

断される。

考察

今次研究班における本研究分担者の研究目的は、エイズに伴う日和見原虫感染症の講習会開催を行って、急性期病院を対象とすると同時に、それを通して、効率的な情報・技術移転方法を確立し、自己点検・評価法も検討して、パッケージ化を試みる事である。当然このパッケージは他の診断技術の講習会に際しても適用されることが期待される。種々検討の結果、今次研究班3年間の成果に基づいて、この種の技術移転に関するパッケージの要点を以下のように纏めた。

- (1) 少なくともこの種の講習会は2日程度で関東、関西でそれぞれ1回ずつは行う必要がある。
- (2) 講習会の内容は実習を重視して構成する必要がある。
- (3) 講習会開催の情報の開示は極めて重要で、文書による案内のみならず、できるだけ多数の関連学会の協力を得て、ホームページに掲載する等、周知を計るべきである。
- (4) 実施に際しては繰り返してのFace to Faceの学習が、特に実習に関しては必要であり、そのため再参加、同一の施設よりの複数参加なども推進すべきである。
- (5) 実習においては監督指導できる人材をできるだけ多数配置し、参加者と討議しつつすすめる必要がある。これにより診断能力の向上がより期待できる。
- (6) 各参加者は施設の代表として送られてくる場合もあるので、実習材料の配布、講義/実習内容を含んだCD等の情報媒体の提供等を行う。これによりある程度の補助的な自己点検、自己評価が可能となるものと思われる。
- (7) 情報ネットワーク等を通じた技術点検評価システムも補助的な手法として有用と思われる。適切な学会のコサソルテーションシステムの導入等、積極的に取り入れられるべきである。
- (8) 最も重要なのは、この種の技術移転のための講習は継続性が担保される必要がある事である。そのための財政的措置、人的な措置は行政、学会サイドが協調して対応し、講習会が長期間継続して行えるようにすべきである。9年間を通して参加者の反応を見ると、臨床検査技師レベルでのこ

のタイプの講習会はニーズが高い。事実、アンケートによれば自身が行った検査結果について十二分に自信を持っている検査技師はそう多くはない。多くの場合、専門家にその都度確認を依頼したり、専門書に頼ったりしている。また、このようなルートも確保できない病院がある事にも留意すべきである。

今期はエイズ診療拠点病院だけでなく、急性期疾患を扱う病院をも対象としているが、このようなアプローチが上記のような留意点にのっとりうまく機能すれば、わが国で増加しつつあるエイズのみならず、他の感染症の診断技術移転などにも応用可能となるものと期待される。最後に現在まで本研究分担者がこの事業に従事して感じた問題点を列挙しておきたい。

- (1) エイズ診療拠点病院は明らかに二極、あるいは多極分化している。病院により本講習会のような企画に回答が全く異なっている事、あるいは少数の単一病院が多数の参加者を送り込んでくる事等、勘案すればエイズ診療の強化のために拠点病院の再整備が必要ではないか。
- (2) 今回の9年にわたる講習会では、地方自治体の保健所は全く対象とならなかった。保健所のCapacity Buildingは国立感染症研究所等の役割であろうが、拠点病院の制度と効率的な連繋が必要ないのだろうか。恐らく現在のエイズ検査、診療での保健所に割り当てられた役割の故か、全く9年間保健所からのアプローチはなかったのが講習会の対象とならなかった主な理由である。

謝辞

今次研究の目的を達成するための講習会開催に際しては、京都府立医科大学の御厚意で講義施設、顕微鏡を含む実習施設を使用させて頂いた。また実習の監督者としても、研究協力者の有菌教授以外にも同大学医動物学教室のスタッフ、及びやはり研究協力者である金沢大学、井関教授の教室の方々の全面的な協力が得られた。謝意を表したい。

研究発表

論文

- 1) Tokoro M, Asai T, Kobayashi S, Takeuchi T, Nozaki T: Identification and characterization of two isoenzymes of methionine gamma-lyase from

- Entamoeba histolytica*. J Biol Chem, 278, 42717-42727, 2003.
- 2) Tachibana H, Cheng X-J, Masuda G, Horiki N, Takeuchi T: Evaluation of recombinant fragments of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin intermediate subunit for serodiagnosis of amebiasis. J Clin Microbiol, 42, 1069-1074, 2004.
 - 3) Tachibana H, Takekoshi M, Cheng X-J, Nakata Y, Takeuchi T, Ihara S: Bacterial expression of a human monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugate specific for *Entamoeba histolytica*. Clin Diagn Lab Immunol, 11, 216-218, 2003.
 - 4) Tachibana H, Watanabe K, Cheng X-J, Tsukamoto H, Kaneda Y, Takeuchi T, Ihara S, Petri WA Jr: VH3 gene usage in neutralizing human antibodies specific for *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin heavy subunit. Infect Immun, 71, 4313-4319, 2003.
 - 5) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T: *Entamoeba invadens*: inhibition of excystation and metacystic development by aphidicolin. Exp Parasitol, 103, 61-676, 2003.
 - 6) Kumagai M, Makioka A, Takeuchi T, Nozaki T: Molecular cloning and characterization of a protein farnesyltransferase from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. J Biol Chem, 279, 2316-2323, 2003.
 - 7) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T: Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase in the excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. Parasitol Res, 91, 204-208, 2003.
 - 8) Haghghi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Thammapalerd N, Nozaki T: Geographic diversity among genotypes of *Entamoeba histolytica* field isolates. J Clin Microbiol, 41, 3678-3756, 2003.
 - 9) Iwashita J, Sato Y, Kobayashi S, Takeuchi T, Abe T: Isolation and functional analysis of chk2 homologue from *Entamoeba histolytica*. Parasitol Int, 54, 21-27, 2005.
 - 10) Cheng X-J, Yoshihara E, Takeuchi T, Tachibana H: Molecular characterization of peroxiredoxin from *Entamoeba moshkovskii* and a comparison with *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol, 138, 195-203, 2004.
 - 11) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T: *Entamoeba invadens*: cysteine protease inhibitors block excystation and metacystic development. Exp Parasitol, 109, 27-32, 2005.
 - 12) Khalifa SAM, Imai E, Kobayashi S, Haghghi A, Hayakawa E, Takeuchi T: Growth-promoting effect of iron-sulfur proteins on axenic cultures of *Entamoeba dispar*. Parasitol, 13, 2006 (in press).
 - 13) Kobayashi S, Imai E, Haghghi A, Khalifa SAM, Tachibana H, Takeuchi T: Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* in newly designed yeast extract-iron-gluconic acid-dihydroxyacetone-serum medium. J Parasitol, 91, 1-4, 2005.
 - 14) 小林正規、前田卓哉、竹内 勤: 赤痢アメーバの抗原検出法。シンポジウム「寄生虫疾患診断に用いる検査キットの諸問題」、Clin Parasitol, 16, 2006. (印刷中)
 - 15) Makioka A, Kumagai M, Takeuchi T, Nozaki T: Characterization of protein geranylgeranyltransferase I from the enteric protist *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol, 2006 (in press).
 - 16) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T: Effect of artificial gastrointestinal fluid on excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. Parasitol Res, 2006 (in press).

学会発表

- 1) 竹内 勤、有菌直樹、井関基弘、塩田恒三: 「エイズに伴う日和見原虫感染症の診断に関する講習会」実施経過と問題点について。第46回日本熱帯医学会大会、京都

難治性クリプトコッカス症に対する免疫療法の開発と免疫再構築症候群の病態解明に関する研究

分担研究者：川上 和義

(東北大学医学部保健学科基礎検査学講座病原検査学分野)

研究協力者：金城 武士、宮城 一也、仲村 究

(琉球大学大学院医学研究科感染病態制御学講座分子病態感染症学分野)

■研究要旨 エイズの重要な日和見病原真菌であるクリプトコッカスは、極度な細胞性免疫低下状態で高率に中枢神経系に播種性感染を起こし、致死的な経過をたどる。その感染防御機構の主体は細胞性免疫であり、IFN- γ を代表とするTh1 関連サイトカインが重要な役割を担っている。一方、非メチル化 CpG モチーフを有するオリゴDNA (CpG-ODN) がTLR9 を介して自然免疫細胞を活性化し、Th1 サイトカインの産生を誘導することが明らかにされてきた。本研究では、このCpG-ODNに注目し、その感染防御効果について致死性マウスクリプトコッカス感染症モデルを用いて検討してきた。CpG-ODN 投与は、感染マウスにTh1 反応を誘導することで明らかな治療効果を示した。さらにこの効果は、抗真菌薬であるフルコナゾールを併用することでより顕著となった。さらに、その作用機序にアプローチするために、真菌培養濾液抗原をパルスした樹状細胞 (DC) を、感染マウスから得られた所属リンパ節細胞と共に培養しサイトカイン産生及び増殖反応について検討を行った。その結果、Th1 細胞の誘導に関わる真菌抗原が存在すること、マンノプロテインがその抗原の候補となりうること、そしてCpG-ODN がこの過程を強く促進することが明らかになった。これらの研究成果から、CpG-ODN をアジュバントとして用いたワクチンの開発や、抗真菌薬治療におけるCpG-ODN のBRMとしての応用の可能性が高まり、今後はCpG-ODN のエイズ合併日和見感染症治療における臨床応用に向けた研究が強く望まれる。

研究目的

エイズに合併するクリプトコッカス症は高率に中枢神経系に播種し、致死的な経過をたどることも少なくない¹⁾ことから、なお重要な日和見感染症である。また、HAART時代では、免疫能の回復にともない免疫再構築症候群がみられ、たとえ治療に成功しても中枢神経系に高度の後遺症を起こすことがあり、重要な問題となっている²⁾。

