

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590145

研究課題名（和文）

スーパー抗原刺激したヒトリンパ球の増殖と制御性 T 細胞動態に及ぼす各種抗菌薬の効果

研究課題名（英文）

Effects of several antibiotics on proliferation and regulatory T cell frequency in human lymphocytes stimulated with superantigen

研究代表者

平野 俊彦 (HIRANO TOSHIHIKO)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90173252

## 研究成果の概要（和文）：

細菌由来スーパー抗原で刺激したヒト末梢血単核細胞（PBMC）では IL-2 産生量が持続的に亢進しており、その背景には mitogen-activated protein kinase（MAPK）の異常な活性化が関与している。しかしこのような異常と PBMC における制御性 T 細胞（Treg 細胞）動態との関連は明らかではない。免疫系の異常な活性化に伴う Treg 細胞の変動や、免疫抑制薬治療抵抗性の背景を明らかとすることにより、免疫抑制薬の効果が出にくい患者に対する新たな治療法の開発に有意義な示唆を与えるものと考えられる。そこで本研究は、スーパー抗原刺激した健常者 PBMC における T reg 細胞の解析、およびこれらの細胞に及ぼす種々の薬物の効果を検討した。細菌由来スーパー抗原や T 細胞マイトゲンで刺激した PBMC では、Treg 細胞率が増加した。そこで次に、同実験系における種々の抗菌薬、亜ヒ酸（As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>）、抗腫瘍薬、あるいは脂溶性ビタミンの効果を検討した。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> や各種抗腫瘍薬が PBMC 中の T reg 細胞率を増加させることを明らかとした。一方ロキシスロマイシンは、T reg 細胞の比率を変えずに JNK の活性を抑制して PBMC 増殖を抑えるものと思われた。また、脂溶性ビタミンのうち、ビタミン K<sub>3</sub> と K<sub>5</sub> が、PBMC 中の Treg 細胞の割合を顕著に増加させることを示した。さらに、SLE 患者の PBMC の免疫抑制薬感受性と Treg 細胞動態についても、関連を見出した。細菌由来スーパー抗原や T 細胞マイトゲンで刺激した PBMC には Treg 細胞が減少しており、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> やビタミン K<sub>3</sub> と K<sub>5</sub> には、Treg 細胞率を増加させて過剰な免疫反応を抑える作用があることを示唆した。

## 研究成果の概要（英文）：

It has been suggested by our previous studies that superantigen-stimulated human peripheral-blood mononuclear cells (PBMCs) show continuous IL-2 producing ability, possibly via elevation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity. However, it has still been unclear about relationship between these abnormal activations and the regulatory T (Treg) cell frequencies in PBMCs stimulated by bacterial superantigen or T cell mitogen. Such information would be useful for providing new strategies for overcoming clinical resistance to immunosuppressive therapy often observed in patients with autoimmune diseases. Then, we examined frequency of Treg in the superantigen-stimulated PBMCs, and the effects of several antibiotics, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, anticancer agents, and lipophilic vitamins. We showed that As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and anticancer agents increase the frequency of Treg cells in the activated PBMCs, whereas roxithromycin inhibits PBMC proliferation without influence on Treg cells, via inhibition of JNK activity. Among the lipophilic vitamins examined, vitamin K<sub>3</sub> and K<sub>5</sub> inhibited the PBMC proliferation via increase in Treg frequency in the activated PBMCs. We also found that there would be correlations between Treg frequencies and the sensitivities to immunosuppressive drugs

in PBMCs of SLE patients. Thus, we concluded that PBMCs stimulated with bacterial superantigen or T cell mitogen have decreased Treg frequencies, and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, vitamin K<sub>3</sub> and K<sub>5</sub> inhibit PBMC proliferation via promotion of Treg frequency in the activated PBMCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：細菌由来スーパー抗原、ヒト末梢リンパ球、制御性T細胞、抗菌薬、脂溶性ビタミン、ヒ素化合物、免疫抑制薬耐性

1. 研究開始当初の背景

免疫抑制薬は、自己免疫疾患や臓器移植の治療に繁用されるが、その治療効果が得られないまま重篤な副作用を発現する症例も少なくない。免疫抑制薬耐性の分子機序を解明できれば、耐性患者に有効な治療を考案できるものと考えられる。我々はこれまでに、患者末梢血単核細胞 (PBMC) の *in vitro* における免疫抑制薬感受性が薬物の治療効果と相関することを報告した (Hirano ら *Clin Pharm Ther* 1997, 1998, 2000, 2003年)。そこでPBMCの薬物感受性が高い患者には免疫抑制薬を減量して重篤な副作用を回避し、感受性が低い患者には薬物の増量もしくはより感受性の高い薬物を選択し得ると考えられる。しかし一方で、免疫抑制薬耐性を示す患者の場合選択可能な薬物が限られる。更に免疫抑制薬耐性の原因には不明な点が多いため、耐性機序を前提とした科学的根拠に基づく代替療法を行えないのが現状である。

