

総 説

自然免疫リンパ球による真菌感染防御の協調的制御

金 城 武 士¹ 藤 田 次 郎¹ 川 上 和 義^{2, 3}

¹ 琉球大学大学院医学研究科分子病態感染症学分野（第一内科）

² 東北大学医学部保健学科検査技術科学専攻基礎検査学講座 病原検査学分野

³ 東北大学病院感染制御リサーチセンター

要 旨

クリプトコッカスはエイズや血液悪性疾患を代表とする免疫低下宿主に合併する日和見感染症である。近年、NK細胞、NKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞などによって構築される自然免疫はTh1-Th2バランスの方向性に多大な影響を与え、その後の獲得免疫の質を左右する重要なプロセスであることがわかってきた。クリプトコッカスの感染防御においてはTh1型免疫反応が重要であり、自然免疫が深く関与していることが推察される。本稿では自然免疫リンパ球、特にNKT細胞と $\gamma\delta$ T細胞に焦点を当て、そのクリプトコッカス感染防御における役割について自験データを中心にまとめた。

Key words: 真菌免疫 (antifungal immunity), クリプトコッカス (*Cryptococcus neoformans*), 自然免疫 (innate immunity), NKT細胞 (NKT cells), $\gamma\delta$ T細胞 ($\gamma\delta$ T cells)

1. はじめに

Cryptococcus neoformans（以下、Cn）は莢膜を有する酵母型真菌であり、土壌など自然界に広く生息する。空気中に飛散した菌体が経気道的に体内へ侵入し肺胞腔内に到達すると肺胞マクロファージによって貪食・殺菌されるが、一部はマクロファージの殺菌に抵抗して増殖を開始する。これに対し宿主側は肉芽腫性炎症反応を誘導して感染を終息に向かわせる。クリプトコッカスに対する感染防御は細胞性免疫が主体であり、これが著しく障害されるエイズや血液悪性疾患患者などでは感染は肺内に留まらず全身性、特に中枢神経系に播種してしばしば致命的となる。クリプトコッカスに対する感染防御は細胞性免疫が重要であり、CD4⁺T細胞、すなわちヘルパーT細胞（Th）が感染防御の中心的役割を果たす。これまでに我々は、Th1-Th2バランスが感染経過に大きく影響し、Th1型反応が優位になると感染防御に働き、逆に、Th2型反応が優位だと感染は増悪することを報告してきた¹⁻⁵⁾。

近年、様々な疾患においてTh1-Th2バランスが病態と深く関与し、また、Th1-Th2バランスの形成において自然免疫が重要な役割を担っていることがわかってきた^{6, 7)}。自然免疫は抗原非特異的な防御反応であり、病原微生物に打ち克つためには引き続いて起こる獲得免疫

による強力な免疫反応が必要であることから、これまで自然免疫は獲得免疫が誘導されるまでの単なる「つなぎ役」として捉えられてきた。しかしながら、近年の研究の進展に伴い、自然免疫細胞は未熟T細胞が分化する際のサイトカイン環境を形成することでその後のTh1-Th2バランスの方向性に決定的な影響を及ぼしていることがわかってきた。すなわち、自然免疫は単なる「つなぎ役」とどまらず、それ以後の獲得免疫の「質」までも規定する重要なプロセスとして捕らえられるようになってきたのである。

自然免疫の担当細胞として、好中球やマクロファージ（Mφ）、樹状細胞（DC）といった貪食、抗原提示細胞の他に、NK細胞、NKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、B1細胞などの自然免疫リンパ球がある。前述したように、クリプトコッカス感染防御においてはTh1-Th2バランスが重要であり、これら自然免疫細胞が重要な役割を演じていることが予想される。我々は自然免疫リンパ球であるNKT細胞と $\gamma\delta$ T細胞に焦点をあて、そのクリプトコッカス感染防御における役割について研究を進めてきた。本稿では、まず感染症におけるNKT細胞と $\gamma\delta$ T細胞の役割に関する研究を紹介し、さらにクリプトコッカス感染防御におけるNKT細胞と $\gamma\delta$ T細胞の役割について、自験データを中心に解説したい。