クリプトコッカス感染に対する生体防御の主体は細胞性免疫であり、Th1 サイトカインが重要な役割を担っている³⁻⁸⁾。これまでに我々は、IFN- γ 、IL-12、IL-18、TNF- α のような Th1 関連サイトカインが重要であり、致死的なマウスモデルにこれらのサイトカインを投与することで感染防御効果があることを報告してきた。しかしながら、サイトカインそのものの投与では過剰炎症反応による副作用の出現も懸念されており、さらなる解析が求められていた。

1984年、徳永らにより結核菌由来の DNA が抗腫瘍効果を有することが初めて報告された⁹⁾。また Krieg らは、合成したオリゴ DNA (ODN) による免疫細胞の活性化作用を報告し、その活性には特定の配列である非メチル化 CpG モチーフ (5'-Pu-Pu-CpG-Pyr-Pyr-3') が重要であることを示した¹⁰⁾。この CpG-ODN はマクロファージ、樹状細胞、NK 細胞などの自然免疫細胞を活性化し、TNF- α や IL-12、IFN- γ などの Th1 関連サイトカインを産生誘導、さらにその機能成熟を促すことが知られている¹¹⁾。その作用機序は従来不明であったが、審良らは CpG-ODN が MyD88 を介してシグナルを伝達させることを見出し、そのレセプターが Toll-like receptor (TLR) 9 であることを明らかにした¹²⁾。

CpG-ODN は、サイトカインや他のアジュバントと比べても少ない副作用で Th1 反応を誘導することができ、さらにその作用機序も徐々に解明され始めていることから、現在は悪性疾患やアレルギー疾患を対象に臨床治験が開始されている¹³⁾。

このような背景から本研究では、致死的なクリプトコッカス肺感染マウスモデルを用いてクリプトコッカスに対する CpG-ODN の治療効果について基礎的検討を行い、その臨床応用の可能性について解析を行った。

研究方法

1. マウス

6～9週令雌の CDF-1 または C57Bl/6 マウスを使用した。全てのマウスは琉球大学医学部附属実験動物センター、東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設において SPF 環境下で飼育され、また実験のプロトコールは琉球大学および東北大学の動物実験倫理委員会の承認を得ている。

2. *Cryptococcus neoformans*

長崎大学医学部第二内科で樹立された *Cryptococcus neoformans* (Cn) 臨床分離株 YC-11、YC-13 (河野 茂教授より供与) を使用した。実験によっては、莢膜欠損変異株 Cap67 (Bonston 大学 Levitz 教授より供与) も用いた。真菌はポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地にて培養、2 日後に生理食塩水で 2×10^6 /ml に調整し、25 ゲージのサーフロ針の外筒を用いて 50 μ l を直接気管内に接種した。YC-11 をマウスに経気道的に感染させると、感染は肺にとどまらず脳播種を起こして 3～6 週でほぼ全例が死亡した。一方、弱毒株である YC-13 では、脳への播種性感染もみられず、死亡することもなかった⁷⁾。

3. CpG オリゴデオキシヌクレオチド

(CpG-ODN) および投与方法

CpG-ODN は S 化した合成 DNA の CpG オリゴヌクレオチド (CpG-ODN : TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT) を使用した。また、コントロールとして同じく S 化したコントロール合成 DNA (CNT-ODN : TCC ATG AGC TTC CTG AGC TT) を用いた。それぞれの合成 DNA を感染 3 日前、3 日後、7 日後に 10、20、40 μ g/マウスを腹腔内に投与した。また、感染当日は真菌とともに気管内に同量を投与した。

4. 気管支肺胞洗浄

CpG-ODN または CNT-ODN を感染マウスに投与し、感染 7 および 14 日後に 25 ゲージのサーフロ針の外筒を用いて生理食塩水 1ml にて気管支肺胞洗浄を行い、得られた検体 (BALF) はサイトカインの測定まで -70 $^{\circ}$ C にて凍結保存した。

5. リンパ節細胞の *in vitro* 抗原再刺激

マウスに CpG-ODN または CNT-ODN を投与し、

感染 12 日後に傍気管リンパ節細胞を分離精製した。得られた細胞を 2×10^6 /ml に調整し、10% FCS 添加 RPMI1640 培地中で種々の濃度のクリプトコッカスとともに培養、48 時間後に培養上清を回収しサイトカイン測定まで -70°C にて凍結保存した。

6. サイトカイン濃度の測定

マウス IFN- γ (Endogen 社、米国)、IL-12p40 (BioSource 社、米国)、IL-4 (Endogen 社、米国) は ELISA キットを用いて測定した。

7. 細胞内 IFN- γ 産生の解析

リンパ節細胞、肺リンパ球中の IFN- γ 産生細胞を解析するために、分離精製した細胞を PMA

(5ng/ml) +ionomycin (2 μM) の存在下で 4 時間インキュベートした後、細胞表面マーカー CD4、CD8 を PE 標識抗体で染色、さらに細胞内に産生された IFN- γ を FITC 標識抗体で染色しフローサイトメトリを用いて解析を行った。

8. 各種免疫細胞除去の影響

NK 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、樹状細胞を除去するために、それぞれ抗アシアロ GM1、抗 $\gamma\delta$ TCR、抗 CD4、抗 CD8、抗 CD11c 抗体 400 μg を感染 3 日前、当日、3 および 7 日後マウス腹腔内に接種した。また、V α 14+NKT 細胞の役割を調べるために、J α 18 遺伝子欠損マウス (千葉大学大学院医学研究院免疫発生学 谷口 克教授より供与) 及びコントロールとして

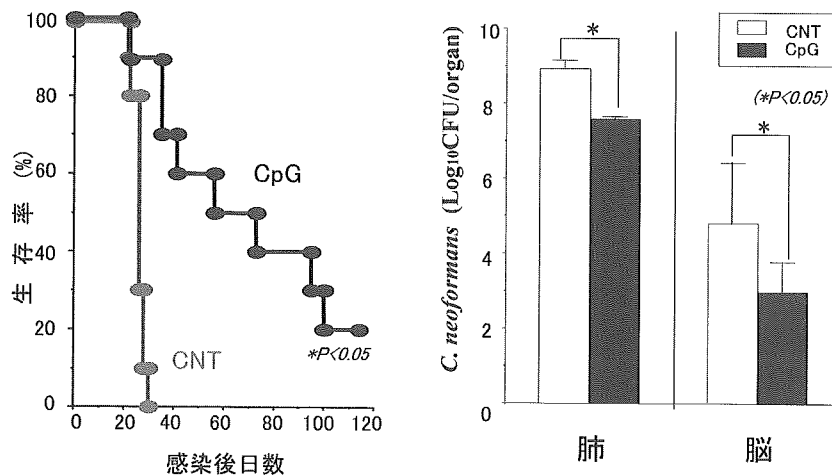


図 1A. CpG-ODN によるクリプトコッカス感染防御効果

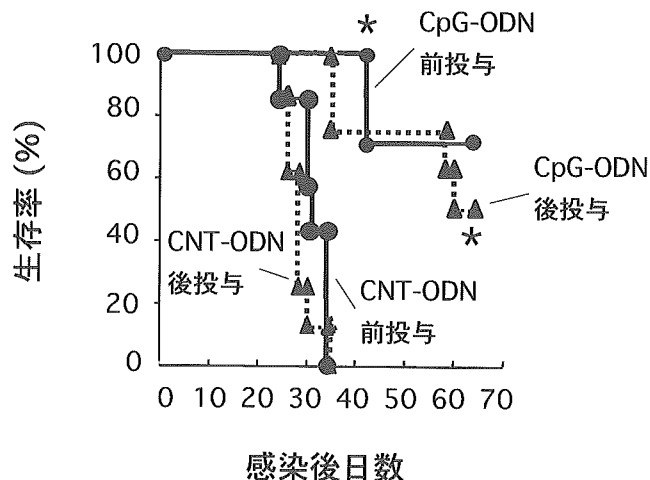


図 1B CpG-ODN の治療効果

遺伝的背景の同一な C57Bl/6 マウスを用いた。

9. 骨髄由来樹状細胞の作製

骨髄細胞を GM-CSF と 9～10 日間培養することで樹状細胞 (DC) を作製した。DC を Cn (YC-11 または Cap67)、培養濾液抗原、またはマンノプロテインと、CpG-ODN 存在、非存在下で 24 時間共培養後、マイクロビーズ結合抗マウス CD11c 抗体を反応させ、磁気細胞分離装置 (MACS) に 2 回通すことで CD11c 陽性細胞 (DC) を分離精製した。得られた DC は、Cn 感染、CpG-ODN 投与マウスから得られた旁気管リンパ節細胞と培養し、2 日後に培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA キットにて測定するとともに、7 日後には ^3H -thymidine の取り込みによって増殖反応についても調べた。

10. CpG-ODN 及び抗真菌薬の投与

マウスに、CpG-ODN または CNT-ODN 20 μg /マウスを感染 1 日、3 日、7 日後、そして以後は 1 週間に 1 回腹腔内に投与した。また、抗真菌剤であるフルコナゾール (FLCZ) 10mg/kg は感染後 4 週間連日腹腔内に投与した。

