

平成30年6月6日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09569

研究課題名(和文)14員環マクロライドのアジュバント効果の発見と、免疫記憶の向上と再感染の阻止

研究課題名(英文)Clarithromycin improves immune memory in influenza infection

研究代表者

高橋 悦久 (TAKAHASHI, Etsuhisa)

徳島大学・先端酵素学研究所(デザイン)・特任助教

研究者番号：10380065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザ感染において、クラリスロマイシンは粘膜免疫増強作用があることが報告されている。本研究では、マウスにインフルエンザA(H1N1)ウイルスを感染させてクラリスロマイシンを投与したときの免疫メモリーについて検証した。フローサイトメトリー解析では、クラリスロマイシンは長期免疫メモリーのセントラル/エフェクターメモリーT細胞の割合を増加させた。また、サイトカイン/ケモカインの産生を確認したところ、血清中で単球走化性タンパク質(MCP-1)誘導がクラリスロマイシンにより有意に抑制された。以上より、感染局所で単球やマクロファージの遊走を減少させ、炎症性細胞浸潤の抑制が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Clarithromycin used in combination with neuraminidase inhibitors, which are commonly used in treatment of influenza infection, has been reported to potentiate mucosal immunity. In this study, we examined the immune memory potentiating effect of clarithromycin in mice infected with influenza A (H1N1) virus. In flow cytometric analysis, clarithromycin increased the proportion of central / effector memory T cells in long-term immune memory. In addition, when the cytokine / chemokine produced was measured, induction of monocyte chemotactic protein (MCP-1) was significantly inhibited by clarithromycin. Furthermore, the amount of serum secretion of MMP-9, which degrades extracellular matrices, was shown to be significantly reduced. These results suggest that CAM suppresses the vascular permeability enhancement and prevents progression in severity.

研究分野：免疫学

キーワード：インフルエンザ マクロライド 免疫メモリー サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ感染時では抗インフルエンザ薬が広く用いられている。ウイルス増殖を抑制する反面、体内でできるウイルス抗原量の減少から不完全な獲得免疫を引き起こし、翌年の再感染率が増加する。これまでにクラリスロマイシン (CAM) がアジュバント効果を有し、粘膜免疫 IgA や全身を巡る血液中の IgG を増強させることを見出し、抗インフルエンザ薬と CAM の併用で獲得免疫が回復して再感染率が低下することを報告してきた。CAM の免疫反応増強機序として、抗原提示細胞でのシグナル伝達機序における B-cell activating of the TNF family (BAFF) の発現増強効果を明らかにしてきたが、免疫記憶機序における CAM の作用までは解析されていなかった。一方で、我々の報告を基に、カナダのグループが、タミフルが免疫メモリーの effector memory CD8+ T cell と central memory CD8+ T cell を抑制することを発表した(文献より引用)。

本研究ではこれらの研究を参考に、CAM 投与による獲得免疫増強効果を effector memory T 細胞と central memory T 細胞の視点から解析する。研究成果は、インフルエンザ感染以外の各種感染症でも、再感染を防御するために有益になると予想される。

2. 研究の目的

インフルエンザの治療にノイラミニダーゼ阻害剤のタミフル (OSV)、リレンザ (ZNV)、イナビル等が抗インフルエンザ薬として広く使用されている。これらの薬剤はウイルス増殖サイクルを抑制して症状を改善するが、ウイルス抗原量の低下は獲得免疫の感染メモリーの低下を引き起こし、翌年の再感染率が増加することを見出した。この獲得免疫の低下を克服する方法として、既存薬の 14 員環マクロライド、クラリスロマイシン (CAM) に免疫能を増加させる新規アジュバント効果を見出し、抗インフルエンザ薬と CAM の併用で翌年の再感染率が著明に減少すること初めて見出して報告した。本プロジェクトは、未だ全容の解明されていない CAM の免疫記憶向上のメカニズムを、局所免疫と全身免疫における免疫記憶のシグナル伝達系に焦点を当てて検討し、さらなる効果的なインフルエンザの治療法を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 免疫メモリーの解析

マウス (雌、離乳後の 4 週齢) に病原性の強い Influenza A/PR/8/34 (H1N1) 株 (PR8) を経鼻感染させて、薬物溶剤 (0.5w/v% Methyl Cellulose 400:MC) に溶解した CAM (150 µg/匹) を 1 回量として 1 日 2 回 12 時間間隔で経口投与した。コントロールとして MC を、ウイルス感染と同時に経口投与 (1 日 2 回) した。実験各群は 1 群 5 匹とした。CAM/MC は感染から 14 日間持続的に投与し、以降 3、5、

