

検診結果 第433回日本皮膚科学会北陸地方会
(金沢市 平成24年2月26日)

4. 望月 隆、安澤数史、藤広満智子: *Trichophyton tonsurans*に見られる厚膜胞子様構造-
迅速同定への応用について- 第433回日本皮膚科学会北陸地方会(金沢市 平成24年2月26日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

1. 本研究の成果の一部は皮膚科関連学会、ならびに平成23年4月開催の日本医学会総会において紹介し、皮膚科医や家庭医の啓発に用いた。
2. 本研究の成果を皮膚科医の教育に活用するため、金沢医科大学皮膚科学が母体となり、現在北陸真菌懇談会の企画として開催している真菌講習会に用いるテキスト「若手皮膚科医のための真菌講習会テキスト」(仮称)を編纂中である。

輸入真菌症の国内発生状況調査と

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

研究分担者 亀井 克彦 千葉大学真菌医学研究センター臨床感染症分野

研究協力者 豊留 孝仁 千葉大学真菌医学研究センター臨床感染症分野

研究要旨

継続的に輸入真菌症の国内発生状況調査を行った結果、昨年落ち着きつつあったコクシジオイデス症を中心として再増加が認められた。また、わが国では希少疾患と考えられたマルネツフェイ型ペニシリウム症が3年連続して確認されるなど、昨年に引き続き輸入真菌症は多様化を続けていると考えられた。ヒストプラズマ症の迅速診断法の改良・開発については、新規抗原候補タンパク質について検討を進め、*H. capsulatum*の抗原タンパク質を組み合わせることにより、感度の上昇を、さらにAgMの部分タンパク質を組み合わせることによりバックグラウンドを低下させることができた。また上記タンパク質のコード遺伝子を対象に新たに設計したサイクリングプローブ (Hist1-probe3) とプライマー (hcN2F, hcN1R) の高い検出感度と優れた検出特異度が示され、更なる改良による実用化が期待された。

1. 輸入真菌症の国内発生状況調査

A. 研究目的

わが国には見られない高度病原菌が多く含まれる輸入真菌症では国内発生状況のモニタリングは、診療の観点からはもちろん、医療機関での感染事故防止やバイオハザード対策の点からも重要と考えられる。当研究班ではこれまで本疾患群のモニタリングを行ない、ヒストプラズマ症およびコクシジオイデス症を中心とした輸入真菌症の増加に警鐘を鳴らしてきたが、その後の経過を知るために本年度も引き続き実態調査を行った。

B. 研究方法

条件を同一とするため、これまでと同じく千葉大学真菌医学研究センター及び国立感染症研究所に対する真菌症のコンサルテーションおよび菌株の同定、抗体の測定依頼などの依頼があった症例に基づいて基礎データを作製した。これに医学中央雑誌、Medlineなどに掲載された報告症例も検索してデータを追

加した。感染症法（4類）に指定されているコクシジオイデス症に関しては保健所を介した報告も確認し、症例の詳細に関しては必要に応じて主治医に直接問い合わせて情報を補完した。

C. 研究成果（図1）

1) コクシジオイデス症

2011年は計4例が確認され、総症例数は66例となった。2007年の3例以降、3例→2例→1例と一応の減少傾向が見られたが、本年のデータからは本疾患の再増加の可能性が考えられた。感染地はいずれも米国であり、カリフォルニア2名、アリゾナ1名、ニューメキシコ1名であった。病型が明らかであった症例3例はいずれも肺コクシジオイデス症と考えられた。

図1

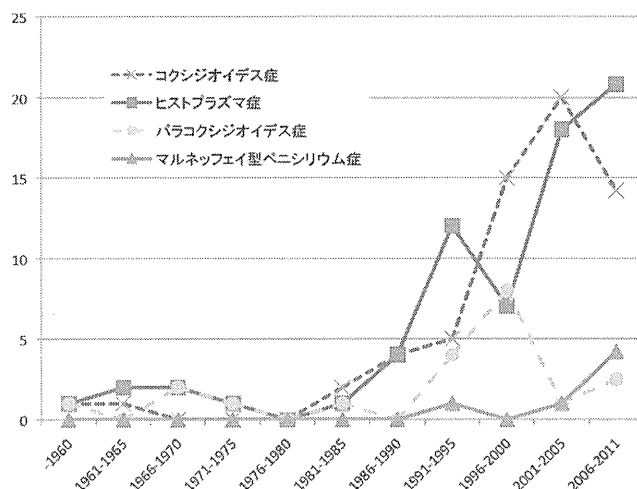


図1：我が国の輸入真菌症症例数の変遷

グラフでは5年ごとに、また2006-2011年の間は6年間の症例数を平均化しているため、2011年の変化が分かりにくいですが、ヒストプラズマ症の減少に代わってコクシジオイデス症の増加が見られている。一方でマルネッフェイ型ペニシリウム症はコンスタントに症例が見られ、パラコクシジオイデス症を抜いて第3位に進んだ（×コクシジオイデス症、■ヒストプラズマ症、●パラコクシジオイデス症、▲マルネッフェイ型ペニシリウム症）。

2) ヒストプラズマ症

2011年のヒストプラズマ症は2例が認められ総計は73例となった。感染地は主に南米（特にブラジル）と考えられた。いずれも播種型であったが、免疫不全を基礎とする例が1例、ほぼ健常人と考えられる症例が1例であった。

3) パラコクシジオイデス症

2009年の2例以降、発生が認められていない（計21例）。本症はこれまででも来日中のブラジル人に好発しており、新規入国のブラジル人の減少がその主因と考えられる。

4) マルネッフェイ型ペニシリウム症

2009年の2例、昨年の1例に続き、1例が発見され計7例となるなど明らかな増加傾向を続けている。本例はHIV感染を基礎としてタイで感染した全身播種型の症例であった。

5) その他の輸入真菌症

北米で症例数が多く、その重篤度から上陸が懸念されるブラストミセス症であるが、本年は認められなかった。

D. 考察

全体に落ち着いた状況であった昨年に比べると、本年ではコクシジオイデス症を中心として再び増加に転じつつある可能性が示され、今後も十分な警戒が必要と思われた。同様にマルネッフェイ型ペニシリウム症についても、過去3年にわたり患者が毎年見られるようになり、過去6年間の平均患者数から見ると、パラコクシジオイデス症を抜いて第3位となるなど、本疾患がわが国においても注意すべき疾患であること確認された。一方、一時患者数の多かったパラコクシジオイデス症は明らかな減少傾向にあり、わが国とブラジルを中心とした流行地域との交流の減少を反映しているものと考えられる。

