

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08884

研究課題名(和文) HTLV-1のシェーグレン症候群病態形成への直接的関与

研究課題名(英文) Direct involvement of HTLV-1 for pathogenesis of Sjogren's syndrome

研究代表者

中村 英樹 (NAKAMURA, Hideki)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：10437832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：シェーグレン症候群(以下SS)とHTLV-1との関連が示唆されている。濾胞性樹状細胞(FDC)とB細胞との作用で形質細胞の分化が誘導されるが、HAM唾液腺内の二次濾胞形成は阻害されており、HTLV-1のFDCへの影響を検討した。HCT-5との共培養を行うとCXCL13とBAFF発現は抑制された。FDC-like cellsにHCT-5を添加するとBAFFは減少傾向を示した。BAFF/CXCL13濃度は抗HTLV-1抗体陽性SSでは、抗体陰性SSより低い傾向を示した。抗HTLV-1抗体陽性SSにおける抗Ro/SS-A抗体出現頻度の低さが、FDC-like cellの抑制によ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

シェーグレン症候群(以下SS)における自己抗体産生系の中で、異所性二次濾胞内上流に位置すると思われる濾胞性樹状細胞(FDC)様細胞のはたらきが、HTLV-1感染細胞HCT-5/MT-2による直接作用によって阻害され、少なくとも細胞内のCXCL13/BAFF発現とインターフェロン刺激で増加するBAFF分泌が抑制されている結果が得られた。また、抗HTLV-1抗体陽性SS患者血清中のBAFF/CXCL13濃度は抗体陰性SS患者より低い傾向が示された。以上より抗HTLV-1抗体陽性SSにおける抗Ro/SS-A抗体出現頻度の低さが、FDC様細胞の機能抑制によって生じている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that Sjogren's syndrome (SS) is associated with human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1). The action of follicular dendritic cells (FDCs) and B cells induces autoantibody producing plasma cell differentiation, but secondary follicular formation in the salivary glands of the patients with HTLV-1-associated myelopathy is inhibited, and the effect of HTLV-1 on FDCs was investigated. Co-culture with HCT-5/MT-2 suppressed the expression of CXCL13 and BAFF. BAFF showed a decreasing tendency when HCT-5/MT-2 was added to FDC-like cells. BAFF / CXCL13 concentrations tended to be lower in anti-HTLV-1 antibody-positive SS than in antibody-negative SS. It was suggested that the low frequency of anti-Ro / SS-A antibody appearance in anti-HTLV-1 antibody-positive SS may be due to functional suppression of FDC-like cells.

研究分野：リウマチ・膠原病

キーワード：シェーグレン症候群 HTLV-1 濾胞性樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群(以下 SS)は涙腺・唾液腺など外分泌腺障害や抗 Ro/SS-A 抗体などの自己抗体が出現する自己免疫疾患である。Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)の高浸淫地域では、SS と HTLV-1 の疫学的な関連が示唆されており、HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) には高率に SS が合併することから HTLV-1 が SS における環境因子のひとつと考えられる。一方で、通常の SS4 では抗 Ro/SS-A 抗体が 70-80%にみられるものの、HAM に合併した SS ではその陽性率が 3 割ほどに低下する現象が観察された。自己抗体産生の場合として二次リンパ濾胞があり、濾胞性樹状細胞 (FDC) や濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh) と B 細胞が作用することにより、記憶 B 細胞や自己抗体産生形質細胞の分化が誘導される。HAM に合併した SS における自己抗体陽性率の低さに、HTLV-1 の二次リンパ濾胞へどのようにかかわっているのかはこれまで明らかとなっていない。また、HTLV-1 感染 SS 唾液腺では、浸潤単核球と導管両者に HTLV-1 感染を確認しているが、成人 T 細胞白血病 (ATL) と HAM では有意な HTLV-1 関連遺伝子発現比率が大きく異なっている。その一方で、浸潤単核球はいずれも Foxp3 発現が高頻度であることが判明した。

2. 研究の目的

抗 HTLV-1 抗体陰性 SS 唾液腺における二次濾胞: germinal center (GC) の出現頻度は 18.8% であったが、抗 HTLV-1 抗体陽性 SS では 3.1% と少なく、特に HAM に合併した SS 例 9 例では GC 形成が欠如していた。このことは、自己抗体産生の場合である GC に対する HTLV-1 の影響を予見させるものであった。このため、GC を構成している免疫細胞に対する HTLV-1 感染の影響を見ることを目的とした。注目したのは GC 内で B 細胞のホーミングや形質細胞への分化を司る司令塔的な役割を担っている FDC である。FDC は C-X-C motif chemokine ligand 13 (CXCL13) を分泌し、GC へ B 細胞をホーミングし、B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF) を分泌することにより B 細胞から高親和性 B 細胞の選択、形質細胞への分化を促す働きをしている。このため、HTLV-1 が CXCL13 や BAFF の発現や分泌、あるいは FDC 自体へどのような影響を与えるかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

