

研究成果報告書

- 研究課題名 :
- 研究代表者氏名 : 吉田 美智子
- 研究発表 (論文、著書、学会発表等があれば記載してください)

- **吉田 美智子**, 佐藤 光, 中畠 那奈, 佐藤 隼人, 大萩 玲奈, 丹野 寛大, 菅野 恵美, 石井 恵子, 菊池 敦生, 川上 和義. “新規潜在性クリプトコックス感染マウスモデルにおける Fingolimod (FTY720) 投与による内因性再燃の免疫機序の解明”. 2024 年 12 月 14 日, 第 8 回東北医真菌研究会.
- **Michiko Yoshida**, Nana Nakahata, Hayato Sato, Reina Ohagi, Ko Sato, Emi Kanno, Hiromasa Tanno, Keiko Ishii, Tetsuji Aoyagi, Atsuo Kikuchi, Kazuyoshi Kawakami. “Immunological mechanism behind reactivated cryptococcosis in persistently infected mice following FTY720 treatment” 2025 年 2 月 1-2 日, Tropical Infectious Diseases Gordon Research Seminar, Oral presentation and Poster presentation.
- **Michiko Yoshida**, Nana Nakahata, Hayato Sato, Reina Ohagi, Ko Sato, Emi Kanno, Hiromasa Tanno, Keiko Ishii, Tetsuji Aoyagi, Atsuo Kikuchi, Kazuyoshi Kawakami. “FTY720-Induced Cryptococcosis Reactivation in Persistently Infected Mice: Mechanisms Uncovered” 2025 年 4 月 12-15 日, ESCMID Global 2025.

- 研究実績 (必要であれば図を用いても構いません)

本研究では、作成した新規潜在性クリプトコックス感染 (Latent cryptococcal infection: LCNI) マウスモデルを用いて、FTY720 投与によるクリプトコックス症の内因性再燃メカニズムを明らかにすることを目標とした。

1. クリプトコックス症の内因性再燃のメカニズム解析 (*in vivo, ex-vivo*)

これまでの実験で、LCNI マウスに FTY720 (「対照には滅菌蒸留水 : DW」) を経口投与し、内因性再燃が起こることを確認している。FTY720 投与 28 日時点で肉芽腫面積が縮小し、続いて肺内生真菌数が増加していた。そのため、投与 28 日より前に、免疫学的変化が起きていることが示唆された。そこで LCNI マウスに FTY720 を 7, 14, 21 日投与し、下記の解析を行った。対照群は DW 投与とした。

[1] .肺内 Th1 関連サイトカイン及び Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 測定 (図 1)

投与期間ごとに、肺ホモジネート上清中の Th1 関連サイトカインを測定した。FTY720 投与群では対照群と比べ、IFN- γ と IL-12p40 レベルが FTY720 投与後 14 日時点で有意に減少していた。しかし TNF- α レベルはどのタイムポイントでも両群共に低値であり、有意差も認めなかった。TNF- α レベルが低値であったことから、免疫細胞のリクルートメントを担う他の因子として、MCP-1 を測定したところ、FTY720 投与 7 日時点から対照群に比べ、FTY720 投与群で有意に減少していた。FTY720 投与により、肺内 IFN- γ と IL-12p40、および MCP-1 レベルが低下することで肉芽腫様組織の構造維持ができなくなり、クリプトコックス症の発症につながると推測された。

[2] .肺内 CD4 $^{+}$ T 細胞の解析 (図 2)

IFN- γ の主な供給細胞である CD4 $^{+}$ effector T cell (Teff) と effector memory T cell (Tem)、また Tem のリザーバーとしての役割を担う central memory T cell (Tcm) の解析を行った。FTY720 投与 7 日時点では、両群間で CD4 $^{+}$ Teff および Tem 細胞の実数に差はなかったが、14 日時点から FTY720 投与群では対照群に比べ、CD4 $^{+}$ Tem 細胞の有意な減少が認められた。21 日時点では、FTY720 投与群では対照群に比べ、CD4 $^{+}$ Tem 細胞に加え、Tcm 細胞と Teff 細胞も有意に減少していた。以上から、肺内 CD4 $^{+}$ Teff と Tem 細胞の減少が、肺中の IFN- γ レベル低下に寄与している可能性が示唆された。さらに、CD4 $^{+}$ Tcm 細胞の減少タイミングは Teff 細胞と同じであったため、FTY720 による二次リンパ組織からの移出阻害作用によるものと推測された。