また、輸入真菌症の一種であるガッティ型クリプトコッカス症で、その原因菌 (*Cryptococcus gattii*) が変異し病原性やその生態を変えて健常人の間で大流行を来した例が北米で問題になっている。本症はわが国ではまだきわめて少数が見られるのみであるが、菌の変異が確認されている以上、今後わが国への大規模な上陸や定着の可能性も考えられ、今後は検索の枠を広げて調査する必要があると考えられる。

E. 結論

今年度の発生状況調査にてコクシジオイデス症の再増加、マルネツフェイ型ペニシウム症の増加の持続などが確認された。今後とも注意深く調査・研究を行ない、必要とされる対策への準備を重ねていくべきと考えられる。

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は病理組織観察や培養による菌の検出等に依っており、これらの検査は非常に重要な意義を持っている。しかしながら、いずれも感度が低いことや強い病原性を持つ真菌であることから培養に特殊な設備や長時間を要するという欠点を持っている。そこでこれらの手法に先行してもしくは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に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。これらの組換えタンパク質を精製し、ELISA 法への応用に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では健常人群に比べ優位に高い抗体価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。さらに、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明らかとなってきた。

本年度はこれら組換えタンパク質を組み合わせるにより、単独で用いた場合に比べて感度・特異度の点で改善が図れると考え、ELISA による検討を行った。

さらに、我々は、これまでに同定した新規抗原タンパク質のうち、Hc1の塩基配列相同性が

近縁の菌種間であっても低いことに着目し、Hc1遺伝子を標的にしたリアルタイムPCRによる診断法の開発を進めてきた。リアルタイムPCRには、DNAとRNAのキメラプローブ(サイクリングプローブ)とRNase Hの組み合わせによる高感度かつ特異性の高いサイクリングプローブ法を採用し、*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の設計を試みた。さらに、新たに設計したサイクリングプローブとプライマーのうち、すべての*H. capsulatum* 供試株(19株)を検出可能であったサイクリングプローブとプライマーについて、その検出特異性と検出感度の評価を行った。

B. 研究方法

1) 複数の *H. capsulatum* 抗原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、我々がこれまでに同定してきた Hc1 および Hc6 の合計 4 種の抗原タンパク質もしくはそれらの部分タンパク質(図 1)について 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 1 時間、25°C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°C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。

本研究では健常人血清 19 もしくは 20 検体、患者血清 10 もしくは 11 検体を用いて検討を行った。

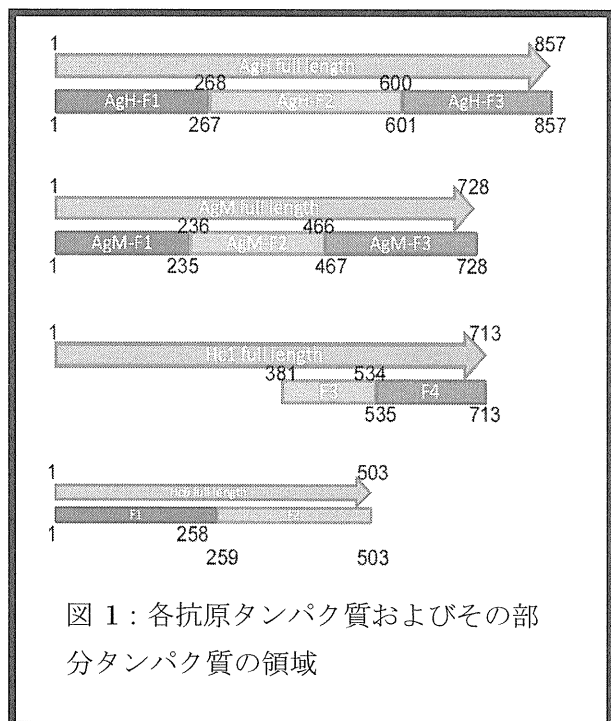


図 1: 各抗原タンパク質およびその部分タンパク質の領域

2) リアルタイム PCR による迅速診断法の開発

H. capsulatum 供試株 (19 株) をすべて検出可能であったサイクリングプローブ (Hist1-probe3) とプライマー (hcN2F, hcN1R) について、その検出特異性と検出感度の評価を行った。検出特異性の評価には、*H. capsulatum* 以外の真菌 37 種から抽出した DNA をリアルタイム PCR に用いた。検出感度の評価には、標的遺伝子である Hc1 遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を最終濃度が $1-10^5$ copies/reaction となるように段階希釈

し、リアルタイム PCR に用いた。

(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 のいずれかの抗原タンパク質もしくは 4 抗原を全て 1 つのウェルにコーティングして、ELISA により検討を行った (図 2、表 1)。4 種の抗原を混合して用いた場合にも AgM 抗原に対する反応が主に健常人群および患者血清群において高い値を示す要因となっていると推測される。しかしながら、高値が見られる健常人検体において抗原を混合して用いることによって AgM を単独で用いた場合に比べて若干低下する事が明らかとなった。このことにより、表 1 に示すように健常人群平均値に標準偏差の 2 倍を加えた値 ($Mean_H + 2SD_H$) をカットオフ値に設定したときの感度において各抗原を単独で使用した場合に比べて改善が見られた。

次に 4 種の抗原を組み合わせた場合、Hc6 を除いた 3 種、さらに AgH および AgM のみの組み合わせを用いて ELISA を行った。図 3 に示したように抗原を多く組み合わせた場合において健常人群の値が低下することが分かった。また、 $Mean_H + 2SD_H$ をカットオフ値として設定して感度などを算出すると感度において組み合わせ抗原が増えるとともに増大する傾向があることが分かった。さらに $Mean_H + 3SD_H$ をカットオフ値とした場合には AgH および AgM のみでは感度が著しく低いのにに対し、Hc1 を加えることにより、大きな感度の上昇が得られた。一方で、Hc6 を追

加した場合には感度の上昇は得られなかった。

これらの結果から、これまでに我々が同定してきた新規抗原 Hc1 および Hc6、特に Hc1、を AgH、AgM と組み合わせる使用することにより、感度が改善されることが明らかとなった。

