

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501015

研究課題名(和文)ポリフェノールの免疫活性化を介した抗結核作用の解析と予防・治療への有効性の検討

研究課題名(英文) Analysis of anti-tubercular activity through immune activation by polyphenol and consideration of its effectiveness to the prevention and the treatment

研究代表者

尾関 百合子(Ozeki, Yuriko)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00169301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：結核は世界最大級の感染症で有り、治療のための投薬期間が長いことから、より安全で副作用の少ない結核薬が求められる。我々はヒト単球由来細胞株THP1に感染した結核菌の増殖を抑制するポリフェノールの探索を実施し、ケンフェロール、ルテオリンがその作用を有し、かつ細胞毒性も低いことを見いだした。作用機作解明のために実施したマイクロアレー解析の結果、ケンフェロールの存在下で41の遺伝子がTHP1細胞内の結核菌増殖抑制に関与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Tuberculosis is the world's largest infectious disease. Because of its long administration period for the treatment, tuberculosis drugs with safer and fewer side effects are required. We found that kaempferol and luteolin inhibit growth of Mycobacterium tuberculosis infected in human monocyte-derived cell line THP1 at low cytotoxic level. In order to clarify the mechanism of inhibitory effect, we conducted microarray analysis. By the treatment of kaempferol, 41 genes affected growth inhibition of M. tuberculosis infected in THP1 cells.

研究分野：細菌学 結核

キーワード：ポリフェノール 結核 マクロファージ マイクロアレー

1. 研究開始当初の背景

結核は最大級の細菌感染症であり、2013年のWHO統計では900万人の新規登録患者と150万人の死亡者が報告されている。結核発症のほとんどは体内潜伏菌の再燃によるものであり、発症リスクはHIV感染者や糖尿病発症者で特に高い。結核の治療は結核菌の増殖が緩慢なために最低でも6ヶ月間の抗生剤服用が必要となる。他の感染症や疾患を持つ免疫能低下者にも投薬が必要であること、また投薬期間が長期にわたることから、抗結核薬は副作用の低い安全なものでなければならない。われわれは結核発症者の血中抗酸化物質濃度が低いことに着目し、抗結核作用を有するポリフェノールの探索を行ってきた。

2. 研究の目的

結核菌は細胞内寄生菌である。すでに見つけた抗結核作用を有するポリフェノールについて、細胞内感染菌に対する増殖抑制作用を検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒト単球由来細胞株 THP1 に結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv) を感染させ、ポリフェノールを添加して培養し、増殖抑制効果のあるポリフェノールのスクリーニングを実施した。THP1細胞は100 nMのPMAを添加してマクロファージに分化し、実験に用いた。細胞内の菌に対する増殖抑制能は界面活性剤を加えてTHP1細胞を破碎し、7H11培地に接種してコロニー数(CFU)から評価した。

(2) これらのポリフェノールのTHP1細胞に対する毒性は細胞からの乳酸脱水素酵素(LDH)遊離試験により検討した。

(3) THP1細胞内の結核菌増殖抑制のメカニズムについてTNF- $\gamma$ 産生、IFN- $\gamma$ による影響を検討した。また、感染後にRNAを採取し、mRNAをcDNAに逆転写後、Agilent社のアレースライド(SurePrint G3 Human 8x60K ver.2.0)で遺伝子発現量解析を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞内感染結核菌に対するポリフェノールの効果

結核菌に対して100  $\mu$ M以下の濃度で増殖抑制作用を有するポリフェノールはケンフェロールとクルクミンであった。次に、細胞内感染結核菌に対するポリフェノールの抑制作用について検討した。マウス骨髄由来マクロファージに感染した結核菌に対して100  $\mu$ Mの濃度で増殖抑制力を持つポリフェノールはケンフェロール、クルクミンの他に数種類存在した。しかし、ヒト単球由来細胞株 THP1 に感染した結核菌に対して同濃度以下で抑制力をもつポリフェノールはルテオリン、ケンフェロール、クルクミンのみに限定され、さらに低い50  $\mu$ Mでも増殖抑制が見られた。この結果は

