

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09927

研究課題名(和文) 感染および慢性炎症関連リンパ腫の腫瘍化機構の解明と新たな制御法開発への展開

研究課題名(英文) Oncogenesis of the infection- and chronic inflammatory-associated lymphomas and development of novel therapeutic strategy

研究代表者

大畑 雅典 (DAIBATA, Masanori)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授

研究者番号：50263976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：悪性リンパ腫の発症には、ウイルスなどの微生物感染や慢性炎症が関与することが多い。その多くはEpstein-Barr (EB) ウイルス感染を伴い、その感染と長期的な慢性炎症が腫瘍化と密接に関連する。今回、慢性炎症関連EBウイルス陽性リンパ腫細胞はケモカインCCL12とCCL22を発現し、その受容体であるCCR4陽性制御性T (Treg) 細胞を自らの腫瘍部位におびき寄せせることを見出した。免疫を抑制する働きのあるTreg細胞を腫瘍部位に遊走させることで、腫瘍が免疫の監視から逃れてがん化を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Epstein-Barr (EB) ウイルスは成人のほとんどが感染している身近なウイルスであるが、リンパ腫という血液腫瘍も発症させるウイルスである。EBウイルス関連リンパ腫の発症には、ウイルスが人の免疫機構から巧みに逃れていることが予想されているが、その詳細なメカニズムは明らかにされていなかった。今回の研究は慢性炎症関連EBウイルス陽性リンパ腫の腫瘍免疫回避機構におけるケモカイン系の役割を解明したものである。このような分子を標的にすることにより、難治性の要因となる免疫抑制的な環境を破綻させる効果が期待でき、新たな治療法の開発に向けての基盤データを提供することができた。

研究成果の概要(英文)：Diffuse large B-cell lymphomas often occur in the setting of longstanding chronic inflammation (DLBCL-CI) and shows association with Epstein-Barr virus (EBV). DLBCL-CI can develop in patients with no predisposing immunodeficiency. This study aimed to investigate the mechanism by which the lymphoma cells escape from the host's immune evasion. EBV-positive pyothorax-associated lymphoma (PAL) is a prototype of DLBCL-CI and may provide a valuable model for the study of immune evasion by DLBCL-CI. This study demonstrates that PAL cell lines express and produce CCL17 and/or CCL22 chemokines, the ligands of CCR4, in contrast to EBV-negative DLBCL cell lines. PAL cells injected into mice attracted CCR4-expressing Treg cells. The CCR4 antagonist significantly suppressed the recruitment of Treg cells by PAL cells. Furthermore, CCR4-expressing Treg cells were abundantly present in primary PAL tissues. Collectively, these findings provide new insight into the mechanisms of immune evasion by PAL.

研究分野：血液腫瘍学、ウイルス学

キーワード：悪性リンパ腫 ウイルス 感染症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫の発症には、細菌やウイルスなどの微生物感染や慢性炎症が関与することが多い。びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫( Diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)においても、WHO 分類改定第 4 版(2017 年)で「DLBCL associated with chronic inflammation (DLBCL-CI)」というカテゴリーが新たに設けられ、昨今注目を集めている。

本研究では、(1)を主に 3 つの研究課題を設定し、遂行した。

(1) DLBCL-CI の多くは Epstein-Barr (EB) ウイルス感染を伴い、その感染と長期的な慢性炎症が発がんや密接に関連する。このような微生物感染を基盤に発症する悪性リンパ腫は明確な免疫不全をもたらす基礎疾患を背景にもたない免疫適格患者においても発症することが特徴である。その発症要因として、腫瘍の有する局所免疫抑制機構の存在が示唆されている。DLBCL-CI のひとつである膿胸関連リンパ腫 (pyothorax-associated lymphoma: PAL) では、腫瘍細胞が免疫抑制性インターロイキンである IL-10 を産生することや、細胞傷害性リンパ球による抗腫瘍免疫応答に関与する MHC クラス I 分子の発現レベルが低下していることが示されている。これらの所見は、慢性炎症を基盤とした腫瘍微小環境にある PAL 細胞が宿主の免疫監視から逃れられることを示唆するが、この腫瘍免疫回避に関与する詳細なメカニズムは解明されていなかった。

(2) B 細胞リンパ腫に限らず、T 細胞リンパ腫においても慢性炎症を背景にして発症することがある。その代表は皮膚 T 細胞リンパ腫の中で最も頻度が高い菌状息肉症であると考えられる。菌状息肉症は腫瘍でありながら炎症性の多彩な細胞浸潤を混在し、多彩な臨床像を呈し長期的な経過をとる症例が多いのが特徴である。しかしながら、菌状息肉症と皮膚ウイルスの関係については不明であった。

(3) Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT リンパ腫) の多くも慢性炎症を基盤に発症することが知られている。しかしながら、これら慢性炎症関連リンパ腫の腫瘍化機構については未解決な点が多く残されていた。

## 2. 研究の目的

(1) 炎症局所への免疫細胞遊走で重要な役割を担うケモカインはウイルス感染細胞でその産生が亢進するが、ウイルス発がんにおけるケモカイン発現制御機構や役割に関する詳細は解明されていない。したがって、DLBCL-CI の腫瘍形成をよりよく理解することは、このような節外性悪性リンパ腫における局所免疫抑制機構の解明とその機構の破綻を狙った新規治療標的の発見につながる。そこで本研究では、ケモカイン・ケモカイン受容体の発現パターンを詳細に解析することにより、DLBCL-CI における腫瘍免疫回避機構を明らかにし、新しい治療法の開発につながる基盤研究成果を得ることを目的にした。

(2) 菌状息肉症と皮膚に常在するウイルスとの関係について調べることを目的にした。皮膚指向性常在ウイルスの中で主要な構成要員であるポリオーマウイルス科のメルケル細胞ポリオーマウイルス (MCPyV)、ヒトポリオーマウイルス 6 型 (HPyV6)、ヒトポリオーマウイルス 7 型 (HPyV7) について調べた。

(3) 胃 MALT リンパ腫は *Helicobacter pylori* (ピロリ菌) 感染による慢性炎症と密接な関係にある。一方、EB ウイルスは胃上皮細胞に感染し、その持続感染が胃上皮細胞のがん化に関わる。胃 MALT リンパ腫においてもピロリ菌に加えて EB ウイルスが直接的あるいは間接的に何らかの関与をしている可能性も想定される。しかしながら、これを立証するために適した胃 MALT リンパ腫モデルは存在しない。そこで今回は EBV 感染胃上皮細胞を用いてピロリ菌が EBV 遺伝子発現に及ぼす影響について解析した。

## 3. 研究の方法

(1) 先ず DLBCL-CI の代表である PAL 細胞株を使って、ケモカイン・ケモカイン受容体の発現を調べた。本研究で使用した PAL 細胞株は、OPL-1、OPL-2、OPL3.2、OPL-5、OPL-7、Pal-2、Deglis の 7 つである。その対照として、HT、MHH-PREB-1、Nu-DHL-1、Nu-DUL-1、Su-DHL-5、Su-DHL-6、Du-DHL-10、Su-DHL-16、WSu-DLCL-2 の 9 つの EB ウイルス陰性 DLBCL 株を使用した。その遺伝子発現を定量的リアルタイム PCR 法で、蛋白の発現分泌を ELISA 法で調べた。その結果を基に、ケモカインチャンパーおよびマウス *in vivo* 解析系を使って細胞遊走アッセイを行った。次に、これらの結果を確かめるために、患者リンパ腫組織におけるケモカイン発現および浸潤細胞の同定を免疫組織染色法で解析した。

(2) 菌状息肉症患者の皮膚より皮膚スワブを採取して、これらウイルスゲノムの検出率およびウイルス量を定量的リアルタイム PCR 法で解析した。対照群として菌状息肉症患者年齢とマッチさせた健常者皮膚からも同様にスワブを採取した。

(3) EB ウイルス感染細胞に種々のピロリ菌株を暴露して培養を行い、48 時間後に EB ウイルス遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1)

PAL 細胞は他のタイプの EB ウイルス陰性 DLBCL 細胞と比べて、ケモカイン CCL17 と CCL22 を強く発現・分泌していた。ヒト末梢血単核球を使った細胞遊走アッセイでは、PAL 細胞培養上清は、CCL17 と CCL22 の受容体である CCR4 を発現する制御性 T(regulatory T: Treg) 細胞を効果的に誘引した。CCR4 阻害薬はその CCR4 陽性 Treg 細胞の遊走を有意に抑制した。

PAL 細胞をマウス腹腔内に投与すると、CCR4 陽性 Treg 細胞が腹腔内に遊走することが示された。この現象は CCR4 阻害薬によって有意に抑制された。

PAL 患者の病変組織では、実際にリンパ腫細胞が CCL17 と CCL22 を高発現しており、その腫瘍組織には CCR4 陽性 Treg 細胞の浸潤が確認された。

以上の結果を基に、以下の結論を導いた。

PAL 細胞による CCL17 および CCL22 の産生は、抗腫瘍免疫の回避に寄与する可能性がある。本研究の成果は、EB ウイルス陽性炎症関連リンパ腫での腫瘍微小環境の構築による腫瘍免疫回避機構の一端に腫瘍細胞によるケモカイン産生が深く関わることを示唆する。

CCR4 を標的とすることで、抗腫瘍免疫抑制の破綻を狙った難治性の EB ウイルス陽性炎症関連リンパ腫に対する新規治療指針の基盤形成への展開が可能である。

(2) HPyV6 と HPyV7 に関しては有意な変動はみられなかったが、菌状息肉症患者の皮膚では統計学的有意差をもって MCPyV の検出率、ウイルス量ともに低下していた。類乾癬は菌状息肉症へ移行する前病変的発疹とされるが、類乾癬患者皮膚においても同様に MCPyV 検出率・量は低下していた。これらの結果は菌状息肉症においてはポリオーマウイルスのバランス変動が生じていることを示している。このことが疾患の発症に関与するのか、あるいは結果としての現象なのか今後の課題である。

(3) 共培養したピロリ菌株によっては、EBV Latent membrane protein (LMP) 1 および LMP2A の発現を有意に増加させるピロリ菌株があることが判明した。これは胃に存在するピロリ菌と EBV が作用し合う可能性を示唆する所見であった。これら細菌とウイルスの共生が胃 MALT リンパ腫の病態にどのような影響を及ぼすのかが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yumiko Hashida, Tomonori Higuchi, Moe Tanaka, Yuka Shibata, Kimiko Nakajima, Shigetoshi Sano, Masanori Daibata.	4. 巻 219
2. 論文標題 Prevalence and Viral Loads of Cutaneous Human Polyomaviruses in the Skin of Patients With Chronic Inflammatory Skin Diseases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1564-1573
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/infdis/jiy618	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tomonori Higuchi, Kazuhiko Matsuo, Yumiko Hashida, Kosuke Kitahata, Takako Ujihara, Ayuko Taniguchi, Osamu Yoshie, Takashi Nakayama, Masanori Daibata.	4. 巻 453
2. 論文標題 Epstein-Barr virus-positive pyothorax-associated lymphoma expresses CCL17 and CCL22 chemokines that attract CCR4-expressing regulatory T cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 184-192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2019.03.053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Isao Miyoshi, Masakazu Mori, Ichiro Yamasaki, Masanori Daibata.	4. 巻 60
2. 論文標題 Is There an Entity of Radiation-Induced Chronic Myeloid Leukemia? Report of a Case and Brief Review of the Literature.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical and Experimental Hematopathology.	6. 最初と最後の頁 24-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3960/jslrt.19044	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 Yumiko Hashida, Tomonori Higuchi, Kimiko Nakajima, Takako Ujihara, Ichiro Murakami, Mikiya Fujieda, Shigetoshi Sano, Masanori Daibata.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Human polyomavirus 6 with the Asian/Japanese genotype in cases of Kimura disease and angiolymphoid hyperplasia with eosinophilia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2019.12.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroaki Kikuchi, Tomonori Higuchi, Yumiko Hashida, Ayuko Taniguchi, Mikio Kamioka, Takahiro Taguchi, Akihito Yokoyama, Ichiro Murakami, Mikiya Fujieda, Masanori Daibata.	4. 巻 9
2. 論文標題 Generation and characteristics of a novel "double-hit" high grade B-cell lymphoma cell line DH-My6 with MYC/IGH and BCL6/IGH gene arrangements and potential molecular targeted therapies.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 33482-33499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26060	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 Ichiro Murakami, Noriko Wada, Junko Nakashima, Mitsuko Iguchi, Makoto Toi, Yumiko Hashida, Tomonori Higuchi, Masanori Daibata, et al.	4. 巻 16
2. 論文標題 Merkel cell polyomavirus and Langerhans cell neoplasm.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12964-018-0261-y	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 Yumiko Hashida, Tomonori Higuchi, Kiyohiko Matsui, Yuka Shibata, Kimiko Nakajima, Shigetoshi Sano, Masanori Daibata.	4. 巻 217
2. 論文標題 Genetic Variability of the Noncoding Control Region of Cutaneous Merkel Cell Polyomavirus: Identification of Geographically-Related Genotypes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1601-1611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jiy070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujieda Mikiya, Tsuruga Kazushi, Sato Tetsuya, Kikuchi Hiroaki, Tamaki Wataru, Ishihara Masayuki, Yamamoto Masaki, Oishi Taku, Tanaka Hiroshi, Daibata Masanori	4. 巻 27
2. 論文標題 Monitoring of Epstein-Barr virus load and killer T cells in patients with juvenile idiopathic arthritis treated with methotrexate or tocilizumab	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 66 ~ 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2016.1177247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashida Masahiko, Daibata Masanori, Tagami Erika, Taguchi Takahiro, Maekawa Fumiyo, Takeoka Kayo, Fukutsuka Katsuhiko, Shimomura Daiki, Hayashi Takamasa, Iwatani Yoshinori, Ohno Hitoshi	4. 巻 35
2. 論文標題 Establishment and characterization of a novel Hodgkin lymphoma cell line, AM-HLH, carrying the Epstein-Barr virus genome integrated into the host chromosome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hematological Oncology	6. 最初と最後の頁 567 ~ 575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hon.2369	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 Higuchi Tomonori, Hashida Yumiko, Taniguchi Ayuko, Kamioka Mikio, Daibata Masanori	4. 巻 7
2. 論文標題 Differential gene expression profiling linked to tumor progression of splenic marginal zone lymphoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-11389-5	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 Hashida Yumiko, Higuchi Tomonori, Matsuzaki Shigenobu, Nakajima Kimiko, Sano Shigetoshi, Daibata Masanori	4. 巻 217
2. 論文標題 Prevalence and Genetic Variability of Human Polyomaviruses 6 and 7 in Healthy Skin Among Asymptomatic Individuals	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 483 ~ 493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jix516	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yumiko Hashida, Tomonori Higuchi, Masanori Daibata.
2. 発表標題 Epidemiological investigation of Merkel cell polyomavirus infection levels in the human skin.
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuka Shibata, Yumiko Hashida, Tomonori Higuchi, Moe Tanaka, Kimiko Nakajima, Masanori Daibata, Shigetoshi Sano.
2. 発表標題 revalence and viral loads of cutaneous human polyomaviruses in the skin of patients with chronic inflammatory skin diseases.
3. 学会等名 第118回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomonori Higuchi, Yumiko Hashida, Takako Ujihara, Ayuko Taniguchi, Takashi Nakayama and Masanori Daibata.
2. 発表標題 EBV+ pyothorax-associated lymphoma expresses CCL17 and CCL22 chemokines that recruit CCR4+ regulatory T cells.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yumiko Hashida, Tomonori Higuchi, Tomohiro Nishimori, Masanori Daibata.
2. 発表標題 Epidemiological study of human polyomavirus 6 and human polyomavirus 7 in normal skin of healthy individuals.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomonori Higuchi, Yumiko Hashida, Tomohiro Nishimori and Masanori Daibata.
2. 発表標題 Expression of CCL17 and CCL22 chemokines in EBV-positive pyothorax-associated lymphoma attracts CCR4-expressing regulatory T cells.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyohiko Matsui, Chang-Kweng Lim, Shigeru Tajima, Masanori Daibata.
2. 発表標題 Activity situation of Japanese encephalitis virus in Kochi prefecture from 2016 to 2018.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shingo Ashida, Chiaki Kawada, Keiji Inoue, Masanori Daibata, Hidewaki Nakagawa.
2. 発表標題 RNA-seq analysis identified candidate pathogens for prostate cancer.
3. 学会等名 AACR Special Conference on The Microbiome, Viruses, and Cancer. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomonori Higuchi, Hiroaki Kikuchi, Yumiko Hashida, Ayuko Taniguchi, Mikio Kamioka, Takahiro Taguchi, Ichiro Murakami, Masanori Daibata.
2. 発表標題 Antiproliferative effects of MYC/PLK1 inhibitions in a cell line derived from lymphoma with MYC/BCL6 rearrangements.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yumiko Hashida, Tomonori Higuchi, Shigenobu Matsuzaki, Masanori Daibata.
2. 発表標題 Quantification of MCPyV DNA loads in the tumor tissues and nonlesional skins of patients with Merkel cell carcinoma.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Yumiko Hashida, Tomonori Higuchi, Kiyohiko Matsui, Masanori Daibata.
2. 発表標題 Genetic variability of the noncoding control region of cutaneous Merkel cell polyomavirus.
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Higuchi Tomonori, Hashida Yumiko, Kamioka Mikio, Taniguchi Ayuko, Daibata Masanori
2. 発表標題 PLK1 upregulation promotes cell proliferation and survival in advanced splenic marginal zone lymphoma
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hashida Yumiko, Higuchi Tomonori, Matsuzaki Shigenobu, Daibata Masanori
2. 発表標題 The relationship between loads of Merkel cell polyomavirus and carcinogenesis
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hashida Yumiko, Higuchi Tomonori, Matsuzaki Shigenobu, Nakajima Kimiko, Sano Shigetoshi, Daibata Masanori
2. 発表標題 High load of MCPyV in the nonlesional skin of patients with Merkel cell carcinoma and among a cohort of asymptomatic elderly individuals
3. 学会等名 第42回日本研究皮膚科学会 年次学術大会・総会
4. 発表年 2017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	松崎 茂展  (MATSUZAKI Shigenobu)  (00190439)	高知大学・医学部・特任准教授   (16401)	
研究分担者	樋口 智紀  (HIGUCHI Tomonori)  (00448771)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教   (16401)	
研究分担者	橋田 裕美子  (HASHIDA Yumiko)  (00767999)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教   (16401)	