[3] . CD4 $^{+}$ Teff および Tm 細胞の IFN- γ 産生能に対する FTY720 の影響 (図 3)

LCNI マウスの肺内白血球を *C. deneoformans* B3501 株で再刺激し, リン酸化 FTY720 (FTY720P) で刺激し, 上清中の IFN- γ 産生を測定した. コントロールは DMSO 刺激とした. 結果, IFN- γ 産生において, FTY720P は抑制効果を認めなかった (図 3A). 図 3 で CD4 $^{+}$ Teff および Tem 細胞数の減少が, 肺中の IFN- γ レベル低下に寄与しているかを確認するため, 21 日間の FTY720 投与後, 肺内白血球中の IFN- γ 陽性 CD4 $^{+}$ Teff および Tm 細胞を解析した. 両群で各細胞における IFN- γ 陽性率は同等であったが (図 3B), IFN- γ 陽性 CD4 $^{+}$ Tm 細胞数は, FTY720 投与群で対照群と比較して, 有意に減少した. 一方, IFN- γ 陽性 CD4 $^{+}$ Teff 細胞数は, 両群間で同等だった (図 3C). これらの結果から, FTY720 が CD4 $^{+}$ T 細胞の IFN- γ 産生能に与える影響はなく, CD4 $^{+}$ Tem 細胞の減少が肺中の IFN- γ レベルの低下を引き起こし, 内因性再燃に関与していることが示唆された.

2. CD4 $^{+}$ Tm 細胞数減少のメカニズム解析 (*in vivo, in vitro*)

[1] . CD4 $^{+}$ resident memory T cell (Trm) の解析 (図 4)

Chitin deacetylase 2 (Cda2) は, クリプトコックスの主要 T 細胞抗原である. Cda2-MHC class II Tetramer を用いて Cda2 特異的 CD4 $^{+}$ Tm 細胞を解析した. LCNI マウスに FTY720 を 14 日間投与し, Cda2 特異的 CD4 $^{+}$ Tm 細胞を解析したところ, FTY720 投与群は対照群と比べ, 割合および数の有意な減少が確認された (図 4A). 続いて, 肺中の Cda2 特異的 CD4 $^{+}$ Trm 細胞を解析したところ, FTY720 投与群は対照群と比べ, FTY720 投与後 14 日時点では Cda2 特異的 Trm 細胞の割合および実数ともに減少傾向にあり, 21 日時点では有意に減少していた (図 4B,C). これらの結果から, FTY720 は肺中の Cda2 特異的 CD4 $^{+}$ Trm 細胞の維持機構を阻害し, それが肺中の Cda2 特異的 CD4 $^{+}$ Tm 細胞減少に寄与する可能性が示唆された.

[2] . Th1 細胞分化過程に対する FTY720 の影響 (図 5)

CnT- II マウスの脾臓から CD4 $^{+}$ ナイーブ T 細胞を単離し, 抗 CD3 抗体, 抗 CD28 抗体, 抗 IL-4 抗体, IL-12p70, IL-2 と培養し, Teff 細胞へ分化させた. さらに, Teff 細胞をサイトカインフリーの培地で 3 日間培養し, 約 25% の CD4 $^{+}$ Tm 細胞の生成に成功した. Teff 細胞をサイトカインフリーの培地で培養する際に FTY720P を添加し, CD4 $^{+}$ Tm 細胞の割合および実数を解析したが, Tm 細胞の分化率と増殖能に対する FTY720P の影響は認めなかった. この結果から, FTY720 投与による LCNI マウスの肺内 CD4 $^{+}$ Tm 細胞減少は, CD4 $^{+}$ Teff 細胞から Tm 細胞への分化障害が原因ではないと考えられた.

