

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462576

研究課題名(和文) 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるCD70に対する分子標的治療の検討

研究課題名(英文) Examination of the molecular target treatment for CD70 in the nasal NK/T cell lymphoma

研究代表者

岸部 幹 (Kishibe, Kan)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：80447101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：NOGマウスに鼻性NK/T細胞リンパ腫の細胞株であるSNK-6を皮下に接種したところ、皮下に腫瘍が形成されるのが確認され、腫瘍は経時的に増大し、病理組織学的な検討により、形態学的に鼻性NK/T細胞リンパ腫の患者で得られる組織と矛盾しない所見であった。また、生着した腫瘍について移植腫瘍組織の免疫染色を施行したところ、in vitroでの結果と同様に、移植腫瘍でもCD70の発現がみられた。

研究成果の概要(英文)：I investigated a murine xenograft in vivo model, using NOD/Shi-scid/IL-2R null (NOG) mice inoculated subcutaneously with SNK-6 that was established from primary site of the nasal NK/T cell lymphoma (NNKTL). Tumor formation at the inoculated site was detectable in all of the NOG mice. Histologically, the tumor was formed by atypical lymphoid cells that were positive for EBER and CD56. These characteristics were similar to those of the malignant cells that form the tumor tissue of NNKTL patients. Immunohistological staining was performed to analyze CD70 expression in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections prepared from the subcutaneous tumor. These neoplastic cells clearly expressed CD70. These results suggest that not only cultured SNK-6 cells but also the SNK-6 tumor in the in vivo xenograft model could express CD70.

研究分野：腫瘍学

キーワード：鼻性NK/T細胞リンパ腫 悪性リンパ腫 CD70 EBV 抗体療法

1. 研究開始当初の背景

(1) 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫について

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が特徴で腫瘍の起源として、NK 細胞あるいは T 細胞由来があり、その発症には Epstein-Barr virus (EBV) が関与するとされている。また多臓器不全により予後は極めて不良なリンパ腫である。また、本疾患に対する治療については、CD20 陽性悪性リンパ腫におけるリツキシマブのような分子特異的な治療もまだ開発されてはならず、未だに従来の化学療法と照射が治療の中心である。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。

そこで、これまでに当科では、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株と正常な人の末梢血リンパ球にて、cDNA array を用いてその遺伝子発現差をスクリーニングした。その結果、正常の末梢血リンパ球と腫瘍細胞株で発現差のある候補遺伝子が複数個検出された。その中に、CD70 の発現上昇も検出された。

(2) CD70 について

CD70 は、CD27 (TNF レセプターファミリー) のリガンドであり、正常では活性化 T 細胞、B 細胞などの限られた細胞にのみ発現する。CD70 の機能は T 細胞と B 細胞いずれの場合にも CD27 との相互作用によって現れ、CD70-CD27 結合刺激により細胞の分化・増殖もしくは逆の作用であるアポトーシスが誘導されると考えられている。また、CD70 は上咽頭癌、ホジキン病といった EB ウイルス関連腫瘍における発現が報告されており、LMP-1 による発現誘導が示唆されている。しかし、一部の悪性リンパ腫では CD70 の発現が増強しているにもかかわらず CD27 の発現が低下しており、アポトーシスを回避し、その発症に関与していると考えられている。また、CD70 は腎癌で高発現する分子であり、欧米では CD70 に対するモノクローナル抗体を用いた腎癌での抗体療法の臨床治験が開始されている。これまでの当教室での本研究に関連する成果として、臨床組織検体を用いた免疫染色においても CD70 の腫瘍細胞での発現が確認され、CD70 のリガンドである CD27 の発現は鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株で認められなかった。CD27 の由来として、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者血清での CD27 の発現を検討したところ、正常人と比べ可溶性 CD27 の有意な上昇を認めた。また、可溶性 CD27 での細胞株の刺激では、CD70 陽性鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株において増殖を示した。以上から、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫では、CD70 の発現を認め、CD70 は腫瘍細胞の増殖に関与していると考えられた。また、*in vitro* 下に補体投与下での抗 CD70 抗体刺激実験をおこなったところ、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株では、生細胞数の減少を示したことから、本腫瘍では抗 CD70 抗体による補体依存性細胞障害活性を認め、抗体療法の可能性が示唆

された。

2. 研究の目的

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫での CD70 を標的とした抗体療法が可能か検討する。

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫は、稀なリンパ腫ではあるが、その発生に地域差があり、アジアと南米に多い。そのため、本国で本疾患の研究をすすめることは意義のあることと考える。また、稀な疾患であり、地域差もあるため、他の腫瘍よりも分子生物学的な研究が進んでおらず、しかも、本疾患は化学療法や放射線療法など種々の治療に抵抗性で、予後が非常に悪い。よって、CD70 に対する本疾患での抗体療法が可能であれば、本疾患に対する分子標的治療薬の開発につながると推測される。このことから、この予後不良の疾患の予後が改善されると考えられる。

3. 研究の方法

(1) SCID マウスに鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の細胞株を移植する

SCID マウスに 2×10^6 個の鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株である SNK-6 を腹部皮下に接種した。

(2) NOD/Shi-scid/IL-2R null (NOG) マウスに鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の細胞株を移植する

NOG マウスに 2×10^6 個の鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株である SNK-6 を腹部皮下に接種した。

(3) マウスに生着した腫瘍細胞が、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の患者で得られる腫瘍細胞と矛盾がないか、HE 染色、免疫染色、EBV EBER-ISH について検討する

マウスを腫瘍細胞接種 30 日後に屠殺し、皮下の腫瘍を切除した。摘出した腫瘍にてホルマリン固定薄切標本を作製し、HE 染色を行い、腫瘍が鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の患者で得られる腫瘍細胞と矛盾がないか検討した。また、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞で陽性となる CD56、EBV EBER-ISH について CD56 免疫染色、EBV EBER-ISH を行い検討した。

CD56 免疫染色

CD56 の免疫染色は、ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を用い、Envision HRP System (DAKO 社) を使用して行った。1 次抗体として、mouse monoclonal anti-CD56 antibody (Novocastra 社) を 50 倍希釈し用いた。

EBV EBER-ISH

EBV EBER-ISH については、以前に報告のあった論文¹⁾に基づいて行った。

(4) マウスに生着した腫瘍細胞に、*in vitro* 同様に CD70 の発現がみられるか検討する

マウスを腫瘍細胞接種 30 日後に屠殺し、皮下の腫瘍を切除した。摘出した腫瘍にてフ

ホルマリン固定薄切標本を作製し、CD70 免疫染色を行い、in vivo でも in vitro 同様に腫瘍細胞が CD70 を発現しているか検討した。

CD70 免疫染色

CD70 の免疫染色は、ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を用い、Envision HRP System (DAKO 社) を使用して行った。1 次抗体として、mouse monoclonal anti-CD70 antibody (R&D Systems 社) を 100 倍希釈し用いた。

4. 研究成果

(1) SCID マウスには鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の細胞株は生着しなかった

SCID マウスに鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の細胞株を皮下に接種するも、皮下に腫瘍は形成されず、組織学的にも腫瘍細胞は認められなかった。そこで、SCID マウスよりも、より高度に免疫不全のマウスである NOG マウスを使用することとした。NOG マウスは、SCID マウスよりも、厳密な飼育環境が必要であり、飼育環境の整備も必要となった。

(2) NOG マウスには、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の細胞株の生着が見られた

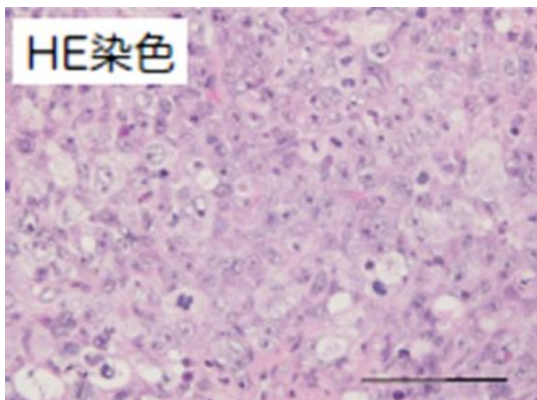
マウスを鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の細胞株接種後より、腹部皮下に腫瘍が出現し、経時的に増大した(下図)。腫瘍細胞が生着しているものと思われたため、本マウスを用いて実験を進めることとした。



(3) NOG マウスに生着した鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の腫瘍細胞は、本疾患の患者で得られる腫瘍細胞と類似していた

