

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19440

研究課題名(和文) 肺非結核性抗酸菌症におけるPD-1陽性消耗性T細胞の動態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) PD-1 positive T cells in pulmonary Mycobacterium avium infection

研究代表者

三橋 善哉 (MITSUHASHI, YOSHIYA)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：70754513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肺Mycobacterium avium症患者および健常者コントロールより末梢血単核白血球を分離した。分離した末梢血単核白血球サンプルをフローサイトメトリーにて解析を行った。CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞共に、PD-1細胞を発現している細胞の割合は、健常者コントロールに比し、ヒト肺Mycobacterium avium症患者にて有意に変化は認めず、むしろPD-1細胞を発現している細胞の割合は低下していた。このことは、他の慢性炎症性疾患や感染症と異なり、Mycobacterium avium感染症では、病原体の持続的な刺激により、T細胞は消耗することなく、存在している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary Mycobacterium avium and intracellular infectious diseases has become an important health-care problem because its prevalence is increasing. We hypothesized that programmed cell death (PD)-1 might be upregulated in T-cells of the patients with pulmonary Mycobacterium avium infection, which would contribute to attenuated cellular immunity. Then, we examined the expression of PD-1 in T cells in the samples of peripheral blood mononuclear cells derived from age and sex matched healthy controls and the patients with pulmonary Mycobacterium avium infection. The percentage of PD-1 positive cells in both CD4 positive T cells and CD8 positive cells were significantly decreased in the patients comparing with healthy controls. In contrast to previous reports about PD-1 T cells in chronic inflammation and infection including chronic hepatitis, pulmonary Mycobacterium avium infection may not induce T-cell exhaustion.

研究分野：呼吸器内科学分野

キーワード：非結核性抗酸菌症 PD-1陽性T細胞 免疫疲労

1. 研究開始当初の背景

肺非結核性抗酸菌症(肺NTM症)は結核菌とライ菌以外の抗酸菌による肺の感染症である。肺NTM症の患者は中高年の女性を中心に増加しており、かつ、NTM症は既存の抗菌薬治療に対し抵抗性であることから、さらなる治療法の進歩が必要とされている。

肺NTM症は同じ肺抗酸菌感染症である肺結核と異なり、病勢は各患者で異なっており、ほとんど病状が進行せず、安定している患者がいる一方、比較的急速に進行する症例が存在している。この病勢の違いは患者の免疫状態・他の慢性呼吸器疾患の合併等、宿主因子が規定すると考えられてきた。一方、繰り返し配列数多型(VNTR: Variable number of tandem repeats)による遺伝子型の解析に基づく我々の研究は、患者 *M. avium* の遺伝子型解析により肺病変が進行するタイプ(進行形 *M. avium* 株)または安定するタイプ(安定型 *M. avium* 株)であるかを予測できることを明らかにしており、(図1、Kikuchi T et al. Thorax 2009;64:901, Kikuchi T and Mitsuhashi Y et al. Clin Microbiol Infect 2014;20:256)、肺NTM症の病勢が宿主因子だけでなく、菌側因子によっても規定される可能性が示されている。しかしながら、病勢を決定する菌側の因子・メカニズムはまだ同定されていない。

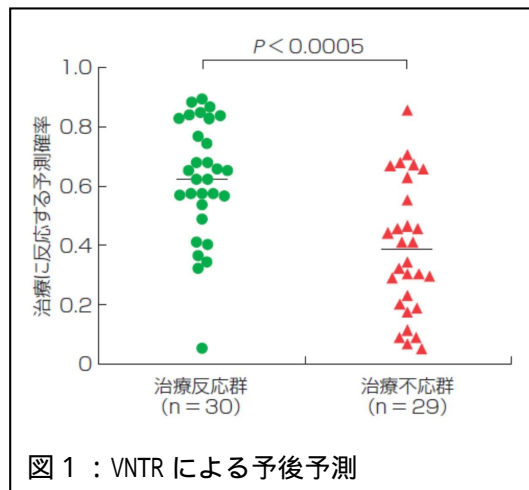


図1: VNTRによる予後予測

PD-1(Programmed cell death 1)は、活性化リンパ球に発現する抑制性レセプターで、Tリンパ球の、過剰な活性化を抑制することが知られている。PD-1の機能不全は過剰な免疫反応につながり、多発性硬化症、1型糖尿病、全身性エリテマトーデスといった自己免疫性疾患発症のリスクとなることが明らかになってきている。一方、腫瘍細胞が腫瘍細胞がPD1のリガンドであるPD-L1を発現し、免疫反応から逃避していることを明らかにし、現在PD1/PD-L1阻害による抗腫瘍両方の開発が進められている。近年の研究により、慢性C型肝炎やHIVウイルス感染といった慢

