

氏名	たんの だいき 丹野 大樹
学位の種類	博士 (保健学)
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 27 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 保健学専攻
学位論文題目	<i>Cryptococcus neoformans</i> による Dectin-2 経路の活性化とその責任分子の探索
論文審査委員	主査 教授 川上 和義 教授 賀来 満夫 教授 石井 直人

論文内容要旨

【目的】

Cryptococcus neoformans は環境中に存在する酵母様真菌であり、日和見真菌感染症として临床上問題となる。Yamamoto らはこれまで、真菌多糖を認識するパターン認識受容体 (PRRs) である C 型レクチン受容体 (CLRs) に着目し、CLRs のシグナル伝達の下流にある CARD9 がクリプトコックス感染防御において重要な役割を担うことを明らかにした (Infect. Immun. 2014)。さらに、Nakamura らは、Dectin-2KO マウスから採取した骨髄由来樹状細胞 (BM-DCs) とクリプトコックスの認識を解析した結果、樹状細胞が Dectin-2 を介して TNF- α と IL-12p40 の産生や CD86 や MHC クラス II の発現に関わることを明らかにし (Infect. Immun. 2015)、クリプトコックスの認識に Dectin-2 が関与することが推測された。一方、Ishikawa らの研究では、Dectin-2 はカンジダやマラセチアなどの真菌に対する免疫細胞の認識には関与するものの、クリプトコックスの認識への関与は確認されていない (Cell Host. Microbe. 2013)。今回私は、Dectin-2 が免疫系によるクリプトコックスの認識に関わるのかを明らかにすることを目的として研究を行った。加えて、クリプトコックス内の Dectin-2 のリガンドがどのような物質であるのかを明らかにすることを目的とした。

【方法】

Dectin-2 のプラスミドを発現した 2B4-NFAT-GFP レポーター細胞をクリプトコックス菌体あるいはマルチビーズショッカーで破碎した破碎成分 (Lysates) で 24 時間刺激し、GFP の発現をフローサイトメーターで解析した (Dectin-2-NFAT-GFP レポーターアッセイ)。 *C. neoformans* は B3501 (莢膜保有株)、Cap67 (莢膜欠損株) の 2 株を用い、陽性対照として heat-killed *Candida albicans* (HKCA) を用いた。クリプトコックス菌体を β -グルカナナーゼ で 37°C、24 時間インキュベートすることで細胞壁を破壊し、その上清を Dectin-2-NFAT-GFP レポーターアッセイで解析した。さらに、その上清を ConA アフィニティークロマトグラフィーを用いて粗精製した (ConA 結合画分)。これらサンプルを Dectin-2-ヒトイムノグロブリン (Ig) Fc 融合タンパク質とインキュベートし、HRP 標識抗ヒト IgG-Fc 抗体による酵素基質反応により吸光度を測定した

(Dectin-2 binding assay). 加えて, Dectin-2KO マウスから採取した BM-DCs と ConA 結合画分を 24 時間共培養し, 培養上清中の TNF- α と IL-12p40 を ELISA 法で測定した. 糖の環状構造を分解する過ヨウ素酸で Lysates を 4°C, 1 時間処理後, GFP レポーターアッセイで解析した. Lysates 刺激の際に過剰量の単糖 (グルコース, ガラクトース, マンノース) を添加し, その影響を解析した. クリプトコックスの主要なタンパク質抗原である 98kDa マンノプロテイン (MP98) でレポーター細胞を刺激し GFP の発現を解析した.

