. gattii* は生体防御反応を誘導させにくい特徴を有しているが、ワクチン接種等、各種サイトカイン応答を増強すれば菌体の増殖を抑制できることが判明し、網羅的遺伝子解析では病原性への関与が示唆される候補遺伝子が抽出された。得られた成果は *C. gattii* の病原因子解明ならびに臨床応用への基盤形成に貢献し得るものである。

図 2. クリプトコックス症感染モデルマウス肺において発現亢進を示していた遺伝子数：本研究では *C. gattii* R265 接種マウス肺のみで Log2 変換後に 2 倍以上の発現亢進を示していた 281 遺伝子が抽出された。

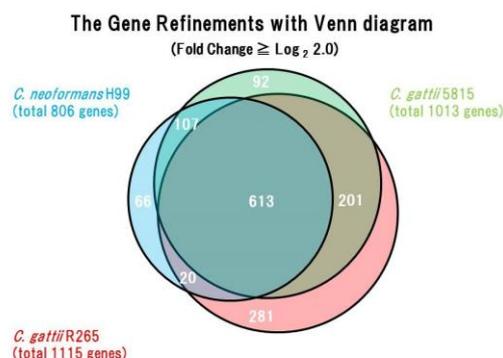


図 3. *C. gattii* R265 接種マウス肺のみで発現亢進していた上位 10 遺伝子：図 2 の 281 遺伝子の中で、発現亢進上位 10 遺伝子は以下の通りである。本研究では Pgk1 が最も発現亢進を示していた。

*C. gattii* R265 infected mice, Fold Change  $\geq$  Log<sub>2</sub> 2.0

| Fold Change | Gene symbol | Gene name                          |
|-------------|-------------|------------------------------------|
| 4.086896    | Pgk1        | 3-phosphoglycerate kinase          |
| 4.081602    | Tnc         | tenascin C                         |
| 3.872107    | Slc7a2      | solute carrier family 7            |
| 3.501668    | Tfpi2       | tissue factor pathway inhibitor 2  |
| 3.413169    | Igf1        | insulin-like growth factor 1       |
| 3.384405    | Rgs5        | regulator of G-protein signaling 5 |
| 3.33342     | Gla         | galactosidase, alpha               |
| 3.318258    | Ccl6        | chemokine (C-C motif) ligand 6     |
| 3.199664    | Emilin2     | elastin microfibril interfacier 2  |
| 3.190153    | Plau        | plasminogen activator, urokinase   |

## 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 14 件)

① Okubo Y: A linking bridge between histopathological analysis and molecular assay in microbiology. Malaysian Journal of Pathology. in press. 査読有 DOI: in press

② Okubo Y, Yokose T, Motohashi O, Miyagi Y, Yoshioka E, Suzuki M, Washimi K, Kawachi K, Nito M, Nemoto T, Shibuya K, Kameda Y: Duodenal Rare Neuroendocrine Tumor: Clinicopathological Characteristics of Patients with Gangliocytic Paraganglioma. Gastroenterology research and practice 2016, 2016:5257312. 査読有 DOI: 10.1155/2016/5257312

③ Okubo Y, Okubo T, Okubo Y, Ishiwatari T: Neuroendocrine Differentiation in Breast Cancer: Clinicopathological Significance of Bcl-2 Positive Solid

Papillary Carcinoma. Case reports in medicine 2016, 2016:9501410. 査読有 DOI: 10.1155/2016/9501410

④ Okubo Y, Motohashi O, Nakayama N, Nishimura K, Kasajima R, Miyagi Y, Shiozawa M, Yoshioka E, Suzuki M, Washimi K, Kawachi K, Nito M, Kameda Y, Yokose T: The clinicopathological significance of angiogenesis in hindgut neuroendocrine tumors obtained via an endoscopic procedure. Diagnostic pathology 2016, 11(1):128. 査読有 DOI: 10.1186/s13000-016-0580-5

⑤ Urai M, Kaneko Y, Ueno K, Okubo Y, Aizawa T, Fukazawa H, Sugita T, Ohno H, Shibuya K, Kinjo Y, Miyazaki Y: Evasion of Innate Immune Responses by the Highly Virulent Cryptococcus gattii by Altering Capsule Glucuronoxylomannan Structure. Frontiers in cellular and infection microbiology 2015, 5:101. 査読有 DOI: 10.3389/fcimb.2015.00101

