

も発見され、マルネツフェイ型ペニシリウム症が本邦においても安定的に認められるようになっていたことが確認された。これは昨年からの指摘されていた輸入真菌症の多様化を指すものであり、今後はいまだわが国で確認されていない輸入真菌症、とくにブラストミセス症を中心として、その発生に十分注意しておく必要があると考えられた。とくに本疾患は病原体の感染力が強く、また、日本と往来の多い米国五大湖周辺で毎年多数の患者が発生しているため、医療知識・普及を含めた十分な警戒体制が必要である。

輸入真菌症の中にはコクシジオイデス症、ヒストプラズマ症、マルネツフェイ型ペニシリウム症のように HIV 感染を基礎として発生するものが多く、わが国で HIV 陽性者が増加していることを考えると、今後の増加が懸念される。また、ヒストプラズマ症の中の 1 例は国内感染が疑われる症例であり、原因菌のヒストプラズマがわが国の国土に定着している可能性や、今後、地球温暖化に伴って菌の生息域の分布が変化する可能性を含め、今後の動向を慎重に注視する必要がある。

## E. 結論

今年度の発生状況調査にてマルネツフェイ型ペニシリウム症の持続的な増加を始めとする輸入真菌症の多彩化が一段と明確になった。輸入真菌症の増加や多様化に対応して、正確な診療活動が行えるよう、また診療に伴う感染事故を未然に防ぐことが出来るよう、今後とも調査・研究が必要と考えられる。

## F. 健康危機情報

なし

## H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

## 2. ヒストプラズマ症の迅速診断法改良・開発へ向けた基礎的研究

### A. 研究目的

ヒストプラズマ症の診断には、病理組織観察や培養による菌の検出等が行われ、これらは診断において非常に重要な意義を持っている。しかしながら、いずれも感度が低く、またその危険性から特殊な設備や長時間を要するという大きな欠点を持っており、これらの手法と並行して行うことが可能な迅速・簡便な診断法が求められている。ヒストプラズマ菌体由来する抗原もしくはそれに対する抗体を検出する血清試験が迅速診断法として用いられているが、現行の血清診断試薬を用いた本邦の症例に対する検討では十分な感度が得られないことが明らかとなっている。このような背景からヒストプラズマ症血清診断法の開発・改良が求められている。これまでの研究において、患者血清中抗体により認識される新規の *Histoplasma capsulatum* 抗原タンパク質を同定してきた。さらにこれらの組換えタンパク質を精製し、ELISA 法への応用へむけた検討を行ってきた。これまでに既知の抗原である M 抗原(AgM)および H 抗原(AgH)では、我々が精製した組換えタンパク質においても患者群において健常人群に比べその抗体価は優位に高い値を示すことがわかり、これら組換えタンパク質が今後、血清診断に利用可能であることが示唆された。また、その他複数の新規抗原においても健常人群に比べヒストプラズマ症患者群の血清中抗体と有意に強く反応することが分かり、今後の応用が期待できる。

一方で、各抗原タンパク質のエピトープ部分に関する情報はこれまでに全く知られていない。患者血清中抗体が認識する主要なエピトープ部分が同定できれば、エピトープではないタンパク質部分の除去、複数のエピトープ

複合タンパク質の作製により、これまでより感度高く検出ができると期待される。そこでエピトープを同定するための部分タンパク質発現ベクターの構築およびそれらタンパク質の発現・精製をこれまでに進めてきた。本年度はこれら組換え部分タンパク質を用いて患者血清中抗体との反応性について、ELISAにより検討を行った。

さらに、迅速診断の一つとしてPCRベースの迅速診断法が試みられている。これまでに同定した新規抗原タンパク質のうち、Hc1については菌種間での相同性が低いため、PCRによる迅速診断法に応用できると示唆され、その検討を進めた。

## B. 研究方法

### 1) *H. capsulatum* 部分タンパク質を用いたELISA

*H. capsulatum* の主要な抗原として既に知られているAgHおよびAgMを含めて、合計4種の抗原タンパク質について図に示すように部分タンパク質遺伝子構築し、His-tag融合タンパク質として大腸菌内で発現させた。発現させたタンパク質はいずれも可溶化せず、封入体として回収されたため、8M尿素で可溶化した。封入体からの抗原タンパク質の精製はニッケルカラムを用いて行い、250mMイミダゾールを含むバッファで溶出した。得られたタンパク質を精製抗原タンパク質として、ELISAに用いた。