【結果】

Dectin-2-NFAT-GFP レポーターアッセイにおいて, Cap67 では高濃度の菌体刺激で弱い GFP 発現が誘導されたものの, B3501 菌体では誘導されなかった. 一方で, Lysates では両株とも HKCA と同等の GFP の発現が確認された. Cap67 Lysates の沈渣では GFP の発現がみられたが, 上清では発現はみられず, 加熱による影響も確認されなかった. 過ヨウ素酸処理は Lysates の GFP 発現を阻害した. 過剰量のマンノースの添加は GFP の発現を阻害したが, グルコース, ガラクトースではその影響はみられなかった. Dectin-2-NFAT-GFP レポーターアッセイにおいて, ConA 結合画分は β -グルカナーゼ処理上清よりも強く GFP の発現を誘導し, Dectin-2 binding assay では吸光度を増加させた. ConA 結合画分の BM-DCs 刺激により, Dectin-2KO マウスでは, 野生型マウスと比較し TNF- α と IL-12 p40 の産生が有意に低下することが確認された. MP98 はレポーター細胞の GFP 発現を若干ではあるが誘導した.

【結論】

本研究により, クリプトコックス内に Dectin-2 刺激経路を活性化するリガンドの存在が明らかになった. それは, 菌体表層ではなく, 細胞壁内に存在することが示唆された. リガンドは糖鎖構造を持つ物質, とりわけマンノースを持つ構造であることが示唆され, MP98 あるいはその類似の物質が候補として考えられた. リガンドの正確な構造を明らかにするため, ConA 結合画分を用いた詳細な構造解析が必要と考えられた. Dectin-2 の認識にクリプトコックスの細胞壁成分が関与することを明らかにした点は, CLRs の認識機構に新たな知見をもたらしたと考えられる.

審査結果の要旨

博士論文題目 *Cryptococcus neoformans*による Dectin-2 経路の活性化とその責任分子の探索

所属専攻・領域名 保健学専攻・基礎検査医科学領域

学籍番号 B4MD4002 氏名 丹野 大樹

真菌多糖を認識する新たなパターン認識受容体（PRRs）として C 型レクチン受容体（CLRs）が注目されている。酵母様真菌である *Cryptococcus neoformans* は、CLRs のうち Dectin-2 に認識されるとの報告がある一方で、Dectin-2-NFAT-GFP レポーター細胞を用いた報告では Dectin-2 によるクリプトコックスの認識は確認されておらず、未だ詳細は明らかにされていない。本研究は、Dectin-2 によるクリプトコックス認識の解明、および Dectin-2 リガンドの構造解析を目的として研究が行われた。

本研究は、莢膜保有株（B3501）と莢膜欠損株（Cap67）のクリプトコックス菌体あるいはその破砕成分（Lysates）を用い Dectin-2-NFAT-GFP レポーター細胞を刺激することで、クリプトコックスの細胞壁成分に Dectin-2 刺激経路を活性化するリガンドが存在することを明らかにした。さらに、Lysates 刺激の際の過ヨウ素酸処理実験および過剰量の単糖添加実験により、Dectin-2 リガンドが糖鎖構造を持つ物質、とりわけマンノースを持つ構造であることを明らかにした。 β -グルカナーゼ処理や ConA アフィニティクロマトグラフィーによりクリプトコックス菌体から ConA 結合画分として Dectin-2 リガンドを粗精製することに成功した。Dectin-2 欠損(KO)マウスの骨髄由来樹状細胞実験による ConA 結合画分の解析により、ConA 結合画分が Dectin-2 を介して樹状細胞の TNF- α と IL-12 p40 の産生に関与することを証明した。クリプトコックスのマンノプロテイン(MP98)の解析から、MP98 あるいはその類似の物質がリガンドの候補として考えられ、ConA 結合画分を用いた糖鎖構造の詳細な解析が今後の重要な課題と考えられた。

以上、本研究は、Dectin-2 によるクリプトコックスの認識を詳細に解析することで、Dectin-2 の認識にクリプトコックスの細胞壁成分が関与することを明らかにした。本研究成果は、CLRs による病原性真菌の認識機構に新たな知見をもたらすとともに、クリプトコックス感染の免疫病態を理解する上での重要な知見となるものと考えられる。加えて、クリプトコックス症における新規ワクチンアジュバントや治療法の開発、さらには新規機能性食品への応用も期待され、審査の結果、本論文内容が十分学位に値することが確認された。

よって、本論文は博士（保健学）の学位論文として合格と認める。