

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16226

研究課題名(和文)肺胞マクロファージ免疫に着目した非結核性抗酸菌症の病原性の解明

研究課題名(英文)Analysis of virulence factors of non-tuberculous mycobacteria focus on alveolar macrophages

研究代表者

井手 昇太郎 (IDE, Shotaro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：20773336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺非結核性抗酸菌症(pNTM)の進展に関与する因子を明らかにするため、長崎大学病院呼吸器内科で診断したpNTM 64株を集積した。それらの菌株で遺伝子導入マクロファージ(AM)を刺激し、NF- $\gamma$  B活性及び細胞上清のTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ を測定した。その結果、*M. kansasii*のNF- $\gamma$  B活性誘導能は高い値を示した。*M. abscessus*では、Smooth型で低く、Rough型は高い値を示した。AMのTNF- $\alpha$ 産生はNF- $\gamma$  B依存性、IL-1 $\beta$ は非依存性だった。NF- $\gamma$  B活性と気管支拡張は逆相関を示した。以上より、菌種によるAMパターン認識受容体の反応の相違を反映してい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

pNTMは近年本邦で増加しているが、難治性であり長期間の治療を必要とする疾患である。本研究では、肺の重要な免疫細胞であるマクロファージの転写因子NF- $\gamma$  B誘導能が、pNTMの病型を規定しているか明らかにすることを目的とした。NTMの菌種ごとにマクロファージの免疫反応の違いが見られ、それがpNTMの病型に関連している可能性が示唆された。原因微生物と宿主との免疫反応を明らかにすることで、pNTMの病態および増悪因子の理解につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research was to analyze virulence factors of non-tuberculous mycobacteria (NTM) focusing on immune responses to alveolar macrophages (AM). We collected 64 strains of NTM from patients with pulmonary non-tuberculous mycobacteriosis (pNTM). The NF- $\gamma$  B eGFP reporter lentiviral-transduced murine AM were stimulated with these clinical NTM strains in vitro, then activity of NF- $\gamma$  B expressed by luciferase was detected and inflammatory cytokines in supernatants were measured by ELISA. Distinct AM NF- $\gamma$  B activities was observed depending on NTM strains, e.g. *M. kansasii* and *M. abscessus* rough morphotype induced high activity of NF- $\gamma$  B. TNF- $\alpha$  production from AM was dependent on NF- $\gamma$  B, although IL-1 $\beta$  was independent. AM NF- $\gamma$  B activity and bronchial dilatation in pNTM showed an inverse correlation. These results suggested that the AM NF- $\gamma$  B response may relates to bronchial inflammation distraction in pNTM.

研究分野：感染免疫学

キーワード：非結核性抗酸菌 抗酸菌 マクロファージ NF- $\gamma$  B Mycobacterium NTM MAC 気管支拡張症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺非結核性抗酸菌症 (肺 **NTM** 症) は本邦においても罹患率が増加しているが、肺病変の進展に關与する微生物学的病原因子や宿主因子は未だ明らかではない。**NTM** は細胞内寄生菌であり、マクロファージを介したサイトカイン応答が感染免疫において重要な役割を担う。宿主のサイトカインおよびその受容体の遺伝子異常により免疫応答が減弱し、抗酸菌に対する易感感染性を来すと報告されているが、菌側の因子による免疫応答の多様性は不明である。

### 2. 研究の目的

肺 **NTM** 症において **NTM** 菌種と肺病変の進展にマクロファージ (**AM**) **NF-κB** 誘導能が關連しているかを明らかにする。**AM NF-κB** 誘導能の評価には、定量的かつ簡便に評価が可能な遺伝子導入マウスマクロファージを用い、多数の **NTM** 臨床分離株・病型・患者背景とマクロファージ **NF-κB** 活性化能との關連を解析する。

### 3. 研究の方法

長崎大学病院およびその關連病院で保存された **NTM** 臨床分離株を集積し、その内日本結核病学会・日本呼吸器学会合同基準 (**Kekkaku 83:525-526,2008**) により診断した肺 **NTM** 症例を電子カルテより抽出し、胸部 **CT** で気管支拡張の程度を測定した (**Reiff score, Am J Respir Crit Care Med 189:576-585,2014**)。またそれぞれの菌株 **106 CFU (10MOI)** で、遺伝子導入 **AM** 株 **RAW264.7-Lenti-NF-κB (Mol Ther 21:825-833, 2013)** を3時間刺激し、**Luciferase** 蛍光により **NF-κB** 活性を定量測定した。コントロールとして **LPS** を用い、各菌株の **NF-κB** 活性誘導能は **%LPS** として示した。さらに、**AM** が産生する **TNF-α**、**IL-1β** を細胞上清 **ELISA** 法で測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 結果

計 **64** 株の **NTM** 株 (**M.avium 38** 株、**M.intracellulare 17** 株、**M.abscessus 6** 株、**M.kansasii 3** 株) を得た。**M.abscessus** はコロニー形態により **Smooth (S 型)** と **Rough (R 型)** に分類した (図1)。