免疫抑制薬耐性機序に関しては、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 由来のスーパー抗原による免疫系の刺激が、臨床のステロイド耐性を誘導する可能性が指摘されている (Haukら *J Allergy Clin Immunol* 2000年)。*S. aureus* 持続感染は、約25%の腹膜透析患者に認められており (Kreftら *Nephrol Dial Transplant* 1998年)、また我々もほぼ同じ割合の自己免疫疾患患者や慢性腎不全患者にステロイド耐性が発現することを報告している (Hiranoら *Int Immunopharmacol* 2007年)。細菌感染が免疫抑制薬感受性に影響を与える可能性は、アトピー性皮膚炎や乾癬でも指摘されている。さらに免疫異常のある患者では生体防

御機構も低下し、その結果細菌感染の危険性が高まるものと考えられる。

このように私は、免疫抑制薬耐性発現に常在菌の一つである *S. aureus* の持続感染が関係すると思え、H16-18年およびH19-21年の科研費補助金に基づく研究を行った。その結果、スーパー抗原刺激したPBMCがIL-2を持続的かつ多量に産生して増殖することを見出した。一方マクロライド系抗生物質は、スーパー抗原刺激したPBMCのIL-2産生やc-jun活性を抑制することを見出した。リファンピシン、ミノマイシン、あるいはリバピリンなどの抗菌薬や抗ウイルス薬にもPBMC増殖抑制作用があることを、予備的治験より得ていた。また興味深いことに、オフロキサシンがT細胞マイトゲンやスーパー抗原で刺激したPBMCの増殖を逆に促進するという知見も得た。さらには、低濃度 (0.1-1ng/ml) のシクロスポリンや亜ヒ酸も、マイトゲンやスーパー抗原で刺激したPBMCの増殖を1.5-2倍に促進した。このように私はH19-21年の基盤研究の中で、種々の薬物がマイトゲンやスーパー抗原で刺激したPBMCの増殖を抑制または促進することを見出している。

近年、活性化T細胞の機能を抑制する制御性T細胞 (T reg) の存在が提唱され、その病態生理学的意義に関心が寄せられている。T reg 機能の亢進は感染症の悪化や悪性腫瘍の進行に係わる一方、その機能の減弱は自己免疫疾患やアレルギーの発症と深く関連している。従って、T reg を操作することにより、様々な病態での免疫応答をコントロールできる可能性がある。T reg はリンパ球の約10%を占め、CD4、CD25などの表面抗原や転

写因子の FOXP3、あるいは 4 型葉酸受容体を発現しており (Yamaguchi ら *Immunity* 2007 年)、これらのマーカーでその動態を知ることが可能である。しかし細菌由来スーパー抗原で刺激した PBMC における T reg 数や、PBMC 増殖に及ぼす影響を詳しく調べた報告は少ない。スーパー抗原刺激した PBMC の増殖を制御する場合、IL-2 などのサイトカインを産生して免疫反応を展開するエフェクター T 細胞 (T effect) の機能を抑制するか、もしくは T reg 活性を上昇させる薬物が有用と思われる。上述のように私は、H19-21 年の科研費基盤研究で、このような可能性を有する抗生物質やヒ素化合物の免疫調節作用に関する基礎データを得た。そこでこれらの化合物が、スーパー抗原で刺激した PBMC における T effect あるいは T reg 数や機能に及ぼす効果を詳細に検討することは、細菌感染に基づく免疫抑制薬耐性発現機序をより鮮明にし、さらには過剰な免疫を抑えたり、あるいはその逆に制御性免疫の亢進に基づく免疫不全状態を改善し得る薬物療法を構築するための基盤創りにも貢献するものと思われた。