3. 抗原提示細胞に対する FTY720 の影響 (図 6, 表 1)

対照群と比べ FTY720 投与群では, 肺ホモジネート上清中の IL-12p40 レベルが低下しており (図 1), FTY720 の抗原提示細胞への影響が考えられた. *C. deneoformans* B3501 株の莢膜成分は樹状細胞の活性化を阻害してしまう可能性が考えられたため, Tg 陰性マウスより作成した骨髄由来樹状細胞 (BM-DCs) を B3501 株の莢膜欠損株である *C. deneoformans* Cap67 株で刺激し, IL-12p40 産生量への FTY720P の影響を確認した. FTY720P 添加群ではコントロールよりも有意に IL-12p40 の産生が減少した. 微量液体希釈法で確認したところ, 本実験で用いた FTY720P と DMSO の濃度は *C. deneoformans* Cap67 株増殖への影響は認めなかった (表 1). 図 1 における肺内 IL-12p40 低下は, 樹状細胞に対する FTY720 の影響が示唆された.

本研究から推測される, クリプトコックス症における内因性再燃メカニズム

本研究により, クリプトコックス感染により誘導されたクリプトコックス特異的 CD4 $^{+}$ Tem 細胞によって潜在性感染が維持されることが示された. さらに, FTY720 による内因性再燃メカニズムとして, 以下のメカニズムが考えられた. FTY720 は CD4 $^{+}$ Tcm 細胞に直接的に作用し肺への遊走を阻害するほか, 肺におけるクリプトコックス特異的 CD4 $^{+}$ Trm 細胞維持機構を阻害し, 肺中のクリプトコックス特異的 CD4 $^{+}$ Tem 細胞数の維持を困難とし, 肺中の IFN- γ 総産生量を低下させる. FTY720 は樹状細胞に直接作用し, IL-12p40 産生を低下させ, Th1 様応答を减弱させる. さらに FTY720 は, MCP 1 産生を抑制し, 免疫細胞の肺への遊走を阻害する. これらにより, 肉芽腫が崩壊し, クリプトコックス症発症に至る.

