

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17953

研究課題名(和文) ベトナム人小児のビタミンD不足がToll様受容体を介した自然免疫反応に与える影響

研究課題名(英文) Vitamin D deficiency impact on innate immune responses through Toll-like receptor: A birth cohort study in Vietnam

研究代表者

宮原 麗子 (Miyahara, Reiko)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・ゲノム医科学プロジェクト 特任研究員

研究者番号：40567301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はビタミンD不足やTLR経路を介した自然免疫応答能が感染症やアレルギー疾患に関連があるかを明らかにすることが目的である。ビタミンD欠乏の小児はベトナムで多く認められたものの、感染症やアレルギー疾患発症との関連性は認められなかった。一方、自然免疫応答能を見るためTLRを刺激し発現した炎症性サイトカイン遺伝子を測定したところ、monocyteなどの血球数と強い相関が認められた。neutrophilやlymphocyteは結核発症と、monocyteは喘鳴様症状との関連が認められたことから、TLRを介する自然免疫応答能が感染症やアレルギー疾患発症に関連する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では呼吸器疾患や喘息などのアレルギー疾患のリスク因子同定や予測因子の推定を試みた。当初の目的であったビタミンD欠乏と自然免疫反応や疾患との関連は明らかにすることはできなかったが、白血球数や血球の分画が自然免疫応答能と強い相関があることを明らかにするとともに、血球数が感染症やアレルギー疾患を予測できるマーカーとなり得ることを示唆する研究成果を得た。医療資源が不足する国において簡便に疾患を予測、診断する方法の発見は重要である。血液検査の中でも白血球数測定は安価に簡便に実施することができることから、低中所得国において喘息の重症化の予防や感染症の早期診断に応用することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to assess the association between vitamin D deficiency and infectious diseases and allergy. The birth cohort study in Vietnam showed that over 40% of children had low vitamin D levels. However, vitamin D deficiency was not associated with infectious diseases in this study.

Toll-like receptors (TLRs) play an important role in innate immunity. We measured the TLR-induced cytokine gene expression levels in the birth cohort study. The inflammatory cytokines were correlated with monocyte counts and lymphocyte counts. Furthermore, our analysis showed that the high neutrophils-to-lymphocyte ratio increased the risk of development TB and elevated monocyte counts increased the risk of wheezing episodes. Our results suggested that inflammatory cytokine induced by TLR-ligands might be related with the development of some infectious diseases and allergy.

研究分野：臨床疫学

キーワード：ビタミンD 自然免疫 アレルギー疾患 感染症 白血球数

1. 研究開始当初の背景

東南アジアなどの発展途上国では、小児の死亡原因の多くは感染症であり、肺炎の割合は、5歳未満(新生児を除く)の死亡原因の3割を占める[1]。研究地域であるベトナム中部都市、ニャチャンでの出生コホート研究(N=1,999)では、2歳未満の小児の入院率は高く、その診断のおよそ80%が感染症によるものであり、中でも下気道呼吸器感染症の割合が、最も高かった[2]。宿主側の易感染性をもたらす要因を見つけることは、疾病予防の介入を行う上で、有益な情報をもたらすと考えられる。Pohらの行った東南アジア諸国での栄養調査では、小児のビタミンD不足が指摘されている[3]。同調査で、ベトナムでは、血中ビタミンD不足(25(OH)D <50nmol/L)の小児は、48.2%おり、そのうち、特に血中ビタミンDが不足している(25nmol/L未満)小児は、11.1%占めた。近年、ビタミンD不足が結核などの感染症の発症にも関連している可能性が示唆されている[4]。Jilliffeらが行ったシステマティックレビューでは、多くの研究は観察研究であり、議論の余地は残るものの、急性呼吸器感染症とビタミンD不足との間に関連があることが示唆された[5]。まだ不明な点も多いが、ビタミンDが自然免疫反応に影響を与えることが関連しているとする指摘があり[6]、ビタミンD不足が自然免疫反応に作用し、易感染性をもたらす要因であることが推測される。

2. 研究の目的

- 1) ベトナム人の2歳児を対象としてビタミンD不足やTLR経路を介した自然免疫応答能が感染症やアレルギー疾患に関連があるかを明らかにする。
- 2) ビタミンD不足や自然免疫応答能に影響を与える環境因子や宿主因子を同定する。

3. 研究の方法

2009年に始まったベトナムニャチャンでの出生コホート研究において、参加者が2歳になる2011年から2012年に行われた健診で血液検体を採取した。採取した全血にTLRリガンド(LPS、Pam3CSK4)を添加し24時間培養し、遠心分離後、血球成分を-80℃に冷凍保存した。2歳時健診にきた1347人(67.4%)のうち360人分の保存した血球成分からRNAを抽出し、サイトカイン遺伝子の発現量をRT-PCRを用いて定量した。また-20℃で保存された血漿からビタミンD(25(OH)D)の測定を行った。これらの結果を用いて血清ビタミンD不足とTLRリガンドによって誘導される6種類のサイトカイン遺伝子発現量の間に関係があるかを統計的に解析した。また本研究期間中に、6歳時に実施された健診結果を取得することができたため、感染症疾患に加え、アレルギー発症と2歳時のサイトカイン遺伝子発現量や血球数(白血球数、白血球分画など)との関連について検討した。

4. 研究成果

1) 2歳時のビタミンD血中濃度

360名の保存血清を用いて、ビタミンD血中濃度を測定したところ、血中ビタミンD不足(25(OH)D <50nmol/L)の小児は299名(84.9%)、特に血中ビタミンDが不足している(25nmol/L未満)小児は42.5%占めた。これは、過去の報告よりも高い割合であったため、検体数を増やし再現性を確認したが、ビタミンDの値は安定せず、血清の保存状態が悪く質が低下していた可能性が高かった。一部のデータでビタミンD血中濃度と感染症やアレルギー疾患との関連を解析したが関連性は認められなかった。

2) Toll様レセプター刺激後のサイトカイン発現

2歳時の血液検体を用いて、LPSとPam3CS4を添加し24時間培養後サイトカインmRNAの発現量をリアルタイムRT-PCRで測定した。24時間の培養刺激後IL-1、IL-6、IL-10、IFN- γ は上昇していることが確認された。またこれらのサイトカイン発現量は、MonocyteやLymphocyte、Neutrophilの数と相関があった。これらの値をマーカーとして感染症やアレルギー疾患の予測ができないかと考え追加の解析を実施した。

3) Monocyte、Lymphocyte、Neutrophil と感染症との関係

血球数と感染症との関連を見るため、タイで行われた結核コホート研究のデータを用いて解析を行った。これまでの研究で、Monocyte/Lymphocyte が結核の発症や重症化に関連があるとする解析結果があったため、HIV 感染者の結核スクリーニングに血球数を使えないかと考え解析を行った。解析結果から Neutrophil/Lymphocyte 比が高いと、2.19 倍 (aHR 2.19, 95%CI:1.23-3.90) 結核のリスクが上昇することが判明した (図 1)[7]

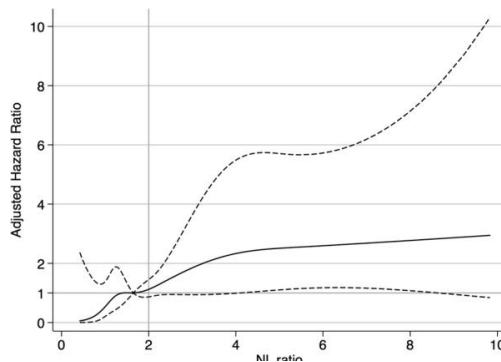


図 1: Neutrophil/Lymphocyte 比と結核発症のハザード比との関係

4) Monocyte とアレルギー疾患との関係

初期の 360 名を対象とした Toll 様レセプター刺激後のサイトカイン発現量と 2 歳時の血球数分類に相関があった。自然免疫はアレルギー疾患との関連も示唆されており、Toll 様レセプター刺激後のサイトカイン発現量と相関があった Monocyte が、アレルギー疾患のマーカーとなる可能性を考え、Monocyte 数とアレルギー疾患との関係を解析した。出生コホートに登録された小児のうち 6 歳までフォローアップできた 973 名のうち 51 名が喘鳴などの喘息様症状が出現していた。喘鳴様症状が出現するリスク因子に高 monocyte 血症があり、monocyte 数が低値の小児に比べ約 4 倍喘鳴の出現するリスクが高かった。Monocyte 数は TLR 刺激後の炎症性サイトカインの発現量とも相関があり、自然免疫応答能とアレルギー疾患との関連も示唆される結果であった。これらの解析結果については現在論文を執筆し国際学術誌への投稿準備中である。

<参考文献>

1. Lin L *et al.* Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *The Lancet* 379, 2151-2161 (2012).
2. Miyahara, R *et al.*, Exposure to paternal tobacco smoking increased child hospitalization for lower respiratory infections but not for other diseases in Vietnam. *Scientific Reports* (2016).
3. Poh, B. K. *et al.* 25-hydroxy-vitamin D demography and the risk of vitamin D insufficiency in the South East Asian Nutrition Surveys (SEANUTS). *Asia Pac J Clin Nutr* 25, 538-548 (2016)
4. Ho-Pham, L. T. *et al.* Association between vitamin D insufficiency and tuberculosis in a Vietnamese population. *BMC Infect Dis* 10, 306 (2010)
5. Jolliffe, D.A., Griffiths, C.J. & Martineau, A.R., 2013. Vitamin D in the prevention of acute respiratory infection: systematic review of clinical studies, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 136, pp.321-32
6. Reins, R. Y., Baidouri, H. & McDermott, A. M. Vitamin D Activation and Function in Human Corneal Epithelial Cells During TLR-Induced Inflammation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 7715-7727 (2015).
7. Miyahara, R *et al.*, Predicting the Risk of Pulmonary Tuberculosis Based on the Neutrophil-To-Lymphocyte Ratio at TB Screening in HIV-infected Individuals, *BMC infect Dis*, Jul 29;19(1):667 (2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Reiko Miyahara	4. 巻 19
2. 論文標題 Predicting the Risk of Pulmonary Tuberculosis Based on the Neutrophil-To-Lymphocyte Ratio at TB Screening in HIV-infected Individuals	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC infectious diseases	6. 最初と最後の頁 667
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12879-019-4292-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----