

令和 6 年 10 月 31 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2022

受付番号 202270011

氏 名 泉田真生

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1-1. 用務地（派遣先国名）用務地：Banjur（国名： The Gambia）

1-2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

西アフリカで感染症の選択圧がもたらす遺伝子多型と自己炎症・免疫疾患への影響の解明

1-3. 派遣期間：令和 4 年 8 月 1 日 ～ 令和 6 年 7 月 31 日（731 日間）

1-4. 受入研究機関名及び部局名

受入研究機関名： MRC Unit The Gambia at London School of Hygiene and Tropical Medicine

部局名： Vaccine and Immunity Team

入も可)

【記載事項】

- ・ 研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等」

研究・調査実施状況；

結核は単一の感染症の死亡原因第一位であり、年間 1000 万人の新規感染者と、140 万人の死亡者を出す。世界人口の 25%が潜在性結核(感染しているが、発病していない状態)と推定され、人類に与える疫学的・免疫学的インパクトが大きい。本研究では、慢性感染症である結核がヒト免疫関連細胞やサイトカイン、トランスクリプトームに与える影響を、臨床サンプルから明らかにした。

結核免疫と自己免疫性疾患の免疫学的共通点に CD4+T 細胞である Th1, Th17 や Treg, IL10, IL17 があることから初年度は、潜在性結核とこれら免疫細胞やサイトカインの共通点を示すことを目的にした。ガンビアの結核コホートで GeneXpert Mtb/RIF assay (Cepheid Inc., Sunnyvale, CA, USA) と喀痰抗酸菌培養によって結核と診断された患者と QuantiFERON TB Gold-in tube (Qiagen, Germany) 陽性の潜在性結核患者の末梢血単核球 (PBMC) を収集した。HIV 陽性者は除外した。

潜在性結核時に結核菌が発現する休眠期抗原 (HBHA, Acr) や活動期結核菌が発現する抗原 ESAT-6/CFP-10 (E/C) で PBMC を刺激して、マルチカラーフローサイトメトリ (結核 n=15, 潜在性結核 n=15) を使用して免疫応答の差異を比較した。(図 1)

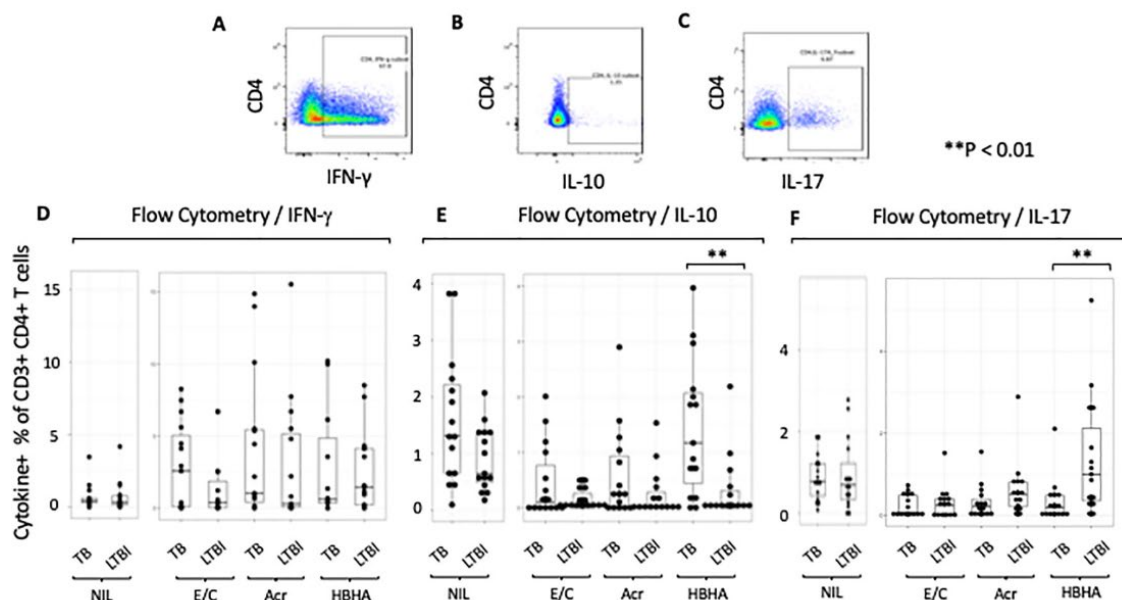


図 1

IFN γ +CD4+T 細胞は、各抗原で刺激した後、結核と潜在性結核の両方に認められたが有意差はなかった (図 1D)。HBHA 刺激後、活動性結核では潜在性結核よりも CD4+ IL-10+T 細胞の割合が有意に高かったが (p=0.0038)、E/C または Acr 刺激後には認められなかった (図 1E)。対照的に、HBHA 刺激後、IL-17+ CD4+T 細胞の割合は、活動性結核と比較して、潜在性結核で有意に増加した (図 1F)。