ELISAは以下の通り行った。抗原タンパク質をコーティングバッファ中でMaxiSorp (Nunc)に16時間、4℃にてコーティングした。TBSにて洗浄後、Protein Free Blocking Buffer solution (Pierce)によるブロッキングを行った。0.1% Tween20含有TBS (TBS-T)で洗浄後、100倍希釈した健常人もしくは患者血清を2時間、25℃にて反応させた。再度

TBS-Tで洗浄し、Protein L-HRPを添加し、1時間、37℃にて反応を行った。TBS-Tによる最後の洗浄を行い、TMBを用いた発色反応を室温で30分間行った。停止液(1N硫酸)にて反応を止めて速やかに450nmにおける吸光度を測定した。

本研究は健常人血清21検体、患者血清9検体を用いて検討を行った。

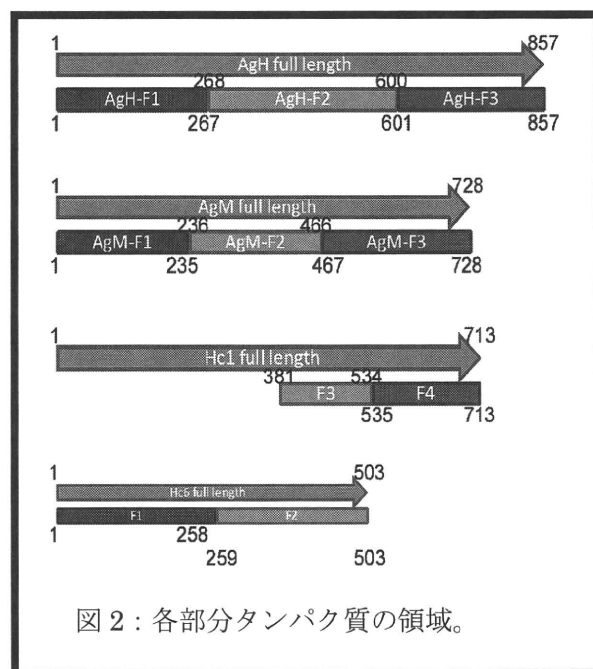


図2：各部分タンパク質の領域。

### 2) リアルタイムPCRによる迅速診断法の開発

標的遺伝子を高感度に検出可能なリアルタイムPCR法の一つであるサイクリングプローブ法を本症の診断法に採用し、*H. capsulatum* のHc1遺伝子を特異的に検出可能なサイクリングプローブとプライマーを設計した。*H. capsulatum* 19株と*H. capsulatum*以外の真菌14株を用いて、設計したプローブとプライマーの特異性を検討した。

(倫理面への配慮)

臨床検体を用いる研究については千葉大学真

菌医学研究センター倫理委員会の承認を受けて行った。

### C. 研究結果

#### 1) 各部分タンパク質に対する患者血清中抗体価の検討

AgH、AgM、Hc1、Hc6 の部分タンパク質および各抗原タンパク質を 96 ウェルプレートにコーティングをして、患者血清中抗体がどの部分を認識しているかを検討した。

AgH は F1 フラグメントおよび F2 フラグメントにおいて健常人群よりも患者血清群において有意に抗体価が上昇していることが明らかとなった。

AgM においては F1 フラグメントおよび F3 フラグメントで健常人群よりも患者群において有意に抗体価が高い結果が得られた。

抗原タンパク質 Hc1 においては F1 フラグメントが健常人群よりも患者群で有意に高い抗体価を示した。

抗原タンパク質 Hc6 では、統計学的有意差が得られなかった( $p=0.057$ )が、F3 フラグメントで患者群の抗体価が高い結果が得られた。

#### 2) リアルタイムPCRによる迅速診断法の開発 設計したサイクリングプローブとプライマーにより *H. capsulatum* 14/19 株が検出されたが、5/19 株は検出されなかった。*H. capsulatum* 以外の真菌においては14株のすべてが検出されなかった。

### D. 考察

我々はこれまでに *H. capsulatum* の抗原タンパク質を同定し、これら抗原の組換えタンパク質を用いた ELISA 法について検討を行ってきた。本年度ではこの ELISA 法の改善を目指して、部分タンパク質を用いた ELISA 法の検討を進めた。部分タンパク質に対する患者血清の反応を検討した結果、それぞれの抗原タンパ

ク質で主要なエピトープと推定される部位が浮かび上がってきた。これらの部分タンパク質の中には健常人群でのバックグラウンドが低減する傾向が見られるものもあった。このことから、部分タンパク質を用いることにより、全長タンパク質よりも S/N 比が高くできる可能性が示された。また、これら複数の部分タンパク質の組み合わせにより、より検出感度を高められる可能性を考えて、今後さらに詳細な検討を進めていく予定である。