さらに昨年度検討した部分タンパク質についても組み合わせの効果について検討を行った。AgM、AgH、Hc1 の部分タンパク質のうち、健常人群に比べて患者群において有意に高い反応を示したタンパク質を選び、検討を行ったが、組み合わせによる有意な感度等の増大が得られなかった。

AgM 抗原と健常人群血清との反応には AgM タンパク質の中央領域(AgM-F2)が関与することが我々のこれまでの解析から明らかとなっている。一方、患者群血清のうち、AgM と強い反応を示す血清検体は AgM の C 末端領域(AgM-F3)においてもその反応が維持されている。そこで、AgH、Hc1、Hc6 に AgM もしくは AgM-F3 を加えて検討を行った (図 4)。その結果、AgM-F3 に代えることによって健常人群において見られていた高値を低く抑えることができた。一方で患者群血清では高値を示す検体ではその反応性は AgM-F3 に代えても維持されていたが AgM を含めた混合抗原で中間の値を示す検体においては AgM-F3 へと代えることによってその値が低下する傾向があった。このことから、AgM に代えて AgM-F3 を用いることは若干の感度の低下につながる可能性があるが、健常人群でのバックグラウンドを低下させることができる。

2) リアルタイムPCRによる迅速診断法の開発

H. capsulatum 以外の真菌 37 種のうち、35 種ではリアルタイム PCR による増幅は認められなかったが、*Rhodotorula mucilaginosa* および *Ochroconis gallopava* においては 35 サイクル以降に若干の増幅が認められた (表 4)。また、検出感度の評価では、リアルタイ

ム PCR は 10 copies/reaction の標的遺伝子まで検出可能であった (図 5)

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 法の開発を進めてきた。本年度は複数抗原を組み合わせる感度等の改善が得られるかどうかについて検討を行った。その結果、既知の抗原タンパク質 AgM、AgH に加えて我々が同定してきた抗原タンパク質 Hc1、Hc6 を組み合わせることにより、単独で用いるよりもよりよい感度が得られることが明らかとなった。さらに AgM の部分タンパク質 AgM-F3 を AgM の代わりに加えることにより、健常人群で見られていた高値を低く抑えることが出来、さらなる検討を加えることによって感度を維持しながらバックグラウンドの低減がはかれる可能性を見いだした。

並行して、我々は、高感度かつ特異性の高いサイクリングプローブ法を用いて、*H. capsulatum* の Hc1 遺伝子の特異的に検出するリアルタイム PCR の開発を進めてきた。新たに設計したサイクリングプローブ (Hist1-probe3) とプライマー (hcN2F, hcN1R) を用いたリアルタイム PCR の検出感度は高く、10 copies/reaction まで検出可能であった。しかし、検出特異性の評価では *Rhodotorula mucilaginosa* および *Ochroconis gallopava* において若干の増幅が認められた。この増幅は 35 サイクル以降に認められたことから、非特異的反応である可能性が高く、今後、アニーリング温度などの PCR 反応条件を検討する必要があると思われる。

E. 結論

H. capsulatum の抗原タンパク質を組み合わせることにより、感度の上昇を、さらに AgM の部分タンパク質を組み合わせることによ

りバックグラウンドを低下させることができた。

また上記タンパク質のコード遺伝子を対象に新たに設計したサイクリングプローブ (Hist1-probe3) とプライマー (hcN2F, hcN1R) の検出感度は高く、10 copies/reactionまで検出可能であった。検出特異性は高かったが、ヒストプラズマ以外の真菌2種においてもわずかに増幅が認められたことから、今後さらなる改良を進め、迅速診断法の実用化につなげてゆきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

学会発表

1. なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

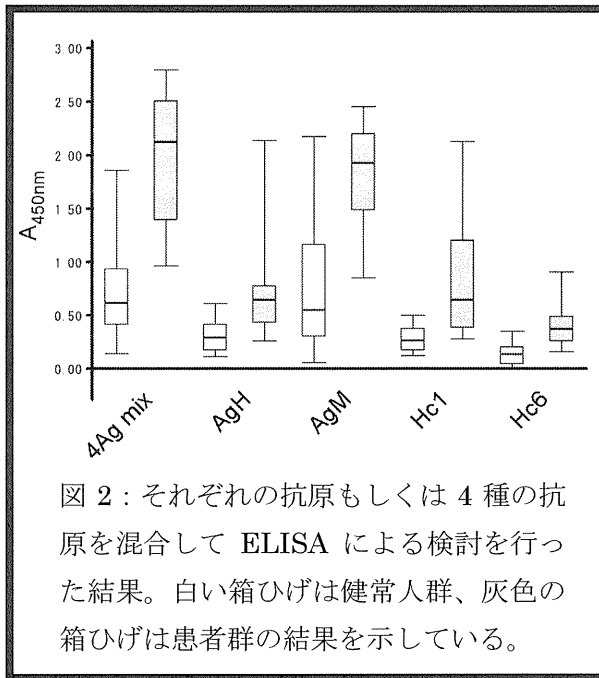


図 2：それぞれの抗原もしくは 4 種の抗原を混合して ELISA による検討を行った結果。白い箱ひげは健常人群、灰色の箱ひげは患者群の結果を示している。

表 1：抗原 4 種それぞれもしくは混合での ELISA における感度・特異度・陽性的中率・陰性的中率

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
4Ag mix	0.70	0.95	0.88	0.86
AgH	0.50	0.95	0.83	0.79
AgM	0.50	0.95	0.83	0.79
Hc1	0.60	1.00	1.00	0.83
Hc6	0.60	0.95	0.86	0.83

