

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08776

研究課題名(和文) HTLV-1陽性関節リウマチの炎症病態におけるIFNシグネチャーの解明

研究課題名(英文) The role of IFN signature in the pathogenesis of human T-cell leukemia virus type 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：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、炎症反応の悪化と治療抵抗性を齎す要因としてIFN $\gamma$ を介した炎症病態の重症化機構に着目した。本研究では、HTLV-1陽性RAにおける“IFNシグネチャー”について、IFN $\gamma$ 自律産生細胞の同定、免疫抑制療法下におけるHTLV-1感染細胞の動態解析、HTLV-1陽性RAの疾患活動性に関わるHTLV-1感染細胞の解析など基礎および臨床研究を詳細に進め、炎症病態の理解に基づいたHTLV-1陽性RA患者の層別化が可能か検討した。

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(RA)におけるIFNシグネチャーについて解析を進め、難治性病態であるHTLV-1陽性RAの病態について理解を深めた。具体的には、HTLV-1陽性RAの末梢血単核球におけるIFN $\gamma$ 自律産生細胞を同定した。この細胞集団は、HTLV-1感染細胞に対する抗ウイルス作用を有する細胞集団である可能性が高いと考えられたが、HTLV-1陽性RAの炎症病態においても何らかの役割を担うものと推察される。これらの知見から、今後のHTLV-1陽性RA患者のRA治療戦略において、IFNシグネチャーを軸にした抗リウマチ薬の選択について、その有効性や安全性などの検討が進むと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infection is known to modify the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA), such as exacerbation of inflammatory responses and inadequate response to anti-rheumatic therapies. As a factor, we are focusing on the mechanism of exacerbation of inflammatory process mediated by IFN $\gamma$  in HTLV-1 positive RA. In this study, assuming that HTLV-1-positive RA has an "IFN signature", we identified IFN $\gamma$  autonomously producing cells, analyzed the dynamics of HTLV-1-infected cells under immunosuppressive therapy, and investigated the association between disease activity of HTLV-1-positive RA and HTLV-1-infected cells or IFN $\gamma$  autonomously producing cells.

研究分野：膠原病リウマチ性疾患

キーワード：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、炎症反応の悪化と治療抵抗性の一因であることを報告し (1,2), 基礎的検討において HTLV-1 感染細胞が産生するインターフェロン (IFN ) が RA 滑膜細胞の活性化に重要であることを明らかにした。HTLV-1 陽性 RA 患者において、IFN を介する炎症病態の悪化が TNF 阻害療法に治療抵抗性を示す 1 つの要因ではないかと考えている。本研究では、HTLV-1 陽性 RA における炎症病態の“IFN シグネチャー仮説”について基礎研究と臨床研究を詳細に進め、炎症病態の理解に基づく HTLV-1 陽性 RA 患者の層別化が可能か検討する。

## 2. 研究の目的

本申請課題では、HTLV-1 感染によって齎される IFN シグネチャー仮説を検証し、RA 病態の修飾機構について解析する。また、免疫抑制療法中の HTLV-1 陽性 RA 患者における HTLV-1 感染細胞の評価を行い、免疫抑制療法による HTLV-1 感染細胞への影響も解析する。

## 3. 研究の方法

我々が運営する HTLV-1 陽性 RA レジストリに登録され HTLV-1 陽性 RA および陰性 RA を対象に、HTLV-1 関連疾患の有無、RA の疾患活動性、T-SPOT.TB 結果や HTLV-1 プロウイルス量 (PVL) といった臨床情報と患者より提供される血液検体を利用し研究を進めた。

(1)HTLV-1 陽性 RA 患者由来末梢血単核球 (PBMCs) を利用し、IFN -ELISPOT アッセイ系の確立

HTLV-1 陽性 RA 患者由来 PBMCs を利用し、IFN 自律産生細胞の検出系として ELISPOT アッセイの確立を試みた。

(2)フローサイトメトリー法による HTLV-1 感染細胞評価系の確立

既報にあるフローサイトメトリー法による HTLV-1 analysis system ( HAS-Flow ) について (3), HTLV-1 陽性 RA 患者における HTLV-1 感染細胞の解析に資するか、その有用性を検討した。

(3)フローサイトメトリー法による IFN 産生細胞のアッセイ系の確立

HTLV-1 陽性 RA 患者では潜在性結核症のスクリーニング検査である IFN 遊離試験 (IGRA), T-SPOT.TB が判定不能になることが報告されている (4)。その要因として無刺激培養した PBMCs 中に IFN を自律産生する細胞が存在することが推察されている。このため、無刺激、48 時間培養した HTLV-1 陽性および陰性 RA 由来 PBMCs における IFN 自律産生細胞をフローサイトメトリーで評価した。

