

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K10024

研究課題名(和文)ステロイド使用患者における潜在性結核感染症の高感度診断法の開発

研究課題名(英文)Development of highly sensitive diagnostic method for latent tuberculosis infection in steroid-using patients

研究代表者

前田 智代 (Maeda, Tomoyo)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：70782168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：免疫抑制治療下の結核既往群20名、非結核暴露群15名の結核特異抗原を添加し16-20時間培養させた末梢血T細胞のマスサイトメトリーデータの解析を行った。CD3+T細胞中のIFN- $\gamma$  high細胞陽性率が結核既往群で増加していた。IFN- $\gamma$  陽性細胞分画のみを高次元解析を行った。GM-CSF低値でIL-2を高発現するCD4+のCluster E、およびCD161, CD25を表面抗原として発現するCD4+のCluster Hは、有意に結核既往群IGRA陽性群で上昇していた。これらの細胞群が免疫抑制治療患者における結核暴露の特異的診断に有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチなどへの免疫抑制治療により医原性の結核蔓延が問題となるが、免疫抑制治療患者における結核特異的血液診断は、検査感度が著しく低下する。本研究により、免疫抑制治療中の結核既往リウマチ性疾患患者における、末梢血結核抗原特異的IFN- $\gamma$  産生T細胞の詳細なphenotypeが明らかとなった。免疫抑制下の結核免疫応答に重要なT細胞群の候補として、IFN- $\gamma$  high+CD4+CXCR3+IL-2high+TNF- $\alpha$ +T細胞、および、IFN- $\gamma$  high+CD4+CD25+CD161+CXCR3+T細胞が示された。これらの細胞群による新たな結核特異的診断法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：An analysis was conducted on the mass cytometry data of peripheral blood T cells that had been cultured for 16-20 hours with the addition of tuberculosis-specific antigens from 20 patients with a history of tuberculosis under immunosuppressive treatment and 15 individuals not exposed to tuberculosis. It was observed that the positive rate of IFN- $\gamma$  high cells within CD3+ T cells was elevated in the group with a history of tuberculosis. High-dimensional analysis was exclusively conducted on the fraction of IFN- $\gamma$  positive cells. Both Cluster E, a CD4+ subset that expressed IL-2 at high levels with low GM-CSF, and Cluster H, a CD4+ subset expressing CD161 and CD25 surface antigens, were found to significantly increase in the IGRA positive group with a history of tuberculosis. These findings suggest the potential usefulness of these cell groups in the specific diagnosis of tuberculosis exposure in patients undergoing immunosuppressive treatment.

研究分野：膠原病

キーワード：免疫抑制治療 T細胞 潜在性肺結核診断

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチなど免疫介在性疾患への免疫抑制治療により医原性の結核蔓延が問題となる。しかしステロイドを含む免疫抑制治療は結核特異的血液診断 Interferon- release assay(IGRA)の感度を大きく下げ、潜在性結核の有効なスクリーニング検査法は世界的にも確立していない。

### 2. 研究の目的

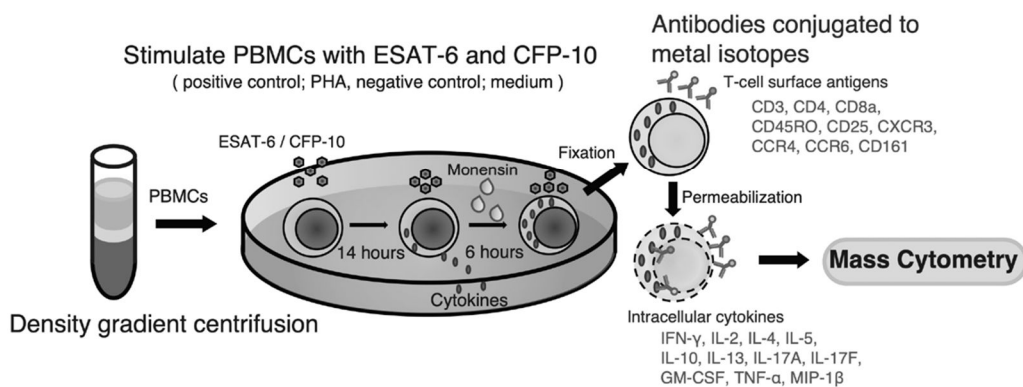
リウマチ膠原病で免疫抑制治療中の結核既往患者および IGRA 陽性患者における結核抗原特異的サイトカイン産生 T 細胞の免疫フェノタイプを詳細に解析し、非結核暴露患者と比較することで、その特徴を探索する。結核既往患者において結核抗原に特異的に炎症性サイトカインを産生する T 細胞の phenotype を明確にし、新たな免疫抑制治療下の潜在性結核診断法の基盤とする。

### 3. 研究の方法

当院通院中リウマチ膠原病患者で、ステロイド/免疫抑制剤治療中の患者を対象とし、結核既往群 20 名 (問診により結核罹患歴が明らかなもの、うち IGRA 陽性 6 名)、非結核暴露群 15 名 (結核既往がなく、胸部画像検査 (胸部 CT) にて陳旧性変化を含む異常を認めず、結核の家族歴のある者や医療関係者を除外、IGRA 陽性 0 名) を選出した。

患者末梢血単核球に結核特異抗原 (ESAT-6/CFP-10) を添加し 37℃, 5%CO<sub>2</sub> で 16~20 時間 (5 時間モノニン添加) 反応させ、回収した (次スライド参照)。処理検体の T 細胞関連の表面抗原 (CD3, CD4, CD8, CCR4, CXCR3, CD161, CD45RO, CCR6, CD25) と細胞内 cytokine (IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-17F, MIP-1 $\beta$ ) をマスマイトメトリーで解析した (下図)。

### 末梢血のMass cytometry解析による結核抗原特異的T細胞の検出



### 4. 研究成果

#### < 研究結果 >

CD3+T 細胞中の IFN- $\gamma$  high+ 陽性率は、非結核暴露群 0.18%、結核既往群 0.50% で有意差を認め、診断感度特異性は IGRA と同等であった。IFN- $\gamma$  以外で両群で有意な差をもつサイトカインはなかった。

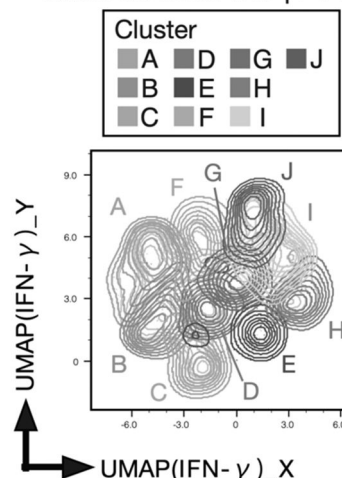
陰性コントロール検体、および結核抗原処理後検体の FCS データを用い、結核抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生 T 細胞 (CD3+IFN- $\gamma$ +) のみにゲートをし、機械学習アルゴリズム FlowSOM を用いて教師なしクラスタリングを行い 10 のクラスター (A~J) に分類した (次ページ右上図)。その中で、IFN- $\gamma$  を高発現する三群 (C, E, H) をみとめた。

Cluster A~J を結核既往患者群 (IGRA 陽性 6 名と陰性 14 名) および非結核暴露群、の 3 群でわけて解析をし、IGRA 陽性群で特異的に多い T 細胞クラスター (特異的クラスター) および非結核暴露群や結核抗原未処理検体 (陰性コントロール) でも IFN- $\gamma$  産生をおこす T 細胞クラスター (非特異的クラスター) を探索した。

IGRA 陽性患者の結核抗原処理後検体で特異的に多い特異的クラスターとして、CD4 + CXCR3 + で IL-2 high+TNF- $\gamma$  + の Cluster E、および CD4 + CD25 + CD161 + CXCR3 + の Cluster H、の二つが候補となった。

非結核暴露群などでも IFN- $\gamma$  高産生の非特異的クラスターとして、GM-CSFhigh+CD4 +CD8+ の Cluster C が候補となった。

Gated on CD3+ IFN- $\gamma$ + T cells



#### < 考察 >

Cluster E, Cluster H が IGRA 陽性患者で特異的に増加し、陽性率も有意差をもって高いことが示された。これらの T 細胞が免疫抑制治療下にもかかわらず結核抗原への免疫記憶を持続し、感染時に応答する T 細胞群と考えられ、その phenotype を同定したことは、結核感染の予防などの理解や新たな治療戦略に重要と考えられた。

一方 Cluster C は非結核暴露群や、結核抗原未処理検体でも IFN- $\gamma$  を高産生する細胞群で、非特異的な IFN- $\gamma$  産生細胞と考えられた。これらを識別 (除外) することが可能となれば、さまざまな免疫病態の影響や治療薬が影響する免疫介在性疾患患者の潜在性結核の免疫診断の精度の向上が期待できる。

#### < 結語 >

本研究により、免疫抑制治療中のリウマチ性疾患 (免疫介在性疾患) 患者における、末梢血結核抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生 T 細胞の詳細な phenotype が明らかとなった。免疫抑制下の結核免疫応答に重要な T 細胞群の候補として、IFN- $\gamma$  high+CD4 + CXCR3 + IL-2 high+TNF- $\gamma$  + T 細胞、および、IFN- $\gamma$  high+CD4 + CD25 + CD161 + CXCR3 + T 細胞が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohmura Shin-ichiro, Naniwa Taio, Tamechika Shin-ya, Miyamoto Toshiaki, Shichi Daisuke, Kazawa Nobukata, Iwagaitsu Shiho, Maeda Shinji, Wada Jun-ichi, Niimi Akio	4. 巻 25
2. 論文標題 Effectiveness and safety of lower dose sulfamethoxazole/trimethoprim therapy for Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with systemic rheumatic diseases: A retrospective multicenter study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 253 ~ 261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2018.11.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田智代 前田伸治
2. 発表標題 免疫抑制治療中のリウマチ膠原病患者における結核抗原特異的T細胞の検討
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会、横浜
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田 伸治 大佐賀 智 前田智代 難波大夫
2. 発表標題 Sparse analysis of rheumatoid arthritis clinical background and peripheral blood Treg phenotyp.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会、福岡
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田伸治
2. 発表標題 シンポジウム1 高齢者RA患者のマネージメント 1 免疫病態について
3. 学会等名 第30回中部リウマチ学会、新潟
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田伸治, 為近真也, 前田智代, 難波大夫
2. 発表標題 ABA中止時点によるリウマチ患者Thサブセットと再燃予測の可能性
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会、東京
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	前田 伸治  (Maeda Shinji)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師	
	(80381854)	(23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------