

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16527

研究課題名(和文)肺MAC症の慢性肉芽形成時のマクロファージ機能変化解明—microRNAの役割

研究課題名(英文)Elucidation of changes in macrophage function during chronic granulation formation in pulmonary MAC disease.

研究代表者

郡山 豊泰 (Koriyama, Toyoyasu)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・臨床検査技師

研究者番号：60723616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、鹿児島大学病院検査部で分離された臨床株を用いてMATR-VNTR解析を行った。多型解析は、15ヶ所のMATR-VNTR領域を対象としPCR増幅反応を行った(T. Inagaki et al. J Clin Microbiol. 2009)。分離された菌株は、材料種により同一クローンを示しており、臨床現場において感染ルートの同定に非常に有用であることが再確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性慢性呼吸器疾患である肺MAC(M. avium complex)症は、世界中で患者数の増加傾向にある。本研究は、当院で2017年1月から同年5月の間に臨床検体より分離されたM. aviumを用いて、MATR-VNTR解析をおこなった。解析の結果、同一クローンを示しており、感染ルートの知見のみならず病原性の高い株やポリクローナル感染の有無を評価できる。さらには治療開始の評価だけではなく、治療薬選択への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, MATR-VNTR analysis was performed using clinical strains isolated at the Clinical Laboratory of Kagoshima University Hospital. Polymorphism analysis was performed by PCR amplification of 15 MATR-VNTR regions. The isolated strains showed identical clones depending on the material type, which was confirmed to be very useful in identifying the route of infection in clinical site.

研究分野：感染症学

キーワード：M. avium complex MATR-VNTR マイクロRNA RICTOR

1. 研究開始当初の背景

① マクロファージと mTOR

mTOR は、自然免疫細胞でも多岐にわたる役割を担っている。近年、mTOR がマクロファージの M1/M2 分極やオートファジーに関連するなど mTORC1 に関する議論が盛んである。本研究は、*Legionella* 感染により mTORC2 の構成成分である RICTOR が miR-218 で発現抑制されること、マクロファージのサイトカイン産生促進に miR-218 が関与することを報告した。

mTOR と肉芽腫形成

非感染において発症するサルコイドーシスの進行について、肉芽腫を形成する分子シグナルがこれまで不明であった。近年、mTORC1 シグナルを活性化させることで、サルコイドーシスの進展に関与すること、サルコイドーシス患者では、mTORC1 の活性化、glycolysis、マクロファージの増殖が臨床的疾患の進行と相関があると証明された。

M. avium と microRNA について

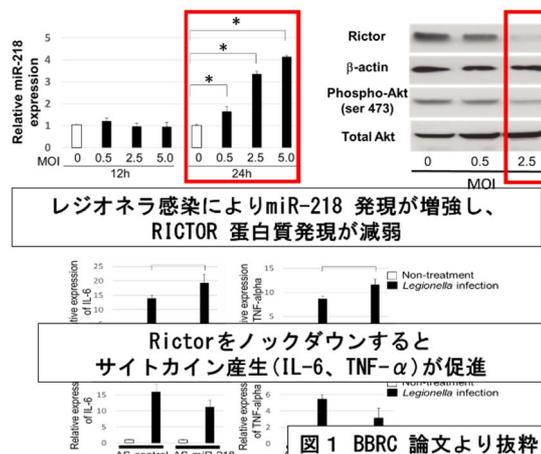
非コード RNA の microRNA は 1993 年に線虫で発見されて以来、ヒトのあらゆる組織細胞に発現し、その各臓器で様々な生理的役割を持つこと、多くの疾患の発症と進展に関与することが証明された。これまで *M. avium* と microRNA に関連した論文報告は 2 報のみであり、miRNA-27a-3p (IL-10)、miR-150 (PDCD4) である。*カッコ内は、論文で示された標的遺伝子を示す。

2. 研究の目的

肺 MAC 症における microRNA の機能解析報告は既にされているが、その機能が *M. avium* の感染ともない生態に関する報告はない。病原体に関連した microRNA 分野の報告は、多くの進歩を遂げ臨床的意義・発展を遂げてきたが、肺 MAC 症における microRNA についてはいまだに発展途上で多くが未解明ある。本研究はこの未知の感染症である肺 MAC 症における microRNA の役割に対して、感染症での意義を見出すことを目的とした。まず初めに、*M. avium complex* の MATR-VNTR 解析を行い病原体のアリルパターンを解析することで感染ルートの同定を目的とした。

3. 研究の方法

当院で 2017 年 1 月から同年 5 月の間に臨床検体より分離された *M. avium complex* を用いて MATR-VNTR 解析をおこなった。*M. avium complex* の同定試験は、固形培地(2%小川培地:極東製薬社)や液体培地(MGIT:日本 B.D.社)で分離された菌株を PCR 法(cobas MAI:Roche社)を用いて同定した。菌株の DNA 抽出は、QIAamp DNA mini kit (QIAGEN社)で行い、得られた DNA をもとに多型解析を行った。多型解析は、15ヶ所の MATR-VNTR 領域を対象とし PCR 増幅反応を行った (T. Inagaki et al. J Clin Microbiol.



2009)。PCR 産物は、2 % アガロースゲル電気泳動により分離した。

4 . 研究成果

本研究は、当院で 2017 年 1 月から同年 5 月の間の抗酸菌検査の件数と抗酸菌の検出数を示した図である。当院でも非結核性抗酸菌症の検査数は増加傾向であった。また、M. avium complex の検出数は増加傾向であった。

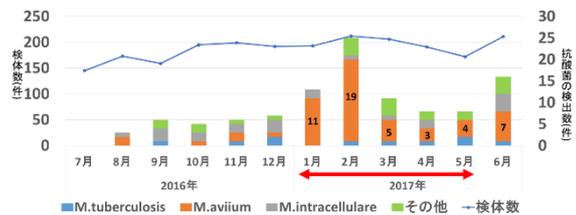
顕著に増加傾向を示す 2017 年 1 月と 2 月を中心に MATR-VNTR 解析を行った。解析の一例を右図に示した。

分離された菌株は、材料種により同一クローンを示しており、臨床現場において感染ルートの同定に非常に有用であることが再確認できた。今後も MATR-VNTR 解析を検査部で迅速に行っていく体制作りにも貢献できると考えている。

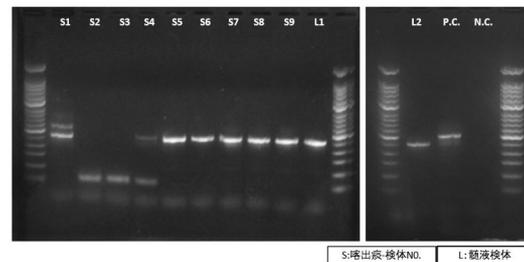
またこれらの多型解析を用いることは、病原性の高い菌株やポリクローナル感染の有無を評価できる。さらには肺 MAC 症の治療開始のみならず、治療選択への応用が期待されるところと考えた。

次にマイクロアレイ解析を行うため抗酸菌の細胞壁の一部であるミコール酸を用いた予備実験を計画した。細胞死の有無について TUNNEL 法および PI 法を用いてフローサイトでの確認や感染マクロファージの Caspase-1, -3, -8、をウエスタンブロット法で確認する予定であったが、新型コロナ感染症の影響で研究に遅延をきたした。したがって最終年度まで一定の成果を得ることはできなかったが、今後も継続して検討を行うことで学会発表や論文なので成果報告を行う予定である。

鹿児島大学病院における抗酸菌の推移



MATR-5



参考文献

- 1 . Monika Linke et al. Chronic signaling via the metabolic checkpoint kinase mTORC1 induces macrophage granuloma formation and marks sarcoidosis progression. Nat Immunol. 2017
- 2 . Thomas Weichhart et al. Regulation of innate immune cell function by mTOR. Nat Rev Immunol. 2015
- 3 . Koriyama T et al. Legionella pneumophila infection-mediated regulation of RICTOR via miR-218 in U937 macrophage cells. BBRC 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mukaihara K, Yamakuchi M, Kanda H, Shigehisa Y, Arata K, Matsumoto K, Takenouchi K, Oyama Y, Koriyama T, Hashiguchi T, ImotoY.	4. 巻 36
2. 論文標題 Evaluation of VEGF-A in platelet and microRNA-126 in serum after coronary artery bypass grafting.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heart Vessels.	6. 最初と最後の頁 1635-1645
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00380-021-01855-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Otake S, Ajiki J, Yoshida M, Koriyama T, Kasai	4. 巻 63
2. 論文標題 Contact with a snake leading to testicular necrosis due to Salmonella Saintpaul infection.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 M.Pediatr Int.	6. 最初と最後の頁 119-121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.14375	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ryo Imakiire, Takuro Nishikawa, Hiroyuki Tominaga, Hiroki Tawaratsumida, Naoko Imuta, Toyoyasu Koriyama, Junichiro Nishi, Noboru Taniguchi, Yoshifumi Kawano	4. 巻 Dec;39(12)
2. 論文標題 Bacillus Calmette-GuErin-Associated Cervical Spondylitis in a 3-Year-Old Immunocompetent Girl	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatr Infect Dis J.	6. 最初と最後の頁 e466-e469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/INF.0000000000002893.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shogo Otake, Jun Ajiki, Makiko Yoshida, Toyoyasu Koriyama, Masashi Kasai	4. 巻 Jan;63(1)
2. 論文標題 Contact with a snake leading to testicular necrosis due to Salmonella Saintpaul infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatr Int.	6. 最初と最後の頁 119-121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.14375.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 郡山 豊泰, 大山 陽子, 川畑 恵, 小濱 祐行, 福山 竜子, 舞木 公子, 中村 政敏, 藤崎 知園子, 東 貞行, 田上 聖徳, 竹之内 和則, 山口 宗一, 政元 いずみ, 橋口 照人
2. 発表標題 病院検査室におけるM aviumの偽陽性例の検討
3. 学会等名 第68回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東 貞行, 藤崎 知園子, 郡山 豊泰, 川畑 恵, 小濱 祐行, 福山 竜子, 舞木 公子, 佐藤 香奈子, 中村 政敏, 政元 いずみ, 田上 聖徳, 大山 陽子, 竹之内 和則, 山口 宗一, 橋口 照人
2. 発表標題 呼吸器系細菌感染症の簡便な検出率改善への試み
3. 学会等名 第68回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------