並行して、ヒストプラズマ症迅速診断法の開発に向けて、リアルタイム PCR による検討を行った。リアルタイム PCR により検出されなかった *H. capsulatum* 5 株について PCR 産物の塩基配列を解読した結果、5 株すべてにおいてプローブ配列に一塩基多型が見つかった。この方法は感度、特異度とも高く、今後有力な方法と考えられ、今後、更に高い特異性を維持しつつ本菌株を幅広く検出することが可能なプローブを設計する予定である。

### E. 結論

*H. capsulatum* の抗原タンパク質の主要なエピトープに関する検討を行い、患者群の血清で健常人群に比べて有意に強く反応するタンパク質部位を見いだした。

一方、リアルタイム PCR 法によるヒストプラズマ症の迅速診断へ向け、対象遺伝子が良好な標的であることが明らかとなったが、その部位に一塩基多型が存在し、*H. capsulatum* でも増幅されない株が存在する事が明らかとなった。

いずれについても今後さらなる検討を進めていく。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

論文発表

学会発表

1. 豊留孝仁、渡辺 哲、亀井克彦 *Histoplasma capsulatum* 抗原タンパク質の主要なエピトープ部位の検討 第85回日本感染症学会総会 2011 (予定)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

10. クリプトコックス感染による自然免疫活性化機序の解明と  
新規免疫検査法の開発

研究分担者 川上和義、東北大学大学院医学系研究科、教授

**研究要旨** 本研究では、クリプトコックス症における宿主免疫応答機序を解明するために、特に感染後の宿主免疫による菌体の認識機構と各種Thサブセットの分化誘導との関連性、特に多糖の認識に重要な Dectin-2 のような C-type lectin receptors (CLRs) とそのシグナル伝達分子の CARD9 に焦点を当て、1) 本真菌に対する感染防御における Dectin-2 や CARD9 の役割、2) Th1、Th2、Th17 細胞の分化誘導との関連性について解析を実施した。今回、クリプトコックス感染防御には Dectin-2 は必須ではないこと、一方、CARD9 は重要な役割を担うこと、特に Th17 細胞の分化誘導に重要であることを明らかにした。最後に、クリプトコックス症の免疫病態に深く関わる細胞性免疫能の定量的評価法として、ヒト末梢血リンパ球からリアルタイム PCR 法により T-bet、GATA3 mRNA の発現比を解析することが有用であることを示すとともに、Th17 細胞、Treg 細胞分化誘導に重要な転写調節因子である ROR- $\gamma$ t 及び Foxp3 mRNA 発現の解析法を開発した。

A. 研究目的

*Cryptococcus neoformans* は、糖尿病、血液悪性疾患、膠原病、エイズなどの免疫低下宿主に合併する日和見病原真菌であり、このような症例では重篤な髄膜脳炎を引き起こし、临床上重要な問題になっている。免疫低下のない場合でも肺クリプトコックス症を起こすことがあるが、限局性のことが多く、通常は髄膜脳炎にまで至ることは少ない。一方、細胞性免疫能が低下した状態では、感染を局所に封じ込めることができずに中枢神経系に播種性感染を惹起する。このような違いは感染宿主の免疫状態によって大きく左右されるた

め、その対策を講じるためには本真菌に対する感染防御免疫機構の理解が重要である。

近年、*C. neoformans* は、マクロファージによる貪食・殺菌からのエスケープ機構を備えており、細胞内で増殖可能な病原微生物として認識されており、そのため感染防御には細胞性免疫の成立が必須であり、CD4<sup>+</sup> ヘルパーT 細胞が重要な役割を果たすことが知られている。感染後の病態には、Th1/Th2 サイトカインのバランスが大きく関係しており、宿主の免疫反応が Th1 側に傾くと生体では感染防御に働き、逆に Th2 側に傾くと感染は憎悪に向かう。この Th1/Th2 バランスは自然免

疫機構によって制御されており、マクロファージや樹状細胞による病原微生物の認識は初期反応として重要である。この過程では、病原微生物由来成分 (pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) がパターン認識受容体 (pattern recognition receptors: PRRs) によって認識され、TLRsC-type lectin receptors (CLR) などが関与している。