研究結果

1. CpG-ODN によるクリプトコッカス感染防御効果

CpG-ODN または CNT-ODN をあらかじめ投与したマウスにクリプトコッカスを感染させ、その

際の生存率を比較したところ、CpG-ODN 投与群ではコントロール群と比べ有意に生存期間の延長がみられた (図 1A)。さらに、CpG-ODN 投与マウスでは、感染 23 日後の肺および脳内の生菌数がコントロールマウスと比べて有意に減少していた。しかし、実際の臨床の場を考えると、感染後の投与によって効果があるかどうかは重要な問題である。そこで我々は、感染 3 日後から CpG-ODN の投与を開始し感染前投与と比較したところ、図 1B に示すように、感染後投与においても感染前投与と同程度に生存期間の延長効果を示すことがわかった。

また、CD4+T 細胞を除去することで CpG-ODN の効果が消失したことから、末期の HIV 感染者における CpG-ODN の効果に疑問が生じてきた。しかしこの結果は、CD4+T 細胞が減少している状態での CpG-ODN の効果を否定するものではなく、そのため CD4KO マウスを用いてこの点について検討した。その結果 CpG-ODN は、CNT-ODN 投与に比較して、CD4KO マウスにおいても肺における Cn の排除を有意に促進できることが明らかになった (図 1C)。

2. CpG-ODN による Th-1 サイトカイン誘導効果

クリプトコッカス感染 7 および 14 日後の BALF 中 IL-12p40 および IFN- γ 濃度を測定したところ、CpG-ODN 投与マウスにおいて感染 14 日後の IFN- γ 、感染 7、14 日後の IL-12p40 産生がコントロール群と比べて有意に増加していた。その際 Th-2 サ

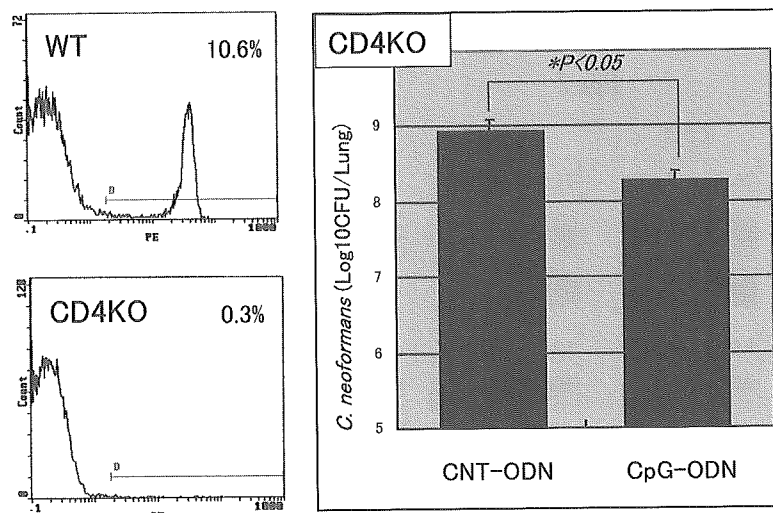


図 1C. CD4+T 細胞欠損状態下での CpG-ODN の治療効果

イトカインである IL-4 は、感染 7 日後で CpG-ODN 投与群において有意にその産生の低下が認められた (図 2)。

また、感染後 12 日目に分離精製した傍気管支リンパ節細胞を *in vitro* で真菌抗原とともに培養し 48 時間後に上清中の IFN- γ を測定したところ、CpG-ODN 投与群では CNT-ODN 投与群と比べて IFN- γ 産生が増加していた。一方、培養上清中の IL-4 濃度は両群間で大きな違いはみられなかった。

3. 細胞内 IFN- γ 産生の解析

CpG-ODN の投与によって感染マウスに誘導される IFN- γ 産生がいずれの細胞に起因するかを明らかにする目的で、感染 7、14 日後に得られた所属リンパ節細胞及び肺内白血球表面上の CD4 また

は CD8 分子とともに、細胞内の IFN- γ を蛍光標識した抗体で染色後フローサイトメーターを用いて解析を行った。感染 7 日後ではリンパ節細胞及び肺内リンパ球ともに CD8+T 細胞が主として IFN- γ を産生しており、一方、感染 14 日後では肺内リンパ球において CD4+T 細胞が主要な IFN- γ 産生細胞であった (図 3)。

4. CpG-ODN の感染防御効果に対する各種自然免疫細胞除去の影響

CpG-ODN を投与したクリプトコッカス感染マウスに抗アジアロ GM1、抗 $\gamma\delta$ TCR、抗 CD4、抗 CD8、抗 CD11c 抗体もしくはコントロールウサギ、ハムスター、ラット IgG を投与して、CpG-ODN の感染防御効果に及ぼす NK 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、樹状細胞除去の

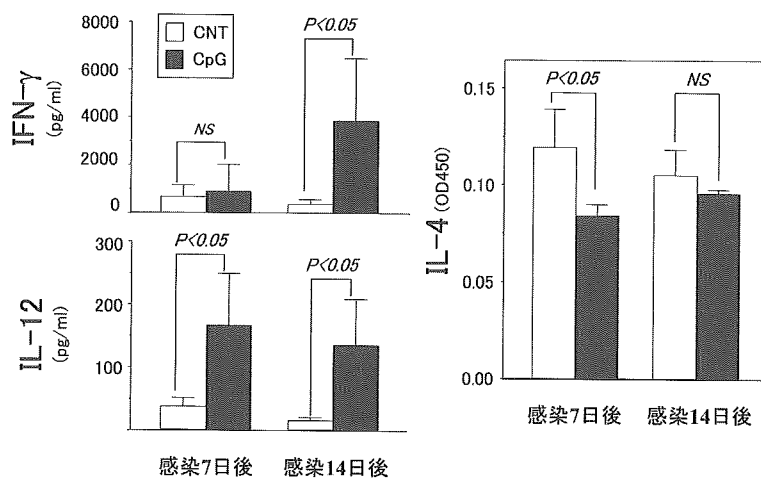


図 2. CpG-ODN による Th1-Th2 バランスへの影響

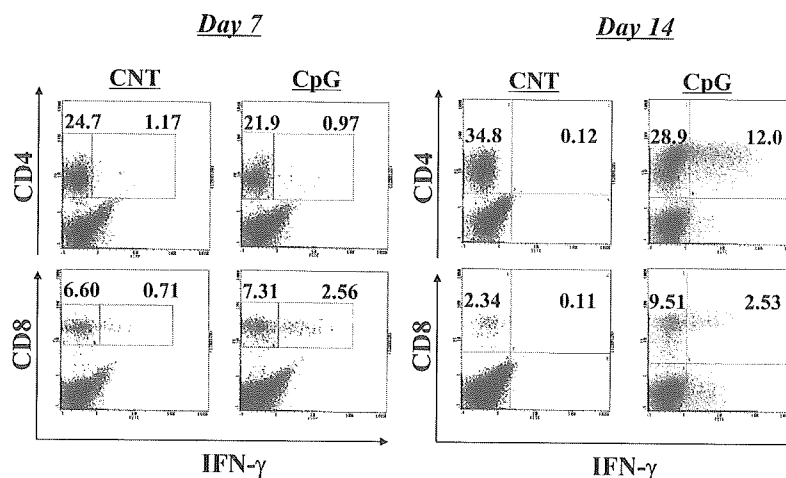


図 3. CpG-ODN による肺リンパ球内 IFN- γ 産生の誘導

影響について解析を行った。NK細胞や $\gamma\delta$ T細胞の除去ではCpG-ODNの効果に全く影響を及ぼさなかったものの、CD4+T細胞、CD8+T細胞、または樹状細胞を除去するとその感染防御効果はほぼ完全に抑制された。また、V α 14+NKT細胞の関与についても調べるために、遺伝的にこの細胞が存在しないJ α 18遺伝子欠損マウスとその野生型コントロールマウスとで比較検討したところ、両マウス間でCpG-ODNの効果はほとんど差が認められなかった。また、同様の方法を用いてCpG-ODN投与によって誘導されるIFN- γ の産生誘導における各種免疫細胞除去の影響について検討したところ、CD4+T細胞、CD8+T細胞、そして樹状細胞が深く関わっていることが明らかになった。

5. CpG-ODNの効果におけるDCの役割

CpG-ODNのクリプトコッカス感染防御効果におけるDCの役割について明らかにするために、マウスに抗CD11c抗体を投与することでDCを除

去し、その影響について解析を行った。図4に示すように、マウスからDCを除去するとCpG-ODNの感染防御効果が完全に消失した。この結果に一致して、CpG-ODNによる肺内Th1細胞の誘導効果も、同様に著明に低下した。

6. CpG-ODNによるDCのTh1細胞誘導の増強効果

DCを*in vitro*でCnと共に培養し、磁気細胞分離装置を用いてCnを除去後、感染マウスから得られたリンパ節細胞に添加してIFN- γ 産生及び増殖反応について検討を行った。その結果、DCをCnのみと培養した場合でもある程度の反応を誘導できたが、DCとCnとの培養にCpG-ODNを添加するとこれらの反応は有意に増強された。さらに、これらのDCをマウスの気管内に投与1日後にCnを感染させ14日後にBAL液中のIFN- γ を測定したところ、図5に示すようにCnとともにCpG-ODNを添加して培養したDCのみが肺内における

