

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 3 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461518

研究課題名(和文)オリゴ多糖体投与による、Th2関連応答を介した感染症の緩和/治療効果

研究課題名(英文)Oligosaccharide administration improved clearance of infectious pathogens in acute inflammatory phase

研究代表者

山本 夏男(Yamamoto, Natsuo)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50466562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：気道、静脈感染を用い、野生型、IL-13遺伝子改変のマウスで連鎖球菌及び真菌の感染感受性を検討した。低用量ではIgMに、高容量でTh1関連の炎症に依存した応答が観察された。肺炎、静脈感染の両方で、高用量の菌体投与後に、IL-13の存在下で炎症性サイトカインが抑制され、キチンオリゴマーの同時投与で感染臓器(肺、腎臓)の炎症応答が修飾された。リコンビナントIL-13とリコンビナントTGF β を添加した骨髄細胞で、菌体と接触後短時間の炎症応答を確認した。TGF β は、添加後のIL-13に濃度依存的に増幅され、4～10日に至る感染臓器のIL-17Aによる応答をこのTGF β が支持している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify a role of IL-13 in early host resistance to streptococci, and *C. albicans*, murine airway and intravenous infection models were used. A low dose administration of these pathogens induced natural and early acquired IgM protection, while high dose administration promoted rapid local inflammatory responses to lung and kidney as infected local organs. In high dose administration, IL-13 suppressed IL-1, CXCL2 and TNF that may be detrimental to host for pathogen elimination. However late IL-17A was dependent on TGF β synthesis, which is also strictly dependent on IL-13. This anti-inflammatory role of IL-13 may be promoted with a chitin-oligomer as an oligosaccharides. Oligosaccharide-IL-13-TGF β cascades may become more critical for a recovery from sepsis as it suppresses an excessive inflammasome activation during a fatal septic condition. The in vivo finding above was supported in vitro tests of bone-marrow derived cells with additional recombinant (r)IL-13, and rTGF β .

研究分野：感染症内科学、免疫学

キーワード：IL-13 TGF β 炎症性サイトカイン Th1関連応答 インフラマソーム オリゴ多糖体

1. 研究開始当初の背景

以前の感染動物実験モデルより、IL-13 の欠損した動物は野生型に比べて肺炎球菌生菌の静脈感染後に、平均生存期間が有意に短縮することを確認した。Th2 関連の応答が、初期抗体の生理学的な調節ないしは、抗炎症作用などで敗血症の予後を改善する可能性が推測された。

また気道感染時にキチンを加水分解したオリゴ多糖体を同時に投与すると、*C. albicans* 経気道感染後の肺内菌量が減少する点を確認された。これらについて IL-13 とオリゴ多糖体の炎症と菌体排除に関わる役割を調べる必要があると考えた。

2. 研究の目的

IL-13 の欠損で何故細菌及び真菌の感染症 (特に敗血症) に対する宿主抵抗性が変化するのかを解明すること。真菌の外膜に豊富なキチンを加水分解した産物 (オリゴ多糖体) が、IL-13 の持つ生体内の役割にどのような影響を与えるのか、感染動物の実験系の中で検証すること。

3. 研究の方法

野生型 (BALB/c) と IL-13 遺伝子単独欠損 ($-/-$) マウスに、肺炎球菌 (臨床分離株 2 種) あるいは ATCC18804 (*C. albicans* 標準株) を経静脈感染あるいは経気道感染を行い、時系列で臓器別バイオマーカーを測定し、予後に関わる因子を探索した。バイオマーカーとしては炎症性のサイトカイン、ケモカインとして IL-1, CXCL2, TNF, IFN, IL-17A, iNOS などを、又抗炎症性サイトカインとして IL-10, TGF を測定した。

以上 *in vivo* での実験で予後と臓器内バイオマーカーに関わる検討をタンパク産物と mRNA を定量して比較した。

これらの *in vivo* 主体の実験系に加えて、骨髄由来の培養細胞と菌体を接触させる実験系も施行した。濃度勾配を賦与した recombinant (r)IL-13 と r TGF を *IL-13^{-/-}* 由来の骨髄培養細胞に添加した条件下で *C. albicans* と骨髄由来培養細胞を接触後、これらの生理活性分子が、真菌に対する細胞の応答にどのような影響を賦与するか mRNA を定量して検証した。

4. 研究成果

研究期間内の検討から、IL-13 遺伝子改変動物と対照群の比較 (肺炎と敗血症モデル) では肺炎球菌、*C. albicans* のいずれにおいても投与菌量により宿主応答の様式 (臓器内 CFU と平均生存期間) が異なる結果が得られた。これらの結果について一定の投与量条件下で再現性を検証した。低用量で感染させた場合ターゲットの臓器内 (肺、腎臓) で野生型が菌体を速やかに排除した。高容量で感染させた場合には逆の結果となり臓器内生菌数は野生型よりも *IL-13^{-/-}* マ

ウスで早く排除された。

<肺炎球菌感染モデル>

感染微生物が構成する多糖体に対する B1a 細胞と IgM の質 (早期獲得型) や量を IL-13 が生理学的に調節していると仮説を立て、この一部を実験結果として観察した (研究初期)。肺炎モデルでは、ポリサッカライド特異的な IgM を産生する脾臓内の B1a 細胞の増加は野生型で顕著であったが *IL-13^{-/-}* マウスの脾臓ではこの増加が欠如していた。

