

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11691

研究課題名(和文) HTLV-1関連シェーグレン症候群の病態解明に向けた免疫学的検討

研究課題名(英文) Immunological study to elucidate the pathophysiology of HTLV-1-related Sjogren's syndrome

研究代表者

田中 昭彦 (TANAKA, AKIHIKO)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：70615799

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)：唾液、血液など採取の容易な検体での解析を行った。今回、細胞から分泌される直径50-150nmの細胞外小胞の一つであるエクソソームはその内部にマイクロRNA(以下 miRNA)含むことが知られており、そのmiRNAに着目し、能動的に分泌されるエクソソーム内miRNAを検出することで、より精度の高い診断への応用を期待した。結果として、血液、唾液、うがい液からmiRNAを検出することが可能であった。疾患特異的な分子の確定にはいたらなかったが、非侵襲的に採取できる唾液やうがい液検体がSS等の口腔内疾患の検査法として有用である可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのシェーグレン症候群に関する検査法には侵襲的な検査が多く、かついくつかの検査を組み合わせることで診断を行っていた。本研究が実用化にいたれば侵襲のない方法で採取可能な唾液やうがい液を用いて診断を行い、これまで困難であった経過観察のツールとして応用可能な、ひいては治療効果の判定にも用いられる検査法の確立する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Analysis was performed on samples that were easy to collect, such as saliva and blood. This time, it is known that exosome, which is one of extracellular vesicles with a diameter of 50-150 nm secreted from cells, contains microRNA (hereinafter referred to as miRNA) in its interior. By detecting the miRNA in exosomes, it is expected to be applied to more accurate diagnosis. As a result, it was possible to detect miRNA from blood, saliva and mouthwash. Although it has not been possible to determine the disease-specific molecule, it has been shown that saliva and gargle samples that can be collected non-invasively may be useful as a test method for oral diseases such as SS.

研究分野：口腔科学

キーワード：シェーグレン症候群 検査 唾液 エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群 (SS) は唾液腺や涙腺などの外分泌腺が特異的に障害を受ける臓器特異的自己免疫疾患であり、ドライマウスやドライアイを主症状とする。導管上皮へのリンパ球浸潤を特徴とし、病態進展とともに高グロブリン血症や悪性リンパ腫などの腺外症状が出現することがあるため、リンパ増殖性病変とも称されるが、病因・病態についてはまだまだ不明な点が多い疾患である。

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-1) は成人 T 細胞白血病 (ATL) や HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の原因ウイルスである。HTLV-1 ウィルスは全世界において 1000~2000 人がキャリアーと推定されているが、日本では特に九州地方 (特に北部九州) が高浸淫地域である。HAM 患者はしばしば多関節症や間質性肺炎を合併し、HAM 患者の約 6 割に SS を合併するという報告もある (Ann Rheum Dis. 1997)。抗 HTLV-1 抗体陽性 SS 患者 (HTLV-1(+) SS) は腺外症状が多く、HAM に合併する SS は乾燥症状が軽度であるという特徴を持つという報告があり、さらに、唾液腺造影での所見の有無 (Rubin & Holt 分類) と口唇腺生検組織でのリンパ球浸潤の程度 (Greenspan 分類) で SS を評価すると、HTLV-1(+) SS では唾液腺構造破壊をきたしにくいことが報告されている (Clin ExLp Rheumatol. 2008.)。

2. 研究の目的

SS は涙腺や唾液腺をはじめとする外分泌腺のリンパ球浸潤を主体とする慢性的な炎症性疾患であるが、その発症や病態進展については不明な点が多い。最近の研究では、その要因の一つとしてウイルスの関与が示唆されているが、そのなかでも HTLV-1 は、T 細胞の細胞増殖や炎症性サイトカイン産生を促進し、SS をはじめとする自己免疫疾患を惹起することが報告されている。SS の唾液腺組織にはしばしばリンパ濾胞が形成され、この部位で SS の免疫反応が惹起されると考えられているが、HTLV-1(+) SS (特に HAM の合併例) では胚中心 (GC) 形成をほとんど認めないことも明らかとなっている (J Rheumatol. 2007.)。このように、HTLV-1(+) SS と HTLV-1(-) SS の臨床像が明らかに違うことから、免疫学的な見地からも、病態形成のメカニズムが異なることが推察される。