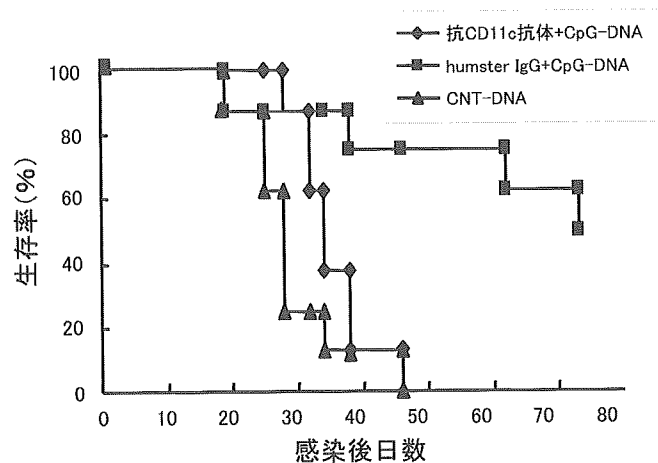


図4. CpG-ODNの治療効果における樹状細胞の役割

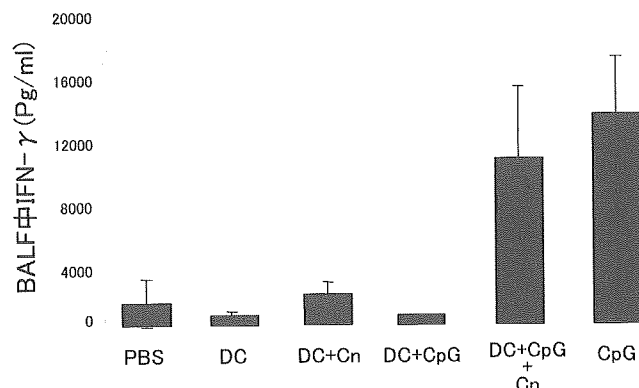


図5. CpG-ODNによる樹状細胞のTh1細胞誘導効果の増強 (*in vivo*)

明らかな IFN- γ の産生を誘導した。これらの結果から、DC が CpG-ODN の存在下にクリプトコッカス由来の抗原を提示して特異的な Th1 細胞の分化を誘導している可能性が推察された。

7. Th1 細胞の分化を誘導するクリプトコッカス抗原の存在

クリプトコッカス特異的 Th1 細胞の誘導に関わるタンパク抗原の存在の可能性を探るために、莖膜を欠損したクリプトコッカス変異株 (Cap67) を用いて同様の解析を行ったところ、DC は Cap67 由来の抗原を取り込み、CpG-ODN が存在しない条件下でもリンパ節細胞に著明な IFN- γ 産生を誘導できることが明らかになった。さらに、Cap67 の代わりにその培養濾液抗原を用いた場合でも、DC にクリプトコッカス特異的な Th1 細胞を誘導でき、この反応は CpG-ODN の添加によって有意に増強した。以上の結果から、Cap67 培養濾液の中に、クリプトコッカス特異的な Th1 細胞の分化誘導に深く関わるタンパク抗原が存在する可能性が示唆された。

これまでにクリプトコッカス由来のマノプロテイン (MP) が T 細胞に対する主要な抗原である可能性が報告されていたため¹⁴⁾、次に我々は、ConA カラムを用いて Cap67 培養濾液から MP を精製し、得られた MP を *in vitro* で添加培養した DC を感染マウスから得られたリンパ節細胞に加えて培養し、IFN- γ 産生と増殖反応を測定した。その結果、MP にも Cap67 培養濾液と同様なクリプトコッカス特異的 Th1 細胞の分化を誘導できる可能性が推察された。

8. CpG-ODN と FLCZ 併用による致死性クリプトコッカス症に対する治療効果

CpG-ODN のような免疫賦活薬の臨床応用を考えると、単独投与よりも抗真菌薬との併用投与が現実的である。そこで、抗真菌薬である FLCZ と CpG-ODN との併用効果について検討を行った。図 6 に示すように、CNT-ODN 投与 (無治療) マウスでは感染 5 週以内に全例が死亡したのに対して、CpG-ODN または FLCZ 単独投与では明らかな生存期間の延長効果が認められた。さらには、CpG-ODN と FLCZ をともに投与したマウスでは、各薬剤の単独投与に比較して有意な生存期間の延長が認められた。

考察

クリプトコッカス症は HIV 感染の末期に合併する日和見真菌感染症であり、初感染臓器である肺から中枢神経系に血行性播種を起こして致死的な髄膜脳炎を引き起こす。2000 年に米国感染症学会から発表されたガイドライン¹⁵⁾では、HIV 合併クリプトコッカス症の治療は、最初の 2 週間のアンホテリシン B とフルシトシンによる導入療法に引き続き、フルコナゾールの静注による 10 週間の地固め療法、そして生涯にわたるフルコナゾール内服による維持療法が必要とされている。また、このような標準治療を行っても、2 週後に 12%、10 週後に 26% が死亡すると報告されており、HAART 時代の現在においてもなお予後の悪い疾患である。

最近の研究によってクリプトコッカスが細胞内増殖菌であることが明らかになり¹⁶⁾、このことに一致してその感染防御機構は主に細胞性免疫によ

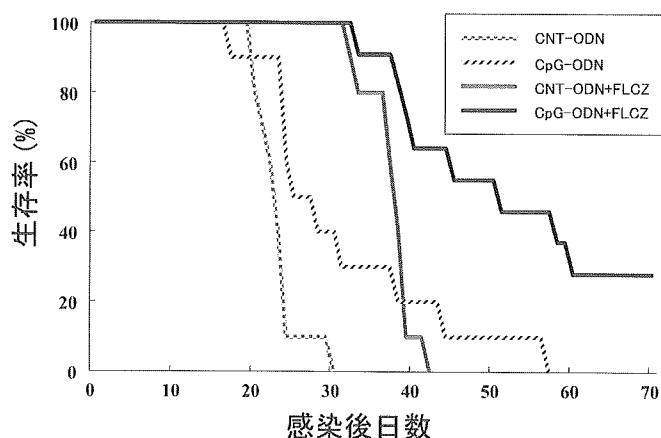


図 6. CpG-ODN と抗真菌薬による併用療法

って担われることが示されている³⁾。従って、感染防御にはTh1サイトカインが必須であり、逆にTh2サイトカインは感染を悪化させる方向に向かわせると考えられる⁴⁻⁸⁾。最近、この理論に従って、米国でエイズに合併する難治性クリプトコッカス髄膜炎症例を対象にIFN- γ 治療の無作為二重盲検ケースコントロール試験が実施された¹⁶⁾。方法は、標準化学療法としてアンホテリシンB (AmB) 0.7mg/kg i.v. \pm 5FC 100mg/kg p.o.を2週間実施後(導入療法)、さらにフルコナゾール (FCZ) 400mgを8週間投与し(地固め療法)、合計10週間の治療が行われ、これにプラセボ、100 μ gまたは200 μ gのIFN- γ 1bを週3回併用投与する形で行われた。評価項目としては、臨床症状、髄液所見、そして副作用について解析を行っている。その結果、プラセボ投与群と比べIFN- γ 投与群において僅かであるが、臨床的、真菌学的効果が報告されている。これは感染症治療に対するIFN- γ を用いた初めての臨床試験であり、ここまで重篤な副作用がみられていないことから、今後とも投与方法などを改善した新たなトライアルが実施されるものと期待している。

我々もこれまでに、致死性マウスクリプトコッカス症モデルを用いて、IFN- γ 、IL-12、IL-18を用いたTh1-Th2バランスの人為的制御による難治性クリプトコッカス症に対する免疫療法の可能性について検討し報告してきた^{3-8,17)}。しかし、いずれも副作用などの問題点を抱えているため、新たなオプションとしての免疫制御物質を検索してきた。

これまでに我々は、CpG-ODNのクリプトコッカス感染防御における治療効果について致死性マウスクリプトコッカス感染モデルを用いて検討してきた¹⁸⁾。このモデルでは、CpG-ODNを投与すると、CNT-ODNと比べてTh1反応および感染防御能が増強した。このことから、CpG-ODNがクリプトコッカス感染後においてIFN- γ の産生を誘導して感染防御に働くことが明らかとなった。これまでの報告では、CpG-ODNは樹状細胞、マクロファージ、NK細胞、B細胞といった自然免疫細胞上のTLR9によって認識され、MyD88を介してシグナルを伝達し、それぞれの細胞を活性化し、その機能を成熟させると考えられている¹⁰⁻¹³⁾。

これらの結果から、CpG-ODNを用いた新たな免疫療法がエイズに合併した難治性クリプトコ

カス感染症患者において有用である可能性が推察された。そこで本研究では、CpG-ODNの作用機序を明らかにすることを目的に解析を行ってきた。CpG-ODNを投与されたマウスでは、感染局所においてIL-12及びIFN- γ 産生が高まり、逆にIL-4産生が低下を示した。この結果に一致して、CpG-ODN投与マウスから得られた所属リンパ節細胞は、抗原再刺激によってIFN- γ 産生が著明に亢進していた。さらに、CpG-ODN投与によって誘導されるIFN- γ 産生細胞を明らかにするために、リンパ節細胞及び肺内リンパ球の細胞内IFN- γ についてフローサイトメトリを用いて検討したところ、感染7日後ではCD8+T細胞、14日後ではCD4+T細胞が主要なIFN- γ 産生細胞であることが明らかとなった。このようにIFN- γ 産生細胞が感染時期によって異なっている理由については不明であるが、CD4+T細胞のみならずCD8+T細胞までもがIFN- γ 産生に参与している点は、エイズにおいて比較的末期までCD8+T細胞数が保たれることを考慮すると重要な知見であると考えられる。