**M.avium** (中央値 **50.57**)、**M.intracellulare** (中央値 **60.57**) はほぼ同等の **AM NF-κB** 活性誘導能を呈するのに対して、**M.kansasii** では高い **NF-κB** 活性誘導能 (中央値 **97.96**) を示した。**M.abscessus** では、**S 型** で低く (中央値 **41.94**)、**R 型** は高い (中央値 **83.93**) **NF-κB** 活性誘導能を示した (**p=0.001**) (図2)。

図1. *M. abscessus* のコロニー形態

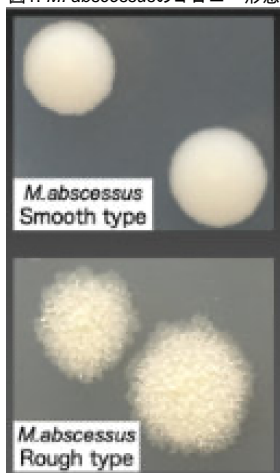
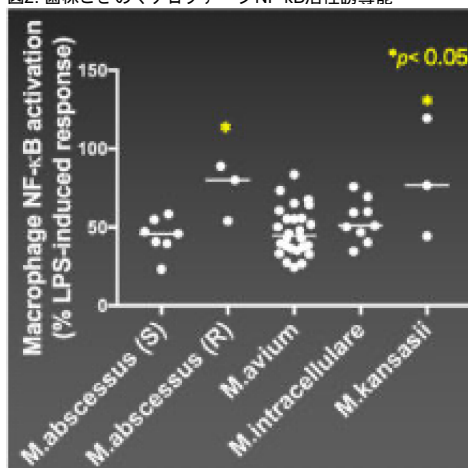
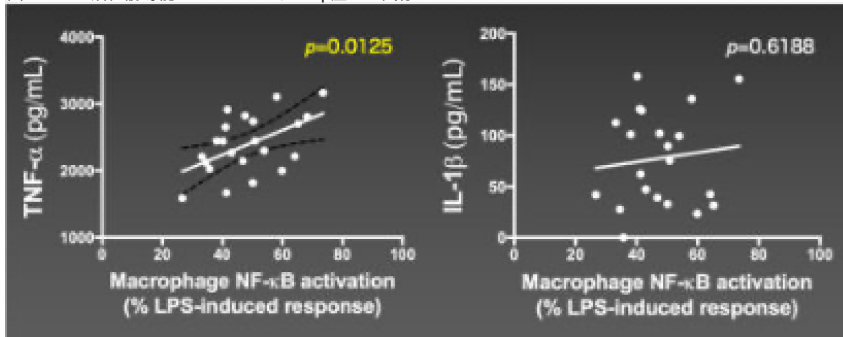


図2. 菌株ごとのマクロファージNF-κB活性誘導能



細胞上清の **TNF-α** は **NF-κB** 活性と正の相関がみられた一方で、**IL-1β** と **NF-κB** 活性との相関は認められなかった (図3)。

図3. NF-κB活性誘導能とTNF-αおよびIL-1β産生との関係



肺 NTM 症の血液炎症マーカー（白血球数、CRP 値）は AM NF-κB 活性との相関は認められなかった（図 4）。また NF-κB 活性とスコア化した気管支拡張の程度は逆相関（ $p=0.029$ ）を示した（図 5）。

図4. NF-κB活性誘導能と血液炎症マーカーとの関係

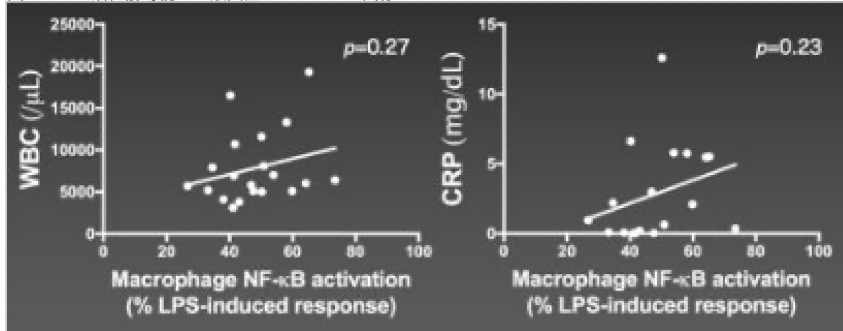
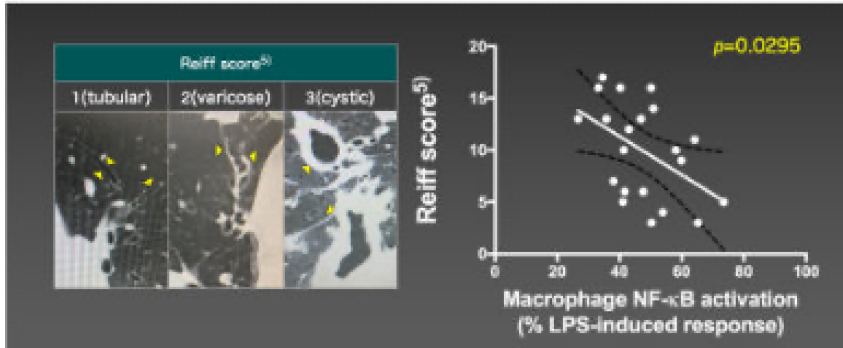