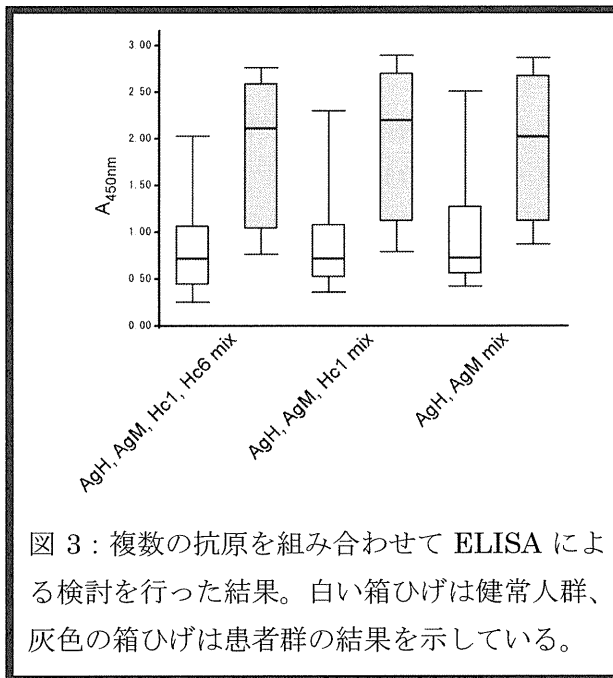


図 3：複数の抗原を組み合わせる ELISA による検討を行った結果。白い箱ひげは健常人群、灰色の箱ひげは患者群の結果を示している。

表 2：抗原 2 種、3 種もしくは、4 種混合での ELISA における感度・特異度・陽性的中率・陰性的中率

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
4Ag mix	0.64	0.95	0.88	0.83
AgH, AgM, Hc1	0.55	0.95	0.86	0.79
AgH, AgM	0.45	0.90	0.71	0.75

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
4Ag mix	0.45	1.00	1.00	0.77
AgH, AgM, Hc1	0.45	1.00	1.00	0.77
AgH, AgM	0.09	1.00	1.00	0.67

上の表はカットオフを $\text{Mean}_H + 2\text{SD}_H$ 、下の表は $\text{Mean}_H + 3\text{SD}_H$ とした場合の値

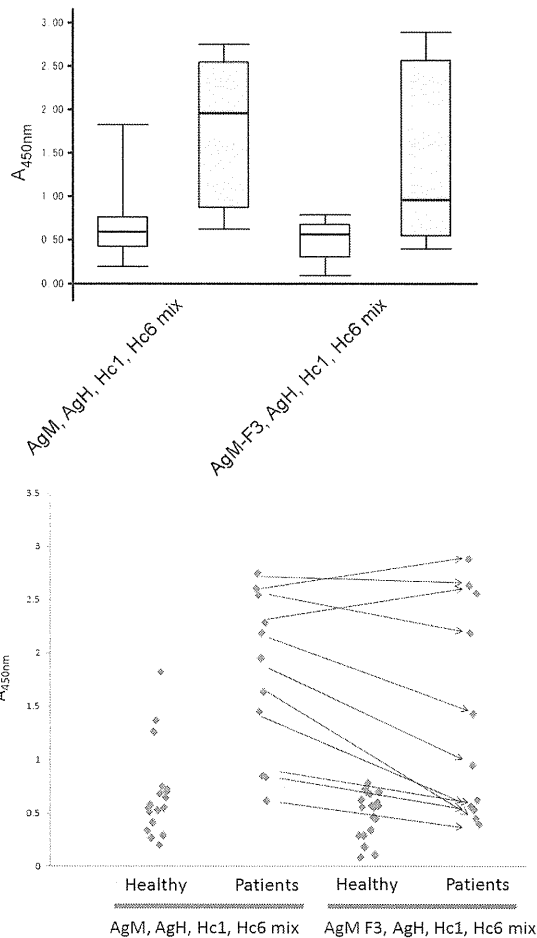


図4: AgH、Hc1、Hc6に加えて、AgMもしくはAgM-F3を組み合わせてELISAによる検討を行った結果。上のグラフは箱ひげ図で示したものの。白い箱ひげは健常人群、灰色の箱ひげは患者群の結果を示している。下のグラフはドットプロットで示したものの。

表3: AgH、Hc1、Hc6に加えて、AgMもしくはAgM-F3を組み合わせたELISAにおける感度・特異度・陽性的中率・陰性的中率

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Mixw/AgM	0.64	0.95	0.88	0.83
Mixw/AgM F3	0.55	1.00	1.00	0.80

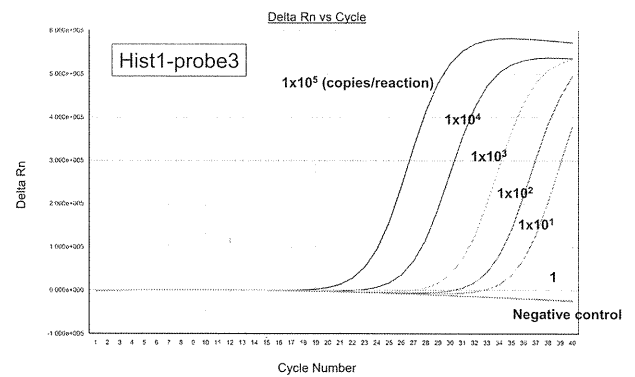


図5: 段階希釈したプラスミドDNAを用いたリアルタイムPCRの検出感度の評価。サイクリングプローブ (Hist1-probe3) とプライマー (hcN2 F, hcN1R) の検出感度は高く、10 copies/reactionまで検出可能であった。

表4：リアルタイムPCRの特異性の評価に用いた真菌の一覧とその結果

使用菌種	使用菌株数	リアルタイム PCR (Hist1-Probe3)	
		陽性数	陰性数
<i>Histoplasma capsulatum</i>	19	19	0
非 <i>Histoplasma</i> 属菌	40	2	38
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	4	0	4
<i>Aspergillus</i> spp. ^a	7	0	7
<i>Candida</i> spp. ^b	8	0	8
<i>Cryptococcus</i> spp. ^c	4	0	4
<i>Rhizopus oryzae</i>	1	0	1
<i>Absidia corymbifera</i>	1	0	1
<i>Rizomucor pusillus</i>	1	0	1
<i>Trichosporon asahii</i>	1	0	1
<i>Scedosporium apiosporium</i>	1	0	1
<i>Paecilomyces variotii</i>	1	0	1
<i>Malassezia furfur</i>	1	0	1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	1*	0
<i>Alternaria alternata</i>	1	0	1
<i>Penicillium islandicum</i>	1	0	1
<i>Sporothrix schenckii</i>	1	0	1
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1	0	1
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	0	1
<i>Exophiala dermatitidis</i>	1	0	1
<i>Ochroconis gallopava</i>	1	1*	0
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	0	1
<i>Schizophyllum commune</i>	1	0	1

*非特異反応、擬陽性の疑い

^a *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus versicolor*, ^b *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida lusitanae*, ^c *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus gattii*

