

樹状細胞の抗原提示能およびサイトカイン産生 に対するマクロライドの影響

石田 芳也 安部 裕介 野澤 はやぶさ 原 遡 保 明

旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座

Analysis of the Influence of 14-lactone-ring Macrolide to The Antigen Presentation Ability and the Cytokine Production of a Dendritic Cell

Yoshiya ISHIDA, Yusuke ABE, Hayabusa NOZAWA, Yasuaki HARABUCHI

Asahikawa Medical College, Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery

A macrolide is one of effective agents for chronic respiratory tract diseases, such as chronic sinusitis, sinobronchial syndrome, and diffuse panbronchiolitis. Although the only limited information is available about their mechanisms, the suppression of several inflammatory cytokines (IL-8 etc.) and some transcription factors are reported. Non-typeable Haemophilus Influenzae is one of the important pathogens of chronic respiratory tract. P6 is one of the outer membrane proteins of NTHI, which is target antigen of protective antibody. To analyze the influence of macrolide to human dendritic cells (DCs), we treated DCs with macrolide and use as antigen presenting cells (APCs). Clarithromycin, Roxithromycin and Prednisolone suppressed in vitro lymphocyte proliferative response of CD4+T cells to P6 and IFN- γ secretion respectively. In the production of IL-8 was also suppressed by Macrolide. This result suggested that Macrolide suppressed antigen specific immune responses of DCs in vitro.

はじめに

慢性副鼻腔炎, び慢性汎細気管支炎等の慢性気道炎症性疾患においては病原微生物の感染と生体の免疫応答の間で悪循環が起こっているとされている。病原微生物が局所の防御機構を傷害し局所に定着すると, それによって宿主の免疫応答が誘導される。特に IL-8 と好中球を中心とした炎症では, エラスターゼや活性酵素により更なる局所の防御機構の障害が起こり, 病原微生物のクリアランスが障害され, 悪循環に

陥っていくとされている¹⁾。

14員環マクロライド系抗生剤は, 免疫調整作用を有する薬剤として, 慢性副鼻腔炎, 副鼻腔気管支症候群, びまん性汎細気管支炎等の慢性気道炎症性疾患の治療に使用され, その有用性が報告されている^{2,3)}。これら慢性気道炎症性疾患に対してマクロライド系薬剤を少量長期投与することにより宿主の過剰な免疫応答を断ち切りこの悪循環を解消することができるとされている。その作用機序として, マクロライド

により IL-8 を初めとする種々の炎症性サイトカインが抑制されることは多数報告があり^{4,5)}, mRNA, 転写因子の NF- κ B や AP-1 レベルでの抑制も報告されている⁶⁾. 飯野らは, マクロライドによって抗原提示細胞の costimulator の発現が抑制されることを示した^{7,8,9)}. 浅野らは, Th2 サイトカインを特異的に抑制することを示した^{10,11)}. しかし, その作用機序に関しては十分に解明されていない部分が多い.

樹状細胞は生体内の種々の組織に分布し T 細胞に抗原提示を行うことで免疫応答を誘導する重要な細胞である. さらに近年, 免疫寛容にも関与していることが示されており免疫制御細胞としての側面を注目されている. 最近になり CD14 陽性ヒト末梢血単核球を GM-CSF, IL-4 の存在下で約 7 日間培養することで樹状細胞の分化誘導が可能となり樹状細胞自体の研究も盛んに行われているが, マクロライドのヒト樹状細胞に対する影響は未だ検討されていない.

インフルエンザ菌は, これらの慢性気道炎症性疾患の重要な起炎菌のひとつである. その外膜蛋白のひとつである P6 蛋白は, 全てのインフルエンザ菌に共通であり, 感染防御抗体の標的抗原となっており, ワクチン療法の標的としても注目されている^{12~15)}.

