

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	長門 利純
<p data-bbox="628 622 1023 667">学位論文題目</p> <p data-bbox="225 763 1433 797">Expression of Interleukin-9 in Nasal Natural Killer/T-cell Lymphoma Cell Lines and Patients</p> <p data-bbox="268 815 1406 848">(邦題: 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株および患者におけるインターロイキン9の発現)</p> <p data-bbox="764 922 890 956">共著者名</p> <p data-bbox="320 1030 1334 1120">小林 博也、岸部 幹、高原 幹、荻野 武、石井 秀幸、及川 賢輔 青木 直子、佐藤 啓介、木村 昭治、清水 則夫、立野 正敏、原渕 保明</p> <p data-bbox="274 1193 1382 1227">(Clinical Cancer Research; December 1 2005, Volume 11, Issue 23, 8250-8257 掲載)</p> <p data-bbox="193 1301 368 1335">I. 研究目的</p> <p data-bbox="185 1355 1474 1709">鼻性 NK/T 細胞リンパ腫は、鼻腔や咽頭に初発し、顔面正中部にそって進行する破壊性の壊死性肉芽腫性病変を主体とする疾患である。従来、進行性鼻壊疽、致死性正中肉芽腫症など多種多様の名称が付けられていたが、最近になって腫瘍細胞の由来が NK 細胞と<math>\gamma\delta</math>T 細胞の 2 種類であることが判明し、現在は鼻性 NK/T 細胞リンパ腫という名称が広く用いられている。また、本疾患は EB ウイルス (EBV) 関連腫瘍のひとつと考えられている。組織学的には、広範囲に壊死や肉芽組織を伴い、かつ、腫瘍細胞以外に炎症細胞が混在しているという特徴を有する。このため、十分な生検材料を得ることは難しく、仮に得られたとしても、炎症細胞の混在のため、腫瘍細胞に特異的に発現している遺伝子解析を行うことは困難とされてきた。</p> <p data-bbox="185 1729 1474 1921">本研究では、はじめに、本疾患患者の鼻腔病変部より最近樹立された SNK-6 と SNT-8 の 2 細胞株(1)を用いて cDNA array 解析を行った。その結果、SNK-6 と SNT-8 で特異的にインターロイキン9 (IL-9) mRNA の発現が上昇していることを見いだした。さらに、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株における IL-9 の役割および患者検体での発現に関して検討した。</p> <p data-bbox="185 1942 384 1975">II. 材料・方法</p>			

## II. 材料・方法

### 1. 患者検体

1976年～2003年までに旭川医大耳鼻咽喉科・頭頸部外科および札幌医大耳鼻咽喉科で鼻性NK/T細胞リンパ腫と診断された17名の患者検体を使用した。対照として、2000年～2003年までに旭川医大耳鼻咽喉科・頭頸部外科で鼻性NK/T細胞リンパ腫以外の悪性リンパ腫（ホジキン病、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型リンパ腫、末梢性T細胞リンパ腫、未分化大細胞型リンパ腫、血管免疫芽球型T細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫および節性濾胞辺縁帯リンパ腫を含む）と診断された20名、および健常人12名より得られた検体を用いた。全検体はインフォームドコンセントを得た後、治療前に採取された。

### 2. 細胞株

鼻性NK/T細胞リンパ腫由来の2細胞株SNK-6とSNT-8（東京医科歯科大学難治疾患研究所、清水則夫博士より供与）を用いた。両者ともにEBV陽性でSNK-6はCD3陰性、CD56陽性で、T細胞レセプター（TCR）の再構成を認めないNK細胞由来であり、SNT-8はCD3陽性、CD56陽性、TCRの再構成を認め、 $\gamma\delta$ 型のTCRを発現しており、 $\gamma\delta$ T細胞由来である。対照としては、EBV陰性のNK細胞リンパ腫/白血病細胞株（CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>TCR<sup>-</sup>）であるNK-92とKHYG-1、EBV陰性のNK細胞様T細胞リンパ腫/白血病細胞株（CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>TCR<sup>+</sup>）であるMTAとDERL-2、T細胞性白血病細胞株のJurkat、MOLT-4およびPEER、ホジキン病細胞株のHDLM-2（IL-9陽性）、成人T細胞白血病細胞株のMT-2（IL-9レセプター（IL-9R）陽性）、および前立腺癌細胞株のPC-3（IL-9R陰性）を用いた。

### 3. cDNA array

SNK-6、SNT-8、健常人より分離した末梢血単核球（PBMC）、NK-92よりtotal RNAを抽出後、逆転写反応時に<sup>32</sup>Pで標識してcDNAプローブを作製した。それらをAtlas Human Cancer 1.2 Array（Clontech社製）にハイブリダイズさせ、BAS2000システム（富士写真フィルム社製）にて各遺伝子スポットを数値化し、各細胞株間での遺伝子発現を比較した。

### 4. Reverse transcription (RT)-PCR

各細胞株とPBMCにおいてIL-9の発現を検討した。また、SNK-6とSNT-8におけるIL-9R $\alpha$ とIL-2R $\gamma$ の発現も検討した。内部標準として $\beta$ 2ミクログロブリンを用いた。

### 5. ELISA

細胞株培養上清と患者血清中のIL-9蛋白を定量した。抗IL-9抗体（R&D社製）をELISAプレートに固相化し、細胞株培養上清または患者血清を反応させ、さらにビオチン標識抗IL-9抗体（PeproTech社製）を反応させた。標準曲線を作製するために、段階希釈したリコンビナントヒトIL-9蛋白（rhIL-9；R&D社製）を用いた。発色基質としてストレプトアビジン標識HRP（R&D社製）を用いた。

### 6. フローサイトメトリー

FACSscan（BD PharMingen社製）を用いてSNK-6とSNT-8の細胞表面におけるIL-9Rの発現を解析した。

IL-9R $\alpha$ の発現解析には、一次抗体として抗 IL-9R $\alpha$ 抗体 (R&D 社製)、二次抗体として PE 標識抗マウス IgM グロブリン抗体 (DAKO 社製) を用いた。IL-2R $\gamma$ の発現解析には、PE 標識抗 IL-2R $\gamma$ 抗体 (BD PharMingen 社製) を用いた。

#### 7. MTT アッセイ

rhIL-9 (R&D 社製)、抗 IL-9 抗体 (中和抗体; PeproTech 社製)、またはウサギポリクローナル抗体 (ア イソタイプコントロール; PeproTech 社製) を添加した 0.1% ウシ胎児血清含有 RPMI-1640 培地を用いて、SNK-6 と SNT-8 を培養した。72 時間または 96 時間後に MTT 溶液 (Promega 社製) を加え、吸光度を測定 することにより、生細胞数を測定した。

#### 8. 免疫組織染色および *in situ* hybridization

生検材料のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて IL-9 および CD56 の二重免疫染色を行った。抗 IL-9 抗体 (Santa Cruz 社製) を一次抗体として用い、ENVISION+ポリマー試薬と DAB 基質キット (共に DAKO 社製) を使用して一次染色を行った。次に、抗 CD56 抗体 (Novocastra 社製) を一次抗体として用い、 ENVISION/AP ポリマー試薬と Fast Red (共に DAKO 社製) を使用して二次染色を行った。IL-9 と CD56 共 陽性の細胞が CD56 陽性細胞の 30% 以上を占める症例を IL-9 陽性症例とした。また、*in situ* hybridization による EBER の発現は、EBER PNA プローブ (DAKO 社製) を使用し、発色基質として Fuchsin (DAKO 社製) を用いて検討した。

### III. 成績

#### 1. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株における IL-9 の発現解析

cDNA array 解析の結果、IL-9 が SNK-6、SNT-8 で PBMC、NK-92 より有意に発現が上昇している遺伝子 のひとつとして認められた。IL-9 は PBMC と比較すると SNK-6 で 3.88 倍、SNT-8 で 19.3 倍の発現上昇を 認め、NK-92 と比較すると SNK-6 で 3.57 倍、SNT-8 で 29.3 倍の発現上昇を認めた。IL-9 が鼻性 NK/T 細胞 リンパ腫細胞株に特異的に発現しているかどうかを確かめるために、SNK-6、SNT-8、PBMC および他の細 胞株における IL-9 の発現を RT-PCR を用いて解析した。その結果、SNK-6 と SNT-8 で IL-9 mRNA の発現 を認めたが、PBMC と他の細胞株では発現を認めなかった。さらに、蛋白レベルでの発現を検討するた めに、細胞株培養上清中の IL-9 量を ELISA 法にて定量した。SNK-6 と SNT-8 では、培養 24 時間後に IL-9 蛋 白の発現を認め、その量は時間の経過と共に増加したが、他の細胞株では測定感度以下であった。これら の結果より、SNK-6 と SNT-8 が IL-9 を特異的に発現し、産生していると考えられた。