免疫低下宿主における日和見感染症では、治療に抵抗性を示し、重症化する症例が少ないことから、いち早くその存在を検出し早期に治療を開始することが重要である。そのため、微生物感染の迅速診断法の開発が進歩してきた。しかしながら、宿主側の免疫能を正確に評価する方法に関しては、未だ十分とは言えず、その早期の開発が待ち望まれている。感染防御機構は、主に好中球に依存するものと、細胞性免疫が中心的な役割を演ずるものに大別することができる。その中で細胞性免疫については、リンパ球数やそのサブセット解析、末梢血リンパ球の幼弱化学験、ツベルクリン反応などが知られているが、必ずしも正確な評価が得られるわけではなく、細胞性免疫低下に起因する日和見感染症の発症を予測するためには十分とは言えない。

このような背景から、本研究では、*C. neoformans*の肺内感染後における自然免疫の活性化機序を解明することを目的として、特に高マンノース含有多糖の認識に関わることが明らかになってきたCLRのDectin-2と、そのシグナル伝達下流分子として機能することが見出されたCARD9の役割について、マウス感染モデルを用いて解析を行った。併せて、宿主の細胞性免疫能をよりの確に評価するための検査法を開発する目的で、Th1/Th2バランスの規定要因と考えられるT-bet、GATA3とともに、最近新たなThサブセットとして注目されるTh17、Treg細胞の分化規定因子として注目されるROR- $\gamma$ t、Foxp3に焦点を当て、リアルタイム

PCR法を用いて、末梢血リンパ球からこれら転写調節因子の発現検出を試みた。

## B. 研究方法

### 1. マウス

C57BL/6 マウスとともに、同じ遺伝的背景を有する CARD9KO マウス (佐賀大学 原博満教授より供与) を用いた。また、C57BL/6 マウスに 7 回戻し交配した Dectin-2 遺伝子欠損 (knockout: KO) マウス (東京大学医科学研究所 岩倉洋一郎教授より供与) とその野生型マウスも用いた。なお、すべての動物実験は、東北大学の動物実験専門委員会及び、組換え遺伝子実験委員会の承認 (22 医動 108、研研 76) を得た上で実施した。

### 2. *C. neoformans*

莢膜欠損株である Cap67 (Stuart M. Levitz 教授, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA より供与)、及びその親株である B3501 (K.J. Kwon-Chung 博士, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA より供与) を potato dextrose agar (PDA) 培地 (栄研化学、東京) にて 30°C で培養した。

### 3. 骨髄由来樹状細胞

マウスの大腿骨から採取した骨髄細胞を 10 ng/ml GM-CSF (和光純薬、大阪) とともに 8 ~ 9 日間培養することで骨髄由来樹状細胞 (bone marrow-derived dendritic cells: BM-DCs) を作製した。

### 4. 骨髄由来樹状細胞の刺激

BM-DCs (1x10<sup>5</sup>/ml) を Cap67 や B3501、各種刺激剤とともに 24 時間培養し培養上清を回収した。

### 5. *C. neoformans* 感染実験

マウスをペントバルビタールで麻酔後、気管内にカニューレを経口的に挿入して 1x10<sup>6</sup>/ml の B3501 を接種した。

### 6. 肺内生菌数

感染 2 週後にマウスから肺を摘出し、ステ

ンレスメッシュですり潰した後、蒸留水で10倍段階希釈し、PDA培地に接種して2~3日後にコロニー数をカウントした。

#### 7. 肺ホモジネート

感染2週後にマウスから肺を摘出し、ステンレスメッシュですり潰した後その上清を回収し、サイトカイン測定まで-80℃にて凍結保存した。

#### 8. リンパ球採取と再刺激

感染2週後にマウスから得られた傍気管リンパ節からリンパ節細胞を採取し、 $1 \times 10^6/\text{ml}$ で各種濃度のB3501またはConA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )と24時間培養し、その培養上清を回収した。

#### 9. サイトカイン測定

培養上清中のIL-12p40、IFN- $\gamma$ 、IL-17A、IL-23、TNF- $\alpha$ 濃度はそれぞれのELISAキットを用いて測定した。

#### 10. NFAT-GFPリポーターアッセイ Dectin-2遺伝子を導入した。

2B4-NFAT-GFPリポーター細胞(九州大学生体防御医学研究所 山崎 晶教授より供与)をCap67、B3501、*Candida albicans* (ATCC 18804株)などと24時間培養し、フローサイトメトリーを用いて蛍光陽性細胞を検出することでDectin-2を介したシグナル伝達の有無について解析を行った。

#### 11. Dectin-2結合の解析

Cap67、B3501、*C. albicans*、OX-CA(粒子状 $\beta$ 1, 3-D-グルカン:東京薬科大学 大野尚仁教授より供与)をリコンビナントDectin-2-ヒトFc、Dectin-2-ヒトFc(東京薬科大学 大野尚仁教授より供与)と30分間インキュベートし、3回洗浄した後、FITC標識抗ヒトFc抗体と氷上・遮光でさらに30分間インキュベート、3回洗浄後、フローサイトメトリーで解析を行った。

#### 12. ヒト末梢血リンパ球(PBMC)からのTbet、

#### GATA3、ROR- $\gamma$ t、Foxp3発現の解析

各年齢(22~53歳)の健康人ボランティアの末梢静脈血からPBMCを採取した。PBMCはTh1刺激活性の強い*Mycobacterium bovis* BCG(日本BCG、東京)やConA (Sigma-Aldrich)の存在あるいは非存在下で24時間刺激培養した。培養後のPBMCからRNAを抽出し、得られたRNAはPrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa)によりDNAに変換後、Tbet、GATA3、ROR- $\gamma$ t、Foxp3及びhouse-keeping geneとして $\beta$ -actin (ACTB)に特異的なTaqMan probeを用いてリアルタイムPCRを行った。

#### 13. 統計学的解析

実験結果はすべて平均値 $\pm$ 標準偏差で表している。各群間の統計学的解析はStudent's t-testを用いて行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

### C. 研究結果

#### 1. *C. neoformans*によるBM-DCs刺激におけるDectin-2の役割

野生型またはDectin-2 KOマウス由来のBM-DCsをB3501で24時間刺激し、産生されるTNF- $\alpha$ を測定したところ、図1に示すように濃度依存的な産生が検出されたが、Dectin-2KOマウスではTNF- $\alpha$ 産生が完全に消失した。

#### 2. *C. neoformans*感染防御におけるDectin-2の役割

野生型またはDectin-2KOマウスにB3501を感染させ、2週後に肺内における生菌数、IL-12p40、IFN- $\gamma$ 、IL-17A、TNF- $\alpha$ を調べたところ、両マウス間に有意差は認められなかった(図2)。同様に、肺の病理所見においても両マウスには明らかな差はみられなかった。

#### 3. *C. neoformans*はDectin-2を介してシグナル伝達を活性化しうるか

Dectin-2遺伝子を導入したGFPリポーター

細胞を Cap67 あるいは B3501、*C. albicans* で刺激して GFP の発現をフローサイトメト

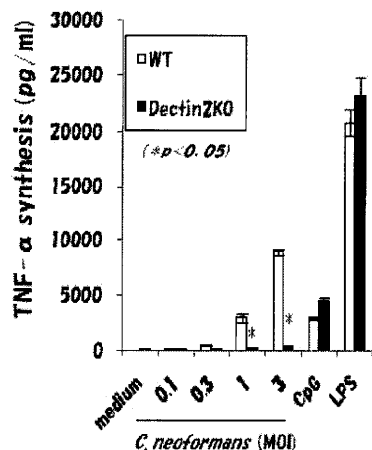


図1. BM-DCsからのサイトカイン産生におけるDectin-2の役割 BM-DCsを各種濃度のB3501あるいはCpG1826、LPSと24時間培養後、上清中のTNF-α濃度を測定した。MOI: multiplicity of infection

リーを用いて解析したところ、*C. albicans* 刺激では活性化が認められたにも関わらず、*C. neoformans* 刺激ではそのような活性は全く検出できなかった。

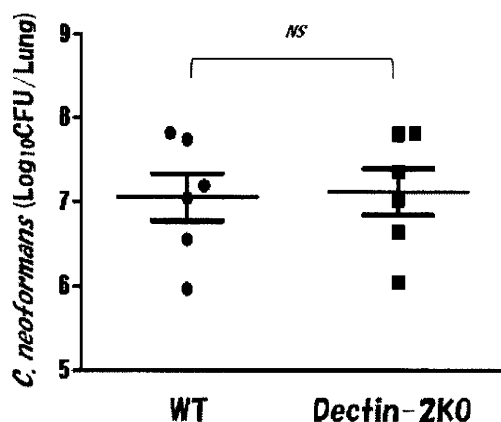


図2. *C. neoformans* 感染防御におけるDectin-2の役割 野生型またはDectin-2KOマウスにB3501を感染させ、2週後の肺内生菌数を検討した。

4. *C. neoformans* は Dectin-2 に結合しうるか

Cap67あるいは B3501、*C. albicans*、OX-CA

への Dectin-2-Fc の結合を調べたところ、*C. albicans* に結合したものの、Cap67、B3501 への結合は検出されなかった。一方、コントロールとして実施した Dectin-1-Fc は OX-CA に結合したものの、Cap67 や B3501、*C. albicans* への結合は観察されなかった。