CpG-ODNはTLR9を介して各種自然免疫細胞に作用することが知られている¹⁰⁻¹³⁾。我々は、抗体投与によって細胞を除去することでNK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、そして樹状細胞の、そして遺伝子欠損マウスを用いることでV α 14+NKT細胞のCpG-ODNの治療効果における役割について解析を行った。その結果意外なことに、NK細胞、V α 14+NKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞といった自然免疫リンパ球の関与を証明することはできなかった。しかし、抗CD11c抗体を用いて樹状細胞を除去すると完全にCpG-ODNの感染防御効果が消失したことから、樹状細胞はCpG-ODNの作用に必須の細胞であることが明らかとなった。この点からみると、TLR9を発現してCpG-ODNに反応すると考えられる形質細胞様の樹状細胞数がエイズの進行とともに減少するという最近の報告¹⁹⁾は、CpG-ODNの臨床応用にとって一つの重要な問題点を提起する可能性がある。

一方、クリプトコッカス由来の菌体成分の中で、MPがTh1細胞及び感染防御免疫応答を誘導するための重要な抗原であることを示唆する結果も得られている。MPをDCにパルスすることで、感作リンパ球の中のTh1細胞が活性化され、IFN- γ 産生が著明に誘導された。これらの結果はMPがクリプトコッカス感染に対する防御免疫を誘導す

るためのワクチン抗原となりうることを示唆している。また、CpG-ODN はそのワクチン活性を増強し、より効果的に Th1 依存性防御免疫を誘導するためのアジュバントとして機能することが期待できる。これまでに Levitz ら²¹⁾は、同じ Cap67 から得られた MP を投与することで、クリプトコッカスによる致死感染からマウスを防御しうることを報告しており、この可能性を指示するものである。今後は、MP 粗精製物の中からより抗原活性の強い分子を特定するとともに、Cap67 培養濾液抗原から MP 以外の防御抗原が存在する可能性についても検討し、より効率的なワクチンの開発を目指す必要があると考えられる。

わが国では、先に日和見感染症を発症してエイズと診断されるケースが多いと考えられている。そのため HAART を開始する前に日和見感染症を治療する必要があり、クリプトコッカス髄膜炎の場合はその治療に難渋することも少なくない。そのため、今回得られた研究成果からは、このような症例において抗真菌薬と CpG-ODN との併用治療が新たな治療オプションとして臨床応用できる可能性が考えられる。マウスモデルを用いた我々の検討では、FLCZ の単独投与よりも CpG-ODN を併用した方が有意に治療効果を増強できることを明らかにした（投稿準備中）。この結果は、CpG-ODN が抗真菌薬による化学療法のアジュバント薬として臨床的にも有用である可能性を示唆

するものである。実際、悪性疾患や B 型肝炎ウイルスワクチンにおいて CpG-ODN を用いた臨床試験が開始されており、その有効性が報告されている^{13,22-24)}。

これまでの研究結果からは、MP を抗原として用いたクリプトコッカスワクチンの開発を考える上で、CpG-ODN がより効果を高めるためのアジュバントとして有用である可能性を示唆している。しかし、HIV 感染者では経過とともに CD4+T 細胞数が減少するため、HAART 前にワクチンを実施してもその効果が期待できない可能性が高い。一方、HAART 後には CD4+T 細胞数の上昇とともにその機能が回復することが示されており、インフルエンザワクチンに対する反応性も増加するとの報告もみられる²⁵⁾。したがって、HAART 後にワクチンを接種することによって、クリプトコッカスに対する感染防御免疫を賦与することで、生涯必要とされる抗真菌薬の投与を中断でき、再燃から免れることができれば意義のあることだと考えられる。図 7 に HIV 感染者に合併する難治性クリプトコッカス感染者における CpG-ODN の臨床応用の可能性についてまとめて示している。ただ、CpG-ODN によって免疫系が賦活されることで HAART にともなう免疫再構築症候群を顕在化してしまう可能性も懸念され、今後もより注意深い解析が必要である。

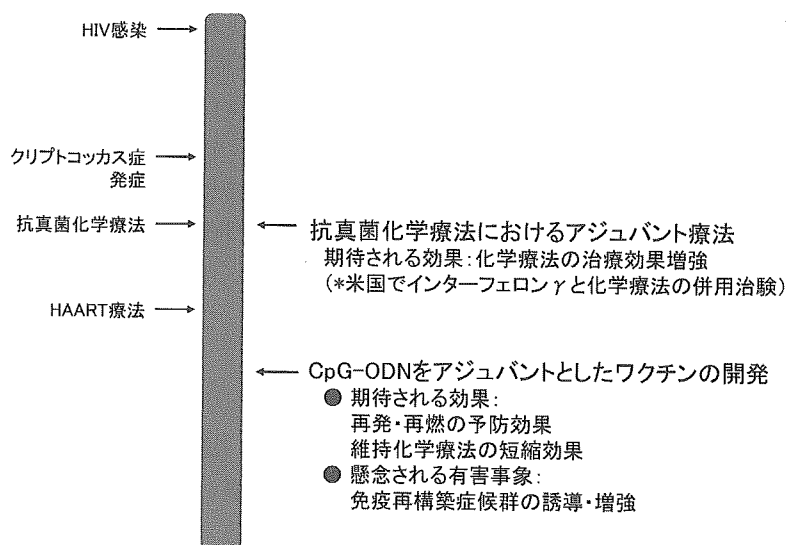


図 7. 難治性クリプトコッカス症に対する CpG-ODN の臨床応用の可能性

参考文献

- 1) Robinson PA, Bauer M, Leal MA, Evans SG, Holtom PD, Diamond DA, Leedom JM, Larsen RA: Early mycological treatment failure in AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis.* 28: 82-92, 1999.
- 2) Jenny-Avital ER, Abadi M: Immune reconstitution cryptococcosis after initiation of successful highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 35: 128-133, 2002.
- 3) Lim TS, Murphy JW: Transfer of immunity to cryptococcosis by T-enriched splenic lymphocytes from *Cryptococcus neoformans* sensitized mice. *Infect Immun* 30: 5-11, 1980.
- 4) Kawakami K, Tohyama M, Teruya K, Kudeken N, Xie Q, Saito A: Contribution of interferon-gamma in protecting mice during pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 13: 123-130, 1996.
- 5) Kawakami K, Qifeng X, Tohyama M, Qureshi MH, Saito A: Contribution of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in host defence mechanism against *Cryptococcus neoformans*. *Clin Exp Immunol.* 106: 468-474, 1996.
- 6) Kawakami K, Tohyama M, Xie Q, Saito A: IL-12 protects mice against pulmonary and disseminated infection caused by *Cryptococcus neoformans*. *Clin Exp Immunol.* 104: 208-214, 1996.
- 7) Kawakami K, Qureshi MH, Zhang T, Okamura H, Kurimoto M, Saito A: IL-18 protects mice against pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* by inducing IFN- γ production. *J Immunol* 159: 5528-5534, 1997.
- 8) Kawakami K, Koguchi Y, Qureshi MH, Miyazato A, Yara S, Kinjo Y, Iwakura Y, Takeda K, Akira S, Kurimoto M, Saito A: IL-18 contributes to host resistance against infection with *Cryptococcus neoformans* in mice with defective IL-12 synthesis through induction of IFN- γ production by NK cells. *J Immunol.* 165: 941-947, 2000.
- 9) Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka Y, Sudo T: Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 72: 955-962, 1984.
- 10) Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 6546-6549, 1995.
- 11) Arthur M, Krieg AM, Hermann W: Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA. *Immunol Today* 21: 5215-26, 2000.
- 12) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S: A toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-745, 2000.
- 13) Agrawal S, Kandimalla ER: Medicinal chemistry and therapeutic potential of CpG DNA. *Trends Mol Med* 8: 114-121, 2002.
- 14) Levitz SM, Nong S, Mansour MK, Huang C, Specht CA: Molecular characterization of a mannoprotein with homology to chitin deacetylases that stimulates T cell responses to *Cryptococcus neoformans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 10422-10427, 2001.
- 15) Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, Pappas PG, Perfect JR, Powderly WG, Sobel JD, Dismukes WE: Practice guidelines for the management of cryptococcal diseases. *Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis.* 2000; 30: 710-718.
- 16) Pappas PG, Bustamante B, Ticona E, Hamill RJ, Johnson PC, Reboli A, Aberg J, Hasbun R, Hsu HH. Recombinant interferon- γ 1b as adjunctive therapy for AIDS-related acute cryptococcal meningitis. *J Infect Dis.* 189: 2185-2191, 2004.
- 17) Kawakami K: Interleukin-18 and host defense against infectious pathogens. *J Immunother* 25: S12-S19, 2002.
- 18) Kawakami K: Promising immunotherapies with Th1-related cytokines against infectious diseases. *J Infect Chemother.* 9: 201-209, 2003.
- 19) Miyagi K, Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, Kinjo T, Nakamura K, Saito A: CpG-oligodeoxynucleotides promote the host protective response against infection with *Cryptococcus neoformans* through induction of interferon-gamma production by CD4+ T cells. *Clin Exp Immunol.* 140: 220-229, 2005.
- 20) Barron MA, Blyveis N, Palmer BE, Whinney SM, Wilson CC: Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus I infected individuals. *J Infect Dis* 187: 26-37, 2003.
- 21) Mansour MK, Yauch LE, Rottman JB, Levitz SM. Protective efficacy of antigenic fractions in mouse models of cryptococcosis. *Infect Immun.* 72: 1746-1754, 2004.
- 22) Cooper CL, Davis HL, Morris ML, Efler SM,

- Adhami MA, Krieg AM, Cameron DW, Heathcote J: CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study. *J Clin Immunol.* 24: 693-701, 2004.
- 23) Cooper CL, Davis HL, Angel JB, Morris ML, Elfer SM, Seguin I, Krieg AM, Cameron DW: CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults. *AIDS* 19: 1473-1479, 2005.
- 24) Speiser DE, Lienard D, Rufer N, Rubio-Godoy V, Rimoldi D, Lejeune F, Krieg AM, Cerottini JC, Romero P: Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest.* 115: 739-746, 2005.
- 25) Kroon FP, Rimmelzwaan GF, Roos MT, Osterhaus AD, Hamann D, Miedema F, van Dissel JT: Restored humoral immune response to influenza vaccination in HIV-infected adults treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 12:F217, 1998.
- promising therapeutic agents against infectious diseases (Kawakami K, Stevens D, eds), *Research Signpost*, pp.105-122, 2004.
- 6) Miyagi K, Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, Kinjo T, Nakamura K, Saito A: CpG-oligodeoxynucleotides promote the host protective response against infection with *Cryptococcus neoformans* through induction of interferon-gamma production by CD4+ T cells. *Clin Exp Immunol.* 140: 220-229, 2005.
- 7) Kawakami K: Innate immunity in the lungs to cryptococcal infection. *In: Fungal Immunology: From an organ perspective* (Eds. Fidel, P., and Haffnagle G. B.), Springer, New York, pp. 135-156, 2005.
- 8) Nakamura K, Miyagi K, Koguchi Y, Kinjo Y, Uezu K, Kinjo T, Akamine M, Fujita J, Kawamura I, Mitsuyama M, Adachi Y, Ohno N, Takeda K, Akira S, Miyazato A, Kaku M, Kawakami K: Limited contribution of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 to the host defense response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* in press.

