

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461477

研究課題名(和文) HTLV-I関連シェーグレン症候群の発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism for HTLV-I-associated 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺上皮細胞とHCT-5の共培養を行い、この時のHTLV-I関連蛋白/遺伝子発現や培養上清における液性因子、細胞死関連分子発現を検討した。HCT-5との共培養を96時間まで行うと72-96時間の唾液腺上皮細胞上に約7.8%の頻度でHTLV-I陽性細胞が観察、in situ PCR法でも48時間でのHTLV-I感染が認められた。培養上清のCXCL11、sICAM-1、IL-8、CXCL10/IP-10およびRANTESはELISA法でも増加を呈した。上皮細胞ライセートのアポトーシスアレイではアポトーシスを誘導分子と拮抗分子の経時的増加が観察されたが、TUNEL陽性像は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：To explore whether HTLV-I infects salivary gland epithelial cells (SGECs) of Sjogren's syndrome (SS). We determined the inflammation-related molecules profiles after the co-culture of SGECs with HCT-5. The apoptosis-related molecules profile was determined by antibody dot-blot array and IF. We investigated the presence of HTLV-I-related molecules by IF and in situ PCR. The apoptosis of SGECs was evaluated by TUNEL staining. 7.8% of the SGECs were positive for HTLV-I-related proteins after co-culture. HTLV-I proviral DNA was detected by in situ PCR. Co-cultured supernatant showed time-dependent increases of sICAM-1, RANTES, and IP-10/CXCL10. The expressions of pro-apoptotic molecules and anti-apoptotic molecules were also increased in the SGECs. Apoptosis of SGECs was not detected after co-culture. HTLV-I could infect SGECs and alter their cellular functions. These findings contribute to the development of HTLV-I-associated SS.

研究分野：膠原病学

キーワード：シェーグレン症候群 HTLV-I

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、ウイルス感染が重要であるが、この中で HTLV-I の関与は疫学的には後方視的研究はあるものの分子生物学的に明らかではない。HTLV-I 陽性 SS における臨床像やその発症機序については、自己抗体の発現の低さや二次濾胞の欠如などが挙げられる。しかしながら、HTLV-I がどのような細胞に感染し、病態を形成するかについては詳らかになっていない。疫学的背景のみでは、HTLV-I 関連 SS の概念が確立されたとは言い難く、その感染機序や感染後の免疫異常の詳細を明らかにする必要がある。世界的にも HTLV-I が誘導する SS の病態については報告が極めて少ない。

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。HTLV-I キャリアにおいてその傾向がみられるが、特に HAM に合併する SS において二次濾胞発現はほぼみられず、HTLV-I 感染がこの現象を誘導していることが示唆される。

これらは主に HTLV-I が浸潤単核球特に B 細胞・形質細胞の成熟に何らかの影響を与えていることが示唆される。このため、HTLV-I が浸潤単核球のどの細胞に感染し、最終的に二次濾胞形成の抑制や自己抗体産生抑制を来すのか検討が必要である。この中でケモカインである CXCL13 は B 細胞のホーミング、BAFF は B 細胞分化に深くかかわっており、これらの分子に対する HTLV-I の関与を検討する必要があった。

一方で、HTLV-I は主に CD4 陽性 T 細胞に感染するが、一部の非リンパ細胞にも感染が可能でありこれまでに樹状細胞への感染は報告されている。さらに HTLV-I は上皮系の細胞にも一部感染することが知られ

ており、滑膜上皮細胞や眼の網膜細胞に感染し、その結果 GM-CSF などの炎症性サイトカイン産生を促す。このため、SS においても唾液腺上皮細胞に感染し、免疫異常を惹起する可能性があり、HTLV-I 感染細胞株を用いた検討を行った。

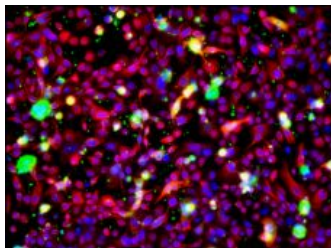
3. 研究の方法

今回長崎大学病院倫理委員会での承認を得て、SS 患者より口唇生検にて得られた唾液腺上皮細胞を用いることとした。得られた唾液腺組織は無血清培地で培養し、ここで得られた唾液腺上皮細胞を蛋白等の発現に用いた。一方、HTLV-I 関連脊髄症 (HAM) 患者髄液より樹立された HTLV-I 感染細胞株である HCT-5 を用いた。唾液腺上皮細胞と HCT-5 の共培養を 0-96 時間行い、この時の HTLV-I 関連蛋白 (GAG 蛋白) や NF-kappa B の発現の有無を検討した。また、ウェスタンブロットでも HTLV-I GAG 蛋白発現を検討した。さらに共培養後の唾液腺上皮細胞上の HTLV-I 遺伝子発現は in situ PCR 法にて解析した。培養上清における炎症性サイトカインやケモカイン発現は、抗体アレイおよび ELISA 法にて検討し、さらに免疫染色法により上皮細胞での発現を検討した。また上皮細胞ライセート上のアポトーシス関連蛋白発現も抗体アレイ法で解析し、免疫染色および TNUEL 法により細胞死の有無を検討した。細胞死の陽性コントロールとしては既報の TRAIL を用いた。