次に、抗原刺激後の活動性結核患者と潜在性結核のメモリー T 細胞サブセットの割合を比較した。CD27+CD45RO+と同一化されたセントラル・メモリー CD4+T 細胞 (T_{cm}) と、CD27-CD45RO+と同一化されたエフェクター・メモリー CD4+T 細胞 (T_{em}) にゲーティングした (図 2A)。刺激がない場合の T_{cm} と T_{em} の割合は有意ではなかった (それぞれ p=0.48 と p=0.085)。しかし、T_{cm} の比率は、E/C 刺激後、活動性結核患者よりも潜在性結核で高かった (p=0.041) (図 2B)。一方、T_{em} の比率は、Acr および HBHA 刺激後、活動性結核患者よりも潜在性結核で高かった (いずれも p<0.01 ; 図 2C)。

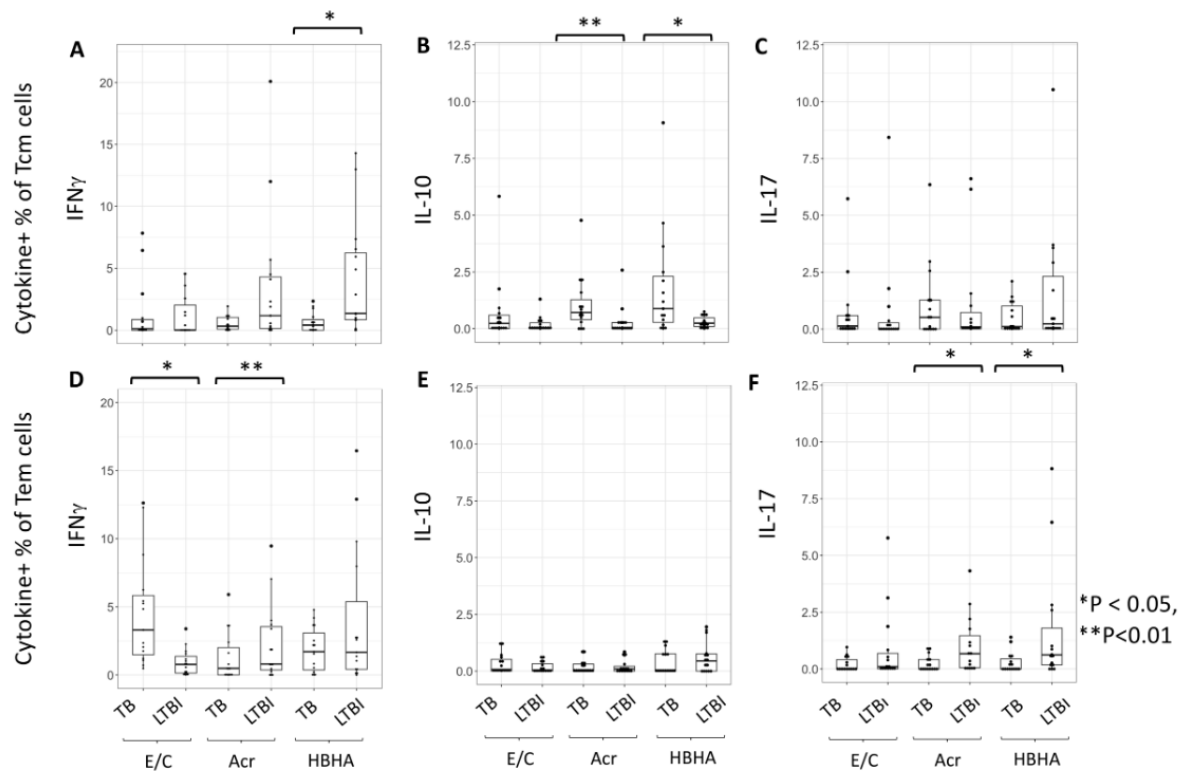


図 2

次に、メモリーCD4⁺ T細胞の異なるサブセットにおける M. tb 抗原特異的サイトカイン産生を測定した。HBHA によって誘導された IFN- γ ⁺ Tcm 細胞の割合は、活動性結核患者よりも潜在性結核で有意に高かった ($p < 0.01$) (図 2A)。逆に、Acr 誘導 IL-10⁺ Tcm 細胞と HBHA 誘導 IL-10⁺ Tcm 細胞の割合は、潜在性結核よりも活動性結核患者で有意に高かった (それぞれ $p < 0.01$ と $p < 0.05$) (図 2B)。E/C 刺激後、サイトカイン産生 Tcm 細胞の割合には、差は認められなかった。また、E/C、Acr または HBHA 刺激後、活動性結核患者と潜在性結核の間で IL-17⁺ Tcm 細胞の割合に差は認められなかった (図 2C)。