2. NKT細胞とは

NKT細胞は $\alpha\beta$ T細胞受容体とNK細胞受容体とともに発現した細胞集団で、マウスでは肝臓、骨髄、胸腺に多く存在（それぞれT細胞の30～50%、20～30%、10～

別刷請求先：川上 和義

〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町2-1
東北大学医学部保健学科検査技術科学専攻
基礎検査学講座 病原検査学分野

20%) しており, 肺や脾臓には数%と少ない⁸⁾. NKT 細胞にはいくつかのサブセットが存在することが知られているが, このなかでも CD1d 拘束性で T 細胞受容体の α 鎖が V α 14/J α 18, β 鎖が V β 8.2/V β 7/V β 2 のみに限定されている細胞群は V α 14⁺ NKT 細胞と呼ばれ, 主要なサブセットと考えられている^{9, 10)}. 海綿由来の糖脂質である α -galactosylceramide (α -GalCer) によって活性化されると早期に大量の IFN- γ を産生し Th1 型の反応を示すが, α -GalCer を複数回投与すると今度は逆に IL-4 産生により Th2 型の反応をする¹¹⁾. また, α -GalCer の疎水炭素鎖を短縮した化合物である OCH で刺激すると Th2 優位な反応を見せる¹²⁾. このように, V α 14⁺ NKT 細胞は刺激を受けると即座に大量の Th1 サイトカ

イン (IFN- γ) や Th2 サイトカイン (IL-4 など) を産生できることから, この細胞が Th1-Th2 バランスの形成に深く関与していることが予想され, また, このプロセスを人為的に制御できる可能性があり臨床応用を視野に入れた研究が盛んに行われている.

3. 感染とNKT細胞

NKT 細胞の生理的な意義については主に腫瘍免疫の分野で活発に研究され, 多くの知見が蓄積されている. 一方, 感染症における NKT 細胞の役割については十分理解されていないが, これまでにいくつかの病原微生物を用いた検討がなされている. これらの研究では, NKT 細胞の機能を解析するために, 分化成熟する際に必須な

Table 1. Role of MKT cells in the host defense against infection

	Microbe	Anti-CD1d, CD1KO or J α 18KO	α -GalCer	Reference
Protective	<i>Leishmania major</i>	Exacerbated	NT	Int Immunol. 2000; 12
	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Exacerbated	NT	J Immunol. 2000; 165
	<i>Plasmodium yoelii</i>	NT	Protected	Cell Immunol. 2001; 211
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Exacerbated	Protected	Infect Immun. 2002; 70
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Exacerbated	Protected	Eur J Immunol. 2003; 33
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Exacerbated	Protected	Nat Med. 2002; 8
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Exacerbated	Protected	J Immunol. 2001; 167 Infect Immun. 2001; 69
Not contributive	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Not exacerbated	(Protected)	Microbiol Immunol. 2002; 46 Infect Immun. 2002; 70
	<i>Salmonella choleraesuis</i>	Not exacerbated	NT	Hepatology. 1999; 29
Suppressive	<i>Listeria monocytogenes</i>	Protected	NT	J Immunol. 1999; 162
	<i>Toxoplasma gondii</i>	Protected	NT	J Med Invest. 2001; 48