真菌感染症の病態解明に基づく検査・治療法の確立と国内診断・
治療ネットワークの構築に関する研究

研究分担者 川上和義 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨 本研究では、真菌感染症の「難治病態の基盤・応用研究」を目的とし、エイズなど免疫低下を背景に発症するクリプトコックス症の発症病態解明を目指して、本真菌に対する免疫応答機構の解析を実施した。今年度は以下の点について明らかにした。1) *Cryptococcus neoformans* DNAには、既知のCpG-DNAとは異なる機序でTLR9依存性に樹状細胞を刺激する新規モチーフを有しており、新たな免疫アジュバントになりうる可能性が示唆された。2) *Card9*遺伝子欠損状態では、Th17細胞への分化が障害されることによって*C. neoformans* 感染が悪化することが明らかになった。3) *Card9*の上流で機能する*C. neoformans* の認識受容体の候補としていくつかの分子が浮かび上がった。4) *C. neoformans* 感染7日後には、肺内でエフェクターメモリーT細胞が検出され、IFN- γ 、IL-4、IL-17A産生能を有していた。

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。髄膜脳炎はたとえ標準治療を行った場合でも死亡率が2週後で12%、4週後で26%に達すると報告されており (*Clin. Infect. Dis.* 28: 82-92, 1999)、また、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位とも言われている (*AIDS* 16: 1031-1038, 2002)。

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（原発性肺クリプトコックス症）、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。

近年では、クリプトコックス症が、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知られている (*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。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いないのが現状であり、
その理解のためにはエイズの進行に伴い本真
菌に対する免疫記憶機構がどのように破綻す
るのかを明らかにする必要がある。

本研究では、真菌感染症の「難治病態の基
盤・応用研究」を行うことを目的とする。そ
のために、エイズなど免疫低下を背景に発症
するクリプトコックス髄膜脳炎の発症病態解
明を目指して、本真菌に対する免疫応答機構
の解析を実施した。

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
満准教授より供与)、MincleKO マウス (九州
大学生体防御医学研究所 山崎 晶教授より
供与) を用いた。

2. *C. neoformans*

莢膜欠損株である Cap67 (Stuart M. Levitz 教
授, University of Massachusetts Medical School,
Worcester, MA、米国より供与)、及びその親
株である B3501 (K.J. Kwon-Chung 博士、
National Institute of Health, Bethesda, MD、米
国より供与) を potato dextrose agar (PDA) 培
地 (栄研化学、東京) にて 30°C で培養した。
実験によっては、臨床分離株である YC-11、
YC-13 も用いた。

3. *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
1x10⁶/ml の Cap67、B3501 を接種した。

4. 肺内生菌数

感染後経時的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、10 倍段階
希釈液を作製し、PDA 培地にて培養し生菌数
を測定した。

5. 肺内白血球の分離とフローサイトメトリ ー解析

感染後経時的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コラゲナー
ゼ、DNase と 37°C、60 分インキュベートし、
比重遠心法にて白血球分画を採取した。得ら
れた細胞を各種抗体で染色し、細胞内サイト
カイン産生及び、エフェクターT 細胞、メモ
リーT 細胞の肺内動態についてフローサイト
メトリーを用いて解析した。

6. *C. neoformans* 由来オリゴ DNA の合成

C. neoformans の病原因子である *URA5* 遺伝
子 (345 塩基) から得られた免疫刺激活性を有
する、あるいは有さない 20 塩基前後の長さの
オリゴ DNA (ODN) を合成した (表 1)。その
中で、免疫刺激活性のある ODN112、ODN111、

表1. 合成オリゴDNAの塩基配列

ODN111 (21 bases)	5'-ACGGTGAGGGCGGTACTIONATGG-3'
ODN112 (24 bases)	5'-CTATGGTCGGTGCGCCTCTCAAGG-3'
ODN113 (20 bases)	5'-TCAAGGGACGAATCGTCATC-3'
ODN121 (18 bases)	5'-AATCGTCATCATCGACGA-3'
ODN122 (21 bases)	5'-CGACGATGTCTCACCTCTGG-3'
ODN123 (18 bases)	5'-ACCTCTGGCAAGGCCATC-3'

ODN: synthesized oligo-DNA

ODN122 と、免疫刺激活性のない ODN123、
ODN112-GC を主に用いた。また、従来から知
られている CpG モチーフを有し、強い免疫刺
激活性のある CpG1826 も人工合成した。

7. 骨髄由来樹状細胞の刺激

マウスの大腿骨から採取した骨髄細胞を 10
ng/ml GM-CSF 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。BM-DCs ($1 \times 10^5/\text{ml}$) を Cap67 や B3501、各種 ODN とともに 24 時間培養し培養上清を回収し、サイトカイン濃度を ELISA にて測定した。また、BM-DCs に発現する CD40 をフローサイトメトリーにて解析した。

8. ITAMモチーフを有するCタイプレクチン受容体、免疫グロブリン受容体と *C. neoformans* との結合の解析

96 ウェルマイクロカルチャープレートに *C. neoformans* 由来マンノプロテイン (Stuart M. Levitz 教授より供与) をコートし、その上に Card9 をアダプター分子としてシグナル伝達に利用する可能性のある ITAM モチーフを有する C タイプレクチン受容体、免疫グロブリン受容体とヒト免疫グロブリン Fc 融合リコンビナントタンパク (佐賀大学 原 博満准教授より供与) (表 2) を反応させた後、HRP 標識

表2. ITAMモチーフを有する受容体

受容体	ファミリー	シグナル伝達
Mincle	CLR	FcRg
Clec2	CLR	HemiTAM
Clec9a	CLR	HemiTAM
MGL1	CLR	HemiTAM(?)
SIGNR3	CLR	HemiTAM
DCAR	CLR	FcRg
Clec5a	CLR	DAPI2
HuDCSIGN	CLR	HemiTAM
TREM1	Ig	DAPI2
TREM2	Ig	DAPI2
TREM3	Ig	DAPI2
LMIR2	Ig	FcRg/DAPI2
LMIR4	Ig	FcRg
LMIR5	Ig	DAPI2
LMIR7	Ig	FcRg
LMIR8	Ig	FcRg
SIRPB1	Ig	DAPI2

(CLR: Cタイプレクチン受容体、Ig: イムノグロブリン)