性感染症において、PD-1陽性消耗T細胞が出現し、病原体の感染持続に関与していることが報告されている。PD-1陽性消耗T細胞はT細胞免疫応答性が低下しており、消耗T細胞の増加は免疫応答の低下・病原微生物に対する抵抗性の低下に繋がると考えられている。加齢によっても体内に増加することから、加齢に伴う免疫応答の低下にも関与している。慢性C型肝炎の研究ではPD1および同じく抑制性レセプターであるCTLA-4を阻害することにより、消耗T細胞のHCVに対する免疫応答性が改善したと報告されている(PLoS Pathog. 2009)。また、最近の研究では、同じく消耗T細胞のHCVに対する免疫応答性が改善したと報告されている(PLoS Pathog. 2009)。また、最近の研究では、同じく消耗T細胞が増加している高齢者に対して、以前より高齢マウスモデルにて免疫応答性の改善効果があると報告されていたmTOR(mammalian target of rapamycin)阻害薬(Everolimus)の少量投与を行った所、PD-1陽性消耗T細胞が減少し、免疫応答性が改善したことが報告されており(Sci Transl Med 2014; 6: 268ra179)、消耗T細胞の回復による感染病原体の排除といった新たな治療法の可能性が示唆されている。このように慢性感染症におけるPD-1陽性消耗T細胞の研究が進められているが、同じく慢性感染症であるNTM症における、消耗T細胞の動態は解析されていない。そこで我々は肺NTM症の代表的な原因菌であり、かつ、我々がこれまで研究を継続してきた*M. avium*を対象を絞り、ヒト患者における末梢血中消耗T細胞の動態を解析することを目的とした。

2. 研究の目的

ヒト肺*M. avium*症患者におけるPD-1陽性消耗T細胞の変化・増減を明らかにする。

3. 研究の方法

ヒト肺*M. avium*症患者におけるPD-1陽性消耗T細胞の解析

(1) 対象:

健常対象者: 年齢・性別・喫煙歴を患者群と調整した、肺疾患既往のない健常者
患者: 2007年に公表された米国胸部疾患学会/感染症学会(ATS/IDSA)基準に合致する肺*M. avium*症患者で、登録時に未治療の患者。

除外条件: 肺*M. avium*症に対する治療歴がある患者、PD-1陽性消耗T細胞に影響を与える可能性がある慢性ウイルス肝炎患者、HIV感染患者、

HTLV-1 感染患者は除外した。

(2) PD-1 陽性消耗 T 細胞の測定：

健常対象者およびヒト M. avium 症患者より末梢血を採取し、Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare)による密度勾配遠心により末梢血単核細胞(PBMC)を分離する。分離した PBMC を蛍光抗体にて染色し、フローサイトメトリーにて以下のパラメーターを解析する。

CD3 陽性 CD4 陽性 CD127 陽性 T 細胞(エフェクターヘルパーT 細胞)に占める PD-1 陽性細胞の比率および PD-1 の MFI(発現強度)を解析する

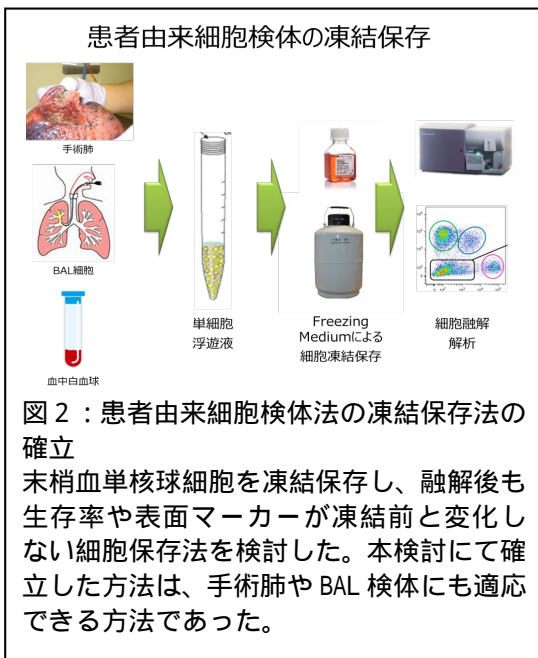
CD3 陽性 CD8 陽性 T 細胞(cytotoxic T 細胞の含まれる分画)に占める PD-1 陽性細胞の比率および PD-1 の MFI(発現強度)を解析する