今回の検討の目的は, 末梢血より誘導した樹状細胞と気道炎症性疾患の主要な起炎菌のひとつであるインフルエンザ菌の P6 外膜蛋白を用いて, CD4 陽性 T 細胞のリンパ球増殖反応, IL-8 の産生, Th1/2 サイトカイン産生など, 抗原特異的な免疫応答に対するマクロライドの影響について検討することである.

方 法

健康成人男性 5 名の末梢血を用いた. 採血した末梢血より比重遠心法で, 末梢血単核球を分離した後, 磁器ビーズ法 (MACS[®]) を用いて CD14 陽性細胞を分離, IL-4 と GM-CSF の存在下に 7 日間培養することで樹状細胞を分化誘

導した. マクロライド系薬剤としてクラリスロマイシン (大正製薬株式会社より提供) とロキシスロマイシン (エーザイより提供) を用い, 免疫抑制の指標としてプレドニゾロン (塩野義製薬より提供) を用いた. 4000rad 照射後 96 穴プレートに 5×10^3 /well で撒いた樹状細胞に各薬剤を 10.0 μ g/ml, 1.0 μ g/ml, 0.1 μ g/ml の 3 段階の濃度で添加し, P6 蛋白を 10.0 μ g/ml で加え約 2 時間インキュベートした. その後, 磁器ビーズ法 (MACS[®]) を用いて別に分離した CD4 陽性 T 細胞を, 各 well に加え 48 時間上清を回収し, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-8 の各サイトカインを ELISA (BD-Pharmingen[®]) にて測定した. さらに 7 日間培養し, 3H-thymidine の取込み (CPM) を測定し各条件でのリンパ球増殖反応を検討した. ELISA もリンパ球増殖反応も同条件の well を 3well ずつ作成し平均値をもって測定値とした. グラフは 5 検体の平均値と ± 1 SD のエラーバーで示した.

結 果

リンパ球増殖反応の測定結果を示す (Fig. 1). P6 刺激による平均の CPM は 20230.8 であった. ロキシスロマイシン, クラリスロマイシン共にマクロライドを加えていないものと比べ濃度依存性にリンパ球増殖反応を抑制した. ともに 1.0 μ g/ml 以上の濃度で有意に抑制された ($p < 0.05$). プレドニゾロンの添加でも各濃度で濃度依存性にリンパ球増殖反応が抑制された ($p < 0.05$).

IFN- γ の測定結果を示す (Fig. 2). P6 刺激による平均 2370.4pg/ml の IFN- γ が産生されているが, ロキシスロマイシンは各濃度で IFN- γ の産生を抑制した ($p < 0.05$). クラリスロマイシンは 10 μ g/ml でのみ有意に IFN- γ の産生を抑制した ($p < 0.05$). リンパ球増殖反応と同様にプレドニゾロンの添加でも各濃度で濃度依存性にリンパ球増殖反応が抑制された

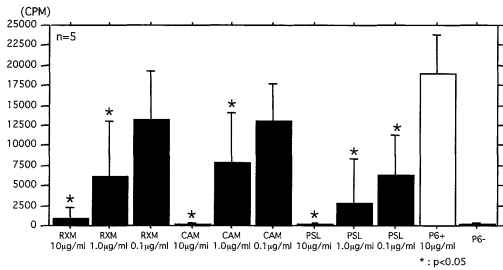


Fig. 1 In vitro lymphocyte proliferative response of CD4+T cells, which were stimulated with dendritic cells and P6 protein, were analyzed. The CPM average with P6 protein without Macrolide was 20230.8. The lymphocyte proliferative response was suppressed with Clarithromycin and Roxithromycin compared with without Macrolide to concentration dependency. The both CPM were significantly suppressed in 1.0 µg/ml or more (p<0.05). The lymphocyte proliferative response was significantly suppressed with Prednisolone to concentration dependency by each concentration (p<0.05).