抗ヒト Ig 抗体とインキュベート後発色基質を加えその発色の程度を測定することで、これらの結合の有無と程度を評価した。

9. 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。

10. 倫理的配慮

すべての動物実験は、事前に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 (2011 医動 86、研研 76) を得た上で実施した。関連法令を遵守し、動物は可及的に少ない頭数を用いるとともに、十分な麻酔を行い、人道的エンドポイントに達した動物は安楽死によって無用な苦痛が生じないように配慮した。

C. 研究結果

1. *C. neoformans* 由来 DNA による免疫刺激活性

これまでの研究により、*C. neoformans* の *URA5* 遺伝子の一部の塩基配列を有する 345 塩基対の DNA が BM-DCs 刺激活性を有すること、その中で BM-DCs 刺激活性を指標に 20 塩基程度のオリゴ DNA にまで絞り込んでいくと、ODN112、ODN111 のように活性を有するものと、ODN123 のように全く活性を示さないものがあることを明らかにしてきた。これまでの研究では Cap67 株のみで検討していたため、今回は B3501、YC-11、YC-13 のような他の株の *URA5* 遺伝子でも検討したところ、同様に BM-DCs からの IL-12 産生誘導活性を示した。また、*URA5* 遺伝子のみでなく *CNLAC1* や *CAP59* のような他の病原遺伝子についても解析を行ったところ、同様な活性が認められ、むしろ *CNLAC1* 遺伝子では *URA5* 遺伝子よりも強い活性が検出された。

2. *C. neoformans* 由来 DNA と従来の CpG モチーフとの比較検討

これまでの研究で最も高い活性を示した ODN112 の活性について、従来から知られていた CpG モチーフを有する ODN (CpG1826)

との比較を行った。CpG1826 は DNA 骨格のリン酸チオール (S) 化により活性が増強されるが、ODN112 を S 化すると逆に IL-12 産生活性が完全に消失した。次に、TLR9 に対する ODNs の作用部位を調べる目的で、高い活性を示す ODN112、ODN122、*C. neoformans* DNA、CpG1826 に過剰量である 10 倍量の活性を示さない ODN123 または、ODN112 の CG を GC に置換して不活性となった ODN112-GC を加えて IL-12 産生活性を測定した。ODN112 及び ODN122 に対しては競合する組み合わせや、逆に活性化する組み合わせがある一方、*C. neoformans* DNA と非メチル化 CpG-ODN の活性には全く影響を与えなかった。このように、ODN112 は、従来の CpG-ODN とは異なる機序で TLR9 を介した免疫機構の活性化を惹起する可能性が示唆された。

3. ODN112 の免疫アジュバント活性

我々が発見した *C. neoformans* DNA 由来の免疫刺激モチーフ (ODN112) が免疫アジュバント活性を有するか検討した。BM-DCs を suboptimal dose の Cap67、B3501、LPS、CpG1826、mannan、*Candida albicans* 細胞壁粒子状 β グルカン (OX-CA) で刺激する際に ODN112 を添加すると、単独刺激の IL-12 産生に比べて著明な増強効果がみられた。また、マウスの気管内に *C. neoformans* 強毒株である YC-11 を接種すると、肺内での IFN- γ 産生がみられず感染が悪化してマウスが死亡するが、このモデルに ODN112 を投与すると、CpG1826 ほどではないが明らかな IFN- γ 産生が観察されるようになった。これらの結果から、ODN112 には強力な免疫アジュバント効果を有することが明らかになった。

4. *C. neoformans* 感染防御免疫における Card9 の役割

昨年度までの研究により、Card9 が *C. neoformans* 感染防御免疫において重要な役割を担うことを明らかにしてきた。今年度はそ

の機序を明らかにするために解析を行った。Card9KO マウスと野生型マウスに B3501 を感染させた後 7 日目に摘出した肺から RNA を抽出し、RT-PCR 法により各種サイトカイン、ケモカイン、そして Th1、Th2、Th17 細胞分化の制御に深く関わる転写制御因子である T-bet、GATA3、ROR- γ t の mRNA 発現について検討した。図 1 に示すように、Card9KO マウスでは、Th1、Th2 サイトカイン及び、それぞれの転写制御因子である T-bet、GATA3 の発現には影響はみられなかったが、Th17 サイトカイン (IL-17A、IL-17F) とその転写制御因子の ROR- γ t については著明な発現低下が観察された。

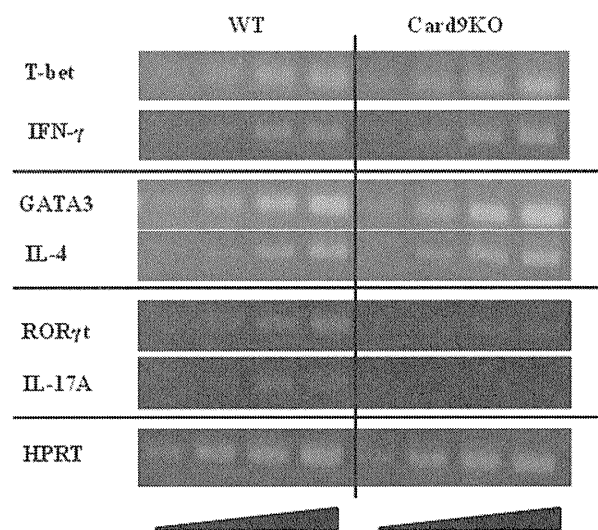


図1. Card9欠損によるTh1/Th2/Th17バランスへの影響

これらの結果から、Card9 が欠損することで、Th1、Th2 免疫応答には影響がないものの、Th17 細胞の分化が阻害されるためにクリプトコックス感染が悪化する可能性が示唆された。このことをさらに明らかにするために、感染 7 日後の肺から採取したリンパ球の細胞内に発現する IFN- γ 、IL-17A をフローサイトメトリーにて解析したところ、IFN- γ には大きな影響がなかったものの、CD4⁺T 細胞、NKT 細胞、 γ δ T 細胞における IL-17A の発現は Card9KO マウスで低下していた。こうして、Card9 欠損に