健康危険情報

特になし

研究発表

論文発表

- 1) Kawakami K: Immunotherapy with Th1-related cytokines against infectious diseases. *J Infect Chemother* 9: 201-209, 2003.
- 2) Uezu K, Kawakami K, Miyagi K, Kinjo Y, Kinjo T, Ishikawa H, Saito A: Accumulation of $\gamma\delta$ T cells in the lungs and their regulatory roles in Th1 response and host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol*, 2004; 172: 7629-7634.
- 3) Kawakami K: Regulation of innate immune T lymphocytes in the host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Jpn J Infect Dis*, 57: 137-145, 2004.
- 4) Kawakami K: Possible immunotherapy with interleukin-18 in intractable infectious diseases. *In: Immunomodulators as promising therapeutic agents against infectious diseases* (Kawakami K, Stevens D, eds), *Research Signpost*, pp.89-104, 2004.
- 5) Kinjo Y, Kawakami K: α -Galactosylceramide: NKT cell-based immunotherapy in intractable infectious diseases. *In: Immunomodulators as*

学会発表

- 1) Kawakami K: Innate immunity lymphocytes and protective immunity. In symposium on the cellular immunity. The 15th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. San Antonio, May 2003.
- 2) Miyagi K, Kawakami K, Uezu K, Kinjo T, Saito A: CpG DNA induction of Th1 response and host protection against fatal pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. The 15th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. San Antonio, May 2003.
- 3) Uezu K, Kawakami K, Miyagi K, Kinjo T, Kishihara K, Matsuzaki G, Saito A: The kinetics and the role of $\gamma\delta$ T cells in the lungs of mice infected with *Cryptococcus neoformans*. The 15th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. San Antonio, May 2003.
- 4) 宮城一也, 川上和義, 上江洲香織, 金城武士, 仲松正司, 山城 信, 山本夏男, 仲宗根力, 齋藤 厚: 致死的クリプトコッカス感染マウスモデルにおける CpG DNA による Th1 細胞誘導とその感染防御効果. 第 33 回日本免疫学会総会, 福岡, 12 月 2003.
- 5) Miyagi K, Kawakami K, Kinjo T, Uezu K, Nakamatsu M, Yamashiro S, Saito A: Unmethylated CpG oligodeoxynucleotides Modulate Th-1-Th-2 balance and enhance host

defense against fatal pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. The 12th International Congress of Immunology, Montreal, July 2004.

- 6) 宮城一也, 川上和義, 金城武士, 仲村 究, 仲松正司, 山城 信, 斎藤 厚: 致死性クリプトコッカス感染マウスモデルにおける CpG-DNA の感染防御効果—樹状細胞の役割. 第34回日本免疫学会総会, 札幌, 2004年12月.
- 7) Kawakami K: DC-based host protection from lethal infection with *Cryptococcus neoformans*. In Symposium: Innate and acquired host immune responses. The 6th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis, Boston, June 2005.
- 8) 川上和義: クリプトコッカス感染における Th1-Th2 サイトカインバランスと自然免疫リンパ球による協調的制御. シンポジウム「感染症とインターフェロン・サイトカイン」, 第70回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 京都, 2005年7月.
- 9) 宮里明子, 川上和義: 生体防御能の制御によるエイズ合併日和見感染症へのアプローチ. シンポジウム「生体防御機能によるエイズ制御」, 第16回日本生体防御学会学術集会, 東京, 2005年8月.
- 10) 川上和義: 自然免疫リンパ球による真菌感染防御能の協調的制御. シンポジウム「真菌感染と自然免疫」, 第49回日本医真菌学会総会, 千葉, 2005年10月.

知的財産権の出願・登録状況

特になし

Cryptococcus neoformans の病原因子探索に関する研究

分担研究者：河野 茂

(長崎大学大学院医学研究科 感染分子病態学講座病態生理制御学分野)

研究協力者：宮崎 義継¹、泉川 公一¹、小林 奨¹、掛屋 弘¹、
塚本 美鈴²

(¹長崎大学大学院医学研究科 感染分子病態学講座病態生理制御学分野

²長崎大学医学部歯学部附属病院第二内科)

■研究要旨 *Cryptococcus neoformans* は日和見真菌感染症の原因として重要な病原真菌である。*C. neoformans* は先ず経気道的に感染することが知られているが、肺における定着や増殖に関与する因子や肺から全身に播種し、中枢神経系へ移行する際に働く因子については検討されていない。そこで、我々はマウスの肺感染モデルを用いた検討で *C. neoformans* の肺感染時に発現量が増加する 41 の遺伝子を Subtraction 法にてクローニングした。クローニングした遺伝子には、すでに *C. neoformans* の病原因子として知られている *CNLAC1*¹⁾ も含まれていた。さらに、クローニングした遺伝子に含まれていた *cis*-prenyltransferase 遺伝子のノックアウト株 (B4500CISD 株) を作成した。ノックアウト株では 37℃ における *in vitro* 発育能が低下した。マウスモデルにおける *in vivo* 病原性では、全身感染の場合には病原性が増強し、気道感染症では病原性が低下する傾向が認められた。ヒト感染におけるこの病原因子を検討する目的で、HIV 患者の脳脊髄液から分離された *C. neoformans* 株 5 株と肺クリプトコックス症患者から分離された *C. neoformans* 5 株、環境分離株 5 株における *cis*-prenyltransferase 遺伝子の発現量を比較したところ、明かな発現の違いは認められなかった。また、他の病原因子として laccase とアルコールデヒドロゲナーゼの発現を比較し、laccase では HIV 患者分離株で発現が低い傾向がみられた。

研究目的

Cryptococcus neoformans は AIDS (acquired-immunodeficiency syndrome) や悪性腫瘍に対する化学療法、免疫抑制剤の使用による免疫抑制状態の患者のみならず、健常者にも感染する病原真菌である。その病原因子として、莢膜 (*CAP59*¹⁾、*CAP60*²⁾、*CAP64*³⁾、*MAN1*⁴⁾、メラニン (*CNLAC1*⁵⁾、交配型 (*MATα*⁶⁾、*STE11α*⁷⁾、*STE12α*⁸⁾、*STE20α*⁹⁾、37℃での発育能 (*CNA1*¹⁰⁾、

*RAS1*¹¹⁾、ホスホリパーゼ (*PLB1*¹²⁾) などが現在まで明らかにされているが、いずれも真菌血症モデルにおける病原因子である。しかし、*C. neoformans* は先ず経気道的に感染することが知られており、侵入門戸である肺における *C. neoformans* の定着や増殖に関与する病原因子の存在が予測される。我々は、本研究班においてマウスの肺クリプトコックス症モデルを用い、肺感染時に発現量が増加する *C. neoformans* の病原遺伝子の同定をお

こなった¹³⁾。これらの遺伝子の機能を確認し、日和見感染症の病態解明、診断や治療への応用を最終目的とする。

研究方法

1. *in vivo* passage モデル

C. neoformans YC-5 株のフローゼンストック (-80 °C) よりサブロー培地を用いて 30 °C で二日間培養。シングルコロニーからクロラムフェニコール 100 µg/ml を添加した YPD (Yeast Extract Polypepton D-glucose) 液体培地にて over night で培養。この菌液を 3000rpm で 20 分遠心分離。ペレットを PBS (リン酸干渉生理食塩水) で suspend し、菌量を 2×10^6 CFU/ml に調整。調整した菌液 50 µl をマウス (CDF1、雌) に経気管支的に感染させ、マウスの生存期間を観察した。観察期間中、死亡直前のマウスより肺を摘出し、摘出した肺を YPD 液体培地中に入れ、感染した *C. neoformans* YC-5 をマウスに 1 回感染後にマウス肺から分離した株 (YC-5FP 株) を培養。YPD 液体培地で培養した YC-5FP 株を YC-5 株と同様に遠心分離。PBS にて 2×10^6 CFU/ml に菌量調整し、マウスに感染させ、マウスの生存期間を観察した。同様の手法を用いてマウス感染を繰り返し、YC-5FP 株感染マウスより分離された株を YC-5SP 株、YC-5SP 株をフローゼンストックした株を YC-5SPF 株とした。親株 YC-5 株の感染を繰り返すことで得られた YC-5FP 株、YC-5SP 株、YC-5SPF 株のマウス感染モデル間でマウスの生存期間に優位な変化がみられるか否かを検討した。

