

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10023

研究課題名(和文)肺MAC症の治療効果を予測するバイオマーカーの探究

研究課題名(英文)Biomarker to predict treatment efficacy of MAC pulmonary disease

研究代表者

伊藤 穰 (Yutaka, Ito)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授

研究者番号：80362482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：12か月以上の多剤治療を行った肺MAC症18例において、気管支肺胞洗浄(BAL)液中のLL-37は菌陰性化と関連はなかったが、CT画像所見の改善と関連した。BAL中のLL-37と好中球割合、IL-8に有意な正の相関関係を認めた。CT画像所見の改善にはBAL液中の好中球の割合、IL-8、年齢、末梢血白血数、好中球数、CRP値のいずれも関連がなく、BAL液中のLL-37のみが関連し、CT画像所見の改善を予測するマーカーであった。LL-37存在下でのクラリスロマイシン、リファンピシン、エタンブトールに対するMAC菌のMICは有意に低下し、LL-37に抗菌活性増強効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LL-37は好中球から産生されると報告されており、MAC菌感染により惹起された気管支、肺内の好中球性炎症に関連して産生されたLL-37が、その抗菌薬の増強効果により画像所見の改善という臨床効果につながったと考えられ、LL-37は治療効果を予測するバイオマーカーになる可能性が示された。治療前喀痰培養陰性の軽症例が多く、菌陰性化との関連を示せなかったのが本研究の限界ではあるが、LL-37が低値で抗菌治療による画像所見の改善が乏しい症例でのLL-37補充療法という新たな治療の可能性をみいだした。

研究成果の概要(英文)：Among 18 patients of pulmonary MAC disease who received multidrug treatment for more than 12 months, LL-37 in bronchoalveolar lavage (BAL) was associated with improvement of CT findings, but not bacterial negative conversion. LL-37 in BAL was positively correlated with neutrophil rate and IL-8 in BAL. The improvement of CT findings was not associated with neutrophil rate and IL-8 in BAL, age, white blood cell counts and neutrophil counts in blood and CRP. LL-37 in BAL was the only biomarker to predict the improvement of CT findings. The MICs of MAC bacilli for clarithromycin, rifampicin, and ethambutol in the presence of LL-37 were significantly reduced. LL-37 enhanced antimicrobial effects.

研究分野：感染症内科

キーワード：Mycobacterium avium LL-37 好中球 IL-8 抗菌活性 CT 菌陰性化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺 *Mycobacterium avium complex* (MAC) 症は難治性の非結核性抗酸菌感染症で、近年患者数は増加傾向にある。標準治療であるマクロライド系抗菌薬 clarithromycin (CAM) を含む多剤併用治療を行っても、細菌学的治癒を示す菌陰性化率 70%程度で、空洞形成や喀痰塗抹陽性など、臨床的に病巣菌量が多いと肺 MAC 症の治療不応性に関わるとされてきた。また、使用する抗菌薬のうち CAM 感受性のみが菌陰性化と関連していることが明らかにされているが、CAM 感受性菌でもしばしば菌陰性化には至らない。環境常在菌である MAC に感染、発病するには何らかの宿主因子が関連すると想定されているが、未だ定説はなく、病勢や抗菌治療に対する効果を予測する有用なバイオマーカーについても不明である。

Cathelicidin/LL-37 は 37 アミノ酸からなる抗菌ペプチドで好中球、マクロファージや上皮細胞などから産生される。Toll-like receptor (TLR) および vitamin D receptor を介してその産生は制御され、結核菌や真菌など様々な微生物の殺菌に関与する。しかし、臨床的な意味づけには不明な点が多く、結核患者では血清中の vitamin D [25(OH)D] と LL-37 に相関はなかった。また、COPD 患者の喀痰中の LL-37 はインフルエンザ菌などの菌陽性例では高値 (Parameswaran *et al.* Chest 2011) であったが、嚢胞性線維症患者の気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中の LL-37 は菌量とは無関係であった。

