

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860754

研究課題名(和文) 治療抵抗性関節リウマチ患者におけるHTLV-1感染の影響

研究課題名(英文) The impact of HTLV-1 infection in inflammatory response of rheumatoid arthritis

研究代表者

梅北 邦彦 (Umekita, Kunihiro)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：20506084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではHTLV-1感染が関節リウマチ(RA)の病態へ与える影響について臨床的研究および基礎的研究を進め、下記1～3の成果を得た。1. HTLV-1陽性RA患者は、陰性RA患者に比べ血漿IL-6やCCL20濃度が高い傾向である。2. HTLV-1感染細胞との共培養によってRA滑膜細胞におけるIL-6、CCL20やMMP-3などの産生、およびパターン認識受容体(PRRs)の発現が亢進する。3. HTLV-1感染細胞が産生するエクソソームはRA滑膜細胞を活性化し、その活性化機構にPRRsが重要である。HTLV-1感染がRA病態を修飾するメカニズムは複雑であり、今後も詳細な検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to investigate the impact of HTLV-1 infection in worsening mechanisms of rheumatoid arthritis (RA). At first, we evaluated cytokine profiles in HTLV-1 positive RA patients and negative RA patients. The level of IL-6 and CCL20 was higher in HTLV-1 positive RA patients than in negative RA patients. Next, to clarify the interaction between HTLV-1 infected cells and RA synovial fibroblasts (RASf), HTLV-1 infected or non-infected cell-lines were co-cultured with RASf. The expression of IL-6, CCL20, and MMP-3 mRNA in RASf was increased by co-cultured with HTLV-1 infected cells. We focused on exosomes derived from HTLV-1 infected cells as inflammatory mediator. HTLV-1 infected cell derived exosomes were added to RASf, increase expression of IL-6 and CXCL10 mRNA was observed, indicating inflammatory change. Finally, we revealed that pattern recognition receptor plays an important role in exosome induced inflammatory change of RASf.

研究分野：膠原病リウマチ学

キーワード：関節リウマチ HTLV-1

1. 研究開始当初の背景

我々は関節リウマチ (RA) 患者の病状を悪化させ、抗サイトカイン療法に対して治療抵抗性を示す一つの要因としてヒトTリンパ向性ウイルス1型 (HTLV-1) 感染を報告した (引用文献1)。しかしながら、HTLV-1 感染がRAの病態へ与える影響に関する検討は、国内・外を通じて乏しいのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、HTLV-1 感染がRAの病態を修飾する分子生物学的機序を探索し、HTLV-1 感染が原因と考えられる自己免疫疾患の発症機構や新規治療標的分子の解明を発展的に遂行することが目的である。

3. 研究の方法

HTLV-1 陽性 RA 患者を対象とした臨床的解析および基礎的解析を行った。宮崎大学医学部膠原病感染症内科とその関連病院である市民の森病院を受診した RA 患者のうち、研究同意が得られ、TNF 阻害療法を導入された RA 患者を対象とした。これら患者の診療録を後方視的に解析し、以下の臨床的検討を行った。また、基礎的検討においては、HTLV-1 感染細胞株と関節リウマチ線維芽細胞様滑膜細胞 (RASf) を共培養する HTLV-1 陽性 RA モデル実験系を確立し、分子生物学的な検討を行った。

臨床的検討

a. HTLV-1陽性RA患者における末梢血サイトカインプロファイルの解析：TNF阻害剤の導入が必要であったHTLV-1陽性RA 8例とHTLV-1陰性RA 16例における治療前の血漿中サイトカインプロファイルを網羅的に解析した。25項目のサイトカインをサイトカイン多項目同時測定機 (Multi Cytokine assay MAGPIX, Luminex社) で測定した。

b. TNF阻害療法治療抵抗性HTLV-1RA患者におけるセカンドバイオの有効性：TNF阻害療法

が導入された10例中6例で、効果不十分などの理由で同製剤が中止されていた。さらに、この6例中5例がIL-6阻害療法 (Tocilizumab: TCZ) へ変更されており、ヨーロッパリウマチ学会 (EULAR) 改善基準によるTCZの有効性を検討した。

基礎的検討

a. HTLV-1感染細胞株 (MT2B, MT2J, Hut102) および非感染細胞株 (Jurkat) とRASfを72時間培養後、RASfにおける炎症性サイトカイン、マトリクスメタロプロテイナーゼ遺伝子の発現を定量PCR法で検討した。さらにRASfにおけるパターン認識受容体の発現についてイムノプロットング法で検討した。

b. HTLV-1感染細胞株と共培養したRASfにおけるHTLV-1感染の可能性について検討した。RASfにおけるHTLV-1プロウイルスの検出、TaxやHBZなどのHTLV-1関連タンパク質の遺伝子発現の評価を行った。

c. HTLV-1感染細胞株が産生する細胞外小胞 (microvesicles: MVs) の精製およびMV中のmRNAの解析を行った。

d. HTLV-1感染細胞由来MVsの炎症性メディエータとしての機能解析を行った。HTLV-1感染細胞株培養上清より精製したMVsをRASfと共培養し、RASfにおけるIL-6やCXCL10遺伝子の発現を測定した。

4. 研究成果

-a. について～ HTLV-1陽性RA患者の血漿IL-6やCCL20が高い傾向であった。血漿IL-6濃度の高値は、RAにおけるTNF阻害療法治療抵抗性の一因である可能性が報告されている (引用文献2)。HTLV-1陽性RA患者における血漿IL-6高値が、TNF阻害療法に対する治療抵抗性に影響している可能性が考えられた。

-b. について ~ HTLV-1陽性RA患者のうち，TNF阻害療法に治療抵抗性のためIL-6阻害療法(トシリズマブ)へ変更されていた5症例について診療録の後方視的検討を行った．治療導入3ヶ月後のEULAR改善基準による臨床効果判定においてもgood response 3/5例(60%)，moderate response 2/5例(40%)であり，IL-6阻害剤の高い有効性が認められた．EULAR改善基準による疾患活動性の推移では，12ヵ月後の寛解と低疾患活動性で6割を占め，高疾患活動性の関節リウマチ患者は認められなかった．

-a. について ~ HTLV-1感染細胞株およびRASfの共培養実験系を確立し基礎的検討を進めた(図1)．

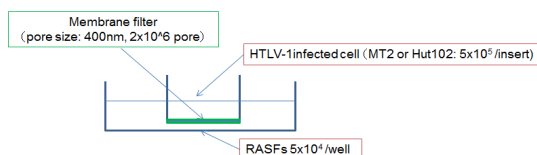


図1．HTLV-1陽性RAモデル実験系．HTLV-1感染細胞とRASfの直接接触による反応を除外するために，トランスウェルチャンバーを利用した．

HTLV-1感染細胞株と共培養したRASfにおいて，RA滑膜細胞のp38MAPKのリン酸化やNF- κ B経路の活性化が強く誘導されており，IL-6，CCL20，VEGF，MMP-3，MMP-1など炎症性サイトカイン，ケモカイン，マトリクスメタロプロテナーゼの遺伝子発現の亢進を認めた(図2)．

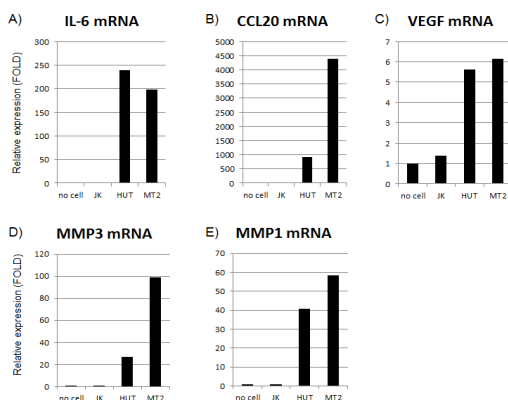


図2．HTLV-1感染細胞と共培養後のRASfでは，サイトカインなどの産生が亢進する

-b. について ~ HTLV-1感染細胞株と共培養したRASfにHTLV-1が感染しているのか検証を行った．共培養後のRASfにおいて，nested PCRでHTLV-1 *pX*領域を検出した．さらにHTLV-1関連タンパク質である*Tax*や*HBZ*のmRNAも定量PCRで検出することができた．HTLV-1がRASfに感染しRASfゲノムにHTLV-1プロウイルスとして組み込まれていることを確認するために，共培養後のRASfを長期間継続培養した(14日間)．その結果，培養後3日目以降のRASfにはHTLV-1プロウイルスが検出されなかった．これらの結果から，本実験では，RASfにHTLV-1感染は成立しておらず，HTLV-1感染によるRASfの活性化の可能性は低いと考えられた．RASfにおいてHTLV-1関連遺伝子が検出された原因として，HTLV-1感染細胞株から伝播した核酸(DNAやRNA)がRASfで検出された可能性が考えられ，そのメカニズムの検討を続けた．

-c. について ~ -bの結果から，HTLV-1感染細胞株から核酸を伝播するメカニズムとして細胞外小胞(Microvesicles: MVs)に注目した．HTLV-1感染細胞株の上清を回収し，フィルターを用いた死細胞，アポトーシス小体の除去を行い，さらに濾過後の培養上清を高速遠心法とエクソソーム分離試薬(Exo Quick)で処理し，エクソソーム分画を回収した．エクソソームはMVsの1つであり，RNAなどの核酸を内包することが報告されている．本実験で得られたエクソソーム分画には，HTLV-1 *pX*領域のDNAや*Tax*，*HBZ* mRNAが存在することが明らかとなった(図3)．実際に，精製エクソソーム分画を混和した培養液でRASfを培養すると，RASfよりHTLV-1 *pX*領域のDNAや*Tax*，*HBZ* mRNAが検出された．-bの現象は，HTLV-1感染細胞株由来エクソソームがRASfに核酸を伝播することによって生じた現象であることが明らかとなった．

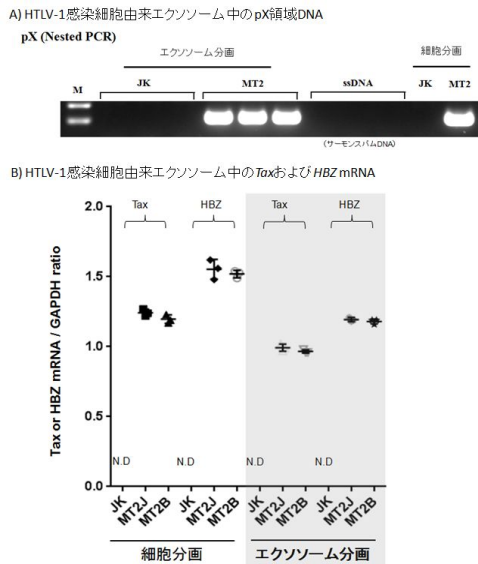


図3 . HTLV-1 感染細胞由来エクソソーム中の pX 領域 DNA および *Tax*, *HBZ* mRNA .

-d)について ~ HTLV-1感染細胞由来エクソソームの炎症性メディエータとしての機能を検討した . 精製エクソソームと共培養したRASfにおいてIL-6, CXCL10 mRNA発現の亢進を認めた . HTLV-1関連慢性炎症性疾患であるHTLV-1関連脊髄症やぶどう膜炎ではINF が病態に関与していること, HTLV-1感染Tリンパ球ではIFN の産生亢進が認められることが報告されている . そこで我々は, IFN で前刺激したRASfの精製エクソソームによる追加刺激を行った . 精製エクソソームはIFN で誘導されるCXCL10 mRNAの発現を強力に増幅することが見出された (図4) .

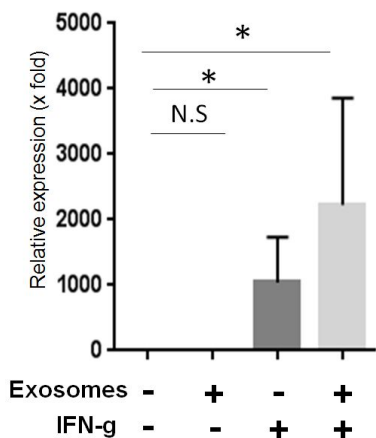


図4 .HTLV-1 感染細胞由来エクソソームは IFN で誘導されるRASfのCXCL10 mRNAの発現を増幅する .

さらに, RASfにおけるエクソソーム認識機構の探索の中で, IFN はRASfにおけるToll様受容体 (Toll-like receptor; TLR) やRIG-I など pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) や damage-associated molecular patterns (DAMPs)を認識する受容体の発現を誘導することが明らかとなった . TLRやRIG-Iは外来核酸抗原の認識に重要なパターン認識受容体 (Pattern recognition receptors: PRRs) であり, 自然免疫において重要役割を担っている . 我々は, このPRRsがエクソソームに含有される核酸の認識に重要であるか検討を行った . その結果, RNA干渉によってRIG-Iの発現を抑制したRASfでは, IFN とエクソソームで増幅されたCXCL10 mRNAの発現が抑制することが見出された . よって, 主に外来RNA抗原を認識するRIG-Iが, エクソソーム中のRNA認識に重要な役割を担っている可能性が示唆された (図5) .

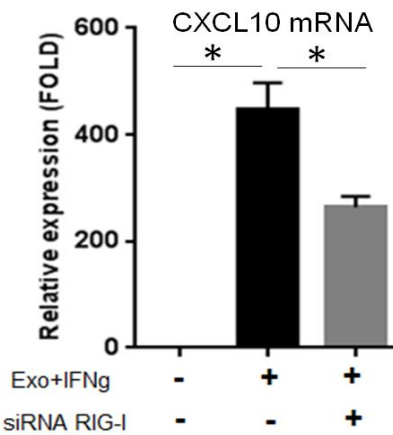


図5 .RNA干渉によるRIG-Iの発現抑制は, HTLV-1感染細胞由来エクソソームとIFNで誘導されるRASfのCXCL10 mRNAの発現を抑制する .

研究総括: 臨床的解析では, HTLV-1陽性RAは陰性RAに比べ炎症状態が強く, 血清IL-6濃度が高値であった . 基礎的検討ではHTLV-1感染細胞がRA滑膜細胞を活性化することが示唆され, 特にHTLV-1感染細胞株由来エクソソームがRASfの活性化を誘導する要因である

ことが見出された。エクソソームはウイルス感染細胞やガン細胞など様々な細胞から分泌されるナノ粒子(直径20~100nm)であり,その生物学的役割は多岐にわたる。RAにおけるエクソソームの生物学的意義については国内外を含め報告に乏しく,HTLV-1感染細胞由来のエクソソームがRASfを活性化するメカニズムは不明である。さらに本研究ではRASfにおけるエクソソーム認識機構の一つとして,PRRsが重要な役割を担う可能性を見出すことができた。

〔引用文献〕

Umekita K, et al. Treatment with anti-tumor necrosis factor biologic agents in human T lymphotropic virus type 1-positive patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2014;66:788.

Takeuchi T, et al. Inhibition of plasma IL-6 in addition to maintenance of an efficacious trough level of infliximab associated with clinical remission in patients with rheumatoid arthritis: analysis of the RISING Study. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1583.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

梅北邦彦. 治療抵抗性関節リウマチにおける HTLV-1 感染の影響. アレルギーの臨床. 査読有, 37 巻, 2017, 86-91.

〔学会発表〕(計 5 件)

Umekita K, et al. Exosomes derived from HTLV-1 Infected cell Enhances IFN- Induced Expression of CXCL10 in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. 第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会. International Concurrent Workshop ICW-18-1. 2017. (4 月

20-22 日(22 日発表),福岡県福岡市,福岡国際会議場)

Umekita K, et al. Exosome Derived From HTLV-1 Infected Cell Acts As Inflammatory Mediator to Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblast. 第 18 回国際ヒトレトロウイルス HTLV 会議. Poster P-E Clinical Research (HAM/TSP & Inflammatory Condition), P-E-2.

2017. (3 月 7-10 日(7 日発表), 東京都千代田区, ホテルグランドアー ク半蔵門)

梅北邦彦,他. HTLV-1 感染細胞による関節リウマチ滑膜細胞の活性化機構. 第 3 回日本 HTLV-1 学会学術集会.

2016. (8 月 26-28 日(28 日発表), 鹿児島県鹿児島市, 鹿児島県市町村自治会館)

Umekita K et al. Tocilizumab is clinically effective and safe for human T-lymphotropic virus type 1 positive patients with rheumatoid arthritis who are not responsive to anti-TNF treatment. *EULAR* 2015. 2015. (6 月 10 日-13 日, Roma)

Umekita K, et al. IL-6 May Have an Important Role in the Resistance to Anti-TNF Therapies of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) Positive Rheumatoid Arthritis (RA) Patients; HTLV-1 Infected Cells Activate the Inflammatory Responses of RA Synovial Fibroblasts. 2015 ACR/ARHP Annual Meeting. 2015. (November 6-11(8 presentation), Moscone Center, San Francisco)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕なし

6．研究組織

研究代表者

梅北 邦彦（UMEKITA Kunihiro）

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：20506084