図 1. FTY720 投与による肺内 Th1 関連サイトカイン及び MCP-1 の経時的变化

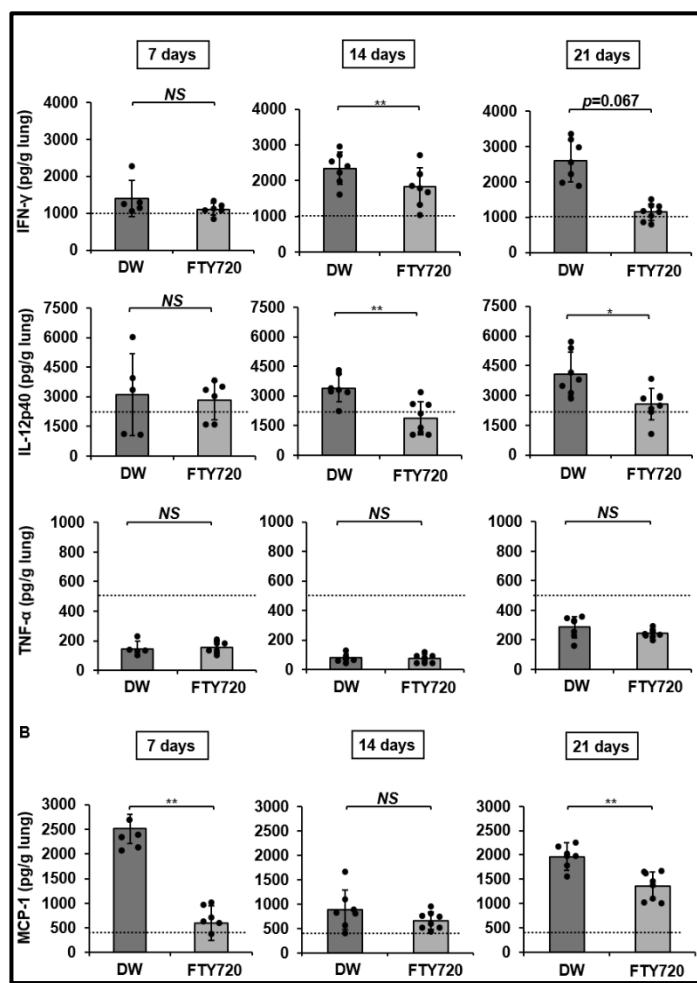


図 2. FTY720 投与による肺内 CD4⁺ T 細胞数の経時的变化

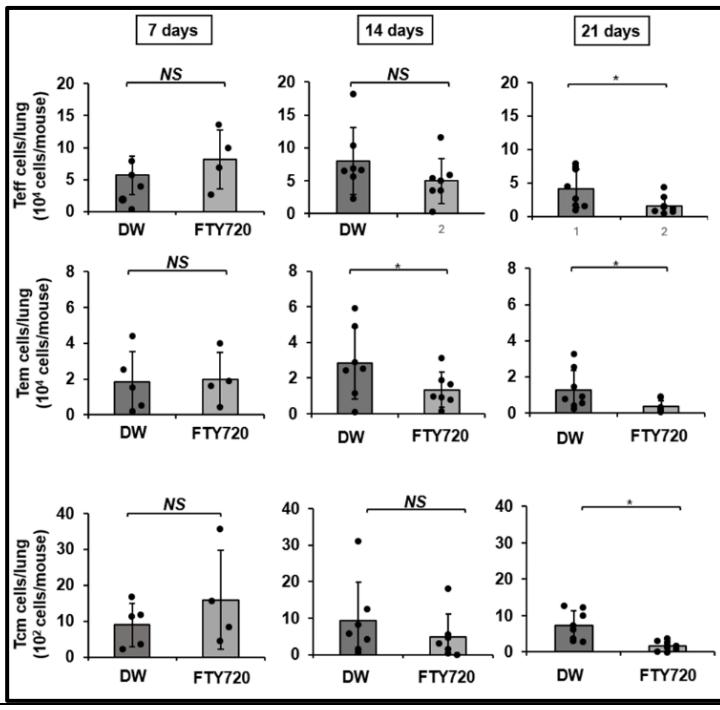


図3. CD4⁺ Teff および Tem 細胞の IFN- γ 産生能に対する FTY720 の影響

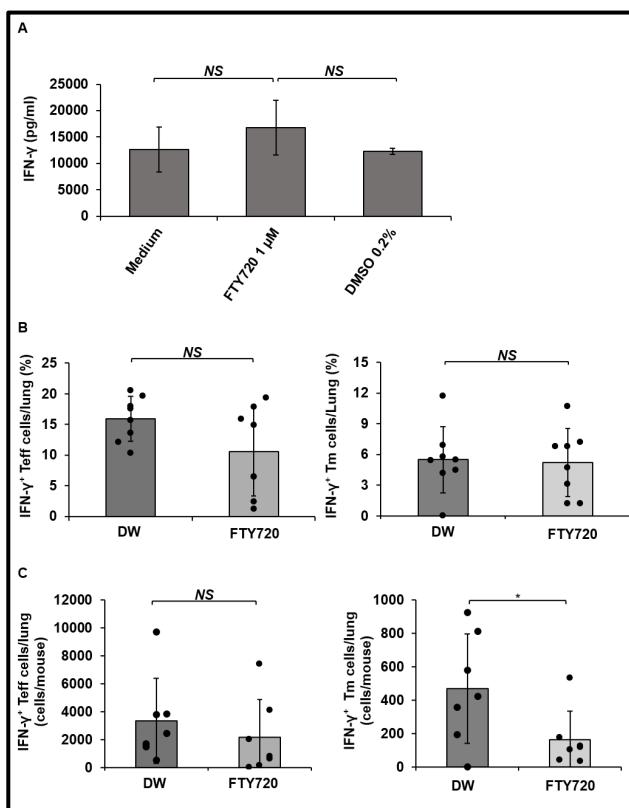


図4. 肺内 Cda2 特異的 CD4+ Trm 細胞数に対する FTY720 の影響

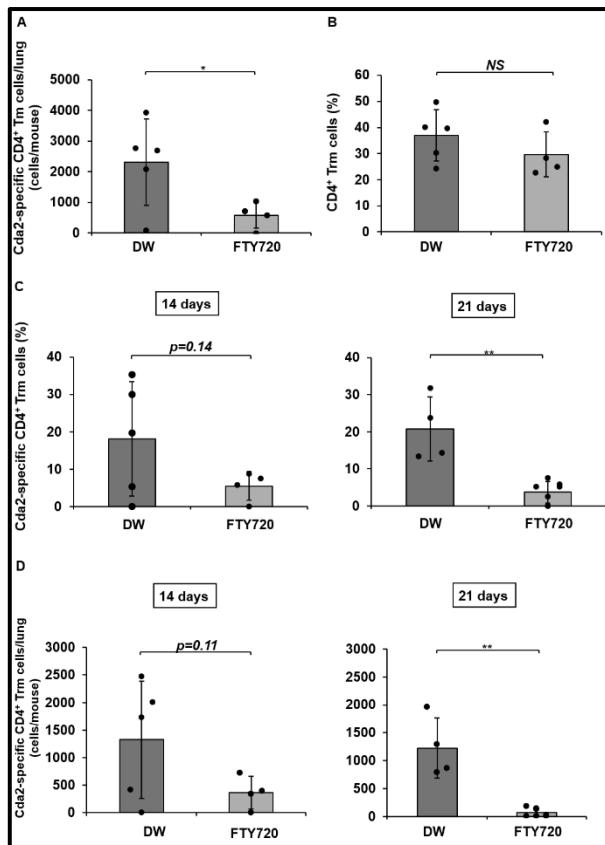


図 5. Th1 分化過程に対する FTY720 の影響

