

## 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：32666  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2012～2014  
 課題番号：24591378  
 研究課題名(和文) EBウイルス由来機能性RNAを標的としたホジキンリンパ腫の実験的分子標的治療  
  
 研究課題名(英文) Elucidation of innate immunity pathway for the development of a novel therapy of Hodgkin lymphoma  
  
 研究代表者  
 和田 龍一 (WADA, Ryuichi)  
  
 日本医科大学・医学部・准教授  
  
 研究者番号：20260408  
  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：エプスタインバールウイルス(EBV)の潜伏感染に対する自然免疫が、ホジキンリンパ腫の新たな治療戦略となる可能性がある。EBV感染を伴うホジキンリンパ腫の腫瘍微小環境では、制御性T細胞が増加し細胞傷害性T細胞は減少していた。パターン認識分子であるRIG-Iは、EBVの潜伏感染に伴って発現が増加していたが、下流のIRF3の活性化とインターフェロンの発現は見られず、EBV由来の最初期遺伝子が阻害している可能性が考えられた。EBV感染は自然免疫のシグナル経路を変化させ、腫瘍微小環境の免疫反応を抑制していることが示された。自然免疫の活性化が、ホジキンリンパ腫の新しい治療戦略となる可能性が確認された。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus (EBV) infection is associated in about half cases of classical Hodgkin lymphoma (CHL). The aim of the study is explore the molecular alteration of intracellular innate immunity for the development of new therapeutic strategy of CHL. In the tumor microenvironment of EBV-positive CHL, regulatory T cells were increased, while cytotoxic T cells were reduced. The expression of a pattern recognition receptor RIG-I was increased, but activation of IRF3 and expression of interferon were not found in EBV-positive CHL. The interruption of RIG-I signaling may be associated with the immediate early genes derived from EBV. Further, the expression of inhibitory chemokine CCL20 was increased in EBV-positive CHL. The latent infection of EBV alter innate immunity signaling and modulate the tumor microenvironment to immunosuppressive state. It is considered that the amelioration of intracellular innate immunity is a possible therapeutic strategy for CHL.

研究分野：Molecular pathology

キーワード：Hodgkin lymphoma Epstein Barr virus RIG-I IRF3 Interferon regulatory T cell cytotoxic T cell innate immunity

## 1. 研究開始当初の背景

古典的ホジキンリンパ腫は、ホジキン細胞とリード・スタンバーグ細胞の出現を特徴とする悪性リンパ腫で、日本では悪性リンパ腫の約 10%を占める。患者は若年者と老年者の 2 峰性を示し、治療反応性は比較的良好である。しかしながら若年者のホジキンリンパ腫の患者では、長期にわたり副作用の少ない効果的な治療法が、また、老年者では治療抵抗性を示す症例もあることから、さらなる病態の理解と効果的な治療法が望まれている。

エプスタイン・バールウイルス (Epstein Barr virus, EBV) は、ヘルペスウイルス属の DNA ウイルスである。EBV は通常、幼少期に不顕性感染をきたすが、青年期の初感染では伝染性単核症をきたす場合もある。一方、EBV の潜伏感染は、ホジキンリンパ腫をはじめ、バーキットリンパ腫などの悪性リンパ腫、鼻咽頭癌、胃癌などの数々の悪性腫瘍に認められており、腫瘍発生や病態に関与していると考えられているが、十分明らかにはなっていない。

ホジキンリンパ腫では、潜伏感染した EBV がウイルス由来分子である LMP1 や LMP2 などを発現し、PI3K から Akt の経路などの「増殖シグナル」を活性化する一方で、NF- $\kappa$ B の活性化から、サイトカインなどを誘導して「腫瘍微小環境」を形成している可能性も考えられている。潜伏感染した EBV は、いくつかのウイルス由来の分子を発現するが、その中の一つとして、ノンコーディング RNA の EB virus encoded RNA (EBER) を多量に発現することが知られている。これまで、EBER の腫瘍発生や病態における役割は十分明らかになっていない。

Retinoic acid inducible gene-1 (RIG-I) は細胞内の「自然免疫」にかかわる分子で、細胞外由来のウイルスや病原体の核酸や分子のセンサーとして働く分子である。これまでの *in vitro* における実験では、EBV の潜伏感染状態では、細胞内の RIG-I が EBER を関知し、細胞内の「自然免疫」のシグナル経路が活性化される可能性が示されている。シグナル経路の中では、NF- $\kappa$ B の活性化からインターフェロンの分泌が誘導される。インターフェロンはアポトーシスに関わる protein kinase RNA regulated (PKR) の発現を誘導し、細胞死を惹起して感染細胞を排除しようとする。しかしながら、EBV 由来の EBER は、PKR に結合して機能を阻害し、細胞死を回避させる可能性が示唆されている。