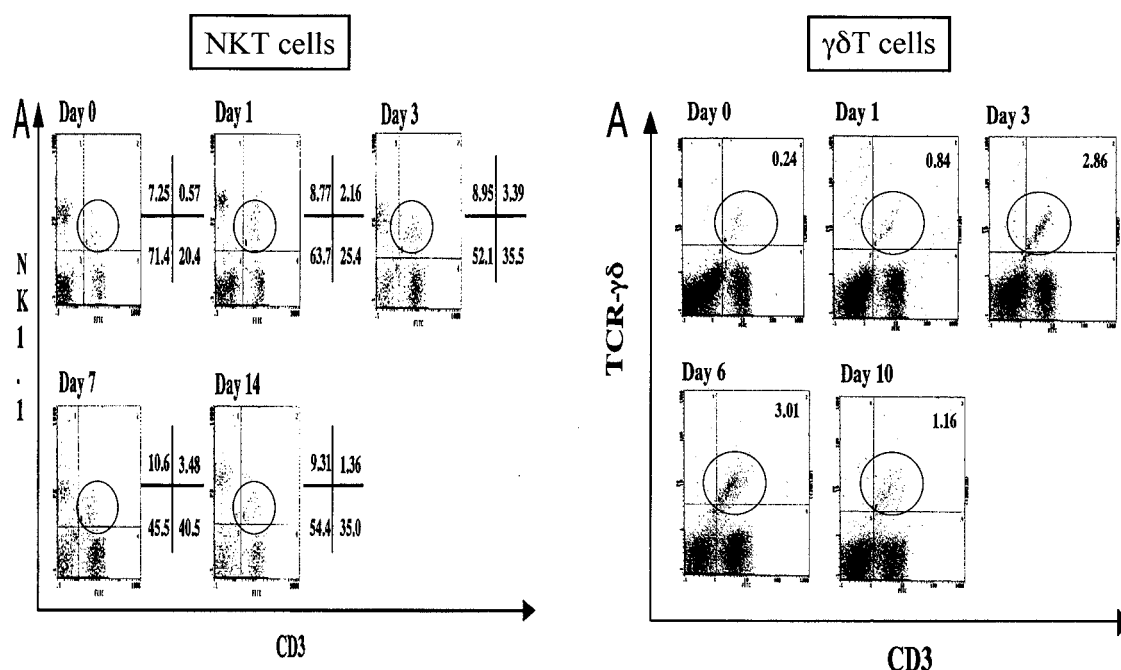


Fig. 1. Accumulation of NKT cells and $\gamma\delta$ T cells in the lungs after infection by *C. neoformans*.

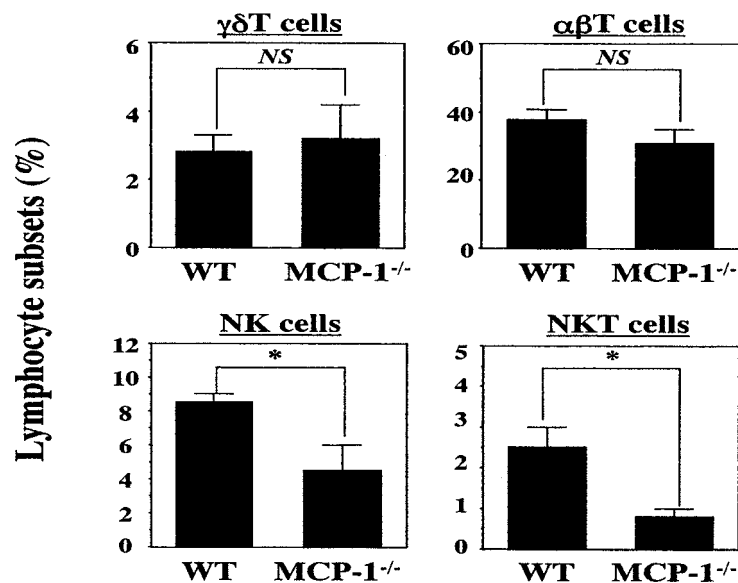


Fig. 2. Role of MCP-1 in the increase of NKT cells and $\gamma\delta$ T cells in the lungs after infection by *C. neoformans*.

CD1d 分子に対する抗体や遺伝子欠損 (CD1dKO) マウス, または $V\alpha 14^+$ NKT 細胞を欠損した $J\alpha 18$ 遺伝子欠損 ($J\alpha 18$ KO) マウスなどを用いている. さらに, $V\alpha 14^+$ NKT 細胞の活性化物質である α -GalCer を投与し, 感染経過へ及ぼす影響を調べている.