2. PCR-Select Subtraction 法

C. neoformans YC-5SP 株より抽出した RNA と YC-5 株より抽出した RNA を用いて PCR-Select™ Subtraction 法 (CLONTECH : CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit) を用い、発現量に差のある遺伝子のクローニングを行った。

3. 遺伝子解析

クローニングした遺伝子を PERKIN ELMER ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer にてシーケンズを行った。得られた遺伝子配列は NCBI (The National Center for Biotechnology Information) BLAST search、TIGR (The Institute for Genomic Research)、SGTC (Stanford Genome Technology Center) などのデータベースを用いて解析した。

4. *cis*-prenyltransferase 遺伝子の knock out mutant の作成

Subtraction 法によって得られた遺伝子片のうち、*C. neoformans* における *cis*-prenyltransferase と推定された遺伝子の塩基配列を SGTC クリプトゲノムプロジェクトの情報とホモロジーサーチを行い、全 *cis*-prenyltransferase 遺伝子を推定した。*URA5* をセレクションマーカーとした knock out construct を作成し、*C. neoformans* B4500FOA 株 (*ura5* mutant) を用い、相同組み替えによる置換破壊を行った。菌体内への knock out construct の導入はジーンガンを使用した。Minimal 培地を用いて *URA5* が菌体内に導入されたことを確認。培養された菌株のうち、特異的に標的遺伝子の部位で knock out construct が相同組み替えを起こしていることを Southern blot にて確認し、B4500CISD 株をえた。

5. RNA 抽出および cDNA 作成

C. neoformans 株のフローゼンストック (-80 °C) よりサブロー培地を用いて 30 °C で二日間培養。シングルコロニーからクロラムフェニコール 100 µg/ml を添加した YPD (Yeast Extract Polypepton D-glucose) 液体培地にて over night で培養。さらに新しい培地内で、OD₆₀₀ = 0.2 から 1.0 まで増菌した。集菌し RNA は FastRNA™ Kit-RED (BIO101) を用いて抽出した。逆転写は TaqMan OneStep RT-PCR MasterKit を用いて 2 µg の検体 RNA から cDNA の作成を行った。

6. 定量的 real-time PCR

定量的 PCR は 7500Fast Real Time PCR system (ABI) を用いて施行した。プライマーは *CNLAC1*、*cis*-prenyltransferase 遺伝子、また機能が不明の遺伝子 *CNPPF10* の配列から作成した。検量線作成のための対照サンプルのコピー数を算出した (測定する各遺伝子のサンプル DNA の量を測定し、当該遺伝子片がサブクローニングされている pCRscript の分子量と各遺伝子の配列から計算されるプラスミドの分子量とからコピー数を求めた)。菌の内因性のコントロールとしては *actin* 遺伝子を用いた。PCR のプロトコルは、initial denature 95 °C 10 分の後、denature 95 °C 10 秒、annealing はそれぞれ 60 °C (*actin* と *CNLAC1*)、64 °C (*actin* と *cis*-prenyltransferase 遺伝子、*actin* と *CNPPF10*) で 5 秒、extension 72 °C 10 秒を 40 サイ

クル行った。尚、各遺伝子の同一株における発現は同一条件で 3～5 回行った。

研究結果

1. マウス passage による真菌の変化

YC-5 株の感染と YC-5FP 株の感染では、マウスの生存率に有意差はみられなかったが、YC-5SP 株は YC-5 株、YC-5FP 株と比較してマウスの生存期間を有意に減少させた ($P<0.0001$)。また、YC-5SPF 株は YC-5SP 株ほどではなかったが、YC-5 株と比較して有意な差を持って生存期間を減少させた ($P<0.0001$)。また YC-5SP 株と YC-5SPF 株にも生存期間に有意差を認めた ($P<0.0001$)。YC-5 株と YC-5SP 株の間での、コロニー形態には相違点を認めなかった。また莢膜の厚さ、増殖速度に有意差は無かった。

2. Subtraction 法による病原遺伝子片の同定

C. neoformans YC-5 株と YC-5SP 株から抽出した RNA から、PCR-Select Subtraction 法を用い、発現量に差のある遺伝子片 41 個をクローニングした。その中には *C. neoformans* の病原因子として検討され、すでに報告されている Laccase 遺伝子 (CNLAC1) が含まれていた。また *Saccharomyces cerevisiae* において 37℃での発育能に関係するとされている cis-prenyltransferase 遺伝子も含まれていた。しかし、そのほとんどが *C. neoformans* では未知の遺伝子であった。

3. B4500CISD 株の表現形の変化

B4500CISD 株は B4500 株と比較して、minimal 培地におけるコロニー形態は B4500 株と差は認めなかった。墨汁染色による観察では、菌体サイズは B4500 株と比較して大きな傾向があり、内部の構造物も明瞭化していた。30℃での発育速度は B4500 株と有意差なかったが、37℃での発育速度有意に B4500 株と比較して有意に遅かった。

4. マウス passage による遺伝子発現の変化 (YC5 と YC5SPF)

YC5 に対する YC5SPF における cis-prenyltransferase 遺伝子の発現量の比は、 2.9 ± 0.2 であり、YC5SPF が相対的に高値であった。

5. HIV 患者分離株における真菌遺伝子の発現量

HIV 患者分離株と非 HIV 患者からの臨床分離株における発現量に有意な差は認められなかった。一方、環境分離株における発現量は臨床分離株と比較して低い傾向にあった。HIV 患者分離株において発現量の高い株が存在していた。

アルコールデヒドロゲナーゼは HIV 患者分離株において発現の高い株が存在したが、全体として非 HIV 患者分離株や環境株と比較してほぼ同等であった。Laccase は HIV 患者分離株は非 HIV 患者分離株と比較して低い傾向にあったが、環境分離株と比較すると臨床分離株全体が高い傾向であった。CNPPF10 は、laccase やアルコールデヒドロゲナーゼと比較して発現量が全般的に低かったが、臨床分離株と環境株の間で違いは認められなかった。HIV 患者分離株と非 HIV 患者分離株の間でも同様であった。

結論

我々は マウスの *in vivo* passage モデルにおいて、有意に生存期間を短縮させた *C. neoformans* 株 (YC-5SPF) を作成した。親株 YC-5 株と YC-5SPF 株間での表現形には変化が見られなかったが、マウスの生存期間が変化したのは何らかの病原因子発現が増強したためであると推定し、PCR Subtraction 法により発現が増強した因子として、Laccase やアルコールデヒドロゲナーゼ、cis-prenyltransferase などの結果をえたが¹³⁾、これらの遺伝子の発現量は数倍に増加していることが今回確認された。

Realtime-PCR を用いた定量的遺伝子測定方法は *Cryptococcus neoformans* の capsule gene で報告されており¹⁴⁾、我々も actin を相対発現量の対照とし報告に従った。アクチンを対照とした場合には、今回測定した遺伝子の発現量は相対的に低いため誤差が懸念されたが、全く同一の条件で測定した場合には高い再現性が確認された(データ非表示)。このことから、比較的簡便に遺伝子の発現量を測定できる realtime-PCR は有用であった。

cis-prenyltransferase の遺伝子破壊株では中枢神経系における病原性が高まることが示され¹³⁾、cis-prenyltransferase が中枢神経系における病原性に抑制的に働く可能性も考えられるが、今回の検討では HIV 患者由来株で cis-prenyltransferase の発現が増加している株が認められた。このことは

HIV患者分離株では必ずしも病原性の高い株ばかりでは無く、むしろ低病原性の株があることが示唆された。ただし、HIV患者の分離株か否かに無関係に臨床分離株は、環境分離株と比較した場合には類似の発現量である傾向が示された。

Laccaseは*C. neoformans*の病原因子として広く認知されているが、代謝物が宿主免疫からの酸化ストレスに対する還元剤として働くことが病原因子の一つと考えられている。Laccaseの発現量がHIV患者分離株では非HIV患者分離株と比較して低い傾向にあった理由の一つとして、HIV患者では宿主免疫細胞の酸化的殺菌能が低下していることとの関連が示唆された。

アルコールデヒドロゲナーゼや機能が不明な遺伝子の中には、HIVや環境株であることが、何ら発現に影響しない因子もあることが示唆された。

統計学的に有意でなかったが、今回の検討ではHIV患者由来株の*C. neoformans*株は免疫異常の無い患者の肺クリプトコックス症患者の分離株と比較して、laccaseやcis-prenyltrasferaseなどの病原因子の発現が必ずしも高くない傾向があることが示された。

