

医研第318号


(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway

(クリプトコッカス・ネオフォルマンズ由来 DNA は TLR9 依存性に骨髄系樹状細胞を活性化する)

氏名 仲村 究 

論 文 要 旨

【 背 景 と 目 的 】

クリプトコッカス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*) は 遍 在 す る 真 菌 の 一 つ で 経 気 道 感 染 し、AIDS など 免 疫 低 下 状 態 に あ る 患 者 で は 致 死 的 な 中 枢 神 経 系 感 染 を 来 す。ク リ プ ト コ ッ カ ス 感 染 防 御 に お い て、自 然 免 疫 系 の 細 胞 が ど の よ う な レ セ プ タ ー を 介 して 同 菌 を 認 識 す る の か に つ い て は 殆 ど 分 っ て い な い。こ れ ま で 我 々 は Toll-like receptor (TLR) 2 及 び TLR4 遺 伝 子 欠 損 マ ウ ス を 用 い 感 染 へ の 影 響 に つ い て 検 討 を 行 っ て い る が、い ず れ に お い て も 感 染 経 過 に 影 響 は 認 め な か っ た (参 考 論 文 1)。ま た、真 菌 の 細 胞 壁 に 存 在 す る β -D glucan を 認 識 す る レ セ プ タ ー で あ る Dectin-1 の 役 割 に つ い て も 検 討 し て い る が、同 様 に 影 響 を 認 め な か っ た (参 考 論 文 2)。こ れ ま で TLR シ グ ナ ル の 下 流 に 存 在 す る MyD88 の 遺 伝 子 欠 損 マ ウ ス に お い て は、明 ら か に ク リ プ ト コ ッ カ ス 感 染 の 増 悪 を 認 め

る事が報告されており (Infect Immun, 72(9), 5373-82, 2004)、TLR2 や TLR4 以外の TLR が宿主のクリプトコッカスへの感染防御において重要な役割を果たしている可能性が示唆されていた。今回我々は、クリプトコッカスの DNA が TLR9 によって認識される事を発見し、また TLR9 遺伝子欠損マウスにおいてクリプトコッカス感染が増悪する事を見出したので、これを報告した。

【方法】野生型もしくはそれぞれの遺伝子欠損型の C57BL/6 マウスの骨髄細胞を GM-CSF にて樹状細胞 (BM-DC) へと分化させ、in vitro の実験に用いた。サイトカイン産生を ELISA にて測定し、CD40 の発現をフローサイトメトリーにて測定した。TLR9 遺伝子発現系の実験では HEK293 細胞を用いてレポーターアッセイを行った。共焦点顕微鏡を用いて、クリプトコッカス DNA 及び CpG-DNA と TLR9 の局在を確認した。経気道的に莖膜を欠損したクリプトコッカス株を感染させ、野生型と TLR9 遺伝

子欠損マウスにて肺での菌数を比較した。

【結果】BM-DCはクリプトコッカスDNA刺激によって用量依存的にIL-12p40を産生し、またCD40を発現した。それらの活性化はTLR9及びMyD88依存的に行われた。この刺激はメチレーン処理によって一部阻害を受け、TLR9遺伝子を強制発現したHEK293細胞においてNF κ Bの活性化を認めた。クリプトコッカスDNAは、BM-DCとRAW264.1細胞においてエンドソーム内のTLR9の局在と一致し、その動態はCpG-DNAとも一致していた。感染実験ではTLR9遺伝子欠損マウスは野生型に比較し、肺内の感染後菌数が増加していた。

【結論】TLR9はクリプトコッカス由来DNAを認識する事で、宿主のクリプトコッカス感染防御において重要な役割を担っている事が示唆された。

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

報告番号	課程博 * 論文博	第 号	氏 名	仲村 究
論文審査委員		審査日	平成 20年 3月 10日	
		主査教授	鈴木 敏彦 (印)	
		副査教授	森 直樹 (印)	
		副査教授	西尾 誠久 (印)	
(論文題目)				
Deoxynucleic acids from <i>Cryptococcus neoformans</i> activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway				
(論文審査結果の要旨)				
上記論文に関して、研究にいたる背景と目的、研究内容、および研究成果の意義と学術的水準について慎重に検討し、以下のような審査結果を得た。				
1. 研究の背景と目的				
<p><i>Cryptococcus neoformans</i> は遍在する真菌の一つで経気道感染し、特に AIDS など免疫低下状態にある患者では中枢神経系感染をきたしやすいことが知られている。しかしながら宿主感染防御において、自然免疫系の細胞がどのように同菌を認識するのかについてはほとんど解明されていない状態にある。この様な背景の下、本研究は自然免疫系のレセプターである Toll-like receptor (以下 TLR) に着目し、特に TLR9 の役割について詳細な解析を行っている。</p>				
2. 研究内容				
<p>今回の研究で、<i>Cryptococcus neoformans</i> 由来の DNA が TLR9 および MyD88 依存的に認識され、また TLR9 遺伝子欠損マウスにおいて同菌の感染が増悪することが明らかとなった。マウスの骨髄由来樹状細胞 (以下 BM-DC) は、同菌の DNA を用いた刺激によって、宿主の感染防御に重要なサイトカインである IL-12 を DNA 濃度依存的に産生していた。また DNA 刺激によって補助刺激分子である CD40 の発現の増強を認めた。この刺激はメチレース処理によって一部阻害を受け、TLR9 遺伝子を強制発現した HEK293 細胞において NFκB の活性化を認めた。<i>Cryptococcus neoformans</i> 由来 DNA は、BM-DC と RAW264.1 細胞においてエンドソーム内の TLR9 の局在と一致し、</p>				

その局在は CpG-DNA と一致していた。マウスを用いた感染実験において、TLR9 遺伝子欠損マウスの肺内菌数は、野生型マウスにおける肺内菌数に比較し有意に増加していた。以上の点から、*Cryptococcus neoformans* の宿主感染防御における TLR9 の重要性が示唆された。

3. 研究成果の意義と学術的水準

本研究は、真菌である *Cryptococcus neoformans* 由来の DNA が、原核生物の DNA から見出された CpG DNA モチーフと同様に TLR9 依存性に認識されることを明らかにし、また同菌の肺感染における TLR9 の役割について明らかにした初めての報告である。

本研究は、*Cryptococcus neoformans* の自然免疫分野における宿主の感染免疫応答の解明の上で重要な研究であり、その研究成果は国際的にも認められた高水準のものであると評価される。

以上により、本論文は学位授与に十分値するものであると判断した。

- 備考
- 1 用紙の規格は、A 4 とし縦にして左横書きとすること。
 - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
 - 3 *印は記入しないこと。