## 2. 研究の目的

以上のように、PBMC の *in vitro* における免疫抑制薬感受性は、薬物の治療効果と密接に関連することが種々の報告により明らかとなっている。従って、PBMC が *in vitro* において薬物耐性を示す場合、この薬物の治療効果にも耐性を示す可能性が高い。スーパー抗原刺激した PBMC は、副腎皮質ステロイド (GC) やシクロスポリンの増殖抑制効果に対し耐性を示すことがわかっているが (Konno ら *Transplant Immunol* 2007 年)、その背景の一つとして、スーパー抗原刺激による PBMC 中の T effect 機能の亢進、もしくは T reg 機能の低下が考えられる。そこでこれらの T 細胞を標的とした免疫抑制薬物療法を考案できれば、細菌感染に基づく免疫抑制薬耐性の患者に対する新たな治療法を開発することが可能となる。

以上のような背景をふまえ、本研究ではまず T 細胞マイトゲンで刺激した健常者 PBMC とスーパー抗原で刺激した健常者 PBMC 間で、増殖能、IL-2 産生量、および T effect/T reg 比を比較検討した。T 細胞マイトゲンで刺激した PBMC に比べ、スーパー抗原で刺激した PBMC は GC やシクロスポリンの抑制効果に応答し難いため、T effect/T reg 比が増加している可能性がある。また、免疫抑制薬、抗菌薬、抗ウイルス薬、あるいは教室で現有する 8 種のヒ素化合物の存在下に、T 細胞マイトゲンあるいはスーパー抗原で刺激した PBMC における細胞増殖および T effect/T reg 比を検討し、T reg 動態に及ぼすこれらの薬物の効果を調べた。細胞増殖率と T effect/T reg 比

との相関を調べ、それによって T reg 機能に及ぼす薬物の効果を考察した。また、全身性エリテマトーデス (SLE) 患者の PBMC を用いて同様の検討を行ない、臨床経過との関連や健常者 PBMC を用いて得られた結果との違いを検討した。

以上、本研究では細菌由来スーパー抗原で刺激したヒト PBMC における T reg 細胞数やその活性化の状態を調べ、その異常と免疫抑制薬耐性発現との関連を明らかとすることを目的とした。また、T effect と T reg を各々特異的に抑制または促進する薬物を、既に臨床で用いられている抗生物質、免疫抑制薬、ヒ素化合物、あるいは脂溶性ビタミンなどから抽出し、その臨床応用を目指す基盤を作ることを最終目標とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、細菌由来スーパー抗原で刺激した、ヒト PBMC における T reg 細胞数やその活性化の状態を調べ、その異常と免疫抑制薬耐性発現との関連を調べた。そこでまず、抗原刺激した PBMC 中の T effect や T reg のマーカーとなる CD4 抗原、CD25 抗原、FOXP3、あるいは GITR の発現を、特異的単クローン抗体による細胞染色とフローサイトメトリー法を用いて検討した。一方、抗原刺激した PBMC の増殖は、 $^3\text{H}$ チミジン取り込み量により算定した。次に、抗原刺激した PBMC の増殖に及ぼす種々の抗生物質、免疫抑制薬、あるいはヒ素化合物の効果を検討する。さらには、上記の測定系を用いて、T effect/T reg 細胞数比、あるいは T effect/T reg 細胞マーカー発現量に及ぼすこれらの薬物の効果を検討した。また、患者 PBMC 中の T 細胞マーカーと、患者の病態あるいは治療応答性との関連を調べた。

以下に測定法の詳細を述べる。

### 3-1. PBMC 中の Treg 細胞の測定法

*in vitro* において、T 細胞マイトゲンのコンカナバリン A で刺激した健常者 PBMC と、*S. aureus* 由来スーパー抗原の TSST-1 あるいは溶血性連鎖球菌由来スーパー抗原 SPEA で刺激した健常者 PBMC 間で、T effect/T reg 比や T reg 細胞の活性化マーカー発現量の経時的変動を比較検討した。さらには、これらの細胞マーカーと PBMC の増殖率との関連を検討した。PBMC の増殖は、増殖細胞への  $^3\text{H}$ チミジン取り込み量により算定した (Hirano T ら *Clin Pharmacol Ther* 2003 年)。T effect や T reg のマーカーとなる CD4 抗原や CD25 抗原、あるいは FOXP3 や GITR は、特異的単クローン抗体による細胞染色とフローサイトメトリー法 (Masuda ら *Int Immunopharmacol* 2009 年) により検討した。

### 3-2. PBMC 培養上清中のサイトカインの測定

抗原刺激した PBMC を 24~72 時間培養後、培養上清を採取し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。以上のようにして作成した PBMC 培養上清中に存在する 6~10 種のサイトカイン (IL-2、4、5、10、12、インターフェロン $\gamma$  などを含む) を、特異的単クローン抗体とフローサイトメトリーを用いたビーズアレイ法 (Kamogawa ら *Eur J Pharmacol* 2009 年) により検討した。