参考文献

- 1) Chang YC, Kwon-Chung KJ.: Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol.* 14: 4912-9 (1994).
- 2) Moore TD, Edman JC.: The alpha-mating type locus of *Cryptococcus neoformans* contains a peptide pheromone gene. *Mol Cell Biol.* 13: 1962-70 (1993).
- 3) Chang YC, Wickes BL, Kwon-Chung KJ.: The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. *Infect Immun.* 64: 1977-83 (1996).
- 4) Wills EA, Roberts IS, Del Poeta M.: Identification and characterization of the *Cryptococcus neoformans* phosphomannose isomerase-encoding gene, MAN1, and its impact on pathogenicity. *Mol Microbiol.* 40: 610-20 (2001).
- 5) Williamson PR.: Biochemical and Molecular Characterization of the Diphenol Oxidase of *Cryptococcus neoformans*: Identification as a Laccase. *Journal of Bacteriology.* 176: 656-664 (1994).
- 6) Moore TD, Edman JC.: The alpha-mating type locus of *Cryptococcus neoformans* contains a peptide pheromone gene. *Mol Cell Biol.* 13: 1962-70 (1993).
- 7) Clarke DL, Woodlee GL, McClelland CM, et al.: The *Cryptococcus neoformans* STE11alpha gene is similar to other fungal mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) gene but is mating type specific. *Mol Microbiol.* 40: 200-13 (2001).
- 8) Wickes BL, Edman U, Edman JC, et al.: The *Cryptococcus neoformans* STE12alpha gene: a putative *Saccharomyces cerevisiae* STE12 homologue that is mating type specific. *Mol Microbiol.* 26: 951-60 (1997).
- 9) Wang P, Nichols CB, Lengeler KB, et al.: Mating-type-specific and nonspecific PAK kinases play shared and divergent roles in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* 1: 257-72 (2002).
- 10) Cruz MC, Sia RA, Olson M, et al.: Comparison of the roles of calcineurin in physiology and virulence in serotype D and serotype A strains of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 68: 982-5 (2000).
- 11) Alspaugh JA, Cavallo LM, Perfect JR, et al.: RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* 36: 352-65 (2000).
- 12) Cox GM, McDade HC, Chen SC, et al.: Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* 39: 166-75 (2001).
- 13) 河野 茂ほか。経気道感染における *Cryptococcus neoformans* の病原因子探索に関する研究—続報—。HAART時代の日和見合併症に関する研究、平成16年度総括・分担報告書：p58-65。(2005)。
- 14) Obayashi et al. Expression of capsule-associated genes of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 160:1-7. 2005.

進行性多巣性白質脳症の PCR 診断と病態解析

分担研究者：北村 唯一（東京大学医学部附属病院・泌尿器科）

研究協力者：鄭 懐穎、余郷 嘉明（東京大学医学部附属病院・泌尿器科）

■研究要旨 PCR を用いた、進行性多巣性白質脳症（PML）の診断サービスを全国の病院に対して実施した。20 名の患者の髄液から JC ウイルス（JCV）調節領域（再編成型）が検出され、PML と診断された。エイズ患者の末梢血リンパ球（PBL）から JCV DNA の検出を試みたが、JCV DNA は検出されなかった。JCV 調節領域を指標として、約 2 年間生存した PML 患者における病巣の拡大を解明した。JCV の VP1 ループ変異が PML 患者の中樞神経系で多発していることを見出した。VP1 ループ変異は PML の病態進行に関係があること、VP1 ループ変異によって抗原性が変化することが示唆された。

研究成果

JC ウイルス（JCV）DNA の調節領域を標的とした nested PCR は進行性多巣性白質脳症（PML）の診断に有用である。この PCR を用いた PML の診断サービスを全国の病院に対して実施した。平成 15 年 3 月から平成 18 年 2 月までに計 156 名の患者の髄液と 1 名の脳生検を検査した。これらのうち 19 名の髄液と 1 名の脳生検から JCV 調節領域が検出された。検出された調節領域はいずれもユニークな再編成型であったことから、20 名の患者は PML と診断された（調節領域の構造は図 1 に示した）。JCV 調節領域が検出された患者の基礎疾患は、エイズ（10 名）、自己免疫性溶血性貧血（1 名）、原発性アルドステロン症（1 名）、自己免疫性好中球減少症（1 名）、真性多血症（1 名）、慢性腎不全（1 名）、成人 T 細胞白血病（1 名）、腎後性腎不全（1 名）、サルコイドーシス（1 名）、SLE（1 名）、不明（1 名）であった。

HAART がエイズ関連 PML に対して効果がある

場合とない場合があることが知られている。我々が髄液から JCV DNA が検出されたほとんど全てのエイズ関連 PML 症例（計 9 症例）において HAART 治療が行われた。これらのうち 4 症例において PML に対する HAART の顕著な効果が認められた。興味深い点は、いくつかの症例では、HAART により免疫再構築症が先ず現れ、その後に神経症状と画像所見が改善された。他方、免疫再構築症候群により PML が改善する前に死亡した症例もあった。したがって、免疫再構築症をいかにコントロールするかが今後の課題であると思われた。

エイズ患者の末梢血リンパ球（PBL）からの JCV DNA を検出するプロジェクトを実施した。対象は原則として、CD4 陽性細胞数が 200 個/ μ l 以下の HIV 陽性患者に限定した。現在までに 19 名のエイズ患者の PBL から JCV DNA の検出を試みたが、いずれも陰性であった。この結果から、コンタミが厳しく排除された施設と検出系を用い

れば、PML 未発症のエイズ患者の PBL から JCV DNA は検出されないことが示唆された。現時点では、PBL 中の JCV DNA の有無が PML のハイリスク患者の判定に有効であるかどうかは明らかでなかった。

JCV DNA の調節領域は患者体内における JCV の動態を解析する指標となる。本年度においては、以前 PML と診断され、その後約 2 年間生存した患者の剖検脳組織を解析した。左頭頂葉、右頭頂葉、小脳、脳幹から、構造上互いに関連した 5 種類の再編成型調節領域 (I ~ V) が検出された。I は最初に作られ、II ~ V は I から、さらなる再編成により作られたと考えられた。また、I は脳全域に分布したが、II ~ V は小脳、脳幹に局在した。以上から、本症例では脱髄病巣が最初、左または右頭頂葉内の単一部位で出現し、その後、複数のルートを辿って脳全体に拡大したことが示唆された。

我々は最近、PML 患者の脳病変部や髄液から分離された JCV DNA の主要キャプシド蛋白 (VP1) 遺伝子にアミノ酸置換を伴う塩基置換が頻発していることを見いだした。この変異は VP1 蛋白の表面ループに集中していることから、VP1 ループ変異と命名された。VP1 ループ変異と PML との関係を解明するため、PML の診断サービスを通して収集された PML 症例を用いて、VP1 ループ変異について解析した。得られた知見から、(1) VP1 変異が生物学的に重要な意義を有すること、(2) VP1 ループ変異は PML の病態進行に関係があること、(3) VP1 ループ変異によって抗原性が変化することが示唆された。

研究発表

発表論文

- 1) Zheng H.-Y., Kitamura T., Takasaka T., Chen Q., Yogo Y. Unambiguous identification of JC polyomavirus strains transmitted from parents to children. *Arch. Virol.* 149, 261-273, 2004.
- 2) Zheng H.-Y., Yasuda Y., Kato S., Kitamura T., Yogo Y. Stability of JC virus-coding sequences in a case of progressive multifocal leukoencephalopathy where the viral control region was rearranged markedly. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 128, 275-278, 2004.
- 3) Zheng H.-Y., Zhao P., Suganami H., Ohasi Y., Ikegaya H., Kim J.C., Sugimoto C., Takasaka T., Kitamura T., Yogo Y. Regional distribution of two related Northeast Asian genotypes of JC virus,

CY-a and -b: implications for the dispersal of Northeast Asians. *Microbes Infect.* 6, 596-603, 2004.

- 4) Yogo Y., Sugimoto C., Zheng H.-Y., Ikegaya H., Takasaka T., Kitamura T. JC virus genotyping offers a new paradigm in the study of human populations. *Rev. Med. Virol.* 14, 179-191, 2004.
- 5) Kato A., Kitamura T., Takasaka T., Zheng H.-Y., Tominaga T., Yogo Y. Detection of the archetypal regulatory region of JC virus from the tonsil tissue of patients with tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *J. Neurovirol.* 10, 244-249, 2004.
- 6) Takasaka T., Goya N., Tokumoto T., Tanabe K., Toma H., Ogawa Y., Hokama S., Momose A., Funyu T., Fujioka T., Omori S., Akiyama H., Chen Q., Zheng H.-Y., Ohta N., Kitamura T., Yogo Y. Subtypes of BK virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region. *J. Gen. Virol.* 85, 2821-2827, 2004.
- 7) Takasaka A., Miranda J.J., Sugimoto C., Paraguisson R., Zheng H.-Y., Kitamura T., Yogo Y. Genotypes of JC Virus in Southeast Asia and the Western Pacific: implications for human migrations from Asia to the Pacific. *Anthropol. Sci.* 112, 53-59, 2004.
- 8) Miranda J.J., Takasaka T., Zheng H.-Y., Kitamura T., Yogo Y. JC virus genotype profile in the Mamanwa, a Philippine Negrito tribe, and implications for its population history. *Anthropol. Sci.* 112, 173-178, 2004.
- 9) Zheng H.-Y., Takasaka T., Noda K., Kanazawa A., Mori H., Kabuki T., Joh K., Oh-ishi T., Ikegaya H., Nagashima K., Hall W.W., Kitamura T., Yogo Y. New sequence polymorphisms in the outer loops of the JC polyomavirus major capsid protein (VP1) possibly associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Gen. Virol.* 86, 2035-2045, 2005.
- 10) Zheng H.-Y., Ikegaya H., Takasaka T., Matsushima-Ohno T., Sakurai M., Kanazawa I., Kishida S., Nagashima K., Kitamura T., Yogo Y. Characterization of the VP1 loop mutations widespread among JC polyomavirus isolates associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 996-1002, 2005.
- 11) Zheng H.-Y., Ikegaya H., Nakajima M., Sakurada K., Takasaka T., Kitamura T., Yogo Y. Two distinct genotypes (MY-x and MX) of JC virus previously identified in Hokkaido Ainu. *Anthropol. Sci.* 113, 225-231, 2005.
- 12) Zheng H.-Y., Kojima K., Ikegaya H., Takasaka T.,