

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19422

研究課題名(和文) IGRAsを越える次世代結核診断法確立へ-結核特異的CD4陽性T細胞の臨床研究

研究課題名(英文) Over the IGRAs-analysis of Tuberculosis specific CD4+T cells

研究代表者

山下 嘉郎 (YAMASHITA, Yoshiro)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：30724520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：結核は未だに世界中で爆発的に拡大する危険性を秘めている。CD4陽性T細胞は種々のサブセットがそれぞれに特徴的なサイトカインを産生し感染防御にあたると考えられ、臨床病期毎に分泌されるサイトカインのプロファイルは異なる事が予想された。本研究では、サンプル提供者の臨床情報を元に結核発症時群、治療中群、治療後群、接触者群に健常者群を加えた計5群で、潜伏期を含む各種結核関連抗原に対するCD4陽性T細胞サイトカインプロファイルの比較検討を行った。この結果、我々は病期毎に特徴的なサイトカインプロファイルを見出す事に成功した。本研究の成果は今後の結核診断、強いては結核撲滅に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Tuberculosis (Tb) is still one of great public health problems, and holds a risk that will spread explosively again among human being in no distant future. CD4+ T cells play a critical role in controlling M. Tuberculosis infection. CD4+ T cells are separated to many subsets, and these subsets produce unique sets of cytokine. In this study, we evaluated the cytokine profile at each clinical stage (contact, active, on-treatment and after-treatment) and of healthy controls. The result is that we could find characteristic cytokine profile at each clinical stage. The knowledge of this study needs to be warranted, but has some potential to detect Tb clinical stage exactly.

研究分野：呼吸器内科学、呼吸器感染症学

キーワード：結核 臨床病期 結核関連抗原 フローサイトメトリー CD4陽性T細胞 サイトカインプロファイル

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では人口の高齢化に伴い、高齢で発病する結核菌潜伏感染者が増加傾向にある。結核菌感染者は世界人口の 1/3 程と推定され、その内 5~10% が発病すると推測されるため、実に 1~2 億の人々がこれから結核を発病し、結核菌を伝播すると考えられる。つまり、結核はいまだ爆発的に人類の間で広がる危険性を有しているという事が言える。

結核発病者は排菌があるにも関わらず、症状が非特異的である事と全身状態が比較的良好である事から、適切な医療機関での受療行動が遅れがちである。この発病から結核診断・治療開始までの時間差が生じる事が、人類が結核蔓延を制御出来ない大きな理由の 1 つである。よって発病者を早期に確実に、あるいは発病リスクの高い潜伏感染者をあらかじめ特定する事が出来れば感染予防率は飛躍的に向上するものと考えられた。

2000 年代に入ると、結核診断法として、結核菌特異的抗原 ESAT-6/CFP-10 を用いるがために特異度が高いとされる IFN- $\gamma$  遊離アッセイ (IGRAs) が普及してきたが、この IGRAs をもってしても感染と発病の区別は難しく、まして、これから発病する潜伏感染者の同定はきわめて困難であった。

## 2. 研究の目的

結核菌は潜伏期に、種々の潜伏期関連タンパクが発現する事が知られていた。前述の IGRAs は結核菌特異的抗原が CD4 陽性 T 細胞を刺激するという仕組みの上に成り立っているが、結核潜伏期関連タンパクを抗原として刺激した場合、ESAT-6/CFP-10 で刺激した場合と比べ CD4 陽性 T 細胞の反応は異なるものと予想された。また、CD4 陽性 T 細胞は Th1, Th2, Th17, Treg のサブセットがあり、それぞれに特徴的なサイトカインを産生し、互助的に、あるいは干渉的に感染防御にあたりと考えられている。この事から、結核の臨床病期毎に活躍する CD4 陽性 T 細胞サブセットの

プロファイルは異なってくるものと推定され、これに伴い分泌されるサイトカインのプロファイルも異なる事が予想された。

先の問題の解決策として、潜伏期関連タンパクを含む種々の結核関連タンパクを抗原として CD4 陽性 T 細胞を刺激し、これによるサイトカインプロファイルを明らかにし、結核臨床病期毎に特徴的なパターンを見出す事を考えた。既に少人数での検証は行っていたが、本研究では比較的多数の臨床検体で上記の検証を行う事を目的とした。

## 3. 研究の方法

長崎県内外近隣の 4 病院からサンプル (血液) の収集を行った。収集した血液から Peripheral Blood Mononuclear cells (PBMC) を抽出し、これに各種結核関連タンパクを抗原として加え一晩刺激した。刺激した後の PBMC を Intracellular cytokine staining (ICS) の手法を用い、細胞から分泌前のサイトカインを蛍光抗体で染色した。染色した PBMC をフローサイトメトリーにかけ、各種サイトカイン (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10, IL-13, IL-17A) 陽性の CD4 陽性 T 細胞の割合を検出した。

サンプル提供者の臨床情報を元に発症時群、治療中群、治療後群、接触者群の 4 群に分け、これらに健常者群を加え計 5 群で、横断的研究の研究デザインを用い、サイトカイン陽性細胞の割合を比較検証した。複数種のサイトカインが陽性になる多機能 T 細胞の検証も行っている。

群間の比較では、Kruskal-Wallis test と、ポストホックテストとして Dunn の手法を統計学的手法として用い解析を行った。

## 4. 研究成果

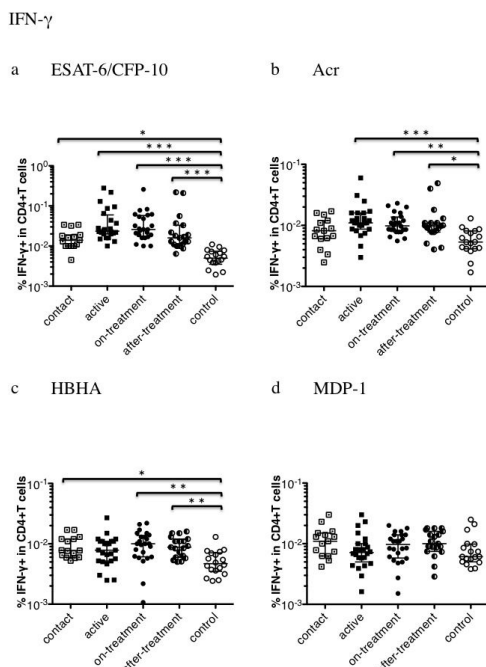
### (1) 参加者

103 名からサンプルを収集し、100 名分で解析を行う事が出来た。内訳は接触者群 15 名、発症時群 24 名、治療中群 24 名、治療

後群 19 名、そしてコントロール群は 18 名である。コントロール群を除いた結核菌感染者の平均年齢は 68.6 歳、性別は 59.8 %が男性であった。

( 2 ) IFN-

ESAT-6/CFP-10 に対する CD4 陽性 T 細胞の IFN- の反応は、コントロール群( 健常者群 ) に比べ、結核のどの病期でも反応に有意差がある事が判明した。結核の病期と病期の間では、多少の差は認めるものの有意差ではなかったため、ESAT-6/CFP-10 に対する IFN- の反応だけで臨床病期を判別する事は困難と考えられた。この事は、感染と発病は区別出来ないとするこれまでの IGRAs の見解とも一致するものであった。



潜伏期関連タンパクでは、Acr で刺激した際に発病後の群がコントロール群に比べ有意差ととれる大きめの反応を示した。ただ、病期毎の反応パターンは ESAT-6/CFP-10 に対するものと似ており、総じて IFN- の反応をみるだけでは病期の特定は困難と思われた。

( 3 ) IL-2

ESAT-6/CFP-10 に対する IL-2 の反応は結核発病後( 発症時、治療中、治療後 ) 特に治療中や治療後群で、コントロール群と比べ有

意差が生じる事が判明した。奇妙な事に潜伏期関連タンパクのどの刺激に対しても、ESAT-6/CFP-10 で刺激した際と同じような反応パターンが示された。IL-2 の反応は、臨床病期的には感染後期と親和性が高い事が示唆された。

( 4 ) TNF-

TNF- の反応は ESAT-6/CFP-10 や Acr 刺激に対して、IFN- の反応と同じように発症時や治療中群で、コントロールや接触者群に比べ有意に高い反応をみせる事が判明した。Th1 系サイトカインとして IFN- と並び称される事が多いサイトカインであるが、結核発病後は通念通りこの 2 種のサイトカインが優勢になる事が示唆された。

( 5 ) 多機能 CD4 陽性 T 細胞

Th1 系サイトカインが発病後で優勢になるという結果を踏まえ、細胞レベルではどうか、ESAT/CFP 刺激に対し反応する Th1 系多機能 CD4 陽性 T 細胞の解析を行った。全 CD4 陽性 T 細胞にしめる割合を比べたところ、IFN- と TNF- がともに陽性である CD4 陽性 T 細胞が接触者から治療後群にかけて、特に発病後でコントロール群と比べ有意差をもって認められる事が明らかになった。その他、IFN- 、TNF- 、IL-2 の 3 種が陽性である CD4 陽性 T 細胞は治療中に、IFN- と IL-2 が陽性である CD4 陽性 T 細胞は接触者に、TNF- と IL-2 が陽性である CD4 陽性 T 細胞は治療中と治療後に、コントロール群と比べ有意差をもって認められる事が判明した。

( 6 ) IL-17A

IL-17A の反応は、Acr で刺激した際に接触者群での反応がコントロール群の反応に比べ有意に高い事が判明した ( P=0.0273 )。他に IL-17 の反応で目をひいたのは HBHA 刺激に対しての反応で、結核感染者、つまり接触者から治療後の群でコントロール群にくらべ有意な反応が認められた ( P=0.0004 )。これは ESAT-6/CFP-10 刺激と IFN- の反応の関

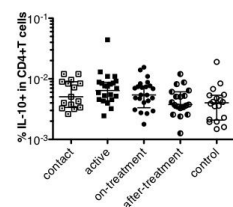
係同様、結核菌感染を示唆するものと思われた。ESAT-6/CFP-10 刺激や MDP-1 刺激では、有意差こそ得られなかったが、接触者群や治療後群でコントロール群よりも大きな反応が目立った。

### (7) IL-10

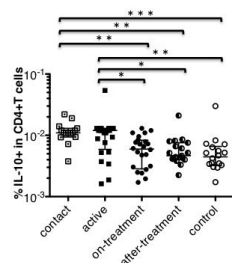
IL-10 の反応は Acr 刺激において顕著であり、接触者や発症時において、他の病期（治療中、治療後）やコントロール群との間に有意差を認めた ( $P < 0.0001$ )。この他、MDP-1 刺激においても接触者や治療後とコントロール群の間で IL-10 の反応に有意差を認めている ( $P = 0.0439$ )。

#### IL-10

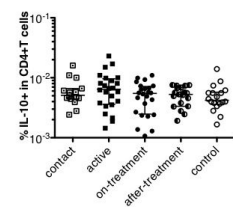
a ESAT-6/CFP-10



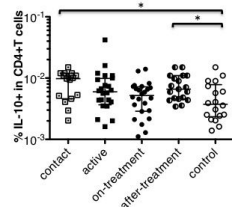
b Acr



c HBHA



d MDP-1



### (8) IL-13

ESAT-6/CFP-10 で刺激した際に、接触者でコントロール群と比べ有意差がある反応を認めた ( $P = 0.0398$ )。

### (9) 考察と今後の展望

本研究の成果として、まず ICS・マルチカラーフローサイトメトリーを用いた結核免疫評価法を確立した事が挙げられる。これまで、あくまで IGRAs の範疇としてフローサイトメトリーを用いる、あるいは結核における Th1 系の多機能 CD4 陽性 T 細胞を解析する研究はみられたが、本研究のように多種結核抗

原刺激にて多種サイトカイン反応を一度に評価した研究はあまり類がない。

そして、結核の臨床病期毎に、各種結核関連抗原とこれに対するサイトカインプロファイルの特徴的なパターンを明らかにした事が大きな成果であったと考える。以下に、本研究で得られた知見を図にして示す。

Specific Antigen	Contact Infection	Development	On Treatment	After Treatment
ESAT-6/CFP-10	IFN- $\gamma$ , IL-13	IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$
Acr	IL-10, IL-17	TNF $\alpha$	TNF $\alpha$	TNF $\alpha$
HBHA			IL-2, IL-17	IL-2, IL-17
MDP-1	IL-10		IL-2,	IL-2, IL-10

接触者での Acr や MDP-1 に対する IL-10 の明らかな反応など、本研究により、従来の IGRAs では見出せなかったが、接触者と発症者の間での結核細胞性免疫に差異が存在する事が示唆された事になる。この事象は、発病リスクの高い潜伏感染者をあらかじめ特定するという目標を達成する事に多いに寄与する可能性を秘めており、今後、より一層追求していく価値があるものと思われた。

本研究で得られた知見をより簡潔により確かなものとするために、今後、フローサイトメトリーよりもより簡便に行えるビーズアレイアッセイを用い、結核臨床病期毎に特徴的なサイトカインプロファイルを明らかにする研究を企画している。

### (10) 結語

潜伏期を含む結核関連抗原を用いる事により、結核臨床病期毎に特徴的なサイトカインプロファイルが存在する事が明らかとなった。本研究で得られた成果は、今後のより詳細な結核診断、強いては結核撲滅に貢献するものと期待される。

### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕なし

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山下 嘉郎 (YAMASHITA, Yoshiro)  
長崎大学・熱帯医学研究所・助教  
研究者番号： 30724520

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

有吉 紅也 (ARIYOSHI, Koya)  
横田 恭子 (YOKOTA, Yasuko)  
寺原 和孝 (TERAHARA, Kazutaka)