過去の研究でも、HTLV-1(+) SS では HTLV-1 に感染した T 細胞が導管周囲に集積しており (Arthritis Rheum. 1998)、HTLV-1(+) SS の疾患特異的 TCR V 遺伝子 (V₇) の発現が亢進していることを報告されている (J Immunol. 2000)。さらに、ATL のほとんどの症例 (>90%) で白血病細胞はケモカイン受容体 CCR4 を強く発現していることが報告され (J. Immunol. 2008)、新規抗体薬も開発されている。我々はこれまで HTLV-1(-) SS の唾液腺に浸潤する Th サブセットに注目し、唾液腺で発現されるサイトカインと Th 細胞の選択的遊走に関するケモカイン、ケモカインレセプター発現のパターンから、SS の唾液腺病変の発症と病態維持には Th1 と Th17 が重要であり、病態進展には Th2 と Tfh 細胞が重要であることを見出した (J Autoimmun. 2013)。

以上の研究成果から、HTLV-1(-) SS は特定の Th サブセットが病変局所において、その病態の発症から進展まで経時的・異時的に関与しており、一方で HTLV-1(+) SS はこのプロセスとは異なった病態発症のプロセスを介している可能性が考えられる。本研究は、SS の特に HTLV-1(+) 患者の病態について特異的な因子を解明すること、さらには **新規分子を利用した新たな検査法の確立を目指す**。

3. 研究の方法

(1) HTLV-1(+) における更新小唾液腺のケモカイン・ケモカインレセプターの発現と局在の確認

(2) SS の病態発症に関与する分子の検索 (RNA マイクロアレイ法) にて行う予定であったが、組織生検は侵襲があることから経過観察に適している検査とはいえない。また、血液検査は組織検査と比べると侵襲は低いものの特異的な診断精度が低く実用化には至っていない。そこで今回われわれは SS で障害される代表的な組織である唾液腺で産生される唾液をサンプルとして解析を行うこととした。なかでも、唾液に含まれる分子 (ナノ粒子) 中に内包されている情報伝達物質による細胞間コミュニケーションや免疫調節機構が疾患の発症や制御に関連していることに着目し、唾液検体から直径 50-150nm の細胞外小胞の 1 つであるエクソソームの解析を行うこととした。エクソソームはその内部にマイクロ RNA を含んでおり、能動的に分泌されるエクソソーム内 miRNA を解析することで精度の高い病態解析に繋がることを期待できる。

(3) サンプル採取：安静時唾液、うがい液、血液を SS 患者、健常者からそれぞれ採取した。

(4) これまでに SS の病態解析にエクソソーム由来の分子を用いて研究した報告はなく、かつ、うがい液から抽出した報告もないためまずは基礎技術の確立を目指し以下の通りに研究を行った。

唾液、うがい液、血清サンプルよりエクソソームペレットの作成および定量解析 (エクソソームの定量解析はナノトラッキング法で行った。)

エクソソーム由来 miRNA の抽出
 エクソソーム由来 miRNA の PCR での発現確認。

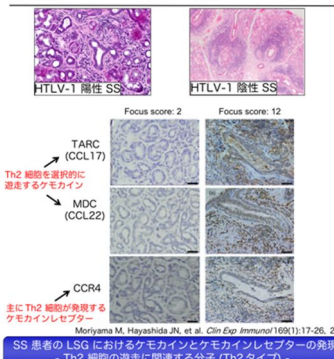
(5) マイクロアレイによりバイオマーカーとなりうる候補 miRNA を選出し、RT-PCR を行いバリデーションを行う。

(6) SS の新しいバイオマーカーの検討

4. 研究成果

| 臨床所見の比較 | | |
|---------------------------|---------------------|--------------------|
| | HTLV-1 陰性SS (n=135) | HTLV-1 陽性SS (n=20) |
| 年齢(歳) | 56.0 ± 18.5 | 58.9 ± 12.1 |
| 性別(男:女) | 1:13.3 | 0:20 |
| 唾液分泌量検査(mi) | 10.92 ± 9.33 | 8.94 ± 7.21 |
| 唾液腺造影検査 (Rubin & Holt 分類) | | |
| stage I (%) | 58 | 55 |
| stage II (%) | 24 | 45 |
| stage III (%) | 13 | 5 |
| stage IV (%) | 5 | 0 |

| 口唇腺組織での比較 | | |
|----------------------|---------------------|--------------------|
| | HTLV-1 陰性SS (n=135) | HTLV-1 陽性SS (n=20) |
| リンパ球の浸潤程度 (石川・小守 分類) | | |
| ± (%) | 0 | 5 |
| + | 60 | 55 |
| 2+ | 25 | 40 |
| 3+ | 15 | 0 |
| 胚中心形成 (%) | 21.3 | 0 |



HTLV-1(+) SS は腺外症状が多く、HAM に合併する SS は HTLV-1(-) SS と比べ乾燥症状が軽度であるという特徴を持つという報告があるが、今回の症例では唾液腺造影検査所見 (Rubin & Holt 分類) では有意差は認めなかった。しかし、口唇腺生検組織でのリンパ球浸潤の程度 (Greenspan 分類) で SS を評価すると、HTLV-1(+) SS では唾液腺構造破壊をきたしにくいことが分かる。また、胚中心の形成率を見ても HTLV-1(+) SS では 0% であった。このことから病態形成において両者では明らかに異なっている可能性が示唆される。これまでの研究でも、HTLV-1(+) SS では HTLV-1 に感染した T 細胞が導管周囲に集積しさらに、成人 T 細胞白血病 (ATL) のほとんどの症例 (>90%) で白血病細胞はケモカイン受容体 CCR4 を強く発現していることが報告され (J. Immunol. 2008)、新規抗体薬も開発されている。我々はこれまで HTLV-1(-) SS の唾液腺に浸潤する Th サブセットに注目し、唾液腺で発現されるサイトカインと Th 細胞の選択的遊走に關与するケモカイン、ケモカインレセプター発現のパターンから、SS の唾液腺病変の発症と病態維持には Th1 と Th17 が重要であり、病態進展には Th2 と Tfh 細胞が重要であることを見出した (J Autoimmun. 2013)

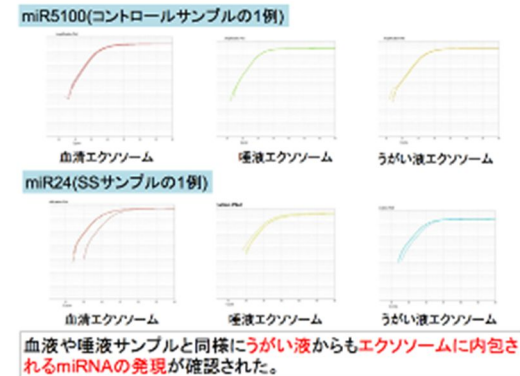
これまで口唇腺組織を用いて検討を行っていたが、唾液をサンプルとして検討を行うことに着目した。前述の流れで検討を行った。血清、唾液、うがい液それぞれのサンプルからエクソソームの抽出を確認。それぞれのサンプルから抽出したエクソソーム由来の miRNA を抽出し、それぞれをマイクロアレイにかけ疾患特異的な因子の抽出を行う。

今回は特異的な因子を特定するまでには至らなかったが、唾液という繰り返し、安全に採取できる唾液という検体を用いて、SS の疾患特異的な分子を検出する可能性を見出した。本研究が実用化に至れば侵襲的な検査を行わずとも SS の病態を経時的にモニタリングするツールとなり得ると考える。

②エクソソーム由来miRNAの分光光度計による純度測定



③エクソソーム由来miRNAを標的としたPCRベースの発現確認



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Ishiguro N, Moriyama M, Furusho, Furukawa S, Shibata T, Murakami Y, Chinju A, Haque A. S. M. Rafiu, Gion Y, Ohta M, Maehara T, Tanaka A, Yamauchi M, Sakamoto M, Mochizuki K, Ono Y, Hayashida J N, Sato Y, Kiyoshima T, Yamamoto H, Miyake K, Nakamura S. | 4. 巻 72 |
| 2. 論文標題 Activated M2 Macrophages Contribute to the Pathogenesis of IgG4 Related Disease via Toll like Receptor 7/Interleukin 33 Signaling | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology | 6. 最初と最後の頁 166 ~ 178 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.41052 | 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 Haque R, Moriyama M, Kubota K, Ishiguro N, Sakamoto M, Chinju A, Mochizuki K, Sakamoto T, Kaneko N, Munemura R, Maehara T, Tanaka A, Hayashida JN, Kawano S, Kiyoshima T, Nakamura S | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 CD206+ tumor-associated macrophages promote proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma via EGF production. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 14611 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51149-1. | 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 - |

〔学会発表〕 計0件

〔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 | 森山 雅文 (MORIYAMA MASAFUMI) (20452774) | 九州大学・歯学研究院・助教 (17102) | |
| 研究分担者 | 安永 純一郎 (YASUNAGA JUNICHIROU) (40362404) | 京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・講師 (14301) | |

