

# 海外から輸入される多剤耐性結核に関する研究

研究分担者 櫻田紳策 国立国際医療研究センター国際医療協力局専門職

## 研究要旨

M-CSFによって単球より分化した活性型マクロファージ M-M において、培養液中の十分な濃度の活性型ビタミン D<sub>3</sub> 25(OH)D<sub>3</sub>の存在下で CYP27B1、VDR、cathelicidin遺伝子の発現が増幅されることが示された。さらに、結核菌 (H37Rv) 殺菌後の培養液上清中の殺菌活性に關与している可能性がある demicidin遺伝子の発現への關与について検討した。

## A. 研究目的

活性型マクロファージ (M-M) における活性型ビタミン D<sub>3</sub> 関連遺伝子発現について確認を行うとともに、活性型ビタミン D<sub>3</sub> の存在とは無関係に H37Rv 殺菌後に培養上清に現れる demicidin について検討を行う。活性型マクロファージによる結核菌殺菌のエフェクター分子が同定され、そのような分子の産生に關わる因子が同定されることによって、結核菌感染初期の封じ込めのメカニズムが明らかとなり、結核の診断及び治療に対して資するところがある。

## B. 研究方法

健常者の末梢血から単球を分離し、M-CSF および GM-CSF 存在下にそれぞれ分化したマクロファージを得る。濃度を振った 25(OH)D<sub>3</sub> または同時に IFN- $\gamma$  (100ng/ml) を培養上清に加えて BCG (MOI=3-5) を感染させ、0、3、6、12 と 24 時間後に全 RNA を抽出する。Real-time PCR にて CYP27B1、CYP24、IL-15、vitamin D receptor、cathelicidin の遺伝子発現を検出する。健常者の末梢血から単球を分離し、M-CSF 存在下に分化した活性型マクロファージを得る。MOI=30 で H37Rv をマクロファージに感染させ、3 日後の培養上清を濾過滅菌し、Differential Solubilization 法による血漿低分子抽出を行い、ペプチドーム解析を実施した。解析結果から、抗菌活性の高い分画

に含まれていた demicidin に着目した。実験に使用したヒト血液は分担研究者自身の自己血である。患者材料は用いていない。従って、本研究においてはとくに倫理上の問題はないと考えられる。

## C. 研究結果

活性型マクロファージの一種と考えられる M-M においては活性型ビタミン D<sub>3</sub> による活性化メカニズムが働いていることが明らかとなった。すなわち、培養液中の十分な濃度の 25(OH)D<sub>3</sub> の存在下において CYP27B1、VDR、cathelicidin 遺伝子の発現が増幅されることが示された。また、IFN- $\gamma$  は CYP27B1 の発現のみを増幅した。BCG 感染後一方、GM-CSF 存在下に分化した GM-M は抗原呈示細胞としての性格を示し、抗結核菌活性を示さないが、活性型ビタミン D<sub>3</sub> による活性化メカニズムは働いていないと考えられた。ただし、IFN- $\gamma$  による IL-15 の誘導は双方のマクロファージにおいて認められた。結核菌感染 M-M における demicidin 遺伝子発現の確認と活性型ビタミン D<sub>3</sub> 25(OH)D<sub>3</sub> の demicidin 発現への効果の検討は、現在検討しているところである。

## D. 考察

M-M においては、高濃度の 25(OH)D<sub>3</sub> の存在による関連遺伝子の発現増幅と IFN-

による IL-15 の誘導は確認された。一方 GM-M においては、対照的に発現増幅は認められず、活性型ビタミン D<sub>3</sub> による活性化に対してはマクロファージの表現型によって異なる応答が起きていると考えられる。また、これとは別に、低濃度の 25(OH)D<sub>3</sub> でも結核菌の殺菌は起こるため、活性型ビタミン D<sub>3</sub> による活性化とは異なるメカニズムの存在が想定される。dem icid in によるものかどうかは、現時点ではまだ確認できていない。また、dem icid in 遺伝子の発現に対する活性型ビタミン D<sub>3</sub> の効果については現在検討中である。

## E. 結論

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

該当無し

### 2. 学会発表

1. 「M-CSF 及び GM-CSF により分化したヒト単球由来マクロファージにおける活性型ビタミン D<sub>3</sub> 関連遺伝子の発現解析」櫻田紳策、PanaddaDehpakson、赤川清子、山崎利雄、慶長直人、第 24 回日本生体防御学会、熊本、2013 年 7 月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当無し

### 2. 実用新案登録

該当無し

### 3. その他

該当無し