よるクリプトコックス感染後の Th17 免疫応答の低下が mRNA のみならず、タンパクレベルでも明らかになった。

5. *C. neoformans* 感染防御免疫における Card9 の上流受容体分子へのアプローチ

昨年度までの研究で、免疫系による *C. neoformans* の認識に Dectin-1、Dectin-2 が関係していないことを明らかにしてきた。Card9 が本真菌の感染防御に重要な役割を担うことから、表 2 に示す ITAM モチーフを有するいずれかの受容体分子が *C. neoformans* の認識に関与することが推測される。そこで、本研究では、表 2 の 17 種類のリコンビナント受容体・ヒト免疫グロブリン Fc 融合タンパク (C タイプレクチン受容体 [CLR] ファミリーの 8 種類及び、イムノグロブリン [Ig] ファミリーの 9 種類) を用いることで、これらのどの受容体が *C. neoformans* に結合するのかについて検討を行った。今回は、*C. neoformans* の代わりに、既に本真菌の主要な免疫刺激因子であることが分かっているマンノプロテインを用いてプレート結合アッセイにより評価した。これまでの結果に一致して、Dectin-1、Dectin-2 は結合を示さなかった。一方、CLR ファミリーの中で Mincle、SIGNR3、hu DCSIGN が明確な結合を示し、さらに Ig ファミリーの Trem2、LMIR5 が強い結合を示した。これらの結果から、Mincle、SIGNR3、hu DCSIGN、Trem2、LMIR5 が Card9 の上流で働く *C. neoformans* の認識受容体分子である可能性が示唆された。しかしながら、MincleKO マウス由来の BM-DCs を用いた実験では B3501、Cap67 刺激による IL-12 産生が影響を受けなかったことから、さらに詳細な検討が必要と考えられた。

6. *C. neoformans* に対するメモリーT細胞の検出

エイズの進行とともに発症するクリプトコックス症の発症病態を理解するためには、免

疫記憶機構がいかにして破綻するのかを明らかにする必要がある。本研究では、マウスモデルを用いることで、感染後経時的に摘出した肺からリンパ球を採取し、CD4⁺T 細胞中のエフェクターT細胞とメモリーT細胞についてフローサイトメトリーを用いて解析した。図2に感染7日後のCD4⁺T細胞の解析結果を示す。CD44^{bright}CD127⁻のエフェクターT細胞とともに、CD44^{bright}CD127⁺のメモリーT細胞が検出された。メモリーT細胞のほとんどはCD62Lであったことから、エフェクターメモリーT細胞が感染肺内で増加することが分かった。また、これらのT細胞のエフェクター機能を調べると、IFN- γ とともに、IL-4、IL-17A を発現する細胞も検出されたことから、Th1細胞のみならずTh2細胞、Th17細胞機能を有するエフェクターメモリーT細胞が感染肺に出現することが明らかになった。

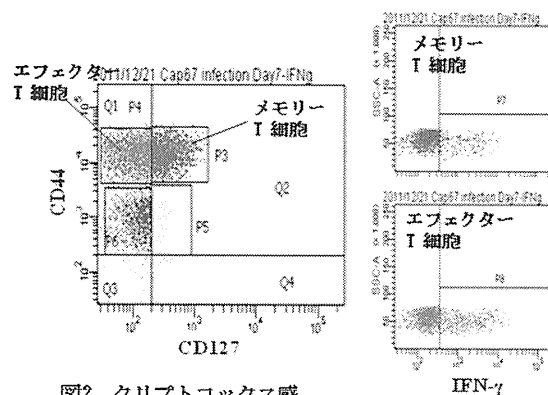


図2. クリプトコックス感染による肺内でのメモリーT細胞の検出

D. 考察

感染症の予後には、宿主の免疫状態が大きな影響を及ぼす。多くの真菌感染症は易感染宿主に発症するために、特に宿主の免疫状態との関連性が深い。病原真菌が感染すると、上皮細胞や自然免疫細胞と遭遇し、パターン認識受容体 (pattern recognition receptors: 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) の起点となり、その後の感染予後にも重要な影響を及ぼす。

PRRsには種々のものがあるが、これまで遺伝子欠損マウスを用いることでTLRsの役割が精力的に研究されてきた。カンジダやアスペルギルス感染においてTLR2やTLR4の関与が報告されてきたが、これら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。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らについても、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。

クリプトコックス感染では、TLR2やTLR4の役割について遺伝子欠損マウスを用いて解析され、TLR4は必須でないが、TLR2が欠損すると免疫応答に支障をきたし感染が悪化するとの報告がなされた (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た (Nakamura et al. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2006; 未発表データ)。さらには、*C. neoformans*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世界に先駆けて報告した (Nakamura et al. J. Immunol. 2008)。

さらに我々は、*C. neoformans* DNAの免疫刺激活性に必須のモチーフを検索した。*C. neoformans*の病原遺伝子URA5の一部をPCRで増幅した345塩基のDNAはBM-DC刺激活性を有していたが、従来から知られていたCpGモチーフを含んでいなかった。そこで、活性を有する領域から段階的に短いODNsを作成することで、最終的に約20塩基の刺激活性を示すODNs (ODN111、ODN112、ODN122など) および不活性のODN123が得られた (表1)。高い活性を示すODN112を中心に、その

特徴を古典的なCpG-ODN (CpG1826)と比較したところ、以下の3点について異なっていた。1) CpG-ODNを安定化させ活性を増強するDNA骨格のチオール化によりODN112の活性が消失した、2) DNAの細胞内への取り込みを促進するDOTAPによりODN112の活性は増強したがCpG-ODNでは影響がなかった、3) 過剰量の不活性ODN123の添加による影響がODN112とCpG1826とでまったく異なっていた。これらの結果は、ODN112とCpG1826はTLR9の結合において立体的配置が異なっていることを示唆している。これらの違いは、TLR9による*C. neoformans* DNA認識の機序を探る手がかりとなりうる。さらに、*C. neoformans* DNAから得られた活性型ODNsは、従来の古典的CpG-ODNとは作用が異なる免疫治療薬としての可能性が期待される。実際、今回の研究から、ODN112が強力な免疫アジュバント活性を示すことを明らかにすることができた。今後は、我々が発見した新規DNAアジュバントを用いた感染症や悪性疾患、アレルギー疾患などの治療・予防へ向けた臨床応用研究を推進したい。

*C. neoformans*は、他の真菌と同様細胞壁や莢膜にグルクロノキシロマンナン、ガラクトキシロマンナン、マンノプロテインなどの多糖を多く含んでいる。近年、病原微生物の多糖を認識するPRRsとしてCLRらに注目を集めている。我々もクリプトコックス感染とCLRらの関連性に注目し、まずは β -1,3-D-glucanの受容体として知られているDectin-1の遺伝子欠損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)。昨年度の研究では、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