現在のところ、EBV の潜伏感染を伴う腫瘍細胞において RIG-I が発現しているのか否か、また、その腫瘍発生や病態における役割は明らかとなっていない。我々は、EBV の感染のあるホジキンリンパ腫の腫瘍細胞に、RIG-I を発現していることを見いだした。EBV の潜伏感染に伴い腫瘍細胞内において自然免疫のシグナル経路の活性化されるが、それを回避して、「細胞不死化」となる過程に、EBER

が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。腫瘍細胞における自然免疫の経路を明らかにすることで、より効果的な治療標的分子を創出や、治療方法を見いだすことが期待される。

## 2. 研究の目的

古典的ホジキンリンパ腫の効果的な治療を目的として、腫瘍細胞内における EBV に対する自然免疫のシグナル経路の分子病態を明らかにし、自然免疫に関連した分子を標的とした、新しい効果的な治療法の可能性を明らかにすることが本研究の目標である。

## 3. 研究の方法

古典的ホジキンリンパ腫と診断された 32 例の症例を検討対象とした。32 例中 15 例は 50 歳以下で、17 例は 50 歳以上であった。生検されたリンパ節組織のパラフィン包埋標本を用いて組織学的な検討を行った。

### 3-1 ホジキンリンパ腫における EBV 潜伏感染についての検討

EBV の潜伏感染は、パラフィン切片上で、EBV 由来の蛋白質である LMP1 の免疫染色による発現と、*in situ hybridization* による EBER の発現確認の二つの因子から、EBV の潜伏感染の判定を行った。

### 3-2 高齢者ホジキンリンパ腫における腫瘍微小環境についての検討

50 歳以上のホジキンリンパ腫症例 17 症例について、パラフィン包埋標本を用いて、3 重免疫染色を行い、制御性 T 細胞 (Treg) を FOXP3 で赤色に、細胞傷害性 T 細胞を granzyme B (GrB) で黒色に、ホジキン細胞とリード・スタンバーグ細胞を CD30 で青色に染色し、ホジキン細胞とリード・スタンバーグ (HRS) 細胞を中心とし腫瘍微小環境における FOXP3 陽性細胞と GrB 陽性細胞の個数について形態計測を行った。計測結果は、単位面積における FOXP3/HRS, GrB/HRS, FOXP3/GrB として算出した。

### 3-3 ホジキンリンパ腫の腫瘍細胞内における分子病態

EBV の潜伏感染によりウイルス由来の分子である EBNA は、ケモカインで Treg の遊走を誘導する CCL20 の発現を亢進することが知られている。HRS 細胞における CCL20 の発現について、免疫染色法により検討を行った。

また、HRS 細胞における RIG-I の自然免疫のシグナル経路の状態についても免疫染色法により検討を行った。検討には、パラフィン包埋標本を用い、抗 RIG-I 抗体、抗 IRF3、抗インターフェロン  $\beta$  抗体を用いて、免疫染色を行った。IRF3 の活性化は、抗リン酸化 IRF3 (pIRF3) 抗体を用いて、リン酸化状態を判定した。

検出する目的蛋白質を黒色に、HRS 細胞を赤で染色し、HRS 細胞における発現を特異的に解析した。

### 3-4 ウイルス由来分子による自然免疫シグナル経路阻害

EBV 由来分子の一つである BRAF1 と BZAF1 は、EBV の急性感染における細胞溶解の際に発現が増強する最初期遺伝子であるが、これらの分子が潜伏感染する HRS 細胞に発現しているのか、免疫染色で検討を行った。

## 4. 研究成果

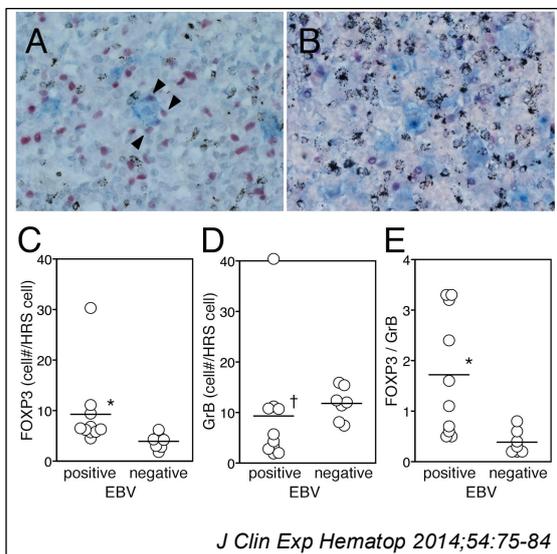
### 4-1 古典的ホジキンリンパ腫症例と EBV 潜伏感染

古典的ホジキンリンパ腫の症例 32 例中、50 歳以下の若年者の症例は 15 例で、50 歳以上の症例は 17 例であった。

50 歳以下の 15 例中 4 例(33%)で EBV の潜伏感染を認め、50 歳以上の 17 例中 10 例(51%)で EBV の潜伏感染が認められた。組織型との関連を見ると、50 歳以下の潜伏感染症例 4 症例中 3 症例(75%)が混合細胞型で、50 歳以上の潜伏感染症例 10 症例中 5 例(50%)が混合細胞型であった。これまで報告があるように、混合細胞型には EBV 感染が多い傾向が認められた。

### 4-2 高齢者古典的ホジキンリンパ腫における腫瘍微小環境

50 歳以上の高齢者のホジキンリンパ腫において、FOXP3, GrB, CD30 の免疫染色を行い、形態計測を行ったところ、EBV の潜伏感染を伴う症例では、FOXP3 陽性細胞が、HRS 細胞を取り囲むような像が見られ(図 A)、HRS 細胞あたりの FOXP3 陽性細胞数は、潜伏感染を伴わない症例に比較して有意に高く(図 C)、GrB 陽性細胞は少なかった(図 D)。一方、EBV の潜伏感染を伴わない症例では、FOXP3 陽性細胞は少なく(図 C)、GrB 陽性細胞が HRS 細胞を取り囲み(図 B)、HRS 細胞あたりの細胞数は多かった(図 D)。単位面



積あたりの FOXP3/GrB の陽性細胞比率は、潜伏感染を伴う症例で有意に高いことが明らかにされた(図 E)。

以上のことから、EBV の潜伏感染を伴う高齢者の古典的ホジキンリンパ腫の腫瘍微小環境においては、FOXP3 陽性の Treg 細胞が多く、細胞傷害性 T 細胞の少ない、免疫抑制状態となっていることが明らかにされた。

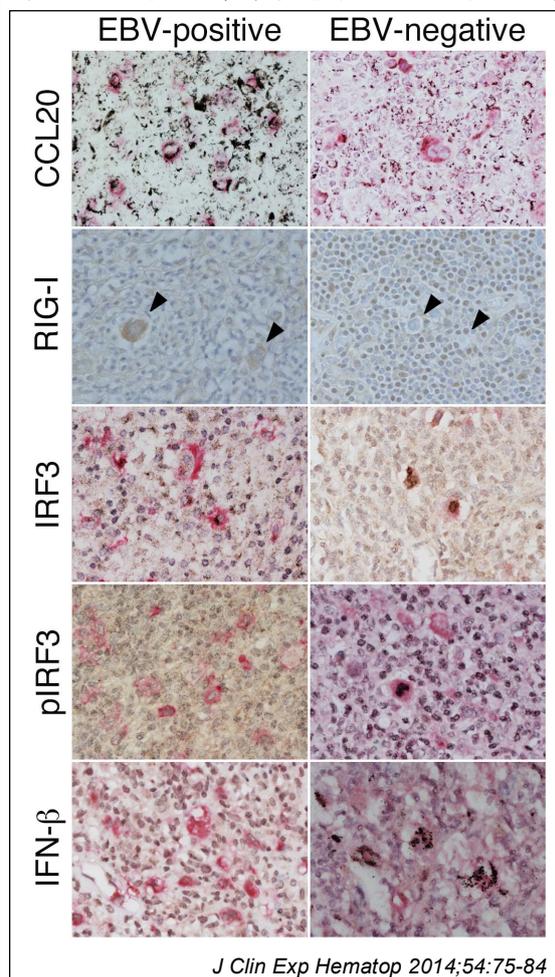
### 4-3 古典的ホジキンリンパ腫の腫瘍細胞内における分子病態

次に、このような腫瘍微小環境の形成について、HRS 細胞内における分子の発現状態によるものではないか、特に自然免疫に関連する分子の発現について検討を加えた。

FOXP3 陽性の Treg の遊走を刺激する CCL20 の HRS 細胞における発現を免疫染色で検討したところ、EBV の潜伏感染を伴う症例で発現の亢進が確認された(下図)。

次に、自然免疫のセンサー分子、pattern recognition receptor である RIG-I とそのシグナル経路の分子について検討を行った。RIG-I の発現は EBV の潜伏感染を伴う症例において、HRS 細胞での発現が増強しており(下図)、EBV の感染に伴って RIG-I の経路が活性化されている可能性が考えられた。

RIG-I の下流の分子で、インターフェロンの発現の誘導にかかわる分子の IRF3 は、EBV の潜伏感染の有無にかかわらず、発現が見られたものの、潜伏感染のある症例では、



リン酸化の程度は減弱しており、pIRF3の核への移行も観察されなかった。このため、RIG-Iのシグナル経路は、RIG-IとIRF3の間で、不活性化されている可能性が考えられた。IRF3の不活性化に伴い、EBV潜伏感染症例では、HRS細胞におけるインターフェロンβの発現は認められなかった。

以上の結果から、EBVの潜伏感染を伴うHRS細胞においては、腫瘍細胞内で自然免疫のRIG-Iの活性化しているものの、その下流の経路で不活性化されており、インターフェロンβの発現と分泌が誘導されない可能性が考えられた。

#### 4-4 ウイルス由来分子による自然免疫シグナル経路阻害

RIG-Iのシグナル経路がどのように不活性化されているのか検討を加えた。IRF3の活性化は、EBV由来の最初期遺伝子で、細胞溶解に関連するBZLF1やBRLF1により不活性化されることが示されている。そこで、これらの分子の発現を免疫染色により、18例の50歳以上のホジキンリンパ腫の症例で検討した。

EBVの潜伏感染を伴う症例9例では、7例でBZLF1とBRLF1のHRS細胞における発現が確認された。一方、EBVの潜伏感染を伴わない症例9例では、BZLF1が1例で、BRLF1が2例で発現が見られたのみであった。

今回の検討では、腫瘍細胞内で自然免疫経路の一つである、RIG-Iの経路がウイルス由来のノンコーディングRNAであるEBERによって活性化され、インターフェロンによるPKRの活性化をEBERが阻害することで、自然免疫を逃れていることを想定していた。しかしながら、解析を進めたところ、RIG-Iのシグナル経路はIRF3の活性化の前の段階ですでに不活性化されていることが明らかにされた。

RIG-Iの自然免疫のシグナル経路の阻害は、その下流のIRF3の活性化を阻害し、IRF3により誘導されるインターフェロンの発現を阻害していると考えられる。通常EBVなどのウイルス感染に伴って、インターフェロンは細胞傷害性T細胞の浸潤を誘導するが、EBVの潜伏感染を伴うホジキンリンパ腫においては、インターフェロンの抑制から、細胞傷害性T細胞の誘導が抑制されると考えられる。これに加えて、EBV由来のEBNAによりCCL20の発現の増加をきたし、制御性T細胞の誘導をきたしていると考えられる。これらのことから、EBVの潜伏感染を伴うホジキンリンパ腫の腫瘍微小環境では、免疫抑制状態が増強されていることが考えられる。

腫瘍微小環境における免疫抑制状態は、EBV潜伏感染を伴うホジキンリンパ腫の予後が不良であることや、治療に対する抵抗性にも関与している可能性が考えられる。したがって、腫瘍細胞内における自然免疫のシグナル経路の改善は、ホジキンリンパ腫の新たな治療戦略となる可能性が確認された。

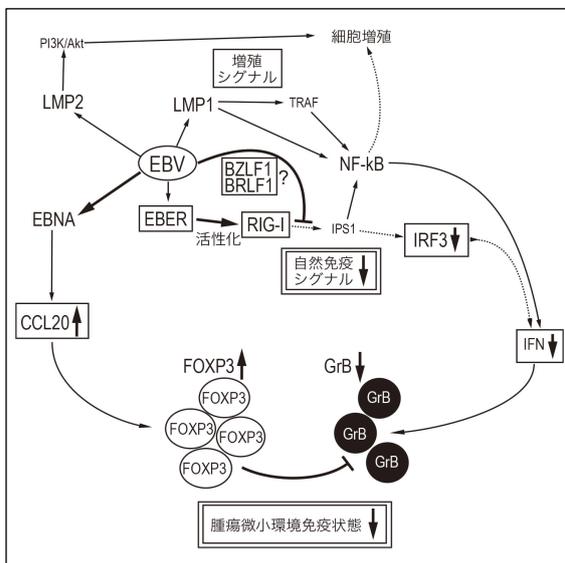
研究の開始時点では、アポトーシスに関連したPKRの活性化を阻害するEBERを治療標的として想定していた。しかしながら、今回の検討ではRIG-Iの下流でシグナルが阻害されている可能性が示されたことから、その阻害機序を明らかにする必要性が示された。そこで、IRF3を阻害する可能性のあるEBV由来のBZLF1とBRLF1の発現について検討を行ったところ、これらの分子がHRS細胞で発現していることが明らかとなった。今回の検討では発現を確認したのみであり、実際、どの分子の機能を阻害しているのか、さらに検討が必要と思われた。

以上のことから、古典的ホジキンリンパ腫の自然免疫のシグナル経路を標的とした治療戦略においては、HRS細胞内における自然免疫のシグナル経路を活性化することが必要と考えられる。そのためには、シグナル経路の阻害メカニズムを明らかにすることが必要と考えられた。

本研究では、主に高齢者のホジキンリンパ腫を検討対象として組織学的な検討を加えてきた。若年者のホジキンリンパ腫における検討も十分に行う必要がある。

#### 結論

古典的ホジキンリンパ腫において、EBVの潜伏感染を伴う腫瘍細胞は、ケモカインCCL20の分泌、さらにRIG-I経路の阻害からインターフェロンの発現と分泌低下をきたして、腫瘍微小環境を制御性T細胞の増加、細胞傷害性T細胞の低下した免疫抑制状態としていることが明らかにされた。腫瘍細胞内における自然免疫のシグナル経路の活性化が、ホジキンリンパ腫の新たな治療戦略となる可能性が示唆された。



## 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 3 件)

- 1 Satoh T, Wada R, Yajima N, Imaizumi T, Yagihashi S. Tumor micro-environment and RIG-I signaling molecules in Epstein Barr virus-positive and -negative classical Hodgkin lymphoma of the elderly. J Clin Exp Hematop. 2014;54:75-84. 査読有, doi: 10.3960/jslrt.54.75
- 2 Yajima N, Wada R, Matsuzaki Y, Yagihashi S. DNA damage response and its clinicopathological relationship in appendiceal tumors. Int J Colorectal Dis 2014;29:1349-54. 査読有, doi: 10.1007/s00384-014-1996-6.
- 3 Wada R, Yagihashi S. The expression of glucagon-like peptide-1 receptor and dipeptidyl peptidase-IV in neuroendocrine neoplasms of the pancreas and gastrointestinal tract. Endocr Pathol 2014;25:390-6. 査読有, doi: 10.1007/s12022-014-9326-7.

[学会発表] (計 3 件)

- 1 佐藤次生、和田龍一、八木橋操六：Classical Hodgkin lymphoma の腫瘍微小環境における年齢と EBV 感染の関与の病理学的検討. 日本病理学会 2013 年 4 月 24 日-26 日, 札幌市
- 2 佐藤次生、和田龍一、八木橋操六：高齢者古典的ホジキンリンパ腫における EBV 感染と腫瘍微小環境の関連 - RIG-I 関連分子と CCL20 の発現について-. 日本病理学会 2014 年 4 月 24 日-26 日, 広島市
- 3 佐藤次生、和田龍一、八木橋操六：高齢者古典的ホジキンリンパ腫における EBV 感染と腫瘍微小環境と RIG-I 関連分子の発現について-. 日本網内系学会 2014 年 6 月 18 日-20 日, 山形市

[図書] (計 0 件)

該当なし。

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当なし。

○取得状況 (計 0 件)

該当なし。

[その他]

ホームページ等

該当なし。

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

和田龍一 (WADA, Ryuichi)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号： 20260408  
(平成 26 年より現職)

(2)研究分担者

矢島信久 (YAJIMA, Nobuhisa)  
弘前大学・医学研究科・研究員  
研究者番号： 30443980

今泉中淳 (IMAIZUMI, Tadaatsu)  
弘前大学・医学研究科・教授  
研究者番号： 90232602

佐藤次生 (SATO, Tsugumi)  
弘前大学・医学研究科・助教  
研究者番号： 40733001

(3)連携研究者

該当なし