

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10107

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893008

研究課題名(和文) 鼻性NK/T細胞リンパ腫における溶解感染誘導の検討

研究課題名(英文) Induction of lytic Epstein-Barr virus infection in nasal NK/T-cell lymphoma

研究代表者

上田 征吾 (UEDA, Seigo)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：90447102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：鼻性NK/T細胞リンパ腫にて、Sp1阻害薬は濃度依存性に細胞死をもたらした。これはBIRC5およびCDK1阻害によるアポトーシス誘導によることが認められた。さらにLMP1の発現がBIRC5やCDK1の発現に関与していることをLMP1のsiRNAによるノックダウンで確認した。また臨床検体を用いた免疫組織化学染色ではLMP1陽性BIRC5陽性細胞を認めた。以上より、本リンパ腫ではLMP1を介してBIRC5やCDK1の発現が亢進していることが示唆された。またSp1阻害薬は海外にて治験が進行しているものもあり、本リンパ腫の治療に本阻害薬を用いることが将来期待された。

研究成果の概要(英文)：Nasal NK/T-cell lymphoma (NNKTL) is EBV-related malignancy and has a poor prognosis. An improved understanding of the mechanisms of NNKTL is crucial for identifying new targets of effective treatment modalities for this deadly disease. We found that inhibitors of Sp1 transcription factor dose-dependently decreased cell proliferation of NNKTL cells. This was associated with decrease in BIRC5 and CDK1 expressions and induction of apoptosis and cell-cycle arrest at G2/M phase in NNKTL cells. Knockdown of EBV-encoded LMP1 induced downregulation of CDK1 and BIRC5 expressions and apoptosis in NNKTL cells. Immunohistochemistry detected BIRC5 expression in LMP1-positive lymphoma cells of NNKTL biopsy specimens. Our results suggest that LMP1 upregulates CDK1 and BIRC5 expression, and these upregulations are essential for NNKTL growth. Thus, targeting CDK1 and BIRC5 by using Sp1 inhibitors might be an effective approach to treat NNKTL that is hallmarked by poor prognosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：鼻性NK/T細胞リンパ腫 Epstein-Barr virus BIRC5 CDK1 LMP1

1. 研究開始当初の背景

(1) 鼻性NK/T細胞リンパ腫は、鼻腔・咽頭に好発し、顔面正中部に沿って進行する壊死性・破壊性肉芽腫性病変を主体としたNKあるいは $\gamma\delta$ T細胞由来のリンパ腫である。本リンパ腫は肺、皮膚、消化管などの他臓器への浸潤が高頻度に出現し、極めて予後不良な疾患であり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。また本リンパ腫の特徴に、EBウイルスがほぼ全症例に陽性である事が挙げられ、実際 *in situ* ハイブリダイゼーションを用いた当科での検討でも32症例中31例において腫瘍細胞内のEB virus-encoded small RNA (EBER)の存在が確認され①、EBウイルスがその腫瘍増殖、維持に大きく関与している事が考えられる。

(2) 本リンパ腫におけるEBウイルスの主な感染様式は、細胞性免疫による監視を免れるため、限られた潜伏感染遺伝子を発現したII型潜伏感染である②。時折EBウイルスは溶解感染に導かれ、ウイルス自身の増殖と宿主細胞死を来すが、我々の定量PCRによる予備的な検討では、本リンパ腫細胞株においては溶解感染のマスター遺伝子であるBZLF1の発現はハウスキーピング遺伝子に比べて極めて低く、本リンパ腫において溶解感染は極めて嚴重にコントロールされていると考えられる。我々はEBウイルス陽性B細胞株を使用した自然免疫系の刺激による溶解感染導入の検討を行い、溶解感染となった宿主細胞は細胞死となることから、人為的な溶解感染導入は特異的にEBウイルス陽性腫瘍細胞死を促すとの着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株での、EBウイルス溶解感染のマスター遺伝子であるBZLF1の内因性発現を定量リアルタイムPCRで確認したところ、ハウスキーピング遺伝子に比べ、著しく低く発現していることを確認した。そこで、複数の試薬を添加培養し、BZLF1の発現を検討したが、有意な発現増加は確認できていない。しかし検討した試薬のうち、Sp1転写因子阻害薬において細胞死をもたらすことが確認された。そのため更なる検討を行った。

(2) Sp1阻害薬はSp1の阻害を介し、アポトーシスを抑制する蛋白であるBIRC5や細胞周期を促進する蛋白であるCDK1を阻害することが報告されている。そこで本リンパ腫細胞株でも検討した。本リンパ腫はEBウイルス潜伏感染様式のII型をとるとされ、本リンパ腫細胞株もEBウイルス潜伏感染蛋白であるLMP1を発現しており、本蛋白は癌原性と考えられている。そこでLMP1の発現が、これらBIRC5やCDK1の発現に関与しているかを、LMP1をsiRNAでノックダウンした細胞株で検討した。また、鼻性NK/T細胞リンパ腫症例よ