4. 研究成果

- (1) ヒト健常者、および、ヒト肺 M. avium 症患者末梢血単核球(PBMC)の分離・凍結保存法の確立

健常者、患者サンプルの末梢血単核球(PBMC)をフローサイトメトリーにて解析するにあたって、障壁となるのは、PBMC の分離後にすぐ、フローサイトメトリーのための染色、解析を連続的に実施すると、各検体が入手できた時点で、長時間の分離＆解析を行わなくてはならず、非常に効率が悪いことが予想された。

そこで申請者は、患者サンプルから末梢血単核球(PBMC)を分離し、凍結保存し、後日融



解し、生細胞を安定的にフローサイトメトリー

ーの解析ができるよう、PBMC の凍結保存法を先ず検討した。各種細胞保存液を試行した結果、凍結保存＆融解後も生存率や表面マーカーが凍結前と変化しない細胞保存液 (Recovery™ Cell Culture Freezing Medium; ThermoFisher Scientific) を選択することができた(図 2)。

(2) ヒト肺 M. avium 症患者における PD-1 陽性消耗 T 細胞の解析

ヒト肺 Mycobacterium avium 症患者および年齢・性別が一致した健常者コントロールより、ヘパリンナトリウム入りの採血管を使用し末梢血を採取、リンパ球比重分離液 (Ficoll-Paque PLUS) を使用し、密度勾配遠心法にて末梢血単核白血球 (PBMC: peripheral blood mononuclear cells) を分離した。分離した末梢血単核白血球サンプルを、LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit にて死細胞を除去し、生細胞のみを汎 T 細胞マーカー CD3、ヘルパー T 細胞マーカー CD4、キラー T 細胞マーカー CD8、CD127 (IL-7 レセプタ alpha 鎖)、PD-1 にて共染色を行い、フローサイトメトリーにて解析を行った(図 3)。

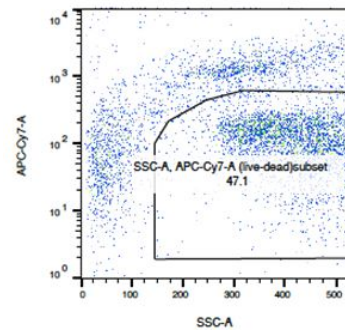


図 3 A：死細胞染色による live PBMCs の抽出。

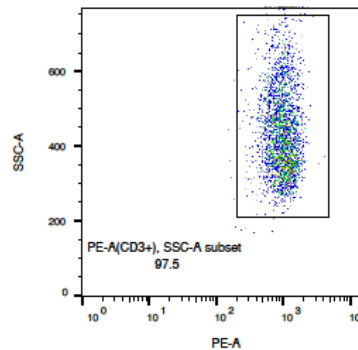


図 3 B：CD3 陽性 T 細胞の抽出。

解析の結果、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞共に、PD-1 細胞を発現している細胞の割合は、健常者コントロールに比し、ヒト肺

Mycobacterium avium 症患者にて有意に変化は認めず、むしろ有意差はないものの、PD-1 細胞を発現している細胞の割合は低下していた(図 4)。このことは、他の慢性炎症性疾患や感染症と異なり、Mycobacterium avium 感染症では、病原体の持続的な刺激により、T 細胞は消耗することなく、存在している可能性が示唆された。

