

令和元年6月11日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09899

研究課題名(和文) シェーグレン症候群におけるHTLV-1の作用点と分子機序を解明する多角的研究

研究課題名(英文) Multidirectional investigation to elucidate an effector site of HTLV-1 and molecular machinery in Sjogren's syndrome

研究代表者

中村 英樹 (NAKAMURA, Hideki)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：10437832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：抗HTLV-1抗体陽性シェーグレン症候群(SS)唾液腺におけるtax/HBZとNF-kappa B/Foxp3蛋白発現を免疫組織学的に比較検討した。SS組織では浸潤単核球と導管両方にHBZとtax発現を認め、HAMSSの浸潤単核球にはtax優位の発現がみられた。キャリアSSでは浸潤単核球・導管共にHBZと少量のtaxが発現していたが、抗HTLV-1抗体陰性SSではHBZ/tax共に発現はごく軽度であった。Foxp3はATL MNCsで17.2%と有意な発現を認めHAMSSでの発現も10.4%と陰性群より高値であった。HAMSSでのtaxの優位発現とFoxp3の発現の偏りが特徴的であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シェーグレン症候群(SS)におけるHTLV-1の関与について、ISHおよび免疫組織検討を行い、ATLとHAMSSでは、浸潤単核球におけるHBZとtaxの発現比率に差がみられた。また、浸潤単核球におけるNF-kB発現はHTLV-1感染に関わらず同等であったが、Foxp3はATLおよびHAMSSに優位であり、HBZ-Foxp3がHTLV-1感染病態により特異的に関与している可能性が示唆された。これまでの研究ではHTLV-1陽性SS唾液腺の遺伝子発現はtaxのみでの検討であったが、HBZとその誘導蛋白Foxp3の発現が明らかとなった。進歩の乏しかったSSとHTLV-1の直接的関連が明確となった。

研究成果の概要(英文)：Expression of HTLV-1 bZIP factor (HBZ), tax and relevant molecules in labial salivary glands (LSGs) from patients with Sjogren's syndrome (SS) was examined by in situ hybridization (ISH) and immunohistochemistry. In LSGs from an adult T-cell leukemia (ATL) patient and HTLV-1-associated myelopathy (HAM) SS patients, both HBZ and tax signals were detected in infiltrating mononuclear cells (MNCs) and ducts, and HBZ and tax were dominantly expressed in MNCs of HAMSS, respectively. HBZ was dominantly observed in LSGs from HTLV-1 asymptomatic carrier (AC)-SS patients. Although Foxp3 expression was observed in LSG MNCs of all of the SS patients, the ATL patient's expression was significantly greater than that of the AC-SS ( $p < 0.01$ ) and HTLV-1-seronegative SS ( $p < 0.01$ ) patients. p65 was expressed in LSG MNC nuclei from all SS patients and co-expressed with Foxp3. These results suggest that HBZ-mediated Foxp3 expression is in part associated with the pathogenesis of HTLV-1-seropositive SS.

研究分野：膠原病分野

キーワード：シェーグレン症候群 HTLV-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

タイトル: シェーグレン症候群における HTLV-1 の作用点と分子機序を解明する多角的研究

シェーグレン症候群 (以下 SS) の発症要因の一つとして、Epstein-Barr ウイルスやレトロウイルス感染が挙げられるが、この中で human T-cell leukemia virus type I: HTLV-1 の関与は長崎での疫学研究では明らかである。また、抗 HTLV-1 抗体陽性 SS 唾液腺の特徴として、異所性二次濾胞が少ないという特徴がある。さらに HTLV-1 の唾液腺上皮細胞への感染は *in vitro* ではわたしたちの先行研究で明らかとなった。一方、HTLV-1 遺伝子では HTLV-1 遺伝子の中でプラス鎖でコードされる *tax* 発現が報告されてきたが、特に HTLV-1 *tax* トランスジェニックマウスにおいては、唾液腺組織や筋組織中における Tax 蛋白発現が報告されている。HTLV-1 遺伝子の中でマイナス鎖にコードされる HTLV-1 bZIP factor (*HBZ*) の発現と機能が新たに注目されている。*tax* と *HBZ* はそれぞれ炎症や転写活性を持つ NF-kappa B (以下 NF-κB) と T 細胞の制御や慢性炎症にかかわる forkhead box protein P3 (Foxp3) を誘導することが知られている。

#### 2. 研究の目的

これまでに SS 唾液腺における *tax* 発現の報告はあるが、*HBZ* や下流の蛋白発現を検討した研究は無い。今回、抗 HTLV-1 抗体陰性および陽性 SS 唾液腺における *tax/HBZ* と NF-κB/Foxp3 蛋白発現を免疫組織学的に比較検討した。