Table 1 に示すように, 感染防御における NKT 細胞の役割は大きく 3 つのグループに分類できる. すなわち, 1) 感染防御的に働くグループ, 2) 積極的な関与が見られないグループ, 3) 感染防御に抑制的に働くグループである. このように NKT 細胞が病原微生物によってその挙動を大きく変えるという現象は非常に興味深いところであるが, その機序は今のところ解明されておらず今後の研究を待たなくてはならない.

4. クリプトコッカス感染防御における NKT 細胞の役割

1) 感染肺での NKT 細胞の増加

まず, クリプトコッカス感染後の肺内におけるリンパ球の動態について調べた. その結果, NK 細胞, NKT 細胞, $\alpha\beta$ T 細胞のいずれも感染後 1 週目頃をピークに増加を示した (Fig. 1). 特に, NKT 細胞の増加が最も顕著であり, 他の細胞が 1.5~2 倍であったのに対して 5~6 倍の増加であった. $V\alpha 14^+$ NKT 細胞についても, 抗 $V\alpha 14$ 抗体陽性細胞, または α -GalCer-CD1d tetramer への結合細胞としてその増加が確認されている. こうして, クリプトコッカス感染後の肺において NK 細胞, $\alpha\beta$ T 細胞のみならず $V\alpha 14^+$ NKT 細胞も増加していることが示された.

2) NKT 細胞の集積における MCP-1 の役割

組織内での炎症細胞の増加には, 他のプールからの集積, または炎症局所での増殖という 2 つの機序が考えられるが, 我々は前者の可能性について検討を行なった. 炎症細胞の局所への集積がケモカインによって厳密に制

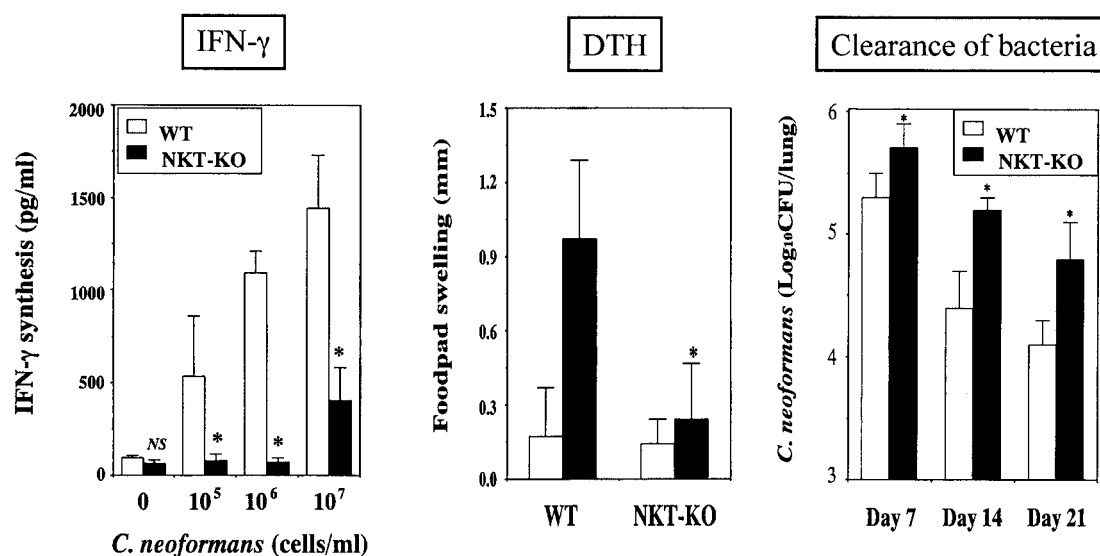
御されていることは周知の事実である. これまで NK 細胞の遊走に関わるケモカインについては多くのものが報告されているが, NKT 細胞に関しては MIP-2 のみが知られていた¹³⁾. 我々は macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1) の遺伝子を欠損した (MCP-1KO) マウスを用いて検討したところ, クリプトコッカス感染後の肺内における NKT 細胞あるいは $V\alpha 14^+$ NKT 細胞の集積が MCP-1KO マウスでは有意に減少していた (Fig. 2). この結果に一致して, 感染後の肺内では MCP-1 の産生がみられ, しかも NKT 細胞の増加に先立っていた. こうして, NKT 細胞の感染局所への集積に MCP-1 も関わっていることが明らかとなった¹⁴⁾.