5. *C. neoformans* による BM-DCs 刺激における CARD9 の役割

野生型または CARD9 KO マウス由来の BM-DCs を B3501 で 24 時間刺激し、産生される TNF-α を測定したところ、図 3 に示すように濃度依存的な産生が検出されたが、CARD9KO マウスでは TNF-α 産生が完全に消失した。

6. *C. neoformans* 感染防御における CARD9 の役割

野生型または CARD9KO マウスに B3501

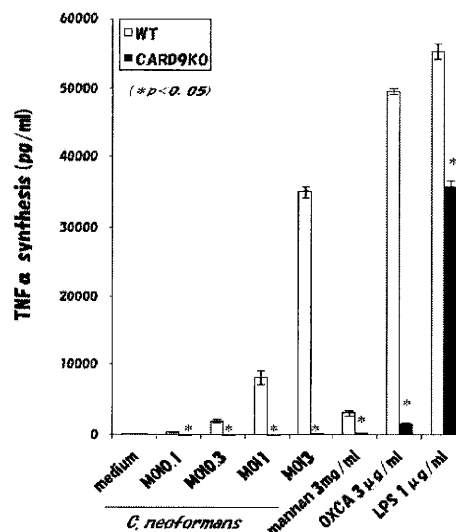


図3. BM-DCsからのサイトカイン産生におけるCARD9の役割 BM-DCsを各種濃度のB3501あるいはマンナン、OX-CA、LPSと24時間培養後、上清中のTNF-α濃度を測定した。MOI: multiplicity of infection

を感染させ、2週後に肺内における生菌数を調べたところ、CARD9KO マウスで有意な菌数の増加が認められた(図4)。さらに、2週後の肺病理所見では、野生型マウスに比べてCARD9KO マウスでは炎症反応の減弱と肺胸腔内における真菌の著明な増加が観察された。一方、2週後の肺内におけるIL-12p40、IFN-γ、IL-17A、TNF-α 産生は、野生型マウスと比較



し、CARD9KO マウスにおいて有意な低下が

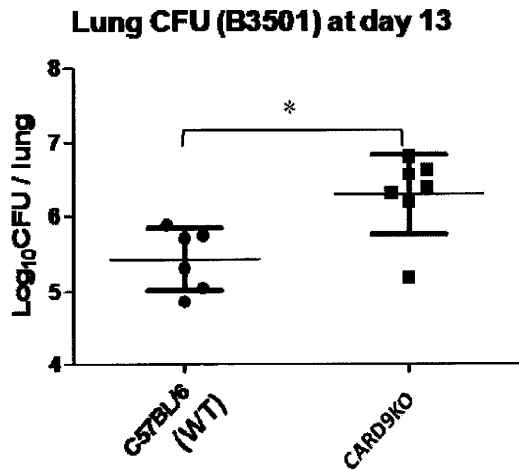


図4. *C. neoformans* 感染防御におけるCARD9の役割 野生型またはCARD9KOマウスにB3501を感染させ、2週後の肺内生菌数を検討した。

みられるものの、完全に消失することはなかった。

#### 7. *C. neoformans* 感染マウスの所属リンパ節における Th1、Th2、Th17 細胞の誘導

*C. neoformans* 感染後の Th1、Th2、Th17 細胞の分化誘導における CARD9 の役割を明らかにする目的で、野生型、CARD9KO マウスに B3501 を感染させ、2 週後に採取した傍気管リンパ節からリンパ節細胞を分離した。これらの細胞を、*in vitro* で抗原再刺激し、産生される IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17A を測定したところ、IFN- $\gamma$  と IL-4 は両マウスで同程度の産生がみられたものの、IL-17A 産生は CARD9KO マウスではほぼ完全に消失していた。

#### 8. PBMC からの T-bet、GATA3、ROR $\gamma$ t、Foxp3 mRNA 発現の解析

リアルタイム PCR による T-bet、GATA-3 の発現を調べたところ、T-bet/ACTB、T-bet/GATA-3 は無刺激の時に比べて、BCG 刺激で増加し、ダニ抗原刺激で低下していた。特に、BCG 刺激による T-bet/GATA-3 は年齢との間に有意な負の相関が認められた。また、免疫抑制剤として用いた FK506、Dex は、BCG によって刺激された PBMC の T-bet/ACTB、T-bet/GATA-3 を低下させるこ