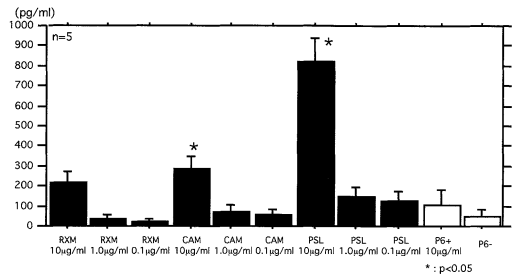


Fig. 3 IL-4 production in the presence of Clarithromycin, Roxithromycin and Prednisolone compared with without Macrolide were analyzed. IL-4 production were not hardly shown with P6 protein stimulation without Macrolide, but IL-4 were increased with 10 µg/ml Clarithromycin (p<0.05) and 10 µg/ml Prednisolone (p<0.05). Although the significant difference was not shown in Roxithromycin, the tendency that increases with concentration was shown in IL-4 production.

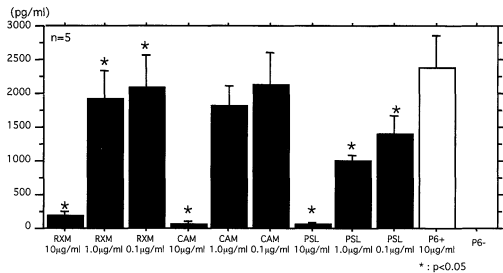


Fig. 2 IFN-γ production in the presence of Clarithromycin, Roxithromycin and Prednisolone compared with without Macrolide were analyzed. An average production of I FN-γ was 2370.4pg/ml in without Macrolide. That puration of IFN-γ was suppressed with Roxithromycin by each concentration (p<0.05). With Clarithromycin the production was suppressed in only 10 µg/ml (p<0.05). The production of IFN-γ was suppressed with Prednisolone to concentration dependency by each concentration (p<0.05).

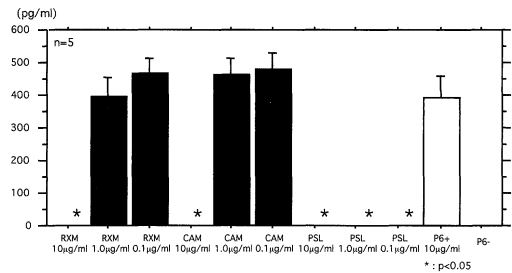


Fig. 4 IL-5 production in the presence of Clarithromycin, Roxithromycin and Prednisolone compared with without Macrolide were analyzed. The average of IL-5 production with P6 protein stimulation without Macrolide was 390.7pg/ml. In 10 µg/ml Roxithromycin and 10 µg/ml Clarithromycin, the production of IL-5 was suppressed and it was below measurement sensitivity. In presence of Prednisolone, production of IL-5 was suppressed in each concentration, and it was below measurement sensitivity.

(p<0.05).

IL-4 の測定結果を示す (Fig. 3). P6 の刺激では IL-4 の産生はほとんど見られなかったが、IL-4 はクラリスロマイシン 10 µg/ml とプレ

ドニゾロン 10 µg/ml で IL-4 の産生が増加した (p<0.05). ロキシスロマイシンでは有意差は得られなかったが、濃度とともに増加する傾向は認められた。

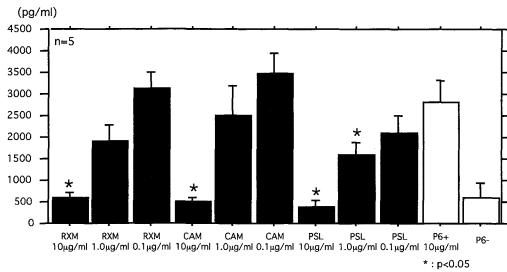


Fig. 5 IL-8 production in the presence of Clarithromycin, Roxithromycin and Prednisolone compared with without Macrolide were analyzed. The average of IL-8 production with P6 protein stimulation without Macrolide was 2818.9pg/ml. In 10 µg/ml Clarithromycin and 10 µg/ml Roxithromycin, production of IL-8 were reduced in concentration dependency with the statistical significant difference ($p < 0.05$). In presence of Prednisolone (10 µg/ml and 1.0 µg/ml), production of IL-8 was reduced by concentration dependency ($p < 0.05$).