HE 染色での類似性

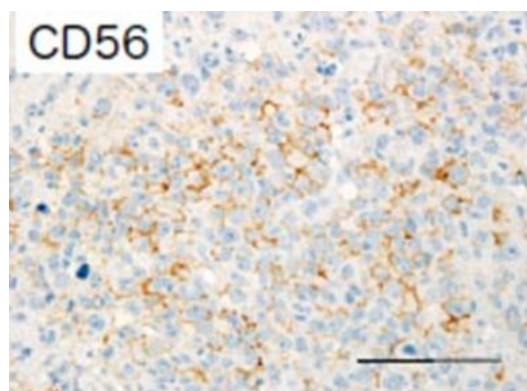
HE 染色の結果を、下図に示す。



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認められる腫瘍細胞と矛

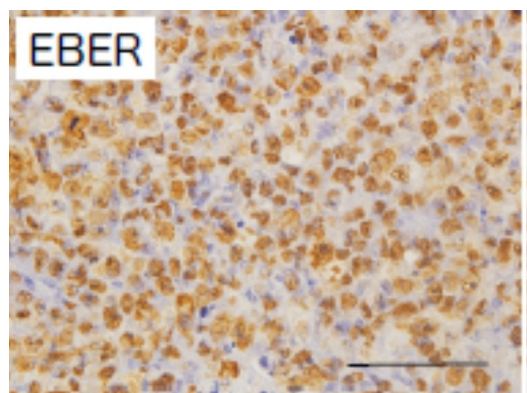
盾しない所見であった。

生着した細胞株は CD56 陽性であった CD56 免疫染色の結果を下図に示す。



腫瘍細胞に一致して、CD56 の発現を認め、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者組織に認められる腫瘍細胞と矛盾しない所見であった。

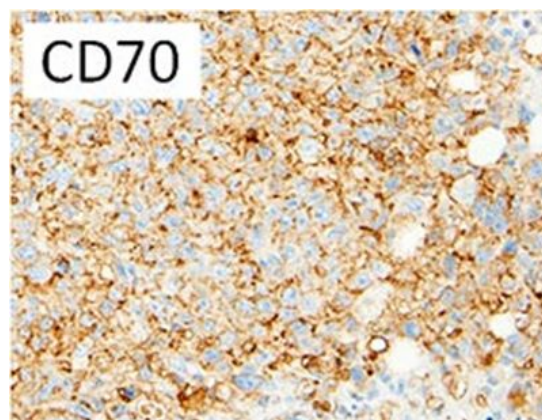
生着した細胞株は EBV EBER-ISH であった EBV EBER-ISH の結果を下図に示す。



腫瘍細胞に一致して、EBV 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、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者組織に認められる腫瘍細胞と矛盾しない所見であった。

(4) NOG マウスに生着した鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の細胞株は、in vitro と同様に CD70 を発現していた

CD70 免疫染色の結果を下図に示す。



以上の結果から、NOG マウスに生着した鼻性NK/T細胞リンパ腫は、鼻性NK/T細胞リンパ腫の患者で得られる腫瘍細胞と類似した特徴を有し、EBVの感染やCD70の発現も保たれていることが判明した。

今後、抗CD70抗体を用いた抗体療法のin vivoでの抗腫瘍効果について検討する。鼻性NK/T細胞リンパ腫は、多臓器不全により予後は極めて不良なリンパ腫であり、本疾患に対する治療については、CD20陽性悪性リンパ腫におけるリツキシマブのような分子特異的な治療もまだ開発されてはならず、未だに従来の化学療法と照射が治療の中心である。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おり、本研究の成功により、本疾患に対する分子特異的な治療の開発が見込まれる。当教室では、この異種腫瘍移植マウスを用いて、すでに薬剤の抗腫瘍効果について実験を行い成果が得られている。今後、抗CD70抗体を用いた抗体療法の実現に向けて研究を重ねていく。

<引用文献>

- 1) Harabuchi Y, Imai S, Wakashima J, Hirao M, Kataura A, Osato T, Kon S (1996) Nasal T-cell lymphoma causally associated with Epstein-Barr virus: clinicopathologic, phenotypic, and genotypic studies. Cancer 77:2137-2149.

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1件)

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. Programmed death-ligand 1 and its soluble form are highly expressed in nasal natural killer/T-cell lymphoma: a potential rationale for immunotherapy. Cancer Immunol Immunother. 査読有、2017, DOI 10.1007/s00262-017-1987

[学会発表](計2件)

Kishibe, K. Komabayashi, Y. Nagato, T. Ueda, S. Takahara, M. Harabuchi, Y. Diagnostic values of circulating Epstein-Barr virus encoded microRNAs as potential biomarkers for nasal natural killer/T-cell lymphoma. EBV 2016, 2016年8月8日 12日、Zurich (Swiss)
原淵保明、進行性鼻壊疽から鼻性NK/T細

胞リンパ腫へ、第117回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会、2016年5月18日 21日、名古屋

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸部 幹 (KISHIBE KAN)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：80447071