3) Th1 型免疫反応誘導における NKT 細胞の役割

これまでの結果から, NKT 細胞は感染肺に集積することで何らかの役割を果たしていることが推察された. そこで次に我々は, $V\alpha 14^+$ NKT 細胞を欠損する $J\alpha 18$ KO マウスを用いてさらに解析を進めた. $J\alpha 18$ KO マウスでは, 野生型マウスに比べクリプトコッカス感染後の血清 IFN- γ 濃度が有意に低下しており, 肺内における IFN- γ 産生性 Th1 細胞の分化も障害されていた. この結果に一致して, $J\alpha 18$ KO マウスでは真菌抗原に対する遅延型過敏反応が減弱しており, また, 局所からの真菌の排除が有意に遅延していた (Fig. 3). これらの結果から, NKT 細胞はクリプトコッカス感染において Th1-Th2 バランスを Th1 へ傾けることで感染防御免疫に積極的に貢献しているものと考えられた.

4) α -GalCer を用いた NKT 細胞の活性化による感染防御効果

さらに我々は, α -GalCer を用いて $V\alpha 14^+$ NKT 細胞を活性化し, クリプトコッカス感染に与える影響について解析を行なった¹⁵⁾. α -GalCer 投与は感染マウスの自

Fig. 3. Role of NKT cells in the host defense against *C. neoformans* infection.Table 2. Role of $\gamma\delta$ T cells in the host defense against infection

	Microbe	Reference
Protective	<i>Klebsiella pneumonia</i>	J Immunol. 2000; 165
	<i>Escherichia coli</i>	Infect. Immun. 1998; 66
	<i>Listeria monocytogenes</i>	J Exp Med. 1992; 175
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Eur J Immunol. 1995; 25
	<i>Nocardia asteroides</i>	J Immunol. 1999; 162
	<i>Candida albicans</i>	Nat Med. 1995; 1
	<i>Leishmania major</i>	J Immunol. 1993; 150
	<i>Toxoplasma gondii</i>	J Immunol. 1995; 155
	<i>Chlamydia trachomatis</i> (early stage of infection)	Infect Immun. 1996; 64
Suppressive	<i>Listeria monocytogenes</i>	J Immunol. 2000; 165
	<i>Salmonella choleraesuis</i>	Infect Immun. 1995; 63
	<i>Candida albicans</i>	Infect Immun. 2001; 69
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	J Immunol. 2004; 172
	<i>Chlamydia trachomatis</i> (late stage of infection)	Infect Immun. 1996; 64

然免疫および Th1 型獲得免疫を著明に誘導し、産生された IFN- γ によって真菌の排除が亢進された。この過程には IL-12 が必須であったが、IL-18 は重要ではなかった¹⁶⁾。同様の報告がマウスマラリアモデルおよび緑膿菌モデルでも報告されており^{17, 18)}、難治性感染症への免疫療法の応用が期待される。

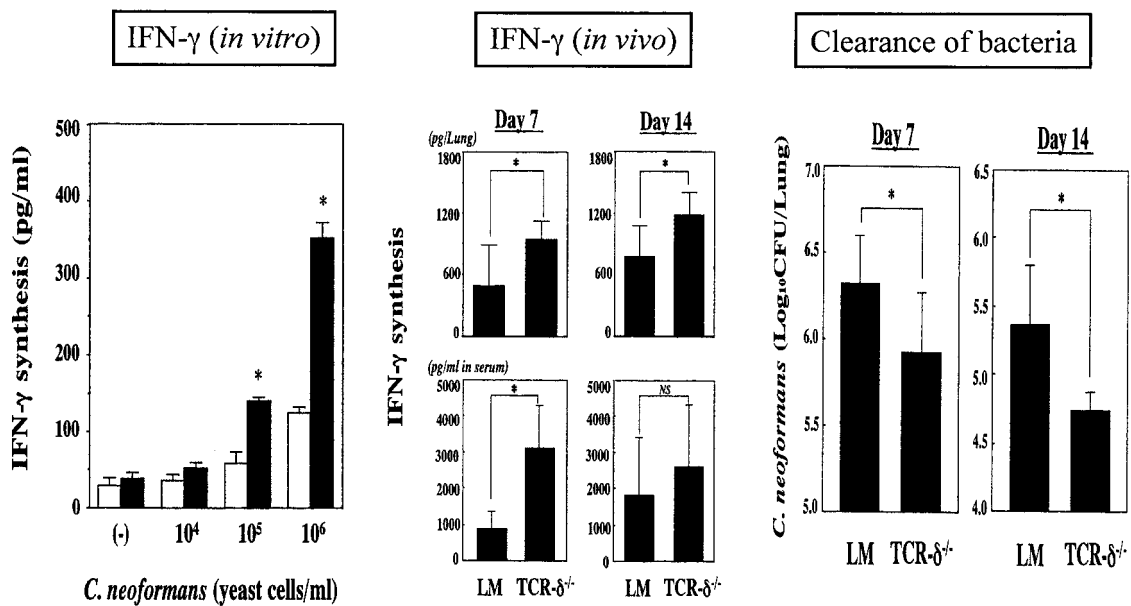
5. $\gamma\delta$ T 細胞とは

大部分の T リンパ球は α 鎖と β 鎖からなる T 細胞抗原レセプターを介して多様なペプチド抗原を認識することはよく知られている。しかし、TCR 遺伝子のクローニングの過程で α 鎖、 β 鎖とは異なる第 3 の TCR 鎖 (γ 鎖) が発見されたのを発端に、 $\alpha\beta$ 型 TCR 以外に γ 鎖

と δ 鎖の二量体からなる第 2 の TCR が存在することが明らかになった。 $\gamma\delta$ T 細胞も NKT 細胞と同様、 $\alpha\beta$ T 細胞に比べ多様性に乏しく、自然免疫リンパ球の 1 つである。 $\alpha\beta$ T 細胞がリンパ節や脾臓といったリンパ組織に多く存在しているのに対し、 $\gamma\delta$ T 細胞はむしろ上皮組織 (皮膚、腸管など) に多く存在している¹⁹⁾。

6. 感染と $\gamma\delta$ T 細胞

$\gamma\delta$ T 細胞は、大量の IFN- γ 産生能を有するなど多くの点で NK 細胞と似た性質を持っていたことから、当初は NK 細胞と類似した細胞であると考えられていた。しかしその後、Th2 サイトカインの産生能も有していることが明らかとなり、病原微生物に応じて選択的に Th1 ま

Fig. 4. Role of $\gamma\delta$ T cells in the host defense against *C. neoformans* infection.

たはTh2型反応を誘導することがわかってきた²⁰⁾. Table 2に, これまでに報告された $\gamma\delta$ T細胞の感染防御における役割をまとめてみた. $\gamma\delta$ T細胞もNKT細胞と同様, 病原微生物に応じてその挙動を変えているのは非常に興味深い, その詳細な機序は解明されていない.

7. クリプトコッカス感染防御における $\gamma\delta$ T細胞の役割

1) 感染肺での $\gamma\delta$ T細胞の増加

クリプトコッカス感染後, 肺内における $\gamma\delta$ T細胞の経時変化を調べた. Fig. 1に示すように感染後6日目頃をピークに増加しており, 感染前に比べると10倍以上の増加率であった. $\gamma\delta$ T細胞にはいくつかのサブセットがあることが知られているため, 我々は, さらにいくつかのサブセットについて, そのmRNA発現の経時変化をRT-PCR法を用いて調べた. その結果, 感染後の肺内でV γ 4, V γ 5, V δ 1, V δ 6の発現が増強しているのが観察された.