(4)HTLV-1 陽性 RA の臨床的特徴と HTLV-1 感染細胞ならびに IFN 産生細胞集団に関する検討

HTLV-1 陽性 RA レジストリに登録された HTLV-1 陽性 RA の臨床情報 (HTLV-1 関連疾患の有無、RA の疾患活動性、T-SPOT.TB 結果や HTLV-1PVL) と HTLV-1 感染細胞および IFN 自律産生細胞集団の関連性について解析した。

#### 4. 研究成果

(1) HTLV-1 陽性 RA 患者由来 PBMCs は生細胞率が低く, *ex vivo* で行う ELISPOT での IFN 自律産生細胞を評価することが困難であった. 特に感染細胞数が多い PBMCs では生細胞率が低いことが課題であった. 生細胞率を良好に保ち, リアルタイムに ELISPOT が実施できるための細胞分離, 保存条件を検討し, 今後 同アッセイ系を確立するための実験が必要である.

(2) 既報にある HAS-Flow 解析が, 免疫抑制療法中の HTLV-1 陽性 RA 患者においても HTLV-1 感染細胞の評価に有用な検証した(図1). HTLV-1 陰性および陽性 RA 患者, それぞれ 13 例および 57 例について HAS-Flow 解析を実施した. HTLV-1 感染細胞と既報にある CADM1 陽性 CD4 陽性細胞集団の割合は, HTLV-1 陽性 RA 患者で有意に増加しており, HTLV-1 陰性 RA ではほとんど観察されなかった(図2). また, 同細胞の集団は, HTLV-1 プロウイルス量(PVL)とも相関し, PVL の高い患者で増加しており, 既報と同様の結果であった. したがって, HTLV-1 陽性 RA 患者においても CADM-1 陽性 CD4 陽性細胞集団の割合は感染細胞数の多い患者で増加していることが明らかとなった. 免疫抑制療法下にあっても, CADM-1 陽性 CD4 陽性細胞集団は PVL と連動した集団であることが示唆された.

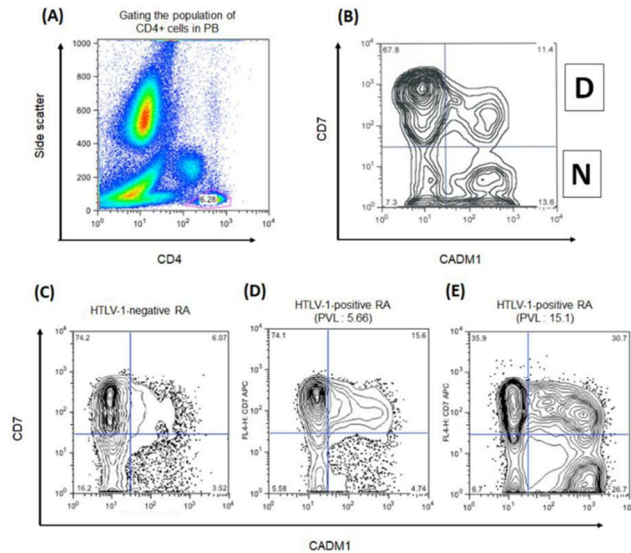


図1. HTLV-1 analysis system (HAS-Flow)の代表例 (A) HTLV-1陽性関節リウマチ (RA) の末梢血におけるCD4ゲートイング. (B) CD4陽性細胞のCADM-1およびCD7による展開. D領域はCADM-1陽性CD7陽性のHTLV-1感染細胞. N領域はCADM-1陽性CD7陰性のHTLV-1感染細胞であり, ATL (前駆) 細胞が多い集団と考えられている. D+NはHTLV-1感染細胞集団. (C) HTLV-1陰性RA患者. (D) プロウイルス量 (PVL) 5.6コピー/100PBMCsのHTLV-1陽性RA患者. (E) プロウイルス量 (PVL) 15.1コピー/100PBMCsのHTLV-1陽性RA患者.

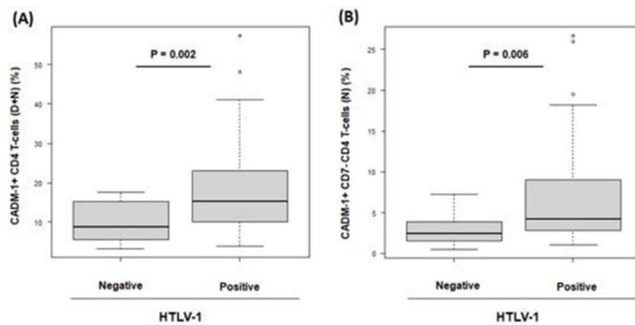


図2. (A) HTLV-1陰性関節リウマチ (RA) およびHTLV-1陽性RA患者末梢血におけるHTLV-1感染細胞トータル (D+N) の割合. (B) HTLV-1陰性RAおよびHTLV-1陽性RA患者末梢血におけるCD7陰性HTLV-1感染細胞 (N) の割合.

(3) 結果(1)のように, ELISPOT 系による IFN 自律産生細胞の検出には更なる条件検討が必要であり, 同アッセイ系の研究期間中の確立は困難と判断した. このため, フローサイトメトリー法による PBMCs 中の IFN 自律産生細胞の評価系の確立を進めた. 潜在性結核症のスクリーニング検査である IFN 遊離試験 (IGRA) の内, T-SPOT.TB において陰性コントロールスポット数の増加のために“判定不能”となった HTLV-1 陽性膠原病リウマチ性疾患 (CTD) 患者, および T-SPOT.TB において陰性コントロールスポット数が検出されずに“判定可能”であった HTLV-1 陽性 CTD 患者の PBMCs を分離培養し, 48 時間後の IFN 自律産生細胞について CD3 陽性 T 細胞のフローサイトメトリー解析を実施した(図3). T-SPOT.TB 判定不能患者の PBMCs では, CD8 陽性 T 細胞が IFN を自律産生 (CD8-IFN + 細胞) していることが明らかとなった.

また、少数の集団ではあったがCD4陽性T細胞においてもIFN自律産生細胞が観察された。T-SPOT.TB判定可能患者の場合には、これらIFN自律産生細胞は検出されなかった。次に、HTLV-1陽性RA約20症例について同様に解析し、T-SPOT.TB判定不能症例ではCD8-IFN $\gamma$ 細胞が増加していることが明らかとなった。このCD8-IFN

・T-SPOT判定不能症例(キャリア, 強皮症)      ・T-SPOT判定可能症例(キャリア, 強皮症)

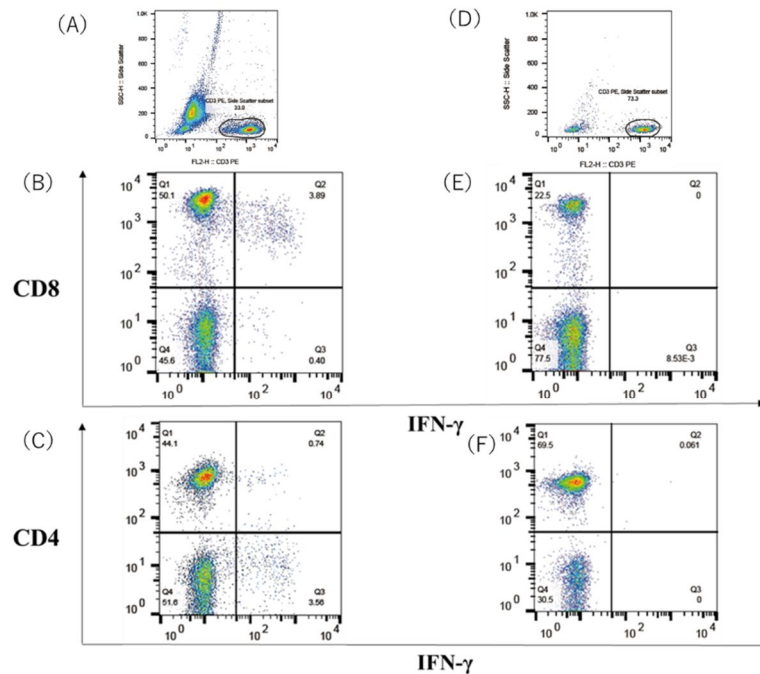


図3. フローサイトメトリーによるIFN $\gamma$ 自律産生細胞の検出。潜在性結核症のスクリーニング検査であるIGRA、T-SPOT.TBにおいて陰性コントロールにIFN $\gamma$ 産生細胞の増加を観察でき、T-SPOT.TB判定不能となった症例および判定可能症例より末梢血単核球(PBMCs)を分離培養しIFN $\gamma$ 自律産生細胞を評価した。(A-C) T-SPOT.TB判定不能のHTLV-1陽性膠原病リウマチ性疾患(CTD)の末梢血におけるCD3ゲーティング(A)、CD8-IFN $\gamma$ (B)、CD4-IFN $\gamma$ (C)陽性細胞の検出。(D-F) T-SPOT.TB判定可能のHTLV-1陽性CTDの末梢血におけるCD3ゲーティング(D)、CD8-IFN $\gamma$ (E)、CD4-IFN $\gamma$ (F)陽性細胞の検出。

