

氏名（本籍） さとう えみ
佐藤 絵美 (福岡県)

学位の種類 博士（医学）

報告番号 甲第 1463 号

学位授与の日付 平成 25 年 9 月 13 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）

学位論文題目

Vitamin D-dependent cathelicidin inhibits *Mycobacterium marinum* infection in human monocytic cells

(ビタミン D 依存性 cathelicidin はヒト単球様細胞の中で
Mycobacterium marinum の感染を阻害する)

論文審査委員（主査）	福岡大学	教授	中山 樹一郎
（副査）	福岡大学	教授	大慈弥 裕之
	福岡大学	教授	黒木 政秀
	福岡大学	准教授	高田 徹

背景

活性型ビタミン D3 はヒト単球/マクロファージ内で抗菌ペプチド cathelicidin (CAMP)の産生を亢進し結核菌感染時にオートファジーを誘導することが知られている。Mycobacterium marinum は魚類や水中に多く存在する非定型抗酸菌でしばしば漁師や熱帯魚飼育者の手に難治な肉芽腫や潰瘍性病変を作り皮膚科診療では度々遭遇する菌である。

目的

今回私たちは活性型ビタミン D3 や CAMP の C 末端である LL-37 がヒト単球様細胞 (THP-1)に感染した M. marinum に対して抗菌活性を持つか検討し活性型ビタミン D3 外用薬や光線治療の皮膚非定型抗酸菌感染症に及ぼす影響について考察した。

方法

THP-1 細胞に活性型ビタミン D3 もしくは LL-37 を添加した後に M. marinum を感染させ、抗菌活性と炎症性サイトカインの産生を確認した。また同様に THP-1 細胞にオートファジー阻害剤である 3-メチルアデニンもしくはクロロキンを投与して抗菌活性の確認をした。

結果

活性型ビタミンD3はTHP-1細胞内でCAMPの産生を顕著に亢進しM. marinumの感染はさらにその現象に拍車をかけた。M. marinumの抗菌活性は活性型ビタミンD3とLL-37を添加したTHP-1細胞で有意に上昇したがビタミンD受容体をノックダウンすると低下した。同時に活性型ビタミンD3を添加したTHP-1細胞内ではオートファゴゾームとLL-37の共局在がみられ、オートファジー阻害剤を加えるとLL-37による抗菌活性は打ち消された。

結論

ヒト単球様細胞では活性型ビタミンD3がビタミンD受容体に結合することでCAMPの産生を亢進しオートファジー機構を利用してM. marinumに対する抗菌活性を上昇させることが確認できた。また単球様細胞外からLL-37を加えることでも同様の効果が確認できた。現在様々な皮膚疾患で活性型ビタミンD3類似体の外用薬やUVによる光線治療が行われている。今回の私たちの研究はM. marinumなどの皮膚非定型抗酸菌感染症にこれらの細胞内CAMPを増加させる治療法が補助的な役割をもたらす可能性を示唆した。

審査の結果の要旨

本論文は、ヒト単球様細胞で活性型ビタミン D3 が CAMP (cathelicidin antimicrobial peptide)の産生を亢進しオートファジーを利用して *M. marinum* に対して抗菌的に働くことを証明した。活性型ビタミン D3 類似体の外用や UV による光線治療は現在様々な皮膚疾患で行われており、この論文は皮膚抗酸菌症にこれらの治療が補助的な役割をもたらす可能性を示唆した。

1. 斬新さ

この論文では皮膚抗酸菌症の原因となる *M. marinum* を用いてデータを得たこと、活性型ビタミン D3 だけではなく cathelicidin の活性化型である LL37 を用いて感染実験を行ったことが新しい。またこの論文では現在乾癬などの治療で使用されている活性型ビタミン D3 類似体外用製剤や局所光線治療機器の臨床応用化について言及し考察を記しており、本症に対する新しい治療のアプローチを提案した点が画期的と思われる。

2. 重要性

M. marinum の感染に活性型ビタミン D3 もしくは LL37 が抗菌的に働くことを *in vitro* で証明し活性型ビタミン D3 外用療法や局所中波長光線療法が皮膚抗酸菌症に対して新しい補助療法となる可能性を示唆した。

3. 実験方法の正確性

細胞は毎回トリパンブルー染色下でカウントして実験に用いた。菌量は毎回 OD600 で混濁度を測定することで確認した。その他 qRT-PCR, ELISA, 蛍光免疫染色などは全て試薬会社のプロトコール通り行い、正確性は十分にあると考えられる。

4. 表現の明確さ

本論文は研究背景、目的、方法、結果、考察を簡潔・明確に記載しており、既に Journal of Dermatological science に受理されている。

5. 主な質疑応答

1) *M. marinum* の宿主細胞はマクロファージだけなのか。

抗酸菌はマクロファージや好中球によって貪食された後寄生すると考えられているが、今回行った *in vitro* の実験において菌は線維芽細胞やケラチノサイト内にも菌は存在し生存・増殖することを確認した。

2) THP-1 細胞以外の細胞株で実験はしたのか。

ヒトケラチノサイトの細胞株でも実験を行い THP-1 細胞と同様の傾向のデータを得ているが今回の論文では割愛した。

3) 活性型ビタミン D3 類似体外用やエキシマランプなどによる治療を補助療法としてど

のような状況で使用するを考えているか

皮膚抗酸菌症の中にはミノサイクリンやリファンピシン、クラリスロマイシンなどの抗菌薬内服だけでは 2-3 か月以上経っても難治な症例がある。このような症例に対して活性型ビ

タミン D3 外用や局所中波長紫外線療法を併用することは有効ではないかと考えている。

- 4) LL37 の炎症制御作用について。形質様樹状細胞では DNA と LL37 の複合体が IFN- α を出させるような炎症促進作用を持つが、今回のマクロファージのデータでは逆に炎症を抑制している。このことについてどう考えるか。

LL37 の炎症制御作用は細胞によって異なるし、投与条件でも異なる。この複雑な免疫制御機構については今後さらに研究を続けたいと思っている。

- 5) 活性型ビタミン D3 を抗酸菌治療の補助療法として行うことを考えるなら感染前投与より後投与の方がよいのではないか。

今後感染後投与でも *M. marinum* に対して抗菌活性が得られるか再度検証すべきと考えている。

- 6) 活性型ビタミン D3 が TNF- α や IFN- β などの炎症性サイトカインを抑えることで抗酸菌感染症を悪化させることはないのか。

今回、ヒトのマクロファージでは活性型ビタミン D3 がオートファジーを誘導することでより殺菌的に働くというデータを得た。ただしマウスのように抗酸菌に対してマクロファージが一酸化窒素 (NO) に依存した殺菌を行う生物ではマウスのカセリサイدينを投与すると NO 産生が抑えられ抗酸菌感染症は悪化する。今回の研究結果からヒトにとって活性型ビタミン D3 外用や光線治療が皮膚抗酸菌症に対して有用であろうと考えられるが、一

方で活性型ビタミン D3 はある特殊な条件で炎症性サイトカインの産生を抑制することは自明である。このことを考慮した上で皮膚抗酸菌症に対する活性型ビタミン D3 外用方法の工夫がその効果の検証が必要であろうと考えている。

以上の審査結果により、本論文は斬新さ重要性と的確な質疑応答により学位論文に値すると評価された。