

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2007~2008
 課題番号： 19791180
 研究課題名 (和文) 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における EB ウイルス膜蛋白の発現機構と機能解析
 研究課題名 (英文) Functional and expressional analysis of EBV latent membrane protein-1 (LMP-1) in nasal NK/T-cell lymphoma.
 研究代表者
 高原 幹 (TAKAHARA MIKI)
 旭川医科大学・医学部・助教
 研究者番号： 50322904

研究成果の概要：

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫は非常に予後が悪い EBV 発癌リンパ腫である。LMP1 は EBV 由来蛋白であり、本腫瘍における調節、機能は不明である。本腫瘍細胞株での LMP1 の発現調節を検討したところ、IL-2, 10, 15, IFN-gamma の細胞外刺激が LMP1 の発現を増強させた。また、その増強した LMP1 が CD25 や IP-10 を介して細胞増殖や遊走能を亢進させた。従って、LMP1 は本リンパ腫にて腫瘍増殖、転移に関与している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：鼻性 NK/T 細胞リンパ腫、LMP1 (latent membrane protein 1)

1. 研究開始当初の背景

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進行する破壊性、壊死性の肉芽腫性病変を主体とする NK 細胞あるいは $\gamma\delta$ T 細胞由来のリンパ腫である。このリンパ腫は肺、皮膚、消化管などの他臓器への浸潤が高頻度に出現し、予後が極めて不良である。よって治療を念頭に置いた腫瘍特性の理解が早急に求められている。

2. 研究の目的

本リンパ腫の大きな特徴として、Epstein-Barr Virus (EBV) が高率に腫瘍細胞に感染している事が挙げられる。EBV 蛋白の発現はタイプ II に分類され、EB ウイルス膜蛋白 (Latent Membrane protein 1 :LMP1) が陽性である。本蛋白は B リンパ球の EBV

による不死化に必須とされ、正常の線維芽細胞を腫瘍化させるなど腫瘍原性が高い事が報告されている。しかしその癌原蛋白である LMP1 の発現調節は未だ明らかになっていない。また、LMP1 の機能においても、その検討はほぼ B 細胞、上皮細胞に限られ、NK 細胞における LMP1 の機能について検討した報告はない。本研究では細胞株や臨床検体を使用し鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における LMP1 の調節機構とその機能を検討する。

3. 研究の方法

・LMP1 の調節

以前より、タイプ II の EBV 関連腫瘍においてサイトカインがその調節に関与していることが報告されている。鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株 SNK6 は鼻腔局所から樹立され

た非常に希少な LMP1 陽性細胞株であり、IL-2 依存性である。その IL-2 が LMP1 の発現を増強するかどうか RT-PCR やウエスタンブロットにて検討する。また他のサイトカインでも同様に LMP1 の発現を検討する。またそのサイトカインが細胞株から自律的に分泌される可能性のある場合 (IL-10、INF- γ 等)、ELISA にて分泌を確かめ、オートクライン機能が働いていないかどうかブロック抗体等を使用して検討する。また本疾患の特徴とされる腫瘍細胞と混在する炎症細胞がどのように LMP1 の増強に関与しているか検討するため、SNK6 と種々炎症細胞との共培養を行い、LMP1 の発現を検討する。

・LMP1 の機能

上記検討結果を基に、LMP1 の発現を増強させるサイトカインにて SNK6 を刺激し細胞増殖能、アポトーシス抵抗性、細胞運動能をサイミジン取り込み、MTT アッセイ、ミグレーションアッセイなどで検討する。さらに EBV 陰性 NK 細胞株との比較を行いその機能がサイトカイン自体の機能であるのか、LMP1 が介している可能性があるのかを検討する。更に現在、LMP1 により影響を受けるとされる蛋白に IFN gamma-inducible protein-10 (IP-10), ICAM1, LFA-1 等が報告されているため、それぞれの蛋白をイムノブロット、フローサイト、ELISA 等にて検討する。更に直接 LMP1 の発現を検討するため、EBV 陰性 NK 細胞株を用い、LMP1 の遺伝子導入を行う。

4. 研究成果

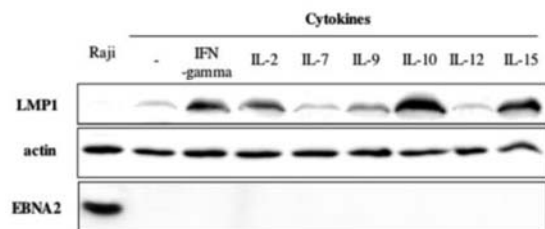
・LMP1 の調節

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株 SNK6 は IL-2 依存性細胞株であるが、IL-2 非存在下で培養すると、LMP1 の発現が著名に低下した。また他のサイトカインでの刺激実験を行うと、IL-10、15 にて著名な発現亢進を、IL-2、INF- γ では中程度の発現亢進を認めた (図 1)。また、他の EBV 陽性 NK 細胞株である SNK1 や KAI3 でも同様な LMP1 の発現調節が認められた。また SNK6 においてサイトカインの産生能を培養上清における ELISA にて検討すると INF- γ や IL-10 を産生していることが判明した。従って INF- γ や IL-10 の抗体を使用し、作用を中和すると著名に SNK6 の LMP1 発現が低下した (図 2)。従って INF- γ や IL-10 の自律性産生が LMP1 の恒常的発現を維持している可能性が示唆された。また、単球との共培養にて SNK6 の LMP1 発現が亢進した。その亢進は、相互の細胞接着が必要であり、液性因子は関与しないことがトランスウエルでの検討にて判明した。さらに中和抗体による検討にて膜性 IL-15 がその亢進に関与していることが判明した。

・LMP1 の機能

上記により IL-10 が LMP1 の強い増強因子であることが判明したが、SNK6 への IL-10 刺激下での MTS や細胞カウント法による検討において、細胞増殖能の亢進は認められなかった。しかし、B リンパ球由来 EBV 陽性細胞株において LMP1 により発現が増強されることが知られる CD25 や CD54 の発現が SNK-6 においても IL-10 刺激実験にて亢進し (図 3)、IL-10 中和により減少することが判明した。この現象は EBV 陰性 NK 細胞株では認められないため、これらの発現亢進は LMP1 を介している可能性が示唆された。CD25 は IL-2 の感受性を亢進させることが知られており、本細胞株においても IL-10 刺激にて IL-2 の細胞増殖能が亢進することが判明した (図 4)。従って、LMP1 は IL-2 の作用を増強することにより間接的に細胞増殖能を亢進させる可能性が示唆された。更に他細胞株において LMP1 により発現が増強されることが知られる IP-10 の発現が SNK6 において亢進することが判明した (図 5)。本発現は LMP1 陰性 NK 細胞株では認められないため、これらの発現亢進は LMP1 を介している可能性が示唆された。機能解析により、IP-10 は SNK6 の細胞浸潤能を亢進させることが判明し、LMP1 は IP-10 を介してその細胞浸潤能に関与している可能性が示唆された。

図 1 各サイトカイン刺激による SNK6 の



LMP1 発現 (ウエスタンブロット)

図 2 抗 INF- γ 、IL-10 中和抗体存在下での SNK6 の LMP1 発現 (ウエスタンブロット)

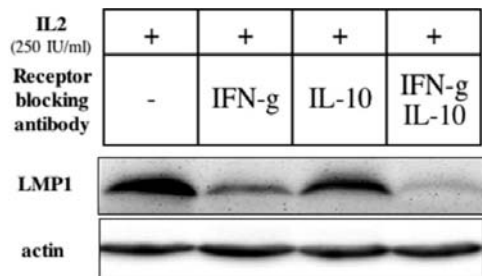
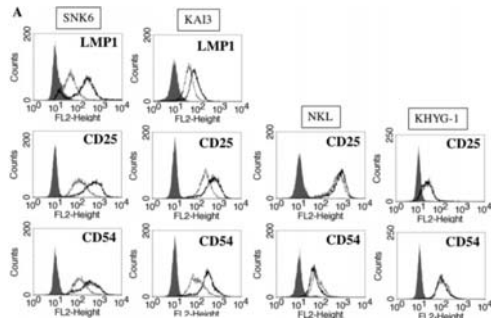


図 3 IL-10 による CD25、CD54 の発現増強 (NKL, KHYG-1 は EBV 陰性 NK 細胞株)



*太線は IL-10 存在下での発現
 図 4 IL-10 による IL-2 の細胞増殖能の増強 (SNK6 ; サイミジンの取り込み)

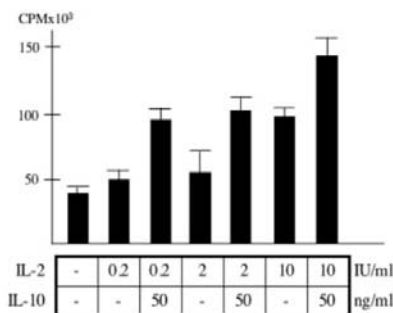
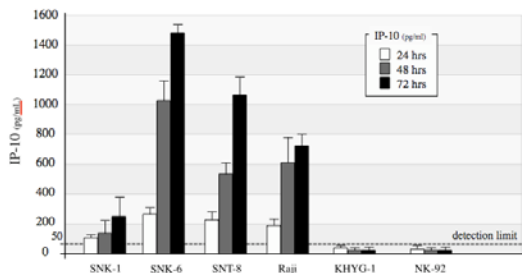


図 5 各 NK 細胞株における IP-10 の産生 (ELISA)



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 9 件)

1. 高原幹、原渕保明. 耳鼻咽喉科処置の有用性 口腔咽頭に生じる潰瘍性病変に対する保存的治療とペーチェット病に対する扁桃摘出術の有効性. 耳鼻臨床 102、240-241、2009. 査読無

2. 吉崎智貴、高原幹、坂東伸幸、原渕保明. 口腔・咽頭科診療における論点 掌蹠膿疱症における扁桃摘出術の適応をどう考えるか? -耳鼻咽喉科の立場から- JHONS 24、1557-1561、2008. 査読無

3. 原渕保明、高原幹. 口腔内病変をどう診

るか 鑑別を要する病態、口腔潰瘍 JHONS 23、1831-1835、2008. 査読無

4. Kobayashi H, Nagato T, Takahara M, Sato K, Kimura S, Aoki N, Azumi K, Tateno M, Harabuchi Y, Esteban Celis. 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. 査読有

5. 高原幹、荻野武、原渕保明. 鼻性NK/T細胞リンパ腫に対する浅側頭動脈動注化学放射線同時併用療法. 耳鼻と臨床 53、57-63、2007. 査読無

6. 原渕保明、高原幹、坂東伸幸、岸部幹、後藤孝、野澤はやぶさ、吉崎智貴、上田征吾. 扁桃病巣疾患の臨床と病態. 耳鼻咽喉科展望 50、10-19、2007 査読無

7. Nozawa H, Takahara M, Yoshizaki T, Goto T, Bandoh N, Harabuchi Y. Selective expansion of TCR V beta 6 in tonsillar T-cells induced by H. parainfluenzae in patients with IgA nephropathy. Clinical and Experimental Immunology 151, 319-322, 2007. 査読有

8. Nagamine M, Takahara M, Kishibe K, Nagato T, Ishii H, Bandoh N, Ogino T, Harabuchi Y. Sequence variations of Epstein-Barr virus LMP1 gene in nasal NK/T-cell lymphoma. Virus Genes 34, 47-54, 2007. 査読有

9. Nagamine M, Kishibe K, Takahara M, Nagato T, Ishii H, Bandoh N, Ogino T, Harabuchi Y. 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. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. Takahara M, Nagato T, Kishibe K, Harabuchi Y. IL-10 leads to elevated expression of CD25 on SNK6 through the EBV encoded latent membrane protein 1 (LMP1). 9th Japan-Taiwan Conference in Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery. November. 9-10 2008. Sendai, Japan.

2. Takahara M, Kishibe K, Moriai S, Ishii H, Harabuchi Y. Expression and function of LFA-1 and ICAM-1 in nasal NK/T cell

lymphoma. The 13th Biennial Conference of the International Association for Research on EBV and Associated Disease (the EBV 2008 Conference). Nov. 7-10 2008, Guangzhou China.

3. 高原幹、長門利純、岸部幹、森合重誉、片山昭公、原渕保明. 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株SNK6におけるIL-10によるLMP1を介したCD25の発現上昇. 第66回日本癌学会. 2008. 10. 3-5, 横浜.

4. 高原幹、岸部幹、森合重誉、石井秀幸、片山昭広、林達哉、原渕保明. 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株における可溶性ICAM1の解析. 第32回日本頭頸部癌学会. 2008. 6. 12-13, 東京.

5. 高原幹、長門利純、岸部幹、森合重誉、坂東伸幸、荻野武、林達也、原渕保明. 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株SNK6におけるLFA-1とICAM1の発現. 第108回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会. 2008. 5. 17-19, 金沢.

6. Takahara M, Ishii H, Ogino T, Harabuchi Y. New treatment and monitoring procedures for nasal NK/T-cell lymphoma: intra-maxillary arterial chemotherapy and analysis of serum EBV DNA. The 12th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. Apr. 3-5 2008, Nara Japan.

7. 高原幹、岸部幹、森合重誉、坂東伸幸、原渕保明. 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株SNK6におけるLFA-1とICAM1の機能解析. 第26回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2008. 2. 21-23, 大阪.

[図書] (計3件)

1. 高原幹、原渕保明. 耳鼻咽喉科ウイルス感染症 (氷見徹夫編) EBウイルス感染と頭頸

部腫瘍. MB-ENT 99, 49-56, 2009.

2. 原渕保明、高原幹. EBウイルス (高田賢蔵編) 鼻性NK/T細胞リンパ腫. 診断と治療社 (東京) 130-140, 2008.

3. 原渕保明、高原幹. 潜伏感染ウイルスによる血液疾患 新しい診断と治療のABC EBウイルスとT/NK細胞増殖症 (河敬世編): (6) 鼻性NK/T細胞リンパ腫-発見の契機. 最新医学社 (大阪) 89-98, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高原 幹 (TAKAHARA MIKI)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号: 50322904