

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04986

研究課題名(和文) 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるEBウイルス関連分子を標的とした診断治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel diagnosis and therapeutic procedures for nasal NK/T-cell lymphoma consists of targeting EBV-associated molecules

研究代表者

原 渕 保明 (Harabuchi, Yasuaki)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：80208686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株をNOGマウスに皮下移植したXenograftモデルを樹立した。形成された腫瘍はEBERが強陽性であった。さらに、鼻性NK/T細胞リンパ腫患者組織と血清中でそれぞれPD-L1とsoluble PD-L1の高発現、高値を認め予後との相関が確認された。鼻性NK/T細胞リンパ腫患者における血清中のEBウイルスマイクロRNA(EBV-miRNA)発現を解析し、バイオマーカーとしての有用性を検討したところ、miR-BART2-5pが鼻性NK/T細胞リンパ腫の診断、予後予測において有用なバイオマーカーになりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We generated murine xenograft models inoculated with an natural killer/T-cell lymphoma cell line and revealed that sPD-L1 could be a prognostic predictor for NNKTL and open up the possibility of immunotherapy of this lymphoma using PD-1/ PD-L1 axis inhibitors. We revealed that circulating EBV miRNAs, particularly miR BART2 5p, may serve as potential diagnostic and prognostic biomarkers in patients with nasal natural killer/T-cell lymphoma.

研究分野：悪性腫瘍

キーワード：頭頸部外科学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 鼻性NK/T細胞リンパ腫は、鼻腔や咽頭に初発し、顔面正中部に沿って急速に進行する壊死性肉芽腫性病変を主体とするTまたはNK細胞由来の悪性リンパ腫である。病理組織上ほとんどが壊死組織や炎症細胞浸潤の所見で腫瘍細胞が確認しにくいことから診断は困難であり、既存の治療法に抵抗性を示すため予後が極めて不良である。これまで研究代表者の原渕らは、病態が不明であった本疾患の腫瘍細胞にEBウイルス(EBV)が感染していることを報告し(Harabuchi Y, et al. Lancet 335, 1990)、本疾患とEBウイルスとの関連性を世界に先駆けて報告した。その後、本研究グループでは鼻性NK/T細胞リンパ腫株(SNK6)に高発現しているIL-9、ケモカインIP-10そして可溶性ICAM-1がオートクライン的にその細胞増殖または組織浸潤に関わっていること(Nagato T, et al. Clin Cancer Res 11, 2005; Moriai S, et al. Clin Cancer Res 15, 2010; Takahara M, et al. Exp Hematol 41, 2013)、EBウイルス膜蛋白(LMP1)がCD25の発現を亢進させIL-2の感受性を高めていること(Takahara M, et al. Int J Cancer 119, 2006)、本腫瘍株を単球と共培養すると、単球の膜結合型IL15を介して細胞増殖とLMP1発現が亢進すること(Ishii H, et al. Int J Cancer, 2011)、LMP1やLMP2Aの塩基配列がHLA-A2拘束性CTLエピトープ部において遺伝子変異を起こしていること(Nagamine M, et al. Virus Genes 34, 2007; Nagamine M, et al. Intervirology 50, 2007)、患者血清においてEBウイルス-DNA量が非常に鋭敏に病勢を反映し、その再発や予後を予測する有用な腫瘍マーカーとなり得ること(Ishii H, et al. J Med Virol 79, 2007)、LMP1エピトープを認識するT細胞クローンが本腫瘍株に対し細胞傷害活性を有すること(Kobayashi H, et al. Cancer Res 68, 2008)を報告し、本疾患の発症にEBウイルスが深く関連していることを証明してきた。最近では、本腫瘍株にCD70が高発現しており、可溶性CD27との結合を介し腫瘍増殖に関与すること(Yoshino K, et al. Br J Haematol 160, 2013)、MicroRNA-15aの発現低下がMYBおよびCyclin D1の発現亢進を介し腫瘍増殖に関わり、本疾患患者予後と相関すること(Komabayashi Y, et al. Am J Hematol 89, 2014)をそれぞれ見出してきた。本疾患は極東アジアに好発する地域性があるため、本邦における研究は極めて有利であり、加えて本研究グループは症例数を数多く有している。さらに、本疾患に対するEBウイルスを標的とした治療に関する研究は本研究グループの報告を除いて皆無に等しい。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は、これまでの研究を発展させ、EBウイルスがどのように本リンパ腫の腫瘍形成、増殖に関与するのかを多面的に解析し、

