

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月11日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591078

研究課題名（和文） シェーグレン症候群における HTLV-I の関与について

研究課題名（英文） Involvement of HTLV-I for Sjogren's syndrome

## 研究代表者

中村 英樹（NAKAMURA HIDEKI）

長崎大学・大学病院・講師

研究者番号：10437832

研究成果の概要（和文）：HTLV-I 陰性シェーグレン症候群小唾液腺では二次濾胞中に濾胞性樹状細胞と、CXCL13 の発現がみられたが、HTLV-I 陽性例では見られなかった。唾液腺上皮細胞と HTLV-I 細胞株との共培養で変動する蛋白質が観察された。

研究成果の概要（英文）：In labial salivary glands from HTLV-I-seronegative SS with germinal center, follicular dendritic cells with CXCL13 were observed. Co-culture of SGEC with HCT-5 showed variation of some molecules.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,300,000円	390,000円	1,690,000円
平成23年度	1,100,000円	330,000円	1,430,000円
平成24年度	1,100,000円	330,000円	1,430,000円
年度			
年度			
総計	3,500,000円	1,050,000円	4,550,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：膠原病学

## 1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群（以下 SS）の発症要因の一つとして、微生物の中では EB ウイルスとともに HTLV-I も挙げられるが、HTLV-I の関与はまだ疫学のおよび分子生物学的に確立されたものではない。わたしたちは以前 HTLV-I 感染は SS 発症の環境要因であり、抗 HTLV-I 抗体陽性 SS 患者での HTLV-I 特異的かつ唾液腺特異的な自己免疫反応の存在は唾液中 IgA 型抗 HTLV-I 抗

体と HTLV-I プロウイルスの存在から確認されていることを報告した。HTLV-I 感染とアポトーシス感受性に関しては数多くの研究が発表され、私たちの *in vitro* 研究からも HTLV-I 感染は宿主細胞の NF- $\kappa$ B、Bcl-2、Bcl-x などの発現誘導およびアポトーシス抵抗性を惹起し SS の病態形成に関わると考えられるが、SS 唾液腺生検組織のアポトーシス陽性細胞率、Fas/Fas ligand、Bcl-2 関連蛋白の発現は、HTLV-I 感染の有無で有意

差は認められない。この結果を踏まえ、HTLV-I による SS 発症を考える場合、アポトーシス以外の機序を考察する必要性を模索してきたが、その中で下記のように唾液腺組織の構造破壊に着目してまず研究を進めた。

## 2. 研究の目的

抗 HTLV-I 抗体陰性 SS と比較して、抗 HTLV-I 抗体陽性 SS の唾液腺は構造破壊を来たしにくいことが明らかとなってきた。この傾向は HAM に合併する SS に顕著に認められ、これは HTLV-I 関連 SS で初めて明らかとなった。HAM には HTLV-I 特異的免疫反応が顕著に検出されるので、この差異の解析は HTLV-I 関連 SS の病態解析に必要と考えられる。

唾液腺局所での ectopic GC は、私たちの組織学的な検討でも、SS では頻度は比較的低いも検出されるが、HAM 合併 SS の生検唾液腺組織には全く ectopic GC は検出されない。私たちの検討では GC 形成に重要なケモカインである CXCL13 の唾液腺組織における発現が HAM 合併 SS では全く検出されなかったことも明らかとなり、GC を介した唾液腺破壊の観点からも HTLV-I 陰性 SS との違いがうかがえる。GC 形成には自然免疫やケモカインの関与が大きい、HTLV-I の pX 遺伝子は transactivator である Tax 蛋白活性化を介して種々のサイトカイン・ケモカインの産生を亢進させることが知られている。わたしたちは HTLV-I 関連 SS の発症機序について、ウイルス感染による自然免疫受容体 (Toll-like receptor ; 以下 TLR) の活性化を想定してその下流にある PI3K-Akt 経路の活性化も検討してきたが、TLR3 のリガンドである poly:IC で初代培養唾液腺上皮細胞を刺激すると細胞死が増加し Akt も MAP kinase のリン酸化も伴って活

性化されていることを見出した。そこで今回、抗 HTLV-I 抗体陽性 SS と抗 HTLV-I 抗体陰性 SS の唾液腺生検組織での比較検討を、ectopic GC、ケモカイン、TLRs、Akt など唾液腺細胞生存に関わる因子の発現を中心に解析したい。また、これら発現の差異を、HTLV-I 感染ヒト T 細胞株 (HCT-5) とヒト初代培養唾液腺細胞の共培養実験で検証し、in vivo では動物モデルを用いて確認・解析したい。

## 3. 研究の方法

HTLV-I の上皮系細胞への感染例としては、網膜色素細胞株に HTLV-I 感染を誘導できた報告が見られる。このため、今回 HTLV-I が口唇生検で得られた唾液腺上皮細胞に感染しうるのかを確認したい。HTLV-I 感染細胞株は HCT-5 を用い、その感染効率がどのくらいの頻度であるのか、HTLV-I の p19、p28 および GAG に特異的なモノクローナル抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、唾液腺上皮細胞 100 個あたりの感染数を検討する。但し、cell line への感染実験ではないため、感染効率が低い可能性はあり、感染実験の条件により詳細な設定が必要である可能性がある。さらに HTLV-I の唾液腺上皮細胞への感染が確認できたら、HTLV-I に対する特異抗体による細胞染色と同時に、異種の抗体を用いた二重染色を行う。すなわち、唾液腺上皮側に発現する生存因子は EGF, PI3K/Akt, XIAP, 報告によっては Bcl-2 の発現があり、カスパーゼなどのアポトーシス誘導分子も発現する。これらの細胞死を制御する分子と HTLV-I 感染の共発現が証明できれば、HTLV-I 感染による生存因子の活性化に言及できると考えられる。さらにこれらの生存因子の発現レベルを、ウェスタンブロット法によっても半定量的に検討する。さらに HTLV-I が感染した場