IL-5の測定結果を示す (Fig. 4). IFN- γ に比べると少ないが P6 刺激により平均 390.7pg/ml の IL-5 が産生されていた。ロキシスロマイシン 10 µg/ml とクラリスロマイシン 10 µg/ml では IL-5 の産生は抑制され測定感度以下であった。プレドニゾロンの添加ではどの濃度でも IL-5 の産生が抑制され測定感度以下であった。

IL-8 の測定結果を示す (Fig. 5). P6 刺激により平均 2818.9pg/ml の IL-8 が産生されていた。ロキシスロマイシン 10 µg/ml とクラリスロマイシン 10 µg/ml では統計学的な有意差をもって濃度依存性に抑制されていた。プレドニゾロンの添加では 10 µg/ml と 1.0 µg/ml の濃度で IL-8 の産生が抑制されていた。

考 察

14 員環マクロライド系抗生剤は免疫調整作用を有する薬剤として、慢性気道炎症性疾患の治療に使用され、その有用性が報告されている。その作用機序として IL-8 を初めとする種々の炎症性サイトカインの mRNA、転写因子の

NF- κ B や AP-1 レベルでの抑制が報告がされている。ランゲルハンス細胞、上皮細胞、線維芽細胞に対する影響の検討は報告があるが、誘導した樹状細胞に対するマクロライドの影響に関してははまだ検討されていない。また TCR (anti-CD3), LPS などの非特異的な刺激に対する CD4 陽性 T 細胞の免疫応答へのマクロライドの影響に関する報告はあるが、実際の起炎菌の菌体成分に対する免疫応答への影響は検討されていない。そこで今回の我々の検討では、樹状細胞と P6 蛋白を用いた CD4 陽性 T 細胞の抗原特異的な免疫応答に対するマクロライドの影響について検討した。

作用させたマクロライド系薬剤はニューマクロライドといわれるロキシスロマイシンとクラリスロマイシンである。免疫調整作用があるとされているのはこれらニューマクロライドであり、エリスロマイシンにはその作用はないとされている。今回の検討ではエリスロマイシンは用いなかったが、今後の検討ではエリスロマイシンと各薬剤の比較も行う必要があると考えられた。免疫応答を抑制する薬剤としてプレドニゾロンをコントロールとした。

各薬剤の濃度は内服による血中濃度から決定した。通常のマクロライド療法に用いられる内服量はロキシスロマイシンが 150mg でクラリスロマイシンが 200mg である。また、クラリスロマイシン 200mg 内服の (Cmax) は 1.16 µg/ml, ロキシスロマイシン 150mg 内服の (Cmax) は 6.8 µg/ml である。よって、作用させるマクロライドの濃度は 10 µg/ml, 1.0 µg/ml, 0.1 µg/ml の 3 段階の濃度で作用させた。さらに、プレドニゾロン 5mg 内服の (Cmax) は 0.105 µg/ml, 50mg 内服の (Cmax) は 0.66 µg/ml であることからプレドニゾロンもマクロライドと同じ 3 段階の濃度で作用させた。

CD4 陽性 T 細胞の免疫応答の指標として³H-thymidine の取り込みによるリンパ球増殖反

応を測定した。ロキシスロマイシン、クラリスロマイシン共にマクロライドを加えていないものと比べ、 $1.0 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で有意にリンパ球増殖反応を抑制した。先ほど示したように両薬剤の C_{max} は $1.0 \mu\text{g/ml}$ 以上であり、実際に用いられる半量投与量でも十分な抑制効果があると考えられた。