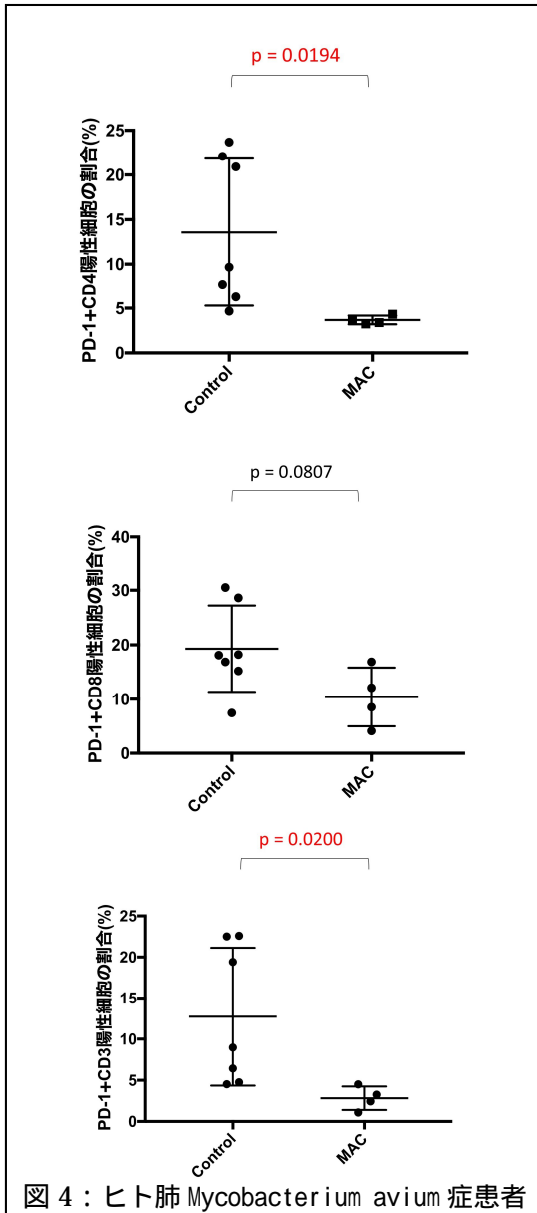


図 4 : ヒト肺 Mycobacterium avium 症患者

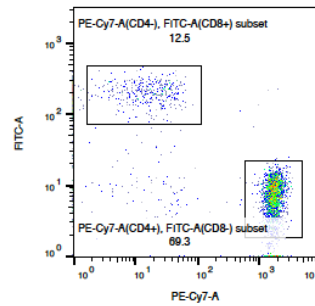


図 3 C : CD4,CD8 陽性 T 細胞の抽出

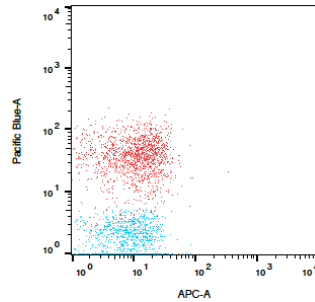


図 3 D : CD127 陽性 CD4T 細胞の抽出

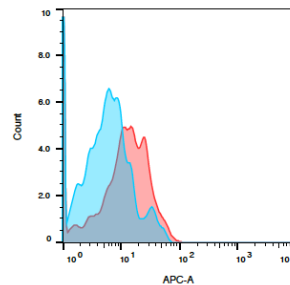


図 3 E : PD-1 陽性細胞の解析

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 3 件)

1 . Taizou Hirano, Mitsuhiro Yamada, Yoshiya Mitsuhashi, Masakazu Ichinose. Invasive pulmonary mucormycosis: rare presentation with pulmonary eosinophilia. BMC Pulm Med. 2017 Apr 28;17(1):76. doi: 10.1186/s12890-017-0419-1. 査読有り

2 . 三橋善哉 .

肺のマイクロバイオーム . THE LUNG PERSPECTIVES .メディカルレビュー社 .大阪 . 2017 ; 37-42 . 査読なし

3 . 佐藤慶, 三橋善哉, 一ノ瀬正和 . 両下肢麻痺を来した肺真菌症の 1 例 . 日本内科学会雑誌 2017 年 ; 106(3) : 591-7 . 査読なし

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況（計0件）

〔その他〕

特記すべきことなし

6．研究組織

(1)研究代表者

三橋 善哉 (MITSUHASHI, Yoshiya)
東北大学・医学系研究科・非常勤講師
研究者番号：70754513