+細胞は、HTLV-1PVLが多い患者でより多く観察できた。一方で、HTLV-1感染細胞であるCADM1陽性CD4陽性細胞集団とCD8-IFN $\gamma$ 細胞集団の割合を比較したが、この細胞集団の間には有意な関連は見られなかった。CD8-IFN $\gamma$ 細胞はHTLV-1プロウイルス量が多い患者で増加していることから、HTLV-1感染細胞に対して抗ウイルス効果を有する細胞集団であることが推察された。また、このようなCD8-IFN $\gamma$ 細胞の影響により、HTLV-1陽性RA由来のPBMCsの培養後の生細胞率が低い可能性が考えられた。RAの炎症関節局所において、HTLV-1感染細胞に反応するCD8-IFN $\gamma$ 細胞がどのような役割を担うのか不明な点が多く、今後の検討課題である。

(4) HTLV-1陽性RAの臨床的特徴とHTLV-1感染細胞ならびにIFN $\gamma$ 産生細胞集団に関する検討を行った。HTLV-1感染細胞集団の割合は、HTLV-1関連疾患を合併したHTLV-1陽性RA患者で増加していた。また、IFN $\gamma$ 自律産生細胞についても、HTLV-1関連疾患を合併したHTLV-1陽性RA患者で増加していた。今回の検討では、RAの活動性とHTLV-1感染細胞集団およびIFN $\gamma$ 自律産生細胞の増加との間には関係性を見出すことができなかった。

#### <引用文献>

1. Suzuki T, Fukui S, Umekita K, Miyamoto J, Umeda M, Nishino A, Okada A, Koga T, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Fujikawa K, Aramaki T, Mizokami A, Matsuoka N, Ueki Y, Eguchi K, Sato S, Hidaka T, Origuchi T, Okayama A, Kawakami A, Nakamura H. Brief Report: Attenuated Effectiveness of Tumor Necrosis Factor Inhibitors for Anti-Human T Lymphotropic Virus Type I Antibody-Positive Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2018 Jul;70(7):1014-1021. doi: 10.1002/art.40461.
2. Umekita K, Hidaka T, Miyauchi S, Ueno S, Kubo K, Takajo I, Hashiba Y, Kai Y, Nagatomo Y,

Okayama A. Treatment with anti-tumor necrosis factor biologic agents in human T lymphotropic virus type I-positive patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2014 May;66(5):788-92. doi: 10.1002/acr.22205.

3 . Kobayashi, S.; Watanabe, E.; Ishigaki, T.; Ohno, N.; Yuji, K.; Nakano, K.; Yamochi, T.; Watanabe, N.; Tojo, A.; Watanabe, T.; et al. Advanced human T-cell leukemia virus type 1 carriers and early-stage indolent adult T-cell leukemia-lymphoma are indistinguishable based on CADM1 positivity in flow cytometry. *Cancer Sci*. 2015, 106, 598–603.

4 . Umekita K, Hashiba Y, Iwao K, Iwao C, Kimura M, Kariya Y, Kubo K, Miyauchi S, Kudou R, Rikitake Y, Takajo K, Kawaguchi T, Matsuda M, Takajo I, Inoue E, Hidaka T, Okayama A. Human T-cell leukemia virus type 1 may invalidate T-SPOT.TB assay results in rheumatoid arthritis patients: A retrospective case-control observational study. *PLoS One*. 2020 May 27;15(5):e0233159. doi: 10.1371/journal.pone.0233159.

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 2件）

1. 著者名 Umekita K, Hashikura Y, Takaki A, Kimura M, Kawano K, Iwao C, Miyauchi S, Kawaguchi T, Matsuda M, Hashiba Y, Hidaka T.	4. 巻 8
2. 論文標題 HAS-Flow May Be an Adequate Method for Evaluating Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infected Cells in Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Positive Rheumatoid Arthritis Patients Receiving Antirheumatic Therapies: A Retrospective Cross-Sectional Observation Study.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Viruses.	6. 最初と最後の頁 468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Umekita K.	4. 巻 1
2. 論文標題 Effect of HTLV-1 Infection on the Clinical Course of Patients with Rheumatoid Arthritis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses.	6. 最初と最後の頁 1460
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梅北邦彦, 高木 寛, 橋倉悠輝
2. 発表標題 ヒトT細胞白血病ウイルス1型（HTLV-1）陽性関節リウマチにおけるHTLV-1感染細胞のフローサイトメトリーによる評価方法の検討
3. 学会等名 第 68回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村賢俊, 工藤理沙, 岩尾千紘, 梅北邦彦, 他.
2. 発表標題 ヒトT細胞白血病ウイルス1型（HTLV-1）陽性関節リウマチ患者におけるインターフェロン 遊離試験（IGRA）に関する検討.
3. 学会等名 日本臨床リウマチ学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村賢俊, 工藤理沙, 力武雄幹, 梅北邦彦, 他.
2. 発表標題 HTLV-1陽性膠原病患者における潜在性結核感染症検査:インターフェロン 遊離試験(IGRA)に関する検討.
3. 学会等名 日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2022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	佐藤 賢文  (SATO YORIFUMI)  (70402807)	熊本大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・教授    (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------