12 ヶ月間ウイルスとの接触が無い状態で飼育した。再感染には 50% 致死量の 250 倍から 400 倍の多量の PR8 を経鼻感染させ、再感染から 6 日後の臓器を摘出してリンパ球を分離後、FACS による解析を実施した。

(2) 炎症抑制効果の解析

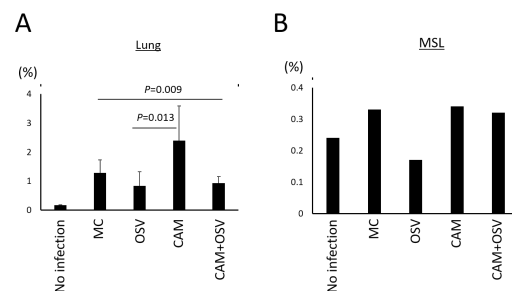
感染 0 日目と、ウイルス増殖がピークとなる 3 日目、感染重症化による多臓器不全が始まる 6 日目、更に 9 日目に剖検を行い、マウスの肺、心臓、血液を採取して、Pro-matrix metalloproteinase (MMP)-9、Activated-MM-9 の発現状況、各種炎症性サイトカインの発現を検討した。エバンスブルーの漏出による血管透過性の評価と HE 染色による炎症性細胞の浸潤のモニターを実施した。

4. 研究成果

(1) CD8+ T 細胞記憶応答における CAM の影響調査

初感染で軽度 PR8 を感染させ、直後から CAM、タミフル (OSV) を 14 日間経口投与した。肺と肺縦隔リンパ節 (MSL) からリンパ球を分離し、CD8+ 細胞について FACS 解析を行った。ウイルス増殖の場である肺では、インフルエンザウイルス HA (HA テトラマー) と反応する CD8+ 細胞の割合が OSV 単独群と比べて CAM 群で有意な増加が認められた (図 1A)。一方で、OSV/CAM 併用群と OSV 単独群間には有意差は認められなかった。所属リンパ節の MSL で同様の解析をしたところ、OSV 単独群に比べて CAM 単独群あるいは併用群では HA と反応する細胞が増加した (図 1B)。

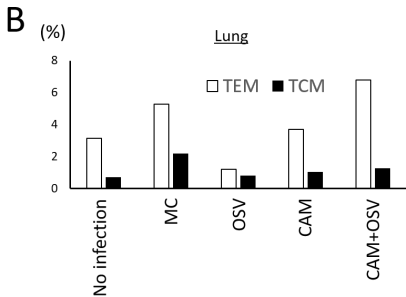
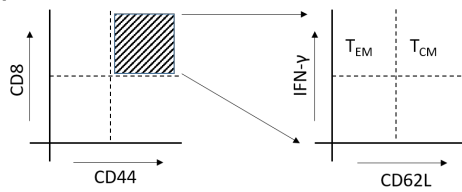
図 1



次に、肺における CD8+ 細胞で、抗原により活性化されて IFN- γ を発現している細胞にゲート (図 2A) を設定して、CD62L が低発現のエフェクターメモリー T 細胞 (TEM) と、CD62L が高発現するセントラルメモリー T 細胞 (TCM) を調べた。初感染から 12 ヶ月経過したマウスに高ドーズの PR8 を感染させて、肺から細胞を分離した。インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ サブユニット (PA) の合成ペプチドを培養液中に添加し、14 時間刺激後に FACS にて以下の解析を実施した。TEM、TCM ともに OSV 単独と比べて CAM 投与によりメモリー細胞が増加した (図 2B)。

以上の結果は 12 ヶ月後まで免疫メモリーが長期間保存されていることが証明された。次に、記憶された免疫によって産生された抗体

図 2
A



の交叉性を調べた。肺におけるウイルス PA のコピー数を調べた結果、CAM 投与群において感染早期からウイルス増殖が抑制されることが明らかとなった(図 3)。このときの IL-1、IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインも抑制されており、炎症の広がりが軽減されたことが示唆された(図 4) (* $P < 0.05$)。

図 3

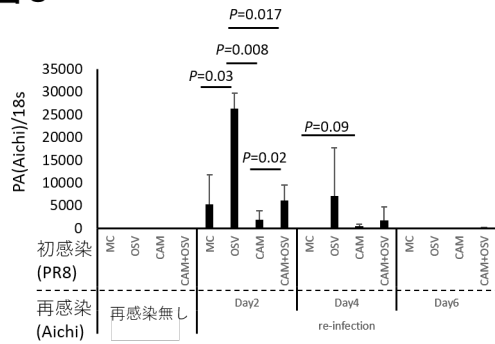
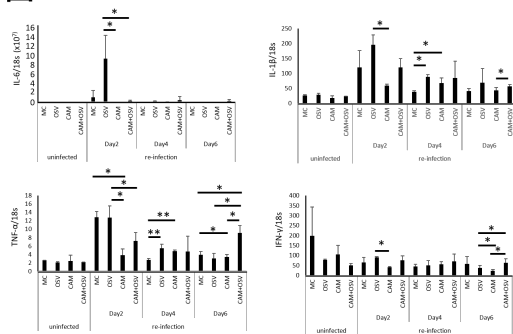


