

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20174

研究課題名(和文) 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるIAPファミリーの発現

研究課題名(英文) Upregulation of members of IAP family in nasal NK/T cell lymphoma

研究代表者

上田 征吾 (Seigo, Ueda)

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) 1,400,000円

研究成果の概要(和文)：EBウイルスは癌原性の一面を持ち、悪性疾患の発生源地となりうる。その原因の一つに、B細胞における検討ではIAP(inhibitor of apoptosis)ファミリー分子の発現が関与していると考えられる。そこで耳鼻咽喉頭頸部領域におけるEBウイルス陽性の代表的悪性疾患である鼻性NK/T細胞リンパ腫において、IAPファミリー発現の検討を行った。その結果本疾患ではIAPファミリーの発現亢進を認め、このうちサバイピンはEBウイルス潜伏感染遺伝子LMP1を介して発現することを同定した。またサバイピンの阻害薬(ミトラマイシン)は細胞株および異種移植マウスモデルにおいて細胞増殖抑制効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：Nasal NK/T-cell lymphoma (NNKTL) is closely associated with Epstein-Barr virus (EBV) and characterized by poor prognosis resulting from rapid progression of the lesion in affected organs. NNKTL is categorized as type II latency of EBV infection and the lymphoma cells express EBV-encoded LMP1, which is regarded as an oncoprotein. Here, we show that NNKTL cells expressed BIRC3, survivin, and XIAP, which are members of inhibitor of apoptosis (IAP) family. Of these, survivin was upregulated by LMP1 in NNKTL cells, and inhibition of survivin in NNKTL cells by several inhibitors lead to decrease in cell proliferation dose-dependently. Moreover, mithramycin, one of these inhibitors, significantly inhibited the growth of established tumor in NOG mice. Our results suggest that LMP1 upregulates survivin expression, and this upregulation is essential for NNKTL growth. Thus, targeting survivin by using mithramycin might be an effective approach to treat NNKTL that is hallmarked by poor prognosis.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：鼻性NK/T細胞リンパ腫 IAPファミリー EBウイルス サバイピン ミトラマイシン

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する、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、EB ウイルス 2 型潜伏感染を呈する。その潜伏感染遺伝子のうち LMP1 が本リンパ腫の発症に関与していることが考えられている。

(2) 我々はこれまで B 細胞への EB ウイルス感染時に、アポトーシスの抑制に働く inhibitor of apoptosis (IAP) ファミリーの一つであるサバイビン (BIRC5) の発現亢進を同定し、移植後リンパ増殖疾患の治療ターゲットとなりうることを報告している。また IAP ファミリー分子は他癌腫においても発現亢進が報告され、同分子をターゲットとした分子標的薬も種々開発・臨床試験が行われており、今後の臨床応用が期待されている。しかしながら鼻性 NK/T 細胞リンパ腫においては国内外含め詳細な研究がなされておらず、今回の研究目的とするに至った。

2. 研究の目的

(1) 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株および本疾患の臨床検体において、IAP ファミリー分子の発現を確認し、EB ウイルス潜伏感染遺伝子との関連を検討する。

(2) IAP ファミリー分子に対する各種阻害薬を用い、本疾患細胞株に対する増殖抑制効果を *in vitro* および *in vivo* で検討する。

3. 研究の方法

(1) RNA 抽出とマイクロアレイ解析および定量リアルタイム 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。マイクロアレイ解析には IL-2 を添加ある・なしで培養した細胞株から全 RNA を抽出し、Affymetrix 社の Human Genome U133A 2.0 Array を用いて解析した。定量リアルタイム PCR には LMP1、BIRC5 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。

(2) 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、SNK-6 と SNT-8 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。YM155 (Selleck Chemicals)、テラメプロコール (Sigma-Aldrich) およびミトラマイシン (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) を用い、エレクトロポレーション法にて、LMP1 の siRNA (Applied Biosystems) を導入した。

(3) 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。

(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-survivin (71G4B7, 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-survivin (71G4B7, Cell Signaling) を用いた。

(6) 異種移植マウスモデル

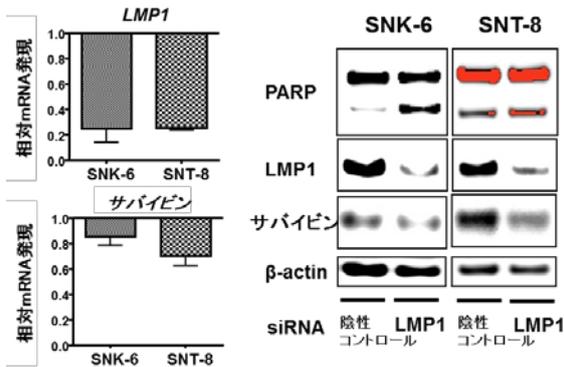
生後 6 週の雌 NOG マウス (実中研) に 5×10^6 個の SNK-6 を側腹部皮下に移植した。腫瘍サイズが 25 mm² となった日を day 0 とし、0.2 mg/kg のミトラマイシン (対照群には PBS) を経尾静脈的に週 3 回投与し、経時的に腫瘍サイズを計測した。対照群の腫瘍サイズが 400 mm² となった時点で両群のマウスを sacrifice し、腫瘍の重量を計測した。

4. 研究成果

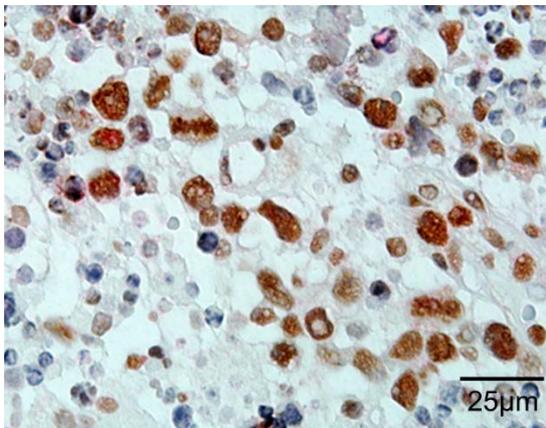
(1) SNK-6 細胞は IL-2 依存性であり、IL-2 を枯渇するとアポトーシスをきたす。そのため IL-2 投与群と IL-2 非投与群で、マイクロアレイ解析を行い、IAP ファミリーの遺伝子発現を検討した。その結果 IAP ファミリーの baculoviral IAP repeat-containing (BIRC) 3、BIRC5 (サバイビン)、X-linked IAP (XIAP) の発現 (表) が IL-2 枯渇により有意に発現低下を認め、これらの発現によりアポトーシスが抑制されていることが示唆された。

Gene Symbol	Alias	p-Value	fold change
BIRC2	c-IAP1	0.17149	-1.135262
BIRC3	c-IAP2	0.03934	-2.388465
BIRC5	survivin	0.03366	-1.850945
NAIP	BIRC1	0.60918	1.309478
XIAP	BIRC4	0.02203	-3.111854

(2) IAP ファミリーのうちサバイビン、EB ウイルス関連悪性腫瘍である上咽頭癌において、EB ウイルス潜伏感染遺伝子の LMP1 がその発現に関与することが報告されている。そのため本疾患でも LMP1 とサバイビンの発現に関連があるか、LMP1 を siRNA でノックダウンした SNK-6 および SNT-8 細胞株を用いて、定量リアルタイム PCR およびウェスタンブロット法にてサバイビンの発現を確認した。その結果 LMP1 発現低下に伴い、サバイビン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確認した。

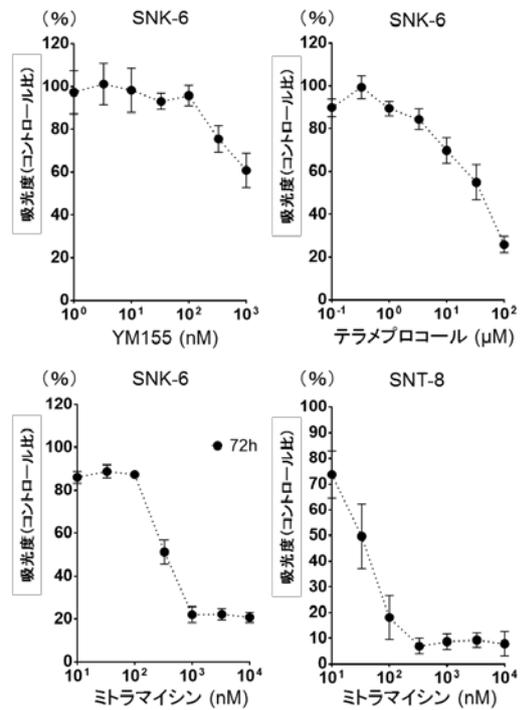


(3) 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫症例より得られた摘出標本を用いた免疫組織化学染色では LMP1 陽性 (DAB) サバイビン陽性 (Permanent Red) 細胞を、LMP1 陽性 6 例中、5 例に認めた。

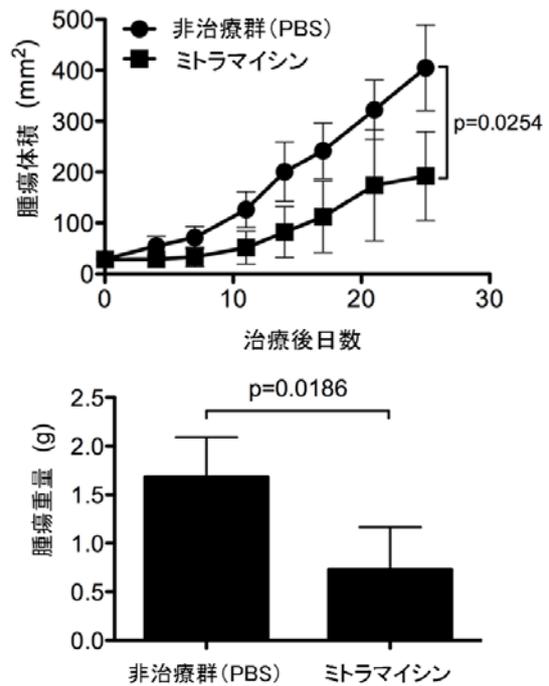


(4) SNK6 細胞株の細胞増殖能に対するサバイビン阻害薬 YM155、テラメプロコールおよびミトラマイシンの効果を、MTS アッセイを用いて検討したところ、濃度依存性に増殖抑制をもたらすことが確認された。そのうちミトラ

マイシンは低濃度で 20%以下の増殖抑制を認めた。



(5) SNK-6 細胞を NOG マウスに異種移植したマウスモデルにおいて、サバイビン阻害作用のあるミトラマイシンを投与したところ、経時的な腫瘍体積および腫瘍重量ともに有意に増殖抑制効果を確認した。



以上より本リンパ腫では LMP1 を介してサバイビンの発現が亢進し、アポトーシス抑制に働くことで腫瘍増殖に寄与していることが示唆された。またサバイビン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 Bernasconi M, Ueda S, 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.
- 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 5 件)

- ① Nagato T, Ueda S (7 番目), 他 18 名 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*. 2017; Epub ahead of print. 査読有り
DOI: 10.1007/s00262-017-1987-x
- ② Otaka R, Ueda S (3 番目), 他 7 名 Up-regulation of CX3CR1 on tonsillar CD8-positive cells in patients with IgA nephropathy. *Hum Immunol*. 2017; 78: 375-383. 査読有り
DOI: 10.1016/j.humimm.2017.02.004
- ③ Mordasini V, Ueda S, 他 7 名 Activation of ATR-Chk1 pathway facilitates EBV-mediated transformation of primary tonsillar B-cells. *Oncotarget*. 2017; Epub ahead of print. 査読あり
DOI: 10.18632/oncotarget.14120
- ④ Komabayashi Y, Ueda S (4 番目), 他 4 名 Circulating Epstein-Barr virus-encoded micro-RNAs as potential biomarkers for nasal natural killer/T-cell lymphoma. *Hematol Oncol*. 2016; Epub ahead of print. 査読あり
DOI: 10.1002/hon.2360
- ⑤ Takahara M, Ueda S (4 番目), 他 6 名 Novel treatment for early-stage nasal natural killer/T-cell lymphoma: intra-maxillary arterial infusion chemotherapy with concomitant radiotherapy. *Hematol Oncol*. 2016; Epub ahead of print. 査読あり
DOI: 10.1002/hon.2273

[学会発表] (計 2 件)

- ① Ueda S, Regulation of CDK1 and Survivin by EBV-encoded LMP1 in nasal NK/T-cell lymphoma cells, The 17th International Symposium on EBV and Associated Diseases (EBV 2016)、2016 年 8 月 8-12 日、Zurich (Switzerland)
- ② 上田 征吾、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における CDK1 とサバイビンの発現、第 117 回日本耳鼻咽喉科学会総会、2016 年 5 月 18-21 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