

機関番号：10107

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21791583

研究課題名(和文)鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における EB ウイルス膜蛋白の制御機構と機能解析

研究課題名(英文)Regulation mechanism and function of Latent Membrane protein of Epstein-Barr Virus in nasal NK/T cell lymphoma cells.

研究代表者 高原 幹 (Miki Takahara)
 旭川医科大学・医学部・助教
 研究者番号：50322904

研究成果の概要 (和文)：

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫は非常に予後が悪い EBV 発癌リンパ腫である。LMP1 は EBV 由来の癌原性蛋白であり、以前の検討にて IL-2, 10, 15 などのサイトカインが LMP1 の調節因子であることを報告した。今回は本腫瘍株においてケモカイン、特に IP-10 (Interferon gamma-induced protein-10) 産生が LMP1 によって増強されること、その IP-10 が細胞浸潤能の増強因子であることを見いだした。さらに IP-10 により単球が引き寄せられ、膜型 IL-15 を介した細胞接着により腫瘍細胞の増殖や LMP1 発現増強が促されることを見いだした。従って、LMP1 は IP-10 や単球の仲介により本リンパ腫にて腫瘍増殖、浸潤に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Nasal NK/T-cell lymphoma is EBV-related malignancy, and has a poor prognosis. We have already shown that an expression of LMP-1, EBV-originated oncoprotein, was enhanced by cytokines such as IL-2, 10, and 15 in nasal NK/T-cell lymphoma cell lines. In this study, we found that chemokine IP-10 (Interferon gamma-induced protein-10) was induced by LMP-1, and IP-10 enhanced invasive potential of the cells in autocrine manner. Moreover, we revealed that monocytes attracted by IP-10 enhanced proliferation and LMP-1 expression of the cells by cell-contact manner via membrane-bound IL-15. Therefore, LMP-1 enhanced the proliferating and invasive potential of the cells through IP-10 or monocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成 22 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：鼻性 NK/T 細胞リンパ腫、Epstein-Barr virus、LMP1 (latent membrane protein 1)
 IP-10 (Interferon gamma-induced protein-10)、monocytes

1. 研究開始当初の背景

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を主体とする NK 細胞あるいは γ δ T 細胞由来のリンパ腫である。このリンパ腫は肺、皮膚、消化管などの他臓器への浸潤が高頻度に出現し、予後が極めて不良である。よって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。

本リンパ腫の大きな特徴として、Epstein-Barr Virus (EBV) が高率に腫瘍細胞に感染している事が挙げられる。EBV 蛋白の発現はタイプ II に分類され、EB ウイルス膜蛋白(Latent Membrane protein 1 :LMP1) が陽性である。本蛋白は B リンパ球の EBV による不死化に必須とされ、正常の線維芽細胞を腫瘍化させるなど腫瘍原性が高い事が報告されている。その癌原蛋白である LMP1 の発現調節機構は明らかになっていなかったが、我々は前回の検討にて(鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における EB ウイルス膜蛋白の発現機構と機能解析 19791180 若手研究 (B) H21-22 年) IL-2, 10, 15, IFN-gamma による細胞外刺激が LMP1 の発現増強因子であることを報告した。本リンパ腫はび慢性に増殖し、周囲に多様な炎症細胞浸潤を伴うことから、それらの細胞が上記サイトカインの供給源になっている可能性がある。また、LMP1 の機能においても、その検討はほぼ B 細胞、上皮細胞に限られ、NK 細胞における LMP1 の機能について検討した報告はなかった。しかし、前回の検討にて LMP1 による CD25 (IL-2 receptor α) の発現上昇が認められ、LMP1 は CD25 を介して IL-2 の感受性を高めることにより間接的に細胞増殖に寄与していることが明らかとなった。しかし、B 細胞や上皮細胞では数多くの LMP1 の機能が報告されており NK 細胞における役割も CD25 の発現上昇のみではないと予想され、更なる検討を思い立った。

2. 研究の目的

本研究ではケモカインや腫瘍細胞周囲の炎症細胞に着目し、細胞株や臨床検体を使用し鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における LMP1 の機能を検討する。

3. 研究の方法

(1) ケモカインの検討

EBV, LMP1 陽性鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株 (SNK1, SNK6, SNT8 など)、慢性活動性 EB ウイルス感染症細胞株 (KAI3)、EBV 陰性 NK 細胞株 (KHYG-1, NK-92) を主に用いて検討を行った。細胞培養上清をケモカインアレイ

(RayBio Human Chemokine Antibody Array I) のメンブレンに反応させ、その発現を測定し、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫株が特異的に産生するケモカインを同定した。さらにサンドイッチ ELISA を行いケモカインアレイの結果を確かめた。また候補となったケモカインの受容体発現に関してもフローサイトメトリーにて解析を行った。さらにオートクラインでの作用を検討するため、中和抗体やリコンビナント存在下での細胞増殖能を MTS アッセイにて、浸潤能をマトリケルを用いたインベーションアッセイにて行った。

(2) 周囲炎症細胞の検討

本リンパ腫細胞と混在する炎症細胞の多くは顆粒球や単球である。それらの役割を検討するため、健常者の末梢血単核球より CD33 陽性顆粒球や CD14 陽性単球を磁気ビーズ法にて分離、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株と共培養を行った。その後生腫瘍細胞数を色素排除法によりカウントし、ウェスタンブロット法により LMP1 の発現を検討した。さらにトランスウェルアッセイによりそれらの発現が液性因子によるものか、細胞接着によるものか検討した。最後に候補となる因子を阻害抗体にてブロックし、それらの発現亢進が減少するかどうか検討した。

4. 研究成果

(1) ケモカインの検討

ケモカインアレイの結果では、LMP1 陽性株にて発現が亢進しているものの、陰性株では発現していないケモカインとして IP-10 (Interferon gamma-induced protein-10) が同定された。ELISA の結果でも同様に、LMP1 陽性株のみに経時的に IP-10 発現量が増強していることが明らかとなった。また IP-10 の主要なレセプターである CXCR3 の発現も LMP1 陽性株にて認められた。B 細胞では LMP1 が IP-10 の産生を亢進させることが報告されており、NK 細胞においても同様な現象が起きていることが示唆された。

MTS アッセイではリコンビナント IP-10, 抗 IP-10 中和抗体存在下においても細胞増殖の亢進や抑制は起きなかった。インベーションアッセイでは IP-10 濃度依存性に浸潤細胞数が増加した。内因性 IP-10 を含む SNK6 培養上清を用いるとやはり浸潤は亢進し、上清に抗 IP-10 中和抗体を添加すると浸潤の抑制が認められた。このことから IP-10 がオートクライン機序により細胞浸潤能を亢進させている可能性が示唆された。

(2) 周囲炎症細胞の検討

顆粒球または単球と鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株との共培養を行ったところ、顆粒球

では認められなかった腫瘍細胞における増殖能と LMP1 発現の亢進が単球との共培養で認められた。トランスウェル共培養下ではこれらの現象は認められず、単球と腫瘍細胞間の接着が必要であると考えられた。単球細胞上には膜型 IL-15 の存在が以前から知られており、共培養時に IL-15 の阻害抗体を添加するとこれらの現象が減弱した。このことから単球による腫瘍細胞株の増殖能と LMP1 発現の亢進には膜型 IL-15 が関与している可能性が示唆された。

IP-10 の生物学的活性の一つに単球を引き寄せる機能がある。このことから、LMP1 により産生が増強した IP-10 が単球を呼び込み、単球上の膜型 IL-15 の作用により、腫瘍細胞の増殖能と LMP1 発現を促すことが上記二つの実験結果から予想される。従って、LMP1 の機能として、IP-10 の産生増強による ①細胞浸潤能の亢進 ②単球の遊走能増強による細胞増殖能と LMP1 発現の亢進 が本実験結果より推測される。これらの結果は鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における EBV の役割をより鮮明化させ、将来的な EBV 標的治療への基礎を築くものであると理解する。今後も本腫瘍に対する LMP1 を含めた EBV の寄与について基礎的研究を続ける予定である。

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. Ishii H, Takahara M, Nagato T, Kishibe K, Kis L, Harabuchi Y, Klein G, Klein E. Monocytes enhance cell proliferation and LMP1 expression of nasal natural killer (NK)/T-cell lymphoma cells by cell contact-dependent interaction though membrane-bound IL-15. *Int J Cancer*. in press, 2011. 査読有
2. Moriai S, Takahara M, Ogino T, Nagato T, Kishibe K, Ishii H, Katayama A, Shimizu N, Harabuchi Y. Production of interferon- γ -inducible protein-10 and its role as an autocrine invasion factor in nasal natural killer/T-cell lymphoma cells. *Clin Cancer Res*. 15. 6771-6779, 2010. 査読有
3. Bando N, Ogino T, Katayama A, Takahara M, Katada A, Hayashi T, Harabuchi Y. HLA class I antigen and transporter associated with antigen processing downregulation in metastatic lesions of head and neck squamous cell carcinoma as a marker of poor prognosis. *Oncol Rep*. 23. 933-939, 2010. 査読有
4. Harabuchi Y, Takahara M, Kishibe K, Moriai S, Nagato T, Ishii H. Nasal natural killer (NK)/T-cell lymphoma: clinical, histological, virological, and genetic features. *Int J Clin Oncol*. 14. 181-190, 2009.
5. Kobayashi H, Nagato T, Takahara M, Sato K, Kimura S, Aoki N, Azumi M, Tateno M, Harabuchi Y, Celis E. Induction of EBV-latent membrane protein 1-specific MHC class II-restricted T-cell responses against natural killer lymphoma cells. *Cancer Res*. 68. 901-908, 2008. 査読有
6. 高原 幹, 原 渕保明. EBウイルス感染と頭頸部腫瘍. *ENTONI* 2009. 49-56.
7. 高原 幹, 原 渕保明. ウイルス性疾患 外来における抗ウイルス薬の使い方. *ENTONI* 2009. 155-162.

[学会発表] (計 10 件)

1. Takahara M, Yoshino K, Nagato T, Kishibe K, Katayama A, Harabuchi Y. Expression and function of LFA-1 and ICAM-1 in nasal NK/T cell lymphoma cells. The 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Disease (EBV meeting 2010), Sept. 4-7, 2010, Birmingham, UK.
2. Kishibe K, Yoshino K, Katayama A, Nagato T, Takahara M, Harabuchi Y. Expression of MicroRNAs in Nasal Natural Killer/T-Cell Lymphoma Cell Lines. EBV meeting 2010, Sept. 4-7, 2010, Birmingham UK.
3. Nagato T, Kishibe K, Yoshino K, Takahara M, Harabuchi Y. Expression of chemokines in nasal natural killer/T-cell lymphoma. EBV meeting 2010, Sept. 4-7, 2010, Birmingham UK.
4. Expression of CD70 in Nasal Natural Killer/T-cell Lymphoma. Yoshino K, Kishibe K, Katayama A, Nagato T, Takahara M, Harabuchi Y. EBV meeting 2010, Sept. 4-7, 2010, Birmingham UK.
5. 高原 幹, 岸部 幹, 片山昭広, 林 達也, 原 渕保明. 鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株におけるLFA-1とICAM1の解析. 第28回日耳鼻免疫アレルギー学会 2010. 2. 18-20, 福井.
6. 長門利純, 岸部 幹, 吉野和美, 高原 幹, 原 渕保明. 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるケモカインの発現. 第34回日本頭頸部癌学会. 2010. 6. 9-10. 東京.
7. Yoshino K, Kishibe K, Katayama A, Nagato

- T, Takahara M, Harabuchi Y. Expression of CD70 in Nasal Natural Killer/T-cell Lymphoma. The 113th American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Annual Meeting, Oct.4-7, 2009, San Diego, USA.
8. Kishibe K, Yoshino K, Nagato T, Takahara M, Katayama A, Harabuchi Y. Expression of MMP-12 in Nasal NK/T Cell Lymphoma. The 113th American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Annual Meeting, Oct.4-7, 2009, San Diego, USA.
9. Takahara M, Kishibe K, Nagato T, Moriai S, Ishii H, Katayama A, Harabuchi Y. Expression and function of LFA-1 and ICAM-1 in nasal NK/T cell lymphoma. 第68回日本癌学会. 2009.10.1-3, 横浜.
10. 岸部 幹, 吉野和美, 長門利純, 高原 幹, 片山昭公, 林 達哉, 原渕保明. 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるmicroRNAの発現. 第48回日本鼻科学会. 2009.10.1-3. 島根.

6. 研究組織

(1)研究代表者 高原 幹

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号： 50322904

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし