

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670484

研究課題名(和文)好中球のオートファジー機構を活用した多剤耐性菌感染症に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel therapies using neutrophil functions mediated by the autophagy machinery against multi-drug resistant bacterial infections

研究代表者

伊藤 洋志 (ITO, Hiroshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20362387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：多剤耐性菌の臨床分離株を用いた実験系により、静注用免疫グロブリン製剤による好中球の貪食能、殺菌能およびオートファジーなどの増強効果を明らかにした。また、菌を内包するオートファゴソーム数の増加も認めた。さらに、オートファジー抑制実験系により、好中球の殺菌能におけるオートファジーの貢献を明らかにした。同様の効果が、造血幹細胞移植後で免疫抑制剤投与中の患者の好中球でも認められた。易感染性患者における多剤耐性菌感染症に対して、オートファジー機構を介した好中球機能の活用による治療法の有用性が期待される。

研究成果の概要(英文)：We revealed the enhancing effects on phagocytic function, bactericidal activity, and autophagy of human neutrophils by an intravenous immunoglobulin preparation in the experimental system using clinical isolate multidrug-resistant bacteria. We also observed that the number of bacteria-containing autophagosomes have increased in the experimental system. In addition, we revealed that the autophagy contributes the bactericidal activity of neutrophils by the autophagy suppression experiments. The similar effects were also observed in neutrophils isolated from the patients being administered immunosuppressive agents after hematopoietic stem cell transplantation. It is expected that the therapy with neutrophil functions mediated by the autophagy machinery will be established effectively against multi-drug resistant bacterial infections in compromised hosts.

研究分野：生体防御学

キーワード：好中球 オートファジー 自然免疫 殺菌能 多剤耐性菌 易感染宿主 貪食 免疫グロブリン

1. 研究開始当初の背景

臓器移植後の免疫抑制剤の使用や、悪性腫瘍における化学療法といった医療の高度先進化と人口の高齢化に伴って、易感染性患者数が増加している。また、感染症治療における抗菌薬の多用は抗菌薬が無効な多剤耐性菌の出現を招き、感染症の難治化・重症化や院内感染症等が臨床現場で大きな問題となっている。このような問題を克服するためには、抗菌薬だけに頼る治療法は限界に達しつつあり、新たな治療法の開発が望まれる。易感染性患者は生体防御機構の低下が背景にあることから、本来宿主に備わっている生体防御機構を活用する治療法が有効であると考えられる。

好中球は白血球の中で最も多く、細菌感染に対する生体防御の一次機構において中心的な役割を果たす。易感染性患者がしばしば陥る重症感染症に対して、静注用免疫グロブリン (Intravenous immunoglobulin : IVIG) 製剤と抗菌薬の併用療法の有効性が報告されている。その機序として、IVIG 製剤中に含まれる種々の細菌等に対する特異抗体による溶菌作用、毒素の中和、抗菌薬に対する細菌の感受性増大のほか、好中球による細菌の貪食促進 (オプソニン作用) が考えられる。

近年、好中球に対して細菌の貪食など活性化酸素産生を伴う刺激を与えると、オートファジー (自己貪食) が誘導されることが報告された。オートファジーは、細胞質内自己成分の分解機構のひとつであり、癌や神経変性疾患、初期発生など多くの重要な生命現象と深く関わっている。また、細胞内寄生細菌の排除機構としての機能も報告され、自然免疫においても重要な役割を果たすと考えられている。貪食によって誘導される好中球のオートファジーは、これまで明らかにされたオートファジー誘導とは異なる機序が考えられ、その解明とともに好中球機能との関連が注目されている。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では下記について明らかにすることを目的とした。

- (1) 好中球と菌を反応させた際に誘導される好中球のオートファジーや諸機能に及ぼす IVIG 製剤の添加効果
- (2) (1)に関して、多剤耐性菌と薬剤感受性菌、および健常人好中球と易感染性患者好中球の比較検討
- (3) 好中球機能におけるオートファジー機構の役割

本研究により、易感染性患者の多剤耐性菌感染症に対して生体防御機構を活用した新規治療法に繋がることを期待される。また、オートファジー機構を介した好中球機能の制御により、感染症治療のみならず、過剰な好中球機能発現による炎症病態に対する治療応用に繋がることも期待される。

3. 研究の方法

(1) 材料

IgG フリー血清 : AB 型健常人血清をプロテイン G アフィニティークロマトグラフィーにより IgG を除去し、補体源として終濃度 1% で用いた。

静注用免疫グロブリン (Intravenous immunoglobulin : IVIG) 製剤 : PBS で透析した献血ベニロン®-I を終濃度 1mg/ml で用いた。

菌株 : 大腸菌 (*E. coli*) および緑膿菌 (*P. aeruginosa*) の薬剤感受性および多剤耐性を示す臨床分離株 (大腸菌 : ESBL 産生株、緑膿菌 : MDRP) を用いた。

好中球 : 健常成人、あるいは造血幹細胞移植後に免疫抑制剤を投与中の患者の末梢血から、パーコール比重遠心法により分離して用いた。

上記の材料を用い、in vitro 実験系で好中球と菌を反応させた際に誘導される好中球

の諸機能について、IVIG 製剤の添加効果について評価した。好中球の諸機能は、次の方法で解析した。

(2) 好中球機能の解析法

殺菌能：コロニー法

貪食能：サイトスピン標本の鏡検法

活性酸素 (O_2^- 産生能): SOD-inhibitable cytochrome c 還元法

Myeloperoxidase (MPO) 放出能: ELISA 法

Neutrophil Extracellular Traps (NETs) 形成: 走査型電子顕微鏡による観察

オートファジーの誘導: ウェスタンブロット法による LC3B conversion の解析、共焦点レーザー顕微鏡による免疫蛍光染色標本の観察、および透過型電子顕微鏡による観察

4. 研究成果

(1) 静注用免疫グロブリン (IVIG) 製剤による多剤耐性菌に対する好中球の殺菌能の増強効果

易感染性患者の重症細菌感染症では、抗菌薬ともに IVIG 製剤の併用療法の有効性が報告されているが、その機序については十分に明らかにされていない。本研究は、IVIG 製剤により院内感染の起炎菌としても重要な緑膿菌や大腸菌の多剤耐性株に対する好中球の殺菌能が薬剤感受性株と同等に増強されることを明らかにした。その機序として、好中球による貪食の促進 (図 1)、活性酸素 (O_2^-) 産生、myeloperoxidase (MPO) の放出、

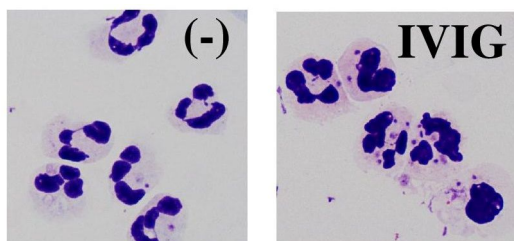


図 1. ヒト好中球による多剤耐性菌の貪食。IVIG の非存在下 (-) または存在下 (IVIG) でのヒト好中球による大腸菌多剤耐性株の貪食像を示す。

及び NETs 形成 (図 2) の増強を示した。

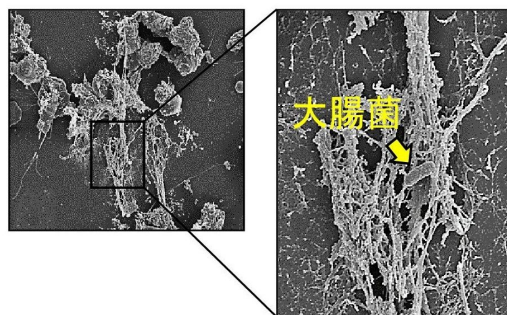


図 2. NETs 形成像。大腸菌が NETs の網状構造に捕捉されている。

(2) 貪食によって好中球の細胞内に取り込まれた菌に対するオートファジーの誘導
細胞内寄生細菌の侵入により誘導されるオートファジーはゼノファジーとも呼ばれる。本研究は、細胞内寄生性を有しない大腸菌 (多剤耐性株) を好中球が貪食するとオートファジーが誘導され (図 3) 細胞内に取り込まれた大腸菌を内包するオートファゴソーム形成 (図 4) が IVIG 製剤による貪食促進効果に伴って増加することを明らかにした。

図 3. 大腸菌を貪食したヒト好中球のオートファジー誘導。

貪食によって細胞内に取り込まれた大腸菌 (DAPI 染色: 青、白矢印) の周囲において、オートファゴソームのマーカである LC3B (赤) と ATG5 (緑) の共局在を示す。

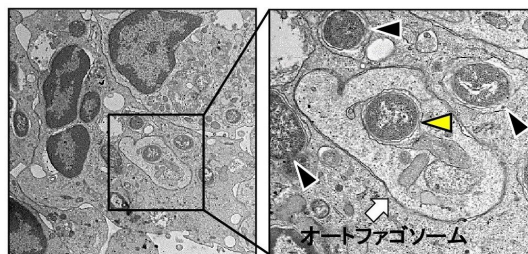
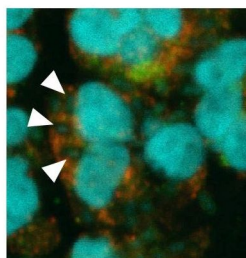


図 4. 好中球の細胞室内に形成された大腸菌を内包するオートファゴソーム。矢尻は大腸菌を示す。大腸菌 (黄色の矢尻) を内包しているオートファゴソームを白い矢印で示す。

上記(1)、(2)の所見について、健常人の好中球と同様に造血幹細胞移植後に免疫抑制剤を投与中の患者から分離した好中球にお

いても確認された。

(3) 好中球の殺菌能におけるオートファジーの役割

オートファジーの過程の後期段階であるオートファゴソームとリソソームの融合を阻害する Bafilomycin A1 (Baf) により、大腸菌の貪食により誘導される好中球のオートファジーを抑制させると、細胞内生菌数が有意に増大した(図5:左から2番目の黒棒)。活性酸素産生能を約 50%抑制させた条件(apocynin; Apoc) で Baf を作用させると、活性酸素産生とオートファジー誘導とともに完全に阻止した条件(DPI:右から1番目の棒)に相当する細胞内生菌数の増大を認めた(右から2番目の黒棒)。このことから、オートファジーは好中球の殺菌能に貢献しており、活性酸素産生系での殺菌が不十分な場合に、オートファジーが補完的に殺菌作用を果たす可能性が考えられる。

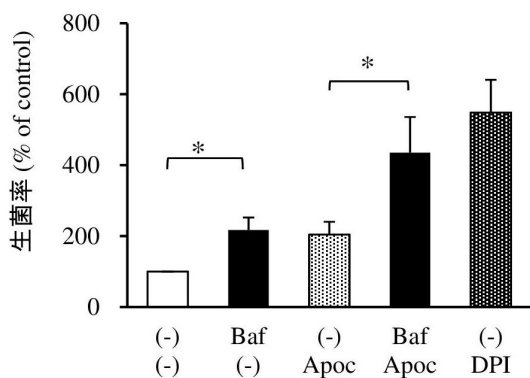


図 5. ヒト好中球の殺菌能に及ぼす各種阻害剤の影響. オートファジー阻害剤(Baf)、活性酸素産生阻害剤(Apoc, DPI)を作用させ、大腸菌多剤耐性株を好中球に貪食させた際の細胞内生菌率を示す(* $P < 0.05$).

以上の実験結果から、易感染性患者における多剤耐性菌感染症に対して、オートファジー機構を介した好中球機能の活用による治療法の有用性が期待される。

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8件)

- (1) Okada K, Arai S, Itoh H, Adachi S, Hayashida M, Nakase H, Ikemoto M. CD68 on rat macrophages binds tightly to S100A8 and S100A9 and helps to regulate the cells' immune functions. *J Leukoc Biol.* 2016, in press. (査読有)
- (2) Matsuo H, Nakamura N, Tomizawa D, Saito AM, Kiyokawa N, Horibe K, Nishinaka-Arai Y, Tokumasu M, Itoh H, Kamikubo Y, Nakayama H, Kinoshita A, Taga T, Tawa A, Taki T, Tanaka S, Adachi S. CXCR4 Overexpression is a Poor Prognostic Factor in Pediatric Acute Myeloid Leukemia With Low Risk: A Report From the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2016, doi: 10.1002/pbc.26035. (査読有)
- (3) Matsuo H, Itoh H, Kitamura N, Kamikubo Y, Higuchi T, Shiga S, Ichiyama S, Kondo T, Takaori-Kondo A, Adachi S. Intravenous immunoglobulin enhances the killing activity and autophagy of neutrophils isolated from immunocompromised patients against multidrug-resistant bacteria. *Biochem Biophys Res Commun.* 464(1):94-9, 2015, doi:10.1016/j.bbrc.2015.06.004. (査読有)
- (4) Tokumasu M, Murata C, Shimada A, Ohki K, Hayashi Y, Saito AM, Fujimoto J, Horibe K, Nagao M, Itoh H, Kamikubo Y, Nakayama H, Kinoshita A, Tomizawa D, Taga T, Tawa A, Tanaka S, Heike T, Adachi S. Adverse prognostic impact of KIT mutations in childhood CBF-AML: the results of the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group AML-05 trial. *Leukemia.* 29(12): 2438-41, 2015, doi:

- 10.1038/leu.2015.121. (査読有)
- (5) Itoh H, Matsuo H, Kitamura N, Yamamoto S, Higuchi T, Takematsu H, Kamikubo Y, Kondo T, Yamashita K, Sasada M, Takaori-Kondo A, Adachi S. Enhancement of neutrophil autophagy by an IVIG preparation against multidrug-resistant bacteria as well as drug-sensitive strains. *J Leukoc Biol*. 2015, 98(1):107-17. doi: 10.1189/jlb.4A0813-422RRR. (査読有)
- (6) Okada K, Arai S, Nakase H, Kohno H, Nakamura F, Takeda M, Toda Y, Itoh H, Adachi S, Ikemoto M. Autocrine pathways involving S100A8 and/or S100A9 that are postulated to regulate the immunological functions of macrophages in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015, 456(1):415-20. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.099. (査読有)
- (7) Matsuo H, Kajihara M, Tomizawa D, Watanabe T, Saito AM, Fujimoto J, Horibe K, Kodama K, Tokumasu M, Itoh H, Nakayama H, Kinoshita A, Taga T, Tawa A, Taki T, Shiba N, Ohki K, Hayashi Y, Yamashita Y, Shimada A, Tanaka S, Adachi S. EVI1 overexpression is a poor prognostic factor in pediatric patients with mixed lineage leukemia-AF9 rearranged acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2014, 99(11):e225-7. doi: 10.3324/haematol.2014.107128. (査読有)
- (8) Matsuo H, Kajihara M, Tomizawa D, Watanabe T, Saito AM, Fujimoto J, Horibe K, Kodama K, Tokumasu M, Itoh H, Nakayama H, Kinoshita A, Taga T, Tawa A, Taki T, Tanaka S, Adachi S. Prognostic implications of

CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Blood Cancer J*. 2014, 4(7): e226. doi: 10.1038/bcj.2014.47. (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

- (1) 伊藤 洋志, 山本 翔, 谷村 志桜里, 久保 靖彦, 足立 壯一, ヒト前骨髄球性白血病細胞株 HL60 を用いたオートファジー解析実験系の確立、第26回日本生体防御学会学術総会、東京、平成27年7月10~12日
- (2) 伊藤 洋志, 北村 奈緒子, 山本 翔, 松尾 英将, 足立 壯一, 好中球の殺菌能におけるオートファジー機構の役割、第25回日本生体防御学会学術総会、宮城、平成26年7月9~11日
- (3) 北村 奈緒子, 山本 翔, 伊藤 洋志, 藤井 康友, 足立 壯一, 真菌感染症の治療における好中球の殺菌能の意義、第24回日本 Cell Death 学会学術集会、大阪、平成27年7月11~12日

〔図書〕(計1件)

- (1) (編集主幹) 井村 裕夫, (編集委員) 足立 壯一 他, (執筆者) 伊藤 洋志 他, 文光堂, わかりやすい内科学 第4版, 2014, ISBN978-4-8306-2030-0

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

該当なし

取得状況 (計0件)

該当なし

〔その他〕

- (1) ホームページ等:

京都大学大学院 医学研究科 人間健康科

学系専攻 検査応用開発学分野 血液・生体
防御学研究室

<http://adachilab.web.fc2.com/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 洋志 (ITOH, Hiroshi)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号： 2 0 3 6 2 3 8 7

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

足立 壯一 (ADACHI, Souichi)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号： 1 0 2 7 3 4 5 0