#### 2. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株における IL-9R の発現解析

IL-9R は IL-9R $\alpha$ と IL-2R $\gamma$ の 2 分子により形成されている。SNK-6 と SNT-8 における IL-9R $\alpha$ と IL-2R $\gamma$ の 発現を検討するために、RT-PCR を行った。その結果、SNK-6 と SNT-8 で、IL-9R $\alpha$ と IL-2R $\gamma$ の mRNA 発現 を認めた。次に、フローサイトメトリーにて細胞表面上の発現を検討した。その結果、SNK-6 と SNT-8 で、

IL-9R $\alpha$ と IL-2R $\gamma$ の細胞表面上の発現を認めた。以上より、SNK-6 と SNT-8 では、IL-9 を産生し、かつ、IL-9R の発現が確認され、両細胞株において IL-9 がオートクライン作用を担っている可能性が示唆された。

### 3. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株における IL-9 のオートクライン作用の検討

IL-9 中和抗体を添加した培地にて、SNK-6 と SNT-8 を培養し、MTT アッセイにて生細胞数を測定した。その結果、SNK-6 と SNT-8 の生細胞数は、IL-9 中和抗体の濃度依存性に減少した。一方、アイソタイプコントロール抗体では、高濃度でも生細胞数は減少しなかった。次に rhIL-9 を添加した培地にて、SNK-6 と SNT-8 を培養し、生細胞数を測定した。その結果、SNK-6 と SNT-8 の生細胞数は、rhIL-9 の濃度依存性に増加した。以上の結果より、SNK-6 と SNT-8 において、IL-9 がオートクライン作用により細胞増殖に関与していると考えられた。

### 4. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者における IL-9 の発現解析

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者 12 名からの生検材料を用いて免疫染色を行った。すべての患者が EBER および CD56 が陽性であることから、個々の腫瘍細胞が IL-9 を発現しているかどうかを検討するために、IL-9 と CD56 の二重免疫染色を行った。その結果、12 名中 8 名で CD56 陽性の腫瘍細胞が IL-9 陽性であった。次に、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者血清中の IL-9 を測定した。その結果、10 名中 4 名で IL-9 の上昇を認めた。一方、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫以外の悪性リンパ腫患者 20 名より採取した血清で IL-9 の上昇を認めたのは 1 名のみであり、さらに、健常人 12 名より採取した血清では IL-9 の上昇は認められなかった。以上より、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者の腫瘍細胞にも IL-9 が産生され、血清中に IL-9 が分泌されている可能性が示唆された。

## IV. 考案

本研究では、cDNA array 解析により鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株である SNK-6 と SNT-8 で IL-9 の発現が上昇しており、RT-PCR と ELISA による他の細胞株との比較により、その発現が SNK-6 と SNT-8 に特異的であることを見いだした。また、SNK-6 と SNT-8 に IL-9R の発現が認められ、IL-9 中和抗体と rhIL-9 を用いた実験により、IL-9 がオートクライン作用で細胞増殖に関与していることが示された。さらに、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者から採取された組織と血清中にも IL-9 の存在が確認された。

IL-9 は、主に活性化した CD4<sup>+</sup>T 細胞により産生され、その標的細胞は T 細胞、B 細胞、肥満細胞、好酸球などであり、T 細胞では細胞増殖に向かうことが報告されている。また、ある種の白血病やリンパ腫細胞の増殖に関与しており、特にホジキン病ではオートクライン作用により腫瘍細胞の増殖に関与しているとの報告がある(2)。最近、ホジキン病患者 44 名より採取された血清のうち 18 名に IL-9 の存在が確認された(3)。これらの報告と本研究結果を考慮すると、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫においても IL-9 が病態形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

さらに、SNK-6 と SNT-8 は EBV 感染細胞株であるのに対し、本研究で対照として使用した他の細胞株

は EBV 非感染細胞株であることから、EBV が IL-9 の産生に何らかの役割を果たしている可能性が考えられ、今後の検討課題であると考えられた。

以上より、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫において、IL-9 がオートクライン作用により病態形成に重要な役割を果たしていることが考えられ、IL-9 が新しい治療法の標的となり得る可能性が考えられた。

## V. 結論

1. cDNA array 解析により、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株である SNK-6 と SNT-8 で IL-9 の発現が上昇していることを見いだした。
2. IL-9 は PBMC および他の細胞株には発現しておらず、SNK-6 と SNT-8 に特異的に発現していると考えられた。
3. SNK-6 と SNT-8 において IL-9R の発現も認められた。
4. SNK-6 と SNT-8 において IL-9 がオートクライン作用で細胞増殖に関与していることが示された。
5. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者より採取された組織と血清中に IL-9 の発現が認められた。
6. 以上の結果より、IL-9 が鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の病態形成に重要な役割を果たしていると考えられた。

## VI. 引用文献

1. Nagata, H., A. Konno, N. Kimura, Y. Zhang, M. Kimura, A. Demachi, T. Sekine, K. Yamamoto, and N. Shimizu. 2001. Characterization of novel natural killer (NK)-cell and gammadelta T-cell lines established from primary lesions of nasal T/NK-cell lymphomas associated with the Epstein-Barr virus. *Blood* 97:708.
2. Gruss, H. J., M. A. Brach, H. G. Drexler, K. J. Bross, and F. Herrmann. 1992. Interleukin 9 is expressed by primary and cultured Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Cancer Res* 52:1026.
3. Fischer, M., M. Bijman, D. Molin, F. Cormont, C. Uyttenhove, J. van Snick, C. Sundstrom, G. Enblad, and G. Nilsson. 2003. Increased serum levels of interleukin-9 correlate to negative prognostic factors in Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 17:2513.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	長門 利純
<p>審査委員長 若 宮 伸 隆 ㊞</p> <p>審査委員 立 野 正 敏 ㊞</p> <p>審査委員 原 淵 保 明 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Expression of Interleukin-9 in Nasal Natural Killer/T-cell Lymphoma Cell Lines and Patients (鼻性NK/T細胞リンパ腫細胞株および患者におけるインターロイキン9の発現)</p>			
<p>鼻性NK/T細胞リンパ腫は、鼻腔や咽頭に初発し、顔面正中部にそって、進行する破壊性の壊死性肉芽腫性病変を主体する疾患である。従来は、本疾患は進行性鼻壊死や致死性正中肉芽腫症と呼ばれていたが、最近になって本腫瘍細胞の由来が、NK細胞と<math>\gamma\delta</math>T細胞の2種類であることが判明し、鼻性NK/T細胞リンパ腫と呼ばれるようになってきた。また、本腫瘍細胞が、近年EBウイルス(EBV)関連腫瘍であることが明らかになってきた。しかしながら、本疾患では、広範に組織が壊死に陥り、腫瘍細胞以外に炎症性細胞が混在しているために、十分な生検材料を得ることができず、遺伝子解析研究が進んでいない。</p> <p>本論文提出者の長門氏は、鼻性NK/T細胞リンパ腫患者から、ごく最近樹立されたSNK-6、SNT-8の2つの細胞株を用いて、遺伝子解析を行い、サイトカインの発現を検討し、癌化発</p>			

症のメカニズムの解明を目指した。

方法としては、鼻性NK/T細胞リンパ腫の患者検体と、本疾患の細胞株である SNK-6, SNT-8 を用いて、cDNA array を行い、各遺伝子の発現を比較検討した。その中で、IL-9 の発現が増加していたことから、RT-PCR 法により、細胞株と末梢単核球において、IL-9, IL-9R $\alpha$ , IL-2R $\gamma$  の検討を行った。次に蛋白レベルの解析を、IL-9 では、細胞の培養上清を用いて ELISA 法で、IL-9R においては Flowcytometry を用いて解析した。また、IL-9 の機能を明らかにする目的で、上記細胞株に、rhIL-9 と IL-9 抗体を添加して、MTT アッセイを行った。最後に、実際の患者の鼻性NK/T細胞リンパ腫組織において、免疫組織化学染色とウイルス抗原染色を行い、その血清中の IL-9 を定量した。

結果として、種々の細胞株のなかで、とくに SNK-6, SNT-8 において、IL-9 mRNA と蛋白発現のあることを明らかにした。さらに、同じ細胞株に、IL-9R の mRNA と蛋白の発現を見出し、リコンビナントヒト IL-9 を用いた、同細胞株への添加培養実験の結果、オートクライン作用を明らかにした。実際の患者から得られた組織においても、患部の全例に EBV の遺伝子発現があることさらに高率に血中 IL-9 蛋白が存在することを明らかにした。

以上より、EBV 依存性に引き起こされる、鼻性NK/T細胞リンパ腫では、サイトカインである IL-9 が常時産生され、そのオートクライン作用により、IL-9 が病態形成に重要な役割をもつ可能性を明らかにした。

本研究結果は、鼻性NK/T細胞リンパ腫の病態メカニズムばかりか、その新しい治療法への展開を導くものであり、本分野の研究発展に多大の寄与をするものであると考える。

なお、論文提出者に対する試問審査においても適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることを確認した。

以上の結果から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位に値するものと判定した。