図 4



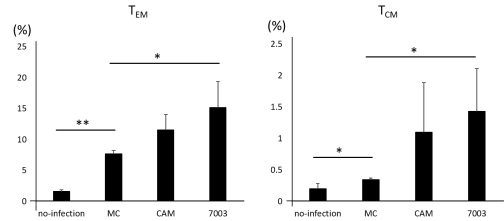
(2) CD4+ T 細胞記憶応答における CAM の影響調査

CD4+T 細胞は、同一の病原体による再感染から生体を守るメモリーCD4+T 細胞へと分化する。CD8+T 細胞と同様に CAM の免疫メモリー増強効果について検証した。

FACS にて CD4+T 細胞を分離するための表面マーカーとゲートを設定し、再感染 6 日後の肺から分離した細胞について TEM, TCM を調べ

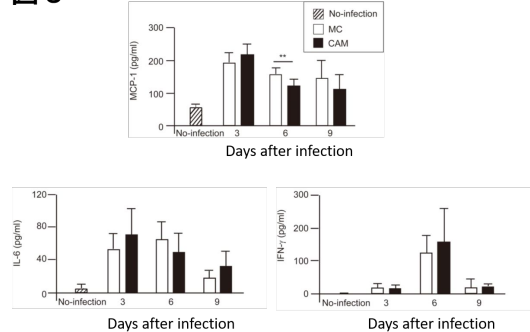
た。その結果、CAM を投与した群のポジティブ細胞の割合に増加が認められた。更に CAM から抗菌活性を除いた誘導体においても同様の増強効果が認められた(図 5) (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)。

図 5



(3) 炎症抑制効果について、CAM の影響調査肺と心臓では感染初期の 3 日目から、炎症性細胞の浸潤と血管透過性亢進の減少が確認できた。CAM を投与した群では、血清、肺、心臓における MMP-9 の発現量が抑制され、血清中では単球走化性タンパク質(MCP-1)の誘導が感染 6 日目に有意に抑制された(図 6) (** $P < 0.01$)。これらの結果は、CAM が IAV 感染において、MCP-1 と MMP-9 誘導を抑制することで炎症部位の単球やマクロファージ遊走を減少させ、基底膜では MMP-9 による型コラーゲン分解を抑制し、血管透過性亢進を伴う感染重症化を抑制すると示唆された。

図 6



本研究期間で、インフルエンザ感染時の CAM 投与が CD8+T 細胞、CD4+T 細胞において、免疫メモリーの増強に影響を与えるかについて検証した。結果として、CAM は最初のインフルエンザ感染から 3 ヶ月、6 ヶ月、1 年後の長期免疫メモリーを増強した。また、サイトカイン/ケモカインを測定したことで新たな治験として、CAM の単球走化性タンパク質(MCP-1)の誘導抑制効果を見出し報告した(文献)。

メモリーT 細胞には 2 つの異なる細胞群があるとされており、1 つはエフェクターメモリーT 細胞 TEM で、再刺激により速やかにサイトカインを産生するとされている。2 つ目はセントラルメモリーT 細胞 TCM で、lymph node homing receptor である L-selectin (CD62L) や CCR7 を発現する。これらの発現によってリンパ節や血液中への移行が速やかに行わ

れている。また、TCM は、エフェクター機能は低いが増殖能は高く、抗原で再刺激を受けるとエフェクターT細胞へと分化する。CAMは肺や肺縦隔リンパ節から分離した細胞でTEMとTCMとが増強された。この免疫メモリーは初感染から1年後にも続いており、これまでに報告してきた再感染リスクの軽減についてのメカニズムが明らかになりつつある。これまで、マウスに対するCAMの効果について、抗体産生能をヒトと比べた場合に効果が弱かった。そのため、免疫細胞の分布において有意差を見出すことが困難であった。データには示さないがCAMの投与量を2倍の1回300µgで1日2回としたとき、肺洗浄液と血液中の抗IgA抗体、抗IgG抗体の増加が認められた。今後、投与量を増やしてメモリー細胞の解析をした場合、よりCAMの効果が増強されることが考えられる。引き続き検討し、CAMの効果を確認にしたい。

<引用文献>

Marois I, et al. The administration of oseltamivir results in reduced effector and memory CD8+ T cell responses to influenza and affects protective immunity. *FASEB Journal* 2015 Mar;29(3):973-87.

