

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09979

研究課題名(和文) エクソソーム誘導性シグナルを介すHTLV-1による関節リウマチ病態修飾機構の解明

研究課題名(英文) The role of exosome-derived from human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infected cells in the pathogenesis of HTLV-1-positive rheumatoid arthritis.

研究代表者

梅北 邦彦 (Umekita, Kunihiko)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：20506084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、HTLV-1感染細胞由来エクソソームによる関節リウマチ滑膜細胞(RASF)の活性化機構について基礎的研究を進めた。HTLV-1感染細胞由来エクソソームとTNF やIFN で共刺激したRASFでは、IL-6、CXCL10やRANTESの遺伝子発現が亢進した。また、エクソソームに含有された外来核酸を認識する細胞内受容体として、RIG-Iとその補助分子に注目し発現抑制実験を行った結果、RIG-IとのダブルノックダウンによってIFN +エクソソームで発現が誘導されるサイトカインの減少が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HTLV-1陽性関節リウマチは炎症反応が高く、TNF阻害療法など既存の抗リウマチ治療に治療抵抗性を示すことが報告されている。その詳細な炎症病態は不明な点が多い。本研究では、HTLV-1感染細胞由来エクソソームが炎症性メディエータとして関節リウマチ滑膜細胞を刺激し、炎症性サイトカインの産生を促進することが明らかとなった。更に、そのメカニズムにおいてRASF細胞質に存在するパターン認識受容体RIG-Iとその補助分子が重要であることが示された。HTLV-1陽性関節リウマチの炎症病態の制御に、これら分子を標的とした新規治療について今後の研究が期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the role of exosomes-derived from HTLV-1 infected cells in the inflammatory responses of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts (RASFs). The expression of cytokines mRNA in RASFs was increased by exosomes and inflammatory cytokines such as IFN and TNF. The silencing of both RIG-I and its cooperative binding protein using siRNA decreased the expression of cytokines mRNA in RASFs which were stimulated by exosomes and IFN. These results suggested that exosomes-derived from HTLV-1 infected cells may act as inflammatory mediator against RASFs. Both RIG-I and its cooperative binding protein may play important role in the exosome-induced signal pathway in RASFs.

研究分野：膠原病リウマチ学

キーワード：エクソソーム ヒトT細胞白血病ウイルス 関節リウマチ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

これまで我々は、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) 感染が関節リウマチ (RA) の病態を修飾し、炎症反応の悪化と TNF 阻害療法に治療抵抗性を示すことを報告した。また、HTLV-1 感染細胞が産生する細胞外小胞エクソソームが RA の病態を悪化させるメディエーターとして機能する可能性を見出しており、本研究ではこの知見をさらに詳細に解析するために、エクソソーム誘導性シグナルを介した HTLV-1 による RA 病態の修飾機構の解明が必要と考えられた。

## 2. 研究の目的

本申請課題では、HTLV-1 感染細胞由来エクソソームによる RA 滑膜細胞 (RASf) の活性化機構について基礎実験を行い、HTLV-1 感染による関節リウマチ病態修飾機構の解明や新たな治療標的分子の探索を発展的に行う。

## 3. 研究の方法

(1) HTLV-1 感染細胞由来エクソソームで誘導される RASf の炎症性サイトカイン・ケモカイン発現の解析。

培養した RASf を HTLV-1 感染細胞由来エクソソーム、TNF および IFN で刺激し、24 時間、48 時間後の培養上清を回収した。エクソソーム刺激および炎症性サイトカインの単独あるいは協刺激を行った RASf の培養上清について、サイトカイン多項目同時測定装置 (MAGPIX) で 40 種類のサイトカインを測定した。発現が認められたサイトカインの産生に重要な転写因子やシグナル経路をシミュレーションし同定を行った。

(2) RASf におけるエクソソーム応答に重要なパターン認識受容体 (PRRs) の発現解析と同定。

RASf におけるエクソソーム応答に重要な PRRs の発現を既報も含めて検討を行った。HTLV-1 感染細胞由来エクソソーム、TNF および IFN で刺激した RASf をイムノブロットサンプルとして回収し、PRRs に対する抗体を用いたウエスタンブロットを行う。解析項目として、Toll 様受容体、RIG-I を検討するが、関節リウマチの病態に関連した PRRs に関する既報も参考にして解析対象となるタンパク質を検討した。

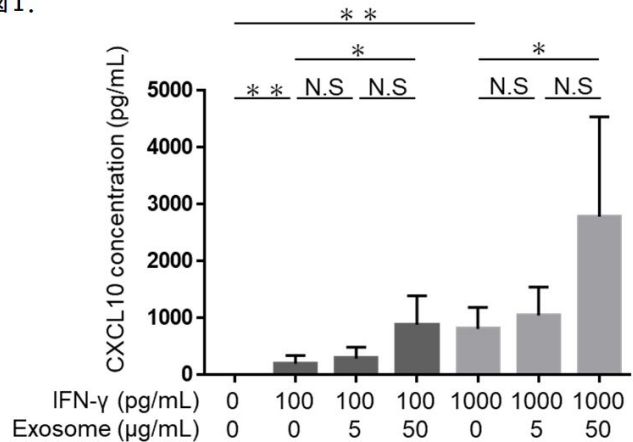
(3) PRRs を介した HTLV-1 感染細胞由来エクソソーム応答におけるシグナル伝達機構の解析。

上記の方法 1) および 2) で得られた結果から、PRRs の発現に重要なシグナル伝達機構を解析する。PRRs の補助因子 (PRRs 関連タンパク) も存在する可能性があり、これらの RNA 干渉による発現抑制実験、阻害薬を効果的に利用し、治療標的となるようなシグナル伝達経路および PRRs 関連タンパクの探索を進めた。

#### 4. 研究成果

(1) HTLV-1 感染細胞由来エクソソーム中には RNA や DNA が含有されており、このエクソソームと TNF や IFN で共刺激した RASF では、IL-6、CXCL10 や RANTES の遺伝子発現が、それぞれのサイトカイン単独で刺激した場合よりも亢進した。特に、IFN とエクソソームによる RASF の共刺激のり RASF の CXCL10 の産生が亢進した (図 1)。

図 1.



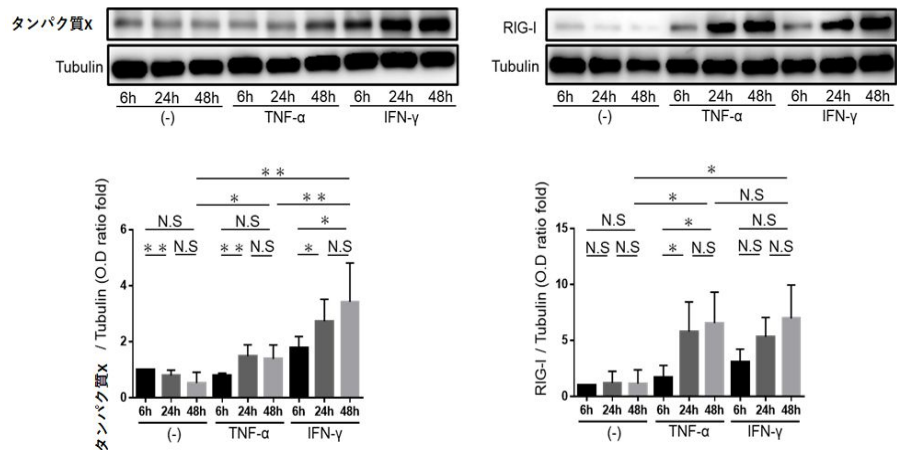
(2) エクソソームが炎症性メディエーターとして機能することに焦点を当て、RASF におけるエクソソーム由来の RNA や DNA を外来核酸として認識する細胞内受容体の役割を検討した。TLR3, 9 および RIG-I について RNA 干渉による発現抑制実験を行った。RIG-I の発現を抑制した RASF においてのみ、IFN + エクソソーム誘導性遺伝子発現が一部抑制されたが、その遺伝子発現抑制は顕著ではなかった。

(3) (2) の結果より、RIG-I の核酸認識機能を補助・促進するタンパク質 X に着目し、RASF における発現を検討した。この RIG-I 機能を補助するタンパク質は TNF ではなく、IFN 刺激によって発現が亢進し、外来核酸の重合化を促進するタンパク質であることを見出した (図 2)。

図 2.

IFN は RIG-I の発現も誘導することから、IFN + エクソソームによる共刺激が、RASF における CXCL10 の発現を誘導するシグナル経路において、RIG-I とその補助タンパクの関与が重要と考えられた。

さらに、このタンパク質の発現は JAK/STAT 経路の活性化で調整されていることも確認された。RIG-I 補助タンパク



質の siRNA による単独発現抑制では、IFN + エクソソームによる CXCL10 産生の減少は認めなかったものの、RIG-I と補助タンパク質のダブルノックダウンによって、IFN + エクソソームで発現が誘導される CXCL10 の減少が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 梅北邦彦
2. 発表標題 HTLV-1感染とリウマチ性疾患.
3. 学会等名 第64回日本臨床検査医学会九州地方会 第30回日本臨床化学会九州支部総会. (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 1.Umekita K, Miyauchi S, Kubo K, Kawano A, Iwao K, Komura M, Matsuda M, Takajo I, Nomura H, Nagatomo Y, Okayama A.
2. 発表標題 HUMAN T CELL LEUKEMIA VIRUS TYPE 1 (HTLV-1) EXACERBATES RHEUMATOID ARTHRITIS; EXOSOMES AND IFN-GAMMA DERIVED FROM HTLV-1 INFECTED CELLS ENHANCE THE INFLAMMATORY RESPONSE OF RHEUMATOID ARTHRITIS SYNOVIAL FIBROBLASTS VIA PATTERN RECOGNITION RECEPTOR, RIG-I.
3. 学会等名 EULAR 2017. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Umekita K, Miyauchi S, Iwao K, Rikitake M, Rikitake Y, Kawada C, Aizawa A, Kariya Y, Matsuda M, Kawaguchi T, Nomura H, Takajo I, Okayama A.
2. 発表標題 Exosomes Derived from T Lymphocytes Enhance Expression of CXCL10 Induced by IFN- in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts Via Pattern Recognition Receptor, RIG-I.
3. 学会等名 2017 ACR/ARHP ANNUAL MEETING. (国際学会)
4. 発表年 2017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	岡山 昭彦 (Okayama Akihiko) (70204047)	宮崎大学・医学部・教授  (17601)	