私どもの肺 MAC 症患者においても血清 25(OH) D 値と血清 LL-37 には相関を認めていない。また、抗菌治療により MAC 菌の排菌が停止した群としなかった群との比較でも血清 LL-37 には有意差はなかった。一方、BAL 中の LL-37 は排菌停止群では有意に高値であり、BAL 中の LL-37 は治療効果を予測するバイオマーカーとなる可能性が考えられた。

緑膿菌などに対する LL-37 の最小発育阻止濃度 (MIC) は高く、その抗菌活性は抗菌薬に比して弱いと考えられている。上記の BAL は肺 MAC 症の診断時のもので、同時に MAC 菌が検出されており、検出された LL-37 では MAC は殺菌されていないことになる。したがって、LL-37 のみが直接的に MAC 症治療の効果に影響を与えたのではないと考えられた。

この機序として、使用した抗菌薬が LL-37 との相乗作用により抗菌活性を上げた (MIC を低下させた) と考えられる。また、LL-37 には緑膿菌やカンジダなどにおいてバイオフィーム産生を抑制する作用があることが報告されている。LL-37 高値群では MAC 菌のバイオフィームの産生を低下させて、抗菌治療での有効性をあげた可能性も考えられる。

さらに、血清中の LL-37 は治療効果に無関係であり、肺において LL-37 の発現に個体差が生じたと考えられた。これにはマクロファージなどの肺での LL-37 産生細胞での LL-37 誘導能が異なる可能性と感染した MAC 菌により LL-37 産生量が制御されている可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

1. BAL 中の LL-37 が治療有効性を予測するバイオマーカーになるかの検証
2. BAL 中の細胞分画、IL-8 と LL-37 との関連性とバイオマーカーになるかの検証
3. LL-37 の MAC 菌に対する抗菌活性と LL-37 存在下での抗菌薬の抗菌活性増強効果

### 3. 研究の方法

1. 肺 MAC 症患者の治療前に血清と BAL の保存を行い、凍結保存の後、LL-37 を ELISA で測定した。肺 MAC 症の標準治療を 1 年行い、1 年後に喀痰抗酸菌培養陰性による菌陰性化と CT 画像所見の改善により、治療の有効性を判定した。これらと BAL 中の LL-37 との関連性を検証した。

2. BAL 中の好中球、リンパ球、マクロファージの細胞分画は臨床検査値から得た。IL-8 は ELISA で測定し、これらと LL-37 の相関および治療効果との関連を検証した。

3. 喀痰、BAL などから分離した患者由来 MAC 臨床分離株を LL-37 (0, 0.2, 2, 20 $\mu$ g/ml) 存在下にミュラーヒントン培地で培養し、MIC を測定した。

*M. avium* GTC603 標準株を、LL-37 (0, 0.2, 2, 20 $\mu$ g/ml) 存在下の colony forming unit (CFU) を測定した。

rifampicin (RFP)、ethambutol (EB)、CAM の各薬剤と LL-37 の希釈列を組み合わせた 96 穴チェッカーボードプレートを作成した。このプレート上で患者由来 MAC 菌株をミュラーヒントン培地で培養し、各薬剤に対する MIC を測定した。

統計処理：2 群間比較は連続変数は Mann-Whitney U 検定、名義変数は Fisher の正確検定、相関関係は Spearman の順位相関係数で行い、 $P < 0.05$  を有意とした

#### 4. 研究成果

登録患者：45 例の肺 MAC 症疑い例に対し、気管支肺胞洗浄（BAL）を施行し、33 例で非結核性抗酸菌症と診断した。菌種ごとの内訳は *M. avium* 症 21 例（63.6%）、*Mycobacterium intracellulare* 症 9 例（27.3%）、*Mycobacterium abscessus* 症 2 例（6.1%）、*Mycobacterium kansasii* 症 1 例（3.0%）、*Mycobacterium talmoniae* 症 1 例（3.0%）だった。*M. avium* 症と *M. intracellulare* 症を合わせた MAC 症は 29 例で、24 例で多剤抗菌治療を開始した。多剤抗菌治療の内訳は RFP + EB + CAM 21 例、RFP + EB + CAM + streptomycin 1 例、EB + CAM 1 例、RFP + CAM 1 例だった。18 例で 12 か月以上治療を行い、RFP + EB + CAM 16 例、RFP + EB + CAM + SM 1 例、EB + CAM 1 例だった。（表 1、2）