これらのポリフェノールが THP1 細胞の活性化を介して結核菌の増殖を抑制していると考えられた(図1)。

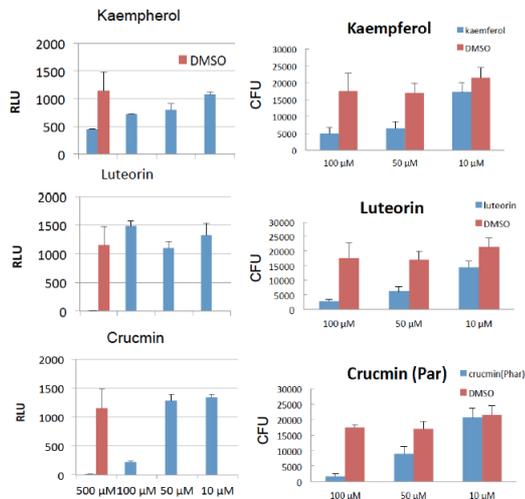


図1. ポリフェノールの結核菌に対する直接的な増殖抑制作用(左列)および THP1 細胞に感染した結核菌に対する増殖抑制作用(右列)

(2) ポリフェノールの細胞に対する毒性および細胞内感染結核菌に対する増殖抑制メカニズムの検討-1

上記の THP1 細胞に感染した結核菌に対して増殖抑制力をもつポリフェノールのうち、ルテオリンとケンフェロールは100  $\mu$ Mでも細胞毒性が無かったが、クルクミンは低濃度でも強い細胞毒性が見られた。次に結核菌感染 THP1 細胞で増殖抑制に必要な TNF- $\gamma$  産生や外部から添加した IFN- $\gamma$  の影響について検討した。しかし、ポリフェノール添加による結核菌の増殖抑制と TNF- $\gamma$  産生量に差は無く、また、IFN- $\gamma$  による細胞の活性化と増殖抑制も関連が見られなかった。

(3) 細胞内感染結核菌に対する増殖抑制メカニズムの検討-2

上記のように THP1 細胞に感染した結核菌のポリフェノールによる増殖抑制メカニズムが予想できないことから、感染後の mRNA を採取してマイクロアレー解析を実施した。ポリフェノールは細胞毒性の低い2種のうちケンフェロールを用い、100  $\mu$ M および 50  $\mu$ M の濃度で検討した。いずれの実験においても増減が見られた遺伝子はケンフェロールの作用のみで2倍以上に発現が増加した(2 up) 遺伝子が55、半分に以下に低下した(0.5 down) 遺伝子が73、感染のみで変動する遺伝子数は2 up が734、0.5 down が484であった。2回のいずれの実験においても、結核菌感染後にケンフェロールが存在することで発現が変動する遺伝子は2 up がわずかに17、0.5 down が24と少なかった。菌感染のみで発現が制御される遺伝子数が非常に多く、ケンフェロールの増殖抑制作用に関連する遺伝子は検

出されにくい、これらの 17 および 24 の中に含まれているはずである。これらについて非感染、ケンフェロール無添加のコントロールを基準として発現量を比較した結果、蛋白質の holding、プロスタグランジン合成、ヒストンの安定化に関する遺伝子発現の有意な増加、アポトーシス、炎症性シグナル伝達に関わる遺伝子発現の有意な減少が観察された。

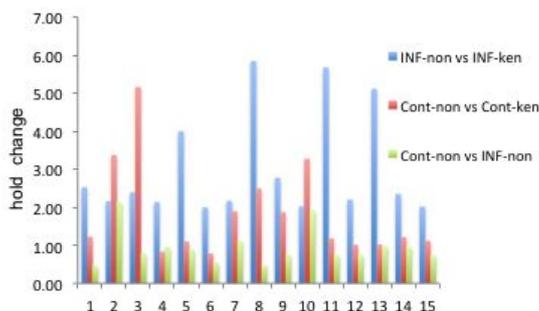


図2 結核菌感染 THP1 細胞でケンフェロールにより発現が2倍以上増強する遺伝子の例

INF-non (感染+, ケンフェロール-)  
 INF-ken (感染+, ケンフェロール+)  
 Cont-non (感染-, ケンフェロール-)  
 Cont-ken (感染-, ケンフェロール+)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 24 件)