#### 3. 研究の方法

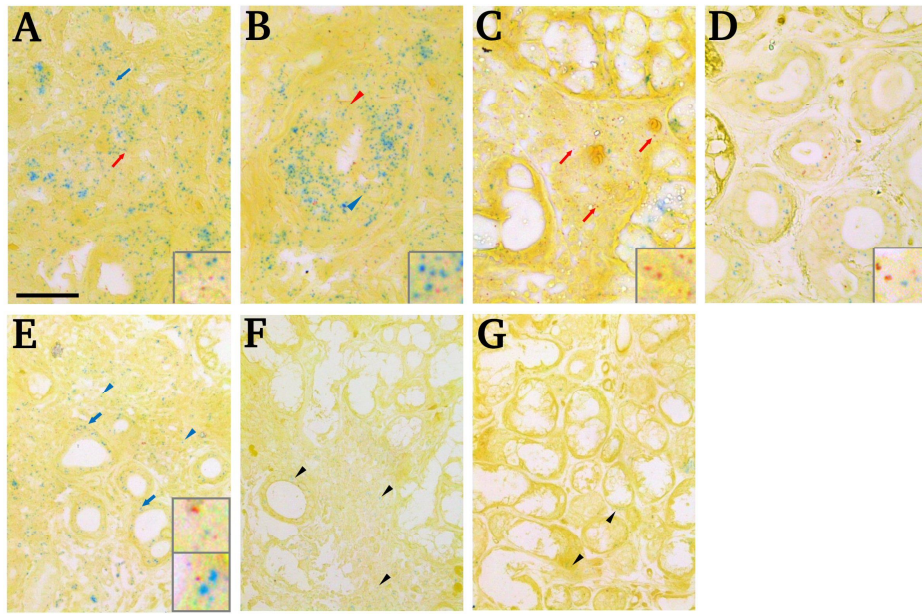
成人 T 細胞白血病 (ATL)、HTLV-I 関連脊髄症 (HAM) SS、HTLV-I キャリア (AC) SS、抗 HTLV-1 抗体陰性 SS、コントロール唾液腺の *HBZ/tax* mRNA 発現を特異的な ViewRNA プローブを用いた *in situ* hybridization (ISH) にて解析した。陽性コントロールとして ATL および HAM 由来細胞株の *HBZ/tax* mRNA 発現を ISH と RT-PCR 法にて検討した。蛋白レベルでは Foxp3 と NF-κB p65 の浸潤単核球 (MNCs) と導管での発現を免疫染色で解析し、MNCs での発現は同一条件下での定量化をハイブリッドセルカウントシステムで行った。

#### 4. 研究成果

ATL 細胞株 YK8, EE8 では ATL と HAMSS では、*HBZ* と *tax* 発現が認められた。HCT-5 においては、*HBZ* と *tax* いずれも ATL 株より強力な発現が認められた。SS 組織では MNCs と導管両方に *HBZ* と *tax* 発現を認めたが、ATL は MNCs・導管共に *HBZ* 優位で *tax* 発現は少数であり、導管に多数の *HBZ* 発現を認めた。一方、HAM MNCs には *tax* 優位の発現がみられ *HBZ* 発現は少数であったが、導管には両者の発現がみられた。ACSS では MNCs・導管共に *HBZ* と少量の *tax* が発現していたが、抗 HTLV-I 抗体陰性 SS では *HBZ/tax* 共に発現はごく軽度であった。ATL で観察される TSLC1/CADM1 発現については陽性コントロールの肺腺癌組織では明らかな発現が見られたが、ATL に合併した SS 症例唾液腺では明らかではなかった。

下記: 唾液腺での ISH: *HBZ* (blue arrow)、*tax* (red arrow)

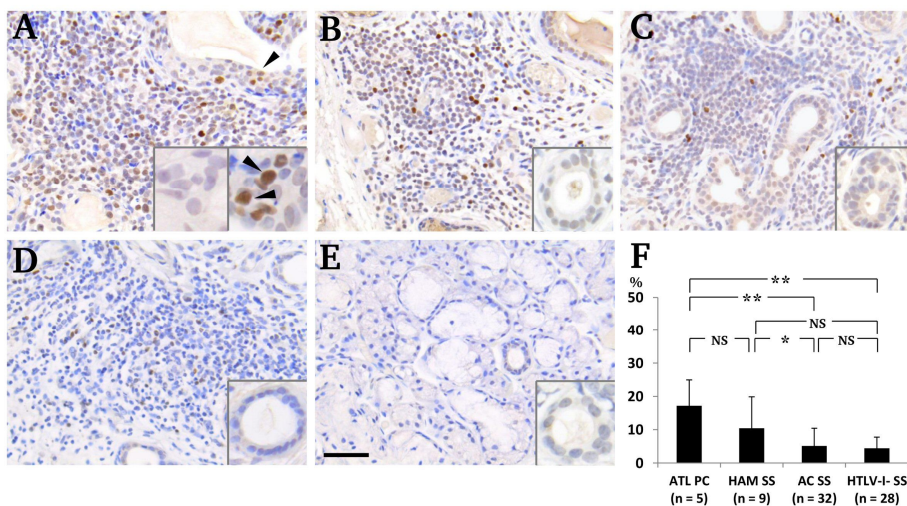
A: ATL 症例浸潤単核球 B: ATL 症例導管 C: HAMSS 例 浸潤単核球 D: HAMSS 例 導管  
E: HTLV-1 キャリア SS F: HTLV-1 陰性 SS G: 非 SS コントロール Bar 40μM



ATL (n=5: focus 数)、HAMSS (n=9)、ACSS (n=32)、  
 抗 HTLV-I 抗体陰性 SS(n=28) 間において、Foxp3 は ATL MNCs で 17.2%と有意な発現を認め HAMSS での発現も 10.4%であったが、ACSS と抗 HTLV-I 抗体陰性 SS での MNCs 発現は 10%以下であり、ATL と有意差を認めた ( $p < 0.01$ )。NF- $\kappa$ B p65 の MNCs 発現はいずれも 70%以上で有意差は無かった。導管には Foxp3 が ATL のみにみられ、NF- $\kappa$ B p65 はコントロール以外の導管全てに発現していた。

下記：唾液腺での Foxp3 蛋白発現

A: ATL 症例 B: HAMSS 症例 C: HTLV-1 キャリア SS D: HTLV-1 陰性 SS E: 非 SS コントロール F: 浸潤単核球内の Foxp3 陽性率 Bar 40 $\mu$ M



結論：ATL と HAMSS では、MNCs における HBZ と tax の発現比率に明らかな差がみられた。また、MNCs における NF-κB 発現は HTLV-1 感染に関わらず同等であったが、Foxp3 は ATL および HAMSS に優位であり、HBZ-Foxp3 が HTLV-1 感染病態により特異的に関与している可能性が示唆された。これまでの研究では HTLV-1 陽性 SS 唾液腺の遺伝子発現は tax のみでの検討であったが、HBZ とその誘導蛋白発現が明らかとなった。今後は、HBZ が SS の病態にどのように関与しているかについて検討することが必要と思われる。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Shimizu T, Nakamura H, Takatani A, Umeda M, Horai Y, Kurushima S, Michitsuji T, Nakashima Y, Kawakami A. Activation of Toll-like receptor 7 signaling in labial salivary glands of primary Sjögren's syndrome patients. Clin Exp Immunol. 2019 Apr;196(1):39-51.( 査読有 )
2. Nakamura H, Hasegawa H, Sasaki D, Takatani A, Shimizu T, Kurushima S, Horai Y, Nakashima Y, Nakamura T, Fukuoka J, Kawakami A. Detection of human T lymphotropic virus type-I bZIP factor and tax in the salivary glands of Sjögren's syndrome patients. Clin Exp Rheumatol. 2018 May-Jun;36 Suppl 112(3):51-60. ( 査読有 )
3. Suzuki T, Fukui S, Umekita K, Miyamoto J, Umeda M, Nishino A, Okada A, Koga T, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Fujikawa K, Aramaki T, Mizokami A, Matsuoka N, Ueki Y, Eguchi K, Sato S, Hidaka T, Origuchi T, Okayama A, Kawakami A, Nakamura H. Brief Report: Attenuated Effectiveness of Tumor Necrosis Factor Inhibitors for Anti-Human T Lymphotropic Virus Type I Antibody-Positive Rheumatoid Arthritis. Arthritis Rheumatol. 2018 Jul;70(7):1014-1021. ( 査読有 )
4. Nakamura H, Horai Y, Shimizu T, Kawakami A. Modulation of Apoptosis by Cytotoxic Mediators and Cell-Survival Molecules in Sjögren's Syndrome. Int J Mol Sci. 2018 Aug 11;19(8). pii: E2369. ( 査読有 )
5. Fukui S, Nakamura H, Takahashi Y, Iwamoto N, Hasegawa H, Yanagihara K, Nakamura T, Okayama A, Kawakami A. Tumor necrosis factor alpha inhibitors have no effect on a human T-lymphotropic virus type-I (HTLV-I)-infected cell line from patients with HTLV-I-associated myelopathy. BMC Immunol. 2017 Feb 3;18(1):7. ( 査読有 )

〔学会発表〕(計 1 件)

- 1 . 中村英樹、清水俊匡、高谷亜由子、川上 純 第 26 回日本シェーグレン症候群学会 学術集会 (平成 29 年 9 月 8-9 日) シェーグレン症候群唾液腺における HBZ および tax 発現について

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

特記事項なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：清水 俊匡

ローマ字氏名：SHIMIZU, Toshimasa

所属研究機関名：長崎大学

部局名：病院（医学系）

職名：助教

研究者番号：40770467

研究分担者氏名：高谷 亜由子

ローマ字氏名：TAKATANI, Ayuko

所属研究機関名：長崎大学

部局名：病院（医学系）

職名：医員

研究者番号：90821380

研究分担者氏名：川上 純

ローマ字氏名：KAWAKAMI, Atsushi

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科（医学系）

職名：教授

研究者番号：90325639

### (2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。