⑥ Ueno K, Kinjo Y, Okubo Y, Aki K, Urai M, Kaneko Y, Shimizu K, Wang DN, Okawara A, Nara T, Ohkouchi K, Mizuguchi Y, Kawamoto S, Kamei K, Ohno H, Niki Y, Shibuya K, Miyazaki Y: Dendritic cell-based immunization ameliorates pulmonary infection with highly virulent Cryptococcus gattii. Infection and immunity 2015, 83(4):1577-1586. 査読有 DOI: 10.1128/IAI.02827-14

⑦ Tochigi N, Ishiwatari T, Okubo Y, Ando T, Shinozaki M, Aki K, Gocho K, Hata Y, Murayama SY, Wakayama M, Nemoto T, Hori Y, Shibuya K: Histological study of chronic pulmonary aspergillosis. Diagnostic pathology 2015, 10:153. 査読有 DOI: 10.1186/s13000-015-0388-8

⑧ Okubo Y, Nemoto T, Wakayama M, Tochigi N, Shinozaki M, Ishiwatari T, Aki K, Tsuchiya M, Aoyama H, Katsura K, Fujii T, Nishigami T, Yokose T, Ohkura Y, Shibuya K: Gangliocytic paraganglioma: a multi-institutional retrospective study in Japan. BMC cancer 2015, 15:269. 査読有 DOI: 10.1186/s12885-015-1308-8

⑨ Nihon-Yanagi Y, Ishiwatari T, Otsuka Y, Okubo Y, Tochigi N, Wakayama M, Nemoto T, Watanabe M, Kaneko H, Sumino Y, Shibuya K: A case of postoperative hepatic granuloma presumptively caused by surgical staples/clipping materials. Diagnostic pathology 2015, 10:90. 査読有 DOI: 10.1186/s13000-015-0291-3

⑩ Nakamura Y, Hata Y, Koezuka S, Makino T, Otsuka H, Sato F, Sasamoto S, Okubo Y, Shibuya K, Iyoda A: Tracheal leiomyoma resected with endobronchial electrocautery snare. Journal of

bronchology & interventional pulmonology 2015, 22(1):90-93. 査読有 DOI: 10.1097/LBR.0000000000000107

⑪ Kurosaka Y, Shiroya Y, Yamauchi H, Kaneko T, Okubo Y, Shibuya K, Minato K: Effects of habitual exercise and dietary restriction on intrahepatic and periepididymal fat accumulation in Zucker fatty rats. BMC research notes 2015, 8:121. 査読有 DOI: 10.1186/s13104-015-1063-6

⑫ Aki K, Okubo Y, Nanjo H, Ishiwatari T, Nihonyanagi Y, Tochigi N, Wakayama M, Nemoto T, Fukutake K, Shinozaki M, Hori Y, Masuda H, Shibuya K: Genomic Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile in Japanese Patients with Invasive Aspergillosis. Japanese journal of infectious diseases 2015, 68(4):330-332. 査読有 DOI: 10.7883/yoken.JJID.2014.420

⑬ Yamamoto Y, Nemoto T, Okubo Y, Nihonyanagi Y, Ishiwatari T, Takuma K, Tochigi N, Okano N, Wakayama M, Igarashi Y, Shibuya K: Comparison between the location and the histomorphological/immunohistochemical characteristics of noninvasive neoplasms of the ampulla of Vater. Human pathology 2014, 45(9):1910-1917. 査読有 DOI: 10.1016/j.humpath.2014.05.013

⑭ 栃木直文, 大久保陽一郎, 澁谷和俊: 肺アスペルギルス症の病理学的考察 2014, 26:22-26. 査読無 DOI:無し、アクセス URL: <http://ci.nii.ac.jp/naid/40020167834>

[学会発表] (計11件)

① 石渡 誉郎、二本柳 康博、大久保 陽一郎、定本 聡太、小林 純子、江嶋 梢、栃木直文、篠崎 稔、若山 恵、根本 哲生、澁谷 和俊 クリプトコックス剖検例の病理組織学的解析 第59回日本医真菌学会総会・学術集会 2015年10月9日 ロイトン札幌(北海道)

② Okubo Y, Ohno H, Ueno K, Aki K, Shinozaki M, Nihonyanagi Y, Ejima K, Ishiwatari T, Tochigi N, Mitsuda A, Wakayama M, Nemoto T, Hori Y, Kinjo Y, Miyazaki Y, Kamei K, Shibuya K Histopathological study of murine pulmonary cryptococcosis: candidate virulence factors against Cryptococci 19th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology 2015年5月4日 Melbourne(Australia)

③ Okubo Y, Aki K, Shinozaki M, Nihonyanagi Y, Ejima K, Ishiwatari T, Tochigi N, Mitsuda A, Wakayama M, Nemoto T, Hori Y, Shibuya K Identification of

dimorphic yeast in FFPE tissue sections by in situ hybridization using PNA probes 19th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology 2015年5月4日 Melbourne(Australia)

④ Ishiwatari T, Nihonyanagi Y, Ejima K, Okubo Y, Tochigi N, Shinozaki M, Wakayama M, Nemoto T, Shibuya K Histopathological study of autopsy subjects with cryptococcosis 2015 19th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology 2015年5月4日 Melbourne(Australia)

⑤ 大久保 陽一郎、大野 秀明、上野 圭吾、石渡 誉郎、栃木 直文、若山 恵、根本 哲生、金城 雄樹、宮崎 義継、澁谷 和俊 マウス肺を用いたクリプトコックス感染症に対する組織学的解析: 感染防御機構の観点から 第104回日本病理学会総会 2015年5月1日 名古屋国際会場(愛知)

⑥ 石渡 誉郎、二本柳 康博、大久保 陽一郎、栃木 直文、若山 恵、根本 哲生、澁谷 和俊 剖検例を用いたクリプトコックス症の病理学的解析 第104回日本病理学会総会 2015年5月1日 名古屋国際会場(愛知)

⑦ 上野 圭吾、金城 雄樹、大久保 陽一郎、清水 公德、金子 幸弘、浦井 誠、川本 進、亀井 克彦、大野 秀明、澁谷 和俊、宮崎 義継 高病原性 cryptococcus gattii の感染防御に寄与する樹状細胞ワクチンの作用 第58回日本医真菌学会総会・学術集会 2014年11月2日 ワークピア横浜・横浜産貿ホール(神奈川)

⑧ 壇辻 百合香、大野 秀明、梅山 隆、上野 圭吾、大久保 陽一郎、田辺 公一、名木 稔、山越 智、金城 雄樹、杉田 隆、澁谷 和俊、宮崎 義継 マクロファージの食食を指標とした Cryptococcus gattii 感染病態の評価 第58回日本医真菌学会総会・学術集会 2014年11月2日 ワークピア横浜・横浜産貿ホール(神奈川)

⑨ 大久保 陽一郎、大野 秀明、安藝 恭子、篠崎 稔、石渡 誉郎、栃木 直文、若山 恵、根本 哲生、下平 佳代子、中山 晴雄、田辺 公一、山越 智、金子 幸弘、宮崎 義継、亀井 克彦、澁谷 和俊 Cryptococcus gattii 株における病原性発現機構の解明 第58回日本医真菌学会総会・学術集会 2014年11月1日 ワークピア横浜・横浜産貿ホール(神奈川)

⑩ 金城 雄樹、上野 圭吾、浦井 誠、金子 幸弘、大久保 陽一郎、清水 公德、大野 秀明、亀井 克彦、川本 進、澁谷 和俊、宮崎 義継 クリプトコックスの莢膜多糖による免疫回避機構の解析及びその制御法の開発 第58回日本医真菌学会総会・学術集会 2014年11月1日 ワークピア横浜・横浜産貿ホール(神奈川)

⑪ 上野 圭吾、金城 雄樹、大久保 陽一郎、浦井 誠、金子 幸弘、大野 秀明、亀井 克彦、澁谷 和俊、宮崎 義継 高病原性

Cryptococcus gatti の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチン 第 63 回日本感染症学会東日本地方会総会学術集会 第 61 回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会 2014 年 10 月 30 日 東京ドームホテル (東京)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
該当せず

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大久保 陽一郎 (OKUBO, Yoichiro)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他  
部局等・医長

研究者番号：40516267

### (2) 研究分担者

該当せず

### (3) 連携研究者

該当せず

### (4) 研究協力者

該当せず