表 1 肺 MAC 症 29 例の患者背景

年齢	62.3±10.3
性別、男/女	2/27
Body mass index	20.5±2.5
画像所見、NB/FC	27/2
多剤抗菌治療	24

表 2 12 か月以上治療した 18 例の患者背景

年齢	59.9±9.0
性別、男/女	0/18
Body mass index	19.6±2.1
画像所見、NB/FC	16/2

NB; nodular bronchiectatic type、FC; fibrocavitary type.

#### 1. BAL 中の LL-37 が治療有効性を予測するバイオマーカーになるかの検証

2 か月以上の多剤治療を行った肺 MAC 症 18 例のうち菌陰性化した 8 例、陰性化しなかった 10 例の間で BAL 液中の LL-37 に有意差はなかった ( $P=0.813$ 、図 1)。CT 画像所見の改善のあった 13 例は改善なかった 5 例と比べ BAL 液中の LL-37 は改善群で有意に高値だった ( $P=0.022$ 、図 2)。血清の LL-37 は菌陰性化、放射線学的効果と関連はなかった。

図 1. 菌陰性化と BAL 中の LL-37 (ng/ml)

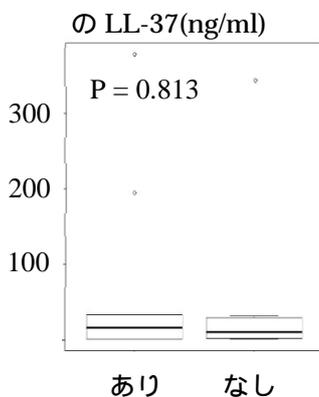
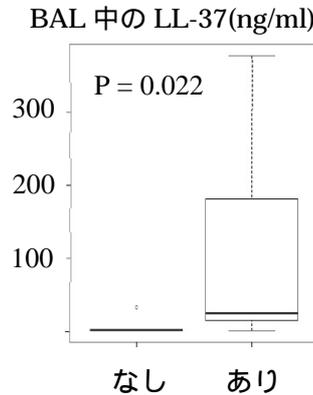


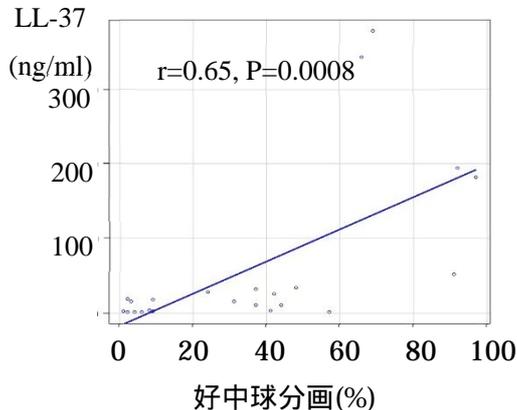
図 2. 画像所見の改善と BAL 中の LL-37 (ng/ml)



#### 2. BAL 中の細胞分画、IL-8 と LL-37 との関連性とバイオマーカーになるかの検証

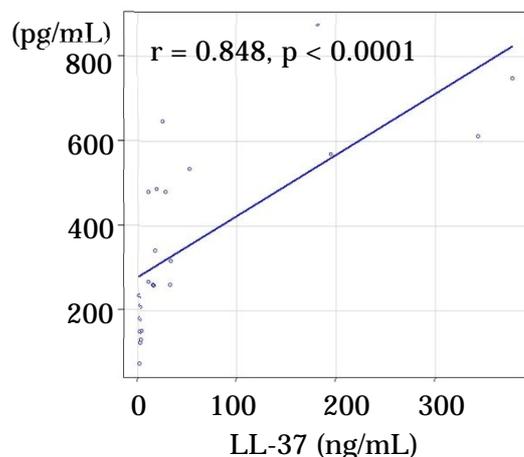
肺 MAC 症 29 例の BAL 中の総細胞数は  $5.1 \pm 7.7$  ( $\times 10^5/\text{ml}$ ) でマクロファージ 42.3±27.3 (%）、好中球 35.7±30.6 (%）、リンパ球 21.5±16.3 (%）、好酸球 0.6±0.7 (%）だった。BAL 液中の細胞分画のうち好中球の割合との間に有意な正相関 ( $r=0.65$ ,  $P=0.0008$ ) を認めた (図 3)。

図 3. BAL 中の LL-37 と好中球分画

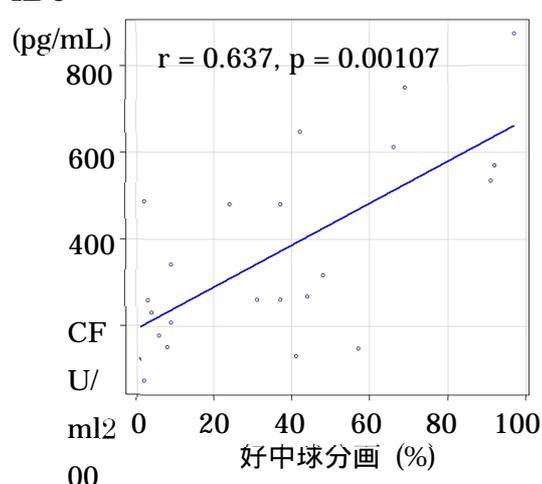


BAL 液中の LL-37 と IL-8、好中球割合と IL-8 の間にも正の相関関係を認めた ( $r=0.848$ ,  $P<0.001$ 、図 4 ;  $r=0.637$ ,  $P=0.001$ 、図 5)

IL-8 図 4 . BAL 中の LL-37 と IL-8



IL-8 図 5 . BAL 中の好中球割合と IL-8



画像所見の改善する関連する因子は、BAL 中の LL-37 以外にはバイオマーカー、患者背景、ベースラインの CT 画像所見で有意なものはなかった。(表 3)

表 3 CT 画像所見の改善に関連する因子

	改善あり(n=13)	改善なし(n=5)	P
年齢	57.0 (49.0, 65.0)	63.0 (60.0, 70.0)	0.166
BMI	19.8 (17.7, 20.5)	19.0 (18.5, 20.4)	0.882
血清 CRP	0.04 (0.03, 0.05)	0.08 (0.07, 0.14)	0.096
空洞あり	1 (7.7)	2 (40)	0.172
気管支拡張あり	13 (100)	4 (80)	0.172
BAL 中の LL-37	25.4 (15.4, 182.1)	1.86 (1.79, 2.47)	0.035
BAL 中の好中球数	109.4 (36.3, 351.4)	28.5 (14.5, 227.9)	0.573
BAL 中の IL-8	525.3 (317.0, 638.6)	148.9 (136.7, 233.0)	0.112

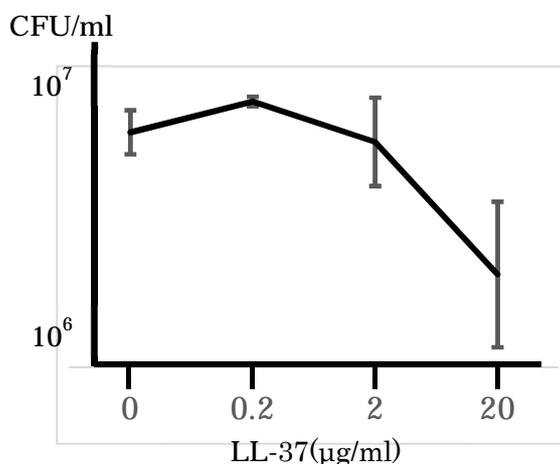
中央値 (IQR) , n (%)

### 3) LL-37 の MAC 菌に対する抗菌活性と LL-37 存在下での抗菌薬の抗菌活性増強効果

肺 MAC 症患者由来の 22 株 (*M. avium* 12 株、*M. intracellulare* 10 株) の LL-37 に対する MIC はすべてにおいて  $>20\mu\text{g/ml}$  だった。

*M. avium* GTC603 標準株を、LL-37 (0, 0.2, 2,  $20\mu\text{g/ml}$ ) 存在下の CFU は LL-37 を  $20\mu\text{g/ml}$  追加することにより有意に低下した ( $P=0.03$ 、図 6)。

図 6 *M. avium* GTC603 標準株に対する LL-37 抗菌活性



肺 MAC 症患者由来の 22 株(*M. avium* 12 株、*M. intracellulare* 10 株)の各薬剤の MIC は LL-37 存在下で有意な低下を認めた。(表 4)

表 4 LL-37 存在下での MAC 菌に対する各薬剤の MIC<sub>50/90</sub>

	LL-37(-)	LL-37 1µg/ml	LL-37 2.5µg/ml	LL-37 5µg/ml	LL-37 10µg/ml	LL-37 20µg/ml	P
CAM	1/1	0.5/1	0.5/1	0.25/1	0.25/1	0.25/1	0.0086
RFP	0.5/0.5<	0.25/0.5<	0.25/0.5<	0.12/0.5	0.12/0.5	0.12/0.5	0.0031
EB	4/16	2/8	<1/2	<1/2	<1/2	<1/2	<0.001

BAL 細胞、気道上皮培養細胞(BEAS-2B)を MAC 生菌で刺激し、上清中の LL-37 を測定したが、検出できなかった。

#### 結果のまとめ

BAL 中の LL-37 は抗菌治療後の CT 画像所見の改善と関連した。喀痰培養による菌陰性化とは関連はなかった。BAL 中の LL-37 は好中球割合、IL-8 と正の相関を認めた。他の臨床所見も含めて CT 画像所見の改善に関連したのは LL-37 のみであった。LL-37 自体の MAC 菌に対する抗菌活性は低かったが、用量依存的に菌増殖抑制を認めた。CAM、RFP、EB の抗菌薬に対する MIC は LL-37 存在下で用量依存的に有意に低下し、LL-37 に抗菌薬の抗菌活性増強効果を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山羽悠介、伊藤 穰、鈴木克洋、菊地利明、小川賢二、長谷川直樹、藤内 智、倉島篤行、渡辺彰、新実彰男
2. 発表標題 抗菌ペプチドLL-37のMAC菌に対する抗菌活性について
3. 学会等名 第58回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山羽悠介、伊藤 穰、鈴木克洋、菊地利明、小川賢二、長谷川直樹、藤内 智、倉島篤行、渡辺彰、新実彰男
2. 発表標題 抗菌ペプチドLL-37のMAC菌に対する抗菌活性について
3. 学会等名 第93回日本結核病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山羽悠介、伊藤 穰、鈴木克洋、菊地利明、小川賢二、長谷川直樹、藤内 智、倉島篤行、渡辺彰、新実彰男
2. 発表標題 抗菌ペプチドLL-37のMAC菌に対する抗菌活性について
3. 学会等名 第58回日本呼吸器学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山羽悠介、伊藤 穰、鈴木克洋、菊地利明、小川賢二、長谷川直樹、藤内 智、倉島篤行、渡辺彰、新実彰男
2. 発表標題 抗菌ペプチドLL-37のMAC菌に対する抗菌活性について
3. 学会等名 第93回日本結核病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 祐太、伊藤 穰、上村 剛大、中村 敦、新実 彰男
2. 発表標題 肺MAC症における抗菌ペプチドLL-37のBAL中濃度と治療効果の関連
3. 学会等名 第97回日本結核病学会
4. 発表年 2022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
研究分担者	新実 彰男  (Niimi Akio)  (30252513)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授    (23903)	

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
---------	---------