さらに、本リンパ腫のマウスモデルを樹立し、臨床応用を目指したEBウイルス標的治療の有効性を解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 分子標的治療の候補遺伝子・蛋白の機能解析

① 候補遺伝子、蛋白の機能解析：これまでの網羅的解析にて候補となったメタロエレスタゼ(MMP)12、種々のケモカイン(TARC、MDC、IL-8、MCP-1)について細胞株を用いてその機能を明らかにする。

② ウイルス・腫瘍増殖分子のバイオマーカーとしての有用性の検討

これまでの網羅的解析にて候補となった分子や可溶性因子、血清中EBウイルスmicroRNAの発現を解析し、バイオマーカーとしての有用性を検討する。

(2) 細胞株を用いた候補遺伝子・蛋白の拮抗薬やアンチセンスの有用性の検討

① siRNAを用いた細胞増殖の抑制：

これまでの網羅的解析にて候補となった分子(IL9, IP10, ケモカイン, microRNAなど)に対するsiRNAや核酸分子を用いて細胞増殖の可能性について検討する。

② Cyclin dependent kinases (CDKs)およびSurvivinの発現解析と阻害薬の有用性の解析：

本疾患におけるこれらの高発現が報告されており、その検証と阻害薬の有用性について腫瘍細胞株を用いて検討する。

③ 抗CD70抗体の有用性の検討：

本腫瘍細胞株にCD70が高発現しており、抗CD70抗体による補体依存性細胞傷害活性を認めることを報告してきた。これを発展させ抗CD70抗体治療の有用性を検討する。

(3) 鼻性NK/T細胞リンパ腫モデルマウスの樹立と分子標的治療の有用性の検討

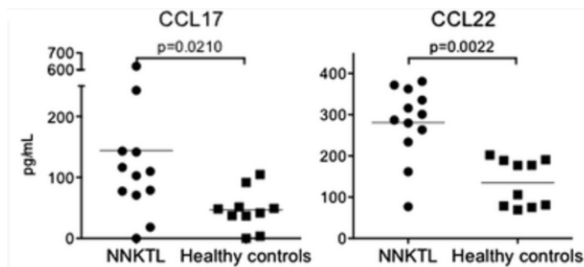
IL-2遺伝子を導入した本腫瘍株(SNK6)およびSNT8)をヒューマン化したNOD/SCIDもしくはNOGマウスに摂取して鼻性NK/T細胞リンパ腫モデルマウスを樹立する。樹立に成功後は、候補分子やEBウイルス遺伝子に対する標的治療やEBウイルス特異的免疫治療を行い、予後、腫瘍縮小効果の有無、全身転移の有無および副反応の有無について対照群と比較検討する。

## 4. 研究成果

(1) 分子標的治療の候補遺伝子・蛋白の機能解析

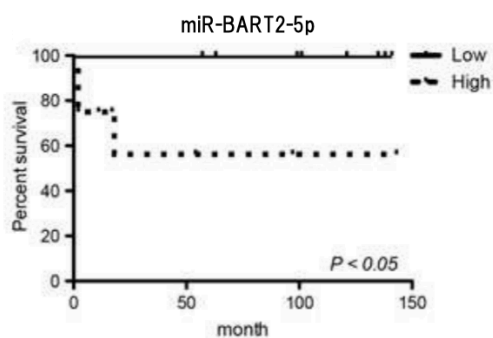
① 候補遺伝子、蛋白の機能解析：ケモカインアレイ解析により鼻性NK/T細胞リンパ腫でCCL17(TARC)とCCL22(MDC)の発現が上昇しており、レセプターであるCCR4の発現も認められた。さらに抗CCR4抗体が鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株に対して抗体依存性細胞傷害

(ADCC)活性を示した。抗CCR4ヒト化単クローナル抗体はモガムリズマブ (Mogamulizumab) としてCCR4陽性の再発性、難治性成人T細胞白血病(ATL)、末梢性T細胞リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫の治療薬として既に使用されている。CCR4を標的とした、もしくはCCL17、CCL22/CCR4経路を遮断する戦略が鼻性NK/T細胞リンパ腫に対する新たな治療となる可能性が示唆された。



② ウイルス・腫瘍増殖分子のバイオマーカーとしての有用性の検討：

臨床検体を用いた血清中EBウイルスmicroRNAの網羅的解析PCRアレイ解析の結果、健常コントロールと比較し鼻性NK/T細胞リンパ腫症例の血清において幅広い種類のEBウイルスmicroRNAが高発現していることが確認された。特に高発現を認めたmiR-BART2-5p、miR-BART7-3p、miR-BART13-3p、miR-BART1-5pについて、症例を増やし定量的RT-PCR解析を行った結果、健常コントロールと比較し鼻性NK/T細胞リンパ腫血清においていずれのEBウイルスmicroRNAも有意に高発現していることが確認された。鼻性NK/T細胞リンパ腫症例における治療前後の血清中EBウイルスmicroRNA発現の変化を比較検討した結果、miR-BART2-5p、miR-BART7-3p、miR-BART13-3p、miR-BART1-5pともに治療前と比較し治療後において有意に低下することが示された。また、Ann Arbor臨床病期I期 症例とII-IV期症例の血清中EBウイルス microRNA発現を比較検討した結果、II-IV期症例においてmiR-BART2-5pおよび miR-BART7-3pの発現が有意に高いことが確認された。さらに、血清中EBウイルスmicroRNAの発現レベルを中央値で2群に分けて患者予後との関係をKaplan-Meier法で検討した結果、血清中miR-BART2-5p高発現群において有意に予後が不良であることが示された。以上より、血清中EBウイルス

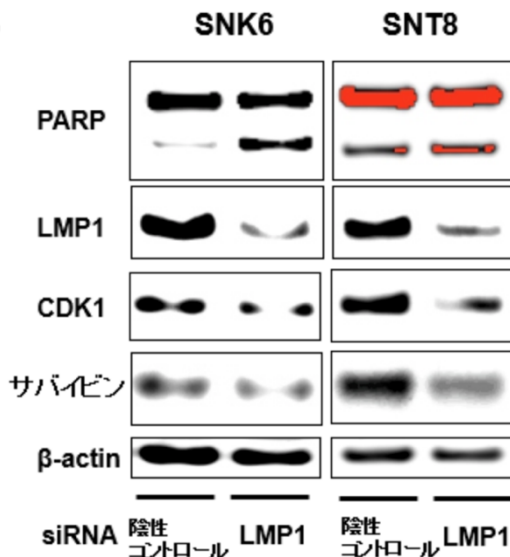


microRNA、特にmiR-BART2-5pは、鼻性NK/T細胞リンパ腫の診断および予後予測において有用なバイオマーカーになりうる可能性が示唆された。

(2) 細胞株を用いた候補遺伝子・蛋白の拮抗薬やアンチセンスの有用性の検討

① siRNAを用いた細胞増殖の抑制：

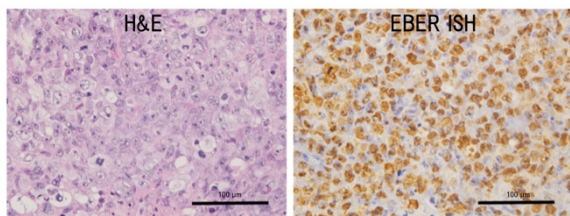
IAPファミリーのうちサバイピンは、EBウイルス関連悪性腫瘍である上咽頭癌において、EBウイルス潜伏感染遺伝子のLMP1がその発現に関与することが報告されている。そのため本誌感でもLMP1とサバイピンの発現に関連があるか、LMP1をsiRNAでノックダウンしたSNK-6およびSNT-8細胞株を用いて、定量リアルタイムPCRおよびウエスタンブロット法にてサバイピンの発現を確認した。その結果LMP1発現低下に伴い、サバイピンの発現低下が認められた。また同時にPARPの切断を認め、アポトーシスを起こしていることを確認した。



③ 抗CD70抗体の有用性の検討：

cDNAアレイ解析の結果、CD70mRNA発現が鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株で特異的に亢進していた。さらに、CD70の発現をRT-PCRとフローサイトメトリーにて確認した。一方CD27(CD70リガンド)の発現は認められなかった。CD27存在下に細胞株を培養すると細胞増殖が亢進した。患者組織の33%にCD70の発現を認め、患者血清の可溶性CD27値は有意に高値を示した。抗CD70抗体を用いた補体依存性細胞傷害活性の測定では鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株の減少を認めた。以上より、鼻性NK/T細胞リンパ腫では、CD70が特異的に高発現しており、腫瘍の増殖に関与していることが示唆された。また抗CD70抗体による分子標的治療の可能性が示唆された。

(3) 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫モデルマウスの樹立と分子標的治療の有用性の検討  
 2002年に我が国の実験動物研究所が樹立した NOG マウス (T および B 細胞の欠失、NK 細胞の欠失、樹状細胞の機能低下、マクロファージの機能低下、補体活性の欠失を特徴としてもつ) の側腹部皮下に鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株 SNK-6 を  $2 \times 10^6$  移植し、異種移植モデルの作製に成功した。腫瘍を摘出して組織学的検索を行ったところ、多形性に富んだ大小不同の腫瘍細胞で形成されており、形態学的に鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者組織に一致する所見であった。さらに EBER が強陽性であり、NOG マウスに移植しても EB ウイルス感染が持続していることが確認された。腫瘍のモニタリングが容易であり、治療効果判定が簡便に行えること、腫瘍組織の採取なども簡単に行えることから、初めに皮下移植モデルの作製を試みた。今後は脈管内投与による実験的転移モデルなどの作製を検討し、本疾患の研究、特に薬効評価の研究をすすめる。



<引用文献>

- ① Harabuchi Y, Yamanaka N, Kataura A, et al.: Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma. *Lancet* 335: 128-130, 1990
- ② Nagato T, Kobayashi H, Kishibe K, et al. Expression of interleukin-9 in nasal natural killer/T-cell lymphoma cell lines and patients. *Clin Cancer Res* 11: 8250-8257, 2005
- ③ Moriai S, Takahara M, Harabuchi Y, et al. Production of interferon- $\gamma$  - inducible protein-10 and its role as an autocrine invasion factor in nasal natural killer/T-cell lymphoma cells. *Clin Cancer Res*. 15. 6771-6779, 2010.
- ④ Takahara M, Kis LL, Nagy N, et al. Concomitant increase of LMP1 and CD25 (IL-2R  $\alpha$ ) expression induced by IL-10 in the EBV-positive NK lines SNK6 and KAI3. *Int J Cancer* 119: 2775-2783, 2006
- ⑤ Ishii H, Takahara M, Nagato T, Kishibe K, Kis L, Harabuchi Y, Klein G, Klein E. Monocytes enhance cell proliferation and LMP1 expression of nasal natural killer (NK)/T-cell lymphoma cells by cell contact-dependent interaction through membrane-bound IL-15. *Int J Cancer*. in press, 2011
- ⑥ Nagamine M, Takahara M, Kishibe K, et al. Sequence variations of Epstein-Barr virus LMP1 gene in nasal NK/T-cell lymphoma. *Virus Genes* 34: 47-54, 2007
- ⑦ Nagamine M, Kishibe K, Takahara M, et al. Selected Amino Acid Change Encoding Epstein-Barr Virus-Specific T Cell Epitope of the LMP2A Gene in Japanese Nasal NK/T Cell Lymphoma Patients. *Intervirology* 50: 319-322, 2007
- ⑧ Ishii H, Ogino T, Berger C, et al: Clinical usefulness of serum EBV DNA levels of BamHI W and LMP1 for nasal NK/T-cell lymphoma. *J Med Virol* 79: 562-572, 2007
- ⑨ Kobayashi H, Nagato T, Takahara M, Sato K, Kimura S, Aoki N, Azumi M, Tateno M, Harabuchi Y, Celis E. Induction of EBV-latent membrane protein 1-specific MHC class II-restricted T-cell responses against natural killer lymphoma cells. *Cancer Res*. 68. 901-908, 2008
- ⑩ Kumai T, Nagato T, Kobayashi H, Komabayashi Y, Ueda S, Kishibe K, Ohkuri T, Takahara M, Celis E, Harabuchi Y. CCL17 and CCL22/CCR4 signaling is a strong candidate for novel targeted therapy against nasal natural killer/T-cell lymphoma. *Cancer Immunol Immunother*. In press, 2015.
- ⑪ Yoshino K, Kishibe K, Nagato T, Ueda S, Komabayashi Y, Takahara M, Harabuchi Y. Expression of CD70 in nasal natural killer/T cell lymphoma cell lines and patients; its role for cell proliferation through binding to soluble CD27. *Br J Haematol* 160:331-342, 2013.
- ⑫ Harabuchi Y, Kataura A, Imai K. Circulating intercellular adhesion molecule-1 and its cellular expression in head and neck non-Hodgkin's lymphomas, including lethal midline granuloma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 105: 634-642, 1996
- ⑬ Takahara M, Nagato T, Komabayashi Y, Yoshino K, Ueda S, Kishibe K, Harabuchi Y. Soluble ICAM-1 secretion and its functional role as an autocrine growth

factor in nasal NK/T cell lymphoma cells. *Exp Hematol* 41:711-718, 2013.