り得られた摘出標本を用いた免疫組織化学染色を行い、LMP1とBIRC5の発現の有無を検討した。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養とLMP1に対するRNA干渉
2種類のEBウイルス陽性鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株、SNK6とSNT8を用いた。これら細胞株は10%ヒトAB血清、ペニシリン(100U/ml)、ストレプトマイシン(100g/ml)および700U/mlのリコンビナントIL-2を添加したRPMI1640で培養した。Terameprocol (Sigma-Aldrich) およびMithramycin A (Sigma-Aldrich)の添加培養の際はDMSOで段階希釈したものを使用した。

LMP1に対するRNA干渉にはNeon transfection system (Invitrogen) 用い、エレクトロポレーション法にて、LMP1のsiRNA (Applied Biosystems) を導入した。

(2) MTS アッセイ

MTSアッセイはCellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) を用いて行った。

(3) RNA抽出と定量リアルタイムPCR

全RNAの抽出にはRNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いた。DNase処理後(DNase free; Ambion)、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いてcDNAを準備した。定量リアルタイムPCRにはLMP1、BIRC5およびCDK1に特異的なプライマーとプローブを使用し、TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) を用いて7900HT (Applied Biosystems) にて行った。

(4) ウェスタンブロット

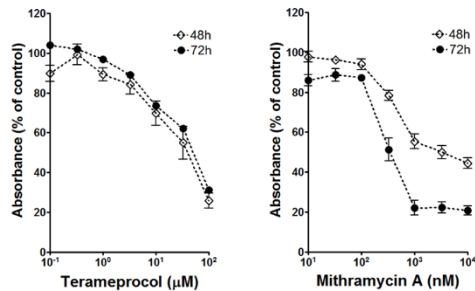
Laemmli buffer (4% SDS、20% glycerol、および120 mM Tris、pH6.8)を用いて細胞からタンパク質抽出を行った。電気誘導およびニトロセルロース膜への転写はNuPAGE system (Invitrogen) を用いた。1次抗体はmouse anti-LMP1 (CS1-4、Santa Cruz)、rabbit anti-BIRC5 (71G4B7、Cell Signaling)、rabbit anti-CDK1 (Cell Signaling)、rabbit anti-PARP (Cell signaling)、rabbit anti- β -actin および mouse anti- α -tubulin (DM1A、Sigma-Aldrich) を用いた。

(5) 免疫組織化学染色

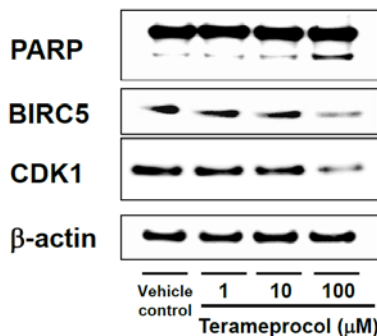
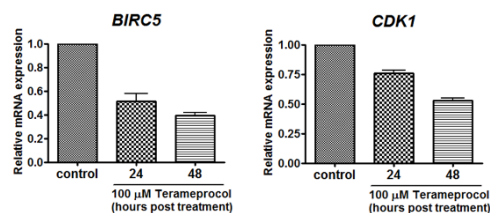
臨床検体の免疫組織化学染色は、ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を用い、Envision G2 Doublestain System (DAKO) を使用して行った。1次抗体には、mouse anti-LMP1 (CS1-4、Dako) および rabbit anti-BIRC5 (71G4B7、Cell Signaling) を用いた。

4. 研究成果

(1) SNK6 細胞株の細胞増殖能に対する Sp1 転写因子阻害薬 terameprocol および mithramycin A の効果を、MTS アッセイを用いて検討したところ、濃度依存性に細胞死をもたらすことが確認された

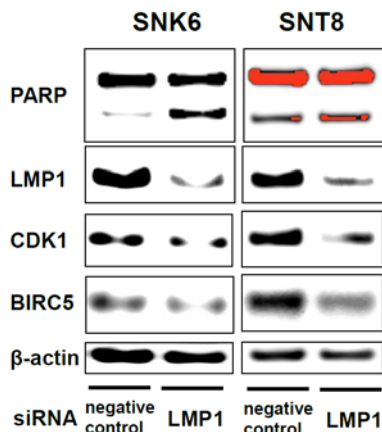


(2) terameprocol は Sp1 の阻害を介し、アポトーシスを抑制する蛋白である BIRC5 や細胞周期を促進する蛋白である CDK1 を阻害する



ことが報告されている。SNK6 腫細胞株でも検討したところ、定量リアルタイム PCR およびウェスタンブロットにより BIRC5 の発現および CDK1 の発現阻害が認められた。また同時に PARP の切断を認め、アポトーシスを誘導することがウェスタンブロット法にて確認された。

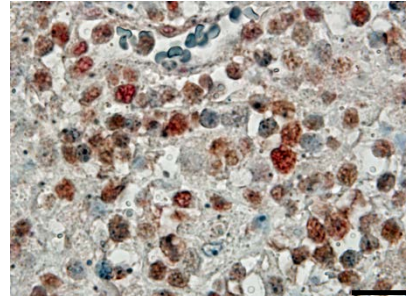
(3) LMP1 を siRNA でノックダウンした SNK6 および SNT8 細胞株を用いて、ウェスタンブ



ット法にて BIRC5 および CDK1 の発現を確認

したところ、これらの蛋白の発現低下が認められた。また同時に PARP の切断を認め、アポトーシスを来していることをウェスタンブロット法にて確認した。

(4) 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫症例より得られた摘出標本を用いた免疫組織化学染色では LMP1 陽性 (DAB) BIRC5 陽性 (Permanent Red) 細胞を認めた。



以上より本リンパ腫では LMP1 を介して BIRC5 や CDK1 の発現が亢進していることが示唆された。また Sp1 阻害薬は海外にて治験が進行しているものもあり、本リンパ腫の治療に本阻害薬を用いることが将来期待された。

<引用文献>

- ① Takahara M, 他 4 名 p53, N- and K-Ras, and beta-catenin gene mutations and prognostic factors in nasal NK/T-cell lymphoma from Hokkaido, Japan. *Hum Pathol.* 2004; 35: 86-95.
- ② Harabuchi Y, 他 5 名 Nasal natural killer (NK)/T-cell lymphoma: clinical, histological, virological, and genetic features. *Int J Clin Oncol.* 2009; 14:181-19.

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 7 件)

- ① Kumai T, Ueda S (5 番目), 他 8 名 CCL17 and CCL22/CCR4 signaling is a strong candidate for novel targeted therapy against nasal natural killer/T-cell lymphoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2015; 64:697-705. 査読有り
DOI: 10.1007/s00262-015-1675-7
- ② Azzi T, Ueda S (4 番目), 他 10 名 Role for early-differentiated natural killer cells in infectious mononucleosis. *Blood.* 2014; 124: 2533-43. 査読有り
DOI: 10.1182/blood-2014-01-553024
- ③ Komabayashi Y, Ueda S (4 番目), 他 4 名 Downregulation of miR-15a due to LMP1 promotes cell proliferation and predicts poor prognosis in nasal NK/T-cell lymphoma. *Am J Hematol.* 2014; 89:

25-33. 査読有り

DOI: 10.1002/ajh.23570

- ④ Ueda S, 他 8 名 Oropharyngeal group A streptococcal colonization disrupts latent Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis.* 2014; 209: 255-64. 査読有り
DOI: 10.1093/infdis/jit428
- ⑤ Bernasconi M, Ueda S (2 番目), 他 12 名 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.* 2013; 133: 2341-50. 査読有り
DOI: 10.1002/ijc.28239
- ⑥ Takahara M, Ueda S (5 番目), 他 5 名 Soluble ICAM-1 secretion and its functional role as an autocrine growth factor in nasal NK/T-cell lymphoma cells. *Exp Hematol.* 2013; 41: 711-8. 査読有り
DOI: 10.1016/j.exphem.2013.03.009
- ⑦ Yoshino K, Ueda S (4 番目), 他 5 名 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.* 2013; 160: 331-342. 査読有り
DOI: 10.1111/bjh.12136

[学会発表] (計 4 件)

- ① 上田 征吾, 扁桃における EB ウイルス感染防御機構の解析、第 27 回日本口腔・咽頭科学会、2014 年 9 月 11-12 日、札幌
- ② 上田 征吾, Regulation of CDK1 and BIRC5 by EBV-encoded LMP1 in nasal NK/T-cell lymphoma cells、The 16th International Symposium on EBV and Associated Diseases (EBV 2014)、2014 年 7 月 16-19 日、Brisbane (Australia)
- ③ 上田 征吾, Oropharyngeal Group A Streptococcal Colonization Disrupts Latent Epstein-Barr Virus Infection、第 42 回日本免疫学会、2013 年 12 月 11-13 日、千葉
- ④ 上田 征吾, EB ウイルス感染による扁桃 B 細胞における DNA 損傷応答の誘導、第 26 回日本口腔・咽頭科学会、2013 年 9 月 12-13 日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 征吾 (UEDA, Seigo)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：90447102