- 1) Wada T, Iwamoto T, Tamaru A, Seto J, Ahiko T, Yamamoto K, Hase A, Maeda S, Yamamoto T. Clonality and micro-diversity of a nationwide spreading genotype of Mycobacterium tuberculosis in Japan. PLoS One, **2015**, Mar 3;10(3):e0118495. (査読あり)
- 2) Yamaguchi T, Izumi Y, Nakamura Y, Yamazaki T, Shiota M, Sano S, Tanaka M, Osada-Oka M, Shimada K, Miura K, Yoshiyama M, Iwao H. Repeated remote ischemic conditioning attenuates left ventricular remodeling via exosome-mediated intercellular communication on chronic heart failure after myocardial infarction. Int J Cardiol. **2015**, 178:239-246 (査読あり)
- 3) Izumi Y, Yamaguchi T, Yamazaki T, Yamashita N, Nakamura Y, Shiota M, Tanaka M, Sano S, Osada-Oka M, Shimada K, Wanibuchi H, Miura K, Yoshiyama M, Iwao H. Percutaneous carbon dioxide treatment using a gas mist generator enhances the collateral blood flow in the ischemic hindlimb. J Atheroscler Thromb. **2015**, 22(1):38-51. (査読あり)
- 4) Nishiuchi Y, Tamaru A, Suzuki Y, Kitada S, Maekura R, Tateishi Y, Niki M, Ogura H, Matsumoto S. Direct detection of Mycobacterium avium in environmental water and scale samples by loop-mediated isothermal amplification. J Water Health, **2014**, Jun;12(2):211-9. (査読あり)
- 5) Iwamoto T, Arikawa K, Nakajima C, Nakanishi N, Nishiuchi Y, Yoshida S, Tamaru A, Tamura Y, Hoshino Y, Yoo H, Park YK, Saito H, Suzuki Y. Intra-subspecies sequence variability of the MACPPE12 gene in Mycobacterium avium subsp. hominissuis. Infect Genet Evol. **2014**, Jan;21:479-83. (査読あり)
- 6) Yamaguchi T, Yamazaki T, Kawaguchi H, Tawa M, Nakamura Y, Shiota M, Osada-Oka M, Tanimoto A, Okamura T, Miura K, Iwao H, Yoshiyama M, Izumi Y. Noninvasive metabolic syndrome model using an extremely small minipig, the microminipig. J Pharmacol Sci. **2014**, 126:168-171 (査読あり)
- 7) Tanaka M, Yamaguchi M, Shiota M, Kawamoto Y, Takahashi K, Inagaki A, Osada-Oka M, Harada A, Wanibuchi H, Izumi Y, Miura K, Iwao H, Ohkawa Y. Establishment of neutralizing rat monoclonal antibodies for fibroblast growth factor-2. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. **2014**, 33:261-269 (査読あり)
- 8) Tanaka M, Mun S, Harada A, Ohkawa Y, Inagaki A, Sano S, Takahashi K, Izumi Y, Osada-Oka M, Wanibuchi H, Yamagata M, Yukimura T, Miura K, Shiota M, Iwao H. Hsc70 contributes to cancer cell survival by preventing Rab1A degradation under stress conditions. PLoS One, **2014**, May 6;9(5):e96785. (査読あり)
- 9) Sano S, Izumi Y, Yamaguchi T, Yamazaki T, Tanaka M, Shiota M, Osada-Oka M, Nakamura Y, Wei M, Wanibuchi H, Iwao H, Yoshiyama M. Lipid synthesis is promoted by