### 4. 研究成果

(1) T 細胞マイトゲンやスーパー抗原で刺激した健常者 PBMC におけるサイトカイン産生量や PBMC 中の T reg 細胞率に及ぼすマクロライド系抗生物質や亜ヒ酸 (As203) の効果を検討をした。in vitro において、T 細胞マイトゲンのコンカナバリン A で刺激した健常者 PBMC と、*S. aureus* 由来スーパー抗原の TSST-1 で刺激した健常者 PBMC の増殖は、増殖細胞への [ $^3\text{H}$ ]チミジン取り込み量により算定した。T reg 細胞のマーカーとなる CD4 抗原や CD25 抗原、あるいは FOXP3 や GITR は、特異的単クローン抗体による細胞染色とフローサイトメトリー法により検討した。また、細胞培養上清中の種々のサイトカイン (IL-2、4、5、10、インターフェロン $\gamma$ 、および TNF- $\alpha$ ) の濃度を、特異的単クローン抗体とフローサイトメトリーを用いたビーズアレイ法により検討した。

まずスーパー抗原またはコンカナバリン A で刺激した PBMC を、種々のマクロライド系抗生物質の存在下で 96 時間培養後、PBMC の増殖率を調べた。10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のロキシシロマイシン、クラリスロマイシン、あるいはアジスロマイシンは、コンカナバリン A や TSST-1 で刺激した健常者 PBMC の増殖を 30-70% 抑制した。中でもアジスロマイシンの効果は強く、PBMC 増殖に対する IC50 値は 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  未満であった。アジスロマイシンは 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で、PBMC からの培養上清中への IL-2、4、5、10、インターフェロン $\gamma$  および TNF- $\alpha$  の放出量を、65-98% 抑制した。一方、PBMC 中の T reg 細胞率に及ぼす種々の薬物の効果を検討したところ、As203 が 5  $\mu\text{M}$  で 96 時間処理した場合に、有意 ( $p < 0.05$ ) に PBMC 中の T reg 細胞率を増加させた (Fig. 1)。As203 は、抗原刺激した PBMC の増殖もほぼ同様の濃度で抑制した。

以上、コンカナバリン A や TSST-1 で刺激した PBMC の増殖や種々のサイトカイン放出に対し、マクロライド系抗生物質のロキシシロマイシンが強い抑制効果を示すこと、および As203 が PBMC 中の T reg 細胞率を増加させることを明らかとした。これらの結果から、マクロライド系抗生物質や As203 が、スーパ

ー抗原あるいは T 細胞マイトゲンで刺激した PBMC の増殖やサイトカイン産生を調節し得る可能性を提示した。

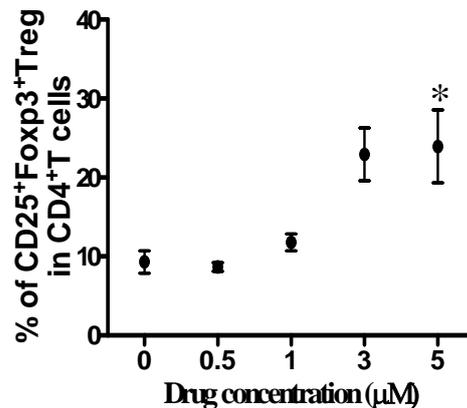


Fig.1 Percentages of CD4+CD25+Foxp3+Treg cells in concanavalin A-stimulated PBMCs cultured in the presence or absence of As203 for 96h (n=4). \* $p < 0.05$  as compared to control.

(2) マクロライド系抗生物質の免疫抑制作用機序をより詳細に知るべく、ロキシシロマイシンが PBMC 中の Treg 細胞動態や MAPK 活性に及ぼす効果を検討した。その結果、ロキシシロマイシンは、スーパー抗原刺激した PBMC における T reg 細胞の比率を変えるよりむしろ、同細胞の MAPK である JNK の活性を抑制することにより、PBMC 増殖を抑えるものと結論した。