4. 研究成果

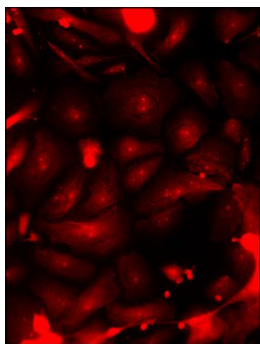
まず、HCT-5 の表面分子を検討したが、CD4 のみ陽性であり、interleukin (IL)-2 存在下で抗 HTLV-I (p19, p28, GAG) 抗体による染色を行うと、96 時間までは viability は保たれており NF-kBp65 の核内発現も観察された。得られた唾液腺上皮細胞を用いて、HCT-5 との共培養を 96 時間まで行うと(唾液腺上

皮細胞のマーカ―として既報の cytokeratin 8/18 に対する一次抗体を使用) 共培養後 72-96 時間の唾液腺上皮細胞上に約 7.8% の頻度で HTLV-I 陽性細胞が観察された。



(緑は HTLV-I 感染細胞、赤は唾液腺上皮細胞マーカ―である cytokeratin 8/18 を示す。黄色のシグナルが共培養 72 時間における HTLV-I に感染した唾液腺上皮細胞を示している。)

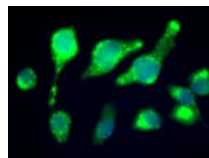
上皮細胞ライセートでのウェスタンブロットでは、HTLV-I 関連蛋白発現が 2-4 時間でも観察され接着性の強い HCT-5 の影響と考えられた。このため、蛋白レベルでの発現検討と同時に、*in situ* PCR 法を用いると、共培養 48 時間以降、唾液腺上皮細胞に dot 状のシグナル増強が確認され、遺伝子レベルでの HTLV-I 感染が認められた。



(共培養 72 時間における *in situ* PCR 法による HTLV-I 遺伝子発現が核内の dot 像として観察された。)

一方、共培養時の培養上清での液性因子の動きを抗体アレイを用いて検討すると、GM-CSF、CXCL11 /GRO α 、CCL1、sICAM-1、IL-1 レセプターアンタゴニスト、IL-6、IL-8、CXCL10/IP-10 および regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted

(RANTES) の経時的増加が確認され、特に接着分子である sICAM-1、炎症に関わる CXCL10/IP-10 や遊走能力にかかわる RANTES の増加が顕著であった。sICAM-1、RANTE および CXCL10/IP-10 の 3 者については ELISA 法による定量法まで行ったが、いずれも共培養後に有意な増加を呈した。また、唾液腺上皮細胞ライセートを採取し、アポトーシスアレイを行ったところ pro-caspase 3、Fas、チトクローム C などのアポトーシスを誘導分子と Bcl-2、HO-2、HSP-27 などアポトーシスに拮抗分子の経時的増加が観察され、免疫染色法においてもこれらの発現が上皮細胞上に確認された。



(共培養 96 時間後の唾液腺上皮細胞におけるチトクローム C の細胞質内発現)

しかしながら、TRAIL で誘導されるような TUNEL 陽性アポトーシスは観察されず、細胞死が起こらないようなバランスが取られていることが示された。

今回これらの結果は欧文誌へ報告できたが、*in vitro* のみでの現象であり、今後動物モデルを用いた検討あるいは、HTLV-I 感染の直接的な機序についても検討が必要と考えられた。

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)

1.Nakamura H, Takahashi Y,

Yamamoto-Fukuda T, Horai Y, Nakashima Y,

Arima K, Nakamura T, Koji T, Kawakami A.

Direct infection of primary salivary gland epithelial cells by human T lymphotropic virus type I in patients with Sjögren's syndrome.

Arthritis Rheumatol. 2015

Apr;67(4):1096-106.

2.Nakamura H, Shimizu T, Takagi Y, Takahashi Y, Horai Y, Nakashima Y, Sato S, Shiraishi H, Nakamura T, Fukuoka J, Nakamura T, Kawakami A. Reevaluation for clinical manifestations of HTLV-I-seropositive patients with Sjögren's syndrome. BMC Musculoskelet Disord. 2015 Nov 4;16:335.

〔学会発表〕(計2件)

1.中村英樹他 第43回日本臨床免疫学会総会(平成27年10月23日 神戸国際会議場(神戸))
シェーグレン症候群唾液腺における
シェーグレン症候群における HTLV-I 感染と
免疫異常

2.中村英樹他 第59回日本リウマチ学会総会・学術集会(平成27年4月25日 名古屋国際会議場(名古屋))

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

川上 純 (KAWAKAMI, ATSUSHI)
長崎大学医歯薬学総合研究科(医学系)・

教授

研究者番号：90325639

(3) 研究分担者

中村 龍文 (NAKAMURA, TATSUFUMI)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)
准教授

研究者番号：00198219

寶來 吉朗 (HORAI, YOSHIRO)
長崎大学・病院(医学系) 医員
研究者番号：30646782