とが判明した。この結果は、ELISA による IFN- $\gamma$  の濃度測定の結果とも基本的によく一致しており、特に T-bet/GATA-3 との間には強い正の相関が観察された。さらに、ROR $\gamma$ t、Foxp3 mRNA 発現の解析条件について検討し、至適条件を得た。

#### D. 考察

病原微生物が感染すると、上皮細胞や自然免疫細胞と遭遇し、PRRs を介した宿主細胞による認識機構が働く。これは免疫応答（炎症反応）の起点になり、その後の感染経過にも重要な影響を及ぼすことが知られている。PRRs には種々のものがあるが、これまで TLRs が精力的に研究され、クリプトコックス感染においても、まずは TLR2 や TLR4 の役割について KO マウスを用いて解析され、TLR4 は必須でないが、TLR2 は欠損すると免疫応答に支障をきたし感染が悪化すると報告がなされた (Yauch et al. *Infect. Immun.* 2004; Biond et al. *Eur. J. Immunol.* 2005)。しかし我々の研究では、TLR4 とともに TLR2 も必須でないこと、TLRs のシグナル伝達に重要な MyD88 の欠損状態では感染が悪化することを明らかにしてきた (Nakamura et al. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2006)。さらには、クリプトコックスの DNA が TLR9 によって認識され、感染防御に重要な意義を有することを最近報告した (Nakamura et al. *J. Immunol.* 2008)。

これらの認識機構はマウスの感染系にとどまらず、ヒトにおいても TLR4 や TLR1、TLR6 の遺伝子多型が見出され、これらの患者では真菌感染に対して感受性になることが報告されている (表 1)。また、TLRs のみならず、近年免疫系による真菌の認識において注目を集めている CLR についても、Dectin-1 の遺伝子多型とカンジダ、アスペルギルス感染との関連性について報告がなされ始めている。

表 1. PRRsの遺伝子多型と真菌感染症

- 
- ▶ **Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation.**  
Bochud PY, Chien JW, Marr KA, et al. *N Engl J Med.* 359: 1766-77. 2008.
  - ▶ **Toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for *Candida* bloodstream infection.**  
Van der Graaf CA, Netea MG, et al. *Eur Cytokine Netw.* 17: 29-34. 2006.
  - ▶ **TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation.**  
Kesh S, Mensah NY, Peterlongo P, et al. *Ann NY Acad Sci.* 62: 95-103. 2005.
  - ▶ **Dectin-1 Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity.**  
Cunha C, Di Ianni M, Bozza S, et al. *Blood.* 2010 Aug 31. [Epub ahead of print]
  - ▶ **Genetic variation of innate immune genes in HIV-infected african patients with or without oropharyngeal candidiasis.**  
Plantinga TS, Hamza OJ, Willment JA, et al. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 55: 87-94. 2010.
  - ▶ **Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections.**  
Ferwerda B, Ferwerda G, Plantinga TS, et al. *N Engl J Med.* 361: 1760-7. 2009.
- 

我々もクリプトコックス感染と PRRs との関連性の中で CLR<sub>s</sub> に注目し、まずは  $\beta$ -1,3-D-glucan の受容体として知られている Dectin-1 の KO マウスを用いて感染への影響について解析を行った。しかし、感染経過、サイトカイン産生において野生型マウスと何ら差がみられなかったことから、クリプトコックス感染防御には必須ではないと結論した (Nakamura et al. *Microbiol. Immunol.* 2007)。

そこで本研究では、高マンノース含有多糖の認識に関わると考えられている Dectin-2 の役割について KO マウスを用いて検討した。Dectin-1 と異なり、in vitro でのクリプトコックス刺激 BM-DCs からのサイトカイン産生はほとんど消失したのにも関わらず、in vivo の感染実験では、感染経過、肺の病理所見、サイトカイン産生において、野生型マウスとの間に全く差を認めなかった。これは、in vivo においては何らかの代償機構が存在しているものと考えている。

さらに、CLR<sub>s</sub> の関与について探索する目的で、TLR<sub>s</sub> に対する MyD88 のように、多くの

CLR<sub>s</sub> に共通のシグナル伝達分子として機能する CARD9 の役割について、次に解析を実施した。その結果、CARD9KO マウスでは、クリプトコックス感染が著明に悪化し、サイトカイン産生が低下し、特に Th17 細胞の分化が損なわれることが明らかになった。このことから、クリプトコックスに対する宿主細胞の認識機構には Dectin-1、Dectin-2 以外の何らかの CLR<sub>s</sub> が関与している可能性が強く示唆された。今後は、Mincle など既知の他の CLR<sub>s</sub> について解析を行っていく必要があると考えられる。このような研究によって、クリプトコックス感染防御に必須の PRRs が明らかにされることで、その遺伝子多型などこれまで不明であったクリプトコックス感染の危険因子・難治化要因が新たに発見される可能性が期待できる。