次に、As203 が活性化 PBMC 中の Treg 細胞動態に及ぼす効果を、PBMC 培養の継時的により詳細に検討した。0.5-3.0  $\mu\text{M}$  の As203 は、PBMC 中の CD4 陽性細胞における Treg 細胞の割合を変えなかったが、5.0  $\mu\text{M}$  の As203 は 48 時間処理により PBMC における CD4 陽性細胞中の Treg の割合を有意に減少させた ( $p < 0.01$ )。一方 5.0  $\mu\text{M}$  の As203 は、72 時間処理により PBMC における CD4 陽性細胞中の Treg 細胞の割合を有意に増加させた ( $p < 0.05$ )。このように、As203 の Treg 細胞動態に及ぼす効果は作用時間に依存しており、作用時間が比較的短い場合は CD4 陽性細胞中の Treg 細胞の割合を減少させ、一方長い場合は逆に Treg 細胞を増加させるものと考えられた。この他、19 種の抗微生物薬やビタミン K が PBMC 増殖に及ぼす効果などを検討し、そのうちの幾つかに比較的強い免疫抑制性の作用があることを見出した。

そこでさらに、脂溶性ビタミンの効果の詳細に検討したところ、ビタミン K<sub>3</sub> と

K<sub>5</sub>が、PBMC中のTreg細胞の割合を顕著に増加させることを示した (Fig. 2)。一方、SLE患者のPBMCの免疫抑制薬感受性とTreg細胞動態についても、関連を見出した (未発表)。細菌由来スーパー抗原やT細胞マイトゲンで刺激したPBMCにはTreg細胞が減少しており、ビタミンK<sub>3</sub>とK<sub>5</sub>にはTreg細胞率を増加させて過剰な免疫反応を抑える作用があることを示唆した。

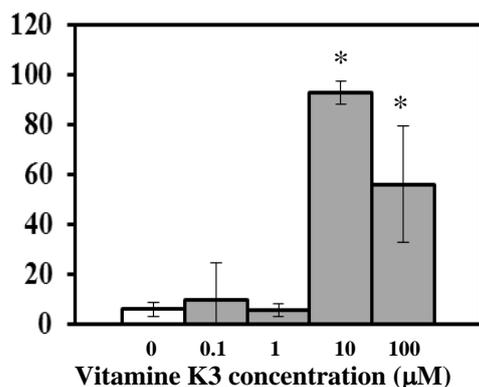


Fig. 2 Percentages of CD4+CD25+Foxp3+Treg cells in concanavalin A-stimulated PBMCs cultured in the presence or absence of VK<sub>3</sub> for 96h (n=10 from eight healthy volunteers). \*p<0.001 as compared to each control (VK 0 μM).

#### 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 5 件)

- 1) Masaki Maeda, Hidetoshi Ishii, Sachiko Tanaka, Kenji Onda, Toshihiko Hirano Suppressive efficacies of antimicrobial agents against human peripheral-blood mononuclear cells stimulated with T cell mitogen and bacterial superantigen. *Arzneimittelforschung* 60: 760-768; 2010.
- 2) Yoko Hiwatashi, Masaki Maeda, Hisayo Fukushima, Kenji Onda, Sachiko Tanaka, Hiroya Utsumi, Toshihiko Hirano. Azithromycin suppresses proliferation, interleukin production, and mitogen-activated protein kinases in human peripheral-blood mononuclear cells stimulated with bacterial superantigen. *J Pharm Pharmacol* 63: 1320-1326, 2011
- 3) Masaki Maeda, Sachiko Tanaka, Hitomi Ishizawa, Yurie Nakamura, Kenji Onda, Toshihiko Hirano. Suppressive effects of peptide antibiotics against proliferation and cytokine production in mitogen-activated human peripheral-blood mononuclear cells. *Arzneimittelforschung* 61: 1-15; 2011.

- 4) Eri Hikita, Mariko Arai, Sachiko Tanaka, Kenji Onda, Hiroya Utsumi, Bo Yuan, Hiroo Toyoda, Toshihiko Hirano. Effects of inorganic and organic arsenicals on growth and apoptosis of human T-lymphoblastoid leukemia cells. *Anticancer Res*, 31: 4169-4178; 2011.
- 5) Naoya Tohyama, Sachiko Tanaka, Kenji Onda, Kentaro Sugiyama, Toshihiko Hirano Influence of anticancer agents on cell survival, proliferation, and CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell-frequency in human peripheral-blood mononuclear cells activated by T cell-mitogen. *Int Immunopharmacol* 15: 160-166; 2013.

[学会発表] (計 1 件)

1. 竹内裕紀、曾我朗子、片山宏章、平野俊彦、畝崎榮、島津元秀 カルシニューリン阻害薬のリンパ球ステロイド感受性に対する増強効果 第 38 回日本臓器保存生物医学会学術集会 2011 年 11 月仙台

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 俊彦 (HIRANO TOSHIHIKO)

研究者番号：90173252

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：