割について同様の解析を行ったところ、やはり感染経過、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。そこで、さらに CLR の関与について探索する目的で、TLR に対する MyD88 のように、多くの CLR 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の著明な悪化が観察され、何らかの CLR の関与が示唆された。

本研究では、Card9 欠損による感染悪化の機序を探る目的で、Th1/Th2/Th17 バランスに着目して解析したところ、感染局所である肺内で Th17 細胞の分化が低下しているとの結果を得ることができた。こうして、Card9KO マウスでは Th1/Th2 バランスへの影響というより Th17 細胞への分化が障害されることによってクリプトコックス感染の悪化がみられるものと考えられた。興味深いことに、遺伝子異常により Card9 を発現できない家系が発見され、真菌感染に感受性が高いこと、Th17 細胞の分化に障害がみられることが報告されており (New Engl. J. Med. 361: 1727-1735, 2009)、ヒトでも同様な病態がみられる可能性が示唆された。Card9 の上流で機能する受容体分子はまだ明らかではないが、今回の検討から Mincle、SIGIRR (hu-DCSIGN)、Trem2、LMIR5 などいくつかの候補分子が浮かび上がってきたので、今後これらの関与についてさらに詳細な解析を行っていきたい。

近年では、クリプトコックス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。この新たな発症様式の理解には、エイズの進行に伴い本真菌に対する免疫記憶機構がどのように破綻するのかを明らかにする必要がある。しかしながら、クリプトコックス感染に伴う免疫記憶

機構の研究はほとんど行われていないのが現状であり、新たに基礎研究から開始する必要がある。本研究では、マウスモデルを用い、*C. neoformans* 感染後の肺内に出現するエフェクター T 細胞がコントラクションの時期を経てメモリー T 細胞へと移行していく過程を検出することから始めた。感染 5 日～7 日後には既にエフェクター T 細胞とともに、一部メモリー T 細胞が検出された。表面マーカーの解析からメモリー T 細胞のほとんどはエフェクターメモリー T 細胞であることが分かった。そのエフェクター機能を調べると、IFN- γ とともに IL-4、IL-17A を発現する細胞も検出されたことから、Th1 細胞のみならず Th2 細胞、Th17 細胞機能を有するエフェクターメモリー T 細胞が感染肺に出現することが明らかになった。しかしながら、通常のマウスを用いた解析では、検出されたメモリー T 細胞は *C. neoformans* に対するものとは限らず、正確な結果を得るためには限界がある。そこで我々は、*C. neoformans* の主要な T 細胞抗原であるマンノプロテインに特異的に反応する T 細胞受容体遺伝子を発現したトランスジェニックマウスの作製を試みている。このようなマウスを用いることで、より詳細な免疫記憶機構の解析と、免疫低下状態でこれらが破綻するメカニズムについてより効果的なアプローチできると考えている。

E. 結論

本研究により以下の点が明らかになった。

- 1) *C. neoformans* DNA には従来から知られている CpG-DNA とは異なる機序で TLR9 依存性に免疫系を刺激する新規モチーフを有しており、新たな免疫アジュバントになりうる可能性が示唆された。
- 2) Card9 遺伝子欠損状態では、Th17 細胞への分化が障害されることによって *C. neoformans* 感染が悪化することが明らかになった。Card9

の上流で機能する本真菌の認識受容体の候補として、シグナル伝達に ITAM モチーフが関与するいくつかの分子が浮かび上がった。

3) *C. neoformans* 感染 7 日後には、肺内でエフェクターメモリー T 細胞が検出され、IFN- γ 、IL-4、IL-17A 産生能を有していた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. 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.

2. Yamamoto H, Abe Y, Miyazato A, Tanno D, Tanaka M, Miyasaka T, Ishii K, Kawakami K: *Cryptococcus neoformans* suppresses the activation of bone marrow-derived dendritic cells stimulated with its own DNA, but not with DNA from other fungi. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 63: 363-372, 2011.

3. 川上和義: 真菌感染, 免疫の事典 (桂 義元, 河本 宏, 小安重夫, 山本一彦編集), 朝倉書店, 253, 2011.

4. 石井恵子, 川上和義: Toll様受容体による真菌の認識と免疫応答, 化学療法の領域, 28: 49-58, 2012.

学会発表

1. Kawakami K: The role of dectin-2 and a downstream signaling molecule, Card9, in the recognition and host immune response to cryptococcal infection, 8th International Congress of Cryptococcus and Cryptococcosis, Charleston, SC, USA, May 2011.

2. 石井恵子, 川上和義: クリプトコックス感染防御におけるパターン認識受容体の役割と発症病態における意義. 基礎・臨床シンポジウム 2: クリプトコックスとクリプトコックス症, 第55回日本医真菌学会学術集会, 東京, 2011年10月.

3. 笛 未崎, 阿部 譲, 山本秀樹, 原 博満, 石井恵子, 川上和義: クリプトコックスによるNKT細胞活性化とパターン認識下流分子の役割. 第22回日本生体防御学会学術総会, 那覇, 2011年6月.

4. 中村優里, 山本秀輝, 高橋友里恵, 阿部 譲, 石井恵子, 西城 忍, 岩倉洋一郎, 原 博満, 山崎 晶, 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22回日本生体防御学会学術総会, 那覇, 2011年6月.

5. 石井恵子, 田中三鈴, 川上和義: *Cryptococcus neoformans* DNA によるマウス骨髄樹状細胞の活性化機序. 第22回日本生体防御学会学術総会, 那覇, 2011年6月.

6. 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*. Workshop, 第40回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2011年11月.

7. Nakamura Y, Yamamoto H, Ishii K, Adachi Y, Ohno N, Saijo S, Iwakura Y, Hara H, Yamasaki S, Kawakami K: Limited role of Dectin-2 in the host defense to infection with *Cryptococcus neoformans*. 第40回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2011年11月.

8. Ishii K, Akahori Y, Takahashi Y, Nakamura Y, Kawakami K: Oligodeoxynucleotides from *Cryptococcus neoformans* activate mouse bone marrow-derived dendritic cells in a different manner from unmethylated CpG motif-containing oligonucleotides. 第40回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2011年11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