肺炎球菌の静脈感染後に (ゼプシスモデルとして)、炎症を惹起する臓器である肝臓でのインフラマソーム関連分子 (NLRP3 など) の動態を更に検討した。その結果、静脈感染後 2.5 時間よりこの分子が肝臓で顕著に増幅された。臓器由来のケモカインとインフラマソーム関連分子は致死量の肺炎球菌感染後に、*IL-13^{-/-}* マウスの肝臓組織から野生型よりも有意差をもって高い発現が認められた。

単離した肝細胞または骨髄細胞を用いて菌体刺激実験を行い、ゼプシスに関わるケモカインやインフラマソーム関連分子の動態を *in vitro* で検討した。静脈感染後の敗血症モデルの場合には、IL-1 を主体とした全身の炎症の程度を肝臓由来のインフラマソーム関連分子が調節するという仮説を立て、これを更に検証する実験を計画、実施中である。この調節にはキチン関連のオリゴ多糖体による IL-13 と TGF が重要で、この調節が欠如した場合には、インフラマソームが過剰に活性化し、全身の炎症をコントロールできなくなる。これに伴って平均生存時間の短縮が生じると考えている (研究後期の仮説)。これらの結果の関連について他の関連する報告と比較検討しながら論文化を行っている。

<*C. albicans* 感染モデル>

C. albicans の静脈感染モデル (*in vivo*) と骨髄由来細胞に菌体を接触させる実験系 (*in vitro*) を行った。この結果臓器 (腎臓) 由来の TGF の生理学的な産生や、感染後の TGF 発現の維持などに IL-13 が必須と考えられた。また感染後 4 日以上経過した感染後期の IL-17 産生と炎症性ケモカインの維持にも IL-13 が重要であると考えられた。これらの結果について投稿作業中である。

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 4件)

1. Expression of activation-induced cytidine deaminase enhances the clearance of pneumococcal pneumonia: evidence of a subpopulation of protective anti-pneumococcal B1a B cells. Yamamoto N, Kerfoot SM, Majewska SM, Dela Cruz C, Szcapanik M, Askenase PW et al. *Immunology*. 147: 97-113, 2016 (DOI10.1111/imm.12544)

2. Epicutaneous immunization with phosphorylcholine conjugated to PC-BSA and TLR9 ligand CpG alleviates pneumococcal pneumonia in mice. Majewska SM, Yamamoto N, Askenase PW, Szcapanik M. *Pharmacol Reports*. 66:570, 2014

3. A subset of AID-dependent B-1a cells initiates hypersensitivity and pneumococcal pneumonia resistance. Philip W. Askenase, Krzysztof B, Andrew T. Hutchinson, Yamamoto N, Nazimek K, Ptak W. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1362: 200-214, 2016

4. 感染症に関わる新しい炎症の概念と感染制御. 山本夏男・仲村 究・金光敬二. 日本臨床微生物学雑誌 Vol.26 (3) : 209-222, 2016

[学会発表](計 8件)

1. IL-13-dependent biomarkers with liver inflammatory differentiation after pneumococcal sepsis during rapid inflammatory phases. Yamamoto N, Nakamura K, Arai K, Abe Y, Machida T, Suzuki Y, DelaCruz C, Ogura Y, Sekine H, Iseki K, Askenase PW, Kanemitsu K. 16th International Congress of Immunology. 2016 8月, Melbourne, Australia. (oral presentation 採択)

2. Innate protective responses of B1 cells dependent on activation-induced cytidine deaminase(AID)and IL-13. Yamamoto N, Nakazawa N, M Szcapanik, Abe Y, Ohana N, Kennimitsu K, Askenase PW. 15th International Congress of Immunology. 2013 8月, Milan, Italy.

3. 感染動物実験モデルによる、血流感染後2.5時間での臓器別バイオマーカーの検討. 山本夏男、阿部良伸、仲村 究、大花 昇、金光敬二. 第63回日本感染症学会東日本地方会学術集会 演題 157

4. カンジダ属の血流感染時に宿主抵抗性に関わるTh2に関連した因子の解析. 阿部良伸、山本夏男、仲村 究、大花 昇、金光敬二第63回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 演題 159

5. A 群溶連菌由来の低分子産物に応答する宿主細胞の分子機構. 山本夏男、新井和明、吉田春乃、阿部良伸、仲村 究、大橋一孝、大花 昇、高橋 孝、金光敬二. 日本細菌学会東日本支部総会 抄録集 p12 演題 30, 2015 8月

6. A 群溶血性連鎖球菌産生の蛋白粗分画による Th1 タイプの炎症を惹起する機序の解明. 新井和明、山本夏男、吉田春乃、仲村 究、大花 昇、金光敬二、高橋 孝. 第64回日本感染症学会東日本地方会学術集会抄録集.p176, 2015

7. A 群溶連菌由来 30KDa 蛋白産物が IL-6 及び NALP3 の早期反応系に及ぼす役割. 山本夏男、新井和明、仲村 究、阿部良伸、吉田春乃、大花 昇、高橋 孝、金光敬二. 同上.p176, 2015

8. 敗血症後早期の NLRP3 発現と抗インフラマソーム分子による炎症緩和が予後に寄与する機序の解析. 山本夏男、仲村 究、阿部良伸、大橋一孝、高野由喜子、大花 昇、金光敬二. 第65回日本感染症学会東日本地方会学術集会抄録集. 2016

[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
Allergy and Clinical Immunology, Yale University
http://medicine.yale.edu/intmed/allergy/people/philip_askenase.profile
医学部医学科 感染制御医学講座、福島医科大学研究者データベース
<http://www.fmu.ac.jp/kenkyu/Profiles/39/0003823/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 夏男 (YAMAMOTO, Natsuo)

福島県立医科大学・

感染制御学講座・准教授

研究者番号：50466562

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：