最後に、リアルタイムPCRにより、末梢血リンパ球から Th1/Th2 細胞分化の決定に重要な転写制御因子 T-bet 及び GATA3 mRNA の発現を定量的に解析することが可能となり、さらに両者の発現比はクリプトコックスの感染経過に重要な影響を有する Th1/Th2 バランス

と密接に関連することが明らかになった。また、最近真菌感染との関連性が注目されている Th17細胞やTreg細胞の分化に重要な転写調節因子であるROR- $\gamma$ t、Foxp3の遺伝子発現についても解析が可能となった。今後は、これらの指標をもとに、真菌感染症と宿主免疫能との関連について臨症的な解析を行っていきたい。

## E. 結論

本研究により以下の点が明らかになった。

- 1) *C.neoformans* 感染防御には Dectin-2 の明らかな役割は認められなかった。
- 2) *C.neoformans* 感染防御には CARD9 が重要な役割を担うことを明らかにし、Dectin-1、Dectin-2 以外の何らかの CLR が関与する可能性を示した。
- 3) 細胞性免疫能の定量的評価法として、ヒト末梢血リンパ球からリアルタイムPCR法により T-bet、GATA3、ROR- $\gamma$ t、Foxp3 mRNA 発現を解析し、T-bet/GATA3比を指標とすることで細胞性免疫能評価できる可能性を示した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Saijo S, Ikeda S, Yamabe K, Kakuta S, Ishigame H, Akitsu A, Fujikado N, Kusaka T, Kubo S, Chung SH, Komatsu R, Miura N, Adachi Y, Ohno N, Shibuya K, Yamamoto N, Kawakami K, Yamasaki S, Saito T, Akira S, Iwakura Y. Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity* 28: 681-691, 2010.
2. Xiao G, Miyazato A, Abe Y, Zhang

T, Nakamura K, Inden K, Tanaka M, Tanno D, Miyasaka T, Ishii K, Takeda K, Akira S, Saijo S, Iwakura Y, Adachi Y, Ohno N, Yamamoto N, Kunishima H, Hirakata Y, Kaku M, Kawakami K: Activation of myeloid dendritic cells by deoxynucleic acids from *Cordyceps sinensis* via a Toll-like receptor 9-dependent pathway. *Cell Immunol.* 263: 241-250, 2010.

### 学会発表

1. Kawakami K: Host defense strategies targeting polysaccharides and glycolipids against *Cryptococcus neoformans*, Immunology of Fungal Infections, Gordon Research Conference, Galveston, TX, USA, Jan 2011.
2. Yamamoto N, Yamamoto H, Abe Y, Tanaka M, Tanno D, Miyasaka T, Ishii K, Saijo S, Iwakura Y, Hara H, Kawakami K: Role for dectin-2 and CARD9 in the host immune response to *Cryptococcus neoformans*. Workshop "WS-092 Immunity to Fungal Infection", 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Kobe, Aug 2010.
3. Ishii K, Tanaka M, Abe Y, Tanno T, Miyasaka T, Yamamoto H, Kawakami K: TLR9-dependent activation of bone marrow-derived dendritic cells by URA5 DNA from *Cryptococcus neoformans*. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Kobe, Aug 2010.
4. Abe Y, Gang X, Miyazato A, Zhang T, Tanaka M, Tanno D, Miyasaka T, Ishii K, Yamamoto N, K. Kawakami: Deoxynucleic acids from *Cordyceps sinensis*, a Chinese herbal medicine, activate myeloid dendritic cells via a Toll-like receptor 9-dependent

pathway. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Kobe, Aug 2010.

5. 阿部 譲, 笛 末崎, 石井恵子, 金城雄樹, 仲川清隆, 宮澤陽夫, 川上和義:  
*Cryptococcus neoformans* による CD1d に依存性した NKT 細胞の活性化とその脂質画分の解析. 第 21 回日本生体防御学会学術総会. 仙台, 2010 年 7 月.
6. 山本秀輝, 山本夏男, 田中三鈴, 高橋友里恵, 阿部 譲, 石井恵子, 金光敬二, 川上和義: クリプトコックス感染防御における Dectin-2 及び Card9 の役割. 第 21 回日本生体防御学会学術総会. 仙台, 2010 年 7 月.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特許取得

特になし

実用新案登録

特になし

その他

特になし