エフェクターメモリーT細胞 (Tem) のうち、Acr 誘導 IFN- γ ⁺ Tem 細胞の割合は、活動性結核患者よりも潜在性結核で有意に高かった ($P < 0.001$) (図 2D)。同様に、Acr および HBHA 誘導性の IL-17⁺ Tem 細胞の割合は、活動性結核群と比較して潜在性結核で高かった ($p < 0.05$) (図 2F)。対照的に、E/C 誘導 IFN- γ ⁺ Tem 細胞の割合は、潜在性結核と比較して活動性結核の参加者で高かった ($p < 0.05$) (図 2D)。M. tb 抗原刺激後の IL-10 + Tem 細胞の割合には、活動性結核と潜在性結核の間で差は認められなかった (図 2E)。

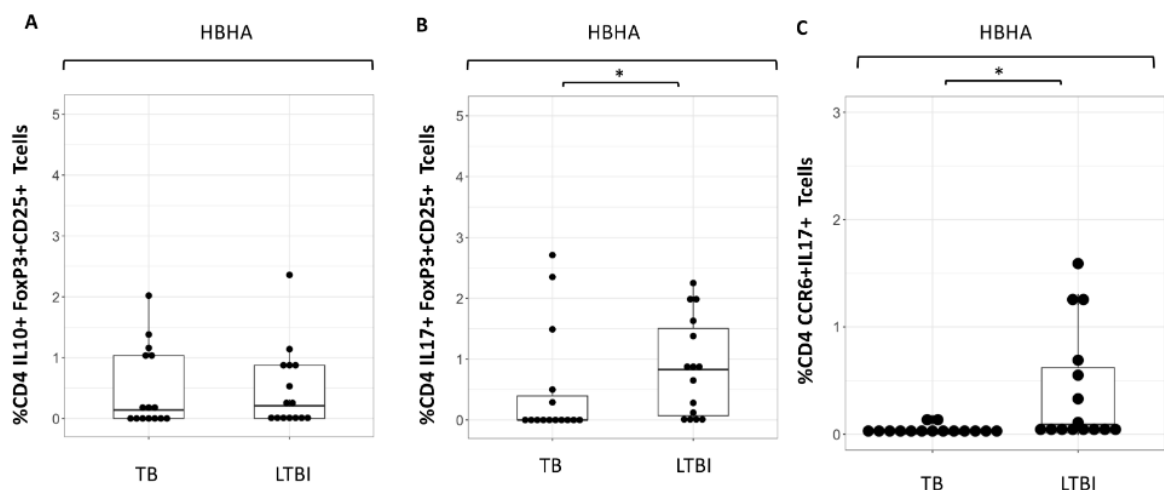


図 3

次に非活動期抗原で刺激した時の免疫応答を調べた。Treg やサイトカイン産生細胞 CD4⁺IL10⁺細胞には差があるものの、%CD4⁺ FoxP3⁺CD25⁺細胞にはどの刺激条件でも差は見られなかった。しかし、IL-10⁺CD4⁺T 細胞の割合は、潜在性結核に比べて活動性結核患者では HBHA 刺激後に高くなった。そこで、HBHA 刺激した FoxP3⁺CD25⁺CD4⁺T 細胞と CCR6⁺CD4⁺T 細胞におけるこれらのサイトカインの発現を比較した。HBHA で刺激したサンプルでは、IL-10⁺FoxP3⁺CD25⁺CD4⁺T 細胞の割合に差は認められなかった (図 3A)。対照的に、HBHA 刺激により誘導された IL-17⁺FoxP3⁺CD25⁺細胞お

よび IL-17+CCR6+細胞は、潜在性結核において有意に高かった（図 3 B、C）（それぞれ $p < 0.05$ および $p < 0.05$ ）。

IFN- γ と IL-10」または「IL-17 と IFN- γ 」の両方を産生する細胞を含む二重サイトカイン陽性 CD4+ T 細胞は、慢性感染症や自己免疫性疾患において重要な役割を果たしている。そこで我々は、どの M. tb 抗原がこれらの細胞を誘導するかを、フローサイトメトリーを用いて調べた。E/C および Acr 特異的な「IFN- γ + IL-10」および「IFN- γ and IL-17」二重陽性 CD4+T 細胞の頻度は、両群間で有意差はなかった（図 4）。しかし、HBHA 特異的 IFN- γ および IL-10 二重陽性 CD4+T 細胞は、潜在性結核と比較して、活動性結核の参加者で高いことが観察された（ $p = 0.036$ ）。対照的に、HBHA 特異的 IFN- γ および IL-17' 二重陽性 CD4+ T 細胞は、活動性結核と比較して潜在性結核で有意に高かった（ $p < 0.05$ ）（図 4）。

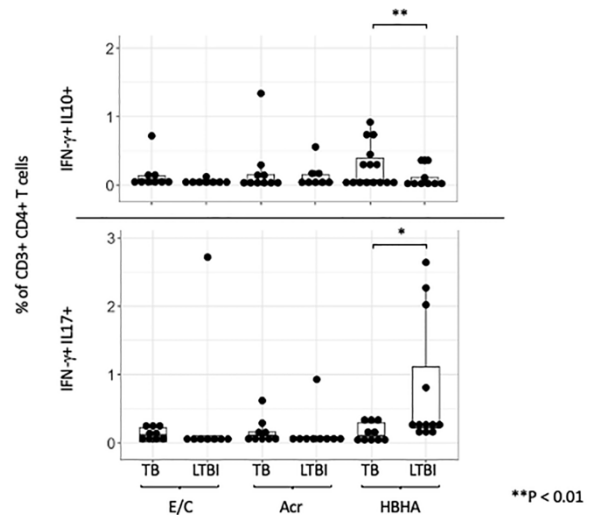


図 4

結核免疫と自己免疫疾患の共通点である IL17 や IL10, Treg 細胞、Th17 細胞についてフローサイトメトリーで解析した結果、潜伏期関連抗原「HBHA」は、潜伏期結核患者では炎症性サイトカインである IL17 を誘導するのに対し、活動性結核患者では抗炎症性サイトカインである IL-10 を誘導することが示された。そして HBHA は潜在性結核において FoxP3 陽性 Treg や Th17 細胞を誘導することがわかった。以上から、慢性感染である潜在性結核の、潜伏期に発現する抗原特異的免疫プロファイルは自己免疫性疾患のそれと類似点が多いことがわかった。

次に、結核コホート集団の中で、自己免疫性疾患の有病率を明らかにする予定であったが、予算と倫理委員会の問題でできなかった。

最近、自己免疫疾患分野で CD4 陽性 T 細胞を対象にシングルセル RNA-seq を用いて、リファレンスが構築され、CD4 陽性 T 細胞のプロファイリングが可能になっている。そこで我々は、結核免疫と、自己免疫疾患の重複をシングルセルレベルで比較することとした。結核接触者を 2 年間追跡した前向きコホートの PBMC を使用して、結核発病者と潜在性結核のまま経過する集団にわけた。それぞれベースライン、6 ヶ月後、18 ヶ月後に PBMC を採取した。（ベースラインと 6 ヶ月後は 11 名ずつ、18 ヶ月後は 8 名ずつ）この PBMC から cDNA ライブラリを構築し、現在シーケンス解読中である。

成果の発表・関係学会への参加状況等

論文発表

Izumida, Mai, Haddijatou Jobe, Edward G. Coker, Amadou Barry, Momodou Rashid, Ismaila L. Manneh, Georgetta K. Daffeh, Koya Ariyoshi, and Jayne S. Sutherland. 2024.

“HBHA Induces IL-10 from CD4+ T Cells in Patients with Active Tuberculosis but IFN- γ and IL-17 from Individuals with Mycobacterium Tuberculosis Infection.”

Frontiers in Immunology 15 (August): 1422700.

発表

6th Dec 2023, MRC Unit The Gambia at LSTHM Vaccine and Immunity Team meeting
Cytokine Trajectory in TB Contacts; Progressor vs Non-Progressor

14th May 2024, LSHTM TB Centre Retreat

HBHA Induces IL-10 from CD4+ T Cells in Patients with Active Tuberculosis but IFN- γ and IL-17 from Individuals with Mycobacterium Tuberculosis Infection.

6th Nov 2024, MRC Unit The Gambia at LSTHM Vaccine and Immunity Team meeting

HBHA Induces IL-10 from CD4+ T Cells in Patients with Active Tuberculosis but IFN- γ and IL-17 from Individuals with Mycobacterium Tuberculosis Infection.