合、その過程で発現する TLRs とその局在を検討する。

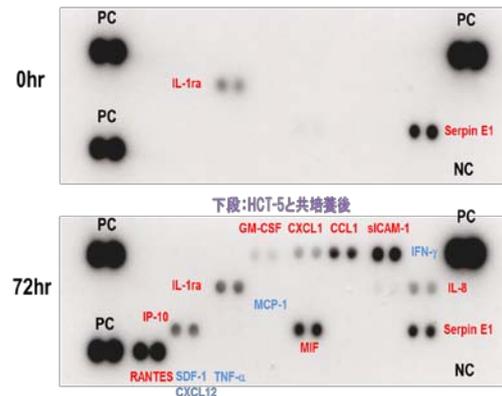
#### 4. 研究成果

唾液腺での検討の前に、ヒトリンパ節の GC 内の CXCL13 発現が濾胞性樹状細胞 (FDC) の分布と類似していることを連続切片による免疫染色で確認した。次いで SS 小唾液腺組織における CXCL13 と FDC の発現を蛍光染色で検討したところ、HTLV-I 関連脊髄症 (HAM) 合併 SS 小唾液腺や HTLV-I キャリア SS 小唾液腺では両者発現はみられなかった。しかし、異所性 GC を有する HTLV-I 陰性 SS 小唾液腺では、CXCL13 (ローダミン標識二次抗体使用) および FDC (FITC 標識二次抗体使用) 両者が蛍光免疫染色により共発現していた。この共発現は、陽性コントロールと用いたヒトリンパ節においても確認された。これらの結果から、CXCL13 発現およびその供給源と考えられる FDC は抗 HTLV-I 抗体陽性 SS 唾液腺では少ないことが確認された。

また、SS 患者由来培養唾液腺上皮細胞 (SGEC) と HCT-5 の共培養を行った。共培養に先立ち、唾液腺用培地中での HCT-5 自体における HTLV-I GAG 蛋白の発現を FITC 標識した二次抗体を用いて 0,12,24,36,48hr まで観察したが、GAG は 0-48hr を通して constitutive に発現しており、共培養に耐えることを最初に確認した。また、共培養 0, 72hr 上清のサイトカインアレイを行い、可溶性 ICAM-1、IP-10、MIF および RANTES の発現が観察された。特に 72hr での可溶性 ICAM-1 と RANTES の増強が顕著であり、細胞接着や T 細胞の migration に関わる機能亢進が示唆された。一方、唾液腺上皮細胞ライセートにおけるアポトーシス関連蛋白アレイ解析では 72hr 共培養後、Fas および Bcl-x 発現が明らかに増強し、cytochrome C

の初 g 年も増強していた。この他にも細胞生存に関わる分子発現の変動が 72hr に観察されており、今後これらのアレイ解析の追試を行い、統計学的解析を行う予定としている。

〈唾液腺上皮細胞と HCT-5 共培養上清サイトカインアレイ結果: PC は陽性コントロール〉



HCT-5 との共培養において、形態学的には細胞数の減少や形態変化はみられず、少なくとも 72hr までは HTLV-I 感染細胞による唾液腺細胞のアポトーシスを思わせる変化は得られていない。これらの結果からは HTLV-I が直接的あるいは液性因子を介して間接的に唾液腺上皮細胞に細胞死に関する分子に影響を与えていると考えられる。

最後に、唾液腺上皮細胞と HCT-5 によって感染が成立するかについて検討した。これまでの検討では、共培養後、48-72hr 時間までは、唾液腺上皮細胞側に GAG 蛋白発現は確認できなかったが、96hr 培養では GAG 蛋白発現と共に、NF-kappa B の核内移行の可能性が示唆された。

今回の解析で少なくとも間接的には、HTLV-I の存在による上清中のサイトカインや唾液腺上皮細胞の生死に関わる分子の変動が確認できた。今後直接的な感染の可能性について検討を進める予定である。

## 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 2 件)

Nakamura H, Horai Y, Suzuki T, Okada A, Ichinose K, Yamasaki S, Koji T, Kawakami A. TLR3-mediated apoptosis and activation of phosphorylated Akt in the salivary gland epithelial cells of primary Sjögren's syndrome patients. *Rheumatol Int.* 2013 Feb;33(2):441-50.

Nakamura H, Horai Y, Tokuyama A, Yoshimura S, Nakajima H, Ichinose K, Yamasaki S, Nakamura T, Hayashi T, Kawakami A. HTLV-I virological and histopathological analysis in two cases of anti-centromere-antibody-seropositive Sjögren's syndrome. *Mod Rheumatol.* 2013 Jan;23(1):133-9.

[学会発表] (計 1 件)

中村英樹他 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (平成 23 年 7 月 20 日 神戸)  
シェーグレン症候群唾液腺における Toll-like receptor 3 による細胞死調節機序について

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)  
該当なし

○取得状況 (計 0 件)  
該当なし

[その他]

ホームページ等  
特記事項無し。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 英樹 (NAKAMURA HIDEKI)  
長崎大学・大学病院・講師  
研究者番号：10437832

### (2) 研究分担者

川上 純 (KAWAKAMI ATSUSHI)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：90325639

### (3) 連携研究者

中村 龍文 (NAKAMURA TATSUFUMI)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：00198219