以前の我々の検討で樹状細胞を用いて CD4 陽性 T 細胞を P6 で刺激すると、T cell より Th1 サイトカインである IFN- γ が優位に産生され Th1 応答が誘導されることが示されていることからサイトカイン産生に対する影響の検討として IFN- γ を ELISA で測定した。ロキシスロマイシンは各濃度で IFN- γ の産生を抑制したが、クラリスロマイシンは $10 \mu\text{g/ml}$ のみ有意に IFN- γ の産生を抑制した。クラリスロマイシンのデータはばらつきが多かったため $10 \mu\text{g/ml}$ のみ抑制される結果となったが、リンパ球増殖反応と同様に両薬剤とも濃度依存性に IFN- γ の産生を抑制した。また、Th1/2 バランスに対しても影響するとする報告もあることから、T 細胞より産生される Th2 サイトカインとして IL-4 と IL-5 を測定した。以前の我々の検討で樹状細胞を用いて CD4 陽性 T 細胞を P6 で刺激すると、IL-4 はほとんど産生されず、IL-5 が少量産生されることが示されている。IL-5 は各薬剤により抑制される傾向になったが、IL-4 は逆に増加する傾向となった。IL-4 の増加は Th1 の抑制による相対的な Th2 の亢進によるものと考えられるが、同じ Th2 サイトカインである IL-5 は抑制されており、両者のこのギャップについては今後さらなる検討が必要である。

IL-8 は単球、マクrofage系より産生され、好中球、T 細胞の遊走に参与しているサイトカインであり、今回の我々の検討の条件では主に樹状細胞より産生されていると考えられる。ロキシスロマイシン $10 \mu\text{g/ml}$ とクラリスロマイシン $10 \mu\text{g/ml}$ で統計学的な有意差をもって

濃度依存性に抑制されたことからマクロライドは樹状細胞に対して IL-8 の産生を抑制する作用があると考えられた。はじめに述べたように IL-8 の産生を抑制することは、慢性気道炎症性疾患における悪循環を断ち切る意味では非常に重要である。以上のことから以下のような結論にまとめられる。(1)マクロライドにより樹状細胞と CD4 陽性 T 細胞の P6 に対する免疫応答は抑制された。(2)サイトカインの解析により、Th1 応答が抑制され Th2 応答が亢進される傾向が認められた。(3)IL-8 の産生もマクロライドにより抑制されていることから、樹状細胞に対してもマクロライドは免疫調整作用を有することが示された。今回の検討では樹状細胞と T 細胞を混合し両者にマクロライドを作用させているが、T 細胞にマクロライドを作用させない条件での検討が必要である。

ま と め

(1) 健常成人より誘導した樹状細胞と CD4 陽性 T 細胞の、マクロライド存在下における P6 に対する免疫応答を解析した。(2)クラリスロマイシン、ロキシスロマイシンともにプレドニンと同様に CD4 陽性 T 細胞の P6 に対するリンパ球増殖反応を抑制した。(3)IFN- γ 、IL-5、IL-8 に関しては各薬剤の濃度に依存してその産生量は抑制されたが、IL-4 は、各薬剤の濃度に依存して産生が亢進した。

参 考 文 献

- 1) 杉山幸比古：マクロライドによる呼吸器疾患へのアプローチ，14 員環マクロライドによる検証，びまん性汎細気管支炎及びその類縁疾患に対するマクロライド療法の有用性びまん性汎細気管支炎及びその類縁疾患における感染と炎症の関連，分子呼吸器病，5 (5)：431-6，2001.
- 2) 吾妻安良太：【気道病変をめぐる最近の進歩】DPB，マイクローライドの作用機序，THE LUNG-perspectives，10 (2)：179-87，2002.

- 3) 羽柴基之：【慢性耳鼻科疾患の治療戦略】慢性耳鼻科疾患の治療におけるマクロライド療法の位置づけ，慢性副鼻腔炎，感染と抗菌薬，4 (2)：177-80, 2001.
- 4) 鈴木秀明，下村明，池田勝久：鼻粘膜上皮細胞の interleukin-8 分泌に対するマクロライドの抑制効果，日本鼻科学会誌，36 (2)：129-34, 1997
- 5) Wallwork B, Coman W, Feron F, Mackay-Sim A, Cervin A, Clarithromycin and Prednisolone inhibit cytokine production in chronic rhinosinusitis, Laryngoscope, 112 (10): 1827-30, 2002
- 6) 菊池暢，萩原弘一，本田芳宏，渡辺彰，貫和敏弘：クラリスロマイシンは lipopolysaccharide によりヒト単球より産生される IL-8 を転写因子 AP-1 と NF- κ B を介したメカニズムにて抑制する，Jpn J Antibiot, 56: 100-5, 2002.
- 7) 飯野ゆき子，宮澤哲夫，今村祐佳子，小島千絵：ヒト抹消血単核球の constimulator 発現に対するマクロライドの影響，免疫アレルギー，16 (2)：194-5, 1998.
- 8) 飯野ゆき子，宮澤哲夫，志賀潤治：【マクロライド新作用研究会】炎症免疫担当細胞，マクロライド療法施行症例の副鼻腔粘膜における免疫組織学的検討，抗原提示細胞の constimulator の発現に及ぼす影響，Jpn J Antibiot, 51: 25-6, 1998.
- 9) 宮澤哲夫，飯野ゆき子：副鼻腔粘膜の細胞表面抗原に対するマクロライドの影響，日本耳鼻咽喉科学会会報，100 (6)：671-7, 1997.
- 10) 浅野和仁：ロキシスロマイシンの Th1/2 バランス調整作用，Allergology & Immunology, 8 (1): 86-91, 2001.
- 11) 瀬戸浩之，浅野和仁，州崎春海：マクロライド系抗生物質，ロキシスロマイシンの Th2 サイトカイン産生抑制作用，Jpn J Antibiot, 54: 76-9, 2001.
- 12) Harabuchi Y, Faden H, et al.: Human milk secretory IgA antibody to nontypeable Haemophilus influenzae: possible protective effects against nasopharyngeal colonization. J Pediatr. 124: 193-8, 1994.
- 13) Harabuchi Y, Faden H, et al.: Nasopharyngeal colonization with nontypeable Haemophilus influenzae and recurrent otitis media. J Infect Dis. 170: 862-6, 1994
- 14) Kodama H, faden H, et al.: Cellular immune response of adenoidal and tonsillar lymphocytes to the P6 outer membrane protein of non-typeable Haemophilus influenzae and its relation to otitis media. Acta Otolaryngol. 119: 377-83, 1999.
- 15) Abe Y, Murphy T. F., et al: Lymphocyte proliferative response to P6 of Haemophilus influenzae is associated with relative protection from exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 165 (7): 967-71, 2002.

質 疑 応 答

質問 播磨谷敦 (札幌医大)

既に NF- κ B のような転写因子レベルでマクロライドが作用し免疫応答を抑制しているとの報告があるが，樹状細胞の免疫応答が抑制される機序としてどのような機序が考えられるか。

応答 石田芳也 (旭川医大)

おそらく樹状細胞においても転写因子レベルでマクロライドが作用していると考えられる。今回の検討では樹状細胞に対してもマクロライドの免疫抑制作用があるかどうかを検討の目的とした。樹状細胞における作用機序に関しては今後の検討課題とした。

質問 榎本冬樹（順天堂大）

- 1) エリスロマイシンを用いた検討は行ったか。
- 2) T細胞の免疫応答を抑制しているがそれは生体にとって有用な応答なのか。

応答 石田芳也（旭川医大）

- 1) 今回はエリスロマイシンを用いた検討は行っていない。今回用いたクラリスロマイシン、ロキシスロマイシンとの比較は今後の検討課題と考えている。
- 2) 慢性副鼻腔炎のような慢性気道炎症性疾患で起こっているような悪循環を断ち切る意味では有用であると考えられる。

連絡先：石田 芳也

〒078-8510

北海道旭川市緑が丘東2条1丁目1番1号

旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座

TEL 0166-68-2554 FAX 0166-68-2559

E-mail ishida@asahikawa-med.ac.jp