- hypoxic adipocyte-derived exosomes in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **2014**, 7;445(2):327-33. (査読あり)
- 10) Tamaru A, Wada T, Iwamoto T, Hase A. [Evaluation of JATA(12)-variable number of tandem repeats as a marker of the source of tuberculosis outbreaks in Osaka]. *Kekkaku*, **2013**, Apr;88(4):399-403. (査読あり)
- 11) Wada T, Tamaru A, Iwamoto T, Arikawa K, Nakanishi N, Komukai J, Matsumoto K, Hase A. [Clustering analysis of Mycobacterium tuberculosis using the JATA(12)-VNTR system for molecular epidemiological surveillance in broad areas of Japan]. *Kekkaku*, **2013**, Apr;88(4):393-8. (査読あり)
- 12) Nakajima C, Tamaru A, Rahim Z, Poudel A, Maharjan B, Khin Saw Aye, Ling H, Hattori T, Iwamoto T, Fukushima Y, Suzuki H, Suzuki Y, Matsuba T. Simple multiplex PCR assay for identification of Beijing family Mycobacterium tuberculosis isolates with a lineage-specific mutation in Rv0679c. *J Clin Microbiol.* **2013**, Jul;51(7):2025-32 (査読あり)
- 13) Yamazaki T, Nakamura Y, Shiota M, Osada-Oka M, Fujiki H, Hanatani A, Shimada K, Miura K, Yoshiyama M, Iwao H, Izumi Y. Tolvaptan attenuates left ventricular fibrosis after acute myocardial infarction in rats. *J Pharmacol Sci.* **2013**, Sep 20;123(1):58-66. (査読あり)
- 14) Osada-Oka M, Tateishi Y, Hirayama Y, Ozeki Y, Niki M, Kitada S, Maekura R, Tsujimura K, Koide Y, Ohara N, Yamamoto T, Kobayashi K, Matsumoto S. Antigen 85A and mycobacterial DNA-binding protein 1 are targets of immunoglobulin G in individuals with past tuberculosis. *Microbiol Immunol.* **2013**, Jan;57(1):30-7. (査読あり)
- 15) Taniguchi K, Takii T, Yamamoto S, Maeyama J, Iho S, Maruyama M, Iizuka N, Ozeki Y, Matsumoto S, Hasegawa T, Miyatake Y, Itoh S, Onozaki K. Reactivation of immune responses against Mycobacterium tuberculosis by boosting with the CpG oligomer in aged mice primarily vaccinated with Mycobacterium bovis BCG. *Immune Aging*, **2013**, 10:25-30. (査読あり)
- 16) Tamaru A, Nakajima C, Wada T, Wang Y, Inoue M, Kawahara R, Maekura R, Ozeki Y, Ogura H, Kobayashi K, Suzuki Y, Matsumoto S. Dominant incidence of multidrug and extensively drug-resistant specific Mycobacterium tuberculosis clones in Osaka Prefecture, Japan. *PLoS One*, **2012**; 7(8):e42505. (査読あり)
- 17) Bi A, Nakajima C, Fukushima Y, Tamaru A, Sugawara I, Kimura A, Kawahara R, Hu Z, Suzuki Y. A rapid loop-mediated isothermal amplification assay targeting hspX for the detection of Mycobacterium tuberculosis complex. *Jpn J Infect Dis.* **2012**, 65(3):247-51. (査読あり)
- 18) Suzuki Y, Nakajima C, Tamaru A, Kim H, Matsuba T, Saito H. Sensitivities of ciprofloxacin-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates to fluoroquinolones: role of mutant DNA gyrase subunits in drug resistance. *Int J Antimicrob Agents*, **2012**, May;39(5):435-9. (査読あり)
- 19) Iwamoto T, Nakajima C, Nishiuchi Y, Kato T, Yoshida S, Nakanishi N, Tamaru A, Tamura Y, Suzuki Y, Nasu M. Genetic diversity of Mycobacterium avium subsp. hominissuis strains isolated from humans, pigs, and human living environment. *Infect Genet Evol.* **2012**, Jun;12(4):846-52. (査読あり)
- 20) Tateishi Y, Kitada S, Miki K, Maekura R, Ogura Y, Ozeki Y, Nishiuchi Y, Niki M, Hayashi T, Hirata K, Kobayashi K, Matsumoto S. Whole-genome sequence of the hypervirulent clinical strain Mycobacterium intracellulare M.i.198. *J Bacteriol.* **2012**, Nov;194(22):6336. (査読あり)
- 21) Tamaru A, Nakajima C, Wada T, Wang Y, Inoue M, Kawahara R, Maekura R, Ozeki Y, Ogura H, Kobayashi K, Suzuki Y, Matsumoto S. Dominant incidence of multidrug and extensively drug-resistant specific Mycobacterium tuberculosis clones in Osaka Prefecture, Japan. *PLoS One*, **2012**,

7(8):e42505. (査読あり)

- 22) Niki M, Niki M, Tateishi Y, Ozeki Y, Kirikae T, Lewin A, Inoue Y, Matsumoto M, Dahl JL, Ogura H, Kobayashi K, Matsumoto S. A novel mechanism of growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria. *J Biol Chem.* **2012**, Aug 10;287(33):27743-52. (査読あり)
- 23) Yamazaki T, Izumi Y, Nakamura Y, Yamashita N, Fujiki H, Osada-Oka M, Shiota M, Hanatani A, Shimada K, Iwao H, Yoshiyama M. Tolvaptan improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in rats. *Circ Heart Fail.* **2012**, Nov;5(6):794-802. (査読あり)
- 24) 松本壮吉、尾関百合子 私達の研究結核ワクチン開発の現状と新しい結核ワクチン開発に向けて 化学療法の領域 **2014**, 30:127-134. (査読なし)

〔学会発表〕(計 11件)

- 1) 尾関百合子、西山晃史、松本壮吉 成人の肺結核予防を目指した、新しい結核ワクチン開発研究 中部乳酸菌研究会 2014年11月23日 サイホクカンホテル(長野県長野市)
- 2) 田丸亜貴 コンタミネーションが原因の結核菌検査誤判定例とその対策に関する考察 第73回日本公衆衛生学会総会 2014年11月5-7日 栃木総合文化センター(栃木県宇都宮市)
- 3) 田丸亜貴 当所における多剤耐性結核菌の発生状況と分子疫学 2007年以降とそれ以前の比較 第90回日本結核病学会総会 2015年3月27-28日 長崎ブリックホール(長崎県長崎市)
- 4) Mayuko Osada-Oka, Yoshitaka Tateishi, Yuriko Ozeki, Seigo Kitada, Ryouji Maekura, and Sohkiichi Matsumoto. Antigen 85A and mycobacterial DNA-binding protein 1 are targets of Immunoglobulin G in individuals with old tuberculosis in Japan. The 13<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara. Sep 23-26, 2014, 奈良県新公会堂(Nara City, Nara.)
- 5) Mayuko Osada-Oka, Yuriko Ozeki, Hiroshi Ichikawa, Yukiko Minamiyama, and Sohkiichi Matsumoto. 12<sup>th</sup> Asian Congress of Nutrition. May 14-18, 2015, パシフィコ横浜(Yokohama City, Kanagawa.)
- 6) 尾関百合子、武田知芳里、岡部真裕子、井上学、岡真優子、平山幸雄、一瀬休生、小林和夫、松本壮吉 ケニア共和国クワレ地区小学生を対象とした潜在性結核感染と寄生虫感染の関連 第87回日本細菌学会総会 2014年3月26-28日 タワーホール船堀(東京都江戸川区)
- 7) 今川裕香子、岡真優子、尾関百合子、松本壮吉 マクロファージの糖代謝酵素とグルコース濃度による結核菌の増殖抑制 第87回日本細菌学会総会 2014年3月26-28日 タワーホール船堀(東京都江戸川区)
- 8) 和田崇之、岩本朋忠、瀬戸順次、田丸亜貴、長谷篤、前田伸司、阿彦忠之、山本太郎 M株の広域的分離の原因究明-比較ゲノム解析に基づく結核ゲノム疫学の導入 第89回日本結核病学会 2014年5月9-10日 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)
- 9) 尾関百合子、西内由紀子、小椋義俊、岩本朋忠、林哲也、岡真優子、仁木満美子、立石善隆、平山幸雄、松本壮吉 リコンビナント BCG(rBCG)を用いた迅速スクリーニング法による抗結核薬の探索と同定 第86回日本細菌学会総会 2013年3月18-20日 幕張メッセ(千葉県千葉市)
- 10) 岡真優子、立石善隆、平山幸雄、尾関百合子、小林和夫、松本壮吉 潜在性結核患者の血清中での結核菌抗原に対するイムノグロブリン g 第86回日本細菌学会総会 2013年3月18-20日 幕張メッセ(千葉県千葉市)
- 11) 井上学、岡真優子、仁木満美子、尾関百合子、一瀬休生、小林和夫、松本壮吉 ケニア共和国における学生の結核菌感染とhookworm感染の関連 第86回日本細菌学会総会 2013年3月18-20日 幕張メッセ(千葉県千葉市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾関 百合子 (OZEKI YURIKO)  
新潟大学・医歯学総合研究科・助教  
研究者番号: 00169301

### (2) 研究分担者

岡 真優子 (OKA MAYUKO)  
京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授  
研究者番号: 40347498

田丸亜貴 (TAMARU AKI)  
大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・研究員  
研究者番号: 70270767