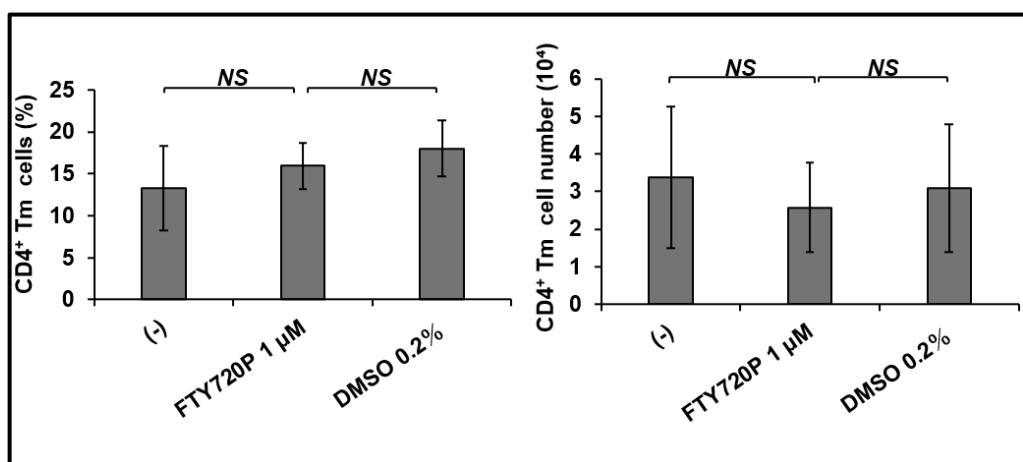


図 6. BM-DC の IL-12p40 產生能に対する FTY720 の影響

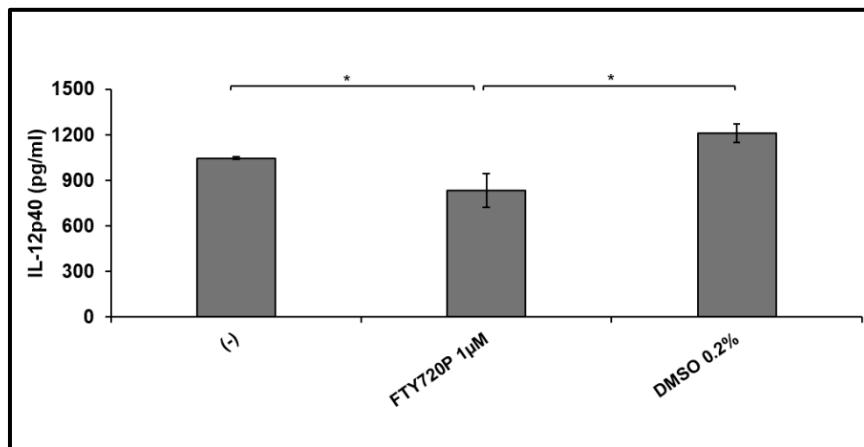


表 1. *C. deneoformans* Cap67 株に対する FTY720P の影響

←	B3501←	Cap67←
FTY720P (μM) ←	10 ←	10 ←
DMSO (%) ←	2 ←	2 ←
Amphotericin B ← (μg/ml, Clinigen Group plc, Burton-on-Trent, UK) ←	0.06 ←	0.03 ←

NS: not significant, *p < 0.05, **p < 0.01