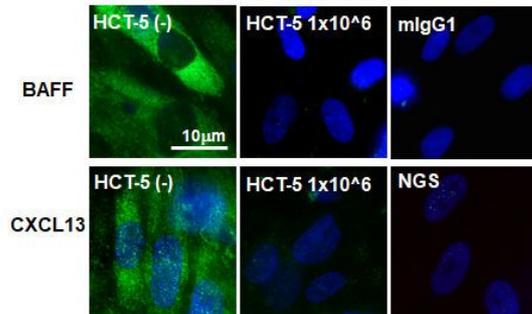
FDC は文献上、リンパ組織の発達した小児扁桃より得ることが望ましいという結論に達し、長崎大学病院倫理委員会での承認(承認番号 16031412)を得て、長崎大学病院耳鼻咽喉科で手術を受けた 10 歳未満患者扁桃を用いた。扁桃組織をミンス、コラゲナーゼ処理し、遠心 Ficoll-Paque により回収した。FDC であることの確認は、細胞表面マーカーをフローサイトメトリーで確認した。細胞内の CXCL13/BAFF 発現は免疫染色で、これら分子の分泌や SS 患者血清での血中濃度は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により確認した。FDC との共培養には、非 HTLV-1 感染細胞株 MOLT-4 を用い、HTLV-1 感染細胞株としては、HAM 由来の HCT-5 と ATL 由来の MT-2 株を用いた。FDC のアポトーシスの有無は、TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法で確認した。FDC と T 細胞株との非接触培養には Transwell を用いた。

4. 研究成果

FDC 培養 2 日目の表面マーカーは CD14, CD23, CD40, ICAM-1, VCAM-1 および BAFF が観察され、既報通りであった。FDC 増殖後の表面マーカーとしては ICAM-1, FDC, fibroblast が

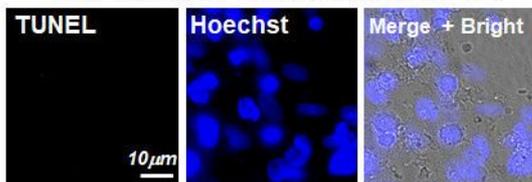
みられ既報の FDC とやや異なったため、FDC-like cell とした。Interferon (IFN)- α /IFN- γ で FDC-like cells を刺激しても BAFF/CXCL13 のフローサイトメトリーでの発現はみられなかったが、細胞質内には刺激にかかわらず恒常的な発現がみられた。しかし、 1×10^6 /ウエルの HCT-5 と MT-2 との接触共培養を行うと細胞質内の CXCL13 と BAFF 発現は著明に抑制されたが、MOLT-4 では抑制されなかった (図 1: HCT-5 との共培養による BAFF/CXCL13 発現への影響を示す)。

図1 細胞質内BAFF/CXCL13の抑制



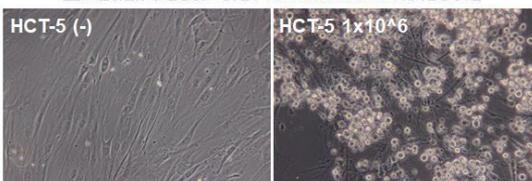
この際、培養 72 時間までの観察で、FDC-like cells への HTLV-1 Gag 蛋白発現は明らかではなく、HTLV-1 感染は確認されなかった。しかし、 α -tubulin 染色を併用すると、FDC-like cells の峽細化が確認されたが、TUNEL 染色ではアポトーシスは認めなかった (図 2: HCT-5 との共培養による TUNEL 染色像を示す)。

図2 HCT-5共培養によるTUNEL染色



この形態学的変化が FDC-like cells と HTLV-1 感染細胞株との接触によるものかどうかを見るため、Transwell を用いて、光学顕微鏡で観察した。この結果、非接触共培養では FDC-like cells の峽細化は起こらなかったが、接触培養では峽細化が生じた (図 3: HCT-5 との共培養による光学顕微鏡による峽細化)。

図3 接触共培養によるFDC-like cellsの形態変化



しかし、FDC-like cells と MOLT-4 の接触培養では峽細化は起こらなかった。次に FDC-like cells から分泌される CXCL13 と BAFF への HTLV-1 の効果を検討した。IFN- α /IFN- γ で FDC-like cells を刺激すると BAFF の分泌増加が ELISA 法で確認できたが CXCL13 分泌は確認できなかった。ここへ HCT-5 を添加すると IFN- α /IFN- γ で増加した BAFF は減少傾向を示したが、MOLT-4 添加では明らかな BAFF の抑制はみられなかった。一方、予想外であったのは HCT-5 および MT-2 培養上清にはサイトカイン刺激にかかわらず、高い CXCL13 分泌が ELISA で確認された。最後に抗 HTLV-1 抗体陽性および陰性 SS 患者と SS との診断が付かなかった患者血清における BAFF と CXCL13 濃度を検討した。この結果、BAFF/CXCL13 濃度はいずれも抗 HTLV-1 抗体陽性 SS では、抗体陰性 SS より低い傾向を示した。CXCL13 に関しては、非 SS 患者は抗 HTLV-1 抗体陰性 SS 患者より有意に低値であった。

以上の結果から、SSにおける自己抗体産生系の中でもGC内では上流に位置すると思われるFDC-like cellsのはたらきが、HTLV-1感染細胞による直接作用によって阻害され、少なくとも細胞内のCXCL13/BAFFとBAFF分泌が抑制されている結果が得られた。抗HTLV-1抗体陽性SSにおける抗Ro/SS-A抗体出現頻度の低さが、FDC-like cellの抑制による可能性が示唆された。

しかし、自己抗体産生系全般に対するHTLV-1の作用の一部が明らかになったことのみであり、Tfhや自己抗体産生そのものへの影響はまだ明らかとなっていない。加えて研究背景で述べたATL/HAM合併SS唾液腺におけるFoxp3陽性細胞浸潤の追加検討も今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takatani A, Nakamura H, Furukawa K, Endo Y, Umeda M, Shimizu T, Nishihata S, Kitaoka K, Nakamura T, Kawakami A	4. 巻 9
2. 論文標題 Inhibitory effect of HTLV-1 infection on the production of B-cell activating factors in established follicular dendritic cell-like cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunity, Inflammation and Disease	6. 最初と最後の頁 777-791
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/iid3.432	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura H, Shimizu T, Takatani A, Suematsu T, Nakamura T, Kawakami A.	4. 巻 269
2. 論文標題 Initial human T-cell leukemia virus type 1 infection of the salivary gland epithelial cells requires a biofilm-like structure.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virus Res	6. 最初と最後の頁 197643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virusres.2019.197643	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 -
1. 著者名 Endo Y, Fukui S, Koga T, Sasaki D, Hasegawa H, Yanagihara K, Okayama A, Nakamura T, Kawakami A, Nakamura H.	4. 巻 49
2. 論文標題 Tocilizumab has no direct effect on cell lines infected with human T-cell leukemia virus type 1.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Int Med Res.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/03000605211002083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Endo Y, Fukui S, Umekita K, Suzuki T, Miyamoto J, Morimoto S, Shimizu T, Koga T, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Origuchi T, Okada A, Fujikawa K, Mizokami A, Matsuoka N, Aramaki T, Ueki Y, Eguchi K, Kariya Y, Hashiba Y, Hidaka T, Okayama A, Kawakami A, Nakamura H.	4. 巻 31
2. 論文標題 Effectiveness and safety of non-tumor necrosis factor inhibitor therapy for anti-human T-cell leukemia virus type 1 antibody-positive rheumatoid arthritis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 972-978
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2020.1847802	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 -

1. 著者名 Nakamura H, Shimizu T, Kawakami A.	4. 巻 9
2. 論文標題 Role of viral infections in the pathogenesis of Sjogren's syndrome: different characteristics of Epstein-Barr virus and HTLV-1.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 1459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm9051459	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura H, Tsukamoto M, Nagasawa Y, Kitamura N, Shimizu T, Kawakami A, Nagata K, Takei M.	4. 巻 14
2. 論文標題 Does HTLV-1 Infection Show Phenotypes Found in Sjogren's Syndrome?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses.	6. 最初と最後の頁 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v14010100.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中村英樹、清水俊匡、高谷垂由子、末松貴史、川上純
2. 発表標題 HTLV-1のシェーグレン症候群患者唾液腺上皮細胞への初期感染様式
3. 学会等名 第28回日本シェーグレン症候群学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村英樹
2. 発表標題 HTLV-1とシェーグレン症候群
3. 学会等名 第29回日本シェーグレン症候群学会学術集会
4. 発表年 2021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	清水 俊匡 (SHIMIZU Toshimasa) (40770467)	長崎大学・病院(医学系)・助教 (17301)	
研究分担者	川上 純 (KAWAKAMI Atsushi) (90325639)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	
研究分担者	高谷 亜由子 (TAKATANI Ayuko) (90821380)	長崎大学・病院(医学系)・医員 (17301)	

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
---------	---------