図5. NF-κB活性誘導能と気管支拡張との関係



## ( 2 ) 考察

NTM の AM NF-κB 活性誘導能は菌種で異なったことから、NTM 菌種による AM パターン認識受容体の反応の相違が示唆される。また NF-κB 活性を誘導しにくい NTM 株で気管支拡張が増悪するメカニズムについては、AM 細胞死との関連性を考慮し研究を進めている。

## ( 3 ) 結語

NTM の AM NF-κB 活性誘導能は菌種で異なり、気管支拡張と逆相関を示すことから、肺 NTM 症では NTM 菌による AM NF-κB 活性が気管支の炎症や拡張の進行と関連する可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Morimoto Misato, Fujikawa Keita, Ide Shotaro, Akagi Midori, Fujiwara Emiko, Mizokami Akinari, Kawakami Atsushi	4. 巻 60
2. 論文標題 Systemic Lupus Erythematosus Complicated with Listeria Monocytogenes Infection in a Pregnant Woman	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1627 ~ 1630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.5079-20	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 -

1. 著者名 Akagi Kazumasa, Yamamoto Kazuko, Uemura Asuka, Ide Shotaro, Hirayama Tatsuro, Takazono Takahiro, Imamura Yoshifumi, Miyazaki Taiga, Sakamoto Noriho, Shiraishi Hirokazu, Takahata Hideaki, Zaizen Yoshiaki, Fukuoka Junya, Morikawa Minoru, Ashizawa Kazuto, Teruya Katsuji, Izumikawa Koichi, Mukae Hiroshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Human immunodeficiency virus-associated vacuolar encephalomyelopathy with granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease improved after antiretroviral therapy: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AIDS Research and Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12981-020-00295-y	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 -

1. 著者名 Miyazaki Taiga, Fukushima Kiyoyasu, Hashiguchi Kohji, Inoue Yuichi, Mihara Tomo, Sawai Toyomitsu, Suyama Naofumi, Kobayashi Tsutomu, Kondo Akira, Fukuda Yuichi, Harada Yosuke, Sasaki Eisuke, Kaku Norihito, Ide Shotaro, Takazono Takahiro, et. al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Efficacy and safety of cefditoren pivoxil for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: A prospective multicenter interventional study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2019.03.018	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 -

1. 著者名 Sawai Toyomitsu, Koga Satoru, Ide Shotaro, Yoshioka Sumako, Matsuo Nobuko, Mukae Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 An iliopsoas abscess caused by Parvimonas micra: a case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medical Case Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13256-019-2004-0	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 -

1. 著者名 Sawai Toyomitsu, Nakao Takumi, Koga Satoru, Ide Shotaro, Yoshioka Sumako, Matsuo Nobuko, Mukae Hiroshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Miliary tuberculosis with co-existing pulmonary cryptococcosis in non-HIV patient without underlying diseases: a case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Pulmonary Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12890-018-0578-8	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 -

1. 著者名 井手昇太郎、迎寛	4. 巻 35
2. 論文標題 成人肺炎診療ガイドライン2017 市中肺炎	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Practice	6. 最初と最後の頁 522-528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 井手口周平、山本和子、巖水慧、井手昇太郎、平山達朗、高園貴弘、宮崎泰可、泉川公一、柳原克紀、迎寛
2. 発表標題 非結核性抗酸菌種別のマクロファージNF-B活性誘導能の検討
3. 学会等名 第95回 日本結核・非結核性抗酸菌症学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北御門孝、山本和子、芦澤信之、平山達朗、田代将人、田中健之、高園貴弘、今村圭文、宮崎泰可、泉川公一、柳原克紀、迎寛
2. 発表標題 Mycobacterium intracellulareによる骨・軟部組織感染症を繰り返した抗IFN- 抗体陽性自己免疫疾患の一例
3. 学会等名 第90回 日本感染症学会 西日本地方会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 巖水慧、山本和子、井手口周平、井手昇太郎、武田和明、高園貴弘、宮崎泰可、泉川公一、柳原克紀、迎 寛
2. 発表標題 非結核性抗酸菌種別のマクロファージNF-B活性誘導能の検討
3. 学会等名 第94回 日本結核病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本和子、巖水慧、井手口周平、井手昇太郎、平山達朗、高園貴弘、宮崎泰可、泉川公一、柳原克紀、迎 寛
2. 発表標題 非結核性抗酸菌臨床株のマクロファージNF- B活性誘導能の検討
3. 学会等名 第50回 結核・非定型抗酸菌症治療研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 巖水慧、山本和子、井手口周平、井手昇太郎、武田和明、高園貴弘、西條知見、今村圭文、宮崎泰可、柳原克紀、迎寛
2. 発表標題 Mycobacterium abscessusによる肺非結核性抗酸菌症の臨床的検討
3. 学会等名 第88回 日本感染症学会西日本地方会学術集会
4. 発表年 2018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
---------	---------