2) $\gamma\delta$ T細胞の集積におけるMCP-1の役割

次に我々は, MCP-1の関与についてMCP-1KOマウスを用いて検討した. NKT細胞とは異なり, 感染後の肺内における $\gamma\delta$ T細胞数はMCP-1KOマウスと野生型マウスとで差はなかった (Fig. 2). この結果から, $\gamma\delta$ T細胞の肺内への集積においてMCP-1はあまり関与していないことが示された.

3) クリプトコッカス感染における $\gamma\delta$ T細胞の役割

クリプトコッカス感染における $\gamma\delta$ T細胞の役割を明らかにするために, $\gamma\delta$ T細胞を持たないTCR- δ 遺伝子欠損 (TCR- δ KO) マウスを用いて検討を行った. 感染7, 14日後の肺内生菌数を比較したところ, 野生型マ

ウスよりもTCR- δ KOマウスで有意に菌の排除が亢進していた (Fig. 4). この機序を明らかにするため, 感染後の肺, 血清におけるIFN- γ 産生を比較したところ, TCR- δ KOマウスではIFN- γ 産生が有意に増加していた. さらに, Th2サイトカインであるIL-4とIL-10, またTGF- β についても同様の検討したところ, IL-4, IL-10については差が見られなかったものの, 感染後7日後のTGF- β 産生はTCR- δ KOマウスで有意に減少していた. これらの結果から, クリプトコッカス感染において $\gamma\delta$ T細胞はIFN- γ 産生を減少させ, さらにTGF- β 産生を増強することでTh1型反応を減弱させる方向に作用し, 感染を負に制御している可能性が示唆された²¹⁾.

8. おわりに

これまでの免疫研究は, 抗原特異的な獲得免疫を中心に発展してきた. しかし近年, 自然免疫の詳細な機構が解明されるにつれ多くの注目を集めるようになってきた. 感染免疫の分野においても, NKT細胞, $\gamma\delta$ T細胞をはじめとする自然免疫細胞がその後のTh1-Th2バランスに影響を与え, 獲得免疫の質をも左右しているという報告が数多くなされ, 自然免疫の重要性が再認識されてきた. しかしながら, 病原微生物に応じてこれらの自然免疫細胞の挙動が異なる理由など不明点が多く残っており, 今後の進展が望まれるところである.

文 献

- 1) Kawakami K, Tohyama M, Xie Q, Saito A: Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase mRNA in the lungs of mice infected with *Cryptococcus neoformans*: effects of interleukin-12. *Infect Immun* **65**: 1307-1312, 1997.
- 2) Koguchi Y, Kawakami K: Cryptococcal infection and Th1-Th2 cytokine balance. *Int Rev Immunol* **21**:423-