⑭ Komabayashi Y, Kishibe K, Nagato T, Ueda S, Takahara M, Harabuchi Y. Downregulation of miR-15a due to LMP1 promotes cell proliferation and predicts poor prognosis in nasal NK/T-cell lymphoma. *Am J Hematol* 89:25-33, 2014.

⑮ Ng SB, Selvarajan V, Huang G, et al. Activated oncogenic pathways and therapeutic targets in extranodal nasal-type NK/T cell lymphoma revealed by gene expression profiling. *J Pathol* 223: 496-510, 2011

⑯ M. Bernasconi, S. Ueda, P. Krukowski, et al. Early gene expression changes by Epstein-Barr virus infection of B-cells indicate CDKs and survivin as therapeutic targets for post-transplant lymphoproliferative diseases, *Int J Cancer* 133:2341-2350, 2013.

#### 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 10 件)

① Programmed death-ligand 1 and its soluble form are highly expressed in nasal natural killer/T-cell lymphoma: a potential rationale for immunotherapy Nagato T, Ohkuri T, Ohara K, Hirata Y, Kishibe K, Komabayashi Y, Ueda S, Takahara M, Kumai T, Ishibashi K, Kosaka A, Aoki N, Oikawa K, Uno Y, Akiyama N, Sado M, Takei H, Celis E, Harabuchi Y, Kobayashi H *Cancer Immunol Immunother* 66 : 877-890, 2017. 査読有

② Novel treatment for early-stage nasal natural killer/T-cell lymphoma: intra-maxillary arterial infusion chemotherapy with concomitant radiotherapy Takahara M, Nagato T, Kishibe K, Ueda S, Komabayashi Y, Yamashina M, Takahashi K, Harabuchi Y *Hematol Oncol* 35 : 158-162, 2017. 査読有

③ Circulating Epstein-Barr virus-encoded microRNAs as potential biomarkers for nasal natural killer/T-cell lymphoma Komabayashi Y, Kishibe K, Nagato T, Ueda S, Takahara M, Harabuchi Y

*Hematol Oncol* : doi: 10.1002/hon.2360, 2016. 査読有

④ c-Met is a novel tumor associated antigen for T-cell based immunotherapy against NK/T cell lymphoma Kumai T, Matsuda Y, Ohkuri T, Oikawa K, Ishibashi K, Aoki N, Kimura S, Harabuchi Y, Celis E, Kobayashi H. *OncoImmunology* 4 : e976077, 2015. 査読有

⑤ Review Article 鼻性NK/T細胞リンパ腫 熊井琢美, 原湊保明 *耳喉頭頸* 89 : 1018-1028, 2017.

⑥ 特集：アレルギー疾患のバイオマーカー 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるマイクロRNAを対象としたバイオマーカーの探索 駒林優樹, 原湊保明 *アレルギーの臨床* 37 : 63-68, 2017.

⑦ 耳鼻咽喉科検査マニュアル 腫瘍の検査 ウイルス検査(HPV検査・EBV検査) 駒林優樹, 原湊保明 *耳喉頭頸* 89 : 282-290, 2017.

⑧ 『宿題報告2016 進行性鼻壊疽から鼻性NK/T細胞リンパ腫へ』 原湊保明 原湊保明編. 旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座, 2016. 旭川.

⑨ 『鼻性NK/T細胞リンパ腫』 原湊保明, 長門利純, 高原 幹 EBウイルス 改訂第3版, 高田賢藏編. 診断と治療社 :120-128, 2015. 東京.

⑩ 『第10章 腫瘍 X 悪性リンパ腫』 岸部 幹 口腔・咽頭の臨床 第3版, 日本口腔・咽頭科学会編. 医学書院 :174-175, 2015. 東京.

[学会発表] (計 11 件)

① The identification of nasal NK/T-cell lymphoma-associated antigens for helper T cell-based immunotherapy Kumai T, Nagato T, Takahara M, Katada A, Hayashi T, Harabuchi Y The 53rd Korean Rhinologic Society Annual Congress : Mar.12, 2017, Seoul, Korean.

② Soluble ICAM-1 secretion and its functional role as an autocrine growth factor in nasal NK/T cell lymphoma cells Takahara M, Nagato T, Ueda S, Kishibe K, Harabuchi Y

The 17th International Symposium on EBV and Associated Diseases (EBV2016) : Aug. 8-12, 2016, Zürich, Switzerland.

③ Diagnostic values of circulating Epstein-Barr virus-encoded microRNAs as potential biomarkers for nasal natural killer/T-cell lymphoma  
Kishibe K, Komabayashi Y, Nagato T, Ueda S, Takahara M, Harabuchi Y

The 17th International Symposium on EBV and Associated Diseases (EBV2016) : Aug. 8-12, 2016, Zürich, Switzerland.

④ Regulation of CDK1 and Survivin by EBV-encoded LMP1 in nasal NK/T-cell lymphoma cells  
Ueda S, Nagato T, Komabayashi Y, Takahara M, Bemasconi M, Nadal D, Harabuchi Y

The 17th International Symposium on EBV and Associated Diseases (EBV2016) : Aug. 8-12, 2016, Zürich, Switzerland

⑤ CCL17 and CCL22/CCR4 signaling is a candidate for novel targeted therapy against nasal natural killer/T-cell lymphoma  
Nagato T, Kumai T, Kobayashi H, Komabayashi Y, Ueda S, Kishibe K, Takahara M, Harabuchi Y

The 17th International Symposium on EBV and Associated Diseases (EBV2016) : Aug. 8-12, 2016, Zürich, Switzerland.

⑥ Circulating Epstein-Barr virus-encoded microRNAs as potential biomarkers for nasal natural killer/T-cell lymphoma  
Komabayashi Y, Kishibe Kan, Harabuchi Y  
第75回日本癌学会 : 10. 6-8, 2016, 横浜.

⑦ 宿題報告 : 進行性鼻壊疽から鼻性NK/T細胞リンパ腫へ  
原渕保明  
第117回日本耳鼻咽喉科学会総会 : 5. 18-21, 2016, 名古屋.

⑧ 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるPD-L1の発現  
長門利純, 大栗敬幸, 大原賢三, 平田 結, 熊井琢美, 小坂 朱, 青木直子, 及川賢輔, 原渕保明, 小林博也  
第106回日本病理学会総会 : 4. 27-29, 2017, 東京.

⑨ 鼻性NK/T細胞リンパ腫における血清中EBウイルスmicroRNAを対象としたバイオマーカーの探索  
岸部 幹, 駒林優樹, 原渕保明

第14回EBウイルス研究会 : 7. 15, 2017, 旭川.

⑩ Expression of cyclin-dependent kinase 1 and survivin in nasal natural killer/T-cell lymphoma  
長門利純, 大原賢三, 平田 結, 原渕翔平, 永田真莉乃, 熊井琢美, 岸部 幹, 高原 幹, 大栗敬幸, 小坂 朱, 青木直子, 及川賢輔, 小林博也, 原渕保明  
第76回日本癌学会 : 9. 28-30, 2017, 横浜.

⑪ 進行性鼻壊疽から鼻性NK/T細胞リンパ腫へ ; EBウイルスが関連する増殖、浸潤機構の解明と新たな診断・治療法の開発  
原渕保明  
第13回EBウイルス研究会 : 7. 9, 2016, 東京.

## 6. 研究組織 (1) 研究代表者

原渕 保明 (HARABUCHI, Yasuaki) 旭川医科大学・医学部・教授 研究者番号:80208686

## (2) 研究分担者

高原 幹 (TAKAHARA, Miki) 旭川医科大学・医学部・講師 研究者番号:50322904

岸部 幹 (KISHIBE, Kan) 旭川医科大学・医学部・助教 研究者番号:80447101

小林 博也 (KOBAYASHI, Hiroya) 旭川医科大学・医学部・教授 研究者番号:90280867

上田 征吾 (UEDA, Seigo) 旭川医科大学・医学部・助教 研究者番号:90447102

長門 利純 (NAGATO, Toshihiro) 旭川医科大学・医学部・助教 研究者番号:80431419

駒林 優樹 (KOMABAYASHI, Yuki) 旭川医科大学・医学部・助教 研究者番号:40548864