

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	N acetyl cysteine mediates protection against Mycobacterium avium through induction of human defensin 2 in a mouse lung infection model
別タイトル	N acetyl cysteineはMycobacterium avium のマウス肺感染モデルにおいて defensinの誘導を介した防御能を呈する
作成者（著者）	塩沢, 綾子
公開者	東邦大学
発行日	2021.03.17
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査：岸一馬 / タイトル：N acetyl cysteine mediates protection against Mycobacterium avium through induction of human defensin 2 in a mouse lung infection model / 著者：Ayako Shiozawa, Chiaki Kajiwara, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda / 掲載誌：Microbes and Infection / 巻号・発行年等：22(10): 567-575, 2020
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第977号
学位記番号	甲第667号
学位授与年月日	2021.03.17
学位授与機関	東邦大学
DOI	10.1016/j.micinf.2020.08.003
その他資源識別子	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457920301507
メタデータのURL	https://mylibrary.toho-u.ac.jp/webopac/TD24473700

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

塩沢綾子より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 667 号

学位申請者 : しお 塩 ざわ 沢 あや 綾 こ 子

学位論文 : N-acetyl-cysteine mediates protection against *Mycobacterium avium* through induction of human β -defensin-2 in a mouse lung infection model

(N-acetyl-cysteine は *Mycobacterium avium* のマウス肺感染モデルにおいて β -defensin の誘導を介した防御能を呈する)

著 者 : Ayako Shiozawa, Chiaki Kajiwara, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda

公 表 誌 : Microbes and Infection

DOI: 10.1016/j.micinf.2020.08.003

論文内容の要旨 :

(概要) 肺非結核性抗酸菌症は抗菌薬治療の有効性の発揮が難しく、新たな治療法の確立が急務とされる呼吸器感染症の一つである。*Mycobacterium avium* (*M. avium*) complex はその約 9 割を占める起因菌である。現在、既存の抗菌薬による治療に何らかの免疫修飾剤を併用して、宿主の抗酸菌に対する免疫能を増強させる免疫補助療法が注目されているが、非結核性抗酸菌に対する免疫応答については現在でも不明な点が多く、十分な有効性を発揮するものはない。本研究では、去痰薬として既に広く使用されているN-アセチルシステイン (NAC) を *M. avium* 感染症に於いて補助療法に活用しうる可能性について検討した。

(方法・結果) *M. avium* JCM 15430 株を A549 細胞 (ヒト肺上皮由来細胞) に感染させ、コントロール群と NAC 添加群 (10mM) に分けて 5 日間培養した。*M. avium* 感染 A549 細胞に NAC を添加すると *M. avium* の増殖が濃度依存的に抑制されており、抗菌ペプチドの一種である human β -defensin-2 (HBD-2) の mRNA の発現が増加していた。また、western blotting でも HBD-2 の産生増加がみられた。この *M. avium* に対する NAC の増殖抑制効果は、抗 HBD-2 抗体の投与で阻害されることを確認した。なお、recombinant HBD-2 を直接 *M. avium* に作用させると、濃度依存的に殺菌効果があることが確認された。

肺 *M. avium* 症マウスモデルに於いては、BALB/c のメスに *M. avium* JCM 15430 株をマウス当たり 10^6 CFU 経鼻感染させ、コン

トロール群、NAC 投与群 (400 mg/kg) 、 clarithromycin (CAM) 投与群 (100 mg/kg) 、 NAC+CAM 投与群の 4 群を設定した。感染 0-6 日目まで各薬剤を経口投与し、感染 7 日目に肺内菌数および各種抗菌ペプチドの mRNA 発現量をリアルタイム PCR で評価した。NAC の投与は肺内菌数を有意に減少させ、HBD-2 のマウスホモログである murine β -defensin-3 (MBD-3) の mRNA の発現を誘導した。なお、肺 *M. avium* 症におけるキードラッグである CAM を併用した NAC+CAM 投与群では、相加的な菌の増殖抑制効果が見られた。

次に、NAC が宿主細胞に作用し HBD-2 の産生誘導に至る上流因子について検討した。HBD-2 はインターロイキン-17 (IL-17) シグナリングによって産生が誘導されることが知られている。筆者らの検討でも *M. avium* 感染 A549 細胞に recombinant IL-17A (rIL-17A) を作用させると HBD-2 の mRNA 発現が誘導されること、そして細胞内の菌数が減少することを確認した。そこで、マウスモデルにおいて IL-17 の関与について検討した結果、NAC を投与したマウスでは IL-17A の mRNA 発現が増強していた。一方で、IL-17A 欠損マウスでは MBD-3 の mRNA 発現は増強せず、NAC 投与群では菌数の減少は見られなかった。以上のことから、NAC の *M. avium* 増殖抑制効果は IL-17A によって媒介されている可能性が示唆された。

最後に、NAC の効果を 4 株の *M. avium* 臨床分離株を用いて検証した。4 株のうち 2 株は CAM 耐性株であったが、いずれにおいても NAC は有意に菌数を抑制した。

(結論) NAC は、宿主細胞の HBD-2 の産生を誘導することで強力な *M. avium* 増殖抑制効果を示した。また、肺 *M. avium* 症のキードラッグである CAM との併用で相加的に菌の増殖を抑制した。NAC は既に慢性下気道感染症などに去痰薬として使用されている薬剤であり、肺 *M. avium* 症における代替療法/補助療法としての応用が期待できることが示唆された。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 667 号	氏 名	塩 沢 綾 子
学位審査担当者	主 査	岸 一 馬
	副 査	松 瀬 厚 人
	副 査	内 藤 篤 彦
	副 査	中 野 裕 康
	副 査	盛 田 俊 介

学位論文の審査結果の要旨 :

本研究では、N-アセチルシステイン (NAC) を *M. avium* 感染症に於いて補助療法に活用しうる可能性について検討された。*M. avium* を A549 細胞に感染させ、コントロール群と NAC 添加群に分けて 5 日間培養した。*M. avium* 感染 A549 細胞に NAC を添加すると *M. avium* の増殖が濃度依存的に抑制され、抗菌ペプチドの一種である human β -defensin-2 (HBD-2) の mRNA の発現が増加した。また、western blotting でも HBD-2 の産生増加がみられた。この *M. avium* に対する NAC の増殖抑制効果は、抗 HBD-2 抗体の投与で阻害された。なお、recombinant HBD-2 を直接 *M. avium* に作用させると、濃度依存的に殺菌効果が認められた。次に、肺 *M. avium* 症マウスモデルでは、*M. avium* を経鼻感染させ、コントロール群、NAC 投与群、clarithromycin (CAM) 投与群、NAC+CAM 投与群の 4 群を設定した。NAC の投与は肺内菌数を有意に減少させ、HBD-2 のマウスホモログである murine β -defensin-3 の mRNA の発現を誘導した。なお、NAC+CAM 投与群では、相加的な菌の増殖抑制効果が見られた。次に、NAC が宿主細胞に作用し HBD-2 の産生誘導に至る上流因子 (IL-17A) について検討した。NAC を投与したマウスでは IL-17A の mRNA 発現が増強していた。一方で、IL-17A 欠損マウスでは MBD-3 の mRNA 発現は増強せず、NAC 投与群では菌数の減少は見られなかった。確認のため、*M. avium* 感染 A549 細胞に recombinant IL-17A を作用させると HBD-2 の mRNA 発現が誘導され、そして細胞内の菌数が減少した。以上より、NAC の *M. avium* 増殖抑制効果は IL-17A によって媒介されている可能性が示唆された。最後に、NAC の効果を 4 株の *M. avium* 臨床分離株 (2 株は CAM 耐性株) を用いて検証し、いずれでも NAC は有意に菌数を抑制した。これらの結果より NAC は肺 *M. avium* 症における補助療法として期待できることが示唆された。

2020 年 10 月 27 日に開催された学位審査会において、研究要旨を発表した後、活発な質疑応答が行われた。審査委員より、培養細胞以外にもプライマリーな細胞を用いた検討を行ったか、NAC がどのように IL-17 の誘導に作用するのか、実際に抗菌活性を示した HBD-2 の所在とその作用する場所、HBD-2 を直接治療薬として用いることが可能なのか、NAC の投与を臨床で検討する場合の用量および投与経路、感染のフェーズに応じた想定される NAC の効果などについて質問があった。申請者はそれら全ての質問に、発表や未発表データおよび文献的考察を交え、適切に返答した。

以上より、NAC が宿主細胞の HBD-2 産生を誘導することで *M. avium* 増殖抑制効果を示した本研究の意義は高く、本論文は学位に値するとの結論に達し、学位審査会を終了した。