- 438, 2002.
- 3) Kawakami K, Tohyama M, Xie Q, Saito A: Interleukin-12 protects mice against pulmonary and disseminated infection caused by *Cryptococcus neoformans*. Clin Exp Immunol **104**: 208-214, 1996.
- 4) Kawakami K, Qureshi MH, Zhang T, Okamura H, Kurimoto M, Saito A: IL-18 protects mice against pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* by inducing IFN-gamma production. J Immunol **159**: 5528-5534, 1997.
- 5) Kawakami K, Koguchi Y, Qureshi MH, Miyazato A, Yara S, Kinjo Y, Iwakura Y, Takeda K, Akira S, Kurimoto M, Saito A: IL-18 contributes to host resistance against infection with *Cryptococcus neoformans* in mice with defective IL-12 synthesis through induction of IFN-gamma production by NK cells. J Immunol **165**: 941-947, 2000.
- 6) Fearon DT, Locksley RM: The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. Science **272**: 50-54, 1996.
- 7) Liew FY: TH1 and TH2 cells: a historical perspective. Nat Rev Immunol **2**: 55-60, 2002.
- 8) Godfrey DI, Hammond KJL, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG: NKT cells: facts, functions and fallacies. Immunol Today **21**: 573-583, 2000.
- 9) Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Kaer LV: NKT cells: what's in a name? Nat Rev Immunol **4**: 231-237, 2004.
- 10) Kronenberg M: Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. Annu Rev Immunol **26**: 877-900, 2005.
- 11) Taniguchi M, Harada M, Kojo S, Nakayama T, Wakao Hiroshi: The regulatory role of V α 14NKT cells in innate and acquired immune response. Annu Rev Immunol **21**: 483-513, 2003.
- 12) Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T: A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. Nature **413**: 531-534, 2001.
- 13) Faunce DE, Sonoda KH, Stein-Streilein JA: MIP-2 recruits NKT cells to the spleen during tolerance induction. J Immunol **166**: 313-321, 2001.
- 14) Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, Yara S, Miyagi K, Koguchi Y, Nakayama T, Taniguchi M, Saito A: Monocyte chemoattractant protein-1-dependent increase of V α 14NKT cells in lungs and their roles in Th1 response and host defense in cryptococcal infection. J Immunol **167**: 6525-6532, 2001.
- 15) Kawakami K, Kinjo Y, Yara S, Koguchi Y, Uezu K, Nakayama T, Taniguchi M, Saito A: Activation of V α 14⁺ natural killer T cells by α -galactosylceramide results in development of Th1 response and local host resistance in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun **69**: 213-220, 2001.
- 16) Kawakami K, Kinjo Y, Yara S, Uezu K, Koguchi Y, Tohyama M, Azuma M, Takeda K, Akira S, Saito A: Enhanced gamma interferon production through activation of V α 14⁺ natural killer T cells by α -galactosylceramide in interleukin-18-deficient mice with systemic cryptococcosis. Infect Immun **69**: 6643-6650, 2001.
- 17) Gonzalez-Aseguinolaza G, de Oliveira C, Tsuji M: α -galactosylceramide-activated V α 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. Proc Natl Acad Sci USA **97**: 8461-8466, 2000.
- 18) Nieuwenhuis EE, Matsumoto T, Exley M, Schileipman RA, Glickman J, Bailey DT, Corazza N, Colgan SP, Onderdonk AB, Blumberg RS: CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. Nat Med **8**: 588-593, 2002.
- 19) Lahn M: The role of $\gamma\delta$ T cells in the airways. J Mol Med **78**: 409-425, 2000.
- 20) Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H: Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells *in vivo*. Nature **373**: 255-257, 1995.
- 21) Uezu K, Kawakami K, Miyagi K, Kinjo Y, Kinjo T, Ishikawa H, Saito A: Accumulation of $\gamma\delta$ T cells in the lungs and their regulatory roles in Th1 response and host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. J Immunol **172**: 7629-7634, 2004.

Cooperative Regulation of the Host Defense to Cryptococcal Infection by Innate Immune Lymphocytes

Takeshi Kinjo¹, Jiro Fujita¹, Kazuyoshi Kawakami^{2, 3}

¹Department of Medicine and Therapeutics, Control and Prevention of Infectious Diseases,
Faculty of Medicine,, University of the Ryukyus,
207 Uehara, Nishihara, Okinawa 903-0215, Japan

²Division of Microbiology and Immunology, Department of Medical Technology, School of Health Sciences,
Faculty of Medicine, Tohoku University, and ³Infection Control Reseach Center, Tohoku University Hospital,
2-1 Seiryō-cho, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8575, Japan

Cryptococcus neoformans is an opportunistic fungal infectious pathogen in immunocompromised patients with acquired immunodeficiency syndrome and hematological malignancies. Recently, innate immune cells, such as NK, NKT and $\gamma\delta$ T cells, have been found critical for determining the quality of acquired immunity by affecting the direction of Th1-Th2 balance. Th1-type immune response is important for the host defense against *C. neoformans*, and innate immunity may involve this process. In the present review, the accumulated knowledge including our own data on the role of innate immune lymphocytes in the host defense to this fungal pathogen are summarized, focusing on NKT and $\gamma\delta$ T cells.

この論文は, 第49回日本医真菌学会総会の“シンポジウム4: 真菌感染と自然免疫”において発表されたものです.