Takahashi E, et al. Clarithromycin suppresses induction of monocyte chemoattractant protein-1 and matrix metalloproteinase-9 and improves pathological changes in the lungs and heart of mice infected with influenza A virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2018 Feb;56:6-13.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8件)

Hayashi H, Kubo Y, Izumida M, Takahashi E, Kido H, Sato K, Yamaya M, Nishimura H, Nakayama K, Matsuyama T. Enterokinase Enhances Influenza A Virus Infection by Activating Trypsinogen in Human Cell Lines. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018; 23;8:91.doi:10.3389/fcimb.2018.00091. 査読有

Takahashi E, Indalao IL, Sawabuchi T, Mizuno K, Sakai S, Kimoto T, Kim H, Kido H. Clarithromycin suppresses induction of monocyte chemoattractant protein-1 and matrix metalloproteinase-9 and improves pathological changes in the lungs and heart of mice infected with influenza A virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2018;56:6-13.doi:10.1016/j.cimid.2017.11.002. 査読有

Kim H, Kimoto T, Sakai S, Takahashi E, Kido H. Adjuvanting influenza hemagglutinin vaccine with a human pulmonary surfactant-mimicking synthetic compound SF-10 induces local and systemic cell-mediated immunity in mice. *PLoS One*. 2018;25;13(1):e0191133.doi:10.1371/journal.pone.0191133. 査読有

Shoji M, Woo SY, Masuda A, Win NN, Ngwe H, Takahashi E, Kido H, Morita H, Ito T, Kuzuhara T. Anti-influenza virus activity of extracts from the stems of *Jatropha multifida* Linn. collected in Myanmar. *BMC Complement Altern Med*. 2017;7;17(1):96. doi:10.1186/s12906-017-1612-8. 査読有

Yoshizawa T, Omori K, Takeuchi I, Miyoshi Y, Kido H, Takahashi E, Jitsuiki K, Ishikawa K, Ohsaka H, Sugita M, Yanagawa Y. Heat stroke with bimodal rhabdomyolysis: a case report and review of the literature. *J Intensive Care*. 2016; 1;4:71. 査読有

Kido H, Indalao IL, Kim H, Kimoto T, Sakai S, Takahashi E. Energy metabolic disorder is a major risk factor in severe influenza virus infection: Proposals for new therapeutic options based on animal model experiments. *Respir Investig*. 2016; 54(5):312-319.doi:10.1016/j.resinv. 査読有

Mizuno D, Kimoto T, Sakai S, Takahashi E, Kim H, Kido H. Induction of systemic and mucosal immunity and maintenance of its memory against influenza A virus by nasal vaccination using a new mucosal adjuvant SF-10 derived from pulmonary surfactant in young cynomolgus monkeys. *Vaccine*. 2016; 7;34(16):1881-1888.doi:10.1016/j.vaccine. 査読有

Shoji M, Arakaki Y, Esumi T, Kohnomi S, Yamamoto C, Suzuki Y, Takahashi E, Konishi S, Kido H, Kuzuhara T. Bakuchiol Is a Phenolic Isoprenoid with Novel Enantiomer-selective Anti-influenza A Virus Activity Involving Nrf2 Activation. *J Biol Chem*.2015;13;290(46):28001-28017. doi: 10.1074/jbc.M115.669465. 査読有

[学会発表](計 4件)

高橋悦久、澤淵貴子、木本貴士、堺 聡子、木戸 博インフルエンザAウイルス感染においてクラリスロマイシン投与によりMMP-9とMCP-1の発現誘導が抑制され、肺と心臓の炎症が軽減される。第90回日本生化学会大会;2017.12.6-9;神戸

高橋悦久、澤淵貴子、木本貴土、堺 聡子、木戸 博. インフルエンザ感染により発現増加する MMP-9 と MCP-1 はクラリスロマイシンの経口投与により抑制され、炎症が軽減される. 第 22 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会; 2017.8.11-12; 大阪

(3) 連携研究者 ()

研究者番号:

高橋悦久、Irene Lorinda Indalao、澤淵貴子、逸見 隼、牧野 聖也、狩野 宏、木戸 博. インフルエンザ感染において OLL1073R-1 株ヨーグルトは抗インフルエンザ薬によって引き起こされる獲得免疫の低下を回復させる. 第 89 回生化学大会 2016.9.25-27; 仙台

(4) 研究協力者 ()

高橋悦久、Irene Lorinda Indalao、澤淵貴子、富永ゆかり、木戸博. インフルエンザ重症化で発現増加する MMP-9 はクラリスロマイシンの投与により抑制される. 第 20 回病態プロテアーゼ学会学術集会; 2015.8.21-22; 名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 悦久 (TAKAHASHI, Etsuhisa)
徳島大学・先端酵素学研究所・特任助教
研究者番号: 10380065

(2) 研究分担者

()

研究者番号: