

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591375

研究課題名(和文)EBV陽性TおよびNK細胞リンパ増殖症発症機構の解明と治療法の開発

研究課題名(英文)Analysis of pathophysiology of EBV-positive T- or NK-lymphoproliferative diseases and development of new treatment strategy

研究代表者

新井 文子(Arai, Ayako)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：70359678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：EBV陽性T、NK細胞リンパ増殖症(EBV-T/NK-LPD)発症機構の解明と治療法開発を目的として研究を行った。2011年度にマウスモデルの作成を行い成功、論文発表した。さらにEBVがT、NK細胞へ感染するとNF- κ Bが活性化し感染細胞が不死化すること、NF- κ Bをbortezomibで抑制するとEBV陽性T、NK細胞株および患者由来の腫瘍細胞に細胞死が誘導され、かつ上記マウスモデルにも抗腫瘍効果を認めることを観察した。以上よりEBV-T/NK-LPD発症へのEBVの関与とNF- κ Bが治療標的になりうるということが明らかになった。2013年欧州血液学会で報告、2014年に論文投稿を行った。

研究成果の概要(英文)：We performed the research in order to elucidate the molecular mechanisms of EBV-positive T or NK lymphoproliferative diseases (EBV-T/NK-LPDs) development, and to establish the new treatment strategy for the disorders. First, we established the xenograft model of EBV-T/NK-LPDs and published the results in 2011. In addition, we performed in vitro EBV infection assay and found that EBV induced NF- κ B-mediated anti-apoptotic signals in T and NK cells. NF- κ B was constitutively activated in EBV-positive T- or NK-cells, not only in the cell lines, but in patients cells. Suppression of NF- κ B by proteasome inhibitor bortezomib induces anti-tumor effects on EBV-T/NK-LPD not only in vitro but also in vivo. NF- κ B may contribute to the development of EBV-T/NK-neoplasms and represents an attractive therapeutic target for the diseases. We reported the results at EHA meeting in 2013, and we have submitted the manuscript to the journal in 2014.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：T,NK細胞リンパ腫 EBウイルス NF- κ B 血液腫瘍学 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

造血器腫瘍の WHO 分類が昨年改定され、いくつかの新しい疾患概念が取り入れられた。その一つに Epstein-Barr virus (EBV) 陽性 T、NK リンパ増殖症 (EBV-positive T, NK-Lymphoproliferative disease = 以下 EBV-TNK-LPD と総称する) がある。これは、本邦を中心に東アジアから報告されてきた EBV による T および NK 細胞腫瘍で、腫瘍細胞に EBV の感染を認めるが、なぜ (通常は感染しないとされる) T 細胞、NK 細胞に EBV が感染するのか、そしてどのような機序で腫瘍発症発症にかかわるかは解明されていない。また、EBV-TNK-LPD は既存の化学療法は無効で非常に予後が悪い。疾患発症機構に基づいた新規治療法の開発は急務である。

2. 研究の目的

EBV-TNK-LPD について、

- 1) 疾患発症の分子機序を明らかにする。
- 2) その結果を元に新規治療法 (分子標的療法および細胞治療) を開発する。

3. 研究の方法

EBV 陽性 T もしくは NK 細胞株を用いて疾患発症機序を、細胞内シグナル分子を中心に細胞レベルで、細胞間相互作用や免疫システムなど細胞外環境を中心に組織、固体レベルで、臨床検体およびモデルマウスを用いて解析を行った。また T および NK 細胞に対し *in vitro* で EBV 感染実験を行い、感染後に起こる変化、蛋白発現、シグナル伝達経路等を解析した。

4. 研究成果

- (1) 慢性活動性 EB ウイルス感染症モデルマウスを作成し論文報告した。(PLoS Pathog. 2011)
- (2) EBV 陽性 T、NK 細胞リンパ増殖症発症における CD137 分子の役割を解析し EBV 陽性 T、NK 細胞株および CAEBV 患者細胞では細胞表面の CD137 発現が EBV 陰性細胞に比べ亢進していることを見出した。また T 細胞への EBV 感染実験を行い、EBV は T および NK

細胞において LMP1 を介して CD137 発現をもたらす事を解明した。さらに EBV 陽性 T および NK 細胞では CD137 リガンドによる CD137 刺激で NF- κ B が活性化し apoptosis が抑制されることを見出し、腫瘍発症の一因となりうることを見出した。第 16 回欧州血液学会年次総会で発表し 2014 年論文投稿した (revise 中)。

(3) EBV 陽性 T、NK 細胞株および EBV-TNK-LPD 患者細胞で、NF- κ B が恒常的に活性化していること、活性化は EBV 感染により LMP1 を介して行われることを示した。さらに NF- κ B の阻害剤 Bortezomib はこれらの細胞において NF- κ B を抑制、apoptosis を誘導し、CAEBV モデルマウスでの腫瘍進展を抑制することを見出した。第 18 回欧州血液学会年次総会で発表し 2014 年論文投稿した。

(4) EBV を MOLT4 に *in vitro* で感染させると細胞表面に CD29, CD49d の発現が誘導され、リガンドである fibronectin (FN) への接着が亢進した。FN への接着による CD29、CD49d の活性化によって EBV 陽性 T/NK 細胞では細胞内分子シグナル、いわゆる outside-in signal が活性化し、VP-16 による細胞死は抑制された。以上から EBV は T/NK 細胞において integrin の発現誘導を介し腫瘍化に働くと考えられた。2012 年に日本血液学会総会で発表した。

(5) EBV-T/NK-LPD 患者で INF- γ 、IL-6、and TNF- α の血清中の濃度が健常者に比べ高値を認められた。EBV の *in vitro* 感染により MOLT4 ではこれらの産生が亢進することが示された。さらに infliximab や tocilizumab は VP-16 による抗腫瘍効果を亢進させた。以上から EBV-T/NK-LPD では EBV 陽性 T/NK 細胞による炎症性サイトカイン産生が亢進しており、病態形成に寄与していること、さらに治療標的となりうることを示された。2012 年に日本血液学会総会で発表し、同年 Int J Hem に

論文発表した。

(6) EBV 感染により T 細胞では DNA に積極的に変異を導入する酵素である AID が発現し、その標的である *cMyc* 遺伝子の変異が増加することを観察した。これは EBV により腫瘍発症に寄与する遺伝子変異が起こりうることを示唆しており、EBV-T/NK-LPD 発症の分子機序の一つと考えられた。2013 年日本血液学会総会および米国血液学会で報告した。

(7) EBV 感染により T 細胞では制御性 T 細胞の Master 分子である FOXP3 の発現が亢進すること、そして EBV 陽性 T 細胞は *in vitro* で共培養にて Responder T 細胞に対し抑制的に働く、すなわち制御性 T 細胞様の性質を獲得することを観察した。これは EBV-T/NK-LPD 発症の機序の一つと考えられた。2013 年日本血液学会総会で報告した。

(8) Simvastatin は、CAEBV 患者から樹立した EBV 陽性 T 細胞株、および患者から分離した EBV 陽性 T 細胞に対し、濃度依存性に apoptosis を誘導することを観察した。さらに Simvastatin 処理によって EBV 陽性 T 細胞における LMP1 の発現が抑制されることも認められた。同薬は本邦でも広く使用されている薬剤であり臨床応用の可能性もある。2013 年日本血液学会国際シンポジウムにて発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)すべて査読有

1) Yagi K, Yamamoto K, Umeda S, Abe S, Suzuki S, Onishi I, Kirimura S, Fukayama M, Arai A, Kitagawa M, Kurata M.

Expression of multidrug resistance 1 gene in B-cell lymphomas: association with follicular dendritic cells. *Histopathology*. 62:414-20. 2013 10.1111/his.12035.

2) Yamamoto N, Imadome KI, et al (他 13 名) The emergence of CD20-/CD19- tumor cells

after rituximab therapy for Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphoproliferative disorder complicated with hemophagocytic lymphohistiocytosis.

Eur J Pediatr. 2013 Oct 30. [Epub ahead of print]

3) Nakamura H, Imadome K, et al. (他 10 名) Human cytomegalovirus induces apoptosis in neural stem/progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells by generating mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress.

Herpesviridae. 2013 Oct 21;4(1):2. doi: 10.1186/2042-4280-4-2.

4) Arai A, Imadome K, Wang L, Wu N, Kurosu T, Wake A, Yamamoto H, Ota Y, Harigai M, Fujiwara S, Miura O.

Recurrence of chronic active Epstein-Barr virus infection from donor cells after achieving complete response through allogeneic bone marrow transplantation

Int Medicine,51(7):777-82.2012

5) 山本 正英, 桑川 華恵, 佐々木 宏治, 村田 諭孝, 大木 学, 黒須 哲也, 福田 哲也, 新井 文子, 村上 直己, 三浦 修

再生不良性貧血の経過中に薬疹に伴い生じた著明な反応性形質細胞増加

臨床血液 53(5):526-30, 2012

6) Arai A, Nogami A, Imadome KI, Kurata M, Murakami N, Fujiwara S, Miura O.

Sequential monitoring of serum IL-6, TNF- α , and IFN- γ levels in a CAEBV patient treated by plasma exchange and immunochemotherapy.

Int J Hematol. 2012 Nov;96(5):669-73. doi: 10.1007/s12185-012-1170-2

7) Iijima K, Imadome K, et al (他 10 名) ZNF385B is characteristically expressed in germinal center B cells and involved in B-cell apoptosis.

Eur J Immunol. 2012 Dec;42(12):3405-15. doi: 10.1002/eji.201242530.

8) Imadome K, Fujiwara S. et al (他 9 名)
Effective control of Epstein-Barr virus infection following pediatric liver transplantation by monitoring of viral DNA load and lymphocyte surface markers.
Pediatr Transplant. 2012 Nov;16(7):748-57. doi: 10.1111/j.1399-3046.2012.01750

9) Imadome K, Arai A, et al (他 13 名)
Novel mouse xenograft models reveal a critical role of CD4+ T cells in the proliferation of EBV-infected T and NK cells. PLoS Pathog. 2011 Oct;7(10):e1002326. Epub 2011 Oct 20.
DOI:10.1371/journal.ppat.1002326

10) Arai A, Imadome K, et al (他 7 名)
Clinical features of adult-onset chronic active Epstein-Barr virus infection: a retrospective analysis. Int J Hematol. 2011, 93(5):602-9.
DOI: 10.1007/s12185-011-0831-x

11) Arai A, Imadome K, et al (他 9 名)
Recurrence of chronic active Epstein-Barr virus infection from donor cells after achieving complete response through allogeneic bone marrow transplantation
Int Medicine, 2012;51(7):777-82.
DOI:10.2169/internalmedicine.51.6769

12) 内田慧美、本間りこ、五十嵐愛子、倉田盛人、今留謙一、大本英次郎、三浦修、新井文子
血漿中 EBV-DNA 量を経時的に測定した EBV 陽性 Hodgkin リンパ腫
臨床血液, 2012, 53(1) : 87-91
DOI なし
〔学会発表〕(計 20 件)

1) 今留謙一、新井文子ら (他 6 名)
慢性活動性 Epstein-Barr Virus 感染症に対する高脂血症治療薬 simvastatin の抗腫瘍効果の検討
第 23 回 EB ウイルス感染症研究会 2013 年 3 月 16 日 東京

2) Ayako Arai, Ken-Ichi Imadome, et al (他 6

名)
Simvastatin Induces Apoptosis in EBV-Positive T- or NK-Cell Lymphoproliferative Disorders and Anti-Tumor Effects in Xenograft Models
The 4th JSH International Symposium May 24, 2103, Matsuyama

3) Ayako Arai, Ken-Ichi Imadome, et al (他 7 名)
NF- κ B is a potential molecular target of EBV-positive T- or NK-cell lymphoproliferative disorders
The 18th Congress of European Hematology Association Jun 15, 2013, Stockholm

4) Ayako Arai, Morito Kurata, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura.
EBV induces AID expression in T or NK cells leading to mutagenesis and development of lymphoma
第 72 回日本癌学会総会 シンポジウム
2013 年 10 月 4 日 横浜

5) Masato Horino, Ken-Ichi Imadome, Ayako Arai, et al (他 10 名)
EBV induces AID expression in T or NK cells leading to mutagenesis and development of lymphoma
第 75 回 日本血液学会総会 2013 年 10 月 12 日 札幌

6) Ludan Wang, Ken-ichi Imadome, Ayako Arai et al (他 5 名)
CD137 is induced by EBV in the presence of IL-2 in T or NK cells and mediates a survival signal
第 75 回 日本血液学会総会 2013 年 10 月 12 日 札幌

7) Honami Komatsu, Ken-Ichi Imadome, Ayako Arai et al (他 5 名)
EBV-positive cells from CAEBV express FOX-p3 and suppress the proliferation of the effector T cells
第 75 回 日本血液学会総会 2013 年 10 月 12

日 札幌

8) Shunsuke Yui, Ken-Ichi Imadome, Ayako Arai,
et al (他 8 名)

A case report for EBV-positive
T-lymphoproliferative disease developed after
cord blood transplantation for AML.

第 75 回 日本血液学会総会 2013 年 10 月 12
日 札幌

9) Ayako Arai, Masato Horino, Ken-Ichi
Imadome, et al (他 9 名)

Epstein-Barr virus Induces Activation-Induced
Cytidine Deaminase Expression in T or NK Cells
Leading to Mutagenesis and Development of
Lymphoma

55th Annual meeting of American Journal of
Hematology

December 7, 2013, New Orleans

10) 新井文子

慢性活動性 EB ウイルス感染症は悪性腫瘍
か？

第 52 回日本リンパ網内系学会総会 シンポ
ジウム V リンパ増殖性疾患：良性か？悪性
か？2012 年 6 月 14 - 16 日 福島

11) Ayako Arai, Ken-Ichi Imadome, et al (他 6
名)

Inflammatory cytokines can be molecular targets
for treatment of CAEBV.

第 74 回日本血液学会総会 2012 年 10 月 19 日
-21 日 京都

12) Ludan Wang, Ken-Ichi Imadome, Ayako
Arai et al (他 4 名)

EBV infection enhances T-cell adhesion and
survival contributing to EBV-T-LPD
development

第 74 回日本血液学会総会 2012 年 10 月 19 日
-21 日 京都

13) 梅澤佳央, 新井文子ら (他 7 名)

低用量 thymoglobulin を含んだ前処置による
同種移植後に EBV 関連リンパ増殖性疾患
(EBV-LPD) を発症した 2 例における

EBV-DNA 定量モニタリング

第 33 回日本造血細胞移植学会総会 2011 年
2 月 23 日 松山

14) Ayako Arai, Yasunori Saitoh, et al (他 3 名)

EBV infection of T or NK cells activates NF-kB
leading to lymphoproliferative diseases
development

第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月
3 日名古屋

15) Ayako Arai, Ken-ichi Imatome, Yasunori
Saitoh, et al (他 7 名)

EBV infection of T or NK cells activates NF-kB
leading to lymphoproliferative diseases
development

第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10
月 7 日名古屋

16) Minako Jinta, Ken-Ichi Imadome, Shigeyoshi
Fujiwara, Osamu Miura, Ayako Arai (他 5 名)

L-asparaginase monotherapy for chronic active
Epstein-Barr virus infection: A pilot study

第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10
月 7 日名古屋

17) Ludan Wang, Aiko Sato-Otsubo, Ayako Arai
et al (他 7 名)

High-resolution genomic copy number profiling
of primary intraocular lymphoma by SNP
microarray

第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10
月 7 日名古屋

18) Chihiro Yamada, Ken-Ichi Imadome, Ayako
Arai, et al (他 12 名)

High level of human cytokines were detected in a
novel mouse xenograft model of CAEBV and
EBV-LHL

第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10
月 7 日名古屋

19) Ayako Arai, Mayumi Yoshimori, Ken-Ichi
Imadome, et al (他 7 名)

CD137 EXPRESSION IS INDUCED BY
EPSTEIN-BARR VIRUS (EBV) INFECTION

AND ACTIVATES NF-κB CONTRIBUTING TO THE DEVELOPMENT OF EBV-POSITIVE T/NK-CELL LYMPHOPROLIFERATIVE DISEASE

The 16th Congress of European Hematology Association, June 10 2011 London

20) Ludan Wang, Ayako Arai et al (他 7 名)

High-Resolution Genomic Copy Number Profiling of Primary Intraocular Lymphomas using SNP Microarrays

The 53rd Annual meeting of American society of Hematology December 6 2011 San Diego

〔図書〕(計 7 件)

- 1) 新井文子.
科学評論社血液内科 PLL の診断と治療.
Diagnosis and treatment of PLL..66:総頁数
9, 2013
- 2) 新井文子.
最新医学社 EB ウイルス陽性リンパ腫の
発症機構. 最新医学 68:48-55, 2013
- 3) 新井文子.
東京医学社 慢性活動性 EBV 感染症
Chronic active EBV infection (CAEBV) と
言われてきた疾患 ~EBV陽性T,NKリン
パ増殖症 EBV-T/NK-LPDs ~.成人病と
生活習慣病 43:1073-78, 2013
- 4) 新井文子.
新興医学出版社 ポケットサイズのステロ
イド診療マニュアル
2013年3月31日 総頁数 8
- 5) 新井文子.
文光堂 腫瘍病理鑑別診断アトラス 造血
器腫瘍 第一部 検鏡前の確認事項 骨
髄評価のための基礎知識 2013年5月29
日 総頁数 11
- 6) 新井文子
南江堂 内科 慢性活動性EBウイルス感
染症 Chronic active EBV infection (CAEBV)

正しい診断のために内科医が知っておくべ
き事

総頁数 4 2012

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

新井 文子 (Arai, Ayako)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究
科・講師

研究者番号: 70359678

(2)研究分担者

今留 謙一 (Ken-ichi Imadome)

国立成育医療研究センター・母児感染研究
部・室長

研究者番号: 70392488

(3)連携研究者

()

研究者番号: