

[] 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

抗結核菌活性を持つ抗菌ペプチド等に焦点を中てた。すなわち、血漿中グラニュリシン値と潜在性結核感染の関連解析を行った。活性型ビタミン D₃による M-CSF 存在下に分化したヒト単球由来活性型マクロファージ (M-M) の活性化機構に与える影響、とくに抗菌ペプチド cathelicidin 遺伝子の発現への影響を検討した。結核菌 (H37Rv) 殺菌後の培養液上清中の殺菌活性に関与している可能性がある demicidin 遺伝子の発現への関与について検討を試みた。

A. 研究目的

1. 潜在性結核感染における末梢血グラニュリシン発現レベルを検討し、質問紙にて調査した臨床疫学的要因と併せて解析を実施して、活動性結核の発症や再活性化におけるグラニュリシンの役割について、将来のより大規模な臨床研究の足がかりとする。
2. 活性型マクロファージ M-M における活性型ビタミン D₃によるヒト型結核菌及び BCG に対する抗菌メカニズムを明らかにする。結核菌に感染した M-M が結核菌殺菌時に産生する抗菌活性因子の候補分子 demicidin 遺伝子の発現について検討を行う。

B. 研究方法

1. ベトナム・ハノイ市の肺病院及び地区の結核センターの医療従事者 109名を対象に、インタビューと採血を実施した。IFN- γ 遊離テスト (QuantiferonTM-Gold in tube) にて診断された潜在性結核感染における末梢血グラニュリシン発現レベルを ELISA にて検討し、質問紙から得られた臨床疫学的情報と併せて統計解析を行った。

(倫理面への配慮)

国立国際医療研究センターの倫理委員会とベトナム保健省の倫理委員会の審査を受け、研究の承認を得た。

2. M-CSF 存在下にヒト末梢血単球より活性型マクロファージ (M-M) を得た。培養液中の十分な濃度の 25(OH)D₃ 或いは 25(OH)D₃ と IFN- γ の存在下において BCG を感染させ、CYP27B1、VDR、cathelicidin、IL-15 遺伝子の発現を定量的 RT-PCR にて検討した。さらに、別研究で M-M に結核菌 (H37Rv) を感染させた 3日後の培養上清中に同定された抗菌ペプチド demicidin の遺伝子の発現検討を試みた。

C. 研究結果

1. ベトナム・ハノイ市の肺病院及び地区の結核センターの医療従事者 109名において、血漿グラニュリシン値と潜在性結核との関連性が示唆された。IFN- γ 遊離テスト陽性者では健常者と比較して有意にグラニュリシンの発現が低下していた。年齢や性別により補正しても結果は変わ

らなかった。また、他の臨床疫学的要因では BM1 以外では潜在性結核感染と関連する要因はなかった。

2. 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 D₃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)D₃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- γ 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 D₃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- γ による IL15 の誘導は双方のマクロファージにおいて認められた。demicidin 遺伝子の発現検討は現在行っているところである。

D. 考察

1. 今回の研究では、血漿グラニュリシン値と IFN- γ 遊離テスト陽性の関連が示唆されたが、末梢血中のグラニュリシンの発現レベルの低下が、活動性結核発症のリスクと相関するマーカーになり得るかを明らかにするためには、潜在性結核感染者を同定し前向きコホート研究を行う必要がある。前向きコホート研究等を実施することで、潜在性結核感染症から活動性結核への発症リスクと血漿グラニュリシン値の発現が関連すれば、活動性結核発症のリスクマーカーとして、潜在性結核感染者のなかのハイリスクグループを特定できる可能性がある。この場合、開発途上国等の高蔓延国においては、ハイリスクグループに的を絞っての予防的治療を行うことによって、コストを削減することができる(約十分の一)。
2. 同じように末梢血単球から分化したマクロファージであっても、GM-M においては、活性型ビタミン D₃による関連遺伝子の発現増幅はまったく認められなかった。遊走性食細胞としての性格の強い M-M と比較すると GM-M は residential macrophage としての性格が強い細胞である。また、双方のマクロファージにおいて IFN- γ により発現が増幅される IL-15は、キラーT細胞におけるグラニュリシンの発現を誘導すると言われている。現在、demicidinの

発現は検討中であるが、活性化ビタミン D₃ の活性化メカニズムが働かないような低濃度の 25(OH)D₃ の存在下でも M-M は結核菌を効率的に殺菌することが分かっている。この細胞においては、活性化ビタミン D₃ の活性化メカニズム以外の殺菌メカニズムがより重要あることが示唆された。

E. 結論

1. 潜在性結核と血漿グラニュリシン値の間には関連があることが示唆された。
2. 活性型マクロファージ M-M において BCG 感染時の活性型ビタミン D₃ は関連遺伝子の発現を増幅させた。一方、GM-M ではそのような増幅は認められなかった。活性型ビタミン D₃ による活性化はマクロファージの表現型によって反応が異なることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

1. 櫻田紳策、PanaddaDehpakson、赤川清子、山崎利雄、慶長直人 :「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 D₃ 関連遺伝子の発現解析」. 第 24 回日本生体防御学会、熊本、2013 年 7 月 .
2. 櫻田紳策、PanaddaDehpakson、赤川清子、山崎利雄、慶長直人 :「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 D₃ 関連遺伝子の発現解析」. 第 83 回実験結核研究会、千葉、2014 年 3 月 .
3. 櫻田紳策、赤川清子、慶長直人 :「結核及び HIV 合併結核患者末梢血単球由来マクロファージにおけるビタミン D 関連遺伝子の発現についての検討」. 第 86 回日本結核病学会、東京、2011 年 6 月 .

H. 知的所有権の取得状況

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